

RAFAEL RAMOS CAIADO

**ANÁLISE E APLICABILIDADE DO CORANTE COMPOSTO POR
ANTOCIANINAS DO FRUTO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM
CROMOVITRECTOMIA EM HUMANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do título de Doutor em Ciências pelo
Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia.

São Paulo

2019

RAFAEL RAMOS CAIADO

**ANÁLISE E APLICABILIDADE DO CORANTE COMPOSTO POR
ANTOCIANINAS DO FRUTO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM
CROMOVITRECTOMIA EM HUMANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do título de Doutor em Ciências pelo
Programa de Pós-Graduação em Oftalmologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Maia

Coorientador: Prof. Acacio Souza Lima-Filho

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ramos Caiado, Rafael

Análise e Aplicabilidade do Corante Composto por Antocianinas do
Fruto do Açaí (*Euterpe oleracea*) em Cromovitrectomia em Humanos /
Rafael Ramos Caiado. - São Paulo, 2019.
xv, 77f.

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

Título em inglês: Analysis and Applicability of the Dye Composed of
Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*) in
Chromovitrectomy in Humans.

1. Retina. 2. Cromovitrectomia. 3. Açaí (*Euterpe oleracea*). 4.
Antocianinas.

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

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Mauro Silveira de Queiroz Campos

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Augusto Paranhos Jr

RAFAEL RAMOS CAIADO

**ANÁLISE E APLICABILIDADE DO CORANTE COMPOSTO POR
ANTOCIANINAS DO FRUTO DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM
CROMOVITRECTOMIA EM HUMANOS**

Presidente da banca:

Prof. Dr. Mauricio Maia

BANCA EXAMINADORA

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

*Dedico esse estudo à minha esposa, **Ana Carolina**, pela parceria de sempre, pelo apoio incondicional, por ser um exemplo de mãe e com quem amo compartilhar a vida. Às minhas filhas, **Marina** e **Gabriela**, meus amores.*

Agradecimentos

Aos meus pais, **Dr. Roberto Caiado** e **Sra. Dalva Procópio**, por me passarem os mais importantes fundamentos da vida e por cultivarem valores que se tornaram os alicerces na formação do meu caráter.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mauricio Maia**, meu respeito, minha admiração e meu sincero agradecimento pela oportunidade de confiar a mim este estudo em 2014. Você foi o motor de todo esse processo e é com grande orgulho que divido esta obra. Obrigado pelo exemplo de energia e por seu otimismo que acompanharam cada passo dessa caminhada.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Acácio Alves de Souza Lima-Filho**, pelo brilhantismo e por seus ensinamentos. Sua amizade e a oportunidade de trabalharmos juntos foram além das orientações prestadas, envolvendo análises laboratoriais e fracionamento do medicamento. Você é um exemplo de vida.

Minha querida parceira de estudo, **Cristiane Peris**, por sua dedicação e persistência.

Ao **Prof. Dr. André Maia**, pelo incentivo e oportunidade. Foi dele o convite para a UNIFESP. Ao **Prof. Dr. Eduardo Rodrigues**, pela amizade e pelos ensinamentos. À **Profa. Dra. Sung Eun Song Watanabe** e à **Profa. Dra. Rita Sinigaglia Coimbra**, pelos ensinamentos em eletrofisiologia ocular e em microscopia.

Aos colegas oftalmologistas, **Dr. Emmerson Badaró** e **Dr. Eduardo Novais**, pela amizade e parceria desde os meus primeiros passos iniciados em um bate-papo no centro cirúrgico até a conclusão do último estudo.

À **Universidade Federal de São Paulo** e ao **Departamento de Oftalmologia**, meu mais sincero agradecimento pela acolhida tanto como pós-graduando quanto como preceptor cirúrgico, pelas oportunidades geradas, pelo crescimento profissional e pela infraestrutura física e intelectual concedidas para a realização deste e de outros projetos.

A **todos os pacientes e seus familiares** envolvidos nesta linha de pesquisa, meu muito obrigado pela confiança e pelo respeito que sempre pautaram nossas relações, bem como pelas amizades que dali floresceram.

Esta tese deu origem às seguintes publicações:

1. Peris CS, Caiado RR, Souza Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves MB, de Queiroz Alves B, Palma Urushima JG, Ragazzi R, Maia M. Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): A potencial novel vital dye for chromovitrectomy. J Ophthalmol. 2018;2018:6830835.
2. Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais EA, Badaró E, Maia A, Sinigaglia-Coimbra R, Watanabe SE, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M. Retinal toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in Rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans. Curr Eye Res. 2017;42(8):1185-93.
3. Caiado RR, Peris C, Rodrigues EB, Farah ME, Maia A, Magalhães O Jr, Novais E, Lima-Filho AS, Maia M. A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2019 Jan 3. doi: 10.1007/s00417-018-04204-y. [Epub ahead of print].

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos	vi
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas	x
Lista de siglas e abreviaturas	xi
Resumo	xii
Abstract	xiv
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	6
3 ARTIGOS	8
3.1 Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (<i>Euterpe oleracea</i>): a potential novel vital dye for chromovitrectomy.....	8
3.2 Retinal toxicity of Acai Fruit (<i>Euterpe oleracea</i>) dye concentrations in rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans.....	18
3.3 A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (<i>Euterpe oleracea</i>) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results.	29
4 DISCUSSÃO.....	44
4.1 Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (<i>Euterpe oleracea</i>): a Potencial Novel Vital Dye for Chromovitrectomy.....	44
4.2 Retinal Toxicity of Acai Fruit (<i>Euterpe oleracea</i>) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans.....	46
4.3 A New Dye Based on Anthocyanins from the Acai Fruit (<i>Euterpe oleracea</i>) for Chromovitrectomy in Humans: Clinical Trial Results	50
4.4 Perspectivas Futuras	53
5 CONCLUSÕES	55
5.1 Considerações finais	55
6 REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	61
Bibliografia consultada	78

Lista de figuras

- Figura 1.** Estrutura molecular básica das antocianinas45
- Figura 2.** Sumário de todo o sistema utilizado para realização da eletrorretinografia. Os três eletrodos estão em destaque e posicionados à direita do coelho - A. eletrodo estimulador posicionado na córnea do animal; B. eletrodo negativo posicionado periocular; C. eletrodo terra posicionado na orelha do animal.....47
- Figura 3.** Achados retinianos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) 24 horas e 7 dias nos olhos controle e após injeção intravítrea do corante a 35% do corante à base do fruto do açaí. Diferentes camadas retinianas mostradas para representar os olhos controle e após 24 horas e 7 dias. Vinte e quatro horas após a injeção intravítrea, há um discreto edema de células ganglionares e desarranjo mitocondrial (B). A presença de corpos multilamelares mais proeminentes com 7 dias (C-seta). Na camada nuclear interna, observa-se danos nos feixes nervosos (E -asterisco), alteração mitocondrial (E e F - Cabeça da seta) e abundantes corpos multilamelares (F - seta). Ausência de anormalidades observadas na camada nuclear externa (H, I). Os segmentos internos e externos dos fotorreceptores não apresentaram anormalidades relevantes, mas houve um desarranjo na crista mitocondrial no segmento interno dos fotorreceptores com 24 horas (K - seta larga), sendo observado com menor expressão com 7 dias (L - seta larga)48
- Figura 4.** Questionário, tabela e gráfico com perguntas e respostas dos cirurgiões após procedimentos usando o corante extraído do açaí.....52

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Quantificação das antocianinas com base no tempo de retenção da área, o qual foi analisado por CLAE nas diferentes concentrações46
- Tabela 2.** Descrição e análise comparativa (Kruskal-Wallis) da eletrorretinografia de campo total em coelhos, após 7 dias da injeção intravítrea de SSB nos olhos controle e de diferentes concentrações do corante do Açaí nos olhos testados47

Lista de siglas e abreviaturas

AFG	Angiofluoresceinografia ou angiografia fluoresceínica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBG	Brilliant Blue G (em português, azul brilhante G)
BM	Buraco macular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
EMD	Edema Macular Diabético
EPM	Escola Paulista de Medicina
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ERG	Eletrorretinografia
ICG	<i>Indocyanine Green</i> (em português, indocianina verde)
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
LM /ML	<i>Light microscopy</i> (em português, microscopia óptica)
MER	Membrana epirretiniana
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MLI	Membrana Limitante Interna
mOsm	Miliosmol
MS	<i>Mass spectrometry</i> (em português, espectrometria de massa)
OCT/TCO	<i>Optical Coherence Tomography</i> (em português, tomografia de coerência óptica)
PIO	Pressão Intraocular
SSB	Solução Salina Balanceada
TEM /MET	<i>Transmission electron microscopy</i> (em português, microscopia eletrônica de transmissão)
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

Resumo

Objetivo: Caracterizar e quantificar as antocianinas do corante extraído do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*), avaliar sua segurança em um modelo animal e testar sua aplicabilidade em cromovitrectomia em humanos. **Métodos:** No estudo 1, amostras de três concentrações de 10%, 25% e 35% do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*), equivalentes a 100 mg, 250 mg e 350 mg de amostras liofilizadas, foram diluídas em 1 ml do tampão fosfato para obter um pH de 7 e uma miliosmolaridade de 300 mOsm. Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta *performance* (CLAE), com base na espectrometria de massa de antocianinas obtidas previamente, para caracterizar e quantificar as antocianinas presentes no novo corante. No estudo 2, 18 coelhos receberam injeções intravítreas com as concentrações de 10%, 25% e 35% do corante do açaí. Olhos controle receberam solução salina balanceada (SSB). Foram realizados, antes das aplicações, após 24 horas e depois de 7 dias, análise da eletrorretinografia (ERG), retinografia, angiofluoresceinografia (AFG), tomografia de coerência óptica (OCT), microscopia óptica (LM) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). No estudo 3, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo e do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) para o protocolo do estudo clínico das fases I/II, 25 pacientes foram selecionados. **Critérios de inclusão:** pacientes diagnosticados com buraco de mácula idiopático, de ambos os sexos, maiores de 18 anos. **Critérios de exclusão:** glaucoma prévio, uveíte ativa, outras condições oculares exceto buraco de mácula que poderiam afetar ou limitar resultados pós-operatórios. **Técnica cirúrgica:** Todos os pacientes foram operados pela técnica de vitrectomia padrão, utilizando quatro esclerotomias e um sistema de 23-*gauge* com iluminação acessória. Pacientes fácicos foram submetidos à cirurgia de facoemulsificação com implante de lente intraocular, seguido por descolamento da hialoide posterior e *peeling* (remoção) da Membrana Limitante Interna (MLI) e guiado pelo corante do açaí a 25%. Imediatamente após os procedimentos, um questionário sobre a habilidade de o corante pigmentar a hialoide posterior e a MLI foi entregue aos dez cirurgiões que realizaram as 25 cirurgias. A toxicidade do corante foi analisada por exames anatômicos e funcionais antes da cirurgia e nos dias 1, 30 e 180. A análise anatômica dos olhos testados incluiu acuidade visual, tonometria, biomicroscopia, fundoscopia, retinografia, AFG, OCT e angiotomografia por coerência óptica. A análise funcional foi realizada com ERG. Foram usados o teste *t-student* e a análise de

variância (ANOVA) com medidas repetidas, e os valores de $p < 0,05$ foram significantes.

Resultados: Estudo 1 mostrou a presença de cinco moléculas diferentes de antocianinas independentemente da concentração do corante do açaí, na seguinte proporção: cianidina-3-O-glucosídeo > homoorientina > orientina > taxifolina > isovitexina. No estudo 2, em coelhos, a retinografia, com 24 horas, mostrou uma elevada opacidade vítrea com o aumento da concentração do corante. AFG e OCT não revelaram toxicidade em nenhuma das concentrações. ERG apresentou amplitudes reduzidas para onda-b em todas as concentrações comparada com a análise *baseline*. As medianas das amplitudes da onda-b diminuíram sem significância e a latência aumentou para as concentrações de 10% e 25%. Esses achados foram significantes para a concentração de 35%. LM e MET não mostraram anormalidades para 10% e 25%. MET, na concentração de 35%, revelou edema de células ganglionares em 24 horas com melhora em 7 dias. Vacuolização, corpos multilamelares e danos de feixes nervosos ocorreram em 24 horas e em 7 dias na camada nuclear interna. A ruptura da crista mitocondrial surgiu no segmento interno dos fotorreceptores em 24 horas, mas regrediu após 7 dias. No estudo 3 (em humanos), independentemente dos períodos testados, não foram identificados anormalidades funcionais nem anatômicas. Os resultados anatômicos mostraram uma taxa de fechamento de mácula em 19 dos 25 olhos operados. Todos os cirurgiões relataram que o corante na concentração de 25% pigmentou a hialoide posterior e a MLI com uma cor roxa. Os resultados do estudo clínico nas fases I/II, após seis meses, mostraram que o corante foi útil e seguro na identificação da hialoide posterior e do *peeling* da MLI em cromovitrectomia em humanos. **Conclusões:** O corante extraído do fruto do açaí é principalmente composto por antocianina cianidina-3-O-glucosídeo. O corante do açaí nas concentrações de 10% e 25% foi usado com segurança em coelhos. Após seis meses, os resultados clínicos em humanos (fases I/II) revelaram que o novo corante, com base nas antocianinas do fruto do açaí na concentração de 25%, foi seguro e eficiente para ser usado na identificação da hialoide posterior e da MLI durante a cirurgia vitreoretiniana em humanos. Esse corante roxo pode ser uma alternativa para a cromovitrectomia e estudos adicionais são necessários.

Abstract

Purpose: This study aimed to analyze the anthocyanin content and test the applicability of a novel dye extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) in chromovitrectomy in humans. **Methods:** Ophthalmos Pharmaceutical Industry S/A (São Paulo, Brazil) developed three concentrations of the acai dye (10%, 25% and 35%) equivalent to 100, 250 and 350 mg of lyophilized acai pulp samples that were diluted in 1 ml of phosphate buffer solution (pH 7 and 300 mOsm). In the first study, the lyophilized acai pulp samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using cyaniding 3-O-glucoside, hemoorientin, and orientin and mass spectrometry (MS) to identify and compare color dye distinctions. Mass spectrometry was used to identify and compare the dye concentrations for five isolated basic anthocyanin molecules. In study 2 rabbits were injected intravitreally with 10%, 25% and 35% concentrations of the acai dye. Control eyes received balanced salt solution (BSS). Electroretinogram (ERG), fundus imaging, fluorescein angiography (FA), optical coherence tomography (OCT), light and transmission microscopy (LM/MET) were performed. In study 3 the ethics committee of the Federal University of São Paulo and the National Council of Research (CONEP) approved the study protocol of a phase I/II clinical trial in 25 human eyes. **Inclusion criteria:** Patients diagnosed with idiopathic macular hole, of both genders, older than 18 years. **Exclusion criteria:** previous glaucoma, active uveitis, ocular conditions other than macular holes that could affect or limit the postoperative results and previous ocular surgeries other than uncomplicated cataract. **Surgical technique:** twenty-three-gauge four-port PPV + phacoemulsification (if phakic eyes) followed by both posterior hyaloid detachment and ILM peeling guided by 25% acai fruit dye staining as well as perfluoropropane injection and 5 day prone positioning. A questionnaire about the ability of the dye to stain the posterior hyaloid and ILM was given to the 10 surgeons that performed the 25 surgeries immediately after the procedures. Dye toxicity was analyzed by anatomic and functional examinations before surgery and at days 1, 30 and 180. The anatomic analysis of tested eyes included best-corrected visual acuity, tonometry, biomicroscopy, funduscopy, fundus imaging, FA, OCT and optical coherence tomography angiography. Functional analysis was performed by ERG. Student's *t* test and Analysis of Variance (ANOVA), with repeated measures, was used and *p*-values <0.05 were significant. **Results:** Study 1 showed the presence of five

different anthocyanin molecules in all three concentrations of the acai dye: cyanidin-3-0-glucoside > homoorientin > orientin > taxifolin > isovitexin. In study 2, using a rabbit model, fundus imaging showed increased vitreous opacity with increased dye concentrations. FA and OCT showed normality in all concentrations. Comparison between BSS and dye concentrations were analyzed using Kruskal-Wallis and Mood's median test ($p < 0.05$). At 24h, ERGs showed reduced amplitudes from baseline in all eyes. Median b-wave amplitudes nonsignificantly decreased and latency increased with 10% and 25%; findings were significant ($p < 0.05$) for 35%. LM and TEM showed no abnormalities for 10% and 25%. With 35%, TEM showed ganglion cell edema at 24 h that resolved after 7 days. Vacuolization, multilamellar bodies, and nerve bundle damage occurred at 24 h/7 days in the inner nuclear layer. Mitochondrial cristae disruption occurred in the inner photoreceptor segment at 24 h that decreased by 7 days. In Study 3 (clinical trial in humans) showed no abnormalities after both anatomical and functional analysis independent on the tested times. The anatomical outcomes showed a closure rate of 19 out of 25 operated eyes. All surgeons reported that the acai fruit dye at a 25% concentration stained the posterior hyaloid detachment and the ILM with a purple color. **Conclusions:** The acai dye extracted from the acai fruit is mainly composed of the anthocyanin cyanidin-3-0-glucoside. The acai dye in the concentrations of 10% and 25% were safe in rabbits. Six months results of a phase I/II trial showed that the new dye based on the anthocyanins from the acai fruit in a 25% concentration was safe and useful for identifying both posterior hyaloid and ILM during vitreoretinal surgery in humans. This purple dye may be an alternative to chromovitrectomy and additional studies are necessary.

1 INTRODUÇÃO

Envolvendo técnicas complexas e delicadas, a cirurgia vitreoretiniana trata de doenças, como o buraco macular (BM), a membrana epirretiniana (MER) e o edema macular diabético (EMD).^(1,2) A cromovitrectomia é uma dessas técnicas que incluem o uso de corantes compostos de pigmentos vitais ou cristais para melhorar a visibilização durante a cirurgia de vitrectomia. Uma boa impregnação do corante favorece o resultado cirúrgico por facilitar procedimentos, como a remoção cirúrgica da membrana limitante interna (MLI) e a MER, além da remoção vítrea completa.⁽³⁻⁵⁾

Os corantes são compostos químicos que se agregam a várias substâncias *in natura* para produzir cor.⁽⁶⁾ Quando os corantes tingem tecidos ou células vivas, são chamados de corantes vitais.⁽⁷⁾ Os corantes atualmente mais utilizados em cirurgia vitreoretiniana, a indocianina verde (ICG) e o azul brilhante G (BBG), facilitam a identificação e a remoção da membrana limitante interna.⁽⁸⁾

A ICG tem importante papel como pioneira para remoção da MLI. No entanto, devido seu conhecido perfil de toxicidade, a recomendação atual para cromovitrectomia é a não utilização da ICG, especialmente na cirurgia de buraco macular.⁽⁹⁻¹¹⁾

O BBG é um corante sintético que foi certificado como corante alimentar na Europa e pode ser usado como marcador do coração e dos vasos sanguíneos e de proteínas em doenças neurológicas.⁽¹²⁾ Dados sobre a utilização do BBG para cromovitrectomia e cirurgia de catarata foram primeiramente publicados em 2006.⁽¹³⁾ Exceto pelos Estados Unidos, é o corante mais utilizado na atualidade para a pigmentação da MLI. No entanto, o uso *in vitro* do BBG revelou toxicidade celular dose-dependente.⁽¹⁴⁾ Apesar da boa afinidade do BBG pela MLI em olhos humanos, a migração inadvertida sub-retiniana do corante em um procedimento de remoção da MLI resultou em “defeitos em janela” na angiofluoresceinografia, sugerindo anormalidades atróficas do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR).⁽¹⁵⁾

O acetato de triancinolona, livre de preservantes e micronizado, possibilita a identificação do vítreo através da deposição de cristais e é um dos corantes mais seguros empregados atualmente.⁽¹⁶⁾ Os corantes azul trypan e o azul patente são outras opções de corantes usados em cromovitrectomia. Enquanto o acetato de triancinolona é limitado a deposição na hialoide posterior/vítreo, o azul trypan e azul patente pigmentam MERs mas possuem afinidade limitada para MLIs.⁽¹⁷⁾

Até o momento não há um corante estabelecido como ideal para ser utilizado em cirurgias vitreoretinianas. A busca por esse corante ideal tem como base um pigmento com baixo potencial oxidativo e uma capacidade pigmentar seletiva e efetiva em relação à MLI e/ou à MER, bem como tem a capacidade de se depositar sobre a hialoide posterior.⁽¹⁸⁾

O uso de corantes naturais foi sugerido como coadjuvante na visualização das estruturas pré-retinianas e de membranas. Entre eles, podemos citar as antocianinas, que são corantes naturais encontrados em uvas, *blueberries*, frutos do açaí e em qualquer outro fruto com coloração roxa. Sabe-se que uma das características das antocianinas é a de seu efeito antioxidante natural.^(19,20)

O fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) é originado de uma árvore nativa da floresta amazônica e tem sido amplamente distribuído em razão de suas excelentes propriedades nutricionais. É um alimento calórico, rico em proteínas, gorduras poli-insaturadas, carboidratos e antocianinas.⁽²⁰⁻²²⁾ As antocianinas presentes em sua composição são compostos reativos devido ao seu estado iônico, apresentando também uma grande sensibilidade a mudanças de temperatura e pH. O potencial antioxidante das antocianinas é dependente do número e posição dos grupo hidroxila e sua conjugação, assim como a presença de elétrons doadores no anel da estrutura, devido a capacidade que o grupo aromático possui de suportar o desemparelhamento de elétrons.⁽²³⁾ Estudos anteriores mostraram que as antocianinas do açaí podem inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e a atividade das ciclooxigenases 1 e 2.⁽²⁴⁾ Também tem sido sugerido que essas moléculas, por serem antioxidantes, apresentam a capacidade de quelar o oxigênio singlete que é liberado após a irradiação do corante pela luz durante a cirurgia vitreoretiniana.^(25,26)

As antocianinas extraídas do fruto do açaí, quando ajustadas a uma concentração de 0,5%, a um pH de 7,06 e a uma osmolaridade de 304 mOsm, resultaram em uma solução de coloração roxa.⁽²⁷⁾ Ao ser testada durante a cromovitrectomia em olhos cadavéricos, a solução identificou com facilidade a MLI, cuja pigmentação revelou-se arroxeadada.^(27,28) Esses estudos marcaram o início da linha de pesquisa atual que começou com a caracterização da composição de antocianinas presentes no pigmento extraído do açaí e terminou com a pesquisa clínica em humanos. O presente estudo também foi inovador pois é o primeiro a testar em humanos o uso de um corante natural isolado, típico da flora brasileira, em vitrectomia. Diante disso, a patente do uso intraocular das antocianinas do fruto do

açaí foi depositada como pedido nacional de Patente sob nº P11000244-8 A2 no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) com cessão de direitos para a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo da pesquisa atual foi testar a aplicabilidade do pigmento extraído do fruto do açaí para ser usado como corante em cromovitrectomia. A linha de pesquisa foi dividida em três estudos e incluiu uma etapa laboratorial, um estudo em coelhos e outro estudo clínico em humanos, com os seguintes objetivos:

- (1) Classificar e quantificar as antocianinas presentes no pigmento extraído do fruto do açaí nas concentrações 10, 25 e 35%.
- (2) Testar a toxicidade nas concentrações 10, 25 e 35% do corante extraído do fruto do açaí, usando um modelo em coelhos.
- (3) Avaliar clinicamente o perfil de segurança e a eficiência do corante na concentração de 25% para identificar a hialoide posterior e a MLI durante cromovitrectomia em humanos.

3 ARTIGOS

3.1 Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): a potential novel vital dye for chromovitrectomy.

Peris CS, Caiado RR, Souza Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves MB, de Queiroz Alves B, Palma Urushima JG, Ragazzi R, Maia M. Journal of Ophthalmology. 2018; 2018:6830835.

doi.org/10.1155/2018/6830833

Hindawi

Research Article

Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*): A Potential Novel Vital Dye for Chromovitrectomy

Cristiane S. Peris,¹ Rafael R. Caiado,¹ Acácio Alves Souza Lima-Filho,^{1,2} Eduardo B. Rodrigues,¹ Michel Eid Farah,¹ Mariana Batista Gonçalves,¹ Bruno de Queiroz Alves,¹ Joao Guilherme Palma Urushima,¹ Raul Ragazzi,^{1,2} and Mauricio Maia^{1,3}

¹Department of Ophthalmology, Federal University of São Paulo, Botucatu Street, 816–Vila Clementino, 04023-062 São Paulo, SP, Brazil

²Ophthalmos S/A, Brigadeiro Luís Antônio Avenue, 4830–Jardim Paulista, 01401-002 São Paulo, SP, Brazil

³Brazilian Institute of Fight Against Blindness, Otto Ribeiro Avenue, 901–Jardim Paulista, 19814-470 Assis, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Mauricio Maia; maiamauricio@terra.com.br

Received 10 March 2018; Accepted 17 May 2018; Published 19 July 2018

Academic Editor: Anat Loewenstein

Copyright © 2018 Cristiane S. Peris et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Purpose. To classify and quantify anthocyanins in a vital dye extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*), adjust pH and osmolarity, and perform lyophilization to develop a new chromovitrectomy dye. **Methods.** Three dye concentrations 10%, 25%, and 50% (equivalent to 100, 250, and 350 mg of lyophilized acai fruit pulp extract samples) were evaluated when diluted in 1 ml of phosphate buffered solution (pH 7 and 300 mOsm). The dye was analyzed by mass spectrometry and high-performance liquid chromatography (HPLC) to identify and quantify anthocyanins molecules. **Results.** The pH and osmolarity correction and lyophilization were performed without damaging the anthocyanin molecular structure. Mass spectrometry confirmed the presence of five anthocyanins in three concentrations of the dye. Cyanidin-3-O-glucoside was the major anthocyanin found. HPLC showed that the concentration of anthocyanin was similar, independent of the dye concentration tested. **Conclusions.** Lyophilization and the correction of pH and osmolarity (7.00 and 300 mOsm, resp.) were performed successfully. Five anthocyanins are present in the dye from the acai fruit. The major anthocyanin is cyanidin-3-O-glucoside. Independent of the dye concentration tested, the anthocyanin concentration was similar. Standardized chemical characteristics of this new dye may allow its use during chromovitrectomy in humans.

1. Introduction

Acai fruit (*Euterpe oleracea*) from the palm tree is native to the Amazon forest in Brazil. In addition to being one of the trees that produce palm hearts, the acai palm also produces a fruit with high nutritional properties and economic value for the food and cosmetic industries. The acai has been described as caloric and rich in proteins, unsaturated fatty acids, and sugars (Table 1) [1]. Carotenoids and anthocyanins are among the main components of the acai fruit [2–4]. Anthocyanins, derived

from flavonoids that are represented by the basic chemical structure C6-C3-C6 (Figure 1). The phenolic structure of anthocyanin provides an antioxidant effect due to electron donation or transference of hydrogen atoms.

It has been suggested that photosensitizing dyes used in chromovitrectomy could enhance phototoxicity by increasing levels of free radicals, creating a photoproduct that could be harmful to retinal cells. The antioxidant effects of anthocyanins theoretically could quench the singlet oxygen, which is released during chromovitrectomy [5–7]. The antioxidant property of acai dye, associated with its high affinity for the internal lining

Reference of nutritional values from 100 grams of acai (*Euterpe oleracea*) pulp on a diet of 2,500 kcal/day.

	13 g
	26 g
	34 g
Protein	227 g
Carbohydrate	56.4 g
Fiber	17 mg
Calcium	932 mg
Iron	45 mg
Phosphorus	286 mg
Sodium	17 mg
Potassium	174 mg
Energy	36 mg
Total value	349 kcal

Federal University of Para State, Brazil.

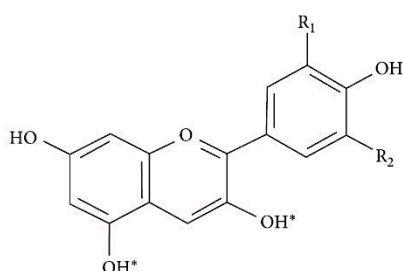


FIGURE 1: Basic molecular structure of the anthocyanins.

In 2017, our research group found that the 10% and 25% concentrations of the acai dye were safe when used in the rabbit model [9]. In this study, rabbits were injected intravenously with the acai dye in three concentrations: 5%, and 35%. Control eyes received balanced salt solution. Functional evaluations were performed using retinography while morphologic examinations were performed by fundus imaging, fluorescein angiography, optical coherence tomography, light microscopy, and transmission electron microscopy. The 10% and 25% dye concentrations from the acai fruit did not cause significant functional or morphological toxicity. However, the 35% concentration showed evidence of morphologic and functional abnormalities suggestive of temporary toxic effects at follow-up.

Therefore, the highest concentration of the acai fruit that was safe and effective in the rabbit model was 25%. This concentration was used for the sequence of a phase I/II clinical trial in 25 humans (unpublished data).

The objectives of the current study were to classify and identify the anthocyanins of the acai fruit dye in the concentrations of 10%, 25%, and 35%. This information will be the basis for further understanding the antioxidant potential of the acai dye.

Materials and Methods

TABLE 2: Gradient used for liquid chromatography analysis of major anthocyanins.

Time	Phase A (%)	Phase B (%)	Flow (mL/min)
0.0	95	5	1.00
5.0	95	5	1.00
20.0	5	95	1.00
25.0	95	5	1.00
27.0	95	5	1.00
35.0	95	5	1.00

anthocyanin powder to produce the concentrations of 10%, 25%, and 35%, respectively.

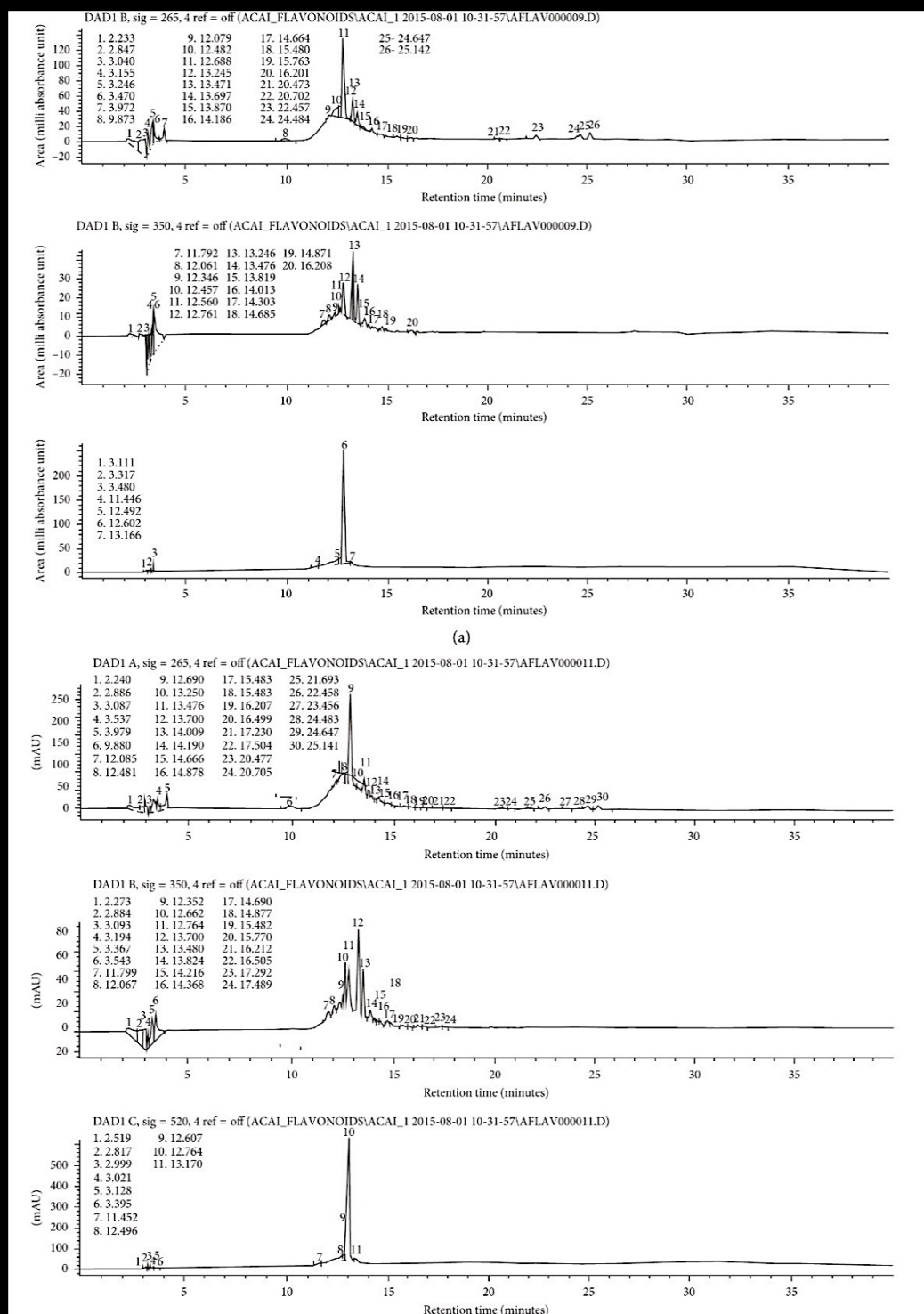
Ophthalmos SA (São Paulo, Brazil) developed the lyophilization process for the final dye preparation that comprised mainly of anthocyanins. This process was performed in a sterile environment, stabilized at -50°C for 24 hours, and diluted in 1 ml of polyvinyl alcohol in the 10%, 25%, and 35% concentrations. The pH of the natural extract was acidic [10]. Hence, both the pH and osmolarity (pH 7 and 300 mOsm) were controlled and established using one milliliter of phosphate-buffered solution (PBS). These concentrations also reflect the most suitable values obtained in preliminary studies in which factors such as staining capacity, pH, osmolarity, solubility, and stability were considered.

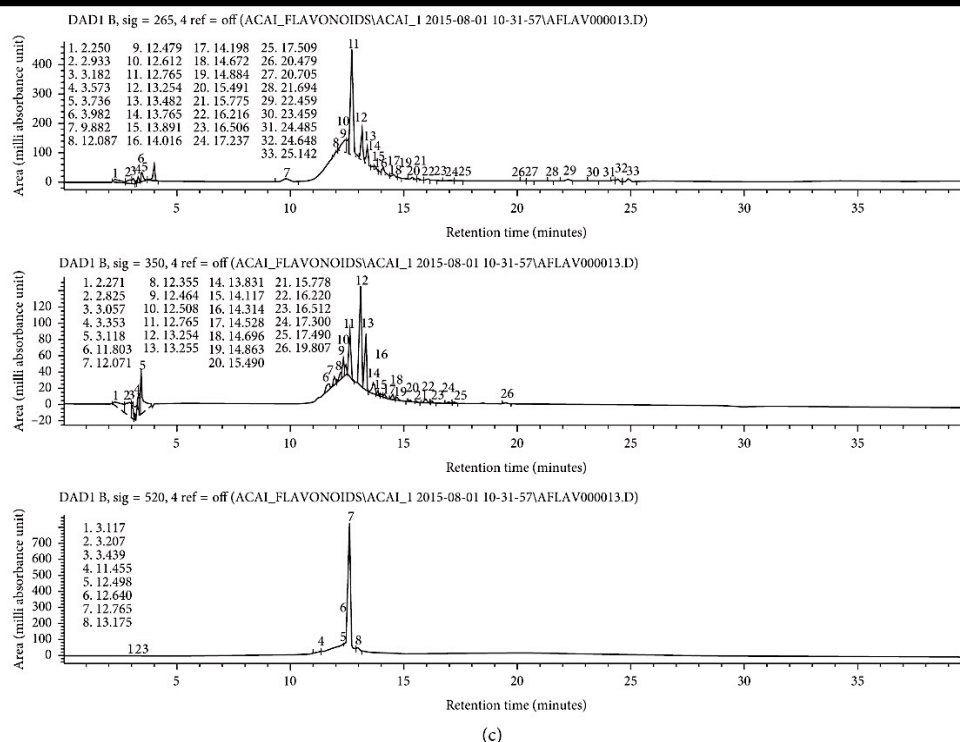
The lyophilized dye solutions were stored in depyrogenized amber flasks based on our previous results. Anthocyanin molecules are highly unstable and light exposure might modify the staining capacity of the dye [9]. Anthocyanins were then analytically characterized by mass spectrometry.

2.2. Mass Spectrometry. Twenty-five-milligram samples of the raw materials and final products were subjected to mass spectrometry to compare the specific molecules in lower and higher quantities. This analysis was based on a spectral database. SGB Chemical Consultant Ltda. (São Paulo, Brazil) which was blinded to the dye components, analyzed three lyophilized samples.

2.3. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Three microliters of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Vetec, Jundiaí, Brazil) and 7.0 mL of the solution from the mobile phase were added to the flasks with the dye concentrations. These were then put in an ultrasonic bath, and the extraction process continued for 10 minutes. The flasks were removed from the bath, and the solutions were filtered into 1.5 mL vials containing a filter 0.22 micrometer diameter. Finally, 20 μL was added to the HPLC stabilization system.

The analysis was performed using the 1260 Infinity liquid chromatography system and a diode array detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The separation methodology used a 5 μm 150 $\times$ 4.6 mm Agilent Ecl Column XDB C18 (Agilent Technologies). The mobile phase was a mixture of 0.1% trifluoroacetic acid in water and acetonitrile.





2: (a) A mass spectrometry graph of the 10% concentration of the vital dye extracted from the acai fruit. (b) A mass spectrometry graph of the 25% concentration of the vital dye extracted from the acai fruit. (c) A mass spectrometry graph of the 35% concentration of the vital dye extracted from the acai fruit.

reagents used water (produced with purified water permutation technique), trifluoroacetic acid (Vetec Technik GmbH, Speyer-am-Rhein, Germany), DMSO, acetonitrile HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). This study used the gradients listed in Table 2, thus enabling the detection of all anthocyanins in the same chromatogram. For the anthocyanin quantification using HPLC, it was necessary to obtain the anthocyanin profiles using mass spectrometry. This information was used to determine the chemical standards of the anthocyanins which were then obtained from ChromaDex Inc. (Irvine, CA).

The 25-milligram samples of the same major isolated anthocyanin molecules were used as comparative patterns from higher to lower quantities: cyanidin-3-O-glucoside, orientin, orientin, taxifolin, and isovitexin. The same amount (2.0 ± 0.20 mg) of the anthocyanin chemical standards was weighed in separate 10 mL volumetric flasks of each. Subsequently, 3 mL of DMSO was added to each and subjected to high-frequency ultrasound for 5 minutes until the mobile phase. The patterns were mixed and equilibrated with the mobile phase.

The anthocyanin concentrations were quantified by using an electrochemical detector. The 350-nanometer wavelength was identified by the detector showing

30% DMSO without being retained in the filter. Such standards were used to obtain the anthocyanin concentration for each concentration of the dye.

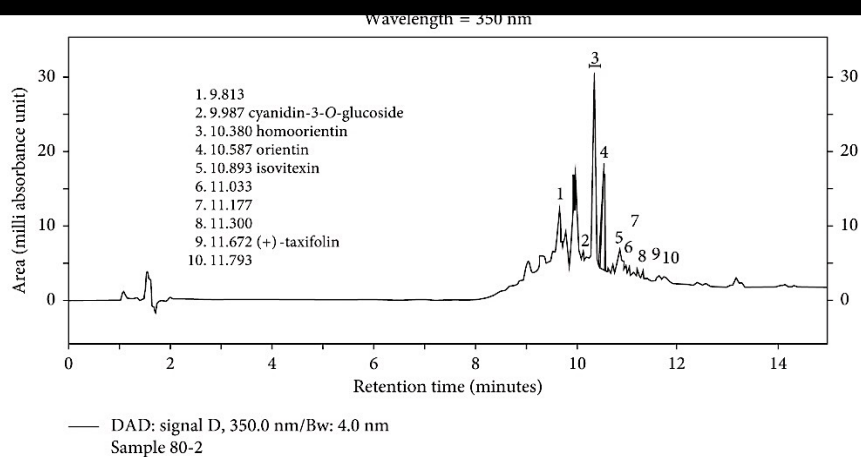
3. Results

3.1. pH and Osmolarity. Correction of pH and osmolarity and the lyophilization process were performed successfully.

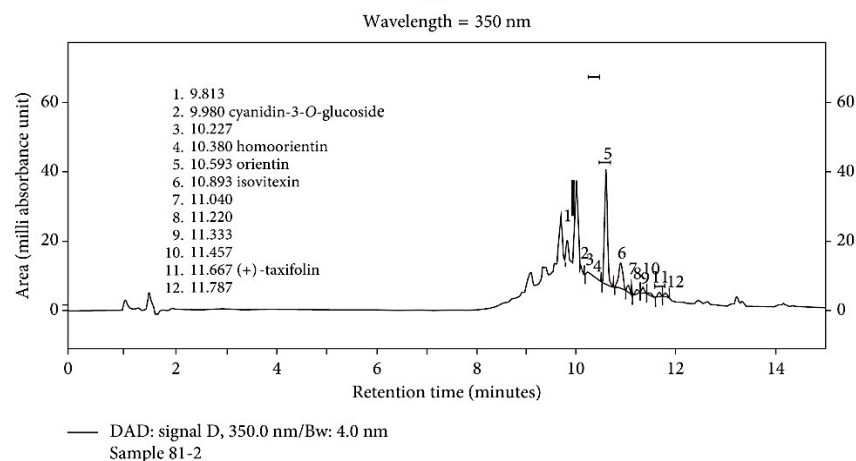
3.2. Mass Spectrometry. This analysis showed the presence of five anthocyanins in the vital dye of the acai fruit from low to higher quantities: taxifolin, orientin, isovitexin, hesperidin, and cyanidin-3-O-glucoside. Mass spectrometry analysis of the 10%, 25%, and 35% concentrations of the vital dye are shown in Figure 2.

3.3. HPLC. This analysis quantified the five major anthocyanins in the vital dye of the acai fruit in the three tested concentrations based on the retention time by area shown in the chromatographs (Figures 3(a)–3(c)). Results showed that the concentration of the anthocyanin was similar (Table 3).

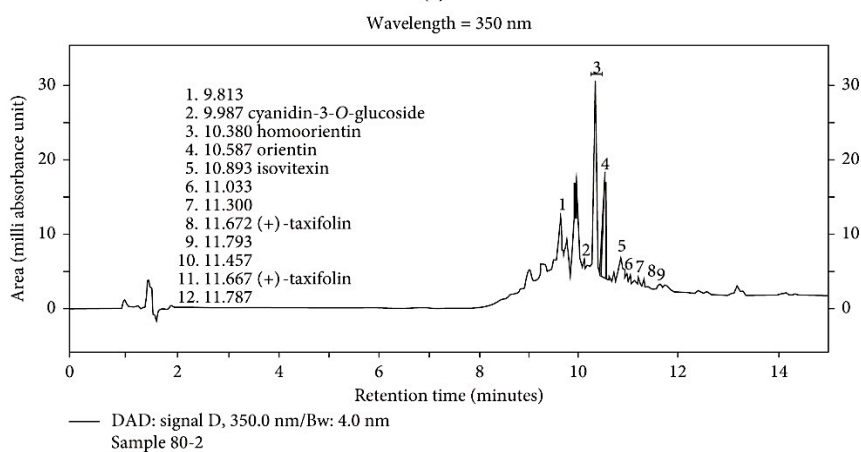
Chromatography results were compared with those of the isolated patterns, which facilitated the confirmation of



(a)



(b)

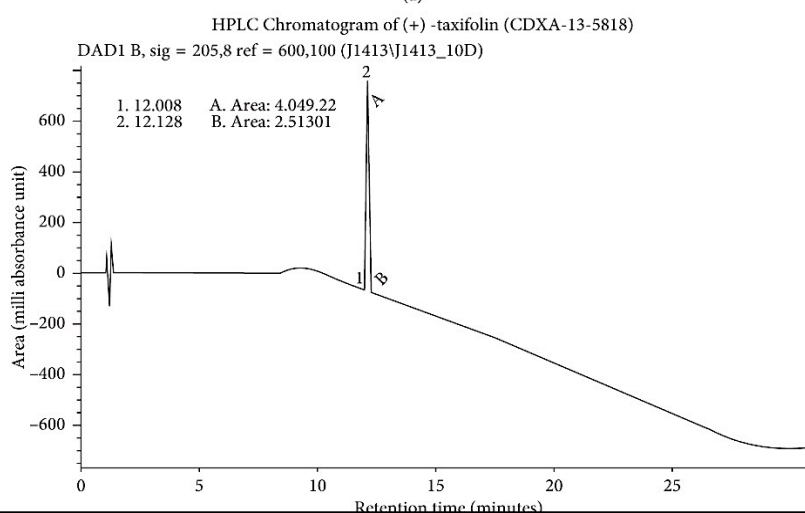
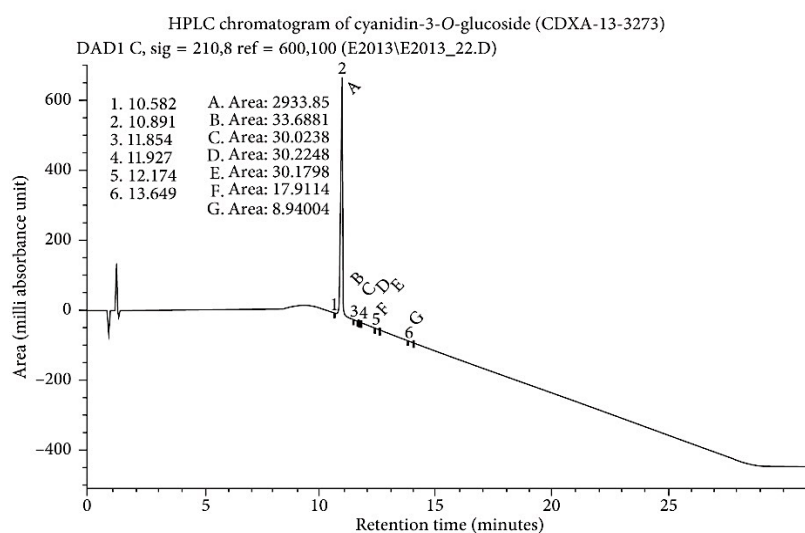


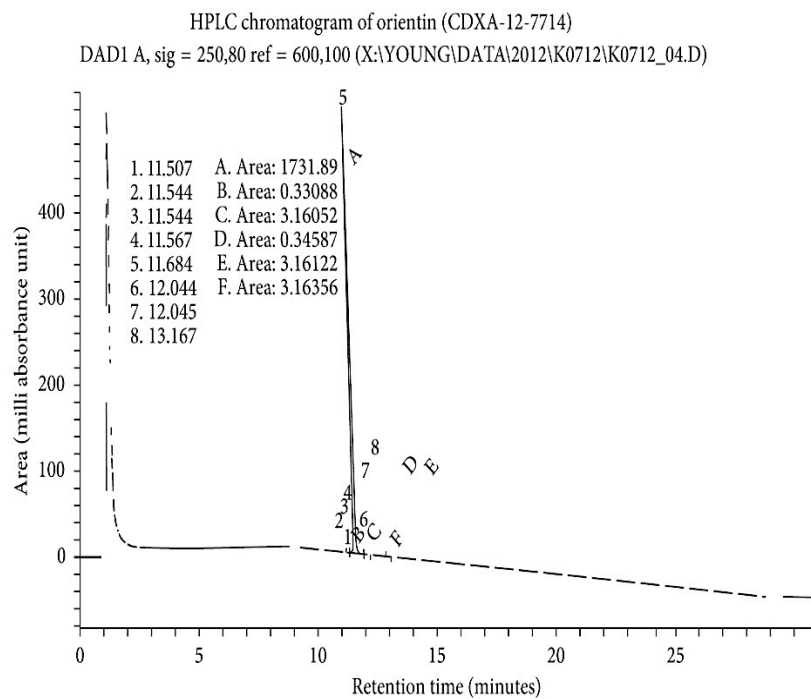
(c)

3: (a) A chromatograph of the 80-2 vital dye extracted from the acai fruit in a 10% concentration (equivalent to 100 n...
lized sample extracted from the acai pulp diluted in 1 ml PBS (pH 7.00; 300 mOsm). (b) A chromatograph of 81-2 vital dye extr

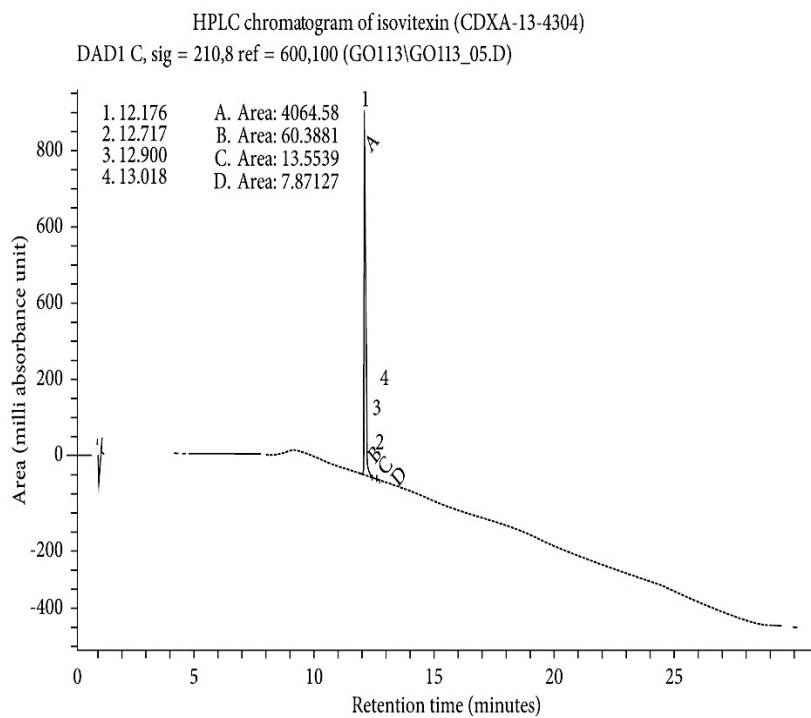
TABLE 3: Quantification of the anthocyanins based on the retention time by area of HPLC results at the three concentrations

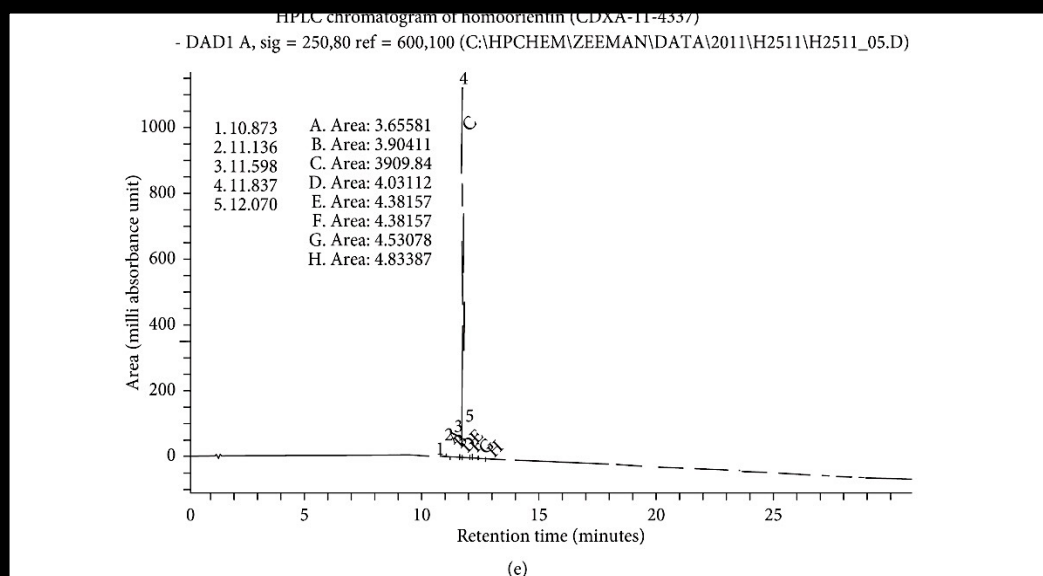
Anthocyanins	10% concentration	25% concentration	35% concentration
Cyanidin-3-O-glucoside			
Retention time (minutes)	9.987	9.980	9.973
Peak area (milli absorbance unit)	23.909	24.410	23.886
Quercetin			
Retention time (minutes)	10.380	10.380	10.380
Peak area (milli absorbance unit)	38.511	36.950	40.106
Delphinidin			
Retention time (minutes)	10.587	10.593	10.580
Peak area (milli absorbance unit)	22.945	22.784	23.988
Malvidin			
Retention time (minutes)	11.673	11.667	11.667
Peak area (milli absorbance unit)	0.966	0.894	0.998
Pelargonidin			
Retention time (minutes)	10.893	10.893	10.880
Peak area (milli absorbance unit)	6.755	6.737	6.194





(c)





4: (a) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of cyanidin-3-O-glucoside 25 mg. (b) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of taxifolin 25 mg. (c) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of orientin 25 mg. (d) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of isovitexin 25 mg. (e) A chromatograph of isolated anthocyanin molecules of homoorientin 25 mg.

Discussion

Açaí fruit is a multistemmed palm widely distributed in northern South America. The fruit varies a great deal in appearance of the plant, flowers, and fruiting production, which can be affected by genetic and environmental factors. Other factors can affect the anthocyanin composition of fruits and their pulp, such as the harvest, type of water quality, and spatial localization [11].

The current study aimed to characterize the physical-chemical composition of the anthocyanins present in the extract used in this research. The current data will be used to produce a standardized acai dye for use in chromovitrectomy that was first tested in cadaveric eyes [8] and [9] and now will be used in a phase I/II clinical trial in humans (unpublished data).

Mass spectrometry and HPLC identified and quantified the presence of five anthocyanins in the vital dye of the acai: cyanidin-3-O-glucoside, homoorientin, orientin, isovitexin, and taxifolin. Data showed that cyanidin-3-O-glucoside is the major anthocyanin. These findings agreed with previous studies that also found that cyanidin-3-O-glucoside was the major anthocyanin found in the acai [12, 13]. Results also showed that independent of the concentration of the acai dye, the anthocyanin concentration was similar (Table 3), and this result is probably because we used the same prime material.

We hypothesized previously [8] that the anthocyanins of acai fruit might have low potential for causing retinal and vitreous damage. Spectrophotometry analysis of

the wavelength of the light source, the higher the emission and consequently the more toxic the light source to the retina [7]. The high absorption peak of light from acai solution suggests that this dye might have a safer toxic profile regarding light absorption than other currently available dyes. A study that evaluated the absorbance spectra of nine vital dyes for chromovitrectomy found that most had two absorbance peaks, the first below 400 nm and the other in the visible light ranging from 400 to 700 nm [6].

In conclusion, the pharmacologic correction of the pH to 7.00 and osmolarity to 300 mOsm and the lyophilization process were successfully performed. The five major anthocyanins are present in the vital dye extracted from acai, the major one being cyanidin-3-O-glucoside. Independent of the concentration of the acai dye, the anthocyanin concentration was similar. These standard chemical characteristics of this new dye may allow its use during chromovitrectomy in humans. Further basic and clinical studies are needed to fully understand the role of acai dye anthocyanins and their antioxidant capacity.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Disclosure

The authors hold a patent related to the intraocular use of anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*). The patent

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil; and Pan-American Association of Ophthalmology/Pan-American Ophthalmological Foundation Kayser Global Award, Arlington, Texas. The authors are grateful to Rubens Belfort Jr., M.D., Ph.D., for providing supplies for the development of this study and to Carlos Belfort, M.D., Ph.D., for support regarding application for financial support at Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil.

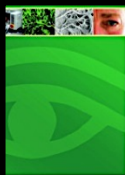
References

- [1] Rogez, A. *Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Cultura*. Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil, 2000.
- [2] Darnet, J. L. Serra, A. C. Rodrigues et al., "A high-performance liquid chromatography method to measure total phenols in açai pulp (*Euterpe oleracea*)," *Food Research International*, vol. 44, no. 7, pp. 2107–2111, 2011.
- [3] Del Pozo-Insfran, C. H. Brenes, and S. T. Talcott, "Physicochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 6, pp. 1539–1545, 2004.
- [4] S. M. Rufino, J. Pérez-Jiménez, S. Arranz et al., "Açaí (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil," *Food Research International*, vol. 44, no. 7, pp. 2100–2106, 2011.
- [5] S. Peris, E. Badaro, M. A. Ferreira et al., "Color variation and stability of the anthocyanins from açai fruit (*Euterpe oleracea*): potential new dye for vitreoretinal surgery," *Journal of Molecular Pharmacology and Therapeutics*, vol. 29, no. 8, pp. 746–753, 2013.
- [6] Costa Ede, E. B. Rodrigues, M. E. Farah et al., "Vital dyes and light sources for chromovitrectomy: comparative assessment of osmolarity, pH, and spectrophotometry," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 50, no. 1, pp. 385–391, 2009.
- [7] Yanagi, Y. Inoue, W. D. Jang, and K. Kadonosono, "A2E-mediated phototoxic effects of endoilluminators," *British Journal of Ophthalmology*, vol. 90, no. 2, pp. 229–232, 2006.
- [8] Chen, M. A. Ferreira, M. E. Farah et al., "Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from açai fruit (*Euterpe oleracea*) and 10 natural vital dyes: experimental study in cadaveric eyes," *Retina*, vol. 33, no. 11, pp. 89–96, 2013.
- [9] R. Caiado, C. S. Peris, A. A. S. Lima-Filho et al., "Retinal toxicity of açai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans," *Current Eye Research*, vol. 42, no. 8, pp. 1185–1193, 2017.
- [10] Gallori, A. R. Bilia, M. Bergonzi et al., "Polyphenolic powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 146, pp. 104–112, 2014.
- [11] A. V. Carvalho, "Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and commercial pulps," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 5, pp. 1467–1474, 2017.
- [12] K. K. Yamaguchi, L. F. Pereira, C. V. Lamas, E. S. Lima, V. F. da Veiga-Junior, "Amazon açai: chemistry and biological activities: a review," *Food Chemistry*, vol. 179, pp. 137–145, 2015.

3.2 Retinal toxicity of Acai Fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans.

Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais E, Badaró E, Maia A, Sinigaglia-Coimbra R, Watanabe SES, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M.

Curr Eye Res. 2017 Aug;42(8):1185-93.



ISSN: 0271-3683 (Print) 1460-2202 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/icey20>

Retinal Toxicity of Acai Fruit (*Euterpe Oleracea*) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans

Rafael R. Caiado, Cristiane S. Peris, Acácio Alves Souza Lima-Filho, Joao Guilherme Palma Urushima, Eduardo Novais, Emmerson Badaró, André Maia, Rita Sinigaglia-Coimbra, Sung Eun S. Watanabe, Eduardo B. Rodrigues, Michel Eid Farah & Mauricio Maia

To cite this article: Rafael R. Caiado, Cristiane S. Peris, Acácio Alves Souza Lima-Filho, Joao Guilherme Palma Urushima, Eduardo Novais, Emmerson Badaró, André Maia, Rita Sinigaglia-Coimbra, Sung Eun S. Watanabe, Eduardo B. Rodrigues, Michel Eid Farah & Mauricio Maia (2017): Retinal Toxicity of Acai Fruit (*Euterpe Oleracea*) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans, *Current Eye Research*, DOI: [10.1080/02713683.2017.1297995](https://doi.org/10.1080/02713683.2017.1297995)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/02713683.2017.1297995>



Published online: 11 May 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=icey20>

Retinal Toxicity of Acai Fruit (*Euterpe Oleracea*) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans

R. Caiado^a, Cristiane S. Peris^a, Acácio Alves Souza Lima-Filho^a, Joao Guilherme Palma Urushima^a, Joao Novais^a, Emmerson Badaró^a, André Maia^a, Rita Sinigaglia-Coimbra^{a,b}, Sung Eun S. Watanabe^c, Joao B. Rodrigues^a, Michel Eid Farah^a, and Mauricio Maia^{a,c}

^aDepartment of Ophthalmology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^bElectron Microscopy Center (CEME), Federal University of São Paulo, Brazil; ^cBrazilian Institute of Fighting Against Blindness (INBRACE), Assis/Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Purpose: Evaluate toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in a rabbit model.

Methods: Rabbits were injected intravitreally with 10%, 25%, and 35% acai dye concentrations. Control rabbits received balanced salt solution (BSS). Electroretinogram (ERG), fundus imaging, fluorescein angiography (FA), optical coherence tomography (OCT), and light and transmission electron microscopy (LM/TEM) were performed.

Results: Fundus imaging showed increased vitreous opacity with increased dye concentrations. FA and OCT showed normality with all concentrations. Comparisons between BSS and dye concentrations were analyzed using Kruskal–Wallis and Mood's median test ($p < 0.05$). At 24 h, ERGs showed reduced amplitudes from baseline in all eyes. Median b-wave amplitudes nonsignificantly decreased and latency increased with 10% and 25%; findings were significant ($p < 0.05$) for 35%. LM and TEM showed no abnormalities for 10% and 25%. With 35%, TEM showed ganglion cell edema at 24 h that resolved after 7 days. Vacuolization, multilamellar bodies, and nerve bundle damage occurred at 24 h/7 days in the inner nuclear layer. Mitochondrial cristae disruption occurred in the inner photoreceptor segment at 24 h that decreased by 7 days.

Conclusion: Ten and twenty-five percent concentrations were safe and may improve identification of the posterior hyaloid and internal limiting membrane during chromovitrectomy in humans.

ARTICLE HISTORY

Received 27 June 2018

Revised 11 January 2019

Accepted 14 February 2019

KEYWORDS

Acai fruit; anthocyanin; chromovitrectomy; *Euterpe oleracea*

Introduction

Retinal surgery involves complex techniques that may be used to treat diseases such as macular holes, epiretinal membranes, and diabetic macular edema.^{1–9} During chromovitrectomy, vital dyes or crystals are used intraoperatively to aid in the identification of intraocular tissues.^{10,11} Such dyes facilitate visualization and peeling of optically transparent tissues, such as internal limiting membrane (ILMs).^{3,6,12–14} Chromovitrectomy was first introduced in 2000, when the indocyanine green (ICG) was used to stain the thin, transparent ILM.¹⁴ Since then, many other dyes have become available for chromovitrectomy.¹⁵ Preservative-free micronized triamcinolone acetonide aids identification of the vitreous by crystal deposition and is one of the safest methods for managing vitreoretinal diseases.^{11,16,17} Trypan blue also became an alternative vital dye for use in chromovitrectomy.^{18–21} While triamcinolone acetonide is limited to deposition at the posterior hyaloid/vitreous, trypan blue and patent blue stain ERMs but have limited use for ILMs.^{19,20}

Although ICG was the first worldwide dye used during chromovitrectomy, ICG is associated with possible retinal

and retinal pigment epithelium (RPE) toxicity.^{5,8} A mechanism of this toxicity may be related to the oxidative effect of the ICG molecule and/or its carbolinic complex derivatives on the RPE cells.^{5,8,22,23} Synthetic brilliant blue G (BBG) has been used as an alternative for staining ILMs and, with the approval of the United States Food and Drug Administration, is currently the most frequently used dye worldwide for this purpose. However, *in vitro* use of BBG may lead to dose-dependent cellular toxicity.²⁴ Unintended subretinal migration of BBG during vitreoretinal surgery in humans that can damage the RPE also was reported.²⁵

The ideal vital dye should have minimal oxidative toxicity on tissues; the ability to reliably and selectively stain the posterior hyaloid, and/or ERMs; and be rapidly eliminated from the eye to avoid possible chronic toxic effects.¹ The search for the combination of these characteristics in a practically ideal dye has led to further research worldwide. Recently, two cadaveric eye studies have reported that a natural dye extracted from the Brazilian fruit acai (*Euterpe oleracea*) successfully enhanced visualization of the internal microstructures during vitreoretinal surgery.^{26,27} Another advantage of this dye is the high concentration of anthocyanins,^{27,28} which are purple flavonoids in vegeta-

© Mauricio Maia. retina@femaneet.com.br. Federal University of São Paulo, 822 Botucatu Street, Vila Clementino, 06023-062, São Paulo, SP. Links of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/icev.

ar stability.²⁹ We hypothesized that this characteristic result in development of a dye to improve identification posterior hyaloid and ILM during vitreoretinal surgery and may quench the singlet oxygen released during irradiation of the retina by the light probe, resulting in a dye useful during chromovitrectomy.^{26,27} The aim of the current study was to test the toxicity of the dye concentrations extracted from the acai fruit in a model. This initial research represents the landmark for testing this alternative vital dye, already tested by our research team, for human use.

Results

New Zealand albino rabbits (weight, 2–4 kg) were used in this study. The Ethics Committee of the Federal University of São Paulo approved this study (protocol number: 2689281013), following the guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology.

Surgical and examination procedures were performed under anesthesia using an intramuscular injection of 25 mg/kg of ketamine hydrochloride (Ketamina Agener, Brazil) and 5 mg/kg of body weight of xylazine hydrochloride (Calmun, Agener, Brazil). Mydriasis was obtained before the procedure by topical application of 0.5% tropicamide (Tropicyl, Alcon, Brazil) and eyes were topically anesthetized with 0.5% proxymetacaine hydrochloride (Anestalcon, Alcon, Brazil). Animals were euthanized under deep anesthesia with an intravenous injection of 70 mg/kg sodium pentobarbital.

Animals were excluded if there was a media opacity or corneal damage before the beginning of the study. The animals included in the study were divided randomly into groups according to the concentrations (10%, 25%, and 35%) of the *Antiarthron terpe oleracea* extract dye solution injected.

Dye preparation

The dye was prepared by SGB Indústria Farmacêutica S/A (São Paulo, Brazil) from the acai dye. The physical and chemical characteristics of the acai powder extract are shown in Table 1.

Anthocyanins, are flavonoids that are antioxidants in vegetable. Various anthocyanins differ according to the functional groups (hydrogen, hydroxyls, or methoxyls) position on the R1–R7.^{30,31} This unstable molecule has a central benzene ring that can quench its singlet oxygen. The mass and anthocyanin composition of the acai powder extract was obtained by request by SGB Consultoria Química LTDA (São Paulo, SP, Brazil). Data showed that the main anthocyanin (anthocyanidin) found in the acai powder extract was Cyanidin-3-O-glucoside.

The lyophilized dye was prepared in a sterile environment (grade A) and diluted in 1 mL of polyvinyl alcohol in concentrations of the acai fruit extract: 10%, 25%, and 35%. The pH of the natural extract was acidic. Hence, both temperature and osmolarity were controlled and established using a phosphate buffer. These concentrations also reflect the most reliable values obtained in preliminary studies^{12,26,27} and considered factors such as staining capacity, pH, osmolarity, solubility, and stability.

The osmolarity and pH were adjusted to about 300 mOsm/L and 7.00, respectively, using a diluted dye solution of anthocyanin in polyvinyl alcohol and phosphate buffer (Ophthalmos, São Paulo, Brazil). The dye solutions were lyophilized, sterilized, and stored in amber flasks based on our previous results that anthocyanin molecules are unstable.²⁷

Injection technique

Each rabbit received injections of 0.1 mL of dye solution in the right eye and 0.1 mL of balanced salt solution (BSS) (Alcon, Worth, TX) in the left eye. After placement of a lid speculum, a drop of topical 5% povidone-iodine was instilled in each eye, followed by BSS washout. The vitreous cavity was accessed through the superotemporal sclera 2 mm posterior to the limbus using a 27-ga needle (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) connected to a 1-mL syringe containing the dye solution or BSS. Eyes were immediately examined by indirect ophthalmoscopy; one drop of an antibiotic/steroid (0.5% moxifloxacin/0.1% dexamethasone) solution was instilled in each eye.

Table 1. Physical and chemical analysis of the acai powder extract.

Analysis	Results
Aspect	Thin hygroscopic powder
Color	Violet
Odor	Characteristic
Humidity (%)	3.6
Volumetric density (g/L)	487.79
Solubility in water	Soluble
Polyphenols	0.53
Heavy metals, As (ppm)	<0.1
Heavy metals, Cd (ppm)	<0.01
Heavy metals, Hg (ppm)	<0.005
Heavy metals, Pb (ppm)	<0.05
Heavy metals, Cu (ppm)	0.3
Acid-insoluble ashes (%)	0.26
Total ashes (%)	0.4

the handheld Ephios ABTM system (Ephios, Örebro, Sweden), electroretinogram (ERG) recordings were taken at baseline, 24 h, and 7 days after the intravitreal injections.

The rabbits were kept in a dark room for 30 min after the mydriasis was achieved and then placed on a heat pad during the experiment. Unipolar contact lenses ERG-electrode (Fabrinal SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) were placed on both corneas with 2% methylcellulose (Ophthalmo, São Paulo, Brazil).

A reference electrode filled with electrolytic gel was placed on the temporal canthus of the eyelid; the ground electrode, also filled with gel, was positioned on the earlobe. After a 30-min period of dark adaptation, the procedure was performed using two responses, dark-adapted 0.01 ERG (rod-cone) and dark-adapted 3.0 ERG (combined rod-cone response), following the parameters determined by previous studies.^{2,23,32–34} Light-adapted cone responses were not explored.

Readings were obtained for each step. The stimulus produced by each flash was 0.01 cd s/m² and interval between flashes for dark-adapted 0.01 ERG and 3.0 cd s/m² with interval of 10 s for dark-adapted 3.0 ERG. The working distance to the eye was standardized to 1 in. Examinations were monocular and performed at room temperature. The data were transferred to Mjølner software (1.3:0.5 and Eph-01 transfer program version 4.0 mc) and ODTM (Ephios, USA). The software determined the amplitude and latency of the b- and a-waves. Baseline recordings were compared to the responses at 24 h and 7 days after injection.

The data are presented as median and standard deviation. Baseline, 24-h, and 7-day comparisons between BSS and the three dye concentrations were analyzed using *t*-Wallis and *post hoc* analysis using Mood's median test. $P < 0.05$ was considered significant. All analyses were using Stata v.11 software (StataCorp, College Station, USA).

Retinal morphology

Imaging and fluorescein angiography (FA) were performed at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injection. Fundus imaging was performed to document the retinal thickness and follow formation of any vitreal opacity. The TRC camera (Topcon, Tokyo, Japan) was used for documentation.

FA was performed through a slow intravenous injection of 10% sodium fluorescein (Ophthalmos, São Paulo, Brazil) over 30 s in the marginal ear vein of the animals to detect a nitrogenous blood-barrier breakdown related to a fast leakage. Fundus photographs were taken using a Spectralis Device (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) a few seconds after injection and

Optical coherence tomography (OCT) was performed in the eyes of all animals at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injection using also Spectralis OCT (Heidelberg, Germany).

Histology

All animals were euthanized 24 h or 1 week after the intravitreal injection. A buffered solution of paraformaldehyde and glutaraldehyde 2.5% (pH 7.4) was injected immediately into the eyes for tissue fixation followed by enucleation. Tissues samples of about 4 mm were collected for processing from two different serial sections: 500 μ m inferior to the optic nerve and 4 mm from the optic nerve in the inferotemporal quadrant. This was followed by postfixation with 1% osmium tetroxide, ethanol dehydration, and rinsing in propylene glycol for posterior inclusion in epoxy resin (EPON 814, Epon, Hatfield, PA). Semi-thin serial sections (500 nm) were obtained and stained with 1% toluidine blue for light microscopy (LM) (NIKON Optiphot 2, Tokyo, Japan). Images were captured by a camera connected to a computer (Pixe PL-B873CF, Ottawa, Canada).

For transmission electron microscopy (TEM), ultrathin sections (70 nm) were disposed over copper grids and then contrasted with uranyl acetate and lead citrate for examination by electron microscopy at 80 kV (1200 EXII, Hitachi, Tokyo, Japan). Electron micrographs were obtained through a digital camera (MultiScan 791, GATAN, Pleasanton, CA).

Digital images obtained for LM or TEM were stored in a Dell workstation computer (Dell Inc., Aliso Viejo, USA) and transformed into TIFF format images with 300-pixel resolution with the aid of Adobe Photoshop software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA). This also was used for contrast/brightness adjustments and figure composition.

Results

Clinical observations

No abnormal or unusual findings were observed in any animal in the anterior and posterior segments.

ERG

No significant differences ($P > 0.05$) were seen in the median amplitude values in microvolts of dark-adapted 0.01 ERG, dark-adapted 3.0 ERG a-wave, and dark-adapted 3.0 ERG b-wave between groups at baseline and 7 days after injection (Tables 2 and 3).

The median amplitude values obtained at 24 h (Table 2) for dark-adapted 0.01 ERG ($P = 0.008$) and dark-adapted 3.0 ERG b-wave ($P = 0.007$) for tested groups differed significantly. Overall, the amplitude values decreased from baseline to 24 h and after 7 days for all concentrations with a

Opted 0.01 ERG	BSS	10%	25%	35%	p
Amplitude (μV)	135 (47–180)	114 (100–125)	121 (60–178)	137 (100–160)	
Latency time (ms)	55 (50–75)	61 (55–165)	60 (50–65)	60 (50–75)	
Amplitude (μV)	10 (6–40)	10 (7–16)	9 (5–12)	12 (10–13)	
Latency time (ms)	25 (13–25)	25 (20–25)	25 (20–25)	24 (13–25)	
Amplitude (μV)	216 (110–260)	210 (190–230)	175 (105–270)	183 (170–212)	
Latency time (ms)	45 (40–60)	45 (40–50)	50 (40–50)	47 (40–50)	

Values (minimum and maximum) of measurements prior to injection are presented.

Descriptive and comparative analysis (Kruskal–Wallis) of full field electroretinography (ERG) after 7 days.

Opted 0.01 ERG	BSS	10%	25%	35%	p
Amplitude (μV)	165 (87–210)	150 (120–220)	173 (65–280)	110 (58–250)	
Latency time (ms)	60 (50–60)	60 (20–70)	65 (60–70)	65 (60–80)	
Amplitude (μV)	8 (2–12)	8 (8–20)	5 (5–5)	10 (9–10)	
Latency time (ms)	25 (12–25)	25 (25–25)	25 (25–25)	25 (25–25)	
Amplitude (μV)	175 (144–265)	225 (170–280)	227 (190–265)	155 (138–180)	
Latency time (ms)	50 (20–50)	45 (45–50)	43 (40–45)	50 (34–53)	

Values (minimum and maximum) of measurements 7 days after injection are presented.

Descriptive and comparative analysis (Kruskal–Wallis) of full field electroretinography (ERG) after 24 h.

Opted 0.01 ERG	BSS	10%	25%	35%	p
Amplitude (μV)	165 (100–220)	100 (100–130)	70 (60–105)	54 (46–75)	
Latency time (ms)	70 (60–75)	70 (65–85)	70 (60–75)	75 (65–75)	
Amplitude (μV)	10 (8–15)	10 (8–12)	4 (4–5)	15 (4–27)	
Latency time (ms)	25 (13–25)	25 (25–25)	25 (20–25)	25 (25–25)	
Amplitude (μV)	200 (120–275)	160 (150–165)	90 (85–120)	73 (49–80)	
Latency time (ms)	50 (45–55)	40 (35–55)	55 (40–60)	44 (42–50)	

Values (minimum and maximum) of measurements 24 h after injection are presented.

Indicate the significance level of Kruskal–Wallis test comparing BSS and the different dye concentrations tested.

dark-adapted 3.0 ERG b-wave implicit time) did not significantly ($P > 0.05$) among groups at any of the time intervals (Tables 2–4). Overall, the latency values decrease markedly in individual cases.

Fundus imaging, FA, OCT

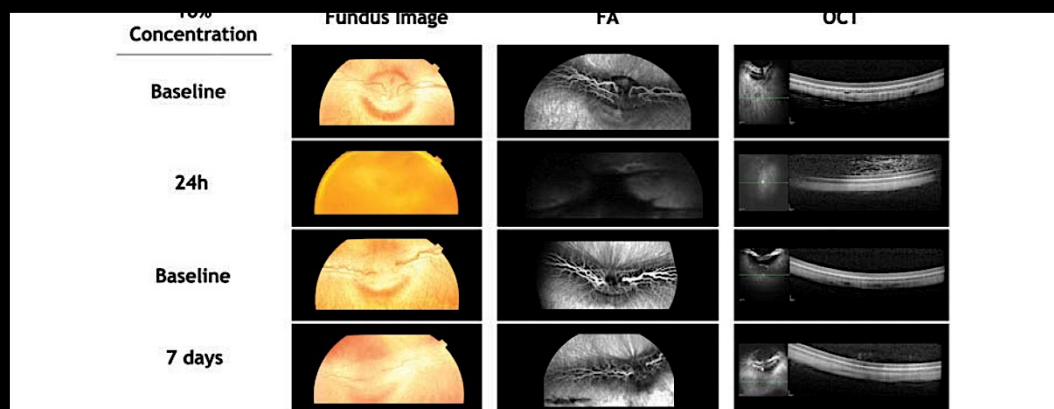
Figures 1–3, respectively, show the results of fundus imaging, FA, and OCT at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injection of the 10%, 25%, and 35% concentrations. Fundus imaging showed that independent of the concentration tested, the vitreous opacity decreased over time. FA showed similar behavior among the concentrations. Independent of the dye concentration used, at 24 h, all FA images had dense opacity that prevented image acquisition. At 7 days, the opacity decreased markedly and images for all concentrations were obtained. This examination did

not show disruption of the internal architecture, and no pigment epithelium complexes and reflectivity for both layers. Images obtained at 24 h showed vitreous opacity that was observed after 7 days for all concentrations.

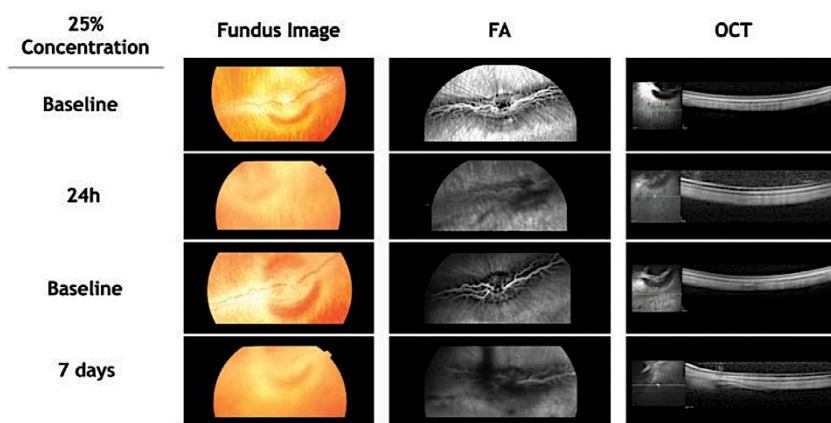
Retinal morphology by histology using LM and TEM

LM histologic examination of eyes injected with the 10% and 25% concentrations showed no major anatomic signs of toxicity and had a similar histologic appearance to that of controls without signs of altered retinal anatomy or inflammation at 24 h and 7 days (Figure 4). Animals that received the 35% concentration had what appeared to be ganglion cell edema at 24 h (Figure 4G) and discrete rarefaction of the outer nuclear layer at 7 days (Figure 4H).

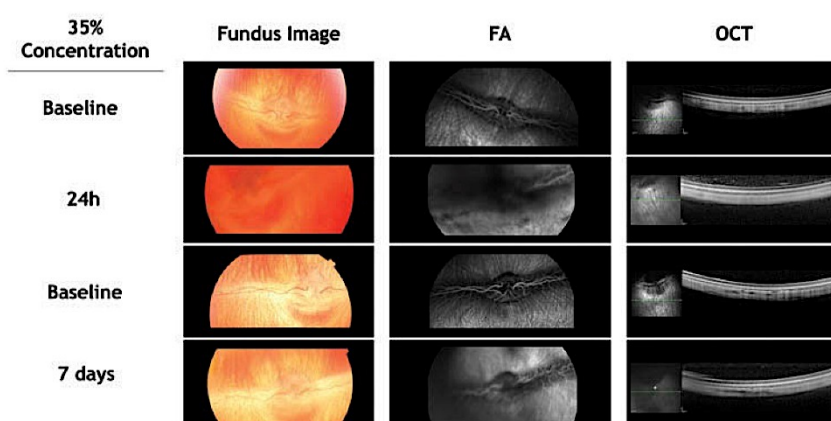
Ultrastructural analysis showed that the 10% and 25% concentrations did not disrupt the appearance of the

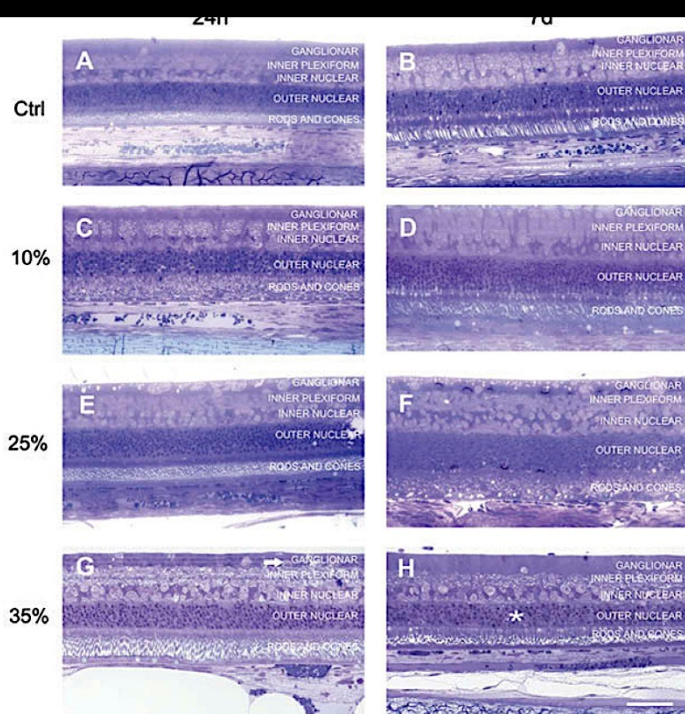


Fundus imaging, fluorescein angiography (FA), and optical coherence tomography (OCT) at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injection of the 10% dye concentration. The images show normal tissue. 24 h, 24 hours.



Fundus imaging, fluorescein angiography (FA), and optical coherence tomography (OCT) at baseline, 24 h, and 7 days after intravitreal injection of the 25% dye concentration. The images show normal tissue. 24 h, 24 hours.





Representative micrographs of rabbit retina survival at 24 h and 7 days after intravitreal injection with the 10%, 25%, and 35% dye concentrations. The control retinas after intravitreal injection with BSS at 24 h and 7 days, respectively (A, B). No major retinal abnormalities are seen in eyes injected with 10% and 25% concentrations at 24 h or 7 days (C–F). The 35% concentration at 24 h and 7 days causes swelling of the ganglion cells (G-arrow) and vacuolization of the outer nuclear layer (H-asterisk). The apparent difference in thickness of the layers seen on light microscopy is related to preparation artifacts during cross-sections by the action of chloroform on epoxy resin cuts. Semi-thin 500-nm cross-sections are stained with 1% toluidine blue (magnification $\times 1000$; 24 hours; 7 d, 7 days; ctrl, control).

At 24 h (Figure 5B) but in lesser extent at 7 days (Figure 5C). At 7 days, the ganglion cells also had cytoplasmic vacuolization and numerous multilamellar bodies (Figure 5C). In addition, the abundant multilamellar bodies, damaged nerve bundles also were seen at 24 h and 7 days in the inner nuclear layer (Figure 5E and F). No abnormalities were seen in the outer nuclear layer (Figure 5H and I). Mitochondria with cristae disarrangement were seen in the inner segment of the photoreceptors at 24 h (Figure 5K) but to a lesser extent at 7 days (Figure 5L). The arrangement of the photoreceptors was preserved at both time points (Figure 5K and L).

Discussion

Anthocyanins are flavonoids, a secondary class of plant metabolites that contain a general structure of two phenyl rings joined by a heterocyclic ring. Flavonoids are potent antioxidants that can reduce protein oxidation and increase expression of superoxide dismutase 2 in macrophages.^{35,36} Evaluation of the anthocyanin content of the acai powder extract by SGB

showed that the phytochemical composition of the acai pulp is rich in cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside.²⁸ According to high-performance liquid chromatography analysis, the total antioxidant content present for each acai dye concentration was 0.0099% for 10%, 0.0247% for 25%, and 0.0346% for 35%.

Trolox equivalent antioxidant capacity is a measure of the antioxidant strength based on the molecule Trolox, an analog of vitamin E. Due to the difficulties in measuring the antioxidant capacity of individual components of complex mixtures (such as acai fruit), a Trolox equivalency is used as a benchmark to compare the antioxidant capacity of such a mixture.³⁷ The total antioxidant capacity of the acai pulp was reported to be 48.6 Trolox equivalents/mL.³⁸ This value was superior to that of fruit rich in anthocyanins such as strawberries (18.3–19.2), raspberries (19.2–22.6), and grape juice (18.2–26.7). This study also showed that the antioxidant activity against superoxide anion, the peroxyl radical of the acai fruit was greater than any other previously described in the literature.

The antioxidant capacity of the acai dye also means that it can quench the singlet oxygen that is released after dye excitation by light. This is a desirable property for a dye used in retinal imaging, as it reduces the risk of oxidative damage to the retina.^{39,40} retinal

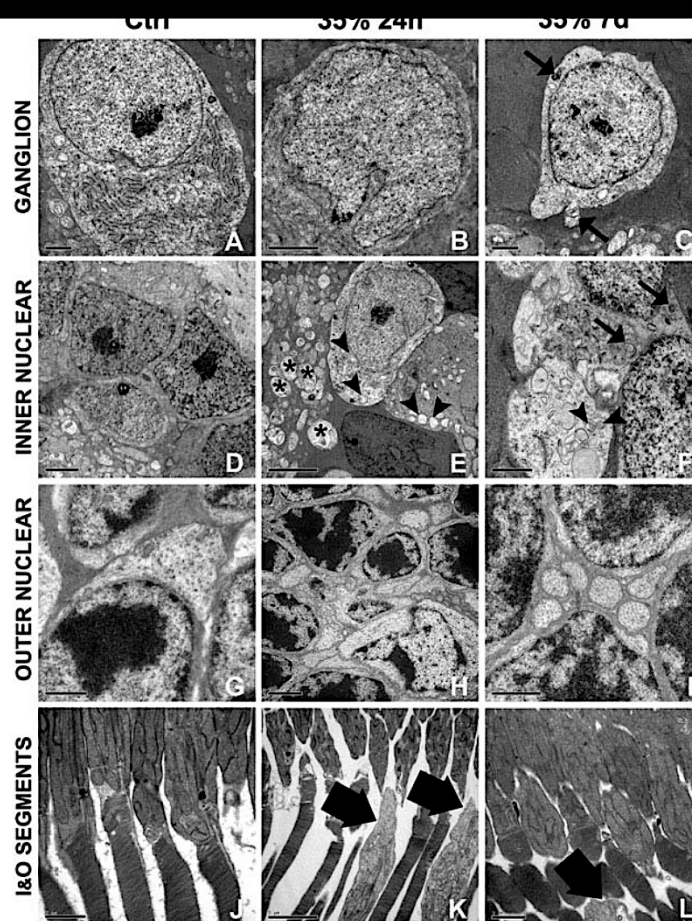


Figure 5. Representative electron micrographs of rabbit retinas 24 h and 7 days after intravitreal injection with the 35% dye concentration and controls. The micrographs are shown in control images (A—ganglion layer; D—inner nuclear layer; G—outer nuclear layer; and J—inner and outer segments). Twenty-four hours after intravitreal injection, discrete ganglion cell swelling and mitochondrial damage were seen (B). The presence of multilamellar bodies became more prominent (F—arrows). The inner nuclear layer presented nerve bundle damage (E—asterisks), disrupted mitochondrion (E and F—arrow heads), and a multilamellar body (F—arrows). No abnormalities were seen in the external nuclear layer (H, I). The inner and outer photoreceptors segments did not have abnormalities, but mitochondria cristae disarrangement in the inner segment at 24 h (K—large arrows) was seen but in a lesser extent at 7 days (L—large arrows). 24 h, 24 hours; 7 d, 7 days; ctrl, control.

for the ILM of cadaveric eyes, supports the premise that the dye may be useful for use during vitreoretinal surgery.²⁷ Further, our previous study found a high affinity of acai fruit anthocyanins for human ILMs.²⁷

To the best of our knowledge, the current study is the first to evaluate the toxicity profiles of three concentrations of a dye derived from the acai fruit in rabbits. The intraocular use of a dye during vitreoretinal surgery in humans is protected by a patent in Brazil (no. P11333244-8A2).

pH and osmolarity were controlled and established to be 7.4 and 300, respectively, because this is recognized to be physiologic for human eyes.²⁷ Polyvinyl alcohol was used as a solvent because it is nontoxic, compatible with most ophthalmic medications and preservatives and can be easily removed from the eye.⁴¹

The functional evaluation was performed using ERG. The morphologic examinations included fundus imaging, FA, OCT, and LM and TEM histology.

Interpretation of the ERG results showed that the dark-adapted 0.01 ERG and dark-adapted 3.0 ERG b-wave amplitudes at 24 h using the 35% concentration had a significant ($p < 0.05$) lower value in microvolts compared to the control (Table 4).

TEM showed abnormalities associated with the 35% concentration in the inner and outer retinal cells at the timeline (Figure 5K and L), revealing a toxicity profile. Preliminary data suggested that the 35% concentration of acai fruit extract should be avoided during chromovitrectomy in human eyes. However, data showed that the 10% and 5% concentrations did not show significant abnormalities.

be independent of the concentration (Figures 1–3). It is suggested that the acai dye is efficiently eliminated from the ocular tissues.

The results did not show a reduction from the normal fluorescence for any of the dye concentrations, and no ocular abnormalities were observed.

Both TEM and histologic evaluations of the 10% and 25% concentrations showed slight retinal alterations similar to those associated with the BSS injections. This may be due to the injection itself or be a physiologic variability.²²

The results were negative for retinal edema or atrophy with the dye concentrations. It is important that the results for eyes injected with the acai dyes were similar to the contralateral eyes in all testing, except that the 35% concentration caused retinal edema in the ganglion cells and outer photoreceptor layers. The ganglion cells swelled at 24 h (Figure 5B) and showed vacuolization, abundant multilamellar bodies, and nerve bundle damage in the internal nuclear layer were observed at both time points (Figure 5E and F). Morphology matched by the ERG findings, suggested that acai is safe in rabbit eyes at concentrations of 10% and 25%; however, the 35% concentration may be associated with functional and morphologic abnormalities detected by TEM (Figure 5). The current results are important since a clinical trial testing the safety of the acai dye is ongoing at the Federal University of São Paulo. Based on the current findings, the dye extracted from the acai fruit at concentrations of 10% and 25% was used in a clinical trial in human eyes. Similar preclinical investigations of the biocompatibility of six novel vital dyes for chromovitrectomy showed that new dyes had dose-dependent toxicity in rabbit eyes.²³ Future studies may include functional and morphologic testing to compare acai dye with other dyes used frequently in chromovitrectomy surgery.

The current study has limitations that must be considered. The study was performed in rabbit eyes and the results may not be completely applicable to humans. The vitreous cavities of rabbits have a smaller volume and retinas are thinner than those of humans. This could have enhanced the toxicity of the tested dye.

However, toxicity results could have been reduced because the dye was injected in a non-vitrectomized rabbit eye. When surgery is performed in a vitrectomized cavity, the dye will have direct contact with the retina. Therefore, probably a lower concentration will be effectively in contact with the retina during vitrectomy in human eyes compared to that in non-vitrectomized rabbit eyes.

During chromovitrectomy in humans, the dye is aspirated from the vitreous cavity at the end of the surgery, which was not performed in the current study. This means that the dye left in the vitreous cavity of rabbits for a longer time could occur in humans.

Despite these limitations, the current study will serve as the basis for the potential use of the dye extracted from acai fruit in chromovitrectomy in humans. Its capacity to stain retinal tissue using the 10% and 25% concentrations is being

evaluated in a future study. The latency of the dye was not a concern for neuron stimulation, because the latency also was not observed at 10% and 25% concentrations. The edema that developed with the 35% concentration provides further scientific evidence that chemical toxicity was the cause of the alterations seen on ERG.

In conclusion, the 10% and 25% dye concentrations from acai fruit did not cause significant functional or morphologic toxicity. However, the 35% concentration showed evident morphologic and functional abnormalities suggestive of secondary toxic effects at 24 h follow-up. The dye extracted from the acai fruit in concentrations of 10% and 25% was safe in a rabbit eye and may be safe and useful for improving identification of the posterior hyaloid and ILM during chromovitrectomy in humans.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Funding

Publication of this article was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; São Paulo, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Brasília, Brazil), and Pan-American Association of Ophthalmology/Pan-American Ophthalmological Foundation (PAAO/PAOF; Arlington, Texas).

References

1. Kurihara K, Ishibashi T, Oshima K. The residual epiretinal membrane after vitrectomy for macular hole. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237(8):648–653.
2. Lam DS, Chan WM, Tam BS. Macular hole surgery using fibrin-activated fibrinogen and selective removal of the internal limiting membrane. *Retina* 1999;19(5):478–479.
3. Kadosono K, Itoh N, Uchio E, Nakamura S, Ohno S. Selective removal of internal limiting membrane in macular hole surgery. *Ophthalmol* 2000;118(8):1116–1118.
4. Mester V, Kuhn F. Internal limiting membrane removal and management of full-thickness macular holes. *Am J Ophthalmol* 2000;129(6):769–777.
5. Gandorfer A, Haritoglou C, Gass CA, Ulbig MW, Krieger-Geis E. Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane may cause retinal damage. *Am J Ophthalmol* 2001;131(3):431–433.
6. Kadosono K, Yazama F, Itoh N, Uchio E, Nakamura S, Amano T, et al. Treatment of retinal detachment resulting from macular hole with internal limiting membrane removal. *Ophthalmol* 2001;131(2):203–207.
7. Kusaka S, Hayashi N, Ohji M, Hayashi A, Kamei M, Tanihara H. Indocyanine green facilitates removal of epiretinal and internal limiting membranes in myopic eyes with retinal detachment. *J Ophthalmol* 2001;131(3):388–390.
8. Engelbrecht NE, Freeman J, Sternberg P Jr., Aaberg TM Jr., Aaberg TM Jr., Martin DF, et al. Retinal pigment epithelial changes after macular hole surgery with indocyanine green-assisted internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol* 2002;133(1):89–94.
9. Caiado RR, Magalhaes O Jr., Badaro E, Maia A, Novaes JF, Stefanini FR, et al. Effect of lens status in the surgical success of vitrectomy for macular hole. *Arq Bras Oftalmol* 2003;66(3):203–207.

- Rodrigues EB, Meyer CH, Kroll P. Chromovitrectomy: a new field vitreoretinal surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243(4):291–293.
- Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. Dyes in ocular surgery: principles and use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol* 2009;148(3):332–340.
- Rodrigues EB, Penha FM, Farah ME, de Paula Fiod Costa E, Maia M, Dib E, et al. Preclinical investigation of the retinal biocompatibility of six novel vital dyes for chromovitrectomy. *Retina* 2009;29:497–510.
- Rodrigues EB, Meyer CH, Farah ME, Kroll P. Intravitreal staining of the internal limiting membrane using indocyanine green in the treatment of macular holes. *Ophthalmologica* 2005;219(5):251–362.
- Chakrabarti SE, Da Mata AP, Snyder ME, Rosa RH Jr., Foster RE. Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane. *Ophthalmology* 2000;107(11):2010–2014.
- Reibl W, Gunther B, Meinert H. [Substances for staining biological tissues: use of dyes in ophthalmology]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2005;222(4):309–311. German.
- Chakrabarti GA, Cheema R, Conway MD, Fang T. Triamcinolone acetate as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloid during pars plana vitrectomy. *Retina* 2000;20(5):554–555.
- Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Bottos J, Dib E, et al. The use of vital dyes in ocular surgery. *Surv Ophthalmol* 1995;40(5):576–617.
- Chakrabarti M, Sebag M. Epiretinal membrane surgery assisted by brilliant blue. *Am J Ophthalmol* 2003;135(6):909–911.
- Chakrabarti S, Meyer CH, Tietjen A, Rodrigues EB, Schmidt JC. Brilliant blue: a novel vital dye in vitreoretinal surgery. *Ophthalmologica* 2006;220(3):190–193.
- Chakrabarti A, Prakash G. Differential staining with indocyanine green and trypan blue dye. *Indian J Ophthalmol* 2004;52(4):339.
- Chakrabarti EJ, Veckeneer M, Parys-Van Ginderdeuren R, Van Lommel M, Melles GR, Stalmans P. Trypan blue staining of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 2002;120(2):141–144.
- Maia M, Kellner L, de Juan E Jr., Smith R, Farah ME, Margalit E, et al. Effects of indocyanine green injection on the retinal surface and into the subretinal space in rabbits. *Retina* 2004;24(1):80–91.
- Maia M, Margalit E, Lakhnani R, Tso MO, Grebe R, Torres G, et al. Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina* 2004;24(1):69–79.
- Chen D, Gonder J, Proulx A, Liu H, Hutnik C. Comparison of the in vitro safety of intraocular dyes using two retinal cell lines: a study on brilliant blue G and indocyanine green. *Am J Ophthalmol* 2009;147(2):251–259 e2.
- Chakrabarti FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB. Subretinal brilliant blue G migration during internal limiting membrane peeling. *Br J Ophthalmol* 2009;93(12):1687.
- Chen J, Ferreira MA, Farah ME, de Carvalho AM, Alves Ferreira J, de Moraes Filho MN, et al. Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from 27. Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AA, Ferreira Maia A, et al. Color variation assay of the anthocyanins from fruit (*Euterpe oleracea*): a potential new dye for vitreoretinal surgery. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013;29(8):746–753.
28. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Food Chem* 2006;54(22):8604–8610.
29. Qin C, Li Y, Zhang R, Niu W, Ding Y. Separation and elucidation of anthocyanins in the fruit of mockstrawberry (*Duchesnea indica* Focke). *Nat Prod Res* 2009;23(17):1589–1598.
30. Kahkonen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem* 2003;51(3):628–633.
31. Rahman MM, Ichinaga T, Komiyama T, Hatano Y, Konishi S. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic Res* 2006;40(9):993–1002.
32. Badaro E, Souza-Lima RA, Novais EA, Maia M, Hirai F, Meyer CH, et al. Investigation of new dyes for chromovitrectomy: clinical biocompatibility of trisodium, orangell and methyl violet. *Int J Retina Vitreous* 2015;1:1.
33. Cardoso EB, Moraes-Filho M, Rodrigues EB, Maia M, Penha FM, Novais EA, et al. Investigation of the retinal biocompatibility of acid violet for chromovitrectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251(4):1115–1121.
34. de Oliveira Dias JR, Badaro E, Novais EA, Colicchio D, Chiarin GM, Matioli MM, et al. Preclinical investigations of intravitreal ziv-aflibercept. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2010;40(6):577–584.
35. Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA. Protective effect of quercetin in primary neurons against Aβ(1–42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 2006;17(4):269–275.
36. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase (PON2) expression is upregulated by unesterified cholesterol through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Biol Chem* 2007;388(12):1353–1358.
37. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26(9–10):1237.
38. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem* 2004;52(6):1539–1545.
39. De Rosso VV, Moran Vieyra FE, Mercadante AZ, Borsarelli R. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radic Res* 2008;42(10):885–891.
40. Jang YP, Zhou J, Nakanishi K, Sparrow JR. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 2003;79(3):529–536.

3.3 A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results.

Caiado RR, Peris C, Rodrigues EB, Farah ME, Maia A, Magalhães O Jr, Novais E, Lima-Filho AS, Maia M.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2019 Jan 3. doi: 10.1007/s00417-018-04204-y. [Epub ahead of print].



New dye based on anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results

R. Caiado¹ · Cristiane Peris¹ · Eduardo B. Rodrigues¹ · Michel Eid Farah¹ · André Maia¹ · Bruno Magalhães Jr¹ · Eduardo Novais¹ · Acácio Souza Lima-Filho^{1,2} · Mauricio Maia^{1,3}

25 September 2018 / Revised: 20 November 2018 / Accepted: 27 November 2018
 Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose To test the applicability of the acai dye at a 25% concentration for identifying the posterior hyaloids and internal limiting membranes (ILMs) during pars plana vitrectomy (PPV) in human eyes with macular holes (MHs). **Methods** This study included 25 patients with chronic idiopathic MHs. The exclusion criteria included glaucoma, preexisting ocular conditions, and previous ocular surgeries except uncomplicated cataract. Ten surgeons performed 23 PPVs, including PPV, phacoemulsification, posterior hyaloid detachment, ILM peeling guided by dye staining, and perfluoropropyl alcohol (PF5) application. The patients remained prone for 5 days postoperatively. The patients were evaluated postoperatively after 1, 3, and 6 months. The surgeons completed a questionnaire regarding the dye's staining abilities. **Results** The posterior hyaloids and ILMs stained purple in all eyes. The final best-corrected visual acuity improved significantly ($p < 0.01$) from preoperatively (1.37 ± 0.29) to 180 days postoperatively (1.05 ± 0.43). The MHs closed in 76% of eyes. The acai dye at a 25% concentration identified posterior hyaloids and ILMs during PPVs in humans. Dye toxicity was not observed. **Conclusion** The acai dye is a promising alternative for identifying posterior hyaloids and ILMs during vitreoretinal surgery.

Keywords Acai dye · Internal limiting membrane · Pars plana vitrectomy · Posterior hyaloid · Toxicity

Introduction

The application of vital dyes during vitreoretinal surgery to identify preretinal tissues and membranes, such as the internal limiting membrane (ILM), was introduced in 2000 by applying the dye indocyanine green (ICG) to stain the thin, semi-transparent ILM [1].

ICG is associated with retinal and retinal pigment epithelium (RPE) toxicity [2, 3], and the mechanism of which might

be related to the oxidative effects of the ICG molecule, specifically the iodine and/or its carbolinic complex derivatives, which cause oxidative damage to the RPE cells [2–5]. Synthetic brilliant blue G (BBG) has been used as an alternative for staining vitreoretinal tissues, and, except in the USA, is currently the most frequently used dye worldwide for this purpose; however, in vitro use of BBG can cause dose-dependent cellular toxicity [6]. Unintended subretinal migration of BBG during vitreoretinal surgery in humans also may damage the RPE [7]. Until recently (PUBMED search, July 25, 2018), no single dye stained both the posterior hyaloid and ILM.

The ideal vital dye for chromovitrectomy should have minimal oxidative effects on retinal tissues and selectively and reliably stain both the ILMs and posterior hyaloid. The dye also should be eliminated rapidly from the eye to avoid possible chronic toxicity [8]. In addition, potential development of dyes cheaper than those currently available is important for modern vitreoretinal surgery [7–9].

In 2013, we performed two studies using cadaver eyes that found that the natural dye extracted from the Brazilian fruit acai (*Euterpe oleracea*) successfully enhanced identification of the intraocular microstructures during vitre-

Electronic supplementary material The online version of this article (doi.org/10.1007/s00417-018-04204-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Mauricio Maia
 mauricio@terra.com.br

Department of Ophthalmology, Federal University of São Paulo, 781, Pedro de Toledo Street, 2nd floor, São Paulo, 04039-032, Brazil

Pharmaceutical Industry, São Paulo, Brazil

Ilalian Institute of Fight Against Blindness, Assis/Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

[9, 10]. The potential advantage of the dye was the concentration of anthocyanins, the basic structure of which is the flavylum cation, a flavonoid that has an antioxidant effect in plants [11–13]. The main anthocyanin found in acai powder is cyanidin-3-glucoside [13–16]. Previous studies have shown that anthocyanins from the acai fruit inhibit the generation of reactive oxygen species and the activity of superoxide dismutases 1 and 2 [17]. The antioxidant capacity of the dye also might result in the ability of the molecule to quench the singlet oxygen released after dye irradiation by photodynamic therapy [13, 18].

We observed recently that the 10% and 25% concentrations of acai dye were safe when used in a rabbit model [14], in which rabbits were injected intravitreally using 10%, 25%, and 35% concentrations of the acai dye. Functional and morphologic examinations were performed. The 35% concentration caused temporary toxic effects seen at the 24-h evaluation. The 10% and 25% dye concentrations did not cause significant functional or morphologic toxicity. Since the concentration of the acai fruit that was safe and effective in the rabbit model was 25%, we selected this concentration for the current clinical trial in humans with macular holes [14].

The aim of the current clinical trial was to test the efficacy and safety of the acai dye at the 25% concentration for identifying posterior hyaloids and ILMs during vitreoretinal surgery in humans.

Results and methods

Study design

This prospective, interventional, non-randomized clinical trial was registered at clinicaltrials.gov (NCT02691429). A consort flow diagram and checklist are available (Supplemental Digital Content 1). The Ethics Committee of the Federal University of São Paulo (Institutional Review Board number 466.833) and the National Brazilian Council of Research (CONEP authorization number 1.139.211) approved the study, which was conducted according to the ethical Guidelines of the Association of Research in Ophthalmology and the Declaration of Helsinki. To avoid bias during data interpretation, 10 surgeons performed the procedures following an aleatory protocol defined by the Ethics Committee of the Federal University of São Paulo. All patients provided informed consent regarding the benefits and risks of the surgical procedure and the new dye tested.

Dye solution preparation

The acai powder was supplied by Acai Natural Products S/A (São Paulo, Brazil). The acai dye was prepared by the research team previously

corrected other chemical properties of the dye (pH, osmolality, solubility, and stability) [9, 10] so that the extracted powder had chemical properties biocompatible with the physiologic environment (pH, 7; osmolality, 300 mOsm/L). Density also was established to be 1.1 mg/cm³ to facilitate delivery to the target structures during chromovitrectomy. The higher density of the acai dye compared to balanced salt solution (BSS) facilitated dye deposition over the posterior hyaloids and ILMs [7, 9, 10].

Because the purple color of the anthocyanin molecule is unstable over time [10], a lyophilization process was necessary. Therefore, the acai dye preparation was divided into two moments: the lyophilization process that occurred in the laboratory and the dilution process that occurred just before surgery. Lyophilization was prepared in a sterile environment (grade A), and the acai powder was stored in amber glass vials. Dilution was performed using 1 mL of balanced saline solution that was injected inside the amber flask. To standardize the procedure, surgeons were instructed to dilute the acai dye 10 min before surgical use.

Patients

Twenty-five eyes (25 patients) with idiopathic MHs who were indicated for vitreoretinal surgery followed by posterior hyaloid and ILM removal were included.

Phacoemulsification was performed in all phakic eyes to avoid possible postoperative cataract induction that could result in bias related to possible decreases in the best-corrected visual acuity (BCVA).

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were men and women diagnosed with any size idiopathic MHs who were older than 18 years and not pregnant. All patients signed a consent form. Patients were excluded who had undergone a previous vitreoretinal surgery and had active uveitis, glaucoma, diabetic retinopathy, retinal detachment, age-related macular degeneration, retinal vascular occlusion, or any other ocular conditions that could confound or limit the postoperative results.

Preoperative physical and ocular evaluations

Patients were followed over 180 days postoperatively. Preoperative data obtained for each patient included the medical history, age, gender, and ocular history, including time from symptom onset until surgery. All patients underwent preoperative physical evaluation that included systemic blood pressure and heart rate measurements and classification of systemic risk associated with the surgical procedures. Patients did not stop taking any anticoagulant medications.

baseline ophthalmologic examination that was based on Snellen BCVA measurement was performed. The BCVAs were converted to the logarithm of the minimal angle of resolution (logMAR) for statistical analysis and comparisons. Intraocular pressure (IOP) was measured using Goldmann applanation tonometry. Slit-lamp biomicroscopy of the anterior and posterior segments was performed followed by a dilated fundus examination. The intraocular lens (IOL) power calculations were performed using noncontact partial coherence interferometry (IOLMaster, version 3.01).

Exposure to retinal morphology and function

Wide-field imaging, fluorescein angiography (FA), and fundus autofluorescence (AF) were performed at baseline and 30 days postoperatively using a TRC-501A camera (Topcon).

Macular thicknesses were classified based on spectral-domain OCT (Spectralis, Heidelberg Engineering). For each patient, the presence of detached posterior hyaloid, retinal layer architecture, central macular thickness, and integrity of the inner and outer segment junction were assessed.

A spectral-domain RTVue-XR Avanti system (software version 2014.2.0.93, Optovue) was used to acquire optical coherence tomography angiography (OCTA) and en-face images of all eyes. Three-dimensional OCT angiograms were generated over a 3×3 -mm square. The OCT images facilitated the evaluation of the tissue morphology; OCTA showed macular impairment due to the disease [19].

Toxicity to retinal function was analyzed using full-field multifocal electroretinography (ffERG/mfERG) recordings. The ERG procedures followed the rules of the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision protocol [20, 21] for both procedures. For ffERG, the pupils were dilated with tropicamide 1% and phenylephrine 10% drops, and the subjects were dark-adapted for 30 min at the site before recording. Tetracaine eye drops were instilled to anesthetize the corneal surface. Under red illumination, a Burian-Allen bipolar contact lens electrode (Hensen Ophthalmic Laboratories) was placed on the corneal surface. A drop of 2% methylcellulose was placed on the inside surface of the contact lens to ensure good electrical contact. A suction cup was applied to the earlobe and served as a ground electrode. Visual response imaging system software was used with the FMSIII stimulator running at 30 Hz. The peak-to-peak amplitudes (microvolts) and implicit times (milliseconds) were determined at each electrode according to the standard protocol.

mfERGs were recorded monocularly after full pupil dilation and at least 10 min of light adaptation in ambient light. A fundus camera was used to monitor fixation. The type of bipolar contact lens electrode used to record

the ffERGs was used for the mfERG recordings. Visual stimuli for the mfERGs consisted of 103 black and white hexagons alternating in a semi-random sequence, modulated according to a binary m-sequence. This hexagonal array subtended 10° of the visual field. The peak of the first-order kernel (P1) was used to measure the implicit time, and the difference between the first trough and P1 response served as the amplitude for each waveform. The average responses of the amplitude and implicit times were obtained in six concentric annular regions (rings) centered on the fovea and considered for statistical analysis.

Surgical procedures

Ten experienced surgeons performed the standardized surgical procedures and completed a questionnaire postoperatively.

Phakic patients underwent standard cataract extraction, phacoemulsification and IOL implantation. All surgeries were performed using the Constellation Vitrectomy System (Bausch & Lomb Laboratories) and a four-port pars plana vitrectomy. The vitrectomy using a 23-gauge vitrectomy system and valved trocar. A fourth sclerotomy was created using the 25-gauge Torque Torpedo (Insight Instruments Inc.) for extra diffuse illumination. A Binocular Indirect Ophthalmomicroscope (Carl Zeiss BIOM System) was used for noncontact, wide-angle surgery.

The OPMI Lumera 700 microscope integrated with the Rescan 700 spectral-domain OCT (Carl Zeiss Meditec) facilitated obtaining videos, snapshots, and intraoperative OCT (iOCT) images to document all surgical steps (Figs. 1 and 2).

The acai dye was diluted 10 min before the beginning of the procedure. The dye was first injected to stain the vitreous/posterior hyaloid. It was also injected a second time to stain the ILM. Intraoperatively, core vitrectomy was performed at a rate of 5000 cuts/min, with a maximum level of 400-mmHg aspiration for about 5 min. When the posterior hyaloid was attached to the posterior pole, the posterior hyaloid was detached using a vitreous probe (aspiration rate 400 mmHg) and the cut mode turned off (Fig. 1). In all cases, identification of the posterior hyaloid was confirmed by injection of 0.3 ml of dye using a 23-gauge side cannula (Synergetics). The dye (0.3 ml) was delivered gently over the posterior pole. Figures 1 and 2 show the dye when the acai dye was delivered, it was heavier than water (density, 1.1 mg/cm³) and deposited over the posterior pole with no flushing required. The dye was left for 5 min before removal. The fact that the dye was left for 5 min was based on previous study protocols in cadaveric eyes performed by our research team [9, 10]. Peeling was performed using a 23-gauge ILM forceps (Figs. 1 and 2). After peeling was completed (Figs. 1 and 2), a fluid exchange was performed to remove all BSS before the fluid-air exchange to perfluoropropane 15% tamponade.

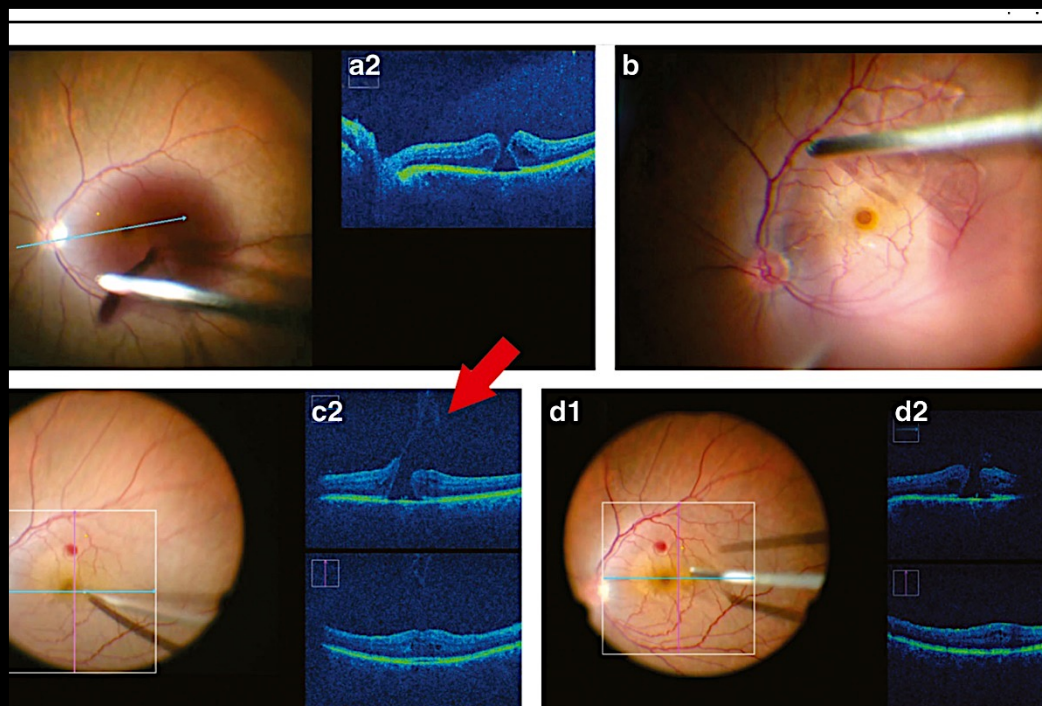


Figure 1. Intraoperative photographs and iOCT images show chromovitrectomy using the 25% acai dye. **A1** The image shows that with gentle delivery of the acai dye, it is heavier than BSS and tends to deposit over the posterior pole. **A2** The iOCT image obtained simultaneously with that in A1 shows a MH. **B** The image shows the completion of the posterior hyaloid detachment using the 25% acai dye.

At the end of surgery, all trocars were removed and no sutures were placed. A subconjunctival injection of 0.2 mL of cefazolin and dexamethasone solution was administered. The lid speculum was removed. The patients were instructed to maintain a facedown position for 5 days postoperatively. The video (Supplemental Digital Content 2) can be viewed on-line.

Figure 2. Intraoperative photographs and iOCT images show chromovitrectomy using 25% acai dye. **A** The image shows gentle delivery of the acai dye and its deposition over the posterior pole. **A1** The image shows ILM peeling. **A2** An iOCT image obtained simultaneously with that in A1 shows ILM removal. **B** The image shows completion of ILM peeling and the difference in the colors of the peeled and unpeeled areas. **C** The image shows the MH above the cornea at the end of surgery.

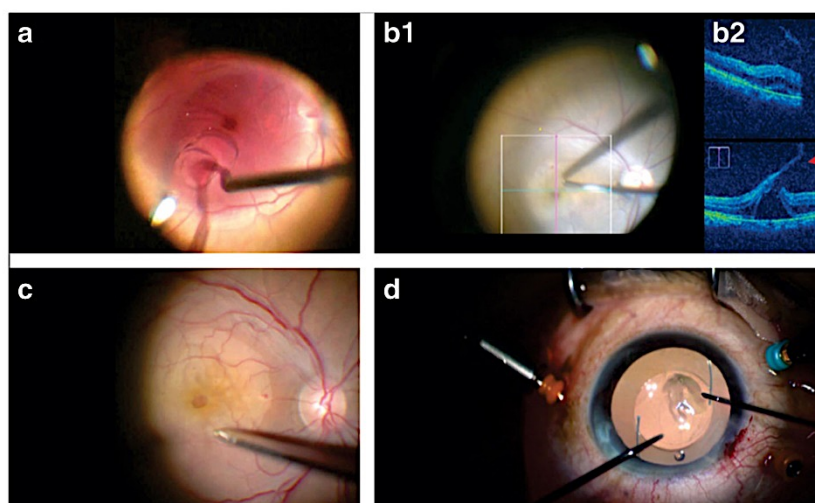


Figure 2. Intraoperative photographs and iOCT images show chromovitrectomy using the 25% acai dye. **C1** The image shows the start of ILM peeling. **C2** An iOCT image obtained simultaneously with that in C1 shows ILM removal. **D1** Completion of ILM peeling. **D2** The iOCT image obtained simultaneously with that in D1 shows the MH after the procedure.

Questionnaire

The 10 surgeons completed a questionnaire immediately after the procedure to assess the ability of the new dye to stain the vitreous structures based on a scale of 0 to 10 (Supplemental Table 3), with 0 indicating the worst and 10 indicating the best performance comparable to the “golden standard” dyes currently used.

in the market, triamcinolone acetonide (TA) for vitreous/retinal hyaloid deposition and BBG for the ILM staining. The questions were based on two published studies [22, 23] and previously by our research team and approved by the ethics committee of the Federal University of São Paulo.

Setup

All patients underwent postoperative ophthalmologic examinations on postoperative days 1, 7, 30, and 180 that included BCVA and IOP measurement, slit-lamp evaluation, and funduscopy. OCT, FA, OCTA, and OCTA of the macular area were performed to identify possible toxicity related to retinal surgery on days 30 and 180 postoperatively. The mfERG and fERG evaluations were more accurate assessments of retinal function on the same timeline.

Statistical analysis

The data were analyzed by descriptive evaluation. Descriptive and relative frequencies were presented for the categorical variables, and summaries of the measurements (mean, median, minimal, maximal, and standard deviation [SD]) were used for the numerical variables. The Student's *t* test compared the means of the two similar evaluation periods. Analysis of variance (ANOVA) and repeated measures was used to compare the means between the two periods of evaluation.

A non-parametric Friedman test was used to compare the results of the surgeons' gradings of the dye regarding the dye deposition at the vitreous core and posterior hyaloid, ILM staining after re-staining, and dye usefulness due to the non-uniformity of the distribution of the scores. When differences between means occurred, they were analyzed using the multiple comparisons Dunn-Bonferroni test to maintain a reliable level of significance.

For the fERG results, categorical variables were presented as descriptive and relative frequencies and for numerical variables as mean and SD. The average a-wave amplitude and implicit time, b-wave amplitude and implicit time, and the difference between the b-wave and a-wave amplitudes and rings were compared between the two time points were compared using the Student's *t* test for paired samples.

For the statistical tests, the significance level was 5%. The tests were performed using the SPSS 20.0 (IBM-SPSS) and STATA 12 statistical software (Stata Corp).

Results

Demography and preoperative clinical profile

In the current study, 25 patients (25 eyes) (mean age $\pm$ SD of 56 ± 7.56 years) with idiopathic MHs had a

mean baseline logMAR BCVA of 1.37 ± 0.29 . The mean IOP was 14.92 ± 2.93 mmHg. Twenty-one eyes were pseudophakic (84%). The average disease duration was 17.7 ± 17.7 months; 16% of MHs were stage 2, 24% stage 3, and 60% stage 4.

Surgical anatomic outcomes and clinical observations

All patients were followed for 6 months. The MHs closed postoperatively in 19 (76%) eyes, and all eyes were pseudophakic because the phakic eyes underwent phacoemulsification and PPV. The IOP did not change significantly ($p = 0.957$).

During the first postoperative week, cells were present in the anterior chamber and fibrin on the IOL in three cases. All symptoms resolved in all cases after 1 week using corticosteroid eye drops. One patient had high IOP (mean value 24 mmHg) that resolved spontaneously after treatment with eye drops; one patient had a rhegmatogenous retinal detachment at 30 days.

Despite that only 76% of the MHs closed, after 30 days OCT showed reduction of the base diameter (preoperative 1227.96 ± 413.55 ; postoperative 180 days, 312.75 ± 51.2 ; $p < 0.001$), minimal diameter (preoperative 590.46 ± 210.1 ; postoperative 180 days, 147.58 ± 270.27 ; $p < 0.001$), and height (preoperative 447.25 ± 69.14 ; postoperative 180 days, 116.29 ± 213.89 ; $p < 0.001$).

Surgeons observed that the acai dye was unable to stain the epiretinal membrane (ERM). Since the ERMs were thin, discrete, and not predominant around the hole, our research group used the same surgical technique to remove the ERM as a "block" within the ILM peeling procedure. The presence of ERM did not interfere with the ILM staining. Therefore, surgeons always initiated the ILM peeling in areas where the ERM was not present.

No dye-related abnormalities were seen at 30 and 180 days postoperatively according to AF, FA, OCT, and OCTA (Figs. 3 and 4).

Surgical outcomes and functional evaluation

The final logMAR BCVA improved significantly ($p < 0.001$) from preoperatively (1.37 ± 0.29) to 180 days postoperatively (1.05 ± 0.43). However, it did not improve significantly ($p > 0.05$) between 30 and 180 days postoperatively.

The fERGs showed more markedly increased responses at 30 and 180 days compared to baseline. At 30 days, the scotopic (dark-adapted, 0.01 cycle/deg) responses (0.01 cycle/deg) and photopic responses (light-adapted 3.0 cd/m^2) at 30 days and slight recovery at 180 days. The rod amplitudes (dark adapted 0.01 cycle/deg) also decreased mildly with recovery at 180 days (Table 1). mfERGs showed a significantly ($p = 0.001$) increased amplitude in ring 1 at 30 and 180 days.

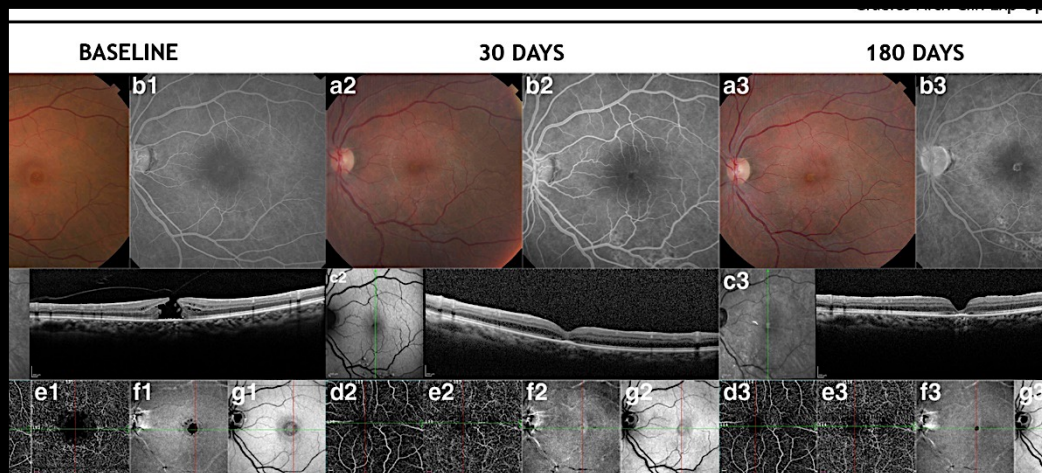


Figure 2. Baseline and postoperative images (30 and 180 days) of the same patient obtained using fundus imaging, DA, OCT, and OCTA. **A1** A fundus image shows a full-thickness MH. **A2, A3** Fundus images 30 and 180 days postoperatively show MH closure, respectively. **B2, B3** Angiograms 30 and 180 days postoperatively centered inferior to the macula window defects, respectively. **C1** A baseline OCT image shows a full-thickness MH. **C2** An OCT image obtained 30 days postoperatively shows MH closure; however, the ellipsoidal zone and the internal limiting membrane are disrupted. **C3** An OCT image obtained 180 days postoperatively shows MH closure with decreased retinal thickness. **D1** A baseline OCTA superficial plexus image of the retina with a MH shows a slightly enlarged foveal avascular zone.

D2, D3 Images 30 and 180 days postoperatively, respectively, show a decreased foveal avascular zone. **E1** A baseline OCTA deep plexus image of the retina shows significant perifoveal vascularization. **E2, E3** Images obtained 30 and 180 days, respectively, show a decreased foveal avascular zone with reperfusion of the perifoveal vascularization. **F1, G1** Baseline OCTA structural en-face images segmented for the inner plexiform layer (IPL) and RPE, respectively, show hyporeflective spaces around the circular hyporeflective center of the MH. **F2, G2** Images 30 and 180 days postoperatively show regression of the hyporeflective areas. **F3** A structural en-face OCTA image 180 days postoperatively shows a circular hyporeflective area on the IPL segmentation reappears with foveal retina atrophy.

ed with baseline. The implicit time changes were measured in all rings of the central retina except ring 1. The implicit time delays were marked at 30 days postoperatively and slightly at the final evaluation despite the mfERG responses (Table 2).

Postoperative dye findings

Intraoperative dye characteristics were observed: The dye was deposited on the posterior pole due to its higher viscosity than BSS, and therefore, no flushing was needed; the dye stained the ILM, core vitreous, and posterior hyaloid; and the dye was removed easily from the posterior pole.

Questionnaire

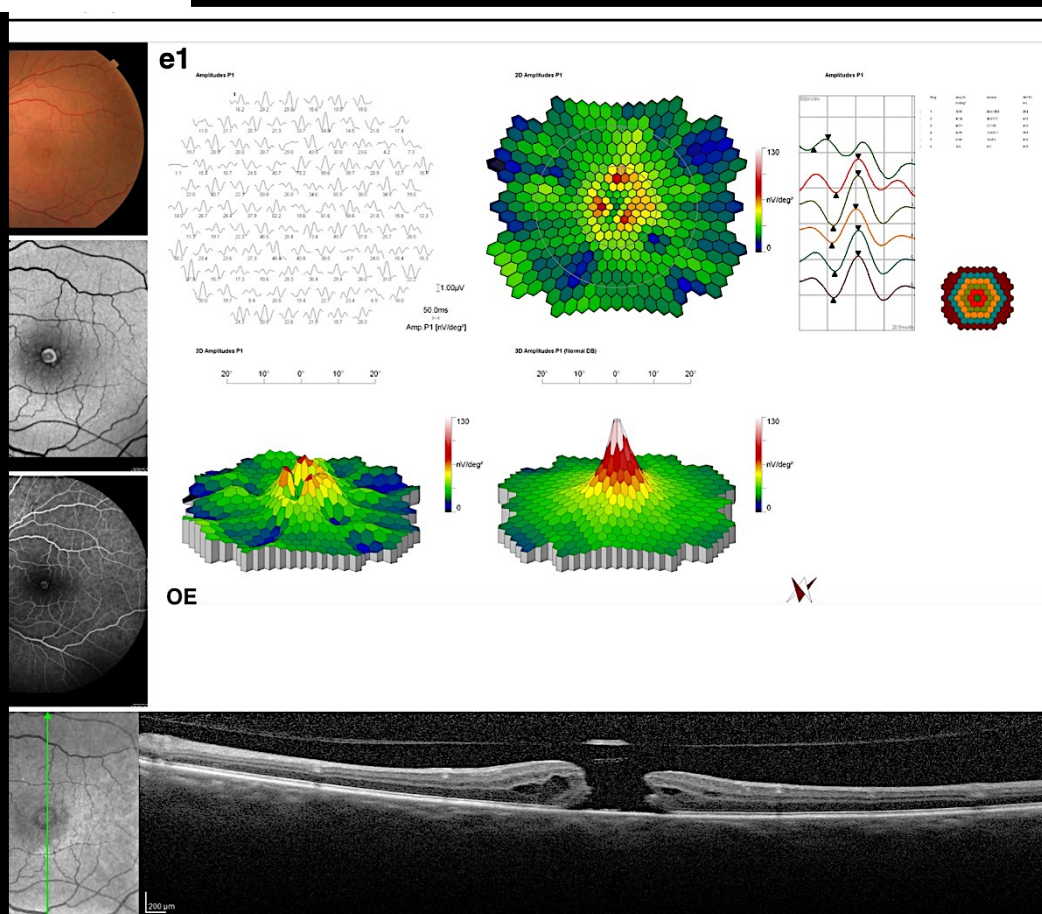
Surgeons reported that the dye identified both the posterior hyaloid and ILMs. (Appendix). After dye injection, only the posterior vitreous, and posterior hyaloid were stained; other structures were not. At the end of surgery, the dye was seen on the ILM after 19 (76%) procedures. Overall, the surgeons' satisfaction rates for the dye capability to be deposited at the posterior pole were 24 (96%) and for ILM staining 22 (88%) (Appendix).

When the acai dye was compared to surgeons' previous experience using TA, scores for dye deposition at the vitreous core and posterior hyaloid reached means of 7.0 ± 1.0 and 7.1 ± 1.4 , respectively. Surgeons' previous experience using TA compared to the acai dye for ILM visibility after dye injection was a mean of 7.1 ± 1.5 . The surgeons classified dye deposition with a significantly ($p < 0.001$) higher score compared to other variables.

The graph (Supplemental Digital Content 3) shows the homogeneity of the values of the evaluated variables. The aspects of the dye were similar ($p < 0.001$). Dye deposition on the posterior hyaloid compared with the ILM received a higher evaluation; however, all surgeons considered this intraoperative dye useful for vitreous and ILM identification.

Discussion

Staining ability is the most important determinant of intraoperative use of vital dyes [24, 25]. Currently, the most common procedures use TA to identify the posterior hyaloid/vitreous base and BBG/ICG to identify the ILM [26]. Previous studies have reported that the dye from the acai fruit selectively stains structures purple in cadaveric and rabbit eyes [9, 10, 14]. The current results showed that the purple stain similar

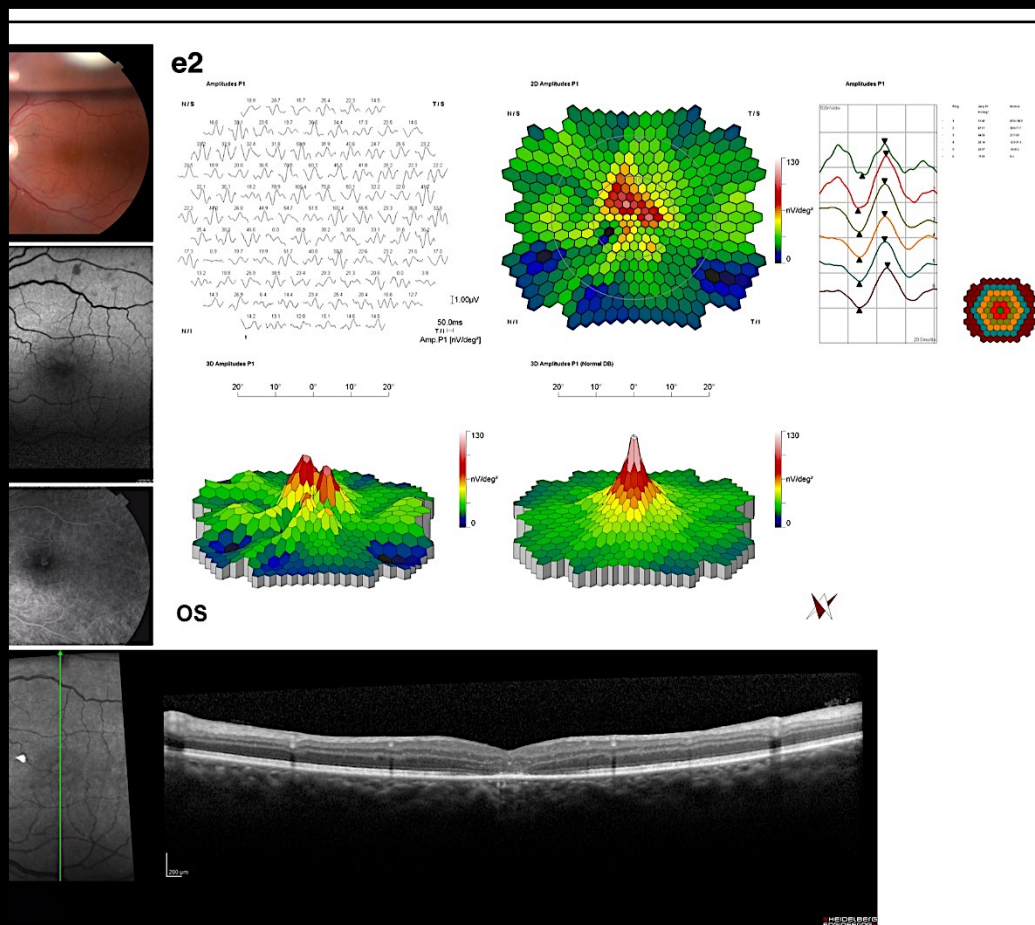


baseline and postoperative images (30 and 180 days) of the same patient using fundus imaging, AF, FA, OCT, and mfERG. **A1** A fundus image shows a full-thickness MH. **A2, A3** Fundus images 30 and 180 days postoperatively show MH closure, respectively. Baseline fundus AF shows hyper-AF in the macula. **B2, B3** F images 30 and 180 days postoperatively show no hypo-AF. Baseline angiogram shows a central window defect at the macula. **C3** Angiograms obtained 30 and 180 days postoperatively show macular window defects. **D1** A baseline OCT image shows a full-

thickness MH. **D2** An OCT image obtained 30 days postoperative shows MH closure, whereas the ellipsoidal zone and external membrane remain defective. **D3** An OCT image obtained 180 days postoperatively shows MH closure with decreased retinal thickness. Baseline image shows mfERG dimensional response density plot trace array. The image suggests an amplitude response reduction. **E3** The images show mfERG dimensional response density plot trace arrays 30 and 180 days, respectively, with amplitude improvement.

respectively stained the vitreous core and posterior hyaloid and ILM (Fig. 2) in human eyes. This unique property is an advantage since only one dye can achieve what currently requires two different dyes for distinct chromovitrectomy [8, 24, 26–28]. In addition, anthocyanins from the acai are thought to be responsible for this staining ability, and their distributions are in the following descending order: cyanidin-3-O-glucoside, homoorientin, orientin, isovitexin, and rutin [16].

To analyze the safety profile of the acai dye, we performed anatomic and functional evaluations. The mean duration of MHS in this study was 23.72 ± 17.7 months and the mean MH diameter was $1227 \pm 413 \mu\text{m}$. Because of the MH chronicity and poor surgical prognosis was expected (independent of dye) using this surgical technique of ILM peeling. In fact, the closure rate was similar to other studies that evaluate postoperative chronic MHS [29, 30]. Significant ($p < 0.05$) reductions in the MH base diameter, minimal diameter



(continued)

so were seen after 30 days on OCT images, indicating improvement. Other findings obtained by AF, FA, and OCTA did not show abnormalities suggestive of ischemia up to 180 days postoperatively. Finally, the BCVA improved significantly ($p < 0.001$) from preoperatively (1.37 ± 0.29) to 180 days postoperatively ($1.05 \pm$

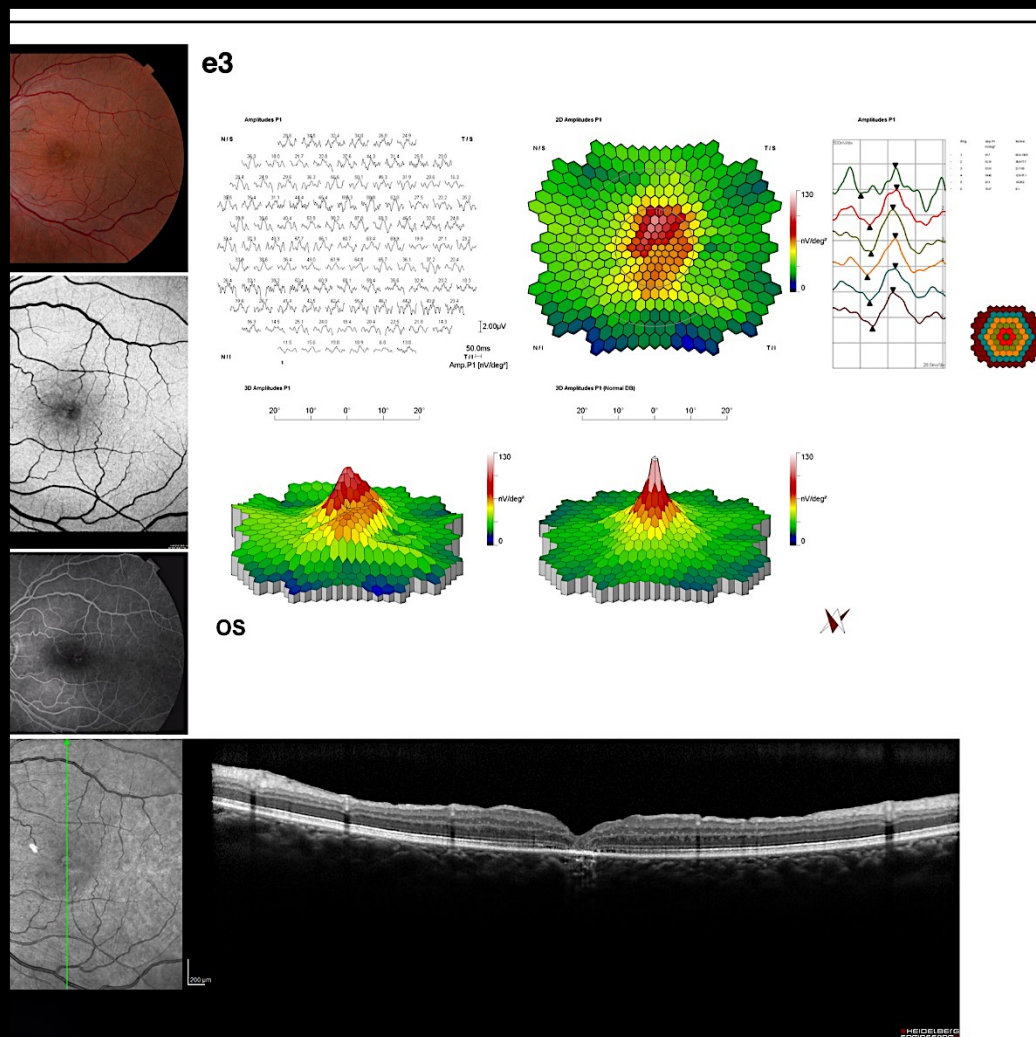
reversed ILM flap may be an interesting surgical technique when managing large macular holes. However, our team has decided to use the “traditional method” (i.e., the ILM removal) which is currently still the most common technique used worldwide and also in our service. Initially, this is the technique that contains the largest number of manuscripts published, and all surgeons were comfortable with the procedure.

retinal detachment developed on the IOL in three of 25 eyes, all of which were treated with combined phaco-PPV, and the fibrinolytic was used 1 week postoperatively using topical steroids.

Similar findings have been reported after cataract surgery [31, 32].

The eye that developed retinal detachment had no postoperative inflammation. The tear was at the 6 o’clock position that is associated with undefined intraoperative tears in the retina by posterior vitreous detachment. In this case, the surgical complication was treated successfully by surgical reoperation and the BCVA improved compared to baseline.

The current functional findings were obtained by measuring the BCVAs and ERGs. While the mean BCVA improved significantly ($p < 0.001$) at 180 days postoperative, ERG is a more objective and sensitive method to evaluate functional results. mfERGs showed that the average values for the explicit and implicit time P1 analysis improved progressively from baseline to 180 days, which likely resulted from foveal retinal improvement at macular closure [29–31]. The change in rings 2 to 6 and the implicit time P1 at 30 days did not change significantly from 30 to 180 days. Since this



(continued)

non-progressive finding and the literature shows that in the mfERG in rings 2 to 6 postoperatively may be due to surgical trauma [29–31], the current scientific data support the assumption that ERG abnormalities also might be due to surgical trauma.

mfERG also was used to evaluate dye toxicity. The 0.01 ERG and scotopic 3.0 ERG results from 1 to 30 days showed values that can be associated with surgical trauma. However, data obtained from 80 days showed consistent improvement based on decreased inflammatory response. Overall, the patterns suggested the absence of toxicity related to the dye. Although a control group (no dyes or ILM peeling) would enrich the data obtained in this study, establishing a control group in which the dye was not used would be technically difficult and the

risks of macular trauma associated with ERG abnormalities would be enhanced [31–33].

The surgeons reported that pigmentation occurred in the ILM, core vitreous, and posterior hyaloid and no other structures were stained. Dye impregnation of the vitreous occurred in 24 (96%) of 25 procedures and 22 (88%) of 25 procedures for the ILM (Appendix). Dye deposition in the vitreous core and posterior hyaloid, received scores of 7.0 ± 1.4 and 8.8 ± 1.4 , respectively, while the score for ILM visible dye injection was 7.1 ± 1.5 .

Although 12% of the surgeons did not believe that the dye adequately stained the ILM compared with their previous experience with BBG, all surgeons believed that the dye was useful for vitreoretinal surgery.

The lack of a control group using a commercially available dye such as BBG is a study limitation. However, testing

Amplitudes and implicit
full-field electroretinog-
ram (mean $\pm$ SD)

	Baseline	30 days follow-up	6 months follow-up
Scotopic 0.01 ERG			
b-wave amplitude (μ V)	216.51 $\pm$ 96.22 ^A	182.66 $\pm$ 91.02 ^B	213.18 $\pm$ 85.6 ^A
b-wave implicit time (ms)	90.26 $\pm$ 6.82 ^B	96.05 $\pm$ 7.69 ^A	93.48 $\pm$ 9.65 ^B
Scotopic 3.0 ERG			
a-wave amplitude (μ V)	223.92 $\pm$ 80.75	217.48 $\pm$ 67.48	227.16 $\pm$ 62.86
a-wave implicit time (ms)	20.53 $\pm$ 2.36 ^C	22.80 $\pm$ 2.22 ^A	21.84 $\pm$ 2.27 ^B
b-wave amplitude (μ V)	399.76 $\pm$ 99.23	404.88 $\pm$ 117.53	418.28 $\pm$ 97.53
b-wave implicit time (ms)	52.06 $\pm$ 6.36	53.67 $\pm$ 6.71	52.21 $\pm$ 6.09
Photopic 3.0 ERG			
b-wave amplitude (μ V)	115.58 $\pm$ 28.62	114.49 $\pm$ 35.17	114.99 $\pm$ 36.92
b-wave implicit time (ms)	32.16 $\pm$ 2.04 ^{B'}	33.33 $\pm$ 4.38 ^{A'}	33.23 $\pm$ 1.86 ^{A'}

$N=25$. p —ANOVA descriptive level for repetitive measurements of Friedman (*). (A), (B), and (C) different averages according to ANOVA contrasts. (A') and (B') present different averages according to Dunn-Bonferroni comparisons

as-free due to the previous experience these surgeons would have had with the commercially available dye. standardizing chronicity and the sizes of the MHs groups would be difficult. Third, this would only be with a large number of eyes. Finally, the primary of this study was to determine the usefulness of the gain the posterior hyaloids and ILMs. The comparison efficiency of the acai dye with the surgeons' experiences other commercially available dyes would only be additional information.

over, surgeons had at least 5 years of experience using es in chromovitrectomy and no previous training being the current dye; therefore, a learning curve is existing the acai dye. Despite this, the usefulness of the

dye received an average score of 7.4 ± 1.4 , indicating potential use in chromovitrectomy.

During a preliminary investigation of the acai dye cadaveric eyes, purple staining occurred a few seconds the dye came into contact with the neurosensory retina more intense staining of the ILM was observed between 3 min before dye removal [9]. In the current study, the sion to allow the dye to remain on the retinal surface for was based on the protocols of previous studies [8, 23] and supported by preclinical findings [9, 14]. To our knowledge no commercially available dye has a well-defined "c time for staining." Future studies can answer that ques

Vital dyes have been described as small chemical substances that pass freely through retinal tissue and exacerbate

Amplitudes and implicit
changes for multifocal
topography at six rings of
ity (mean $\pm$ SD)

	Baseline	30 days follow-up	6 months follow-up
Amp. P1 nV/deg2			
Ring1	49.64 $\pm$ 20.1 ^B	59.07 $\pm$ 29.21	66.03 $\pm$ 30.96 ^A
Ring2	48.86 $\pm$ 12.1	48.34 $\pm$ 13.23	52.70 $\pm$ 15.25
Ring3	43.70 $\pm$ 8.80	40.79 $\pm$ 10.15	43.63 $\pm$ 10.59
Ring4	31.58 $\pm$ 7.54	30.31 $\pm$ 6.94	32.43 $\pm$ 6.92
Ring5	25.24 $\pm$ 5.44	24.48 $\pm$ 6.14	25.49 $\pm$ 6.06
Ring6	20.55 $\pm$ 4.82	18.94 $\pm$ 5.55	20.16 $\pm$ 5.57
Pe T.P1			
Ring1	42.94 $\pm$ 7.30	43.54 $\pm$ 6.99	44.91 $\pm$ 3.89
Ring2	44.01 $\pm$ 2.58 ^B	45.99 $\pm$ 2.37 ^A	45.45 $\pm$ 2.64 ^A
Ring3	43.43 $\pm$ 2.12 ^B	45.56 $\pm$ 2.76 ^A	45.00 $\pm$ 2.84 ^A
Ring4	43.20 $\pm$ 2.36 ^B	45.36 $\pm$ 2.81 ^A	44.82 $\pm$ 2.89 ^A
Ring5	43.32 $\pm$ 1.99 ^B	45.55 $\pm$ 2.66 ^A	45.08 $\pm$ 2.68 ^A
Ring6	43.32 $\pm$ 2.06 ^B	45.93 $\pm$ 2.80 ^A	45.30 $\pm$ 2.92 ^A

$N=25$. p —ANOVA descriptive level for repetitive measurements of Friedman (*). (A), (B) present different averages according to ANOVA contrasts

toxicity from intraoperative light exposure. It has been suggested that photosensitizing dyes enhance phototoxicity by increasing the levels of free radicals, creating a photoproduct that is harmful to retinal cells and shifting light absorbance from the retinal site to another. We believe that because the acai has a high anthocyanin concentration, it might have a photoprotective antioxidant effect [11–13, 15, 17, 18]. Ongoing studies are evaluating the antioxidant capacity and safety profile of the acai in vitro and the possible protective effect on the ocular tissues, especially for RPE cells.

Another important potential advantage of the dye from the acai is that it is heavier than BSS, which results in gentle sedimentation onto the posterior pole by turning off the infusion and positioning the soft-tip cannula at the center of the vitreous cavity. This step avoids dye flushing into the posterior pole [7]. Despite the study limitations, the preliminary results suggest that the new dye extracted from the acai fruit at a concentration identified the posterior hyaloids and during PPVs in humans. Dye toxicity was unlikely. Further long-term follow-up and additional studies are necessary. The initial results suggested that the acai dye may be used for chromovitrectomy in the future.

Acknowledgments Vision Institute (IPEPO) and Ophthalmological Industry.

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- 402718/2013-5), Brazil, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2014/07686-8), São Paulo, Brazil.

Compliance with ethical standards

This prospective, interventional, non-randomized clinical study was registered in clinicaltrials.gov (NCT02691429). The consort flow diagram and list are available (Supplemental Digital Content 1). The Ethics Committee of the Federal University of São Paulo (Institutional Review Board number 466.833) and the National Brazilian Council of Research (authorization number 1.139.211) approved the study, which was conducted according to the Research Guidelines of the Association of Surgeons in Vision Ophthalmology and the Declaration of Helsinki. To avoid bias during data interpretation, 10 surgeons performed 25 procedures following an aleatory protocol defined by the Ethics Committee of the Federal University of São Paulo. All patients provided informed consent regarding the benefits and risks of the surgical procedure and the new dye.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

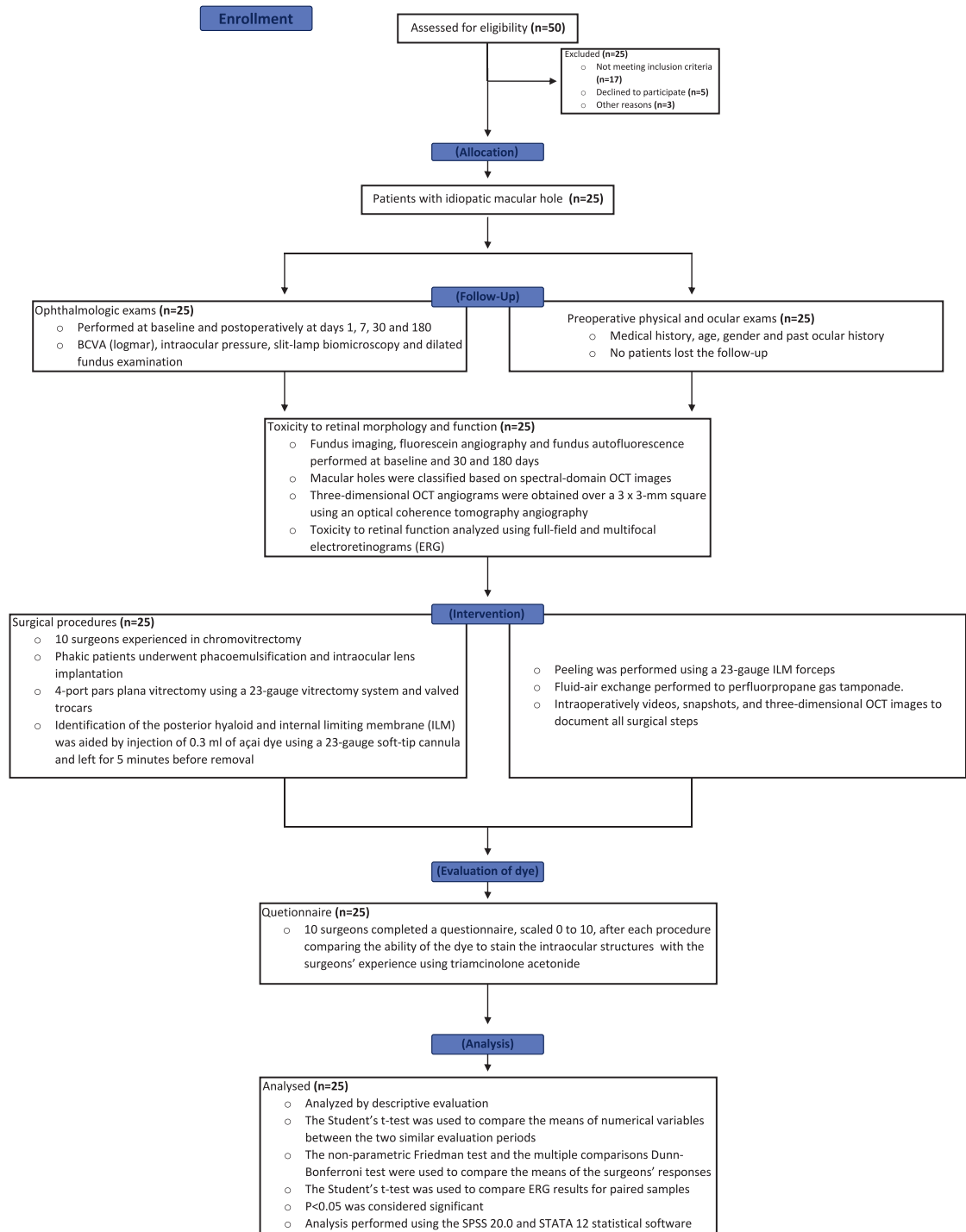
References

- Burk SE, Da Mata AP, Snyder ME, Rosa RH Jr, Foster R (2010) Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane. *Ophthalmology* 107:2010–2014
- Gandorfer A, Haritoglou C, Gass CA, Ulbig MW, Kampik A (2012) Indocyanine green-assisted peeling of the internal limiting membrane may cause retinal damage. *Am J Ophthalmol* 132:431–433
- Engelbrecht NE, Freeman J, Sternberg P Jr, Aaberg TM Sr, Aaberg TM Jr, Martin DF et al (2002) Retinal pigment epithelial detachment after macular hole surgery with indocyanine green-assisted limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol* 133:89–94
- Maia M, Kellner L, de Juan E Jr, Smith R, Farah ME, Marmá A et al (2004) Effects of indocyanine green injection on the surface and into the subretinal space in rabbits. *Retina* 24:100–105
- Maia M, Margalit E, Lakhnani R, Tso MO, Grebe R, Torres J (2004) Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina* 24:69–79
- Yuen D, Gonder J, Proulx A, Liu H, Hutnik C (2009) Comparison of the in vitro safety of intraocular dyes using two retinal cameras: a focus on brilliant blue G and indocyanine green. *Ophthalmol* 147:251–9 e2
- Malerbi FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB (2009) Subretinal brilliant blue G migration during internal limiting membrane peeling. *Br J Ophthalmol* 93:1687
- Farah ME, Maia M, Rodrigues EB (2009) Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol* 133:332–340
- Chen J, Ferreira MA, Farah ME, de Carvalho AM, Alves RE, de Moraes Filho MN et al (2013) Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanin from acai fruit (*Euterpe oleracea*) and 10 other natural vitamins: an experimental study in cadaveric eyes. *Retina* 33:89–96
- Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AA, Ferreira MA, Maia A et al (2013) Color variation assay of the anthocyanin from acai fruit (*Euterpe oleracea*): a potential new dye for vitreous surgery. *J Ocul Pharmacol Ther* 29(8):746–753
- Kahkonen MP, Heinonen M (2003) Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem* 51:628–634
- Rahman MM, Ichihara T, Komiyama T, Hatano Y, Kawanishi S (2006) Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activities of anthocyanins; structure-activity relationship and their synthesis. *Free Radic Res* 40:993–1002
- De Rosso VV, Moran Vieyra FE, Mercadante AZ, Borsari R (2008) Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavyl cations. *Free Radic Res* 42:885–891
- Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Nogueira Badaro E et al (2017) Retinal toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in rabbits: basic principles of a new chromovitrectomy in humans. *Curr Eye Res* 42(8):1185–1191
- Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST (2004) Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea*). *J Agric Food Chem* 52:1539–1545
- Peris CS, Caiado RR, Lima-Filho AAS, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves M, et al. (2018) Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): a potential novel vital dye for chromovitrectomy. *J Ophthalmol* 2018:1–9
- Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J et al (2002) Antioxidant capacity and other bioactivities of the free radicals of Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acai). *J Food Chem* 54:8604–8610
- Jang YP, Zhou J, Nakanishi K, Sparrow JR (2005) Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane lipid peroxidation in retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 81:529–536

26. de S, Savastano A, Bacherini D, Savastano MC (2017) Vascular features of full-thickness macular hole by OCT angiography. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 48:62–68
27. Rodriques EB, Maia M, Meyer CH, Penha FM, Dib E, Farah ME (2007) Vital dyes for chromovitrectomy. *Curr Opin Ophthalmol* 179–187
28. Rodriques EB, Penha FM, de Paula Fiod Costa E, Maia M, Moraes M Jr et al (2010) Ability of new vital dyes to stain macular membranes and tissues in ocular surgery. *Am J Ophthalmol* 149:265–277
29. Tari SR, Vidne-Hay O, Greenstein VC, Barile GR, Hong Chang S (2007) Functional and structural measurements assessment of internal limiting membrane peeling in idiopathic macular pucker. *Retina* 27:567–572
30. Lim JW, Cho JH, Kim HK (2010) Assessment of macular function by multifocal electroretinography following epiretinal membrane surgery with internal limiting membrane peeling. *Ophthalmol* 4:689–694
31. Chatziralli IP, Theodosiadis PG, Steel DHW (2018) Internal limiting membrane peeling in macular hole surgery; why, when, how? *Retina* 38:870–882
32. Eckardt C, Eckardt U, Groos S, Luciano L, Reale E (2018) Removal of the internal limiting membrane in macular holes. Clinical and morphological findings. *Ophthalmologie* 94:50–55
33. Mester V, Kuhn F (2000) Internal limiting membrane removal management of full-thickness macular holes. *Am J Ophthalmol* 129:769–777
20. de S, Savastano A, Bacherini D, Savastano MC (2017) Vascular features of full-thickness macular hole by OCT angiography. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 48:62–68
21. Bach DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS et al (2012) ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (ERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol* 124:1–13
22. Culloch DL, Marmor MF, Brigell MG, Hamilton R, Holder GE, Kovach R et al (2015) ISCEV standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc Ophthalmol* 130:1–12
23. Furlani B, Prazeres J, Maia M, Lima AA, Souza-Martins DS et al (2014) Soluble lutein in combination with brilliant blue as a dye for chromovitrectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 52:1071–1078
24. Furlani B, Souza-Lima AA, Martins DS, Navarro RM, Port R Jr (2014) Lutein: a new dye for chromovitrectomy. *Retina* 34:262–272
25. Rodriques EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Bottos J, Dib E et al (2009) The use of vital dyes in ocular surgery. *Surv Ophthalmol* 54:604–617
26. Furlani B, Priglinger SG, Haritoglou C, Josifova T, Ferreira PR, Weiss RW et al (2011) Quantification of contrast recognizability using brilliant blue G- and indocyanine green-assisted chromovitrectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:4345–4349
27. Rodriques EB, Moraes-Filho MN, Maia A, Rodriques EB, Farah ME, Maia M (2014) State of the art in chromovitrectomy. *Rev Bras Ophthalmol* 73:363–376

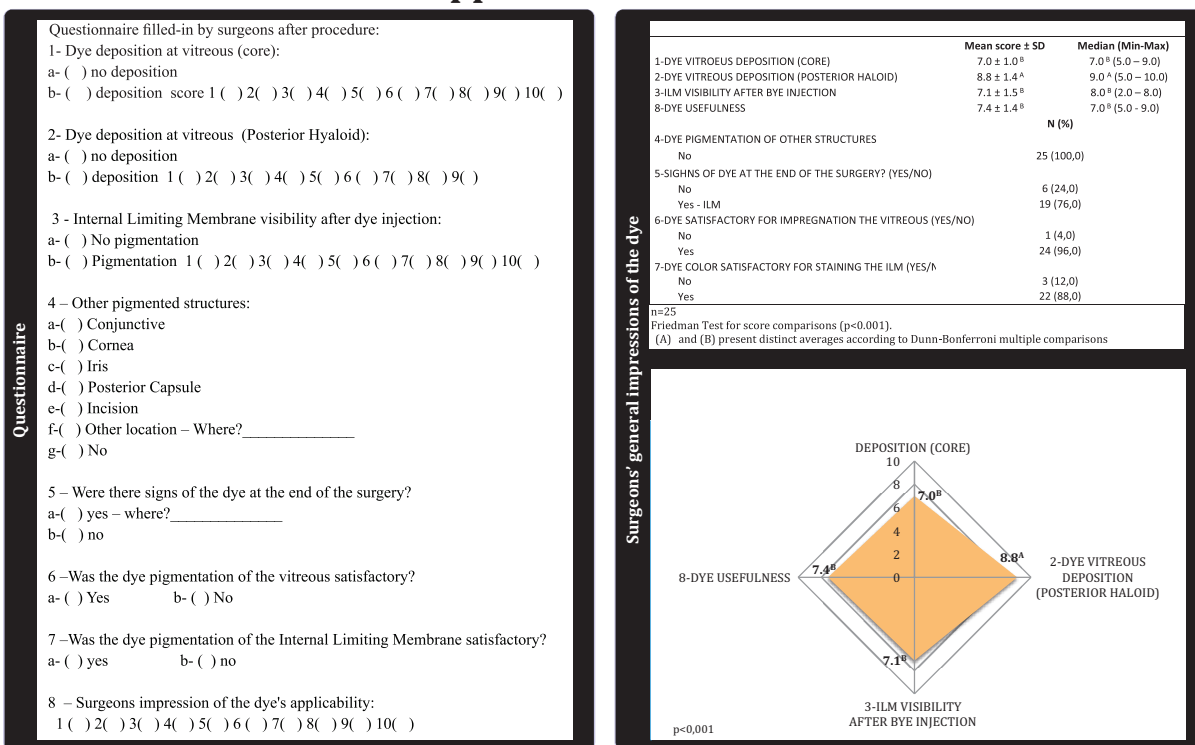
(Supplemental Digital Content 1)

CONSORT Flow Diagram



(Appendix / Supplemental Digital Content 3)

Supplemental Material



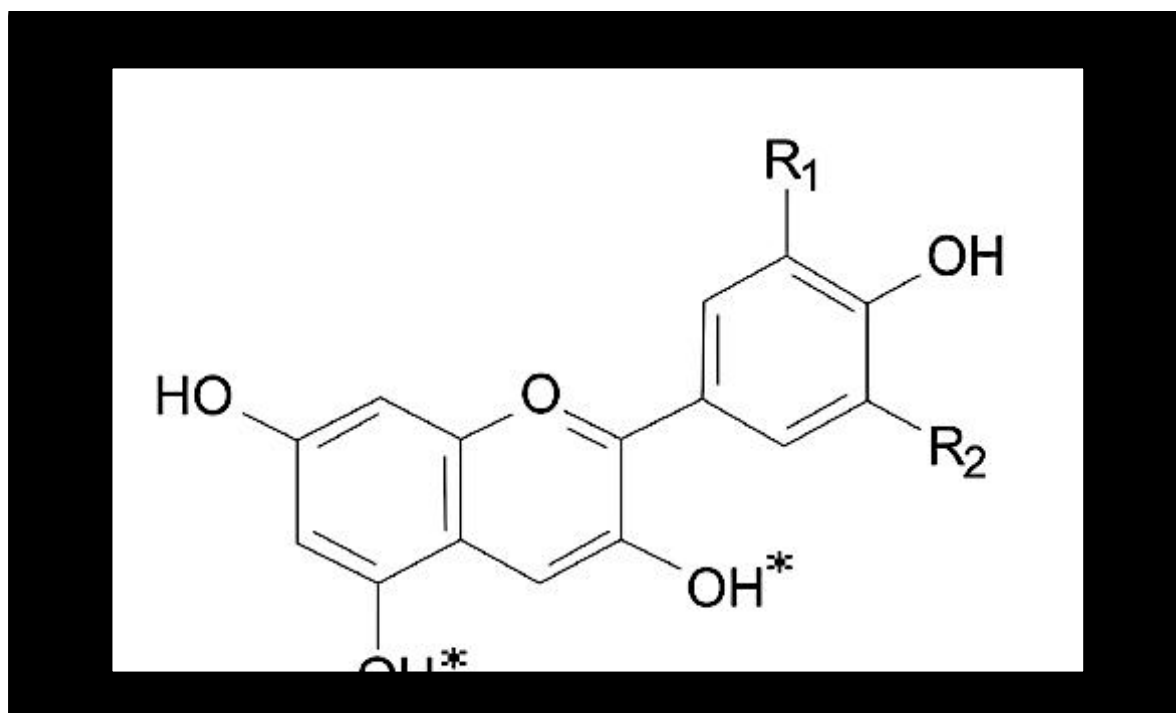
4 DISCUSSÃO

A aplicabilidade do pigmento extraído do fruto do açaí como corante usado em cromovitrectomia foi avaliada quanto à sua composição antioxidante, à sua eficiência em pigmentar seletivamente as estruturas transparentes do olho e à sua toxicidade morfofuncional, inicialmente em coelhos, e, posteriormente, em humanos. A linha de pesquisa deu origem a três publicações:

- Artigo 1: *Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (Euterpe oleracea): A Potential Novel Vital Dye for Chromovitrectomy;*
- Artigo 2: *Retinal Toxicity of Acai Fruit (Euterpe oleracea) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans;* e
- Artigo 3: *A New Dye Based on Anthocyanins from the Acai Fruit (Euterpe oleracea) for Chromovitrectomy in Humans: Clinical Trial Results.*

4.1 Analysis of Anthocyanins Extracted from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*): a Potential Novel Vital Dye for Chromovitrectomy.

Antocianinas são flavonoides, um metabolito secundário de plantas que contêm, em sua estrutura geral, dois anéis fenil e um anel heterocíclico (Figura 1). Já foi descrito que o poder antioxidante dos flavonoides reduz a oxidação proteica e aumenta a expressão da enzima paraoxanase 2 em macrófagos.⁽²⁷⁻³³⁾ As antocianinas são um dos principais componentes do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*). Além disso, a capacidade antioxidante equivalente ao trolox do fruto do açaí (48,6 μmol Trolox equivalentes/mL) é maior do que a de diversas frutas, como o morango e a uva.⁽³⁴⁾



Fonte: Peris CS, Caiado RR, Souza Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves MB, de Queiroz Alves B, Palma Urushima JG, Ragazzi R, Maia M. Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): A potential novel vital dye for chromovitrectomy. J Ophthalmol. 2018;2018:6830835

Figura 1. Estrutura molecular básica das antocianinas

Especula-se que as antocianinas apresentam um efeito antioxidante ao quelarem o oxigênio singlete, o qual seria liberado por corantes irradiados pela luz durante a cromovitrectomia.^(32,35) Portanto, a presença de antocianinas no pigmento extraído do fruto do açaí pode estar associada à baixa toxicidade do corante desenvolvido.

O objetivo do primeiro artigo foi caracterizar e quantificar as antocianinas presentes no pigmento extraído do fruto do açaí. Para isso, foram usadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrometria de massa (MS). As técnicas revelaram a presença de cinco moléculas diferentes de antocianinas, independentemente da concentração do corante do açaí, na seguinte proporção: cianidina-3-O-glucosídeo > homoorientina > orientina > taxifolina > isovitexina (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação das antocianinas com base no tempo de retenção da área, o qual foi analisado por CLAE nas diferentes concentrações

Antocianinas	Concentração -10%	Concentração -25%	Concentração -35%
Cianidina-3-O-glucosídeo			
Tempo de retenção (minutos)	9.987	9.980	9.973
Área (ml)	23.909	24.410	23.886
Homoorientina			
Tempo de retenção (minutos)	10.380	10.380	10.380
Área (ml)	38.511	36.950	40.106
Orientina			
Tempo de retenção (minutos)	10.587	10.593	10.580
Área (ml)	22.945	22.784	23.988
Taxifolina			
Tempo de retenção (minutos)	11.673	11.667	11.667
Área (ml)	0.966	0.894	0.998
Isovitexina			
Tempo de retenção (minutos)	10.893	10.893	10.880
Área (ml)	6.755	6.737	6.194

Fonte: Peris CS, Caiado RR, Souza Lima-Filho AA, Rodrigues EB, Farah ME, Gonçalves MB, de Queiroz Alves B, Palma Urushima JG, Ragazzi R, Maia M. Analysis of anthocyanins extracted from the acai fruit (*Euterpe oleracea*): A potencial novel vital dye for chromovitrectomy. J Ophthalmol. 2018;2018:6830835.

O resultado obtido nesse trabalho serviu de base para identificar e, então, compreender melhor as antocianinas presentes no corante extraído do fruto do açaí. Trabalhos futuros poderão analisar o efeito antioxidante dessas antocianinas e como a ação destas está ou não ligada à baixa toxicidade morfológica e funcional do corante durante a cromovitrectomia.

4.2 Retinal Toxicity of Acai Fruit (*Euterpe oleracea*) Dye Concentrations in Rabbits: Basic Principles of a New Dye for Chromovitrectomy in Humans

O objetivo desse estudo foi testar a toxicidade de diferentes concentrações (10%, 25% e 35%) do pigmento extraído do fruto do açaí, usando um modelo em coelhos.

Para avaliar a toxicidade funcional do corante, realizamos uma ERG (Figura 2) enquanto a toxicidade morfológica foi mensurada ao proceder aos seguintes exames: fundoscopia, angiografia fluoresceínica (AFG), tomografia de coerência óptica (OCT), LM e microscopia eletrônica de transmissão (MET).



Fonte: do autor.

Figura 2. Sumário de todo o sistema utilizado para realização da eletroretinografia. Os três eletrodos estão em destaque e posicionados à direita do coelho - A. eletrodo estimulador posicionado na córnea do animal; B. eletrodo negativo posicionado periocular; C. eletrodo terra posicionado na orelha do animal.

A interpretação dos resultados da ERG (Tabela 2) revelou que as amplitudes na fase escotópica de 0,01 ERG e de 3,0 ERG para a concentração de 35%, após 24 horas, apresentaram valores significativamente mais baixos em microvolts comparados ao SBB ($p < 0,05$). Após 7 dias, os valores de todas as concentrações tenderam à recuperação.

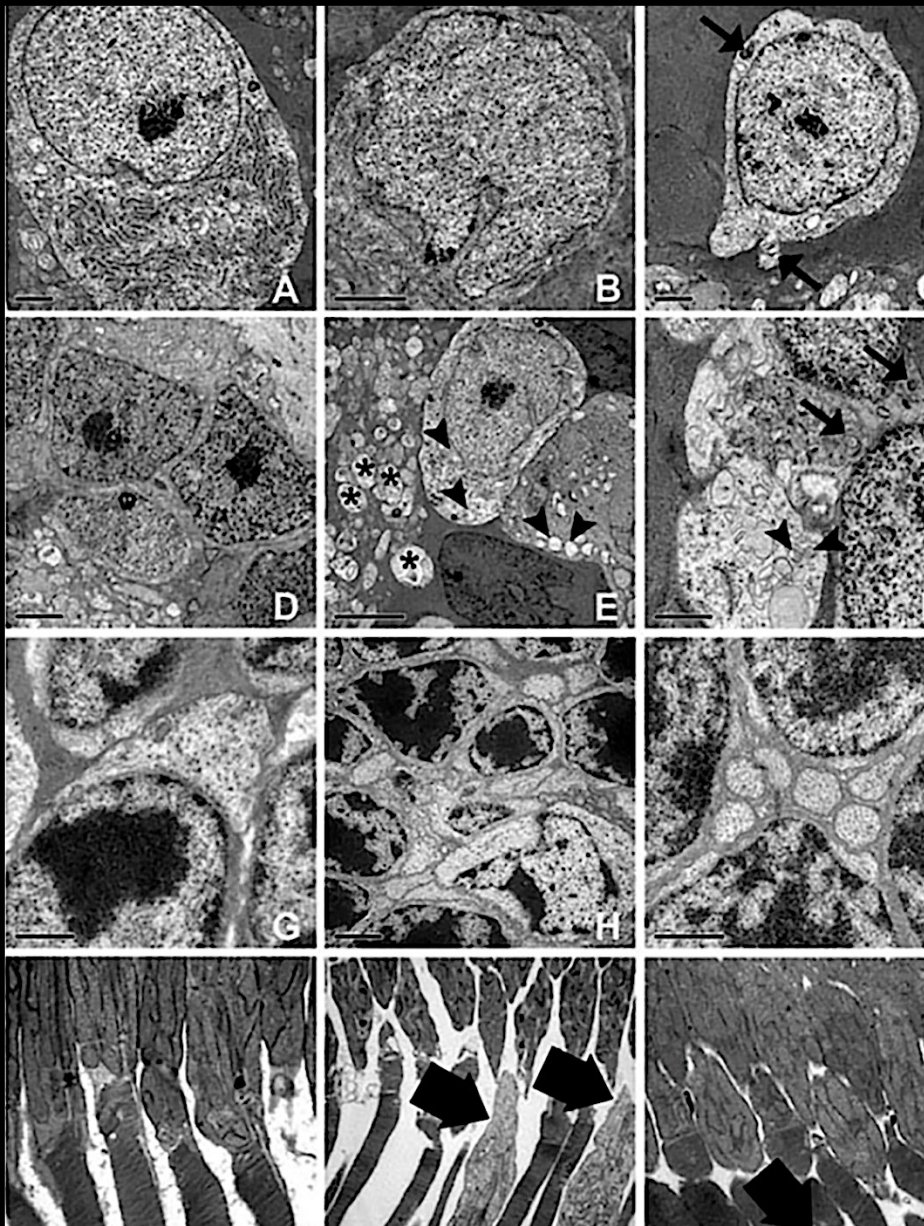
Tabela 2. Descrição e análise comparativa (Kruskal-Wallis) da eletroretinografia de campo total em coelhos, após 7 dias da injeção intravítrea de SSB nos olhos controle e de diferentes concentrações do corante do Açaí nos olhos testados

Fase escotópica 0,01 ERG		SSB	10%	25%	35%	$p (<0.05)$
onda-b	Amplitude (μV)	165(87-210)	150(120-220)	173(65-280)	110(58-250)	0.879
	Tempo implícito (ms)	60(50-60)	60(20-70)	65(60-70)	65(60-80)	0.083
Fase escotópica 3,0 ERG		SSB	10%	25%	35%	$p (<0.05)$
onda-a	Amplitude (μV)	8(2-12)	8(8-20)	5(5-5)	10(9-10)	0.204
	Tempo implícito (ms)	25(12-25)	25(25-25)	25(25-25)	25(25-25)	0.801
onda-b	Amplitude (μV)	175(144-265)	225(170-280)	227(190-265)	155(138-180)	0.135
	Tempo implícito (ms)	50(20-50)	45(45-50)	43(40-45)	50(34-53)	0.659

Fonte: Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais EA, Badaró E, Maia A, Sinigaglia-Coimbra R, Watanabe SE, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M. Retinal toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in Rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans. Curr Eye Res. 2017;42(8):1185-93.

Valores médios (mínimo e máximo) obtidos 7 dias após a injeção intravítrea

A MET apresentou anormalidades associadas apenas na concentração de 35% (Figura 3). Esses dados preliminares sugerem que a concentração do corante extraído do fruto do açaí tem toxicidade celular. Por outro lado, as concentrações de 10% e 25% não apresentaram esse perfil de toxicidade.



Fonte: Caiado RR, Peris CS, Lima-Filho AAS, Urushima JGP, Novais EA, Badaró E, Maia A, Sinigaglia-Coimbra R, Watanabe SE, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M. Retinal toxicity of acai fruit (*Euterpe oleracea*) dye concentrations in Rabbits: basic principles of a new dye for chromovitrectomy in humans. *Curr Eye Res.* 2017;42(8):1185-93.

Figura 3. Achados retinianos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) 24 horas e 7 dias nos olhos controle e após injeção intravítrea do corante a 35% do corante à base do fruto do açaí. Diferentes camadas retinianas mostradas para representar os olhos controle e após 24 horas e 7 dias. Vinte e quatro horas após a injeção intravítrea, há um discreto edema de células ganglionares e desarranjo mitocondrial (B). A presença de corpos multilamelares mais proeminentes com 7 dias (C-seta). Na camada nuclear interna, observa-se danos nos feixes nervosos (E -asterisco), alteração mitocondrial (E e F - Cabeça da seta) e abundantes corpos multilamelares (F - seta). Ausência de anormalidades observadas na camada nuclear externa (H, I). Os segmentos internos e externos dos fotorreceptores não apresentaram anormalidades relevantes, mas houve um desarranjo na crista mitocondrial no segmento interno dos fotorreceptores com 24 horas (K - seta larga), sendo observado com menor expressão com 7 dias (L - seta larga)

A retinografia revelou que a opacidade vítrea diminuiu de modo progressivo, independentemente da concentração, sugerindo que o corante é eliminado pelos tecidos oculares com eficiência. AFG não revelou alteração da fluorescência ou anormalidades vasculares independentemente da concentração do corante. Achados histológicos (LM e MET) revelaram que as pequenas alterações da retina (variabilidade fisiológica), apresentadas pelos corantes nas concentrações de 10% e 25%, não mostram achados diferentes do apresentado pela Solução Salina Balanceada (SSB). A exceção foi para a concentração de 35%, que demonstrou edema celular em células ganglionares e no segmento externo de fotorreceptores. A OCT foi negativa para edema ou atrofia retiniana, com imagens semelhantes às encontradas em olhos contralaterais.

Os resultados morfológicos corroboraram os achados de ERG e sugerem que o corante extraído do fruto do açaí é seguro para uso em coelhos na concentração de 10% e 25%. No entanto, a concentração de 35% foi associada à toxicidade funcional e morfológica.

A biocompatibilidade de outros corantes também já provou ser dose dependente.⁽³⁴⁾ Estudos futuros poderão comparar a toxicidade funcional e morfológica do corante extraído do fruto do açaí a outros corantes atualmente comercializados.

A limitação mais evidente desse estudo foi o fato de ser realizado em coelhos. As cavidades vítreas desses animais são menores e suas retinas são mais finas do que as de humanos. Por esse motivo, os resultados de toxicidade obtidos podem até ser maiores do que se realizados em olhos humanos.

Outra limitação do estudo foi o fato de o corante ter sido injetado em olhos de coelhos não vitrectomizados. Em olhos assim, o corante entrará em contato direto com a retina. Dessa forma, em humanos, o corante também entrará em contato direto com a retina e poderá resultar em maior toxicidade. Por outro lado, em humanos o corante é aspirado ao final da cirurgia e não permanece dentro do olho por tanto tempo, conforme ocorreu no estudo com coelhos.

Considerando essas limitações, o atual estudo em coelhos serviu de base para o estudo clínico realizado em humanos. Foi possível concluir que o corante extraído do fruto do açaí nas concentrações de 10% e 25% não causaram toxicidade funcional nem morfológica em coelhos.

4.3 A New Dye Based on Anthocyanins from the Acai Fruit (*Euterpe oleracea*) for Chromovitrectomy in Humans: Clinical Trial Results

A busca de um corante ideal para cromovitrectomia tem como base um pigmento que fosse viável e seguro ao mesmo tempo. Os objetivos deste estudo foram, portanto, avaliar a viabilidade e a segurança do uso do corante composto por antocianinas extraídas do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) na concentração de 25% em humanos que apresentavam a indicação cirúrgica para cromovitrectomia.

O preparo do corante foi realizado pela Ophthalmos Indústria Farmacêutica S/A, certificada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apesar de o estudo anterior ter revelado que ambas as concentrações de 10% e 25% foram seguras em coelhos, a investigação atual foi realizada com a concentração mais alta em razão de sua maior capacidade de pigmentação. Outros parâmetros estabelecidos para obtermos um corante biocompatível com o ambiente ocular foram a osmolaridade (300 mOsm), o pH (7) e a densidade (1,1). O processo de liofilização foi necessário por conta da instabilidade da cor.

Para analisar o perfil de segurança do corante extraído do açaí a 25%, realizamos avaliações anatômicas e funcionais. A fim de avaliar a viabilidade desse corante, foi investigada a capacidade de impregnação deste na hialoide posterior e na MLI por meio de preenchimento do questionário respondido pelo cirurgião após a utilização.

Os achados anatômicos obtidos nos exames de autofluorescência, angiofluoresceinografia, tomografia de coerência óptica e angiotomografia por coerência óptica não mostraram anormalidades anatômicas sugestivas de toxicidade no seguimento de 180 dias de pós-operatório.

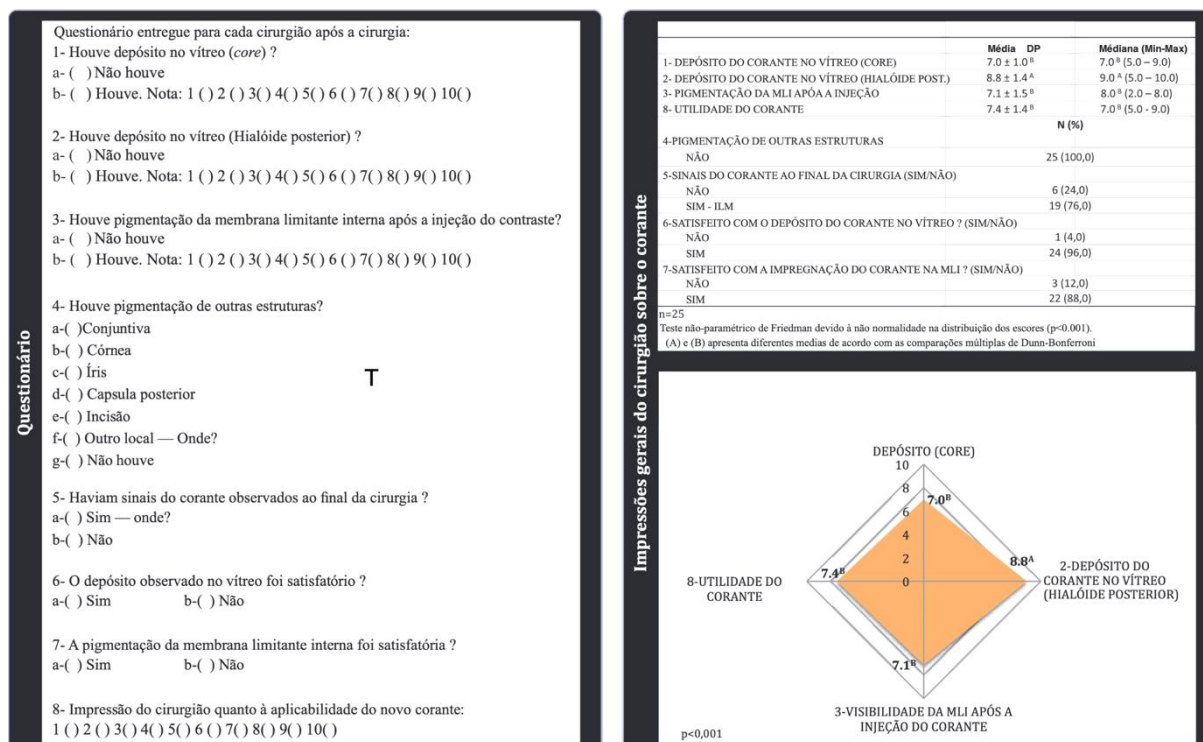
A taxa de fechamento do buraco macular foi de até 76% e todos os 25 olhos foram considerados pseudofácicos. Essa taxa de fechamento é semelhante à de outros estudos que também avaliam buracos maculares crônicos no pós-operatório.^(35,36) Dessa forma, o número de casos com fechamento do buraco macular sugere não haver relação com uma possível toxicidade do corante.

Neste estudo, os achados funcionais foram obtidos ao medir a acuidade visual e ao registrar a ERG multifocal. A acuidade visual média melhorou estatisticamente ($p < 0,001$) desde o pré-operatório ($1,37 \pm 0,29$) até 180 dias pós-operatório ($1,05 \pm 0,43$). No entanto, a melhora limitada da acuidade visual pode estar relacionada à cronicidade

dos casos. A ERG multifocal é um exame mais objetivo e sensível do que o da acuidade visual para avaliar os resultados funcionais. A ERG multifocal mostrou que os valores médios de amplitude para o anel 1 e a análise do tempo implícito P1 melhoraram progressivamente em relação ao *baseline* para 180 dias. Esse resultado provavelmente deveu-se a uma melhora anatômica foveal após o fechamento macular. As médias das amplitudes dos anéis 2 ao anel 6 e do tempo implícito P1 apresentaram um aumento desde o *baseline* até 30 dias e não mudaram significativamente de 30 para 180 dias. Esse aumento, embora não clinicamente importante, pode ser resultado de trauma cirúrgico causado pelo *peeling* da MLI, demonstrando ser improvável a possibilidade de efeitos tóxicos relacionados ao novo corante.

A ERG de campo total também foi utilizada para avaliar a toxicidade do corante. A ERG escotópica 0,01 e a ERG escotópica 3,0, *baseline* até 30 dias, mostraram valores que podem estar associados a trauma cirúrgico, isto é, à presença do gás perfluoropropano na cavidade vítrea e à resposta inflamatória pós-operatória. No entanto, os dados obtidos de 30 a 180 dias apresentaram melhora consistente com base na diminuição da resposta inflamatória. Em geral, os padrões ERG de campo total sugeriram ausência de toxicidade associada ao corante de açaí.

A análise dos questionários (Figura 4) revelou que a pigmentação foi seletiva e ocorreu para MLI, *core vitreous* e hialoide posterior. A pigmentação do vítreo (*core* e hialoide posterior) ocorreu em 24 de 25 procedimentos (escore de $7,0 \pm 1,0$ e $8,8 \pm 1,4$, respectivamente) e para a MLI em 22 de 25 procedimentos (escore $7,1 \pm 1,5$). Os cirurgiões também classificaram a aplicabilidade do corante com a nota de $7,4 \pm 1,4$. É importante ressaltar que, apesar de os cirurgiões serem experientes com outros corantes, eles nunca haviam operado usando o corante extraído do açaí. É razoável considerar que esses resultados poderão receber pontuação ainda mais alta após a realização de mais casos empregando o novo corante.



Fonte: Caiado RR, Peris C, Rodrigues EB, Farah ME, Maia A, Magalhães O Jr, Novais E, Lima-Filho AS, Maia M. A new dye based on anthocyanins from the acai fruit (*Euterpe oleracea*) for chromovitrectomy in humans: clinical trial results. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2019 Jan 3. doi: 10.1007/s00417-018-04204-y. [Epub ahead of print].

Figura 4. Questionário, tabela e gráfico com perguntas e respostas dos cirurgiões após procedimentos usando o corante extraído do açaí

Uma observação clínica importante foi o fato de o corante extraído do açaí ser mais pesado que o SSB. Essa característica resulta na sua cuidadosa deposição no polo posterior ao desligar a infusão e posicionar a ponta da cânula no centro da cavidade vítrea. Esse passo evita manobras agressivas, como o *flushing* do corante sobre o polo posterior. Outra possível vantagem do corante é que o fruto do açaí é acessível e, portanto, a produção em larga escala desse produto poderá resultar em um corante mais econômico em comparação aos comercializados atualmente. Além disso, diferente dos corantes atualmente empregados (PubMed, fevereiro, 2018), todos os passos da cromovitrectomia podem ser realizados usando apenas um corante, já que ele pigmenta tanto a hialóide posterior como a MLI.

Finalmente, apesar de esse estudo ser a última etapa de uma linha de pesquisa extensa que avaliou o corante extraído do fruto do açaí, estudos adicionais devem ser realizados para acompanharmos um maior número de pacientes por um período maior. De acordo com o estudo atual, o corante extraído do açaí a 25% foi seguro e viável para ser empregado em cromovitrectomia em humanos.

4.4 Perspectivas Futuras

Apesar dos resultados promissores em relação ao corante extraído do fruto do açaí em cromovitrectomia, novas pesquisas laboratoriais e clínicas deverão ser desenvolvidas. Duas principais linhas de pesquisa devem ser iniciadas. A primeira voltada para compreender melhor o papel antioxidante das antocianinas presentes no corante e de que maneira essa característica pode estar relacionada à sua baixa toxicidade celular. A segunda linha deverá tomar uma abordagem clínica, voltada para a comparação do corante extraído do fruto do açaí com outros corantes atualmente comercializados.

O aprofundamento do entendimento das propriedades químicas e físicas do corante extraído do fruto do açaí poderá tornar esse corante um produto técnica e economicamente mais interessante do que outras substâncias empregadas hoje em dia em cromovitrectomia.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

A linha de pesquisa atual revelou que o corante extraído do fruto do açaí, na concentração de 25%, é seguro e viável para ser usado em cromovitrectomia em humanos.

As vantagens do emprego desse novo corante são as seguintes:

- (1) O açaí possui uma alta composição de antocianinas (cianidina-3-O-glucosídeo > homoorientina > orientina > taxifolina > isovitexina).
- (2) Avaliações anatômicas e funcionais em coelhos não mostrou sinais de toxicidade do corante na concentração de 10% e 25%.
- (3) Todos os passos da cromovitrectomia podem ser realizados usando apenas um corante. Além disso, por ser mais pesado do que a SSB, o corante extraído do açaí evita manobras agressivas, como o *flushing*. O corante também se mostrou seguro e eficaz em cromovitrectomia em humanos.

5.1 Considerações finais

O corante extraído do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) é uma alternativa segura e eficiente para o uso em cromovitrectomia. Novas pesquisas clínicas e laboratoriais poderão aprofundar seu desempenho clínico e sua ação antioxidante na toxicidade celular.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

1. Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A. Resolution of diabetic macular edema after surgical removal of the posterior hyaloid and the inner limiting membrane. *Retina*. 2000;20(2):126-33.
2. La Heij EC, Hendrikse F, Kessels AG, Derhaag PJ. Vitrectomy results in diabetic macular oedema without evident vitreomacular traction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001 Apr;239(4):264-70.
3. Rodrigues EB, Meyer CH, Kroll P. Chromovitrectomy: a new field in vitreoretinal surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005 Apr;243(4):291-3.
4. Gandorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A. Indocyanine green selectively stains the internal limiting membrane. *Am J Ophthalmol*. 2001 Mar;131(3):387-8.
5. Schmidt JC, Meyer CH, Rodrigues EB, Hoerle S, Kroll P. Staining of internal limiting membrane in vitreomacular surgery: a simplified technique. *Retina*. 2003 Apr;23(2):263-4; author reply 264.
6. Kiernan JA. Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotech Histochem*. 2001 Sep-Nov;76(5-6):261-78.
7. Schulte EK. Standardization of biological dyes and stains: pitfalls and possibilities. *Histochemistry*. 1991;95(4):319-28.
8. Dib E, Rodrigues EB, Maia M, Meyer CH, Penha FM, Furlani BA, et al. Corantes vitais em cromovitrectomia. *Arch Bras Ophthalmol*. 2018 Feb 12;72(6):845-50.
9. Tadayoni R, Paques M, Girmens JF, Massin P, Gaudric A. Persistence of fundus fluorescence after use of indocyanine green for macular surgery. *Ophthalmology*. 2003 Mar;110(3):604-8.
10. Maia M, Kellner L, de Juan E Jr, Smith R, Farah ME, Margalit E, et al. Effects of indocyanine green injection on the retinal surface and into the subretinal space in rabbits. *Retina*. 2004 Feb;24(1):80-91.
11. Maia M, Margalit E, Lakhanpal R, Tso MO, Grebe R, Torres G, et al. Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits. *Retina*. 2004 Feb;24(1):69-79.
12. Westermeier R. Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue staining of polyacrylamide gels. *Proteomics*. 2006 Sep;6 Suppl 2:61-4.
13. Hisatomi T, Enaida H, Matsumoto H, Kagimoto T, Ueno A, Hata Y, et al. Staining ability and biocompatibility of brilliant blue G: preclinical study of

- brilliant blue G as an adjunct for capsular staining. *Arch Ophthalmol*. 2006 Apr;124(4):514-9.
14. Yuen D, Gonder J, Proulx A, Liu H, Hutnik C. Comparison of the in vitro safety of intraocular dyes using two retinal cell lines: a focus on brilliant blue G and indocyanine green. *Am J Ophthalmol*. 2009 Feb;147(2):251-259 e2.
 15. Malerbi FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB. Subretinal brilliant blue G migration during internal limiting membrane peeling. *Br J Ophthalmol*. 2009 Dec;93(12):1687.
 16. Peyman GA, Cheema R, Conway MD, Fang T. Triamcinolone acetate as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloid during pars plana vitrectomy. *Retina*. 2000;20(5):554-5.
 17. Caiado RR, Moraes-Filho MN, Maia A, Rodrigues EB, Farah ME, Maia M. State of the art in chromovitrectomy. *Rev. Bras. Oftalmol*. 2014 Dec;73(6):363-76.
 18. Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am J Ophthalmol*. 2009 Sep;148(3):332-40.
 19. Qin Y, Xia M, Ma J, Hao Y, Liu J, Mou H, et al. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am J Clin Nutr*. 2009 Sep;90(3):485-92.
 20. Udani JK, Singh BB, Singh VJ, Barrett ML. Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. *Nutr J*. 2011 May 12;10:45.
 21. Sun X, Seeberger J, Alberico T, Wang C, Wheeler CT, Schauss AG, et al. Acai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Exp Gerontol*. 2010 Mar;45(3):243-51.
 22. Yamaguchi KK, Pereira LF, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food Chem*. 2015 Jul 15;179:137-51.
 23. Kuskoski EM, Asuero, AG, García-Parilla, MC, Troncoso AM, Fett R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology*. 2004 Oct/Dec;24(4):691-3.
 24. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006 Nov 1;54(22):8604-10.

25. Jang YP, Zhou J, Nakanishi K, Sparrow JR. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol.* 2005 May-Jun;81(3):529-36.
26. De Rosso VV, Morán Vieyra FE, Mercadante AZ, Borsarelli CD. Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radic Res.* 2008 Oct;42(10):885-91.
27. Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AA, Ferreira EL, Maia A, et al. Color Variation Assay of the Anthocyanins from Acai Fruit (*Euterpe oleracea*): A Potential New Dye for Vitreoretinal Surgery. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013 Oct;29(8):746-53.
28. Chen J, Ferreira MA, Farah ME, de Carvalho AM, Alves Ferreira RE, de Moraes Filho MN, et al. Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from acai fruit (*Euterpe oleracea*) and 10 other natural vital dyes: experimental study in cadaveric eyes. *Retina.* 2013 Jan;33(1):89-96.
29. Qin C, Li Y, Zhang R, Niu W, Ding Y. Separation and elucidation of anthocyanins in the fruit of mockstrawberry (*Duchesnea indica* Focke). *Nat Prod Res.* 2009;23(17):1589-98.
30. Kähkönen MP, Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem.* 2003 Jan 29;51(3):628-33.
31. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem.* 2004 Mar 24;52(6):1539-45.
32. Rahman MM, Ichiyanagi T, Komiyama T, Hatano Y, Konishi T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic Res.* 2006 Sep;40(9):993-1002.
33. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999 May;26(9-10):1231-7.
34. Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Bottós J, Dib E, et al. The use of vital dyes in ocular surgery. *Surv Ophthalmol.* 2009 Sep-Oct;54(5):576-617.
35. Willis AW, Garcia-Cosio JF. Macular hole surgery. Comparison of longstanding versus recent macular holes. *Ophthalmology.* 1996 Nov;103(11):1811-4.
36. Shukla SY, Afshar AR, Kiernan DF, Hariprasad SM. Outcomes of chronic macular hole surgical repair. *Indian J Ophthalmol.* 2014 Jul;62(7):795-8.

ANEXOS

Anexo 1. Comissão de Ética para o estudo laboratorial.

CEP Nº 4216091213 Registrado em: 12/12/2013

Título: "Caracterização das Antocianinas do Fruto do Açaí (EuterpeOleracea): Estudo da Interação Molecular das Antocianinas com a Membrana Limitante Interna "

Documentos anexados: 1.) 1. Projeto de Pesquisa

Data	Documento	Comentário do CEP	Status
12/12/2013	Projeto de Pesquisa	Estudo aprovado. (30/12/2013)	APROVADO

Recebido

Visualizar

Incluir doc

Sair



COMITE DE ETICA EM PESQUISA



São Paulo, 23 de janeiro de 2014
CEUA N [2689281013](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Rafael Ramos Caiado
Depto/Disc: Oftalmologia
Dr Mauricio Maia (orientador)

Título do projeto: "Avaliação da toxicidade retiniana das antocianinas e proantocianidinas do fruto do Açaí (Euterpe oleracea) em coelhos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A cirurgia vitreoretiniana é uma cirurgia que envolve técnicas complexas e delicadas que tratam doenças como buraco macular (BM), membrana epirretiniana (MER) e o edema macular diabético. (1, 2) A cromovitrectomia é uma dessas técnicas que incluem o uso de corantes compostos de pigmentos vitais ou cristais para melhorar a visualização durante a cirurgia de vitrectomia. Uma boa impregnação do corante favorece o resultado cirúrgico por que facilita procedimentos como o peeling da membrana limitante interna (MLI) e da membrana epirretiniana (MER), além da remoção vítrea completa. (3-5)

Até o momento não há um corante estabelecido para ser utilizado em cirurgias vitreoretinianas. A busca de um corante ideal é baseada em um pigmento que tenha um baixo potencial oxidativo, e a capacidade de fazer uma pigmentação seletiva e efetiva da MLI e/ou da MER. (17)

Recentemente, o uso de corantes naturais foram sugeridos como coadjuvantes na visualização das estruturas pré-retinianas e membranas. Entre eles, podemos citar as antocianinas, que são corantes naturais encontrados em uvas, blueberries, fruto do açaí e em qualquer outro fruto com coloração roxa. Sabe-se que uma das características das antocianinas é seu efeito antioxidante natural. (18, 19)

As antocianinas extraídas do fruto do açaí quando ajustadas a uma concentração de 0,5%, um PH de 7,06 e uma osmolaridade de 304mOsm resultaram em uma solução de coloração roxa. Ao ser testada durante cromovitrectomia em olhos cadavéricos, a solução identificou com facilidade a MLI que revelou uma pigmentação arroxeada. (20)

Portanto, existem estudos recentes que demonstraram a viabilidade clínica do uso das antocianinas provenientes do fruto do açaí (Euterpe oleracea) para se corar de maneira efetiva as estruturas pré-retinianas e membranas em cirurgia vitreoretiniana em olhos humanos cadavéricos. (20) (21) O presente estudo avaliará a possível toxicidade de diversas concentrações de antocianinas desse fruto em coelhos, sendo de grande interesse para a cirurgia vitreoretiniana atual. A consequência desse estudo será gerar uma base para o desenvolvimento de um corante originado de um fruto nacional e que ainda não foi descrito na literatura durante a cromovitrectomia em olhos humanos. Além disso, sua patente já está protocolada na forma de Depósito de Pedido Nacional de Patente sob no P11000244-8 A2 no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) com sessão de direitos para a Universidade Federal de São Paulo.

INFORMAÇÃO SOBRE ANIMAIS E CRONOGRAMA

ANIMAIS: Serão utilizados:

38 coelhos, machos, com 2Kg

PROCEDÊNCIA: Fazenda Angolana

MANUTENÇÃO: CEDEME

VIGÊNCIA DO ESTUDO: início previsto para: jan/2014 com término previsto para: dez/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 23/01/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



auditoria dos órgãos competentes.

4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Anexo 3. Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliar a aplicabilidade do corante composto pelas antocianinas e proantocianidinas do fruto do Açaí (Euterpe orelacea) em cromovitrectomia em humanos

Pesquisador: Rafael Ramos Caiado

Área Temática: Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 2

CAAE: 22208713.3.0000.5505

Instituição Proponente: Departamento de Oftalmologia

Patrocinador Principal: Universidade Federal de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 496.833

Data da Relatoria: 20/12/2013

Apresentação do Projeto:

Conforme Parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

Objetivo da Pesquisa:

Conforme Parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme Parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de resposta de pendência apontada no parecer 482.016

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência apontada no parecer CEP. 482.016 de 6/12/2013

QUANTO AO TCLE: Deve estar descrito que uma via deverá ficar com o pesquisador e outra com o

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 496.833

participante. Todas as páginas do TCLE deverão estar numeradas (ex: 1/4, 2/4,) e devem ser rubricadas pelo pesquisador principal e participante no momento da aplicação do TCLE. O TCLE deverá estar em papel timbrado do departamento e instituição atualizada)

resposta: nova versão de TCLE foi apresentada atendendo as solicitações do parecer inicial. - pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

SAO PAULO, 17 de Dezembro de 2013

Assinador por:
José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

Anexo 4. Parecer Consubstanciado da CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliar a aplicabilidade do corante composto pelas antocianinas e proantocianidinas do fruto do Açaí (*Euterpe orelacea*) em cromovitrectomia em humanos

Pesquisador: Rafael Ramos Caiado

Área Temática: Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 5

CAAE: 22208713.3.0000.5505

Instituição Proponente: Departamento de Oftalmologia

Patrocinador Principal: Universidade Federal de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.139.211

Data da Relatoria: 27/05/2015

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A cirurgia vitreoretiniana é uma cirurgia que envolve técnicas complexas e delicadas que tratam doenças como buraco macular (BM), membrana epirretiniana (MER) e o edema macular diabético. A cromovitrectomia é uma técnica que inclui o uso de corantes compostos de pigmentos vitais ou cristais para melhorar a visualização durante a cirurgia de vitrectomia. Uma boa impregnação do corante favorece o resultado cirúrgico por que facilita procedimentos como a remoção cirúrgica da membrana limitante interna (MLI) e da membrana epirretiniana (MER), além da remoção vítrea completa. Corantes são compostos químicos que se agregam a várias substâncias in natura para produzir cor. Quando os corantes coram tecidos ou células vivas, são chamados de corantes vitais. Em cirurgia vitreoretiniana, o emprego da indocianina verde (ICG) e o azul brilhante G (BBG) facilitam a visualização e a remoção de membranas pre-retinianas. A ICG tem importante papel como pioneira para remoção da membrana limitante interna (MLI). Porém, devido seu conhecido perfil de toxicidade, a recomendação atual para cromovitrectomia é a não utilização da ICG, especialmente na cirurgia de buraco macular. O BBG é um corante sintético que foi certificado como corante alimentar na Europa e pode ser usado como marcador cardiovascular e de proteínas em doenças neurológica. Dados sobre a utilização de BBG para cromovitrectomia e cirurgia de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

catarata foram primeiramente publicados em 2006. O perfil de segurança do BBG foi investigado por alguns autores em experimentos pré-clínicos em ratos e primatas e não foram observadas alterações patológicas à microscopia óptica ou eletrônica em pequenas doses injetadas de BBG. O acompanhamento de longo prazo não foram observados sinais de toxicidade. Apesar da boa afinidade do BBG pela membrana limitante interna (MLI) em olhos humanos, a migração inadvertida sub-retiniana do corante em um procedimento de remoção da MLI resultou em $\zeta++$.

D efeitos em janela ζ na angiofluoresceinografia sugerindo anormalidades atróficas do Epitélio Pigmentado da Retina (EPR). (16) Até o momento não há um corante estabelecido como ideal para ser utilizado em cirurgias vitreoretinianas. A busca de um corante ideal é baseada em um pigmento que tenha um baixo potencial oxidativo, e a capacidade de fazer uma pigmentação seletiva e efetiva da MLI e/ou da MER, bem como ser capaz de se depositar sobre a hialoide posterior. (17) Recentemente, o uso de corantes naturais foram sugeridos como coadjuvantes na visualização das estruturas pré-retinianas e membranas. Entre eles, podemos citar as antocianinas, que são corantes naturais encontrados em uvas, blueberries, fruto do açaí e em qualquer outro fruto com coloração roxa. Sabe-se que uma das características das antocianinas é seu efeito antioxidante natural. (18, 19) As antocianinas extraídas do fruto do açaí quando ajustadas a uma concentração de 0,5%, um PH de 7,06 e uma osmolaridade de 304mOsm resultaram em uma solução de coloração roxa. (20) Ao ser testada durante cromovitrectomia em olhos cadavéricos, a solução identificou com facilidade a MLI que revelou uma pigmentação arroxeada. (21) Portanto, existem estudos recentes que ressaltam a importância e a viabilidade clínica do uso das antocianinas provenientes do fruto do açaí (*Euterpe oleracea*) para se corar de maneira efetiva as estruturas pré-retinianas e membranas em cirurgia vitreoretiniana em olhos humanos cadavéricos. (20, 21) A patente do uso intraocular das antocianinas do fruto do açaí já foi depositada como pedido nacional de Patente sob nº P11000244-8 A2 no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) com cessão de direitos para a Universidade Federal de São Paulo.

Hipótese:

Desfecho Primário: Eficácia do tingimento do corante nas concentrações de 0,5 mg/ml nas estruturas investigadas. Desfecho Secundário: Ausência de toxicidade ou outros efeitos adversos relacionados ao uso do corante bem como melhora da acuidade visual.

Metodologia:

Vinte e cinco pacientes com diagnóstico de membrana epirretiniana, buraco macular, retinopatia

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

diabética com ou sem hemorragia vítrea e/ou edema macular e/ou tração vitreomacular associado a indicação de cirurgia de vitrectomia seguido da remoção da membrana epirretiniana e/ou membrana limitante interna serão selecionados para participar do presente estudo. Após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-UNIFESP), todos os pacientes deverão compreender e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da realização da cirurgia. Os pacientes atendidos no setor de Retina do Departamento de Oftalmologia da UNIFESP com diagnóstico de membrana epirretiniana, buraco macular ou retinopatia diabética proliferativa com indicação de cirurgia pela técnica de vitrectomia posterior via pars plana para remoção da membrana epirretiniana e/ou membrana limitante interna, serão convidados a participar deste estudo. Todos os pacientes serão operados pela técnica de vitrectomia padrão utilizando-se 4 esclerotomias e sistema de 23-gauge com iluminação acessória. Todos receberão o corante composto pelas antocianinas extraídas do fruto do Açaí (*Euterpe oleracea*) para corar a membrana epirretiniana e a membrana limitante interna e identificação do vítreo (hialóide posterior). Os pacientes serão seguidos por um período mínimo de 30 dias e cada consulta consistirá de exame oftalmológico conforme descrito acima e, na consulta de 30 dias, os exames complementares supra-citados serão repetidos.

Critérios de Inclusão/ Exclusão:**Critérios de inclusão:**

Pacientes maiores de 18 anos, ambos os sexos- diagnóstico de membrana epirretiniana, buraco macular ou retinopatia diabética proliferativa com ou sem hemorragia vítrea.- indicação de tratamento cirúrgico para remoção da membrana epirretiniana (com ou sem remoção da membrana limitante interna subjacente), remoção da membrana limitante interna e em retinopatia diabética com ou sem hemorragia vítrea.

Critérios de Exclusão:

Antecedente de qualquer doença ocular - Glaucoma - Qualquer infecção ocular previa modificando a anatomia ocular.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar a viabilidade e segurança do uso do corante composto pelas antocianinas extraídas do fruto do Açaí (*Euterpe oleracea*) nas concentrações de 0,1 mg/ml e 5 mg/ml em humanos que apresentam a indicação cirúrgica para cromovitrectomia. Será investigada

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde**Bairro:** Asa Norte**CEP:** 70.750-521**UF:** DF**Município:** BRASILIA**Telefone:** (61)3315-5878**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

a capacidade de impregnação do corante no hialóide posterior, da membrana epirretiniana e da membrana limitante interna.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Toxicidade do corante. Esse risco será minimizado pelo fato de já haver estudos anteriores em laboratório que não evidenciaram toxicidade. Dentre esses estudos, temos estudo de olhos cadavéricos, perfil de toxicidade retiniana em coelhos e cultura de células.

Benefícios:

Possibilidade de maior perfil de segurança durante o procedimento cirúrgico e altos níveis de sucesso terapêutico devido a propriedades antioxidantes e boa capacidade de tingimento dos tecidos com baixo risco de toxicidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

RECURSO ÀS PENDÊNCIAS 1, 2B, 2D, 2F e 2H.

1. Quanto à relação entre benefício esperado e risco da participação no referido protocolo: Conforme a resolução 466/2012 item V.I "As pesquisas envolvendo seres humanos são admissíveis quando: a) o risco se justifique pelo benefício esperado; b) no caso de pesquisas experimentais da área da saúde, o benefício seja maior, ou, no mínimo igual às alternativas já estabelecidas para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento.". O pesquisador faz referência, no protocolo de pesquisa, a estudos em olhos de cadáver. Não cita mais estudos prévios de biossegurança (como aconteceu no caso do corante BBG, por exemplo). Solicita-se que o pesquisador apresente todos os dados das pesquisas desenvolvidas, especificando a

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

fundamentação da fase de pesquisa clínica na qual se realizará o estudo, demonstrando que as fases anteriores já foram cumpridas, em acordo com a resolução 251/97.

RESPOSTA: Não há no momento, um corante estabelecido como ideal para ser utilizado em cirurgias vítreo-retinianas. Atualmente o corante Azul Brilhante tem sido a substância de escolha usado em cirurgias vítreo-retinianas. Porém, o estudo de Rodrigues et al. de 2009 ¹ revelou uma toxicidade seletiva aos fotorreceptores retinianos após injeção intra-vítrea do Azul Brilhante em olhos de coelhos. Um relato de caso (Malerbi et al.) ² descreveu a migração não-intencional de azul brilhante ao espaço sub-retiniano durante uma cromovitrectomia, sendo evidenciado, a anormalidade do Epitélio Pigmentário Retiniano na angiografia. A busca de um corante ideal é baseada em um pigmento que tenha um baixo potencial oxidativo, e a capacidade de fazer uma pigmentação seletiva e efetiva dos tecidos do olho. Recentemente, o uso de corantes naturais foram sugeridos como coadjuvantes na visibilização das estruturas pré-retinianas e membranas. Entre eles, podemos citar as antocianinas, que são corantes naturais encontrados em uvas, blueberries, fruto do açaí e em qualquer outro fruto com coloração roxa. Sabe-se que uma das características das antocianinas é seu efeito antioxidante natural. O estudo atual faz parte de uma linha de pesquisa da Universidade Federal de São Paulo que se iniciou em estudos laboratoriais in vitro (Peris et al. 2013 ³ e Chen et al. 2013 ⁴) e in vivo em coelhos (dados não publicados). Tais estudos incluíram a extração de antocianinas provenientes do fruto do açaí, o teste do uso do corante em olhos cadavéricos e o teste de toxicidade em olhos de coelho. Porém a limitação da técnica em laboratório e em animais requer que o experimento seja realizado em humanos. O estudo de Peris et al (2013) ³, revelou que o corante, quando estabelecido a um pH e osmolaridades fisiológicas (concentração de 0,5%, um pH de 7,06 e uma osmolaridade de 304mOs), resultou em uma solução de coloração roxa, ou seja, viável como corante. Ao ser testada em cromovitrectomia em olhos cadavéricos, a solução identificou com facilidade a MLI que revelou uma pigmentação arroxeadada, como mostrado no estudo na Jane Chen de 2013. ⁴ Outro trabalho recente em humanos, que não faz parte da presente linha de pesquisa (Sanchez et al 2009) ⁵, revelou que a polpa do açaí pode ser usada como um agente de contraste oral, natural, seguro, de baixo custo, com alta eficiência e bem aceito pelo paciente em exames de colangiopancreatografia usando ressonância magnética.

1. Rodrigues EB, Penha FM, Farah ME, de Paula Fiod Costa E, Maia M, Dib E, et al. Preclinical investigation of the retinal biocompatibility of six novel vital dyes for chromovitrectomy. Retina. 2009 Apr;29(4):497-510.

2. Malerbi FK, Maia M, Farah ME, Rodrigues EB. Subretinal brilliant blue G migration during internal

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

limiting membrane peeling. The British journal of ophthalmology. 2009;93(12):1687. Epub 2009/11/27.

3. Peris CS, Badaro E, Ferreira MA, Lima-Filho AA, Ferreira EL, Maia, et al. Color Variation Assay of the Anthocyanins from Acai Fruit (Euterpe oleracea): A Potential New Dye for Vitreoretinal Surgery. Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics. 2013. Epub 2013/07/26.

4. Chen J, Ferreira MA, Farah ME, de Carvalho AM, Alves Ferreira RE, de Moraes Filho MN, et al. Posterior hyaloid detachment and internal limiting membrane peeling assisted by anthocyanins from acai fruit (Euterpe oleracea) and 10 other natural vital dyes: experimental study in cadaveric eyes. Retina. 2013;33(1):89-96. Epub 2012/09/20.

5. Sanchez TA, Elias J, Jr., Colnago LA, de Almeida Troncon LE, de Oliveira RB, Baffa O, et al. Clinical feasibility of Acai (Euterpe oleracea) pulp as an oral contrast agent for magnetic resonance cholangiopancreatography. J Comput Assist Tomogr. 2009 Sep-Oct;33(5):666-71.

ANÁLISE: Os autores citaram como justificativa à busca de novos corantes, entre outros pontos, a toxicidade revelada pelo corante já utilizado em olhos de coelhos. No entanto, os autores não apresentaram dados de toxicidade em olhos de coelhos do corante em estudo. A falta desses dados pode submeter os participantes de pesquisa a riscos não aceitáveis. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RECURSO: Os dados de toxicidade do uso do corante em olhos de coelhos está apresentado em documento anexo (ANEXO 1). Resultados mostram que o uso do corante investigado é seguro no ponto de vista de toxicidade em coelhos.

ANÁLISE DO RECURSO: Embora os pesquisadores afirmem haver um "anexo 1" onde supostamente estariam os dados sobre toxicidade em coelhos, não há tal documento na plataforma. Entretanto, procurando entre os que há, encontra-se o documento Relatório toxicidade 21.04.15.pdf. Neste documento há os dados de toxicidade em coelhos. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão 3, datado de 09/12/2013:

a) Na página 1 de 4 lê-se: "Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar a viabilidade e segurança do uso do corante composto pelas antocianinas extraídas do fruto do Açaí (Euterpe oleracea) nas concentrações de 0,1mg/ml e 5 mg/ml em humanos que apresentam a indicação cirúrgica para cromovitrectomia.". O documento de consentimento deve seguir a terminologia da Resolução CNS 466/2012, item IV, e ser apresentado ao participante da pesquisa em forma de convite. Cabe ao pesquisador informar

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

todos os procedimentos do estudo e as garantias do participante da pesquisa para, ao final, solicitar sua anuência. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: O documento de consentimento foi totalmente modificado para seguir a terminologia da Resolução CNS 466 de 2012. O texto foi modificado para ser apresentado ao participante da pesquisa em forma de convite. Para facilitar o entendimento do paciente voluntário separamos o texto nos seguintes itens:

- I. Título da Pesquisa
 - II. Justificativa
 - III. Procedimentos
 - IV. Inclusão de Grupo controle ou placebos
 - V. Métodos alternativos para Obtenção da Informação ou Tratamento da Condição
 - VI. Desconfortos ou Riscos Esperados e Assistência
 - VII. Descrição dos Benefícios ou Vantagens Diretas ao Voluntário
 - VIII. Forma de Acompanhamento e Assistência ao Sujeito
 - IX. Forma de Contato com os Pesquisadores e com o CEP
 - X. Garantia de Esclarecimento
 - XI. Garantia de Recusa à Participação ou Saída do Estudo
 - XII. Garantia de Sigilo
 - XIII. Garantia de Ressarcimento e Indenização
 - XIV. Garantia de Entrega de Cópias
- ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

b) De acordo com o item IV-1-b da Resolução CNS 466/12, o TCLE deve "prestar informações em linguagem clara e acessível, utilizando-se das estratégias mais apropriadas à cultura, faixa etária, condição socioeconômica e autonomia dos convidados a participar da pesquisa.". O TCLE apresentado contém vários termos técnicos de difícil compreensão ao leigo. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Para tornar a linguagem apresentada no TCLE mais clara e acessível substituímos diversos termos técnicos para termos mais populares. Por exemplo, o termo "midríase medicamentosa" foi substituída por dilatação pupilar.

ANÁLISE: O TCLE continua com vários termos de difícil compreensão a um leigo. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA

RECURSO: Novas modificações foram realizadas em todo o texto do TCLE para tornar a sua linguagem mais acessível ao paciente.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

ANÁLISE DO RECURSO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

c) Na página 01 de 04, lê-se: "A introdução do corante composto pelas antocianinas extraídas do fruto do Açaí (experimental) ocorrerá durante a cirurgia de retina que será realizada de forma rotineira, com a remoção do Gel vítreo e de eventuais estruturas correspondentes à causa da doença abordada. Dessa forma, não há benefício direto para o participante. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que o corante em questão, permite melhor visibilização dessas estruturas, SEM OFERECER EFEITOS COLATERAIS."(Destaque nosso). Da forma como a hipótese a ser testada foi apresentada dá a entender que não há risco de efeito colateral, o que não é verdade. Solicita-se correção.

RESPOSTA: Os procedimentos e os riscos de efeito colateral foram detalhadamente explicados no texto do TCLE sob os subtítulos: III – Procedimentos; VI- Desconfortos ou Riscos Esperados e Assistência

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

d) Na página 2 de 4, lê-se: "Ao término da cirurgia, todos os pacientes RECEBERÃO UMA RECEITA MÉDICA com colírio de associação de antibiótico com corticoide, seguindo a rotina de cirurgia de vitrectomia, durante as semanas seguintes do pós-operatório." (Destaque nosso). Como a medicação pós-operatória faz parte do estudo, não é aceitável que os participantes tenham despesas com tal medicação, que deve ser fornecida pelo patrocinador, em acordo com o item IV-3-g da Resolução CNS 466/12. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Não haverá despesas pessoais para o paciente em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, além do custo de deslocamento do paciente para essas etapas do estudo.

Essa informação foi agora introduzida sob o subtítulo:

VII. Descrição dos Benefícios ou Vantagens Diretas ao Voluntário

ANÁLISE: O trecho apresentado foi: "não haverá despesas pessoais [...] ALÉM DO CUSTO DE DESLOCAMENTO [...]" (destaque nosso). No entanto, da forma como o trecho foi redigido entende-se que o gasto de transporte dar-se-á por conta do participante de pesquisa. PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA.

RECURSO: O Trecho destacado acima (página 6/9) foi modificado para:

"Não haverá despesas pessoais para o paciente e seu acompanhante, em qualquer fase do estudo, incluindo exames, consultas, custos de alimentação e deslocamento durante essas etapas do estudo."

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

ANÁLISE DO RECURSO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

e) Na página 2 de 4 lê-se: "Posteriormente serão realizados exames para documentação e análise dos resultados, como a Retinografia e Angiofluoresceinografia. Os efeitos adversos referente ao exame de angiofluoresceinografia incluem náusea, vômitos, rubor da pele, coceira, urticária e espirros em excesso. Problemas raros incluem desmaio, edema de laringe, brocoespasmo e choque anafilático. Quase todos pacientes apresentam alteração na coloração da pele e da urina, sem qualquer outra intercorrência. Os demais exames oftalmológicos: acuidade visual, eletrorretinografia, tomografia de coerência óptica e microperimetria não são invasivos, não utilizam radiação e não apresentam efeitos adversos.". Não há o detalhamento dos procedimentos, incluindo o tempo que se estima gastar para sua realização. Não há menção ao fato de que alguns dos exames não são realizados rotineiramente no pós-operatório, e que serão realizados exclusivamente com fins a fornecer dados à pesquisa. E especificamente no caso da eletrorretinografia, não é verdade que "não apresenta efeito adverso", pois necessita de dilatação das pupilas e uso de eletrodo de lente de contato, que podem causar desconforto e apresentam riscos, ainda que de frequência baixa. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Todas as informações acima descritas foram acrescentadas ao TCLE sob os subtítulos de: III. Procedimentos e VI. Desconfortos ou Riscos Esperados e Assistência.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

f) Não é informado que está garantido o ressarcimento de gastos relacionados ao estudo. Cabe ressaltar que, como prevê o item IV.3."g" da Resolução CNS 466/2012, deve ser garantido ao participante de pesquisa (e a seu acompanhante, se for o caso) o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames. Assim sendo, solicita-se que a garantia de ressarcimento dos gastos decorrentes da participação no estudo seja apresentada de modo claro e afirmativo.

RESPOSTA: Incluímos as informações acima descritas no texto do TCLE sob o subtítulo:

VII. Descrição dos Benefícios ou Vantagens Diretas ao Voluntário

ANÁLISE: O trecho apresentado foi: "não haverá despesas pessoais [...] ALÉM DO CUSTO DE DESLOCAMENTO [...]" (destaque nosso). No entanto, da forma como o trecho foi redigido entende-se que o gasto de transporte dar-se-á por conta do participante de pesquisa. PENDÊNCIA NÃO

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

ATENDIDA.

RECURSO: O Trecho destacado acima (página 6/9) foi modificado para:

"Não haverá despesas pessoais para o paciente e seu acompanhante, em qualquer fase do estudo, incluindo exames, consultas, custos de alimentação e deslocamento durante essas etapas do estudo."

ANÁLISE DE RECURSO: PENDÊNCIA ATENDIDA

g) Na página 2 de 4, lê-se: "As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente incluindo o Sr.(a)". Considerando que os dados pessoais serão identificados, solicita-se que sejam indicados os procedimentos que garantam sigilo, confidencialidade e segurança no tratamento dos dados (Resolução CNS 466/2012, item III.2.i e IV.3.e). RESPOSTA: Incluímos as informações acima descritas no texto do TCLE sob o subtítulo: XII. Garantia de Sigilo. Os pesquisadores asseguram a privacidade do sujeito quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Para isso, cada paciente será identificado com uma numeração a fim de resguardar seu dados pessoais durante a pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

h) Na página 3 de 4, lê-se: "Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. Os pesquisadores responsáveis se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.". Cabe ressaltar que a responsabilidade pela prestação de cuidados integrais de saúde pelo tempo que for necessário para o tratamento por lesões não pode estar vinculada à comprovação de relação direta com a participação no estudo, devido à própria dificuldade prática em comprovar esse vínculo. Assim sendo, danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios sofridos no decorrer da participação no estudo, devem ser acompanhados e tratados pelo pesquisador e seu patrocinador mesmo que não seja estabelecido nexo causal. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: O texto foi modificado sob o subtítulo: VIII. Forma de Acompanhamento e Assistência ao Sujeito

ANÁLISE: O trecho apresentado (a seguir) não evidencia a garantia de assistência integral e gratuita: "Em caso de dano pessoal, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios sofridos no decorrer

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

da participação no estudo, serão acompanhados e tratados pelo pesquisador e seu patrocinador na própria instituição". PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

RECURSO: O trecho citado acima (página 7/9) foi modificado para atender a garantia de assistência integral e gratuita ao paciente:

"Em caso de dano pessoal, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios sofridos no decorrer da participação no estudo, os pacientes envolvidos no estudo receberão assistência integral e gratuita e serão acompanhados e tratados pelo pesquisador e seu orientador na própria instituição."

ANÁLISE DE RECURSO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

i) Na página 3 de 4, lê-se: "Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Rafael Ramos Caiado, CPF-864.010.501-44, que pode ser encontrado no endereço: Rua Botucatu 822 Vila Clementina São Paulo SP, tel 5085-2087. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Rua Botucatu, 572 - 1º andar cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 E-mail: cepunifesp@epm.br.". Solicita-se que sejam incluídos no TCLE: uma breve descrição do que é o CEP, qual sua função no estudo e seu horário de funcionamento. Solicita-se ainda a inclusão da forma de contato com o pesquisador em caso de urgência/emergência.

RESPOSTA: O texto foi modificado sob o subtítulo: IX. Forma de Contato com os Pesquisadores e com o CEP.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

j) Na última página do TCLE, lê-se: "Em casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.". Tal afirmação está incoerente com os critérios de inclusão, que preveem apenas maiores de 18 anos de idade. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: A afirmação foi removida e o texto adequado para os critérios de inclusão.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

k) O participante de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apondo sua assinatura na última página do referido Termo. O pesquisador responsável, ou membro da equipe delegada pelo pesquisador responsável, deverá, da mesma forma, rubricar todas as folhas do TCLE, apondo sua

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 1.139.211

assinatura na última página do referido Termo. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: As observações acima serão seguidas no ato das assinaturas do TCLE, como sugerido.

Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

BRASILIA, 10 de Julho de 2015

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Bibliografia consultada

Normas para teses e dissertações [Internet]. 2ª ed. rev. e corrigida. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de Cursos; 2015 [cited Year Month Day]. Available from: <http://www.bibliotecacsp.sites.unifesp.br/images/doc/normas-para-teses-e-dissertacoes.pdf>