



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

ANTONIO AUGUSTO RAMOS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE (CAM) DE
OVOS EMBRIONADOS DE GALINHA FRENTE À EXPOSIÇÃO A COMPLEXOS
DE RUTÊNIO**

FORTALEZA

2025

ANTONIO AUGUSTO RAMOS RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE (CAM) DE OVOS
EMBRIONADOS DE GALINHA FRENTE À EXPOSIÇÃO A COMPLEXOS DE
RUTÊNIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso Graduação em Farmácia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra
Jorge.

Coorientadora: Ma. Francisca Amanda de
Oliveira Silva.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R611a Rodrigues, Antonio Augusto Ramos.

Avaliação da Irritação da Membrana Corioalantóide (CAM) de Ovos Embrionados de Galinha Frente à Exposição a Complexos de Rutênio / Antonio Augusto Ramos Rodrigues. – 2025.
74 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientação: Profa. Ma. Francisca Amanda de Oliveira Silva.

1. CAM. 2. princípio dos 3 Rs. 3. toxicidade. 4. complexos organometálicos. I. Título.

CDD 615

ANTONIO AUGUSTO RAMOS RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO DA MEMBRANA CORIOALANTÓIDE (CAM) DE OVOS
EMBRIONADOS DE GALINHA FRENTE À EXPOSIÇÃO A COMPLEXOS DE
RUTÊNIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Aprovado em: 15/07/2025

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu falecido pai, Antonio José Rodrigues.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me ajudado a chegar até aqui, porque essa trajetória não foi nem um pouco fácil. Embora eu não seja uma pessoa muito religiosa e seguidora de uma religião, tenho uma confiança muito forte em Deus e sei que, sem essa minha convicção, minha vida seria mais complicada.

À minha mãe, que embora não seja muito presente na minha vida, ajuda da maneira que pode.

À minha coorientadora, Amanda, que, mesmo sem me conhecer direito, acabou fazendo parte da minha escolha por cursar Farmácia, ao me tirar várias dúvidas, com muita paciência e cuidado, em relação à grade curricular e à profissão. Esse auxílio foi tão significativo para mim que a chamei para ser minha madrinha na Cerimônia do Jaleco. Além disso, ela se tornou uma grande amiga e sou muito grato pelas suas contribuições na execução deste trabalho.

À minha orientadora, professora Roberta, que é uma pessoa de um coração enorme sempre disposta a ajudar a todos da melhor forma que consegue, meu muito obrigado pela oportunidade de ingressar no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET) e me permitir aprender sobre diferentes metodologias na pesquisa científica, aumentando expressivamente minha capacitação profissional. Obrigado por acreditar em mim e sempre estimular o meu melhor.

Aos professores Ramon e Josimar, por terem aceitado participar da análise deste trabalho. Ambos são professores que comecei a admirar antes mesmo de fazer suas respectivas disciplinas e, após fazê-las, pude confirmar a dedicação e competência nas suas áreas.

Às minhas amigas de fora da faculdade, Gabrielly, Mariana, Larissa, Angel, Tamires e Morganna, que tiveram que compreender minhas ausências em muitos momentos por conta da faculdade, mas sem abalar nossa amizade em nenhum momento. Agradeço por todas as risadas, conselhos e por me apoiarem em tudo.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), minha instituição formadora, que, apesar das dificuldades de uma universidade pública no Brasil, se mantém como uma entidade de qualidade e referência para o Ceará e o País inteiro. Por meio da UFC, tive inúmeras vivências que contribuíram significativamente não apenas para minha formação acadêmica como também para minha formação humana. Agradeço demais pelas bolsas que tive ao longo dessa graduação e que muito favoreceram minha permanência na faculdade. Através da bolsa

de monitoria em Bioquímica tive minha primeira experiência em docência e tive empatia pelos professores ao ver o quanto falar por quase uma hora dói a garganta. Agradeço também ao professor Nicholas Costa Barroso Lima, orientador dessa monitoria, pela paciência e compreensão e por ter me permitido realizar um trabalho tão relevante para tornar o ensino de Bioquímica mais acessível para deficientes visuais com o auxílio fundamental da Secretaria de Acessibilidade da UFC (UFCInclui). Com a bolsa de extensão, orientado pela professora Roberta no LAFAVET, pude contribuir com a formação de jovens estudantes do ensino médio que sonham em se tornar cientistas. Sou muito agradecido também ao LAFAVET e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com a bolsa de iniciação científica que me permitiu atuar na área científica, sendo algo que sempre quis desde o início do curso. Agradeço também a contribuição daqueles professores da UFC que repassaram seus conhecimentos e incentivaram os estudantes a sempre buscar melhorar acadêmica e pessoalmente. Sou grato também à Casa de Cultura Francesa desta Universidade por me permitir aprender um idioma com professores extremamente competentes e dedicados. Aproveito para agradecer ao professor Roterdan por ter disposto um pouco do seu tempo para avaliar o resumo em francês que fiz deste trabalho. Além disso tudo, sou muito grato à UFC pelas amizades que fiz ao longo desses 6 anos.

Aos meus amigos de turma, notadamente Dayse, Marusa, Elisandi, Ana Beatriz, Vinícius, Renata e Laisa, pelas risadas e sofrimentos compartilhados, sendo que cada um me marcou de forma diferente e sou muito feliz por ter conhecido vocês e sei que serão excelentes profissionais. Dayse, nossas conversas durante a janta no RU do Benfica jamais serão esquecidas. Gostaria de fazer um agradecimento especial para os amigos que mais estiveram presentes comigo durante essa graduação, Laís Kimberly, Lucas Frota e Vitor Lima: vocês foram muito especiais para mim, obrigado por estarem sempre presentes e espero que nossa amizade só se fortaleça e que possamos realizar nossos sonhos profissionais e pessoais.

Ao meu querido Centro Acadêmico Rodolfo Teófilo (CART), o primeiro projeto que participei na faculdade, por todas experiências proporcionadas. Durante as gestões que participei, pude desenvolver habilidades de liderança que me moldaram, contribuindo para meu desenvolvimento individual e tenho certeza que contribuirão para minha atuação profissional. Acredito que, por meio do CART, pude auxiliar diversos estudantes do Curso de Farmácia da UFC. Dei o meu máximo para buscar solucionar problemas institucionais e acadêmicos e sou muito feliz por cada estudante que me enxerga como uma figura importante para o Curso de Farmácia, enquanto, por muito tempo, os centros acadêmicos na UFC não eram valorizados pelos alunos. O CART me propiciou conhecer pessoas incríveis e a formar

amizades maravilhosas, destacando-se Leandro, Marília, João Vinícius, Mara Aguiar e Ana Vitória. Agradeço pela amizade, apoio e contribuição de cada um desses, mas tenho que ressaltar o papel do Leandro e Marília para o bom funcionamento dessa organização. Leandro com toda sua organização, humanidade e experiência, sempre esteve muito disposto a fazer o necessário para que tivéssemos excelentes resultados nas nossas atividades, sendo um exemplo para todos ao seu redor. Marília desde que ingressou no curso e no CART no seu primeiro semestre da graduação, mesmo sendo calada, mostrou-se muito responsável e alguém capaz de enxergar e propor soluções para diversos problemas, sendo a pessoa perfeita para assumir a direção do CART quando eu já estava cansado de todas as gestões que atuei. Agradeço à Marília por todos os textos que fizemos juntos reclamando por melhorias na UFC. Ainda gostaria de agradecer à Coordenação do Curso de Farmácia desta instituição, representada pela professora Zirlane e professor Paulo Arrais, coordenadora e vice-coordenador durante o período que estive à frente do CART, pelo suporte que procuraram dar às nossas demandas. Dedico singular agradecimento às professoras Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage e Ana Karina Bezerra Pinheiro, diretora e vice-diretora da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da UFC durante minha jornada no CART, por toda a acolhida, respeito e amizade, empenhando-se intensivamente para ajudar todos os discentes da FFOE, além de serem grandes exemplos para mim de pessoas comprometidas com o serviço público e como seres humanos.

À Liga de Saúde da Família (LISF), por me permitir interagir de forma multiprofissional ainda na graduação e mostrar a contribuição do profissional farmacêutico para a saúde da comunidade. Agradeço à professora Caroline e a cada membro da LISF que contribuiu com meu desenvolvimento durante minha permanência nesse projeto tão lindo.

À toda a equipe do LAFAVET, sobretudo aos meus parceiros de iniciação científica Lucas Fechine, Aparecida, Rafaela, Graziela e Rúbia e às doutorandas Ivynna e Ingrid, por toda a recepção, carinho, atenção e ajuda no decorrer desses anos.

À Ana Celeste, pós-doutoranda do LAFAVET, por toda sua paciência, calma e vontade de ensinar, tendo sido essencial para a realização dos experimentos com o *HET-CAM*.

Ao professor Luiz Gonzaga de França Lopes, do Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) e seus colaboradores, pelos compostos fornecidos sem os quais não seria possível a realização desta pesquisa.

Ao professor Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru e aos colaboradores do Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica, em especial à doutoranda Ana Patrícia, por todo o auxílio no desenvolvimento de diversas atividades.

RESUMO

As doenças cardiovasculares são um conjunto de condições crônicas, muitas vezes assintomáticas, que afetam o coração e os vasos sanguíneos, sendo um expressivo problema de saúde pública mundial, representando a principal causa de morte no Brasil e no mundo. Fatores como inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial contribuem para a progressão dessas enfermidades. Nesse contexto, compostos que liberam óxido nítrico (NO), como os complexos de rutênio, ganham destaque por seu potencial terapêutico, já que o NO atua na regulação da pressão arterial, vasodilatação e proteção vascular. No entanto, ainda não há medicamentos à base desses compostos aprovados para uso clínico, sendo essencial investigar o perfil toxicológico dessa classe de moléculas a fim de avançar no desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seguros para tratar esses agravos tão presentes em nossa sociedade. Assim, este estudo empregou uma abordagem experimental, tendo como finalidade avaliar a toxicidade de dois complexos de rutênio, FOR0603 e FOR0803, por meio de uma metodologia alternativa ao uso de animais, aplicando o teste do ovo embrionado de Hen na membrana corioalantóide (do inglês *Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane, HET-CAM*). Foi realizada a aplicação de 200µL das substâncias-teste na membrana corioalantóide (*CAM*) de ovos embrionados de galinha e observado por 300 segundos sinais clássicos de irritação, marcados por coagulação, lise e hemorragia dos vasos sanguíneos, e o momento exato, em segundos, em que cada evento iniciou foi registrado para ser aplicado em uma fórmula que determina o grau de irritação da *CAM*. Foram utilizados um total de 20 ovos distribuídos em 5 grupos com 4 ovos cada, divididos em grupos controle (NaOH 0,1 M (+), PBS (-) e DMSO 3%) e grupos experimentais (FOR0603 e FOR0803, ambos com concentração de 100 µM). Os resultados encontrados indicaram que o FOR0603 e FOR0803 não apresentaram irritação na *CAM*. Entretanto, mais estudos sobre o perfil toxicológico desses compostos fazem-se necessários, a fim de estabelecer uma avaliação de toxicidade mais completa e avançar em ensaios clínicos.

Palavras-chave: *CAM*; princípio dos 3 Rs; toxicidade; complexos organometálicos.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are a group of chronic conditions, often asymptomatic, that affect the heart and blood vessels. They are a significant global public health problem, representing the leading cause of death in Brazil and worldwide. Factors such as inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction contribute to the progression of these diseases. In this context, compounds that release nitric oxide (NO), such as ruthenium complexes, stand out for their therapeutic potential, since NO acts in the regulation of blood pressure, vasodilation, and vascular protection. However, there are still no drugs based on these compounds approved for clinical use, and it is essential to investigate the toxicological profile of this class of molecules in order to advance the development of more effective and safer drugs to treat these conditions that are so prevalent in our society. Thus, this study employed an experimental approach to evaluate the toxicity of two ruthenium complexes, FOR0603 and FOR0803, using an alternative methodology to animal testing, applying the Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane (HET-CAM). 200 μ L of the test substances were applied to the chorioallantoic membrane (CAM) of embryonated chicken eggs and observed for 300 seconds for classic signs of irritation, marked by coagulation, lysis and haemorrhage of blood vessels, and the exact moment, in seconds, when each event began was recorded to be applied in a formula that determines the degree of irritation of the CAM. A total of 20 eggs were used, distributed into 5 groups of 4 eggs each, divided into control groups (NaOH 0.1 M (+), PBS (-) and DMSO 3%) and experimental groups (FOR0603 and FOR0803, both with a concentration of 100 μ M). The results found indicated that FOR0603 and FOR0803 did not cause irritation in CAM. Nevertheless, further studies on the toxicological profile of these compounds are necessary in order to establish a more complete toxicity assessment and advance clinical trials.

Keywords: CAM; 3 Rs principle; toxicity; organometallic complexes.

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires sont un ensemble d'affections chroniques, souvent asymptomatiques, qui touchent le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles constituent un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale, représentant la principale cause de décès au Brésil et dans le monde. Des facteurs tels que l'inflammation, le stress oxydatif et le dysfonctionnement endothélial contribuent à la progression de ces maladies. Dans ce contexte, les composés qui libèrent de l'oxyde nitrique (NO), tels que les complexes de ruthénium, se distinguent par leur potentiel thérapeutique, car le NO agit sur la régulation de la pression artérielle, la vasodilatation et la protection vasculaire. Cependant, aucun médicament à base de ces composés n'a encore été approuvé pour un usage clinique. Il est donc essentiel d'étudier le profil toxicologique de cette classe de molécules afin de progresser dans le développement de médicaments plus efficaces et plus sûrs pour traiter ces maladies si présentes dans notre société. Ainsi, cette étude a utilisé une approche expérimentale visant à évaluer la toxicité de deux complexes de ruthénium, FOR0603 et FOR0803, à l'aide d'une méthodologie alternative à l'utilisation d'animaux, en appliquant le test de l'œuf embryonné de poule sur la membrane chorio-allantoïdienne (en anglais *Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane*, *HET-CAM*). 200 µL des substances d'essai ont été appliqués sur la membrane chorio-allantoïdienne (*CAM*) d'œufs embryonnés de poule et les signes classiques d'irritation, caractérisés par une coagulation, une lyse et une hémorragie des vaisseaux sanguins, ont été observés pendant 300 secondes. Le moment exact, en secondes, où chaque événement a commencé a été enregistré afin d'être appliqué à une formule qui détermine le degré d'irritation de la *CAM*. Au total, 20 œufs ont été utilisés, répartis en 5 groupes de 4 œufs chacun, divisés en groupes témoins (NaOH 0,1 M (+), PBS (-) et DMSO 3 %) et groupes expérimentaux (FOR0603 et FOR0803, tous deux à une concentration de 100 µM). Les résultats obtenus ont indiqué que les composés FOR0603 et FOR0803 n'ont pas provoqué d'irritation au niveau de la *CAM*. Toutefois, des études supplémentaires sur le profil toxicologique de ces composés sont nécessaires afin d'établir une évaluation plus complète de leur toxicité et de progresser dans les essais cliniques.

Mots-clés: la *CAM*; le principe des 3 R; la toxicité; les composés organométalliques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação esquemática do embrião de galinha dentro do ovo.....	31
Figura 2	– Demonstração do efeito irritante na <i>CAM</i> por meio da aplicação de 2 mL de NaOH 1 M.....	35
Figura 3	– Representação da estrutura molecular dos complexos de rutênio FOR0603 e FOR0803 e seus núcleos de origem.....	37
Figura 4	– Pré-tratamento dos ovos.....	39
Figura 5	– Chocadeira com sistema de rotação (Modelo IP35D, Premium Ecológica®).....	39
Figura 6	– Transferência dos ovos para a incubadora.....	40
Figura 7	– Visualização do desenvolvimento embrionário.....	41
Figura 8	– Preparo dos ovos no dia do experimento.....	42
Figura 9	– Representação da irritação (B) que pode ser observada após aplicação de composto tóxico (A) na <i>CAM</i> íntegra.....	43
Figura 10	– Painel de acompanhamento de irritação da <i>CAM</i> após aplicação das substâncias-teste.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre o desenvolvimento embrionário de galinha e o período recomendado de manipulação da <i>CAM</i>	33
Tabela 2 – Faixa de classificação do Coeficiente de Irritação (CI).....	45
Tabela 3 – Dados da análise do <i>HET-CAM</i>	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>CAM</i>	<i>Chorioallantoic Membrane</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DCV	Doença Cardiovascular
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>HET-CAM</i>	<i>Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane</i>
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
iNOS	Isoforma induzível da óxido nítrico sintase
NONO ₂	Nitratos orgânicos
NONOatos	Diazeniodiolatos
RSNOs	S-nitrosotióis
NTG	Nitroglicerina
SNP	Nitroprussiato de sódio
sGC	Guanilato ciclase solúvel
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Ca ²⁺	Cálcio iônico
PGI ₂	Prostaciclina vasodilatadora
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
ET-1	Endotelina 1
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Ang-II	Angiotensina II
TxA ₂	Tromboxano A ₂

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1	Complexos de rutênio	22
3.2	Doenças cardiovasculares	23
3.3	Pesquisas utilizando animais	25
3.4	Tipos de toxicidade	27
3.5	Ensaio utilizando a membrana corioalantóide (CAM)	28
3.5.1	<i>Membrana corioalantóide de embrião de galinha</i>	30
3.5.2	<i>Fatores que influenciam o desenvolvimento embrionário e sua relação com a janela experimental de uso da CAM</i>	32
3.5.3	<i>Método de incubação In Ovo e Ex Ovo</i>	33
3.5.4	<i>Aplicação de substâncias na CAM</i>	34
3.5.5	<i>Eventos irritantes observados no HET-CAM</i>	35
4	METODOLOGIA	37
4.1	Aspectos éticos	37
4.2	Complexos de rutênio estudados	37
4.3	Ensaio de toxicidade aguda utilizando ovos embrionados de galinha pela metodologia HET-CAM	38
4.3.1	<i>Local de aquisição dos ovos fecundados de galinha</i>	38
4.3.2	<i>Local de realização do teste</i>	38
4.3.3	<i>Condições anteriores ao experimento</i>	39
4.3.4	<i>Substâncias usadas no experimento</i>	41
4.3.5	<i>Procedimento experimental</i>	42
4.3.6	<i>Análise dos dados</i>	44
5	RESULTADOS	46
6	DISCUSSÃO	50
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
8	CONCLUSÃO	54

REFERÊNCIAS	55
ANEXO A – DECLARAÇÃO DE ISENÇÃO DE SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	73

1 INTRODUÇÃO

Os metalofármacos são complexos de coordenação onde o átomo ou íon metálico atua como o componente ativo (Anthony *et al.*, 2020). A aplicação de metalofármacos, ou metalodrogas, para propósitos terapêuticos e diagnósticos representa um dos principais focos de pesquisa na química inorgânica medicinal. Os metais e metaloides desempenham um papel essencial nos processos biológicos, participando de diversas funções em níveis celulares e subcelulares (Wang, Li, Sun, 2019). Apesar de o desenvolvimento de metalofármacos parecer uma inovação recente na pesquisa científica, esses compostos têm sido utilizados como produtos farmacêuticos há milênios, remontando a mais de 5.000 anos, em práticas da antiga Mesopotâmia, Egito e sistemas tradicionais de medicina indiana (Malarvizhi *et al.*, 2023).

Os metalofármacos apresentam propriedades terapêuticas notáveis e variadas, sendo indicados como agentes anticâncer (Muhammad, Guo, 2014; Muhammad *et al.*, 2017), antimicrobianos (Ray *et al.*, 2007), antiartríticos (Fricker, 2007), antidiabéticos (Maikoo *et al.*, 2021), antivirais (Heffern *et al.*, 2013), psicotrópicos (Mjos; Orvig, 2014) e no tratamento de distúrbios cardiovasculares e gastrointestinais (Malarvizhi *et al.*, 2023). Entre os metalofármacos, os complexos à base de rutênio têm atraído significativa atenção para aplicações médicas (Clarke, 2002; Allardyce; Dyson, 2001; Ang, Dyson, 2006). Os compostos de rutênio apresentam afinidade pelo óxido nítrico (NO) em razão de sua estrutura química, estabelecendo ligações moleculares e interagindo com outros compostos metálicos (Silveira, 2019; Lima, 2010). Os compostos de nitrosil rutênio têm demonstrado potencial terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares (DCVs), como a aterosclerose, devido à sua capacidade de liberar NO, promovendo vasodilatação e apresentando propriedades antioxidantes (Gouveia Júnior *et al.*, 2023).

Nesse contexto, diversas pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de desenvolver fármacos capazes de doar NO e de estimular ou ativar a via da guanilato ciclase solúvel (sGC). Embora os avanços terapêuticos sejam significativos, ainda existem poucas substâncias aprovadas no mercado que apresentem eficácia comprovada e baixo perfil de toxicidade (Grzešk *et al.*, 2023). Os principais grupos de fármacos doadores de NO com uso clínico incluem os nitratos orgânicos (RONO₂), com destaque para a nitroglicerina (NTG), e os nitrosilos, sendo o nitroprussiato de sódio (SNP) o principal representante. Além desses, outras classes de doadores de NO compreendem os diazeniodiolatos (NONOatos) e os S-nitrosotióis (RSNOs) (Rios, 2022; Mace *et al.*, 2023).

Nesse sentido, a pesquisa animal tem sido fundamental para os avanços científicos e médicos, contribuindo significativamente para a compreensão de diversas doenças e para o desenvolvimento de novos medicamentos e tratamentos (Festing, Wilkinson, 2007). Alguns autores argumentam que modelos animais são indispensáveis para a investigação de mecanismos biológicos e a avaliação de novas terapias, considerando que organismos complexos, como os humanos, requerem estudos em sistemas integrados para compreender completamente as interações entre os órgãos (Barré-Sinoussi, Montagutelli, 2015). Embora alternativas, como culturas celulares e pesquisa molecular, tenham contribuído para reduzir o uso de animais em pesquisas científicas, certas áreas ainda dependem de estudos com animais para obter dados mais precisos e respostas mais completas (Festing, 2008). Assim, desde a segunda metade do século XX, a pesquisa científica com uso de animais enfrenta resistência, culminando, enfim, em uma abordagem ética para o uso experimental deles por meio da aplicação do Princípio dos 3 Rs (Franco, 2013; Russell, Burch, 1959).

No que diz respeito a análises de um novo medicamento durante o seu desenvolvimento, estima-se que, em média, entre 10.000 e 25.000 compostos químicos sejam analisados. A toxicidade pré-clínica (em modelos animais) e os eventos adversos (toxicidade humana) representam, em conjunto, aproximadamente 1/3 das razões para o descarte de candidatos a medicamentos (Guengerich, 2011). A avaliação da toxicidade representa uma etapa crucial no desenvolvimento de medicamentos e produtos químicos (Zhang *et al.*, 2014), sendo essencial para minimizar os riscos aos seres humanos e ao meio ambiente (Crawford *et al.*, 2017).

Dessa maneira, os princípios da toxicologia verde incluem etapas fundamentais, como o desenvolvimento de projetos mais seguros e a realização de testes precoces, com o objetivo de criar produtos químicos menos nocivos e tornar o processo de testes mais sustentável (Maertens *et al.*, 2014). Um aspecto central dessa abordagem é a redução do número de testes em animais (Crawford *et al.*, 2017).

Devido à sua estrutura e características, a membrana corioalantóide (do inglês *Chorioallantoic Membrane, CAM*) é um modelo aplicável para testes de toxicidade de medicamentos (Kue *et al.*, 2015). O teste do ovo embrionado de galinha (do inglês *Hen's Egg Test, HET*) (Luepke, Kemper, 1986) foi desenvolvido como um teste rápido, sensível e de baixo custo, que pode fornecer informações sobre os efeitos embriotóxicos, teratogênicos ou imunopatológicos de substâncias químicas e seu potencial de irritar as membranas mucosas.

O teste do ovo embrionado de Hen usando a membrana corioalantóide (do inglês *Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane, HET-CAM*) pode determinar o potencial dos materiais de teste para causar hemorragia, lise e coagulação dos vasos sanguíneos, com alta previsibilidade para materiais de teste leves e não irritantes (Lotz, 2016).

Suas propriedades parecem ser suficientes para serem usadas como uma alternativa ao teste padrão de irritação ocular de Draize (Draize, Woodard, Calvery, 1944), que usa o coelho como modelo animal, já que as substâncias testadas mostram um efeito semelhante na membrana e no olho (Lotz, 2016). Kishore *et al.* (2008) testaram o potencial de irritação de vários pesticidas comparando o ensaio *HET-CAM* e o teste de irritação ocular *in vivo* de Draize. Os resultados mostraram boa correlação entre os dois testes, e os autores destacam o potencial do *HET-CAM* para refinar ou reduzir o uso de animais, especialmente no campo de testes oculares (Kishore *et al.*, 2008).

Assim, o uso dessa metodologia experimental mostra-se como uma alternativa cientificamente validada e alinhada ao Princípio dos 3Rs ao promover a substituição dos modelos animais tradicionais por métodos que mantêm a qualidade científica com o menor impacto ético possível. O modelo *HET-CAM* apresenta muitas vantagens, como custo-benefício, fácil manuseio, bom acesso ao tecido e rápido desenvolvimento, que ocorre em poucos dias (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014; Ribatti, 2016).

Dessa maneira, considerando que as DCVs representam um grave problema de saúde global e demandam a constante busca por terapias mais seguras e eficazes, este estudo se propõe a realizar ensaios de toxicidade com dois complexos de rutênio, com a finalidade de contribuir com o perfil de toxicidade das moléculas e permitir o avanço para ensaios clínicos. Nesse contexto, os complexos de rutênio têm se destacado como uma alternativa terapêutica. No processo de desenvolvimento de novos fármacos, é imprescindível assegurar a segurança da molécula para a população e para o meio ambiente. Para alcançar esse objetivo, realizam-se ensaios pré-clínicos com as substâncias para avaliar o potencial de causar danos a organismos vivos. Para isso, pensando no bem-estar animal e seguindo as diretrizes nacionais e internacionais, uma metodologia alternativa ao uso de animais foi adotada a fim de promover uma ciência mais justa e ética, sem comprometer a qualidade e a confiança das análises realizadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito tóxico de complexos organometálicos a base de rutênio (FOR0603 e FOR0803) por meio de teste na membrana corioalantóide (*CAM*) de ovos embrionados de galinha.

2.2 Objetivos específicos

- I. Analisar a ocorrência de coagulação, lise e hemorragia na *CAM* quando exposta às substâncias-teste;
- II. Identificar o tempo em que os eventos irritantes ocorrem;
- III. Classificar a toxicidade das substâncias pela metodologia *HET-CAM*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Complexos de rutênio

O rutênio (Ru) é um elemento químico da classe dos metais de transição, caracterizado por sua estabilidade em condições fisiológicas e por apresentar estados de oxidação como Ru(II) e Ru(III). Além disso, destaca-se por sua capacidade de formar uma ampla variedade de complexos, devido à sua versatilidade na formação de ligações químicas, em reações de transferência de elétrons, e por suas propriedades redox e catalíticas (Allardyce, Dyson, 2001).

As atividades biológicas dos complexos de rutênio foram descritas pela primeira vez na década de 1950 (Dwyer *et al.*, 1952; Dwyer *et al.*, 1965; Meggers, 2007; Bergamo; Sava, 2007). Seu comportamento cinético é comparável ao da platina nos processos de divisão celular (Clarke, 2002; Reedijk, 2008; Deubel, Lau, 2006), porém apresenta menor toxicidade em relação à cisplatina (Sava *et al.*, 1998). Essa redução na toxicidade pode ser atribuída à capacidade do rutênio de imitar o ferro, permitindo sua ligação a diversas biomoléculas, como a albumina do soro humano e a transferrina, uma proteína de transporte de ferro (Allardyce, Dyson, 2001; Ang, Dyson, 2006).

Os complexos de Ru(III) atuam como precursores de Ru(II), sendo convertidos *in vivo* por meio de redução promovida por redutores biológicos, como a glutatona e o ácido ascórbico (Clarke, 2002; Allardyce, Dyson, 2001; Rover *et al.*, 2001). Os centros de Ru(II) apresentam maior reatividade em comparação com os de Ru(III) em reações de substituição, permitindo uma rápida coordenação e forte ligação a átomos de nitrogênio e enxofre presentes em biomoléculas (Tfouni *et al.*, 2012).

Nesse contexto, os compostos de rutênio podem ser valiosos como agentes para a liberação ou eliminação de moléculas que desempenham funções essenciais para a fisiologia. Um exemplo é o óxido nítrico (NO), uma molécula endógena sintetizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), por meio da conversão de L-arginina em L-citrulina e NO (Palmer, Ashton, Moncada, 1988). Existem três isoformas de NOS: a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), que dependem da concentração intracelular de Ca^{2+} e são expressas constitutivamente em diversos tecidos, e a isoforma induzível (iNOS), que é independente de Ca^{2+} e ativada por estímulos pró-inflamatórios (Pagliaro, 2003; Pacher, Beckman, Liaudet, 2007). Uma diferença significativa entre as isoformas de NOS é que as formas constitutivas (eNOS e nNOS) produzem NO em baixas concentrações, na faixa de nmol/L, enquanto a

forma induzível (iNOS) gera NO em concentrações mais elevadas, na faixa de $\mu\text{mol/L}$ (Pagliaro, 2003). O óxido nítrico exerce um papel crucial em várias funções fisiológicas, incluindo o controle da pressão arterial (Ignarro, 1989), neurotransmissão (Bredt, Hwang, Snyder, 1990; Garthwaite, 1991; Garthwaite, 1995), respostas imunológicas (Hibbs Jr. *et al.*, 1988; Marletta *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 2007) e ação antioxidante (Ignarro, 2000; Wink, Mitchell, 2003; McCleverty, 2004). Esses efeitos dependem fortemente da biodisponibilidade e da concentração local de NO (Wink, Mitchell, 1998).

Os doadores de NO apresentam limitações importantes. O uso contínuo de nitratos orgânicos frequentemente resulta no desenvolvimento de tolerância, possivelmente associada à oxidação do grupo heme da sGC, o que compromete a eficácia e exige o aumento das doses administradas. Além disso, concentrações elevadas de NO podem induzir toxicidade celular ao reagirem com superóxido, formando peroxinitrito. Essas limitações reforçam a necessidade de desenvolver novos compostos que apresentem maior eficácia e menor risco de efeitos adversos (Banin, 2016; Gonçalves, 2018; Paz, 2019; Mace *et al.*, 2023).

Atualmente, não existem medicamentos formulados com complexos de rutênio aprovados para uso clínico, pois nenhum deles completou todas as fases dos testes pré-clínicos e clínicos. Contudo, alguns complexos de rutênio têm apresentado resultados promissores em estudos pré-clínicos (Silva, 2023).

3.2 Doenças cardiovasculares

As DCVs englobam um grupo de distúrbios que afetam o coração e os vasos sanguíneos (Pagidipati, Gaziano, 2013). Trata-se de um conjunto heterogêneo de enfermidades, cuja causa subjacente é, na maioria dos casos, a aterosclerose (Wong *et al.*, 2022). Essas doenças são crônicas, desenvolvem-se gradualmente ao longo da vida e muitas vezes permanecem assintomáticas por longos períodos (Sonja, Nola, 2018). As DCVs destacam-se ainda como a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes em âmbito global (Amini; Zayeri; Salehi, 2021). Os casos prevalentes de DCVs quase dobraram entre 1990 e 2019, passando de 271 milhões para 523 milhões. No mesmo período, as mortes atribuídas às DCV também aumentaram de forma constante, subindo de 12,1 milhões para 18,6 milhões (Roth *et al.*, 2020).

No Brasil, as DCVs também lideram as causas de morte, sendo responsáveis por aproximadamente 31% dos óbitos em 2011, com destaque para a doença isquêmica do coração e o AVC (Ribeiro *et al.*, 2016; Brant *et al.*, 2021). Entre 1980 e 2019, foram registrados mais de 10,8 milhões de mortes por DCV no país, com uma tendência de queda nas taxas ajustadas por idade, embora o número absoluto de mortes permaneça elevado devido ao envelhecimento populacional (Bastos *et al.*, 2021; Brant *et al.*, 2017). Entre 2008 e 2017, houve mais de 11 milhões de internações hospitalares por DCV no Brasil, com quase 870 mil mortes registradas nesse período (Fonseca, Lima, Gualdi, 2020). Apesar da redução nas taxas de mortalidade ajustadas, fatores de risco como hipertensão, obesidade e diabetes continuam a impulsionar a carga dessas doenças (Brant *et al.*, 2021). Portanto, estima-se que milhões de brasileiros convivam com doenças cardíacas, refletindo a tendência global de alta prevalência e impacto significativo na saúde pública (Ribeiro *et al.*, 2016; Brant *et al.*, 2021; Brant *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2023).

Entre as doenças cardiovasculares mais comuns estão a doença arterial coronariana, a insuficiência cardíaca, a angina, o infarto agudo do miocárdio, as doenças valvares, as arritmias e as doenças hipertensivas, entre outras (Magalhães *et al.*, 2014). Essas enfermidades têm como característica principal causar alterações significativas no funcionamento do sistema cardiocirculatório, comprometendo sua capacidade de distribuir oxigênio e nutrientes essenciais para que as células desempenhem suas funções adequadamente (Ribeiro, Oliveira, 2011).

O coração humano é formado por miócitos, fibroblastos e uma extensa rede de vasos sanguíneos, todos envolvidos no desenvolvimento de DCVs por meio de diferentes mecanismos moleculares (Bauer, Martin, 2017). Os vasos sanguíneos, por sua vez, são constituídos por diversos tipos celulares, incluindo células musculares lisas e células endoteliais. As células endoteliais, localizadas no lúmen dos vasos, estão em contato direto com as células que circulam no sangue e desempenham funções essenciais, como a regulação da pressão arterial e o controle do tráfego de leucócitos (Goveia, Stapor, Carmeliet, 2014). Em diversas doenças, incluindo as DCVs, a função fisiológica dos vasos sanguíneos é comprometida devido a fatores como reações inflamatórias, estresse oxidativo e expressão anormal de determinadas moléculas na superfície das células endoteliais (Siti, Kamisah, Kamsiah, 2015).

Um endotélio em condições fisiológicas basais é capaz de responder a sinais e estímulos, tanto fisiológicos quanto bioquímicos, por meio da liberação de mediadores regulatórios que mantêm o equilíbrio de suas funções (Bahia *et al.*, 2006). Esses mecanismos

desempenham um papel fundamental no controle de fatores hemodinâmicos, como a pressão arterial, o fluxo sanguíneo e a regulação do tônus vascular, por meio da produção de fatores de relaxamento e contração essenciais para a regulação cardiovascular (Pereira *et al.*, 2011; Prati *et al.*, 2014).

Entre as substâncias liberadas que atuam na estimulação da vasodilatação estão o óxido nítrico (NO), sulfeto de hidrogênio (H₂S), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), prostaciclina vasodilatadora (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Por outro lado, entre os principais fatores de contração destacam-se a prostaglandina H₂ (PGH₂), endotelina 1 (ET-1), angiotensina II (Ang-II), tromboxano A₂ (TxA₂) e espécies reativas de oxigênio (EROS) (Shimokawa, 2014; Sharma *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2021).

Farmacoterapias direcionadas à disfunção endotelial, como medicamentos hipolipemiantes, anti-hipertensivos e antidiabéticos, possuem potencial para o tratamento de doenças cardiovasculares e outras condições relacionadas (Xu *et al.*, 2021).

3.3 Pesquisas utilizando animais

Desde a segunda metade do século XX, a oposição aos experimentos com animais intensificou-se significativamente, em grande parte após a publicação, em 1975, de *Libertação Animal*, obra do filósofo australiano Peter Singer. Em 1983, o filósofo estadunidense Tom Regan apresentou ao movimento pelos direitos dos animais uma perspectiva mais rigorosa sobre nossas responsabilidades em relação aos animais, contrastando com o utilitarismo de Peter Singer, por meio da publicação de sua obra *O Caso dos Direitos Animais*. Os trabalhos de Singer e Regan tiveram um impacto profundo na sociedade e no meio acadêmico, dando origem à "ética animal" como um novo campo de estudos filosóficos e bioéticos. Esse campo trouxe consigo uma multiplicidade de visões éticas sobre os animais, incluindo reflexões sobre a pesquisa científica que os envolve e sobre os deveres humanos para com eles (Franco, 2013).

Assim, a abordagem dos 3 Rs forneceu uma estrutura ética e científica para fundamentar uma visão reformista do uso de animais na biomedicina. Além disso, preparou o terreno para uma defesa mais moderada dos direitos dos animais: embora continue incompatível com a perspectiva abolicionista dos direitos dos animais, esses princípios éticos reconhecem aos animais algo semelhante a um direito à proteção contra o sofrimento, ou ao menos contra sofrimentos que excedam um limite definido (Olsson, Robinson, Sandoe, 2011),

preservando a ideia central de que existem limites absolutos e inegociáveis para o que pode ser feito aos animais (Franco, 2013). No entanto, foi apenas nas décadas de 1980 e 1990 que ocorreu um progresso significativo no desenvolvimento e reconhecimento do Princípio dos 3 Rs, para a satisfação de William Russell e Rex Burch, que testemunharam a "redescoberta" de seus princípios e o surgimento de um novo campo de pesquisa inspirado em seu trabalho inovador (Burch, 1995; Russell, 2005).

Dessa forma, o Princípio dos 3 Rs, também conhecido como Princípios da Técnica Experimental Humanitária (Russell, Burch, 1959), mostrou-se como uma alternativa ética ao uso de animais em pesquisas científicas. Russell e Burch (1959) estabeleceram os seguintes conceitos para o uso de animais em pesquisa:

1. Substituição (do inglês *Replacement*): Trocar o uso de animais superiores vivos e conscientes por materiais insensíveis;
2. Redução (do inglês *Reduction*): Diminuir o número de animais necessários para alcançar um determinado nível de informação com precisão adequada;
3. Refinamento (do inglês *Refinement*): Minimizar a severidade dos procedimentos desumanos aplicados aos animais que ainda precisam ser utilizados.

Russell e Burch apresentaram os conceitos do Princípio dos 3 Rs em uma ordem que reflete sua prioridade de abordagem: (1) animais sencientes não devem ser usados se houver alternativas não sencientes disponíveis; (2) caso o uso de animais seja necessário, o projeto deve ser planejado de forma que o número mínimo de animais seja empregado, mantendo a obtenção de resultados científicos consistentes; (3) devem ser adotadas medidas para minimizar qualquer dor, sofrimento ou angústia experimentados pelos animais durante os procedimentos (Hubrecht, Carter, 2019).

A ética da experimentação animal é amplamente debatida em todo o mundo, refletindo variações significativas nas legislações entre os países. Enquanto algumas nações adotam normas mais rigorosas, outras mantêm regulamentações relativamente flexíveis sobre o uso de animais em pesquisas científicas (Batalha, 2017).

No Brasil, é a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, também conhecida como Lei Arouca, que regulamenta a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica. Essa legislação determina que o uso de animais em pesquisas deve ser justificado pela relevância científica do estudo e só pode ocorrer quando não existirem alternativas viáveis (Brasil, 2008). Por meio desta lei, foi criado o Conselho Nacional de

Controle da Experimentação Animal (CONCEA), órgão integrante da estrutura do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), sendo a instância colegiada multidisciplinar de caráter normativo, consultivo, deliberativo e recursal, para coordenar os procedimentos de uso científico de animais (Brasil, 2009).

Estima-se que, anualmente, mais de 115 milhões de animais em todo o mundo sejam mortos em experimentos de laboratório (Marques, 2023). Entre 2019 e 2023, o número total de animais utilizados em atividades de ensino e pesquisa no Brasil foi de 11.390.421 animais, sendo que, deste número, 10.927.919 correspondem apenas ao uso de animais em pesquisa. Contudo, observa-se que houve uma redução da quantidade utilizada para o segmento de pesquisa ao longo do período analisado. Entre os animais mais utilizados em pesquisa no Brasil nesse recorte temporal destacam-se as aves, os peixes e os roedores, representando, respectivamente, 33,7%, 25,9% e 17,7% do total (Brasil, 2024a).

3.4 Tipos de toxicidade

A toxicidade pode ser classificada de diversas formas, dependendo do tempo de exposição, do órgão afetado, do mecanismo de ação e da combinação de substâncias. Os principais tipos incluem toxicidade aguda, que ocorre após exposição única ou de curta duração a uma substância, e toxicidade crônica, resultante de exposições repetidas ou prolongadas, podendo causar efeitos cumulativos ao longo do tempo (Shaheen *et al.*, 2018; Akhila *et al.*, 2007).

Há também toxicidade subaguda e subcrônica, que se referem a exposições intermediárias entre aguda e crônica (Akhila *et al.*, 2007). A toxicidade pode ser específica de órgãos, como neurotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e carcinogenicidade (Kozłowski *et al.*, 2014; Grisold, Carozzi, 2021; Shaheen *et al.*, 2018). Além disso, pode-se distinguir toxicidade local (no local de contato) e sistêmica (afetando todo o organismo após absorção) (Shaheen *et al.*, 2018; Gregus, Klaassen, 1969).

Outro aspecto importante é a toxicidade combinada, que ocorre quando diferentes substâncias interagem, podendo resultar em efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (Katsnelson *et al.*, 2015; Bliss, 1939). O tipo e a gravidade da toxicidade dependem ainda da dose, via de exposição, características individuais e do próprio agente tóxico (Shaheen *et al.*, 2018; Gregus, Klaassen, 1969).

No que se refere aos testes de toxicidade aguda, o principal objetivo é identificar o potencial de perigo de substâncias químicas, classificando-as de acordo com sua toxicidade intrínseca, o que é fundamental para a gestão de riscos e regulamentação de produtos químicos e medicamentos (Walum, 1998; Gribaldo *et al.*, 2005; Yadav, Rohane, 2021; Akhila *et al.*, 2007).

3.5 Ensaio utilizando a membrana corioalantóide (CAM)

O primeiro uso da membrana corioalantóide (CAM, do inglês *chorioallantoic membrane*) como modelo experimental remonta a 1911, quando Rous e Murphy demonstraram o crescimento de tumores de sarcoma de galinha transplantados para a CAM (Rous; Murphy, 1911). Na década de 1930, a CAM foi usada pela primeira vez para o cultivo de vírus e bactérias (Goodpasture, Woodruff, Buddingh, 1931; Morrow *et al.*, 1938) e ainda hoje é usada para o estudo do desenvolvimento vascular e da angiogênese e para testes gerais de novos medicamentos. Ela é usada com sucesso na biologia do câncer, onde podemos acompanhar todas as etapas da progressão do tumor: crescimento do tumor, angiogênese, invasão, extravasamento e metástase. Ela é usada para estudar as propriedades respiratórias e o transporte de íons na embriogênese e para testar novos biomateriais (Valdes *et al.*, 2003). Esse sistema também é usado para diagnóstico e terapias antivasculares seletivas, como terapia fotodinâmica, fotoangiólise a laser e radioterapia (Nowak-Sliwinska; Segura; Iruela-Arispe, 2014). A CAM é uma ferramenta útil para estudar o transplante de curto prazo de tecidos criopreservados, por exemplo, tecidos ovarianos humanos criopreservados protegidos antes de quimioterapia ou radioterapia agressivas (Isachenko *et al.*, 2012).

A CAM tem uma rica rede vascular bem visível através do tecido transparente. Os vasos vasculares densos e os capilares criam condições adequadas para a sobrevivência e o desenvolvimento de enxertos de células e tecidos em sua superfície (Cimpean, Ribatti, Raica, 2008). O modelo permite a visualização em tempo real dos ensaios e a acessibilidade completa ao sistema circulatório para a aplicação intravascular de substâncias (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014).

As principais vantagens do modelo CAM aviário em comparação com os modelos de mamíferos são o custo mais baixo, a simplicidade do modelo e a rapidez do enxerto. Em camundongos NOD/SCID imunodeficientes, por exemplo, pode haver uma diferença de 14 dias para o enxerto em camundongos e 2 dias para o enxerto detectável no caso de um

embrião de peru. As despesas menores não estão relacionadas apenas ao modelo em si, mas também à criação e à manutenção necessárias para os animais com imunidade suprimida. Também há menos requisitos de espaço e não é necessário usar anestésicos durante o trabalho, pois esse modelo não sente dor (Dünker, Jendrossek, 2019; Grinberg *et al.*, 2009).

A *CAM* pode ser usada como um modelo alternativo para a mucosa bucal de suínos na avaliação da absorção de medicamentos, pois o tecido da *CAM* é semelhante à mucosa bucal em termos de perfil de permeação e valor do coeficiente de permeabilidade. Ademais, ela também tem o potencial de substituir modelos de epitélio da córnea e da retina de suínos (Tay, Heng, Chan, 2011).

Com relação à substituição de animais para fins de pesquisa e teste, o modelo de enxertos de pele incorporados à membrana corioalantóide poderia ser útil para investigações de curto prazo em dermatologia (Kunzi-Rapp, Rück, Kaufmann, 1999). Seria uma boa alternativa para o ensaio de linfonodo local murino, usado para testar cosméticos e previsões de alergenicidade cutânea. Ele tem a vantagem de testar diretamente a pele humana em vez de modelos de diferentes espécies de mamíferos. A *CAM* oferece condições fisiológicas mais naturais para a pele do que os meios de cultivo comuns, pois é nutrido pelo sangue do embrião e a observação pode durar mais tempo (Slodownik *et al.*, 2009). Além de irritantes para a pele ou para os olhos, o modelo *CAM* também pode ser usado para testes de irritação de produtos vaginais e medicamentos (Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2018).

Uma das limitações e desvantagens da *CAM* como modelo experimental é sua origem aviária, o que implica em diferenças com a fisiologia dos mamíferos e seu metabolismo de drogas. Isso significa que também há uma disponibilidade limitada de reagentes, como anticorpos, citocinas ou primers, que são compatíveis com as espécies aviárias usadas (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014; Ribatti, 2016). As diferenças significativas também estão nos requisitos fisiológicos e nas funções da vasculatura (Auerbach *et al.*, 2000). No entanto, a irritação do tecido da *CAM* evoca respostas semelhantes às dos modelos de mamíferos, o que torna esse modelo adequado para testar biomateriais e observar as respostas do tecido por cerca de duas semanas. A *CAM* permite a avaliação de respostas inflamatórias agudas e crônicas, fibrose, granulação e neovascularização do tecido causadas por uma lesão ou implantes (Valdes *et al.*, 2003; Eke *et al.*, 2017; Mangir *et al.*, 2019).

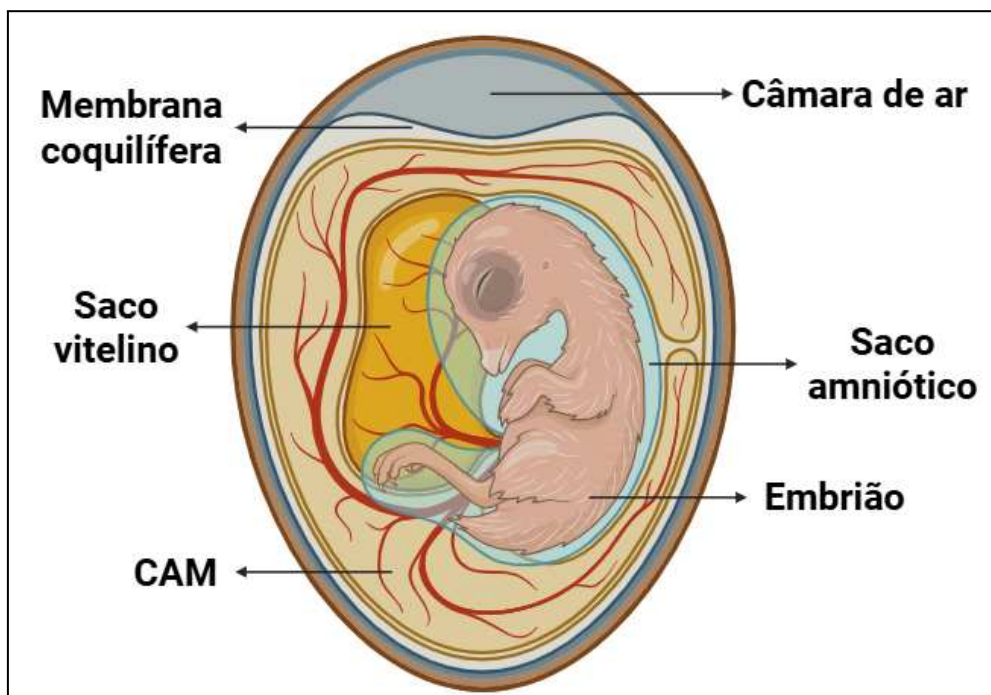
O modelo de membrana corioalantóide de um embrião de ave em desenvolvimento pode ser utilizado como um modelo experimental *in vivo* e, em muitos países, esse modelo não exige aprovação do comitê de ética (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014). No Brasil, a Nota Informativa CONCEA/Nº 01/2024 estabelece que projetos de pesquisa e planos de ensino que utilizem embriões, fetos e formas larvais de animais, independentemente do estágio de desenvolvimento, devem ser apresentados às Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) para registro. Para avaliação pelas CEUAs, serão analisados os projetos que envolvem animais em estágio superior a 50% de seu desenvolvimento, aqueles que iniciam com embriões, fetos e formas larvais em estágio inferior a 50% e terminam em estágio superior a 50%, e, também, em casos de evidência científica consolidada sobre o desenvolvimento de sciência antes dos 50% de desenvolvimento em determinadas espécies (Brasil, 2024b).

3.5.1 Membrana corioalantóide de embrião de galinha

A membrana corioalantóide de um embrião de ave é uma membrana extra-embrionária simples e rica em vascularização. Durante o desenvolvimento embrionário, ela desempenha várias funções (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014). Para realizar suas funções, a *CAM* adere-se à membrana da casca do ovo, chamada de membrana coquilífera, que é fundamental para o desenvolvimento embrionário do ovo de galinha (Figura 1), atuando como uma barreira física e química que protege o embrião contra invasão de patógenos e perda de água, além de servir como suporte estrutural para a mineralização da casca de cálcio e para transferência desse cálcio da casca para formação do esqueleto do embrião (Cordeiro, Hincke, 2016; Halgrain *et al.*, 2022a; Halgrain *et al.*, 2022b). Ao longo do desenvolvimento, proteínas presentes na membrana coquilífera, como inibidores de protease, proteínas de ligação ao cálcio e proteínas antimicrobianas, mudam de acordo com as fases do embrião, refletindo sua importância dinâmica na proteção e nutrição do embrião (Cordeiro, Hincke, 2016). Presa à casca do ovo, a *CAM* serve como órgão respiratório para o embrião em desenvolvimento, proporcionando troca gasosa por meio dos poros da casca (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014). A *CAM* tem uma função na osteogênese durante o desenvolvimento embrionário, pois fornece o suprimento de cálcio, removendo o mineral da membrana da casca (Elaroussi *et al.*, 1994). A *CAM* transporta ativamente o sódio e o cloreto do saco alantóico e tem a função de órgão excretor do embrião. Ela fornece um

reservatório para produtos residuais, como ureia e ácido úrico (Lusimbo, Leighton, Wobeser, 2000; Valdes *et al.*, 2003; Gabrielli, Accili, 2010; Ribatti, 2016).

Figura 1 – Representação esquemática do embrião de galinha dentro do ovo. Ovo embrionado de galinha é mostrado com a região romba, a extremidade mais larga, voltada para cima na imagem, indicando a localização da câmara de ar. Embrião de 14 dias é indicado envolvido pelas estruturas embrionárias que lhe conferem nutrição (saco vitelino) e proteção (saco amniótico). É possível notar como a membrana corioalantóide (*CAM*) é extensa, abraçando todo o embrião e desempenhando diversas funções importantes para o desenvolvimento embrionário. Justaposta à *CAM*, observa-se a membrana coquilífera, também chamada de membrana da casca do ovo.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025 (Criado em <https://BioRender.com>).

Durante o desenvolvimento do embrião de galinha, o alantoide surge como uma evaginação a partir da parede ventral do intestino posterior do endoderma por volta de 3,5 dias de incubação. Entre os dias 4 e 10 de incubação, a vesícula alantoide cresce rapidamente e a sua camada mesodérmica se funde com a camada mesodérmica do córion adjacente, originando a *CAM*. A fusão dessas duas camadas permite o desenvolvimento de uma abundante rede vascular que conecta a circulação do embrião a duas artérias alantóicas e a uma veia alantóica (Ribatti, 2017). A fixação da *CAM* à membrana interna da casca ocorre já

durante os dias 4 e 5 (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014). Antes do dia 6, a troca gasosa do embrião ocorre por meio da parte vascularizada da membrana do saco vitelino (Romanoff, 1960). O crescimento da CAM é concluído no dia 10; no dia 12, ele cobre completamente a superfície interna da casca e, no dia 13, o tecido da CAM está totalmente diferenciado (Romanoff, 1960; Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014; Makanya *et al.*, 2016).

Vasos sanguíneos imaturos espalhados pelo mesoderma se desenvolvem acentuadamente até o dia 8 e formam um plexo capilar fortemente associado com as células coriônicas epiteliais próximas, apresentando a função de realizar trocas gasosas com o meio externo. A proliferação capilar continua até o dia 11 e, em seguida, o índice mitótico das células epiteliais reduz de maneira acelerada e o sistema vascular alcança a conformação final no dia 18, antes da eclosão. Os vasos mesodérmicos tornam-se notáveis arteríolas e vênulas entre os dias 10 e 12 (Ausprunk, Knighton, Folkman, 1974).

3.5.2 Fatores que influenciam o desenvolvimento embrionário e sua relação com a janela experimental de uso da CAM

O desenvolvimento embrionário depende de vários fatores, entre eles os que estão relacionados ao próprio embrião e os ambientais. Mesmo os ovos que são colocados na incubadora ao mesmo tempo podem, após alguns dias, apresentar leves diferenças no estágio de desenvolvimento. Esses fatores incluem diferenças genéticas entre as várias raças, a estação do ano, possíveis diferenças na fase de desenvolvimento antes do início da incubação, a duração e as condições durante o armazenamento dos ovos e sua temperatura antes da incubação. O desenvolvimento também pode ser afetado pelo tamanho dos ovos, pelo ajuste da temperatura e pelas mudanças de temperatura durante a incubação, bem como pelo tamanho e pelo tipo da incubadora (Hamburger, Hamilton, 1992). Dependendo da origem e da linhagem dos ovos utilizados, a idade de desenvolvimento pode variar entre 12-18h (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018).

A duração do desenvolvimento embrionário determina a janela experimental durante a qual é possível trabalhar com a CAM (Tabela 1). Esse período começa no dia embrionário em que a CAM tem tamanho suficiente, pois a manipulação muito precoce pode levar a uma maior taxa de mortalidade dos embriões. É comum encerrar a experimentação

antes do dia embrionário em que o embrião obtém a capacidade de sentir dor. Dependendo das regulamentações de cada país, o uso do modelo *CAM* após esse estágio requer a aprovação do comitê de ética (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014; Kue *et al.*, 2015). No caso de ovos embrionados de galinha, o período total de desenvolvimento é de 21 dias e o período recomendado para realizar o experimento é entre os dias de desenvolvimento embrionário 7 e 14, podendo ser estendido até o dia 18, a depender da legislação de cada país (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Relação entre o desenvolvimento embrionário de galinha e o período recomendado de manipulação da *CAM*. Em vermelho, estão representados os dias de desenvolvimento embrionário (DE) que, em geral, não são realizados procedimentos; em verde-escuro, o período ideal de experimentação da janela experimental (JE) e em verde-claro, o período em que ainda podem ser realizados procedimentos a depender das legislações de cada país.

DE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
JE																					

Fonte: Adaptado de Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018.

3.5.3 Método de incubação *In Ovo* e *Ex Ovo*

A incubação de embriões é possível em condições de cultura *ex ovo* ou *in ovo*. Mas, antes de tudo, os ovos são mantidos em uma incubadora umidificada por três dias (embrião de galinha ou codorna) (Lazarovici *et al.*, 2006; Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014).

Durante o cultivo *in ovo*, os ovos devem ser girados durante os primeiros 3 dias do período de incubação para evitar que os embriões grudem nas membranas da casca. Depois disso, os ovos são deixados na incubadora, agora sem rotação, até o início do experimento. Quando a *CAM* crescer o suficiente para ser trabalhada, é feita uma abertura no ovo para permitir o acesso à membrana corioalantoide (Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014). Esse método de cultivo de embriões é mais adequado para experimentos mais duradouros, pois proporciona um ambiente mais fisiológico e a fonte de cálcio para o embrião

é mantida. Isso resulta em menos anormalidades de desenvolvimento e os embriões podem chegar à eclosão (Vargas *et al.*, 2007; Bressan, Mikawa, 2015). Por outro lado, o orifício pode causar uma limitação da área de trabalho, o que pode dificultar a microscopia de alta resolução em embriões *in ovo* (Vargas *et al.*, 2007; Bressan, Mikawa, 2015; Ribatti, 2016).

O cultivo *ex ovo* consiste na transferência do embrião para placas de Petri, placas de cultivo ou outros recipientes adequados no terceiro dia do desenvolvimento embrionário. Essa abordagem de cultivo sem casca permite mais acesso à CAM e proporciona uma área de trabalho maior, o que facilita a manipulação e permite a observação e a visualização contínuas e em tempo real do experimento (Auerbach *et al.*, 2000). Por outro lado, o cultivo *ex ovo* tem requisitos mais altos de esterilidade e o ambiente artificial e a ocorrência de ruptura da gema durante a manipulação têm um impacto na sobrevivência do embrião (Vargas *et al.*, 2007; Nowak-Sliwinska, Segura, Iruela-Arispe, 2014; Ribatti, 2016). Alguns autores relatam taxas de sobrevivência acima de 80% (Mangir *et al.*, 2019), mas, em geral, o cultivo *ex ovo* pode levar a uma secagem mais extensa dos embriões, diminuir a viabilidade, representa um risco maior de infecção e causa uma taxa de mortalidade mais alta (Bressan, Mikawa, 2015; Ribatti, 2016; Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018).

As espécies aviárias com ovos maiores, como galinha, peru ou pato, são mais adequadas e mais comumente usadas para o ensaio *in ovo* (Roth *et al.*, 2008; Villaflores *et al.*, 2019). Por outro lado, espécies com ovos pequenos, por exemplo, codornas, são predominantemente usadas no método *ex ovo*, com algumas exceções (Ratushnyy, Ezbekova, Buravkova, 2020).

3.5.4 Aplicação de substâncias na CAM

As substâncias experimentais podem ser aplicadas topicamente, injetadas intravascularmente ou no âmnio (Witt *et al.*, 1998). As substâncias líquidas aplicadas topicamente na superfície da CAM precisam de um suporte para manter o composto teste dentro da área selecionada e marcar o local de aplicação. Esses suportes podem ter a forma de um anel, uma folha ou uma esponja. No entanto, eles podem causar irritação da CAM ou afetar a arquitetura da vasculatura em desenvolvimento, especialmente quando aplicados antes do dia 10 de desenvolvimento embrionário no embrião de galinha (Kundeková *et al.*, 2021).

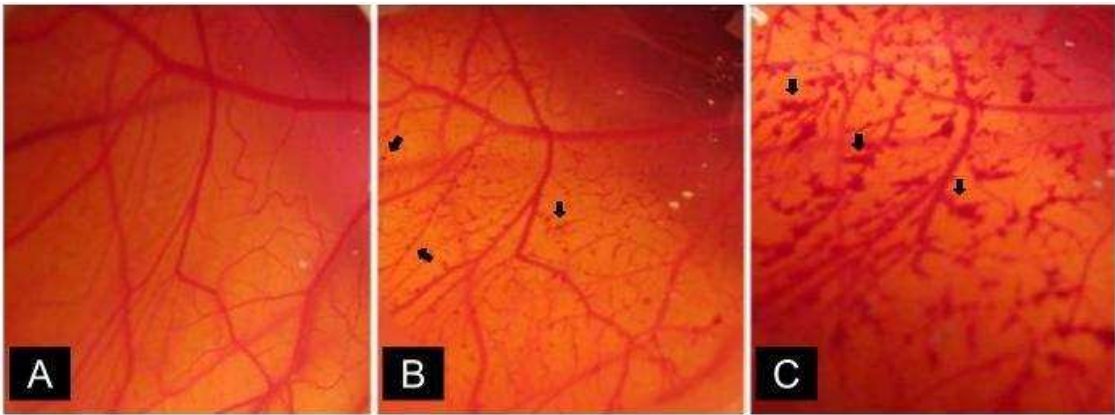
3.5.5 Eventos irritantes observados no HET-CAM

A metodologia *HET-CAM* é utilizada para identificar eventos irritantes em ensaios de toxicidade aguda, especialmente para avaliar o potencial irritante de substâncias em contato com tecidos sensíveis, como oculares ou mucosas. O teste consiste na aplicação da substância de interesse sobre a membrana corioalantóide (Figura 2) de ovos de galinha fertilizados, observando-se reações como hemorragia, lise vascular e coagulação, que são sinais clássicos de irritação (Rivero *et al.*, 2021; Viera *et al.*, 2022; Babu K., Narayanan R., 2021).

A hemorragia se manifesta como extravasamento de sangue dos vasos, a lise como desaparecimento ou rompimento dos vasos, e a coagulação como formação de trombos ou opacificação dos vasos (Harnoss *et al.*, 2019; Lototska-Dudyk *et al.*, 2023; Luepke, Kemper, 1986). A identificação dos eventos irritantes (Figura 2) é feita pela cronometragem do tempo até o aparecimento dessas reações após a aplicação do teste, sendo que tempos mais curtos indicam maior potencial irritante. A soma dos tempos de início dessas reações é convertida em um coeficiente de irritação, que classifica a substância como não irritante, levemente, moderadamente ou severamente irritante, conforme protocolos padronizados como o da ICCVAM ou adaptações validadas internacionalmente (Rivero *et al.*, 2021; Viera *et al.*, 2022; Babu K., Narayanan R., 2021).

O *HET-CAM* é reconhecido por sua boa correlação com testes clínicos e *in vivo*, sendo capaz de identificar com precisão produtos não irritantes e, em muitos casos, superestimar a irritação, o que aumenta a segurança na triagem de substâncias (Rivero *et al.*, 2021; Viera *et al.*, 2022; Budai *et al.*, 2021). Além disso, o método pode ser adaptado para diferentes tipos de formulações e aplicações, como produtos oftálmicos, cosméticos e até dispositivos médicos (Rivero *et al.*, 2021; Smail, 2024).

Figura 2 – Demonstração do efeito irritante na CAM por meio da aplicação de 2 mL de NaOH 1 M. A - Membrana íntegra antes da aplicação da solução irritante; B - Focos de coagulação indicados pelas setas pretas; C - Extravasamento sanguíneo mais intenso indicado pelas setas pretas representando a hemorragia.



Fonte: Adaptado de McKenzie *et al.*, 2015.

4 METODOLOGIA

Este trabalho adotou um delineamento experimental caracterizado pela manipulação intencional de variáveis independentes com o objetivo de analisar seus efeitos sobre variáveis dependentes previamente definidas, permitindo estabelecer relações de causa e efeito, garantindo confiabilidade aos resultados.

Nos experimentos com os embriões de galinha, os ovos foram distribuídos aleatoriamente entre o grupo experimental e os grupos controles, assegurando a homogeneidade entre os grupos e minimizando possíveis vieses. As intervenções foram aplicadas em ambiente controlado, seguindo protocolos padronizados, a fim de assegurar a validade interna dos resultados.

4.1 Aspectos éticos

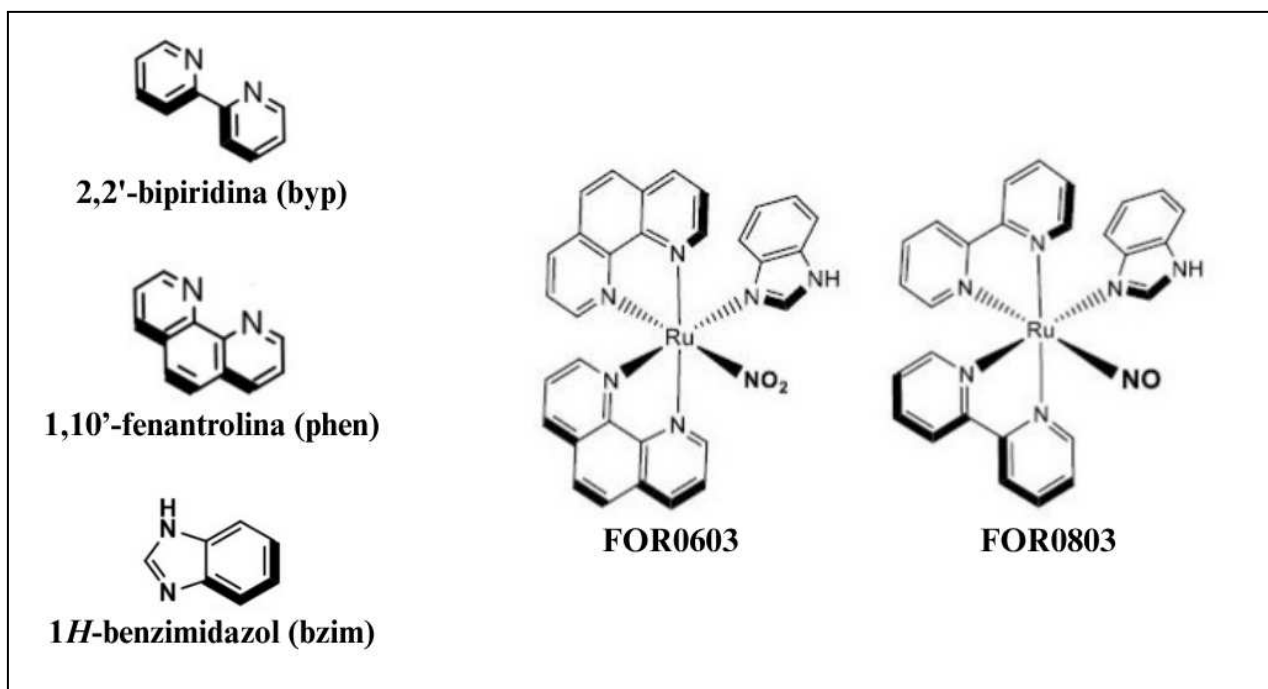
O uso dos ovos fecundados de galinha usando a metodologia HET-CAM foi comunicado à Comissão de Ética no Uso de Animais do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (CEUA/NPDM-UFC), recebendo da coordenadora a isenção de licenciamento por parte da referida comissão (Anexo A).

4.2 Complexos de rutênio estudados

Os ensaios realizados utilizaram dois complexos de rutênio, *cis*-[Ru(phen)₂(Bzim)(NO₂)]PF₆ (FOR0603) e *cis*-[Ru(bpy)₂(Bzim)(NO)](PF₆)₃ (FOR0803) (Figura 3), sintetizados pelo grupo de pesquisa de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes, professor titular da UFC.

O composto FOR0603 é formado a partir dos núcleos de 1,10'-fenantrolina (phen) e 1H-benzimidazol (Bzim), apresentando massa molar de 770,60 g/mol. Já o composto FOR0803 é formado a partir dos núcleos de 2,2'-bipiridina (bpy) e 1H-benzimidazol (Bzim), apresentando massa molar de 1011,51 g/mol.

Figura 3 – Representação da estrutura molecular dos complexos de rutênio FOR0603 e FOR0803 e seus núcleos de origem.



Fonte: Autoria própria, 2025.

4.3 Ensaio de toxicidade aguda utilizando ovos embrionados de galinha pela metodologia *HET-CAM*

O protocolo experimental para esta metodologia, descrito a seguir (4.3.3, 4.3.4, 4.3.5 e 4.3.6), tem como base o “*Atlas do método HET-CAM: Protocolo ilustrado aplicado à avaliação da toxicidade ocular*”, publicação do MCTI (Fiocruz, 2023).

4.3.1 Local de aquisição dos ovos fecundados de galinha

Neste ensaio, os ovos fecundados de galinha foram adquiridos na Companhia de Alimentos do Nordeste CIALNE S.A., localizada na Av. Presidente Costa e Silva, 2067 - Mondubim, Fortaleza - CE, 60761-505, inscrita no CNPJ 07.220.874/0001-01.

4.3.2 Local de realização do teste

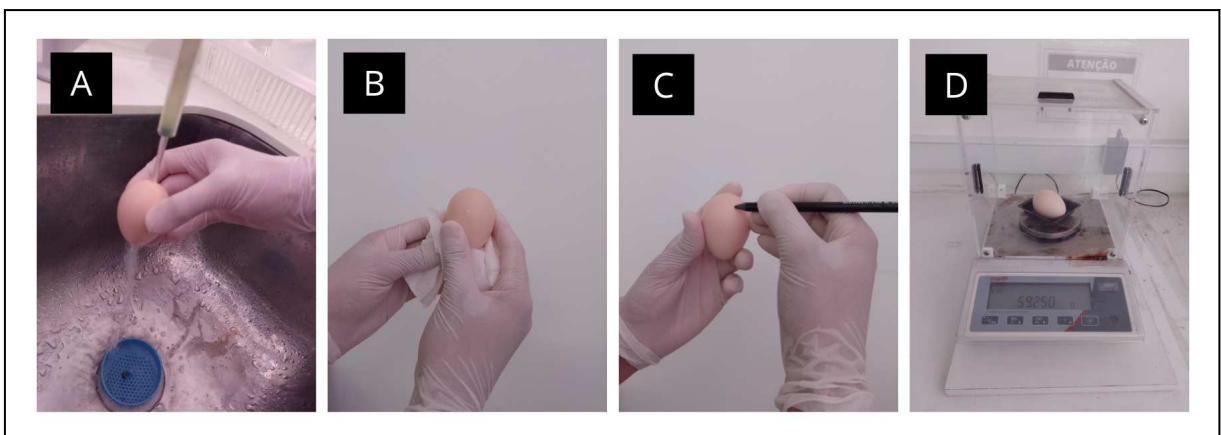
O experimento utilizando a metodologia *HET-CAM* foi realizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará

(NPDM-UFC), no Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica e no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas.

4.3.3 Condições anteriores ao experimento

Ao chegar ao laboratório, os ovos fecundados de galinha foram lavados com água corrente e secos com papel toalha (Figura 4). A seguir foram numerados por meio da utilização de lápis na casca e, então, pesados, sendo cada peso correspondente anotado. Para serem utilizados no experimento, os ovos deveriam pesar entre 50 e 70 g.

Figura 4 – Pré-tratamento dos ovos. A - Lavagem com água corrente; B - Secagem com papel toalha; C - Numeração dos ovos com lápis e D - Pesagem dos ovos.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Os ovos fecundados com pesos adequados foram colocados em uma chocadeira com sistema de rotação (Modelo IP35D, Premium Ecológica®) (Figura 5), mantendo a temperatura controlada em $37,8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa entre 50-60%.

Figura 5 – Chocadeira com sistema de rotação (Modelo IP35D, Premium Ecológica®).



Fonte: Autoria própria, 2025.

No quarto dia de incubação, os ovos foram retirados da chocadeira e transferidos para uma incubadora de CO₂ (Modelo MCO-17AC, Sanyo Scientific®). Cada ovo foi acomodado dentro de um copo plástico de 50 mL, posicionado com a parte mais romba voltada para cima (Figura 6). Os ovos permaneceram nessa incubadora até o nono dia de desenvolvimento embrionário, momento em que o experimento foi realizado.

Figura 6 – Transferência dos ovos para a incubadora. A - Separação e numeração de copos plásticos de 50 mL, servindo como suporte para os ovos; B - Acomodação dos ovos nos copos plásticos com a região romba voltada para cima; C e D - Colocação dos ovos na incubadora.

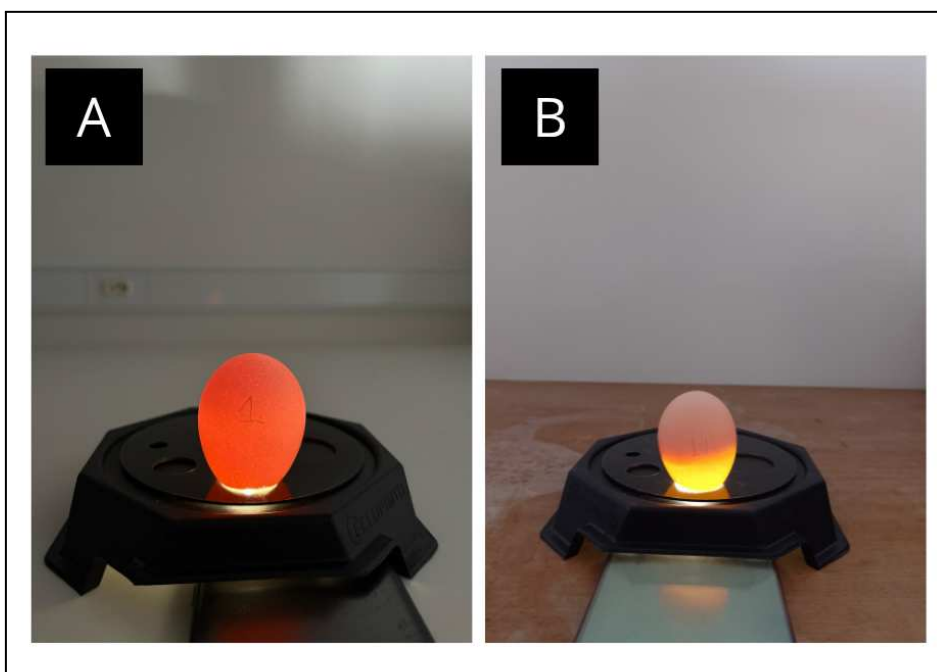


Fonte: Aatoria própria, 2025.

Na véspera do experimento, observou-se, com o auxílio de uma fonte de luz, a formação de câmara de ar na porção mais larga do ovo e se há indício de formação de embrião por meio de escurecimento de parte do ovo (Figura 7). Essa etapa é essencial para a triagem dos ovos viáveis, pois os ovos que apresentassem as seguintes condições deveriam ser descartados:

- Sem embrião;
- Ausência de câmara de ar;
- Câmara de ar formada em região inadequada.

Figura 7 – Visualização do desenvolvimento embrionário. A - Ovo submetido a uma fonte de luz antes de ser colocado na chocadeira, notando-se que a luz consegue atravessar todo o ovo e B - Ovo submetido a uma fonte de luz um dia antes do teste, sendo possível perceber que a luz não atravessa a região romba, indicando a formação do embrião.



Fonte: Aatoria própria, 2025.

Os ovos considerados viáveis foram devolvidos à incubadora e mantidos em condições apropriadas até o momento do experimento.

4.3.4 Substâncias usadas no experimento

Foram preparadas, previamente, soluções de 100 μM do FOR0603 e do FOR0803, utilizando água destilada com adição de DMSO (dimetilsulfóxido) como veículo de dissolução dos compostos. Além disso, foi realizado um grupo de controle negativo, utilizando PBS (solução salina tamponada com fosfato), a pH 7,31, solução reconhecidamente não irritante. Para o controle positivo foi utilizado uma solução de NaOH 0,1 M, solução reconhecidamente irritante. Foi feito, ainda, um grupo com o veículo de dissolução dos complexos de rutênio para excluir a possibilidade de uma possível reação ser oriunda dessa preparação.

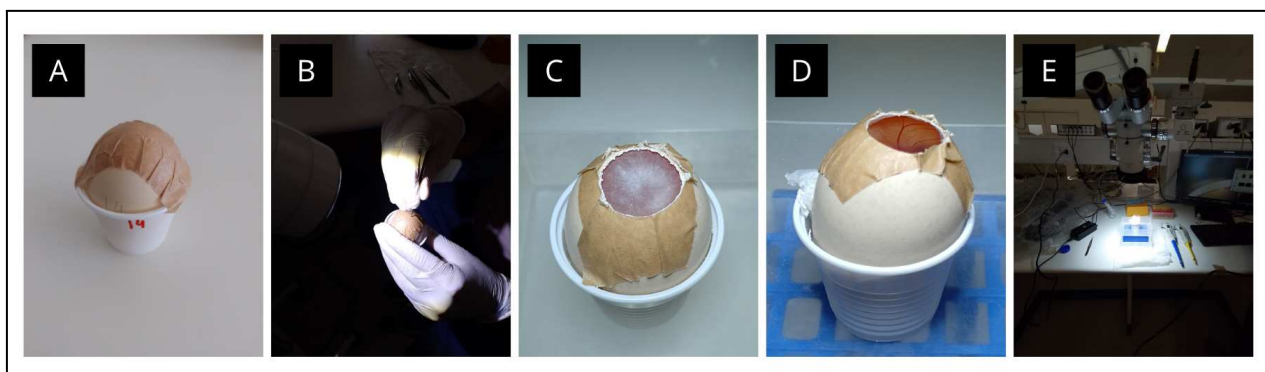
A concentração dos complexos metálicos empregada neste ensaio foi definida com base em estudos anteriores com complexos de rutênio que utilizaram 100 μM como concentração padrão em triagens toxicológicas (Lima, 2019), com as amostras sendo aplicadas diretamente sobre a membrana corioalantoide em um volume fixo de 0,2 mL (200 μL), estabelecido na literatura científica como o volume padrão para aplicação da substância-teste no método *HET-CAM* quando estas são dissolvidas ou suspensas (Luepke, 1985).

4.3.5 Procedimento experimental

Para cada substância, foram utilizados quatro ovos, sendo os grupos divididos em grupos experimentais (FOR0603 e FOR0803) e grupos controles (negativo, positivo e grupo do veículo de dissolução dos complexos de rutênio). Portanto, foram utilizados 20 ovos no total.

Durante o experimento, foi retirado um ovo por vez da incubadora e, com auxílio de um ovoscópio e de fita adesiva (Papel crepado tratado e adesivo de borracha natural, Marrom, Eurocel®), foi marcado o limite entre a *CAM* e a câmara de ar. A fita adesiva era responsável por manter mais firme a área a ser aberta e também evitar que fragmentos da casca caíssem sobre a *CAM* durante a abertura (Figura 8).

Figura 8 – Preparo dos ovos no dia do experimento. A - Fixação de fita adesiva no ovo; B - Abertura do ovo com o auxílio de uma tesoura curva; C - Ovo aberto, sendo possível visualizar a membrana coquilífera; D - Remoção da membrana coquilífera e E - Posicionamento do ovo ao microscópio para início do teste.



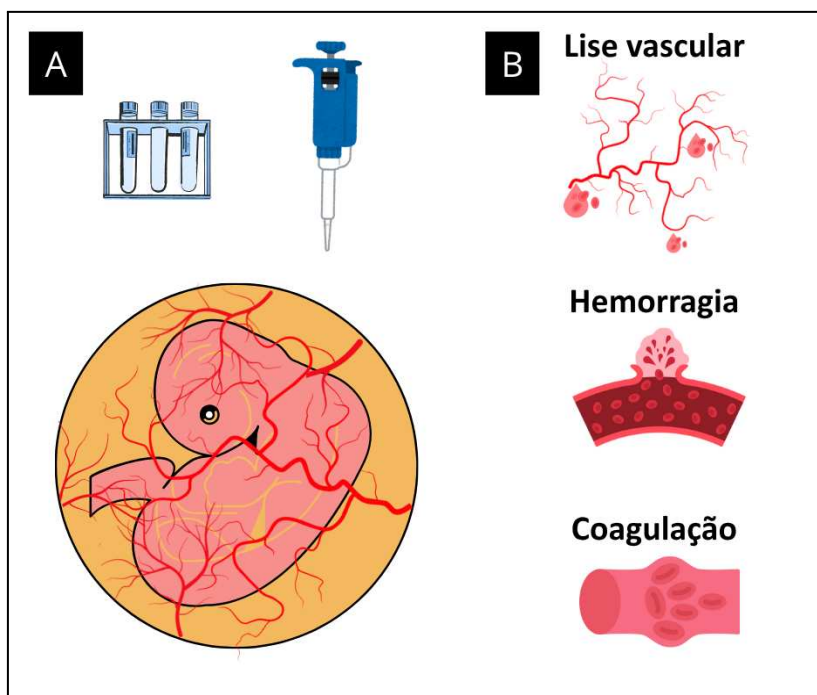
Fonte: A autoria própria, 2025.

Para abrir o ovo, foi necessário colocá-lo em uma superfície e segurar com firmeza. Usando a ponta de uma tesoura curva, abriu-se um orifício no topo do ovo da região mais romba. Com a tesoura curva, cortou-se, delicadamente, a casca da câmara de ar seguindo o orifício inicial feito, indo até um pouco acima da inserção da membrana.

Com o auxílio de uma pinça, retirou-se a membrana coquilífera externa com muito cuidado para não lesar a *CAM*, iniciando a retirada dessa membrana rente à casca para facilitar. É opcional utilizar soro fisiológico ou outra solução conhecida não irritante para umedecer a membrana e ajudar na retirada. Nesse experimento, foi utilizado o PBS para ajudar nessa etapa.

Uma vez retirada a membrana coquilífera, colocou-se o ovo no microscópio com adaptador de câmera acoplado (Modelo MC-M1232, DF Vasconcellos®), ajustando-se a altura da lente objetiva para dar o foco. Ao iniciar a filmagem, aplicou-se imediatamente 200µL da amostra líquida (Figura 9), deixando o experimento ser gravado por 5 minutos, além de fazer registros fotográficos da *CAM* nos tempos 0s (antes da aplicação da substância-teste), 30s, 60s (1 min), 120s (2 min), 240s (4 min) e 300s (5 min) para posterior análise dos efeitos.

Figura 9 – Representação da irritação (B) que pode ser observada após aplicação de composto tóxico (A) na *CAM* íntegra. A - Amostras com as substâncias-teste preparadas para serem aplicadas com auxílio de uma pipeta sobre a *CAM* e B - Sinais clássicos de irritação na *CAM*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025 (Criado em <https://www.canva.com>).

Por fim, realizou-se a eutanásia do embrião através da secção de um dos vasos, acondicionando os ovos em um saco branco específico para dispensação adequada.

4.3.6 Análise dos dados

Após o experimento, os vídeos foram analisados por dois analistas de forma independente, devendo ser registrados os seguintes fenômenos, caso ocorressem, para indicar o potencial irritante da substância-teste: hemorragia, lise de vasos e/ou coagulação. Ressalta-se que os analistas passaram por um treinamento para identificar os eventos irritantes para essa análise na CAM. Durante a análise, o tempo exato (em segundos) em que cada evento surgiu foi anotado, pois esses dados seriam utilizados para aplicar a fórmula do Coeficiente de Irritação (CI), descrita a seguir:

$$CI = 5 \left(\frac{301 - \text{segH}}{300} \right) + 7 \left(\frac{301 - \text{segL}}{300} \right) + 9 \left(\frac{301 - \text{segC}}{300} \right)$$

Onde:

H: Hemorragia

L: Lise dos vasos

C: Coagulação

seg: tempo de início de cada evento (em segundos)

5: Constante de hemorragia, que multiplica o tempo em segundos em que a hemorragia ocorreu.

7: Constante de lise vascular, que multiplica o tempo em segundos em que a lise foi observada.

9: Constante de coagulação, que multiplica o tempo em segundos em que a coagulação ocorreu.

Com base no número obtido nessa equação, pode-se classificar o quão irritante a substância é, de acordo com a tabela a seguir:

Tabela 2 – Faixa de classificação do Coeficiente de Irritação (CI).

Intervalo do Coeficiente de Irritação (CI)	Classificação
0,0 – 0,9	Não irritante (N.I.)
1,0 – 4,9	Irritante leve (I.L.)
5,0 – 8,9	Irritante moderado (I.M.)
9,0 – 21	Irritante severo (I.S.)

Fonte: Adaptado de Luepke, 1985.

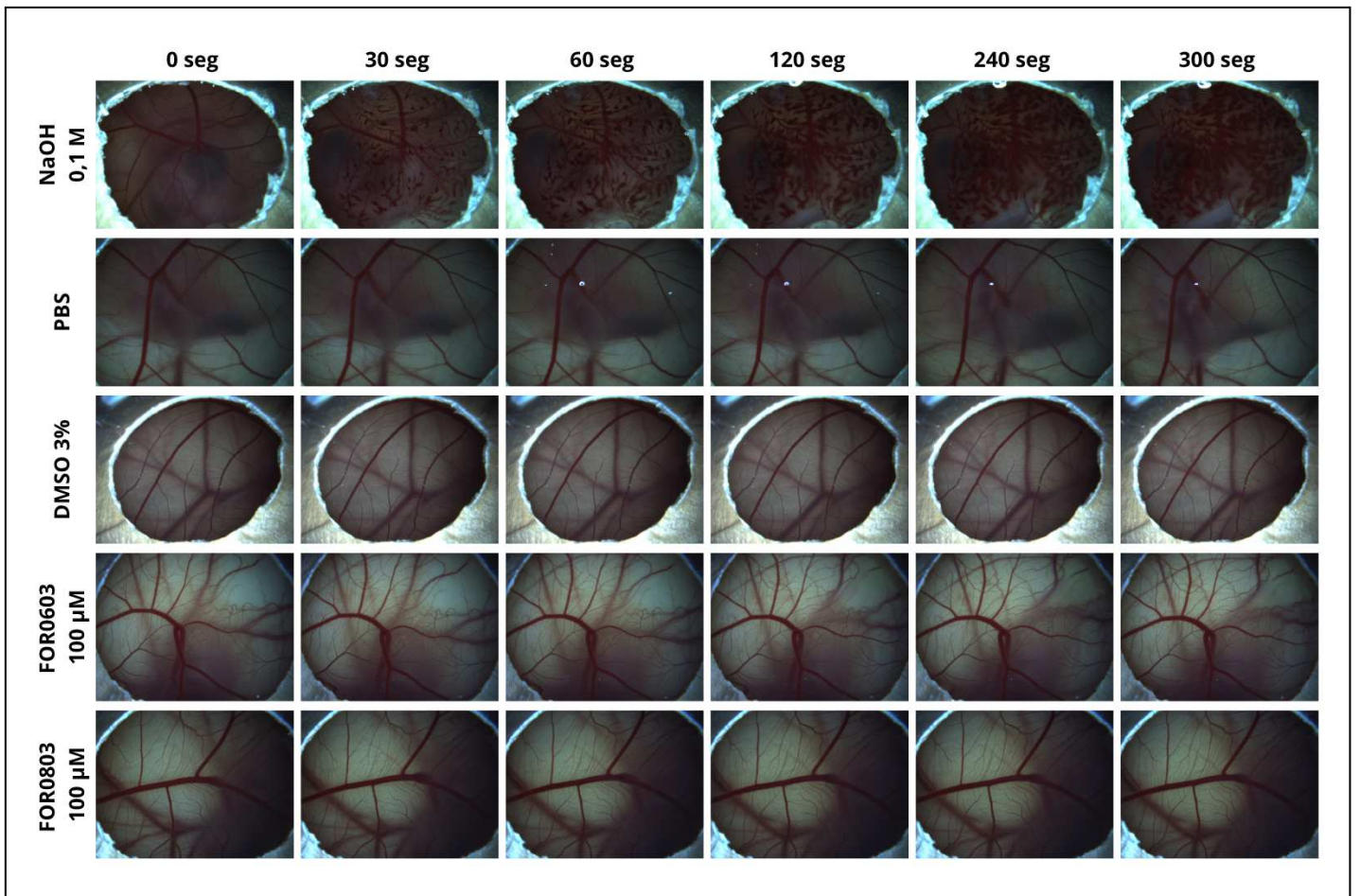
Para indicar que determinado evento não ocorreu no vídeo em análise, deveria ser registrado o tempo 301s. A partir dos dados dos analistas, foi feita uma média simples entre seus resultados de CI.

5 RESULTADOS

Os ovos que foram utilizados no experimento ficaram com os pesos dentro da faixa de recomendação e evidenciaram uma média de 60,47 g e desvio padrão de 3,51 (Tabela 3), indicando uniformidade no procedimento experimental realizado. Por meio do teste *HET-CAM*, observou-se que o efeito irritante na membrana corioalantóide ocorreu apenas ao aplicar a solução de NaOH 0,1M, com os valores Coeficiente de Irritação médio (CI_m) apresentando valores correspondentes a uma irritação severa. A análise dos vídeos permitiu verificar que a irritação na *CAM* com NaOH 0,1 M acontece de forma muito rápida, iniciando, de forma geral, por coagulação, com formação de trombos de sangue nos vasos, limitando a expansão do sangramento; seguido de lise vascular na forma de rompimento sutil dos vasos sanguíneos e, por fim, extravasamento intenso e generalizado de sangue, a hemorragia.

Pode-se notar que os analistas 1 e 2 divergiram no tempo de início de alguns dos eventos vasculares irritantes da solução de NaOH 0,1 M. No entanto, os resultados de CI dos analistas 1 e 2 ficaram na faixa que classifica a substância como Irritante Severo, indicando a diminuição da subjetividade da análise. Em contrapartida, as outras substâncias-teste (PBS, DMSO 3%, FOR0603 e FOR0803) utilizadas neste ensaio não apresentaram qualquer dano vascular durante o tempo de análise dos vídeos (Figura 10).

Figura 10 – Painel de acompanhamento de irritação da *CAM* após aplicação das substâncias-teste. Reprodução da *CAM* antes das soluções serem aplicadas (0 segundos), acompanhada de registros sequenciais depois da administração.



Fonte: Dados experimentais, 2025.

Tabela 3 – Dados da análise do HET-CAM. Apresentação dos registros experimentais relativos ao peso (em gramas) dos ovos utilizados, tempo (em segundos) em que cada evento irritante ocorreu e os resultados da aplicação da fórmula do Coeficiente de Irritação (CI) por meio da avaliação de cada analista, permitindo classificar o grau de irritação da substância-teste na CAM.

Substância-teste	Replicata	Peso (g)	Analista 1				Analista 2				CI _m	Classificação
			segH 1	segL 1	segC 1	CI 1	segH 2	segL 2	segC 2	CI 2		
NaOH	1	57,38	68	12	6	19,48	94	12	6	19,04	19,26	Irritante Severo
	2	60,19	21	8	5	20,38	23	28	4	19,91	20,15	Irritante Severo
	3	61,09	25	9	7	20,23	4	7	6	20,66	20,45	Irritante Severo
	4	65,34	12	13	4	20,45	12	17	4	20,35	20,40	Irritante Severo
PBS	1	62,78	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	2	70,33	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	3	57,89	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	4	59,25	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
DMSO 3%	1	58,27	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	2	56,44	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	3	60,86	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	4	61,77	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
FOR0603	1	57,47	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante

Continuação da Tabela 3 – Dados da análise do *HET-CAM*.

Substância-teste	Replicata	Peso (g)	Analista 1				Analista 2				CI _m	Classificação
			segH 1	segL 1	segC 1	CI 1	segH 2	segL 2	segC 2	CI 2		
FOR0603	2	60,04	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	3	57,98	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	4	58,40	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
FOR0803	1	58,32	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	2	62,46	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	3	65,89	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	4	57,36	301	301	301	0	301	301	301	0	0	Não Irritante
	Média	60,47										
	Desvio padrão	3,51										

Fonte: Dados experimentais, 2025.

6 DISCUSSÃO

O *HET-CAM* é considerado um ensaio confiável para diversos testes biológicos, especialmente para avaliação de irritação e toxicidade de substâncias químicas, cosméticos, fármacos e adjuvantes de vacinas. Estudos mostram que os resultados do *HET-CAM* apresentam boa correlação com métodos tradicionais *in vivo*, como o teste de Draize em coelhos, tanto para irritação ocular quanto para irritação de mucosas, sendo reconhecido como alternativa válida e ética para reduzir o uso de animais em experimentação, em conformidade com os princípios dos 3Rs (Luepke, Kemper, 1986; Batista-Duharte *et al.*, 2016; Spielmann *et al.*, 1997; Viera *et al.*, 2022). O método é sensível, de fácil execução e permite avaliações qualitativas e semi-quantitativas dos efeitos irritantes, além de ser útil para triagem inicial de compostos e para pré-seleção de candidatos em pesquisas farmacêuticas e toxicológicas (Löffler *et al.*, 2021; Brantner *et al.*, 2002; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2018). No entanto, algumas limitações são reconhecidas, como menor capacidade de avaliar efeitos sistêmicos ou biodistribuição completa, o que pode exigir testes complementares em modelos animais para confirmação de resultados (Löffler *et al.*, 2021).

A irritação resultante da exposição da membrana corioalantóide ao NaOH é bem relatada em outros trabalhos (Lima, 2019; Neto *et al.*, 2022). Em relação à sequência dos eventos irritantes, eles seguiram uma progressão um pouco diferente do que é relatado em testes com *HET-CAM*, provavelmente devido à subjetividade da análise. É documentado que, após a aplicação de um agente irritante, a sequência clássica de reações inclui inicialmente a lise (destruição) dos vasos sanguíneos, seguida por hemorragia e, em casos mais graves, coagulação dos vasos, indicando dano vascular significativo (Budai *et al.*, 2004; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2018; Smail, 2024). Essas respostas são semelhantes ao processo inflamatório observado em tecidos conjuntivos, como o olho de coelhos, e refletem uma reação inflamatória aguda da *CAM* à lesão (Budai *et al.*, 2004; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2018). A intensidade e a rapidez desses eventos dependem da natureza e concentração do agente testado, sendo que substâncias mais irritantes provocam respostas mais rápidas e intensas (Budai *et al.*, 2004; Palmeira-de-Oliveira *et al.*, 2018; Smail, 2024). A avaliação pode ser feita tanto por observação macroscópica quanto por análise histológica, que confirma a ruptura dos vasos e a presença de sangue ao redor deles (Budai *et al.*, 2004).

Além disso, há também limitações quanto a comparação com dados de testes *in vivo*, pois nem todos os agentes apresentam correlação perfeita entre os resultados na *CAM* e em tecidos humanos ou animais, e alguns compostos podem ser embriotóxicos mesmo sem

causar irritação ocular (Lawrence *et al.*, 1986). A avaliação dos efeitos irritantes (como coagulação, lise vascular e hemorragia) depende da observação visual e do momento em que cada reação é registrada manualmente pelo avaliador (Viera *et al.*, 2022). Para minimizar essa subjetividade e garantir maior confiabilidade, a padronização dos protocolos utilizados é fundamental, como demonstrado na comparação entre protocolos franceses e alemães, que levou à otimização e adaptação do método para reduzir a variabilidade entre avaliadores (Rivero *et al.*, 2021; Viera *et al.*, 2022). Há, ainda, a possibilidade de uso de algoritmos, sistemas de classificação unificados e, mais recentemente, técnicas de análise automatizada de imagens e inteligência artificial têm sido propostos para tornar a análise mais objetiva e reprodutível (Rivero *et al.*, 2021). Um estudo propôs um método que utiliza softwares como ImageJ para quantificar objetivamente os danos vasculares, reduzindo a subjetividade da análise (McKenzie *et al.*, 2015). Por fim, a validação cruzada dos resultados do *HET-CAM* com dados clínicos ou outros métodos *in vitro* também contribui para aumentar a confiabilidade e a aceitação do teste como alternativa ética e precisa (Rivero *et al.*, 2021; Viera *et al.*, 2022).

Os complexos de rutênio têm sido amplamente estudados quanto à sua atividade biológica, incluindo efeitos sobre a membrana corioalantóide de embriões de galinha, estando os resultados deste estudo em acordo com outros ensaios do nosso grupo de pesquisa, os quais foram testados os complexos de rutênio FOR011A, FOR011B, FOR811A, FOR811B e FOR711A quanto ao seu potencial de causar irritação na CAM, chegando a conclusão que na concentração de 100 μM os compostos são categorizados como Não Irritantes, sugerindo boa tolerabilidade para aplicações biológicas (Lima, 2019; Neto *et al.*, 2022). Outros trabalhos investigaram diferentes complexos de rutênio quanto à sua atividade antiangiogênica e antitumoral na CAM, demonstrando que esses compostos podem inibir a formação de novos vasos sanguíneos e até destruir a vasculatura existente, mas sem relatar efeitos irritantes diretos à membrana (Lai *et al.*, 2015; Nowak-Sliwinska *et al.*, 2011; Magalhães *et al.*, 2017; Schmitt *et al.*, 2018).

Em se tratando dos grupamentos dos complexos de rutênio utilizados neste estudo, é relatado na literatura que complexos à base de 1,10'-fenantrolina, estudados principalmente como agentes antitumorais e antimicrobianos, especialmente os contendo metais como cobre, prata, titânio e rênio, demonstram citotoxicidade significativa contra células tumorais, frequentemente comparável ou superior à de drogas como a cisplatina (Savinykh *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2020; Nicolás *et al.*, 2024; Bildziukevich *et al.*, 2022; Suntharalingam *et al.*, 2015; Ramírez-Contreras *et al.*, 2024). No entanto, esses compostos

tendem a ser menos tóxicos para células não tumorais, mas a seletividade varia conforme a estrutura. Alguns complexos mostraram baixa toxicidade em células normais e em modelos animais, sugerindo potencial terapêutico com menor risco de efeitos colaterais (Silva *et al.*, 2020; Suntharalingam *et al.*, 2015; Bontempo *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2022).

Já sobre os compostos à base de 2,2'-bipiridina, também muito estudados como agentes antitumorais e antimicrobianos, é indicado que quando complexados com metais como cobre, zinco, níquel, rutênio e irídio, apresentam baixa toxicidade em células normais e em modelos animais, mesmo em doses elevadas (Priyanka *et al.*, 2025; Vasile Scăețeanu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Babak *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2024; Millán *et al.*, 2023). Ensaios em camundongos e ratos indicam ausência de efeitos tóxicos relevantes em órgãos vitais e parâmetros bioquímicos, principalmente para complexos metálicos, enquanto a 2,2'-bipiridina livre pode apresentar maior toxicidade, como perda de peso em ratos (Priyanka *et al.*, 2025; Yang *et al.*, 2018; Babak *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2024).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por mais que os resultados aqui apresentados tenham mostrado que os complexos organometálicos à base de rutênio FOR0603 e FOR0803 possuem um bom perfil de segurança para seguir para análises mais complexas relacionadas ao comportamento biológico, é imprescindível evidenciar que limitações presentes neste trabalho devem ser aperfeiçoadas de forma mais consistente, ressaltando-se que foi realizado apenas a análise da toxicidade aguda das substâncias, sendo aconselhável realizar outros testes abrangendo as toxicidades subaguda, crônica e subcrônica para estabelecer um perfil ampliado da toxicidade desses compostos.

É essencial ainda reforçar o perfil de toxicidade desses compostos utilizando ensaios com outras metodologias, como estudos *in silico*, cultivo de células humanas e de outras espécies, modelos de organoides e estudos com delineamentos experimentais otimizados para determinar a DL50 (como o procedimento *up-and-down*), reforçando a necessidade de promover uma otimização da confiabilidade de resultados e atuar de forma responsável e ética, especialmente quando são usados animais experimentais.

8 CONCLUSÃO

Entende-se, portanto, que os complexos de rutênio testados neste estudo não causaram irritação significativa na CAM, sendo considerados seguros neste modelo experimental, reforçando seu potencial para uso em pesquisas biomédicas e desenvolvimento de fármacos.

No entanto, existem limitações no método que precisam ser superadas. Para isso, é fundamental salientar que são necessários outros estudos para complementar o perfil de toxicidade dos complexos organometálicos testados neste trabalho e, assim, permitir o avanço para ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

- AKHILA, J.S.; SHYAMJITH; DEEPA.; ALWAR, M.C. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. **Current Science**, 93, 2007, 917-920. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/24099255>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- ALLARDYCE, C.S.; DYSON, P.J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platin. Met. Rev.**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001. Disponível em: <https://technology.matthey.com/content/journals/10.1595/003214001X4526269>. Acesso em: 12 out. 2024.
- AMINI, M.; ZAYERI, F.; SALEHI, M. Trend analysis of cardiovascular disease mortality, incidence, and mortality-to-incidence ratio: Results from global burden of disease study 2017. **BMC Public Health** 2021, 21, 401. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7905904/>. Acesso em: 12 out. 2024.
- ANG, W.H.; DYSON, P.J. Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy, **European Journal of Inorganic Chemistry** (2006) 4003–4018. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejic.200600723>. Acesso em: 12 out. 2024.
- ANTHONY, E. J.; *et al.* Metallodrugs are unique: Opportunities and challenges of discovery and development, **Chem. Sci.**, 2020, 11(48), 12888–12917. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8163330/>. Acesso em: 12 out. 2024.
- AUERBACH, R.; *et al.* Angiogenesis Assays: Problems and Pitfalls. **Cancer Metastasis Rev.** 2000, 19, 167–172. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191056/>. Acesso em: 16 out. 2024.
- AUSPRUNK, D.H.; KNIGHTON, D.R.; FOLKMAN, J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study, **Dev. Biol.** 38 (1974) 237–248. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4831108/>. Acesso em: 16 out. 2024.
- BABAK, M. V.; *et al.* Rollover Cyclometalated Bipyridine Platinum Complexes as Potent Anticancer Agents: Impact of the Ancillary Ligands on the Mode of Action. **Inorganic Chemistry**, 2018, 57(5), 2851–2864. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b03210>. Acesso em: 20 jul. 2025.
- BABU K, A.; NARAYANAN R, R. Determination of Ocular Irritancy Potential of Ophthalmic products using HET-CAM Method. **Research Journal of Pharmacy and Technology**. 2021; 14(6):3063-6. Disponível em: 10.52711/0974-360X.2021.00535. Acesso em: 14 jun. 2025.
- BAHIA, L.; *et al.* O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.**, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/abem/a/czLyfhSwDWX9Kpx3yp3JphH/?lang=pt>. Acesso em: 16 out. 2024.

BANIN, T.M. Estudo da tolerancia in vitro induzida pelo doador de NO cis-[Ru (bpy) 2 (py) NO₂](PF₆)(RuBPY). 2016. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-02052016-144520/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future Science OA**, 2015, 1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28031915/>. Acesso em: 10 out. 2024.

BASTOS, L.; OLIVEIRA, G.; VILLELA, P.; FELICIANO, S.; BICHARA, J. Social determinants and mortality from cardiovascular disease in Brazil. **European Heart Journal**. Volume 42, Issue Supplement_1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab724.2739>. Acesso em: 16 jun. 2025.

BATALHA, E. Uso de animais em pesquisa abrange desafios éticos e compromisso com novas tecnologias. **Portal Fiocruz**, 23 fev. 2017. Notícia. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/uso-de-animais-em-pesquisa-abrange-desafios-eticos-e-compromisso-com-novas-tecnologias>. Acesso em: 29 dez. 2024.

BATISTA-DUHARTE, A.; JORGE MURILLO, G.; PÉREZ, U. M.; TUR, E. N.; PORTUONDO, D. F.; MARTÍNEZ, B. T.; TÉLLEZ-MARTÍNEZ, D.; BETANCOURT, J. E.; PÉREZ, O. (2016). The Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane: An Alternative Assay for the Assessment of the Irritating Effect of Vaccine Adjuvants. **International journal of toxicology**, 35(6), 627–633. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1091581816672187>. Acesso em: 16 jun. 2025.

BAUER, A. J.; MARTIN, K. A. Coordinating regulation of gene expression in cardiovascular disease: Interactions between chromatin modifiers and transcription factors. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, 2017, 4, 19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28428957/>. Acesso em: 23 out. 2024.

BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy, **Dalton Transactions** 2007, 1267–1272. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2007/dt/b617769g>. Acesso em: 16 out. 2024.

BILDZIUKEVICH, U.; *et al.* Novel cytotoxic 1,10-phenanthroline-triterpenoid amphiphiles with supramolecular characteristics capable of coordinating 64Cu(II) labels. **Org Biomol Chem.**, 2022 Oct 26;20(41):8157-8163. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d2ob01172g>. Acesso em: 20 jul. 2025.

BLISS, C. THE TOXICITY OF POISONS APPLIED JOINTLY¹. **Annals of Applied Biology**, 26, 1939, 585-615. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1939.TB06990.X>. Acesso em: 10 jun. 2025.

BONTEMPO, N.J.S.; *et al.* Copper(II) Complex Containing 4-Fluorophenoxyacetic Acid Hydrazide and 1,10-Phenanthroline: A Prostate Cancer Cell-Selective and Low-Toxic Copper(II) Compound. **Molecules**, 2022, 27(20), 7097. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27207097>. Acesso em: 20 jul. 2025.

BRASIL. DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. DF: **Diário Oficial da União**, 2009. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm. Acesso em: 28 dez. 2024.

BRASIL. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, DF: **Diário Oficial da União**, 2008. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm. Acesso em: 28 dez. 2024.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). RELATÓRIO DE USO DE ANIMAIS EM ENSINO E PESQUISA 2019-2023. Brasília: **Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação**, 2024a. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1n2wio3MI6mqeryVIDSQ4Xti9InSdE9C1/view>. Acesso em: 26 dez. 2024.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). NOTA INFORMATIVA CONCEA/Nº 01/2024. Dispõe sobre o uso de embriões, fetos ou formas larvais animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Brasília: **Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação**, 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/nota-informativa-concea-no-01-2024>. Acesso em: 28 dez. 2024.

BRANT, L. C. C.; NASCIMENTO, B. R.; PASSOS, V. M. A.; DUNCAN, B. B.; BENSENÖR, I. J. M.; MALTA, D. C.; SOUZA, M. F. M.; ISHITANI, L. H.; FRANÇA, E.; OLIVEIRA, M. S.; MOONEY, M.; NAGHAVI, M.; ROTH, G.; RIBEIRO, A. L. P. Variações e diferenciais da mortalidade por doença cardiovascular no Brasil e em seus estados, em 1990 e 2015: estimativas do Estudo Carga Global de Doença. **Revista Brasileira De Epidemiologia**, 20, 2017, 116–128. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-5497201700050010>. Acesso em: 16 jun. 2025.

BRANT, L., NASCIMENTO, B., VELOSO, G., GOMES, C., POLANCZYK, C., OLIVEIRA, G., RIBEIRO, A., MALTA, D. Burden of cardiovascular diseases attributable to risk factors in Brazil: data from the Global Burden of Disease 2019 study. **European Heart Journal**. Volume 42, Issue Supplement_1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab724.3141>. Acesso em: 16 jun. 2025.

BRANTNER, A. H.; QUEHENBERGER, F.; CHAKRABORTY, A.; POLLIGGER, J.; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R. (2002). HET-CAM bioassay as in vitro alternative to the croton oil test for investigating steroidal and non-steroidal compounds. **ALTEX**, 19(2), 51–56. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12098009/>. Acesso em: 16 jun. 2025.

BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide, **Nature** 347 (1990) 768–770. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1700301/>. Acesso em: 16 out. 2024.

BRESSAN, M.; MIKAWA, T. Avians as a Model System of Vascular Development. **Methods Mol. Biol.** 2015, 1214, 225–242. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25468608/>. Acesso em: 24 nov. 2024.

BUDAI, P.; VÁRNAGY, L.; FEJES, S.; SOMLYAY, I.M.; LINCZMAYER, K.; PONGRÁCZ, A. Irritative effects of some pesticides and a technical component on tissue structure of the chorioallantoic membrane. **Commun Agric Appl Biol Sci.** 2004;69(4):807-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15756873/>. Acesso em: 14 jun. 2025.

BUDAI, P., KORMOS, É.; BUDA, I.; SOMODY, G.; LEHEL, J. Comparative evaluation of HET-CAM and ICE methods for objective assessment of ocular irritation caused by selected pesticide products. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, 74, 2021, 105150. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105150>. Acesso em: 14 jun. 2025.

BURCH, R.L. The progress of humane experimental technique since 1959: A personal view. **Altern. Lab. Anim.** 1995, 23, 776–783. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119299502300607>. Acesso em: 08 out. 2024.

CIMPEAN, A.M.; RIBATTI, D.; RAICA, M. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model to Study Tumor Metastasis. **Angiogenesis** 2008, 11, 311–319. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18780151/>. Acesso em: 23 out. 2024.

CLARKE, M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals, **Coordination Chemistry Reviews** 232 (2002) 69–93. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010854502000255>. Acesso em: 16 out. 2024.

CORDEIRO, C.M.M.; HINCKE, M.T. Quantitative proteomics analysis of eggshell membrane proteins during chick embryonic development, **Journal of Proteomics**, Volume 130, 2016, Pages 11-25, ISSN 1874-3919, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.014>. Acesso em: 7 jun. 2025.

CRAWFORD, S.E.; *et al.* Green Toxicology: a strategy for sustainable chemical and material development. **Environ. Sci. Eur.** 2017, 29, 16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28435767/>. Acesso em: 20 out. 2024.

DEUBEL, D.V.; LAU, J.K.C. In silico evolution of substrate selectivity: comparison of organometallic ruthenium complexes with the anticancer drug cisplatin, **Chemical**

Communications (2006) 2451–2453. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16758012/>. Acesso em: 16 out. 2024.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1944, 82, 377–390. Disponível em:

[https://jpet.aspetjournals.org/article/S0022-3565\(25\)08751-8/abstract](https://jpet.aspetjournals.org/article/S0022-3565(25)08751-8/abstract). Acesso em: 23 out. 2024.

DÜNKER, N.; JENDROSSEK, V. Implementation of the Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model in Radiation Biology and Experimental Radiation Oncology Research.

Cancers 2019, 11, 1499. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31591362/>. Acesso em: 28 out. 2024.

DWYER, F.P.; *et al.* Biological activity of complex ions, **Nature** 170 (1952) 190–191.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12982853/>. Acesso em: 16 out. 2024.

DWYER, F.P.; *et al.* Inhibition of landschuetz ascites tumour growth by metal chelates derived from 3, 4, 7, 8-tetramethyl-1, 10-phenanthroline, **British Journal of Cancer** 19

(1965) 195–199. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14284381/>. Acesso em: 16 out. 2024.

EKE, G.; *et al.* Development of a UV Crosslinked Biodegradable Hydrogel Containing Adipose Derived Stem Cells to Promote Vascularization for Skin Wounds and Tissue Engineering. **Biomaterials** 2017, 129, 188–198. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28343005/>. Acesso em: 28 out. 2024.

ELAROSSI, M.A.; *et al.* The Role of Vitamin D in Chorioallantoic Membrane Calcium Transport. **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.** 1994, 1192, 1–6. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8204637/>. Acesso em: 03 nov. 2024.

FESTING, S. On the necessity for animal experimentation. **BioEssays**, 2008, 30. Disponível

em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18081030/>. Acesso em: 18 dez. 2024.

FESTING, S.; WILKINSON, R. The ethics of animal research. **EMBO reports**, 2007, 8.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17545991/>. Acesso em: 18 dez. 2024.

FIOCRUZ (Brasil). Atlas do método HET-CAM: Protocolo ilustrado aplicado à avaliação da toxicidade ocular / organizado por Isabella Fernandes Delgado, Lorena Rigo Gaspar Cordeiro e Marize Campos Valadares. – Rio de Janeiro, RJ: **Fiocruz**, RENAMA, 2023. Disponível em:

<https://educare.fiocruz.br/resource/show?id=y6EPRsbZ>. Acesso em: 10 out. 2024.

FONSECA, L.G.A.; LIMA, I.N.D.F.; GUALDI, L.P. Characterization of Brazilian hospital admissions due to cardiovascular diseases: a longitudinal study. **BMC Cardiovasc Disord**,

20, 311, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01588-w>. Acesso em: 16 jun. 2025.

FRANCO, N. H. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective.

Animals: an open access journal from MDPI, 2013, 3(1), 238–273. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26487317/>. Acesso em: 18 dez. 2024.

FRICKER, S. P. Metal based drugs: From serendipity to design, **Dalton Trans.**, 2007(43), 4903- 4917. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17992275/>. Acesso em: 23 out. 2024.

GABRIELLI, M.G.; ACCILI, D. The Chick Chorioallantoic Membrane: A Model of Molecular, Structural, and Functional Adaptation to Transepithelial Ion Transport and Barrier Function during Embryonic Development. **J. Biomed. Biotechnol.** 2010, 2010, 940741. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20339524/>. Acesso em: 12 nov. 2024.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system, **Trends in Neurosciences** 14 (1991) 60–67. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1708538/>. Acesso em: 28 out. 2024.

GARTHWAITE, J. Neural nitric oxide signalling, **Trends in Neurosciences** 18 (1995) 51–52. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7537404/>. Acesso em: 28 out. 2024.

GONÇALVES, M.M. Produção e caracterização de nanopartículas derivadas de poliacrilatos contendo tamoxifeno e nitroprussiato de sódio, com possível aplicabilidade no tratamento do câncer. 2018. 73 f., il. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) — **Universidade de Brasília**, Brasília, 2018. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/20938>. Acesso em: 19 jun. 2025.

GOODPASTURE, E.W.; WOODRUFF, A.M.; BUDDINGH, G.J. The Cultivation of Vaccine and Other Viruses in the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos. **Science** 1931, 74, 371–372. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17810781/>. Acesso em: 28 out. 2024.

GOUVEIA JÚNIOR, F. S.; *et al.* New nitrosyl ruthenium complexes with combined activities for multiple cardiovascular disorders. **Dalton transactions**, 2023, 52(16), 5176–5191. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36970749/>. Acesso em: 08 fev. 2025.

GOVEIA, J.; STAPOR, P.; CARMELIET, P. Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease. **EMBO Molecular Medicine**, 2014, 6(9), 1105–1120. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25063693/>. Acesso em: 01 dez. 2024.

GREGUS, Z.; KLAASSEN, C. Mechanisms of toxicity.. **British medical journal**, 4, 1969, 5678, 251. Disponível em: https://doi.org/10.7326/0003-4819-71-6-1232_6. Acesso em: 10 jun. 2025.

GRIBALDO, L.; GENNARI, A.; BLACKBURN, K.; CLEMEDSON, C.; DEGUERCY, A.; MENEGUZ, A.; PFALLER, W.; RUHDEL, I. 3.1. Acute Toxicity. **Alternatives to Laboratory Animals**, 33(1), 2005, 27 - 34. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/026119290503301s07>. Acesso em: 10 jun. 2025.

GRINBERG, I.; *et al.* Engraftment of Human Blood Malignancies to the Turkey Embryo: A Robust New in Vivo Model. **Leuk. Res.** 2009, 33, 1417–1426. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19297019/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

GRISOLD, W.; CAROZZI, V. Toxicity in Peripheral Nerves: An Overview. **Toxics**, 9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics9090218>. Acesso em: 10 jun. 2025.

GRZEŚK, G.; WITCZYŃSKA, A.; WĘGLARZ, M.; WOŁOWIEC, Ł.; NOWACZYK, J.; GRZEŚK, E.; NOWACZYK, A. Soluble Guanylyl Cyclase Activators—Promising Therapeutic Option in the Pharmacotherapy of Heart Failure and Pulmonary Hypertension. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 861, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36677920/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

GUENGERICH, F.P. Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. **Drug Metab. Pharmacokinet.**, 2011, 26, 3–14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20978361/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

HALGRAIN, M.; BERNARDET, N.; CREPEAU, M.; MÊME, N.; NARCY, A.; HINCKE, M.; RÉHAULT-GODBERT, S. Eggshell decalcification and skeletal mineralization during chicken embryonic development: defining candidate genes in the chorioallantoic membrane, **Poultry Science**, Volume 101, Issue 2, 2022a, 101622, ISSN 0032-5791. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101622>. Acesso em: 7 jun. 2025.

HALGRAIN, M.; GEORGEAULT, S.; BERNARDET, N.; HINCKE, M. T.; RÉHAULT-GODBERT, S. Concomitant Morphological Modifications of the Avian Eggshell, Eggshell Membranes and the Chorioallantoic Membrane During Embryonic Development. **Frontiers in physiology**, 13, 2022b, 838013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35574476/>. Acesso em: 7 jun. 2025.

HAMBURGUER, V.; HAMILTON, H.L. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. **Dev. Dyn.** 1992, 195, 231–272. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1304821/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

HARNOSS, J. C.; ELRUB, Q. M. A.; JUNG, J. O.; KOBURGER, T.; ASSADIAN, O.; DISSEMOND, J.; BAGUHL, R.; PAPKE, R.; KRAMER, A.; SUPPORTED BY THE WORKING GROUP ANTISEPTICS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CHEMOTHERAPY FOR INFECTION AND CANCER (ISC). Irritative potency of selected wound antiseptics in the hen's egg test on chorioallantoic membrane to predict their compatibility to wounds. **Wound repair and regeneration** : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society, 27(2), 2019, 183–189. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/wrr.12689>. Acesso em: 14 jun. 2025.

HEFFERN, M. C.; *et al.* Cobalt derivatives as promising therapeutic agents, **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 2013, 17(2), 189–196. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23270779/>. Acesso em: 27 nov. 2024.

HIBBS JR., J.B.; *et al.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule, **Biochemical and Biophysical Research Communications** 157 (1988) 87–94. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3196352/>. Acesso em: 14 out. 2024.

HUBRECHT, R. C.; CARTER, E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. **Animals**: an open access journal from MDPI, 2019, 9(10), 754. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31575048/>. Acesso em: 10 out. 2024.

IGNARRO, L.J. Endothelium-derived nitric-oxide - actions and properties, **Faseb Journal** 3 (1989) 31–36. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2642868/>. Acesso em: 10 out. 2024.

IGNARRO, L.J. Nitric Oxide Biology and Pathobiology, **Academic Press**, 2000.

ISACHENKO, V.; *et al.* Comparison of In Vitro- and Chorioallantoic Membrane (CAM)-Culture Systems for Cryopreserved Medulla-Contained Human Ovarian Tissue. **PLoS ONE** 2012, 7, e32549. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3316540/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

KATSNELSON, B.; PANOV, V.; MINIGALIYEVA, I.; VARAKSIN, A.; PRIVALOVA, L.; SLYSHKINA, T.; GREBENKINA, S. Further development of the theory and mathematical description of combined toxicity: An approach to classifying types of action of three-factorial combinations (a case study of manganese-chromium-nickel subchronic intoxication).. **Toxicology**, 334, 2015, 33-44. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.05.005>. Acesso em: 10 jun. 2025.

KISHORE, A.S.; *et al.* Hen Egg Chorioallantoic Membrane Bioassay: An in Vitro Alternative to Draize Eye Irritation Test for Pesticide Screening. **Int. J. Toxicol.** 2008, 27, 449–453. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19482824/>. Acesso em: 28 out. 2024.

KOZŁOWSKI, H.; KOŁKOWSKA, P.; WĄTŁY, J.; KRZYWOSZYŃSKA, K.; POTOCKI, S. General aspects of metal toxicity.. **Current medicinal chemistry**, 21 33, 2014, 3721-40. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867321666140716093838>. Acesso em: 10 jun. 2025.

KUE, C.S.; *et al.* Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM): An Alternative Predictive Model in Acute Toxicological Studies for Anti-Cancer Drugs. **Exp. Anim.** 2015, 64, 129–138. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25736707/>. Acesso em: 28 out. 2024.

KUNDEKOVÁ, B.; *et al.* Chorioallantoic Membrane Models of Various Avian Species: Differences and Applications. **Biology** 2021, 10, 301. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33917385/>. Acesso em: 28 out. 2024.

KUNZI-RAPP, K.; RÜCK, A.; KAUFMANN, R. Characterization of the Chick Chorioallantoic Membrane Model as a Short-Term in Vivo System for Human Skin. **Arch. Dermatol. Res.** 1999, 291, 290–295. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10367712/>. Acesso em: 28 out. 2024.

LAI, H.; ZHAO, Z.; LI, L.; ZHENG, W.; CHEN, T. Antiangiogenic ruthenium(ii) benzimidazole complexes, structure-based activation of distinct signaling pathways. **Metallomics**. 2015 Mar;7(3):439-47. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25630534/>. Acesso em: 16 jun. 2025.

LAWRENCE, R.S.; GROOM, M.H.; ACKROYD, D.M.; PARISH, W.E. The chorioallantoic membrane in irritation testing, **Food and Chemical Toxicology**, Volume 24, Issues 6–7, 1986, Pages 497-502, ISSN 0278-6915, Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90100-6](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90100-6). Acesso em: 10 jun. 2025.

LAZAROVICI, P.; *et al.* Nerve Growth Factor (NGF) Promotes Angiogenesis in the Quail Chorioallantoic Membrane. **Endothelium** 2006, 13, 51–59. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16885067/>. Acesso em: 28 out. 2024.

LIMA, B.A.V. Avaliação das atividades citotóxicas de alguns complexos fosfínicos de rutênio (Células tumorais MDA-MB 231). 2010. 207 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6465>. Acesso em: 16 jun. 2025.

LIMA, N.C.B. Utilização do ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM) para análise do efeito irritante de complexos de rutênio. 2019. 45 f. TCC (Graduação em Biotecnologia) - **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/48967>. Acesso em: 18 jun. 2025.

LÖFFLER, J.; HAMP, C.; SCHEIDHAUER, E.; DI CARLO, D.; SOLBACH, C.; ABAEI, A.; HAO, L.; GLATTING, G.; BEER, A. J.; RASCHE, V.; WINTER, G. (2021). Comparison of Quantification of Target-Specific Accumulation of [18F]F-siPSMA-14 in the HET-CAM Model and in Mice Using PET/MRI. **Cancers**, 13(16), 4007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34439163/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

LOTOTSKA-DUDYK, U.; KUZMINOV, B.; CHEMODUROVA, N.; TURKINA, V. HET-CAM test in evaluation of irritating action of adhesives used in shoe making industry. **Medicni perspektivi**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 189–199, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2023.4.294232>. Acesso em: 14 jun. 2025.

LOTZ, C. Alternative Methods for the Replacement of Eye Irritation Testing. **ALTEX** 2016, 33, 55–67. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26626125/>. Acesso em: 28 out. 2024.

LU, W.; SU, Z.; SHEN, Y.; YUAN, J.; ZHANG, H.; LI, S.; LIU, Z. Worldwide trends in mortality for hypertensive heart disease from 1990 to 2019 with projection to 2034: data from the Global Burden of Disease 2019 study. **European journal of preventive cardiology**. Volume 31, Issue 1, 2023, Pages 23–37. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwad262>. Acesso em: 16 jun. 2025.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287–291, 1985. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4040077/>. Acesso em: 28 out. 2024.

LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. The HET-CAM Test: An Alternative to the Draize Eye Test. **Food Chem. Toxicol.** 1986, 24, 495–496. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0278691586900992?via%3Dihub>. Acesso em: 28 out. 2024.

LUSIMBO, W.S.; LEIGHTON, F.A.; WOBESER, G.A. Histology and Ultrastructure of the Chorioallantoic Membrane of the Mallard Duck (*Anas platyrhynchos*). **Anat. Rec.** 2000, 259, 25–34. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10760740/>. Acesso em: 28 out. 2024.

MACE, E.H.; KIMLINGER, M.J.; BILLINGS IV, F.T.; LOPEZ, M. G. Targeting Soluble Guanylyl Cyclase during Ischemia and Reperfusion. **Cells**, [S.L.], v. 12, n. 14, p. 1903, 21 jul.

2023. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/cells12141903>. Acesso em: 19 jun. 2025.

MAERTENS, A.; *et al.* Green toxicology. **ALTEX**, 2014, 31, 243–249. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25061898/>. Acesso em: 28 dez. 2024.

MAGALHÃES, F. J.; *et al.* Fatores de risco para doenças cardiovasculares em profissionais de enfermagem: estratégias de promoção da saúde. **Revista Brasileira De Enfermagem**, v. 67, n. 3, p. 394-400, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reben/a/ty5vrCwrrb35GTyrcxf3qjn/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 20 dez. 2024.

MAGALHÃES, L.F., MELLO-ANDRADE, F., PIRES, W.C., SILVA, H.D., DA SILVA, P.F.F., MACEDO, L.M., HENRIQUE DE CASTRO, C., CARNEIRO, C.C., CARDOSO, C.G., DE MELO REIS, P.R., CAMARGO DE OLIVEIRA, L., CAETANO, R.R., BATISTA, A.A., SILVEIRA-LACERDA, E.P. cis-[RuCl(BzCN)(bipy)(dppe)]PF₆ induces anti-angiogenesis and apoptosis by a mechanism of caspase-dependent involving DNA damage, PARP activation, and Tp53 induction in Ehrlich tumor cells. **Chem Biol Interact.** 2017 Dec 25;278:101-113. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28935426/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

MAIKOO, S.; *et al.* Ruthenium compounds as potential therapeutic agents for type 2 diabetes mellitus, **Eur. J. Med. Chem.**, 2021, 213, 113064, DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113064. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33279292/>. Acesso em: 30 out. 2024.

MAKANYA, A.N.; *et al.* Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. **PLoS ONE** 2016, 11, e0152821. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27046154/>. Acesso em: 03 nov. 2024.

MALARVIZHI, K.; *et al.* Analytical insights into the detoxification process and characterization of a traditional metallopharmaceutical formulation. **RSC medicinal chemistry**, 14 6 (2023): 1143-1157. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37360396/>. Acesso em: 23 nov. 2024.

MANGIR, N.; *et al.* Using Ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay to Evaluate the Biocompatibility and Angiogenic Response to Biomaterials. **ACS Biomater. Sci. Eng.** 2019, 5, 3190–3200. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.9b00172>. Acesso em: 03 nov. 2024.

MARLETTA, M.A.; *et al.* Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate, **Biochemistry** 27 (1988) 8706-8711. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3242600/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

MARQUES, S.D. Uso de animais em pesquisas obedece a diretrizes rígidas e segue necessário quando os modelos alternativos não dão conta da complexidade da vida. **Jornal da Universidade - UFRGS**, 3 ago. 2023. Reportagem. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/jornal/uso-de-animais-em-pesquisas-obedece-a-diretrizes-rigidas-e-segu>

e-necessario-quando-os-modelos-alternativos-nao-dao-conta-da-complexidade-da-vida/. Acesso em: 29 dez. 2024

MCCLEVERTY, J.A. Chemistry of nitric oxide relevant to biology, **Chemical Reviews** 104 (2004) 403–418. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14871130/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

MCKENZIE, B., KAY, G., MATTHEWS, K.H., KNOTT, R.M., CAIRNS, D. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. **Int J Pharm.** 2015 Jul 25;490(1-2):1-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25980731/>. Acesso em: 20 mai. 2025.

MEGGERS, E. Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes, **Current Opinion in Chemical Biology** 11 (2007) 287–292. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17548234/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

MILLÁN, G.; *et al.* A new family of luminescent iridium complexes: synthesis, optical, and cytotoxic studies. **Dalton Transactions**, 2023, 52(19), 6360–6374. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d3dt00028a>. Acesso em: 20 jul. 2025.

MJOS, K. D.; ORVIG, C., Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry, **Chem. Rev.**, 2014, 114(8), 4540–4563. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24456146/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

MORROW, G.; *et al.* The Growth of *Leptospira Icterohemorrhagiae* on the Chorioallantoic Membrane of the Chick Embryo. **Science** 1938, 88, 384–385. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17746419/>. Acesso em: 01 nov. 2024.

MUHAMMAD, N.; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents, **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 2014, 19(1), 144–153. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24608084/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

MUHAMMAD, N.; *et al.* Biotin-tagged platinum(IV) complexes as targeted cytostatic agents against breast cancer cells, **Chem. Commun.**, 2017, 53(72), 9971–9974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28831477/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

NETO, J. O., MARINHO, M.M., SILVEIRA, J.A.M., ROCHA, D.G, LIMA, N.C.B., GOUVEIA JÚNIOR, F.S., LOPES, L.G.F., SOUSA E.H.S., MARTINS, A.M.C., MARINHO, A.D., JORGE, R.J.B., MONTEIRO, H.S.A. Synthesis and potential vasorelaxant effect of a novel ruthenium-based nitro complex. **J Inorg Biochem.** 2022 Mar;228:111666. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34923187/>. Acesso em: 18 jun. 2025.

NICOLÁS, Á.; *et al.* DNA Interactions and Biological Activity of 2,9-Disubstituted 1,10-Phenanthroline Thiosemicarbazone-Based Ligands and a 4-Phenylthiazole Derivative. **Biology**, 2024, 13(1), 60. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology13010060>. Acesso em: 20 jul. 2025.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; *et al.* Consensus Guidelines for the Use and Interpretation of Angiogenesis Assays. **Angiogenesis** 2018, 21, 425–532. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29766399/>. Acesso em: 01 nov. 2024.

NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M.L. The Chicken Chorioallantoic Membrane Model in Biology, Medicine and Bioengineering. **Angiogenesis** 2014, 17, 779–804. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25138280/>. Acesso em: 01 nov. 2024.

NOWAK-SLIWINSKA, P., VAN BEIJNUM, J.R., CASINI, A., NAZAROV, A.A., WAGNIERES, G., VAN DEN BERGH, H., DYSON, P.J., GRIFFIOEN, A.W. Organometallic ruthenium(II) arene compounds with antiangiogenic activity. **J Med Chem.** 2011 Jun 9;54(11):3895-902. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21534534/>. Acesso em: 10 jun. 2025.

OLSSON, I.A.S.; ROBINSON, P.; SANDOE, P. Ethics of animal research. In Handbook of Laboratory Animal Science-Volume I: Essential Principles and Practices, 3rd ed.; Hau, J., Schapiro, S.J., Eds.; **CRC Press**: Boca Raton, FL, USA, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, **Physiological Reviews** 87 (2007) 315–424. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17237348/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

PAGIDIPATI, N.J.; GAZIANO, T.A. Estimating Deaths from Cardiovascular Disease: A Review of Global Methodologies of Mortality Measurement. **Circulation** 2013, 127, 749–756. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23401116/>. Acesso em: 27 dez. 2024.

PAGLIARO, P. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO, **Life Sciences** 73 (2003) 2137–2149. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12927585/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; *et al.* Testing Vaginal Irritation with the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane Assay. **ALTEX** 2018, 35, 495–503. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29534246/>. Acesso em: 30 out. 2024.

PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, **Nature** 333 (1988) 664–666. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3131684/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

PAZ, I.A.. Síntese, caracterização e avaliação cinética de vasodilatação com complexos metálicos doadores de óxido nítrico. 2019. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) - **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/62771>. Acesso em: 19 jun. 2025.

PEREIRA, A.C. *et al.* Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. **Braz J Med Biol Res.** v. 44(9). p. 947-57. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21755266/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

PRATI, C. *et al.* Endothelial dysfunction in joint disease. **Joint Bone Spine**. v. 81(5). p. 386-91. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24565889/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

PRIYANKA; *et al.* Comprehensive safety and toxicity analysis of 2,2'-Bipyridine derivatives in combating MRSA biofilm formation and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2025, 15, 1493679. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1493679>. Acesso em: 20 jul. 2025.

RAMÍREZ-CONTRERAS, D.; *et al.* L-Citrullinato-Bipyridine and L-Citrullinato-Phenanthroline Mixed Copper Complexes: Synthesis, Characterization and Potential Anticancer Activity. **Pharmaceutics**, 2024, 16(6), 747. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16060747>. Acesso em: 20 jul. 2025.

RATUSHNYI, A.; EZDAKOVA, M.; BURAVKOVA, L. Secretome of Senescent Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Negatively Regulates Angiogenesis. **Int. J. Mol. Sci.** 2020, 21, 1802. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32151085/>. Acesso em: 05 dez. 2024.

RAY, S.; *et al.* Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes, **J. Am. Chem. Soc.**, 2007, 129(48), 15042–15053. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17988129/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

REEDIJK, J. Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes, **Platinum Metals Review** 52 (2008). Disponível em: <https://technology.matthey.com/content/journals/10.1595/147106708X255987>. Acesso em: 26 nov. 2024.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**, 2017, 70, 97-101, 0890-6238. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27832950/>. Acesso em: 13 out. 2024.

RIBATTI, D. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane (CAM). A Multifaceted Experimental Model. **Mech. Dev.** 2016, 141, 70–77. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27178379/>. Acesso em: 13 out. 2024.

RIBEIRO, P.R.Q; OLIVEIRA, D.M. Reabilitação cardiovascular, doença arterial coronariana e infarto agudo do miocárdio: efeitos do exercício físico. **Rev Digital** [Internet]. v. 15, n. 152, p. 1, 2011. Disponível em: <https://www.efdeportes.com/efd152/reabilitacao-cardiovascular-efeitos-do-exercicio-fisico.htm>. Acesso em: 21 out. 2024.

RIBEIRO, A. L.; DUNCAN, B. B.; BRANT, L. C.; LOTUFO, P. A.; MILL, J. G.; BARRETO, S. M. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. **Circulation**, 133(4), 2016, 422–433. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008727>. Acesso em: 16 jun. 2025.

RIOS, R.R. Complexos de rutênio como agentes doadores de óxido nítrico: estudos de uma interface entre a química inorgânica e a biologia. 2022. Tese de Doutorado. **Universidade de**

São Paulo, Ribeirão Preto, 2022. Disponível em:

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60136/tde-25082023-141042/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

RIVERO, M.N., LENZE, M., IZAGUIRRE, M., DAMONTE, S.H.P., AGUILAR, A., WIKINSKI, S., GUTIÉRREZ, M.L., Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition, **Food and Chemical Toxicology**, Volume 153, 2021, 112229, ISSN 0278-6915. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112229>. Acesso em: 10 jun. 2025.

ROMANOFF, A.L. *The Avian Embryo: Structural and Functional Development*; **McMillan**: New York, NY, USA, 1960.

ROTH, G.; *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. **Journal of the American College of Cardiology**, 2020, 76, 2982 - 3021. Disponível em: <https://www.jacc.org/doi/10.1016/j.jacc.2020.11.010>. Acesso em: 27 dez. 2024.

ROTH, S.; *et al.* Comparative Toxicity and Cell-Tissue Distribution Study on Nanoparticulate Iron Complexes Using Avian Embryos and HepG2 Cells. **Transl. Res.** 2008, 151, 36–44. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18061126/>. Acesso em: 01 nov. 2024.

ROUS, P.; MURPHY, J.B. Tumor Implantations in the Developing Embryo. **J. Am. Med. Assoc.** 1911, 56, 741–742. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/436712>. Acesso em: 20 out. 2024.

ROVER, L.; *et al.* Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation, **Química Nova** 24 (2001) 112–119. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/4g5WY3HZZ6YSFhy5XmDKFTc/abstract/?lang=en>. Acesso em: 15 out. 2024.

RUSSELL, W.M. The three Rs: Past, present and future. **Anim. Welf.** 2005, 14, 279–286. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal-welfare/article/abs/three-rs-past-present-and-future/233FD6C54E82AE9E0F69EEC8F5EF1A44>. Acesso em: 16 out. 2024.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*; **Methuen & Co Ltd.**: London, UK, 1959. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>. Acesso em: 16 out. 2024.

SANTOS, A.L.S.; *et al.* Decoding the anti-Leishmania braziliensis activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its silver- and copper-based complexes: In vitro and in vivo approaches. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, Volume 6, 2022, 100093, ISSN 2772-4174. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100093>. Acesso em: 20 jul. 2025.

SAVA, G.; *et al.* Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex, **Clinical & Experimental Metastasis** 16 (1998) 371–379. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9626816/>. Acesso em: 18 out. 2024.

SAVINYKH, P.E.; *et al.* Synthesis, crystal structure and cytotoxic activity of 2,2'-bipyridine / 1,10-Phenanthroline based Copper(II) complexes with diphenylphosphinic acid. **Polyhedron**, Volume 261, 2024, 117141. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.poly.2024.117141>. Acesso em: 20 jul. 2025.

SCHMITT, F.; KASPARKOVA, J.; BRABEC, V.; BEGEMANN, G.; SCHOBERT, R.; BIRSACK, B. New (arene)ruthenium(II) complexes of 4-aryl-4H-naphthopyrans with anticancer and anti-vascular activities. **J Inorg Biochem.** 2018 Jul;184:69-78. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29684697/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

SHARMA, P.; *et al.*, Intermittent hypoxia regulates vasoactive molecules and alters insulin signaling in vascular endothelial cells. **Sci Rep.** v. 20, n. 8, p. 1. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30237409/>. Acesso em: 16 nov. 2024.

SHAHEEN, S.; SULTANA, S.; UDDIN, M.; MOHAMMAD, A. Principles of Toxicology: A Clinical Review. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science**, 8, 2018, 145-150. Disponível em: <https://doi.org/10.5958/2231-5659.2018.00026.7>. Acesso em: 10 jun. 2025.

SHIMOKAWA, H. 2014 Williams Harvey Lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities--from bench to bedside. **European Heart Journal**, [S.L.], v. 35, n. 45, p. 3180-3193, 29. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25354517/>. Acesso em: 16 nov. 2024.

SILVA, D.E.S.; *et al.* Cytotoxic and apoptotic effects of ternary silver(i) complexes bearing 2-formylpyridine thiosemicarbazones and 1,10-phenanthroline. **Dalton Trans.**, 2020 Apr 28;49(16):5264-5275. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d0dt00253d>. Acesso em: 20 jul. 2025.

SILVA, F.A.O.S. Estudo do efeito vascular de um novo complexo de rutênio em aorta de ratos. 2023. 74 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/76422>. Acesso em: 19 jun. 2025.

SILVEIRA, J.A.M. Caracterização farmacológica da atividade vasodilatadora de novos complexos de rutênio contendo derivados imidazólicos. 2019. 147 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/43337>. Acesso em: 16 jun. 2025.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, 2015, 71, 40-56. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25869516/>. Acesso em: 27 dez. 2024.

SLODOWNIK, D.; *et al.* The Human Skin/Chick Chorioallantoic Membrane Model Accurately Predicts the Potency of Cosmetic Allergens. **Exp. Dermatol.** 2009, 18, 409–413. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19054059/>. Acesso em: 30 out. 2024.

SMAIL, S.S. Ex Vivo Irritation Evaluation of a Novel Brimonidine Nanoemulsion Using the Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane (HET-CAM). *Cureus*. 2024 Aug 31;16(8):e68280. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39350816/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

SONJA, F.; NOLA, I.A. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Curr. Cardiol. Rev.* 2018, 14, 153–163. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29473518/>. Acesso em: 27 dez. 2024.

SPIELMANN, H.; LIEBSCH, M.; MOLDENHAUER, F.; HOLZHÜTTER, H. G.; BAGLEY, D. M.; LIPMAN, J. M.; PAPE, W. J.; MILTENBURGER, H.; DE SILVA, O.; HOFER, H.; STEILING, W. (1997). IRAG working group 2. CAM-based assays. Interagency Regulatory Alternatives Group. *Food and chemical toxicology* : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 35(1), 39–66. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9100814/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

SUNTHARALINGAM, K.; *et al.* Necroptosis-inducing rhenium(V) oxo complexes. *J Am Chem Soc.*, 2015 Mar 4;137(8):2967-74. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja511978y>. Acesso em: 20 jul. 2025.

TAY, S.L.M.; HENG, P.W.S.; CHAN, L.W. An Investigation of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model to Various Biological Tissues for Permeation Studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2011, 63, 1283–1289. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21899543/>. Acesso em: 29 nov. 2024.

TFOUNI, E.; *et al.* Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. *Nitric Oxide*. 2012 Jan 1;26(1):38-53. Epub 2011 Dec 7. PMID: 22178685. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22178685/>. Acesso em: 03 nov. 2024.

VALDES, T.I.; *et al.* Ex Ova Chick Chorioallantoic Membrane as a Novel in Vivo Model for Testing Biosensors. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003, 67, 215–223. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14517879/>. Acesso em: 28 out. 2024.

VARGAS, A.; *et al.* The Chick Embryo and Its Chorioallantoic Membrane (CAM) for the in Vivo Evaluation of Drug Delivery Systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 1162–1176. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17870202/>. Acesso em: 28 out. 2024.

VASILE SCĂEȚEANU, G.; *et al.* Synthesis, Structural Characterization, Antimicrobial Activity, and In Vitro Biocompatibility of New Unsaturated Carboxylate Complexes with 2,2'-Bipyridine. *Molecules*, 2018, 23(1), 157. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23010157>. Acesso em: 20 jul. 2025.

VIERA, L. M.A.L.; SILVA, R. S.; DA SILVA, C. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; BOAS, M. H. S. V. (2022). Comparison of the different protocols of the Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by evaluating the eye irritation potential of surfactants. *Toxicology in vitro* : an international journal published in association with BIBRA, 78, 105255. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34743969/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

VILLAFLORES, O.B.; *et al.* Anti-Angiogenic Activity of Gracilaria coronopifolia J.G. Agardh Extract by Lowering the Levels of Trace Metals (Iron, Zinc and Copper) in Duck Chorioallantoic Membrane and in Vitro Activation of AMP-Kinase. **Mol. Biol. Rep.** 2019, 46, 4151–4160. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31102149/>. Acesso em: 28 out. 2024.

WALUM, E. Acute oral toxicity.. **Environmental Health Perspectives**, 106, 1998, 497 - 503. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/EHP.98106497>. Acesso em: 10 jun. 2025.

WANG, Y.; LI, H.; SUN, H. Metalloproteomics for Unveiling the Mechanism of Action of Metallodrugs, **Inorg. Chem.**, 2019, 58(20), 13673–13685. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31298530/>. Acesso em: 07 nov. 2024.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, **Free Radical Biology & Medicine** 25 (1998) 434–456. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9741580/>. Acesso em: 07 nov. 2024.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Nitric oxide and cancer: an introduction, **Free Radical Biology & Medicine** 34 (2003) 951–954. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12684080/>. Acesso em: 07 nov. 2024.

WITT, A.; *et al.* Carcinogen-Induced Mitochondrial DNA Damage in the In Ovo Model. **Toxicol. In Vitro** 1998, 12, 329–333. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20654414/>. Acesso em: 28 out. 2024.

WONG, N.D.; *et al.* Atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment: An American Society for Preventive Cardiology clinical practice statement. **Am. J. Prev. Cardiol.** 2022, 10, 100335. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35342890/>. Acesso em: 11 nov. 2024.

XU, S.; *et al.* Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. **Pharmacological Reviews**, 2021, 73, 924 - 967. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34088867/>. Acesso em: 11 nov. 2024.

YADAV, T.; ROHANE, S. Acute Toxicity study of Synthesized drug and Herbal Product. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.52711/2231-5691.2021.00044>. Acesso em: 10 jun. 2025.

YANG, G.W.; *et al.* Photochemical property of a Ru(II) compound based on 3-(2-pyridyl)pyrazole and 2,2'-bipyridine for ablation of cancer cells. **New Journal of Chemistry**, 2018, 42, 5395-5402. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C7NJ05034H>. Acesso em: 20 jul. 2025.

YAO, X.; *et al.* Impact of Anchoring Groups on the Photocatalytic Performance of Iridium(III) Complexes and Their Toxicological Analysis. **Molecules**, 2024, 29(11), 2564. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules29112564>. Acesso em: 20 jul. 2025.

ZHANG, L.; *et al.* Emerging approaches in predictive toxicology. **Environ. Mol. Mutagen.**, 2014, 55, 679–688. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25044351/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

ANEXO A - DECLARAÇÃO DE ISENÇÃO DE SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE
MEDICAMENTOS – NPDM
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/ NPDM



DECLARAÇÃO DE ISENÇÃO DE SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

Eu, Maria Vivina Barros Monteiro, coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), após análise da proposta intitulada " **AValiação do Efeito Irritante de Complexos de Rutênio Utilizando o Ensaio da Membrana Cório-Alantoide (HET-CAM)**", esclarecemos que o referido projeto utiliza embriões de galinha no teste HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane) para a avaliação de efeitos tóxicos e terapêuticos.

De acordo com as diretrizes regulamentadas pelo CEUA para o uso de animais vertebrados em suas formas imaturas, destacamos que **não há necessidade de licenciamento por este comitê nos seguintes casos:**

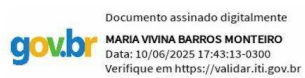
1. Projetos de pesquisa que utilizam mamíferos, pássaros e répteis em suas formas imaturas estão sujeitos à submissão ao CEUA apenas **a partir da metade do período de gestação ou incubação.**
2. No caso específico de **ovos embrionados de aves, não há necessidade de licenciamento pela CEUA se a inoculação e a morte dos embriões ocorrerem antes da metade do período de incubação.**

O projeto em questão realiza os experimentos no **9º dia de incubação**, período anterior ao 14º dia, caracterizando-se como uma fase embrionária imatura, ainda sem o completo desenvolvimento do sistema nervoso. Dessa forma, o experimento está isento da necessidade de submissão e aprovação por este comitê, conforme as normativas vigentes.

Ressaltamos que os procedimentos descritos no projeto, incluindo a eutanásia adequada dos embriões e o descarte seguro de resíduos, estão em conformidade com as boas práticas de pesquisa.

Diante do exposto, este comitê declara que o projeto está isento da obrigatoriedade de submissão ao CEUA.

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275. Contato: Email: [ceua-npdm@ufc.br](mailto:ceua-<u>npdm@ufc.br</u>) Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos - NPDM



Atenciosamente,

Fortaleza, 02 de Junho de 2024

Maria Vivina Barros Monteiro
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos – NPDM
Universidade Federal do Ceará