

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**SISTEMA DE GELEIFICAÇÃO *in situ* TERMORREVERSÍVEL
DE SUPERAGREGADOS DE ANFOTERICINA B PARA O
TRATAMENTO DA CERATITE AMEBIANA**

Maria Luiza Carneiro Büchele

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

BUCHELE, MARIA LUIZA
SISTEMA DE GELEIFICAÇÃO in situ TERMORREVERSÍVEL
DE SUPERAGREGADOS DE ANFOTERICINA B PARA O
TRATAMENTO DA CERATITE AMEBIANA / MARIA LUIZA
BUCHELE ; orientadora, Karin Silva Caumo,
coorientadora, Fabiola Branco Filippin Monteiro,
2017.

119 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Acanthamoeba spp. 3. Ceratite
amebiana. 4. Anfotericina B pré-aquecida. 5.
Sistema de geleificação in situ. I. Caumo, Karin
Silva. II. Monteiro, Fabiola Branco Filippin . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

**“SISTEMA DE GELEIFICAÇÃO in situ
TERMORREVERSÍVEL DE SUPERAGREGADOS
DE ANFOTERICINA B PARA O TRATAMENTO
DA CERATITE AMEBIANA”**

POR

Maria Luiza Carneiro Buchele

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creckzynski Pasa (UFSC – Membro Titular)

Prof(a). Dr(a). Marilise Brittes Rott (UFRGS – Membro Titular) videoconferência



Prof(a). Dr(a). Thiago Caon (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Karim Silva Caumo (UFSC – Orientador(a))

Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creckzynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 29 de setembro de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**SISTEMA DE GELEIFICAÇÃO *in situ* TERMORREVERSÍVEL
DE SUPERAGREGADOS DE ANFOTERICINA B PARA O
TRATAMENTO DA
CERATITE AMEBIANA**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Karin Silva
Caumo

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª Fabíola
Branco Filippin Monteiro

Florianópolis
2017

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e ao Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago pela oportunidade de realizar minha pesquisa e por terem sido uma segunda casa desde o ingresso no ensino superior. Em meu coração, serei para sempre UFSC.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro para realização deste trabalho (chamada n°14/2014).

À minha orientadora, Dr^a Karin Silva Caumo, pela confiança e apoio durante a jornada na pós-graduação. Agradeço por todos os ensinamentos e aprendizado científico, sempre representará uma inspiração, uma fonte de determinação e estímulo inesgotáveis.

À minha co-orientadora Dr^a Fabíola Branco Filippin Monteiro pelos momentos de auxílio e apoio. Sua parceira foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho;

À professora Dr^a Liliete Canes de Souza por dividir comigo seu conhecimento sobre a Anfotericina B.

Ao professor Dr^o Marcos José Machado pelas nossas tardes em estatística.

Aos colegas do laboratório LAPEO, em especial a Carolina Camargo, Débora Wopereis, Fabiana Casara, Thaís Castro e Paula Monteiro. Que alegria trabalhar com vocês todos os dias! Obrigada pela amizade, acolhimento, experimentos e cafés compartilhados.

Ao laboratório GEIMM, por sempre estar com as portas abertas para me receber, em especial a Bárbara de Lima – a minha colega “anfoterinete”, minha parceira nos estudos com Anfotericina B e ao Jelver Aexander Sierra Restrepo e Alex Evangelista do Amaral por todo o auxílio e ensinamentos.

À minha amiga – irmã Juliana Destro, que mesmo longe, esteve presente em cada etapa da vida me auxiliando e acolhendo quando necessário.

Em especial aos meus pais, Terezinha e Frederico pelo amor e apoio incondicional. Vocês são parte fundamental de todas as minhas

conquistas, meu porto seguro, exemplo e inspiração para tudo o que eu viver.

Aos meus irmãos, Maria Amália e Carlos. A ela, por ser minha melhor amiga, minha segunda mãe e a ele por ser sempre meu parceiro e a razão pela qual eu escolhi minha profissão.

A minha tia avó Selma, que nem imagina ser a fonte de inspiração que é.

Ao Leonardo, meu esposo pelo seu amor, apoio e paciência durante esses dois anos de estudo; e a nossa filha Alice, nascida no meio da construção dessa dissertação.

A todos que de alguma forma me ajudaram a construir este trabalho: muito obrigada!

*Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para
atravessar o rio da vida - ninguém, exceto tu, só tu.
Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semideuses que se
oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa;
tu te hipotecarias e te perderias.
Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar.
Onde leva? Não perguntes, segue-o!*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Acanthamoeba spp. são patógenos responsáveis por casos de ceratite amebiana (CA), uma inflamação grave da córnea. A anfotericina B – desoxicolato (ABDOC) é utilizada no tratamento de ceratites infecciosas, levando a morte celular pela alteração da permeabilidade de membrana de microrganismos. Problemas são relacionados ao uso tópico ocular da anfotericina B, como blefarites, irites e instilação dolorosa. O pré-aquecimento de ABDOC diminui a citotoxicidade do fármaco pela formação de superagregados (hABDOC). A eficácia do tratamento da CA depende em grande parte, da capacidade do fármaco em alcançar o tecido alvo escapando das barreiras protetivas do olho. Neste contexto, os sistemas de geleificação *in situ* termorreversível consistem em uma opção promissora para a liberação tópica ocular, devido à biocompatibilidade, baixa toxicidade e alto tempo de residência na superfície ocular. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação tópica ocular de hABDOC a partir da preparação de um sistema de geleificação *in situ* para o tratamento da CA. Após o aquecimento a 70°C por 20min, hABDOC foi incorporada a um sistema de geleificação termorreversível. A atividade amebicida de ABDOC e hABDOC foi avaliada frente a trofozoítos e cistos de *A. castellanii* (ATCC 50492) e um isolado clínico regional de Florianópolis (IC01). As alterações celulares em *Acanthamoeba* spp. foram monitoradas usando um microscópio invertido durante 48 e 96h e a contagem celular realizada na câmara de Fuchs-Rosenthal. Os resultados mostraram efeito amebicida de ABDOC e hABDOC sob trofozoítos e cistos. O pré-aquecimento de ABDOC não alterou a ação farmacológica do fármaco. Para a avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos, células de veia umbilical humana (HUVEC) foram desafiadas com ABDOC e hABDOC por 48h. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de rezasurina e a hABDOC não apresentou citotoxicidade para a linhagem HUVEC. Desta forma, a ABDOC pré-aquecida associada a um sistema de geleificação *in situ* termorreversível demonstra ser um sistema de promissor para a administração tópica ocular da hABDOC para a terapêutica da CA.

Palavras-chave: *Acanthamoeba* spp. Ceratite amebiana. Anfotericina B pré-aquecida. Superagregados. Sistema de geleificação *in situ*.

ABSTRACT

Acanthamoeba spp. are pathogens that causes amoebic keratitis (A serious inflammation of the cornea. Amphotericin B - deoxyol (ABDOC) is used in the treatment of infectious keratitis, leading to cell death by altering the membrane permeability of microorganisms. Problems are related to its topical ocular use such as blepharitis, iritis and painful instillation. Pre-heating of ABDOC decreases its cytotoxicity by the formation of superaggregates (hABDOC). The efficacy of AC treatment depends to a large extent on the ability of the drug to reach the target tissue by escaping the protective barriers of the eye. In this context, thermoreversible *in situ* gelation systems are a promising option for topical ocular release due to their biocompatibility, low toxicity and high residence time on the ocular surface. The objective of this study was to develop a topical ocular topical formulation of hABDOC from the preparation of an *in situ* gelation system for the treatment of AK. After heating at 70°C for 20 min, hABDOC was incorporated into a thermoreversible gelling system. The amebicidal activity of ABDOC and hABDOC was evaluated against trophozoites and cysts of *A. castellanii* (ATCC 50492) and a regional clinical isolate from Florianópolis (IC01). Cellular alterations in *Acanthamoeba* spp.. were monitored using an inverted microscope for 48 and 96 hours and the cell count performed in the Fuchs-Rosenthal chamber. The results showed amebicidal effect of ABDOC and hABDOC under trophozoites and cysts. The pre-heating of ABDOC did not alter the pharmacological action of the drug. For assessment of cytotoxicity in mammalian cells, human umbilical vein (HUVEC) cells were challenged with ABDOC and hABDOC for 48h. Cell viability was assessed by the rezasurin test and hABDOC did not show cytotoxicity against HUVEC. Thus, pre-heated ABDOC associated with a thermoreversible *in situ* gelation system proves to be a promising system for topical ocular topical administration of hABDOC for CA therapy.

Keywords: *Acanthamoeba* spp. Amoebic keratitis. Preheated Amphotericin B. Superaggregated. *in situ* gelation system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.	23
Figura 2 – Caso de ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	27
Figura 3 – Patogênese de <i>Acanthamoeba</i> spp.	29
Figura 4 – Representação esquemática das camadas da córnea.....	31
Figura 5 – Estrutura do bloco de copolímeros – PEO e PPO.....	33
Figura 6 – Representação esquemática da formação micelar em consequência do aumento na temperatura.....	34
Figura 7 – Estrutura molecular da Anfotericina B.....	35
Figura 8 – Representação esquemática das alíquotas de ABDOC e hABDOC mantidas sob diferentes condições de temperatura.....	43
Figura 9 – Aspecto macroscópico da formulação ABDOC antes do aquecimento (A) ABDOC e após o aquecimento (B) hABDOC.....	49
Figura 10 – Distribuição do tamanho das partículas por DLS antes e após o seu aquecimento.....	50
Figura 11 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formulações de ABDOC e hABDOC.....	51
Figura 12 – Diâmetro médio das partículas de ABDOC e hABDOC avaliados durante o período de 90 dias.....	54
Figura 13 – Viabilidade de trofozoítos de <i>A. castellanii</i> (A) e IC01 (B) frente às formulações ABDOC e hABDOC após 48h de tratamento.....	58
Figura 14 – Viabilidade de trofozoítos de <i>A. castellanii</i> (A) e IC01 (B) frente às formulações ABDOC e hABDOC após 96h de tratamento.....	59
Figura 15 – Viabilidade de cistos de <i>A. castellanii</i> (A) e IC01 (B) frente às formulações ABDOC e hABDOC após 48h de tratamento.....	61
Figura 16 – Viabilidade de cistos de <i>A. castellanii</i> (A) e IC01 (B) frente às formulações de ABDOC e hABDOC após 96h de tratamento.....	62
Figura 17 – Formas morfológicas de <i>Acanthamoeba castellanii</i> (ATCC 50492) após 48h de incubação frente à formulação geleificante com hABDOC na concentração de 0,15%.....	65

Figura 18 – Representação do comportamento amebiano de <i>A. castellanii</i> (ATCC 50492) após 7 dias de incubação.....	67
Figura 19 – Viabilidade de células HUVEC frente à ABDOC e hABDOC após 48h de tratamento.....	68
Figura 20 - Representação esquemática da morfologia das células HUVEC após 48h de tratamento com ABDOC (B, C, D, E), hABDOC (F, G, H, I), CLX (J) e PHMB (K). Aumento de 100x.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Determinação da temperatura de geleificação dos polímeros.....	56
Quadro 2 – Determinação da temperatura de geleificação após a incorporação de AB a 0,15%.....	56
Quadro 3 – Determinação da temperatura de geleificação após a incorporação de AB a 0,3%.....	57
Quadro 4 – Determinação da temperatura de geleificação após a incorporação de AB a 0,5%.....	57
Quadro 5 - Valores de área sob a curva da citotoxicidade induzida por ABDOC e hABDOC em células HUVEC.....	70
Quadro 6 – Valores de índice de seletividade da citotoxicidade induzida por ABDOC e hABDOC em células HUVEC.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Solubilidade da anfotericina B.....	36
Tabela 2 – Tamanho médio (Z-average) das partículas das formulações de ABDOC e hABDOC.....	53
Tabela 3 – Índices de polidispersão (PDI) das partículas das formulações de ABDOC e hABDOC.....	55
Tabela 4 – Valores de área sob a curva da citotoxicidade induzida por ABDOC e hABDOC em trofozoítos de <i>A. castellanii</i> e Isolado Regional IC01.....	60
Tabela 5 - Valores de área sob a curva da citotoxicidade induzida por ABDOC e hABDOC em cistos de <i>A. castellanii</i> e Isolado Regional IC01.....	64
Tabela 6 - Crescimento amebiano nas formulações avaliadas 48h após a sua inoculação em cultivo monoxênico.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB Anfotericina B
- ABDOC Anfotericina B desoxicolato de sódio
- AVL Amebas de Vida Livre
- ATCC Coleção de Cultura do Tipo Americana (*American type culture collection*)
- CA Ceratite Amebiana
- CLX Digluconato de clorexidina
- DLS Espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic light scattering*)
- DOC Desoxicolato de sódio
- EAG Encefalite Amebiana Granulomatosa
- hABDOC Anfotericina B desoxicolato de sódio pré-aquecida
- HUVEC Células endoteliais de veia umbilical humana (*Human umbilical vein endothelial cells*)
- LAPEO Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas
- PHMB Polihexametileno biguanida
- PLM Proteína de Ligação a Manose
- PYG Proteose peptona, extrato de levedura e glicose (*Proteose Peptone, yeast extract, glucose*)
- RPMI Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
- SBF Soro bovino fetal
- STF Fluído lacrimal simulado (*Simulated tear fluid*)
- SUS Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.3	O gênero <i>Acanthamoeba</i>	21
2.2.	Aspectos morfológicos e ciclo de vida	21
2.3	Ceratites infecciosas	23
2.4	Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	24
2.5	Patogênese da ceratite amebiana.....	28
2.6	Tratamentos da ceratite amebiana.....	29
2.7	A córnea e administração tópica ocular de fármacos.....	30
2.8	Formulações poliméricas <i>in situ</i> para administração ocular de fármacos	31
2.9	Anfotericina B	34
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivo geral.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Formulação de AB	41
4.1.1	Preparação da formulação de Anfotericina B.....	41
4.1.2	Obtenção dos superagregados de ABDOC.....	41
4.2	Determinação do tamanho de partícula	41
4.3	Estudo de estabilidade física de superagregados	42
4.4	Microscopia eletrônica de transmissão	43
4.5	Preparação do gel termorreversível.....	44
4.5.1	Incorporação da AB no gel termorreversível.....	44
4.6	Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B	45
4.6.1	Cultura e obtenção de parasitos	45
4.6.2	Avaliação da atividade da AB frente à trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	45
4.6.3	Avaliação da atividade de AB frente a cistos de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	46

4.7	Avaliação do comportamento amebiano frente à formulação geleificante.....	46
4.8	Avaliação da citotoxicidade frente a células endoteliais..	47
4.9	Cálculo do índice de seletividade.....	48
4.10	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Preparação da formulação pré-aquecida de ABDOC e obtenção de superagregados.....	49
5.1.1	Análise do tamanho de partícula.....	49
5.2	Análise morfológica dos superagregados de hABDOC por MET	50
5.3	Estudo da estabilidade física dos superagregados	51
5.4	Preparação do sistema de geleificação <i>in situ</i> termorreversível e determinação da temperatura de geleificação	56
5.5	Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B	57
5.5.1	Avaliação da atividade contra trofozoítos.....	57
5.5.2	Avaliação da atividade cisticida	60
5.3	Avaliação do comportamento amebiano frente à formulação geleificante.....	64
5.4	Avaliação da citotoxicidade frente a células endoteliais..	68
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÕES.....	85
8	PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	APENDICE A	117

1. INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre (AVL) pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* estão distribuídas mundialmente e habitam uma ampla variedade de nichos ambientais. Dentre as infecções acantamebianas, a ceratite amebiana (CA) é a infecção mais frequente, com crescente incidência, atingindo principalmente usuários de lentes de contato (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; LORENZO-MORALES, KHAN e WALOCHNIK, 2015; OMAÑA-MOLINA *et al.*, 2016). A CA é cada vez mais reconhecida como a causa de infecção ocular grave em todo o mundo, e quando diagnosticada tardiamente, elevam-se as taxas de complicações clínico-terapêuticas (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; LORENZO-MORALES, KHAN e WALOCHNIK, 2015; MAYCOCK e JAYASWAL, 2016).

Os tratamentos utilizados são inespecíficos e baseiam-se no uso de múltiplos fármacos, o que leva muitos indivíduos a recidiva da infecção. Dentre os fármacos recomendados estão o polihexametileno biguanida (PHMB), gluconato de clorexidina, diamidinas, isotionato de propamidina (Brolene®) e hexamidina (Desomedine®). Ainda podem ser utilizados antifúngicos como miconazol, fluconazol, cetoconazol e voriconazol (LORENZO-MORALES *et al.*, 2010; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; LORENZO-MORALES, KHAN E WALOCHNIK, 2015; MAYCOCK e JAYASWAL, 2016).

Atualmente são utilizadas formulações oftálmicas que visam a inativação dos cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., mas a maioria delas tem atividade antitrofozoítos, e são pouco efetivos contra os cistos, que podem levar a recorrência da infecção e prolongamento do tratamento (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004a; DART, SAW e KILVINGTON, 2009; SAEED *et al.*, 2009). A maioria dos casos de CA evolui para o transplante de córnea, porém mesmo após o transplante pode-se observar a permanência de cistos no tecido ocular e reaparecimento dos sintomas (DART, SAW e KILVINGTON, 2009; SAEED *et al.*, 2009).

Considera-se neste estudo, a proposição de diminuição da toxicidade da Anfotericina B através do seu aquecimento, adaptando-a para a administração ocular em um sistema polimérico de geleificação

in situ, a fim de aumentar a sua disponibilidade e tempo de retenção ocular. A anfotericina B é um antifúngico poliênico de amplo espectro de ação.

O estudo condiz com a necessidade de desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo Anfotericina B para administração ocular, que sejam eficazes, aumentem a disponibilidade do fármaco e que apresentem efeitos adversos mínimos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.3 O gênero *Acanthamoeba*

Amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* são protozoários amplamente distribuídos no ambiente e têm sido isoladas de uma grande variedade de habitats, como águas doces e salgadas, lagos, rios, córregos, como também são comumente encontradas em piscinas, água de torneira e engarrafada, estações de “lava-olhos”, unidades dentárias, máquinas de diálise e sistemas de ar-condicionado (CAUMO *et al.*, 2009; ALKHARASHI *et al.*, 2015; CHOMICZ *et al.*, 2015; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

Acantamoebas são consideradas organismos anfitriões, pois apesar de existirem naturalmente enquanto organismos livres, também são capazes de causar infecções em hospedeiros mamíferos causando danos (TAWFEEK *et al.*, 2016). Espécies de *Acanthamoeba* são agentes causadores de infecções oportunistas graves em indivíduos imunocomprometidos e imunodeprimidos, como a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), lesões cutâneas, nasofaríngea, infecção pulmonar e renal (DUARTE *et al.*, 2006; VISVESVARA *et al.*, 2007; TRABELSI *et al.*, 2012; ZAMORA *et al.*, 2014; MORRISON *et al.*, 2016; EL SAHLY *et al.*, 2017; ONG *et al.*, 2017).

Elas também são capazes de causar a ceratite amebiana, uma infecção ocular não-opportunista, que atinge principalmente usuários de lentes de contato (LC) (Stehr-Green *et al.*, 1987; Mubareka *et al.*, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007; Grün *et al.*, 2014; Siddiqui *et al.*, 2014).

2.2. Aspectos morfológicos e ciclo de vida

Acanthamoeba spp. apresentam-se sob duas formas quanto ao ciclo de vida (figura 1): a de trofozoíto, a forma metabolicamente ativa, capaz de dividir-se, alimentar-se e invadir células do hospedeiro, e a de cisto, forma de resistência em condições ambientais adversas (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013).

Os trofozoítos apresentam projeções aciculiformes da membrana celular, estruturas denominadas de acantopódios (finos pseudópodes), exclusivas do gênero e importantes para a alimentação e movimento celular (BOWERS e KORN, 1968; SIDDIQUI e KHAN, 2012a). Observa-se no citoplasma a presença de um vacúolo grande e

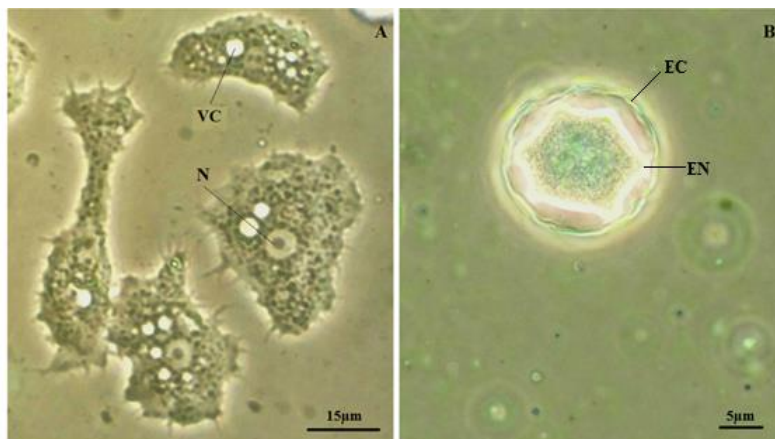
contrátil, responsável pela regulação osmótica da célula e vacúolos pequenos responsáveis pela digestão celular (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013). Sua reprodução é assexuada, ocorrendo por fissão binária (ALKHARASHI *et al.*, 2015). São formas com tamanho de 20 a 40 µm de diâmetro, variando significativamente entre isolados pertencentes a diferentes espécies/genótipos (CAUMO *et al.*, 2009; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013).

Os cistos apresentam parede externa dupla, constituída de endocisto e ectocisto. O encistamento permite a resistência da ameba frente a condições adversas, tais como: falta de nutrientes, temperaturas extremas, mudanças no pH, exposição a agentes biocidas, radiação ultravioleta e desinfetantes (LLOYD, 2014; ALKHARASHI *et al.*, 2015). Os cistos são tão resistentes que podem sobreviver no meio externo por mais de 50 anos (LLOYD, 2014).

Alguns estudos descreveram a composição da parede dos cistos de *Acanthamoeba* spp. (BOWERS e KORN, 1968; 1969; CHÁVEZ-MUNGUÍA *et al.*, 2005; FOUQUE *et al.*, 2012; LLOYD, 2014). A celulose é caracterizada como o principal constituinte da parede cística, dificultando a permeabilidade de agentes externos como antissépticos e desinfetantes. Além da glicose, a galactose também já foi descrita como componente importante das paredes do cisto de *Acanthamoeba* spp. (DUDLEY *et al.*, 2009).

O conteúdo lipídico da estrutura da parede do cisto e membrana do trofozoíto de *Acanthamoeba* spp., apresenta ergosterol e 7-dehidrostigmasterol, compreendendo aproximadamente 15% dos lipídios totais do protozoário (SMITH e KORN, 1968; BOWERS e KORN, 1969). Em *Acanthamoeba* spp., esses são considerados os principais lipídios de membrana, tanto de isolados não patogênicos quanto patogênicos (LLOYD, 2014). Tornam-se, portanto, interessantes alvos de investigação farmacológica, uma vez que tanto trofozoítos quanto cistos apresentam ergosterol em suas membranas (MARTÍN-NAVARRO *et al.*, 2013).

Figura 1 – Formas de vida de *Acanthamoeba* spp.



(A) Trofozoítio e (B) cisto: N: núcleo; VC: vacúolo contrátil; EC: ectocisto; EN: endocisto. Microscópio de contraste de fase (1000X). Fonte: – Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO/UFSC).

2.3 Ceratites infecciosas

As ceratites infecciosas consistem na principal causa de perda de visão evitável no mundo, sendo decorrente da invasão e proliferação de microrganismos na córnea, gerando reação inflamatória e consequente destruição tecidual (DUARTE, 2016). Muitos microrganismos podem causar úlceras de córnea, como bactérias, fungos, protozoários e vírus (MARUJO *et al.*, 2013).

Países em desenvolvimento apresentam maior incidência de casos de ceratites infecciosas do que países desenvolvidos. Em países em desenvolvimento, trauma ocular tem sido responsável pela maioria dos casos, enquanto que em países desenvolvidos, um dos principais fatores de risco é uso de lentes de contato (DUARTE, 2016). Adicionalmente, em países em desenvolvimento muitos são os casos de úlceras de córnea não adequadamente tratados, isto devido à falta de medicamentos necessários, de equipamentos para a realização de

exames e cirurgias, como também de profissionais com treinamento adequado (CAO *et al.*, 2014).

As ceratites infecciosas são consideradas problema de saúde pública, consistindo na segunda maior causa de cegueira, atrás apenas de casos de catarata. A morbidade associada a quadros de infecções de córnea são relacionadas à dificuldade de diagnóstico e seguimento de tratamento adequado ao agente etiológico (SOBRAL, 2013). Os casos de ceratites infecciosas representam as principais indicações para transplantes de córnea na comunidade médica e são consideradas como emergências oculares, pois apresentam rápida progressão, com ameaça de baixa visual e potencial para perfuração (SOBRAL, 2013; CURRY, 2015).

O custo em saúde pública associado a casos de procedimentos médicos relacionados a doença de córnea é enorme; nos Estados Unidos são realizadas cerca de 1 milhão de visitas médicas anuais, gerando um valor de \$175 milhões de dólares ao sistema de saúde pública (COPE *et al.*, 2015). No Brasil, no primeiro semestre de 2017, constam 3.307 internações médicas, gerando o valor de R\$ 5.567.502,15 reais no sistema único de saúde (SUS). Na região sul, para o mesmo período, totalizaram-se 926 internações e R\$ 1.363.501,11 reais (DATASUS, 2017).

2.4 Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

A ceratite amebiana (CA) é uma infecção grave da córnea, causada por diversas espécies do gênero *Acanthamoeba* (LORENZO-MORALES *et al.*, 2015). Caracteriza-se pela perda gradual da visão, chegando em alguns casos a provocar cegueira (VISVESVARA *et al.*, 2007; VISVESVARA, 2013). Observa-se um aumento anual do número de casos no mundo todo, principalmente em usuários de lentes de contato, abrangendo aproximadamente 80 a 93% dos casos (NIYADURUPOLA e ILLINGWORTH, 2006; ALKHARASHI *et al.*, 2015; LAKHUNDI *et al.*, 2016). Também ocorrem casos relacionados a traumatismos oculares (10 a 15%), associados à exposição a água ou solo contaminados, frequentemente em trabalhadores rurais, como também após cirurgias oculares (ILLINGWORTH e COOK, 1998; CARVALHO *et al.*, 2009; PACELLA *et al.*, 2013).

O número de casos de CA diagnosticados aumentou durante os últimos anos, acompanhando o crescente número de usuários de lentes de contato. Somente nos Estados Unidos são mais de 40 milhões de usuários de lentes de contato (COPE *et al.*, 2015). A incidência anual de CA é estimada entre 1 a 10 casos por milhão de habitante em países desenvolvidos (PAGE e MATHERS, 2013; WALOCHNIK *et al.*, 2015). O principal fator de risco está associado a más condições de higiene e manuseio das lentes e estojo de lentes de contato.

Estudos têm demonstrado um aumento significativo do número de pacientes com ceratite amebiana nos Estados Unidos, Áustria, Inglaterra, Austrália, Itália, Nova Zelândia, Iran e Brasil (CARVALHO *et al.*, 2009; KU *et al.*, 2009; VERANI *et al.*, 2009; LASJERDI *et al.*, 2011; NIYYATI e REZAEIAN, 2015; WALOCHNIK *et al.*, 2015; CARNT e STAPLETON, 2016). No Brasil, os dados epidemiológicos são escassos, porém alguns relatos de casos e levantamentos de dados em centros de oftalmologia têm sido publicados (KASHIWABUCHI *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2009; CARIELLO *et al.*, 2011; MARUJO *et al.*, 2013)

O estudo conduzido por Carvalho e colaboradores (2009) sobre a investigação de casos de CA em um centro de oftalmologia em São Paulo durante duas décadas, relata um aumento não linear do número de casos ao longo dos anos. Do total de 581 pacientes investigados, 32% tiveram diagnóstico confirmado para CA, e destes, 82% eram usuários de lentes de contato. Sacramento e colaboradores (2005), ao observarem os fatores epidemiológicos associados a casos de ceratite infecciosas em serviço universitário do Setor de Doenças externas oculares e córnea (UNIFESP-EPM 2001 – 2002), relata verificar casos frequentes de ceratite amebiana, com positividade de 6% dos pacientes investigados. A maioria dos casos positivos para *Acanthamoeba* spp. foram associados ao uso de lentes de contato.

Estudos demonstram que o uso de lentes de contato aumenta o risco para infecção por *Acanthamoeba* spp., devido a possibilidade de trofozoítos e cistos aderirem ao material que compõe as lentes (MOORE *et al.*, 1987; STEHR-GREEN *et al.*, 1987; IBRAHIM *et al.*, 2009; STAPLETON e CARNT, 2012; COPE *et al.*, 2015; COPE *et al.*, 2016). O manuseio incorreto das lentes de contato e dos produtos envolvidos em sua manutenção podem favorecer a colonização e sobrevivência de microrganismos patogênicos, servindo como fonte de diversos

microrganismos oportunistas, como bactérias, fungos, protozoários e vírus (THAKUR e GAIKWAD, 2014; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015). O uso incorreto de lentes de contato também pode afetar a integridade do epitélio da córnea através de pequenas abrasões causadas no olho pelo uso prolongado e por afetar as atividades celulares metabólicas (LINDSAY *et al.*, 2007).

Inicialmente, o diagnóstico da CA baseia-se na avaliação dos sintomas relatados pelo paciente, histórico e exame biomicroscópico. No entanto, os sinais clínicos não são patognômicos para a CA, e em muitos casos ocorre a identificação incorreta do agente etiológico, principalmente com ceratite causada por herpes vírus e fungos (CLAERHOUT *et al.*, 2004; ANANE *et al.*, 2008; KOVACEVIĆ *et al.*, 2008; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

Devido às dificuldades no diagnóstico clínico e laboratorial da CA, atualmente ainda ocorrem muitas subnotificações, principalmente pelo desconhecimento do agente etiológico e poucos laboratórios especializados para o diagnóstico específico. A maioria dos casos de CA quando diagnosticados tardiamente, leva ao aumento de complicações clínico-terapêuticas, que podem acarretar a necessidade de transplante de córnea e perda incapacitante da acuidade visual (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

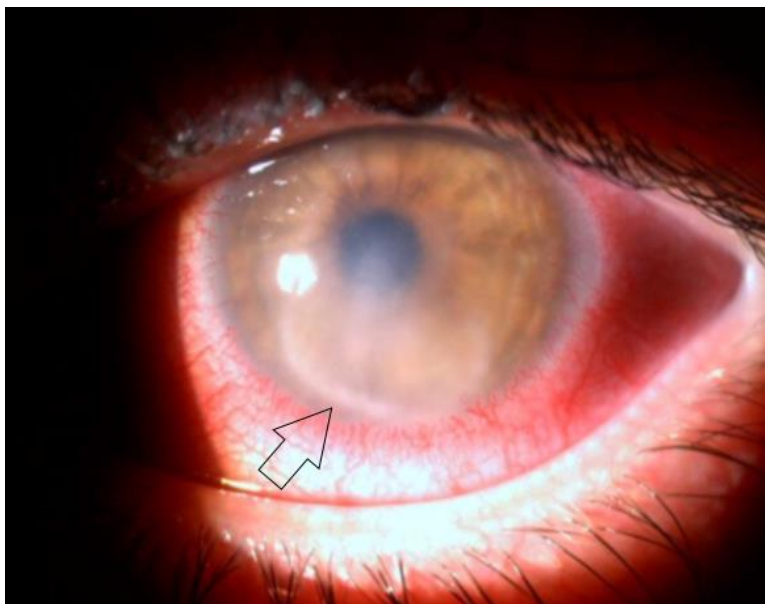
Tipicamente, apenas um dos olhos é envolvido na infecção, mas há relatos de ceratite bilateral (VISVESVARA *et al.*, 2007; ROBAEI *et al.*, 2014). Ainda, diversos trabalhos têm relatado casos de coinfeção ocular de *Acanthamoeba* spp. com *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Fusarium* spp. e herpes simplex vírus (DINI *et al.*, 2000; GUPTA *et al.*, 2011; WANACHIWANAWIN *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2013; HONG *et al.*, 2014).

A ceratite amebiana é uma doença progressiva e dolorosa. Clinicamente os sintomas estão ligados à invasão e a degradação dos componentes da córnea, resultando em vermelhidão, lacrimejamento, fotofobia, opacidade e edema nas pálpebras (DART *et al.*, 2009; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015). A dor relatada na ceratite amebiana, provocada por ceratoneurite radial, geralmente é muito intensa, não proporcionalmente relacionada com o quadro clínico visual e ocorre pelo contato de amebas com as células nervosas no estroma da córnea (CLARKE e NIEDERKORN, 2006b; WANG *et al.*, 2014).

Inicialmente as amebas são restritas ao epitélio da córnea, com erosões epiteliais puntiformes e tardiamente invadem o estroma, causando danos, opacidade e inflamação, provocados pela presença de neutrófilos, gerando um infiltrado em forma de anel, que é típico da ceratite amebiana, conforme apresentado na figura 2 (CLARKE e NIEDERKORN, 2006a; PATEL e MCGHEE, 2009; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015; MAYCOCK e JAYASWAL, 2016).

Além da formação do abscesso anelar, poderão ocorrer esclerite, glaucoma, catarata, perfuração da córnea e infecções microbianas secundárias (LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; NATH *et al.*, 2013).

Figura 2 – Caso de ceratite por *Acanthamoeba* spp.



Presença de infiltrado neutrofílico indicado pela seta. Diagnóstico laboratorial realizado por cultivo e isolamento de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp., a partir do raspado da córnea do paciente no Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Fonte: LAPEO/UFSC.

2.5 Patogênese da ceratite amebiana

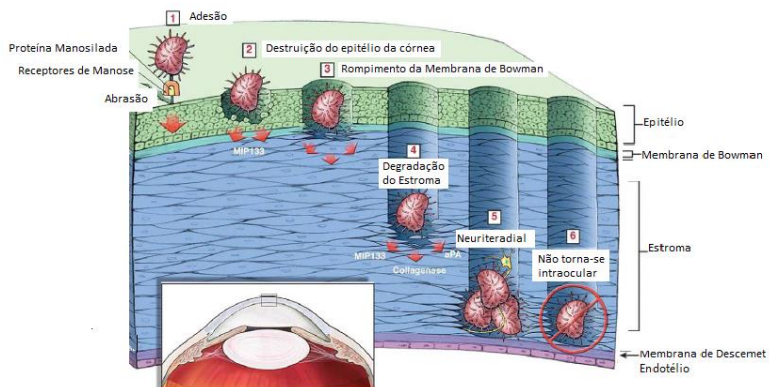
Nos últimos anos foram feitos progressos significativos para a compreensão do mecanismo pelo qual a *Acanthamoeba* spp. aderem-se às células do hospedeiro, sendo este o passo fundamental na patogênese da infecção (PATEL e MCGHEE, 2009; WINCK *et al.*, 2011; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015; MAYCOCK e JAYASWAL, 2016). Faz-se necessária a adesão do trofozoíto com a superfície do epitélio da córnea, através de proteínas de adesão, mediadas por um sistema de reconhecimento de carboidratos (PANJWANI, 2010; ALKHARASHI *et al.*, 2015; NEELAM e NIEDERKORN, 2017).

A principal proteína responsável pela adesão dos trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. ao epitélio da córnea é a proteína de ligação aos receptores de manose (PLM) (PANJWANI, 2010; ALKHARASHI *et al.*, 2015). Após a adesão, *Acanthamoeba* spp. produzem serino, cisteíno e metaloproteases, que possuem a capacidade de degradar diversos substratos proteicos (imunoglobulinas, interleucinas, elastina, fibronectina, colágeno tipo I e IV) (OMAHÑA-MOLINA *et al.*, 2016).

A serino-protease MIP-133 produzida induz a apoptose em células do epitélio da córnea, facilitando a penetração do trofozoíto no estroma corneano e a degradação da matriz de colágeno que compõe a camada intermediária da córnea conforme apresentado na figura 3 (NEELAM e NIEDERKORN, 2017). Os trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. também produzem outras proteínas facilitadoras na invasão dos tecidos e a evasão da resposta imune do hospedeiro (CHÁVEZ-MUNGUÍA *et al.*, 2016; OMAÑA-MOLINA *et al.*, 2016).

As enzimas produzidas pela ameba após a adesão trabalham em conjunto para produzir um efeito citopático envolvendo o aumento da concentração de Ca^{++} , mudanças na estrutura do citoesqueleto e morfologia celular, ocasionando aumento na permeabilidade da membrana celular, degradação da matriz extracelular e a morte da célula por apoptose (CASTRILLÓN e OROZCO, 2013). *Acanthamoeba* spp. também exercem a sua ação patogênica através do bloqueio de genes importantes para o processo de divisão celular, induzindo a morte celular e impedindo a regeneração do tecido (CASTRILLÓN e OROZCO, 2013).

Figura 3 – Patogênese de *Acanthamoeba* spp.



Adesão de *Acanthamoeba* spp. à superfície tecidual através da expressão de receptores de Manose e a produção de enzimas hidrolíticas que degradam a matriz extracelular, levando a morte celular.

Fonte: Adaptado de Clarke e Niederkorn (2006b).

2.6 Tratamentos da ceratite amebiana

Os tratamentos utilizados para ceratite amebiana são inespecíficos, baseados no uso de antimicrobianos, e na maioria das vezes realiza-se a combinação de fármacos (LORENZO-MORALES *et al.*, 2010; ROBERTS e HENRIQUEZ, 2010). A maioria dos fármacos utilizados têm ação sobre os trofozoítos, mas são pouco efetivos sobre os cistos, ocasionando a recidiva das infecções na maioria dos casos (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004a; b; LORENZO-MORALES *et al.*, 2013; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015; MAYCOCK e JAYASWAL, 2016).

Dentre os fármacos recomendados estão o polihexametileno biguanida (PHMB), digluconato de clorexidina (CLX), isotionato de propamidina (Brolene®) e hexamidina (Desomedine®). Ainda podem ser utilizados antifúngicos como neomicina, clotrimazol, itraconazol (TRABELSI *et al.*, 2012). Em casos de infecção bacteriana associada, pode-se ainda utilizar cloranfenicol (CARLESSO, 2014). O tratamento

da infecção ocular é difícil e de longo prazo. Os fármacos de aplicação tópica são utilizados por dias, a cada hora (NAKAMINAMI *et al.*, 2017). Posteriormente, o número de aplicações é reduzido, porém o tratamento pode durar vários meses, chegando muitas vezes até um ano (LORENZO-MORALES *et al.*, 2010; TRABELSI *et al.*, 2012; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

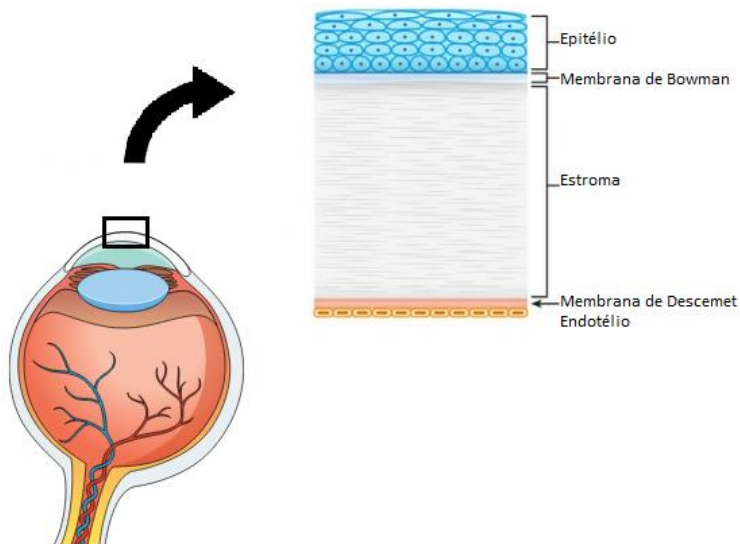
O tratamento da CA quando realizado na fase tardia, poderá não ter o efeito esperado, fazendo-se necessárias intervenções cirúrgicas como ceratoplastia, debridamento e transplante de córnea (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SAEED *et al.*, 2009). Quando o tratamento não é realizado, poderá ocorrer ulceração da córnea, com presença de infiltrado no estroma, perfuração e perda de visão (SAEED *et al.*, 2009; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

2.7 A córnea e administração tópica ocular de fármacos

A córnea é a parte anterior do globo ocular, responsável pela refração da luz e juntamente com o cristalino faz a focalização da visão através da pupila para a retina agindo como uma lente fixa (LUDWIG, 2005; PENS, 2008; NAGATA *et al.*, 2015; VERÉB *et al.*, 2016).

É uma estrutura límpida, transparente e avascular, nutrida pelo humor aquoso e líquido lacrimal e composta de cinco camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (figura 4) (LUDWIG, 2005). Representa uma barreira de 500 a 700µm de espessura, não somente efetiva contra a entrada de microrganismos, mas também contra a absorção de fármacos (LUDWIG, 2005; VERÉB *et al.*, 2016). As pálpebras e o sistema lacrimal constituem uma barreira contra lacerações por partículas, traumas e ação de microrganismos. O ato de piscar tem função de distribuir o filme lacrimal pela córnea e conjuntiva, garantindo a hidratação. O excesso de lágrima é coletado pelo saco lacrimal e excretado pelo duto nasolacrimal (ABELHA, 2012).

Figura 4 – Representação esquemática das camadas da córnea.



Fonte: Adaptado dos bancos de imagens mindthegraph® e dreamstime®.

2.8 Formulações poliméricas in situ para administração ocular de fármacos

A aplicação tópica de fármacos nos olhos representa a via mais popular de administração ocular, chegando a alcançar 90% das formulações oftálmicas disponíveis (DA SILVEIRA *et al.*, 2016). Mas, devido às barreiras protetivas do olho e a rápida perda causada pela drenagem lacrimal, apenas uma pequena parte da dose administrada consegue alcançar os tecidos intraoculares, enquanto que o restante é eliminado via ducto nasolacrimal ou através da absorção pela conjuntiva (EDSMAN *et al.*, 1998; AL KHATEB *et al.*, 2016). Consequentemente, o tempo de residência ocular de um fármaco é pequeno e a sua absorção é limitada a menos de 5% da dose instilada (SHASTRI, *et al.*, 2010).

Dessa forma, são necessárias diversas instilações por dia para manter os níveis terapêuticos adequados, e o uso de altas concentrações medicamentosas pode ocasionar efeitos colaterais e danos celulares à superfície ocular (PENS *et al.*, 2008; DA SILVEIRA *et al.*, 2016).

Diversas estratégias são estudadas de forma a aumentar a disponibilidade dos fármacos oftálmicos, dentre elas: o aumento do tempo de residência do fármaco no epitélio da córnea e também o uso de polímeros que possibilitem aumento de tempo de contato e permitam a penetração do fármaco (MAYOL *et al.*, 2008). O uso de colírios e pomadas tem a vantagem de permitir um contato sustentado com a superfície ocular, mas por outro lado podem causar visão turva e induzir o reflexo de piscar devido à irritação e sensação de desconforto (PENS *et al.*, 2008; SHASTRI, D. *et al.*, 2010; DA SILVEIRA *et al.*, 2016; SHARMA e TANIGUCHI, 2017). Os géis são sistemas que aumentam o tempo de retenção na superfície ocular, quando comparados a colírios convencionais e são mais bem tolerados do que as pomadas (ABELHA, 2012).

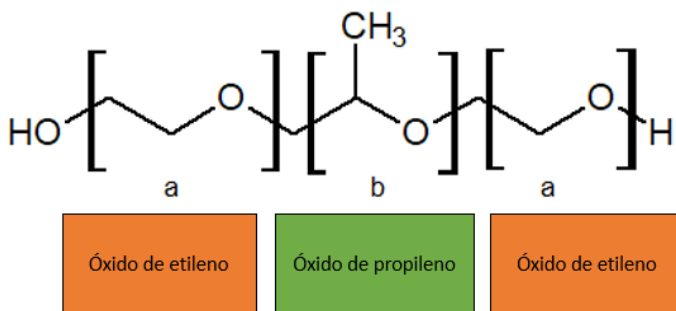
Novas formulações para uso tópico ocular vêm sendo desenvolvidas, entre elas, formulações *in situ*, que consistem de soluções de polímeros que podem ser administrados na forma líquida, mas sofrem uma transição de fase para um gel semissólido após exposição a determinadas condições, tais como: mudança na temperatura, pH ou presença de íons e radiação ultravioleta (LUDWIG, 2005; NIE *et al.*, 2011; LOU *et al.*, 2014; AL KHATEB *et al.*, 2016). Géis que são afetados por mudanças de temperatura são chamados de géis *in situ* termoresponsivos (LUDWIG, 2005).

Estas formulações oferecem diversas vantagens como a ação prolongada e sustentada de fármacos quando comparados com os sistemas convencionais de liberação de medicamentos, assim como facilitam a administração e reduzem a frequência de instilação; melhorando o conforto e adesão do paciente à terapia (LUDWIG, 2005; DESTRUEL *et al.*, 2017). A alta viscosidade destes géis garante o aumento no tempo de residência do fármaco e, por consequência, garante um tempo estendido de liberação do fármaco (MAYOL *et al.*, 2008; SHARMA e TANIGUCHI, 2017). Desta forma, colírios de geleificação *in situ* são interessantes, uma vez que são gotejados como uma preparação líquida, mas quando em contato com a superfície da

córnea passam por uma transição em gel induzida pelo ambiente fisiológico (ABELHA, 2012).

Poloxamers são copolímeros não iônicos de poli (óxido de etileno) (PEO) – poli (óxido de propileno) (PPO) e são disponíveis comercialmente como Pluronic® (PATEL *et al.*, 2009), cuja estrutura química é apresentada na figura 5. São materiais solúveis em água que atraem muito interesse como excipientes farmacêuticos, uma vez que têm um caráter anfifílico e são capazes de interagir com superfícies hidrofóbicas e membranas biológicas (AL KHATEB *et al.*, 2016).

Figura 5 – Estrutura do bloco de copolímeros – PEO e PPO.



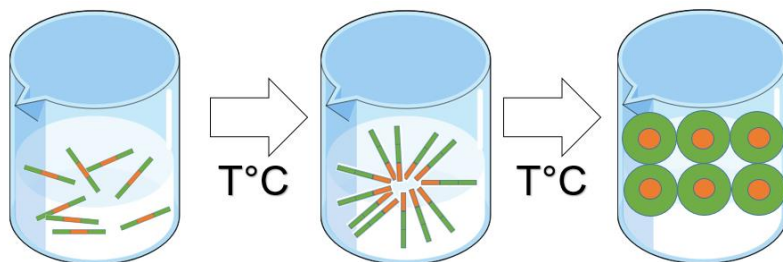
Fonte: Adaptado de KABANOV *et al.*, 2002.

Pluronic® não apresentam coloração, dessa forma não interferem com a visão, sendo polímeros apropriados para uso oftalmológico (AL KHATEB *et al.*, 2016). Um gel termo responsivo, quando utilizado para fins oftálmicos, deverá apresentar uma temperatura de transição maior que 25°C e convertido para a forma semissólida frente à temperatura pré-corneal após sua diluição no filme lacrimal (LOU *et al.*, 2014). Tal propriedade garante que a formulação seja facilmente liberada aos olhos, prevenindo a perda pré-corneal, que representa o maior problema no uso de formulações oftálmicas convencionais (LUDWIG, 2005).

A transição do estado líquido da formulação para o estado de gel pode ser induzida pelo aumento da temperatura (Abelha, 2012). De fato, a temperatura de transição tende a diminuir com variações de

temperatura ou com aumento da concentração de Pluronic®, devido a mudanças ocorridas nas propriedades das cadeias de PEO e PPO (figura 6).

Figura 6 – Representação esquemática da formação micelar em consequência do aumento na temperatura.



Fonte: Adaptado de Abelha (2012).

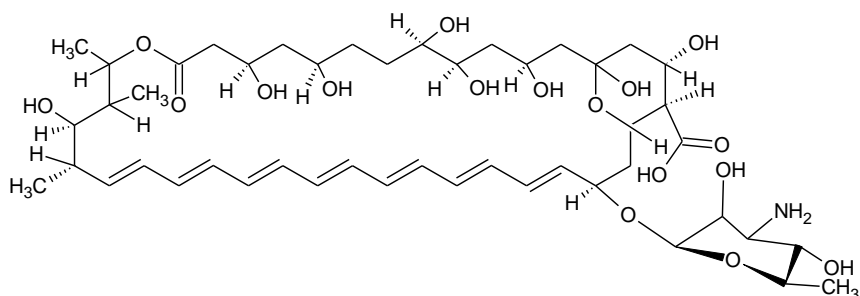
2.9 Anfotericina B

A anfotericina B (AB) é um antibiótico antifúngico natural, do grupo dos poliênicos produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Isolada de culturas bacterianas provenientes de solo venezuelano em meados de 1950 e aprovada em 1965 pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (WU, 1994; MORESCO, 2010), tem sido, a partir de então, extensivamente utilizada na prática clínica como fármaco de escolha em diversas micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos (PAPPAS *et al.*, 2001; PERFECT *et al.*, 2010; YATERA *et al.*, 2011).

A AB interage com o ergosterol, esteroide constituinte da parede celular de microrganismos, levando a formação de poros através de membranas lipídicas (HAMILTON-MILLER, 1973; VYAS e GUPTA, 2006; MESA-ARANGO *et al.*, 2012). A alteração da permeabilidade celular permite o escape de íons e metabólitos, principalmente íons potássio, ocasionando morte celular (BOLARD, 1986; ONDARZA *et al.*, 2006; NEUMANN *et al.*, 2016).

A Anfotericina B apresenta 37 átomos de carbono formando um anel macrocíclico fechado por lactonização; uma cadeia de duplas ligações conjugadas não substituídas (heptaeno) e, uma cadeia poli-hidroxilada com grupos hidroxila livres, que lhe confere característica anfipática. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina com um aminogruppo livre, formando uma cadeia lateral (FILIPPIN e SOUZA, 2006). A Figura 7 ilustra a estrutura e configuração da AB.

Figura 7 – Estrutura molecular da Anfotericina B.



Fonte: Ganis et al., 1971.

Como consequência das propriedades físico-químicas da anfotericina, este composto apresenta baixa solubilidade em solventes aquosos e em diversos solventes orgânicos (TORRADO *et al.*, 2008), sendo praticamente insolúvel em soluções aquosas em pH fisiológico devido à justaposição das porções hidrofóbicas que acabam por formar agregados insolúveis (MORESCO, 2010).

Na tabela 1 são apresentadas as solubilidades da AB em alguns solventes, com exceção do dimetilsulfóxido (DMSO) e da dimetilformamida, a AnB é praticamente insolúvel em soluções aquosas de pH neutro (FILIPPIN e SOUZA, 2006).

Tabela 1 – Solubilidade da anfotericina B (adaptada de RIBEIRO, 2014).

Solvente	Solubilidade em mg/mL
1,4 – dioxano	0,55
Acetato de Etila	0,30
Acetona	0,35
Ácido acético	1 – 2
Água	0,75
Álcool benzílico	0,75
Álcool isoamílico	1,05
Benzeno	0,06
Ciclohexano	0,02
Cloro – etileno	0,30
Dimetilformamida	2 – 4
Dimetilsulfóxido	30 – 40
Etanol	0,50
Etilenoglicol	2,6
Formamida	6,4
Metanol*	1,6
Piridina	1,75
Propilenoglicol	1 – 2

*Em metanol anidro, a solubilidade é de 0,2 – 0,4 mg/mL.

A AB tornou-se disponível comercialmente como Fungizone® (Bristol – Myers – Squibb, USA), uma suspensão coloidal na qual o sal desoxicolato de sódio (DOC) é utilizado para a sua solubilização (VYAS e GUPTA, 2006; BARRATT e BRETAGNE, 2007). No Brasil, está disponível comercialmente o Anforicin B® (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.) como formulação convencional (CALDEIRA, 2011).

A solubilidade de AB em meio aquoso pode ser aumentada por adição de DOC, entretanto o sistema não é homogêneo, podendo apresentar três formas diferentes: monomérica, oligomérica e agregados de ABDOC misturados com micelas puras de DOC (FILIPPIN e SOUZA, 2006; LEGRAND *et al.*, 1992).

Num ambiente aquoso, a AB está presente como uma mistura equilibrada de monômeros e agregados solúveis e insolúveis (GABORIAU, *et al.*, 1997; PETIT *et al.*, 1998; TORRADO *et al.*, 2008; ZIA *et al.*, 2016). Os agregados solúveis de AB demonstram mais eficiência ao induzir a permeabilidade das membranas que contém colesterol, enquanto que os agregados insolúveis e monômeros apresentam maior eficácia ao induzir danos a células que contém ergosterol (GABORIAU, *et al.*, 1997; GABORIAU, Chéron, Petit, *et al.*, 1997; BAGINSKI e CZUB, 2009).

Dessa forma, o estudo estrutural e quantificação das formas em equilíbrio de ABDOC torna-se parte essencial para os estudos de seletividade e toxicidade deste composto (GABORIAU, *et al.*, 1997; ZIA *et al.*, 2016). Assim, uma das estratégias para diminuir a toxicidade de AB é desenvolver novos derivados e/ou formulações que apresentem menores estados de agregação ou que objetivem a produção de agregados menos tóxicos (GABORIAU, *et al.*, 1997; VAN ETTEN *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Van Etten e colaboradores (2000) reportaram um aumento no tamanho dos agregados de AB após aquecimento, a 70°C por 20 minutos, sem apresentar nenhum prejuízo a atividade antimicrobiana do fármaco. O tratamento térmico não induziu a dispersão molecular, mas sim aumentou o tamanho dos agregados até ocorrer floculação. Na temperatura de 70°C ocorre a formação de ‘superagregados’, resultantes da condensação das formas monoméricas com agregados de AB (GABORIAU, *et al.*, 1997; VAN ETTEN *et al.*, 2000). Zia e colaboradores (2016) ao avaliar a diminuição da citotoxicidade de AB

após o aquecimento, ressaltam que a elevada estabilidade química de AB aquecida aumenta a especificidade do fármaco em induzir a formação de poros em membranas contendo ergosterol.

Atualmente a administração tópica ocular de AB é preparada empiricamente como uma suspensão (0,15 a 0,5%), através da diluição da apresentação comercial de ABDOC em água esterilizada, para posterior administração do medicamento entre intervalos de 60 minutos (MÜLLER, 2013). Durante o período de utilização, a solução deve ser mantida em refrigeração e protegida da luz, de forma a evitar a degradação do fármaco (SILVEIRA, 2009; MÜLLER, 2013).

Embora a AB possua maior afinidade por ergosterol, muitos efeitos tóxicos lhe são atribuídos, resultantes da capacidade do fármaco em ligar-se ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (Morand *et al.*, 2007). Diversos são os problemas relacionados à administração da AB para obtenção do efeito esperado no tratamento de infecções oculares:

- (i) A aplicação de pomada a 0,5% de ABDOC poderá causar irritação conjuntival (THOMAS, 2003);
- (ii) A injeção subconjuntival leva a necrose severa no local de aplicação (KAJI *et al.*, 2009),
- (iii) A administração intravítreal da AB está relacionada com eventual toxicidade da retina e possível deslocamento quando a aplicação não for realizada exatamente no centro do humor vítreo (MÜLLER, 2013);
- (iv) O uso de AB na forma de colírio é associado a efeitos colaterais como: instilação dolorosa, irritação, e alta frequência de dosagem, o que acarreta em baixa adesão ao tratamento e agravamento dos sintomas (MORAND *et al.*, 2007; CHHONKER *et al.*, 2015);

Diante do reduzido arsenal farmacêutico para o tratamento da CA, da alta citotoxicidade para a córnea dos fármacos atualmente utilizados para a terapêutica, da ocorrência de vários casos associados a ceratites fúngicas, do baixo tempo de residência dos fármacos na córnea e em consequência a baixa concentração de fármacos para eliminação de cistos no interior da córnea, sendo que muitos cistos permanecem

viáveis e são responsáveis pelas recidivas da infecção relatadas na maioria dos casos, o presente estudo poderá contribuir com o desenvolvimento de uma nova alternativa para a terapêutica da CA.

Até o momento, nenhum estudo foi realizado utilizando ABDOC previamente aquecida como um potencial fármaco amebicida. Neste contexto, uma formulação tópica ocular de superagregados de AB associada a um sistema de geleificação *in situ* termorreversível contribuirá na busca de novos tratamentos para casos de ceratite amebiana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação tópica ocular de Anfotericina B pré-aquecida a partir da preparação de um sistema de geleificação *in situ* termorreversível para o tratamento de ceratite amebiana.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar físico-quimicamente uma formulação de Anfotericina B pré-aquecida;
- Preparar e caracterizar um sistema de geleificação *in situ* termorreversível associado à AB pré-aquecida para administração ocular;
- Avaliar a atividade amebicida da formulação de AB pré-aquecida frente a *Acanthamoeba* spp.;
- Avaliar a atividade amebicida do sistema de geleificação *in situ* termorreversível associado à AB pré-aquecida;
- Avaliar a citotoxicidade da formulação de AB pré-aquecida e ABDOC em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Formulação de AB

4.1.1 Preparação da formulação de Anfotericina B

Para a preparação das formulações testes de AB foi utilizada a Anfotericina B convencional (ABDOC) (Sigma-Aldrich®), que é uma suspensão coloidal contendo desoxicolato de sódio (DOC) como agente solubilizante. A formulação apresenta 45% de AB e 35% de DOC, além de fosfato e cloreto de sódio.

A formulação liofilizada de ABDOC foi reconstituída em água ultrapura, para obtenção da concentração final de 5mg/mL, de acordo com as condições de manuseio estabelecidas pelo fabricante (Sigma - Aldrich®).

4.1.2 Obtenção dos superagregados de ABDOC

Para a obtenção de superagregados de AB, alíquotas de 500 µL na concentração de 5mg/mL foram acondicionadas em microtubos e aquecidas em banho-maria a 70°C por 20 minutos, conforme descrito por (GABORIAU, *et al.*, 1997).

4.2 Determinação do tamanho de partícula

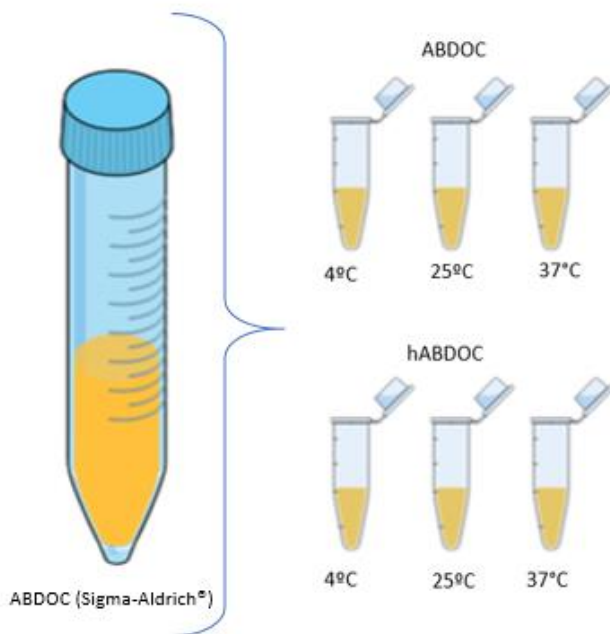
O tamanho de partícula das formulações de Anfotericina B (ABDOC) e Anfotericina B pré-aquecida (hABDOC) foi analisado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS – *dynamic light scattering*), realizadas em equipamento ZetasizerNano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), a 25°C, em ângulo detecção de 173° com laser de He-Ne (633 nm). Os dados obtidos a partir da taxa de decaimento na função de correlação de fótons foram analisados com o método cumulante para obter os diâmetros hidrodinâmicos (Z-

average) e os índices de polidispersão (PDI) das moléculas correspondentes. Os valores de Z-average e índice de polidispersão (PDI) foram obtidos a partir de três leituras feitas pelo aparelho ZetaSizerNano no modo intensidade.

4.3 Estudo de estabilidade física de superagregados

Para examinar a estabilidade física das formulações, estudos foram conduzidos em diferentes condições de temperatura de armazenamento (figura 8). Amostras foram preparadas e armazenadas nas temperaturas de 4, 25 e a 37°C, durante 90 dias. As análises do tamanho das partículas em solução foram realizadas conforme descrito no item 3.1.3 e avaliadas nos dias de produção e após 24h; 10, 15, 25, 40, 50, 65, 80, 90 dias de estoque.

Figura 8 – Representação esquemática das alíquotas de ABDOC e hABDOC mantidas sob diferentes condições de temperatura.



Fonte: A autora.

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A obtenção dos superagregados foi analisada pela observação das soluções de ABDOC e hABDOC através de microscopia eletrônica de transmissão (MET - JEOL JEM 1011). Para tanto, as amostras foram diluídas (1:5) em polímero poli(álcool vinílico) 1% e permaneceram para secagem em temperatura ambiente por 24h. Posteriormente, foram depositadas em suportes de níquel (*grids*) revestidos com carbono 200

mesh e levadas ao laboratório central de microscopia eletrônica da UFSC para observação (XU *et al.*, 2013; AMENDOLA, 2015).

4.5 Preparação do gel termorreversível

O gel de aplicação tópica ocular foi produzido pela mistura dos polímeros Pluronic F127 e F68 (Sigma-Aldrich®) em solução aquosa na proporção de 26 e 4%, respectivamente, conforme o estudo conduzido por Lou *et al.* (2014). A temperatura de geleificação foi verificada por teste de inversão de tubo. A combinação dos polímeros foi considerada adequada quando a temperatura de geleificação apresentava-se maior que 30°C. As temperaturas-chave testadas foram 4, 25, 30, 35, 37 e 40°C.

A capacidade de geleificação das formulações foram testadas em diferentes diluições de fluido lacrimal simulado (STF – *simulated tear fluid*), constituída de 0,67g de cloreto de sódio, 0,2g de bicarbonato de sódio, 0,008g de cloreto de cálcio em 100 mL de água ultrapura, com a finalidade de simular as diluições provocadas pelo lacrimejamento da superfície ocular (ALI *et al.*, 2014; LOU *et al.*, 2014).

4.5.1 Incorporação da AB no gel termorreversível

Após a preparação do gel termorreversível foram preparados 03 géis contendo cada formulação de AB (ABDOC e hABDOC), de forma a obter as diferentes concentrações que são utilizadas nos colírios preparados para o tratamento das ceratites.

Realizou-se a incorporação de 0,15, 0,3 e 0,5% de ABDOC e hABDOC, alíquotados em tubos de 1 mL, para posterior verificação de mudanças na temperatura de geleificação, por inversão de tubo.

4.6 Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B

4.6.1 Cultura e obtenção de parasitos

Os testes de atividade amebicida foram realizados com a cepa de *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492) (genótipo T4), obtida da córnea de paciente com ceratite amebiana e com um isolado regional de *Acanthamoeba* spp. (genótipo T4 – número de acesso GenBank MF579529) de paciente com diagnóstico clínico e laboratorial confirmado de caso de CA (3 a 5^o subcultivo pós isolamento). O isolado foi obtido de raspado de córnea e caracterizado no Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e oportunistas/LAPEO-UFSC – neste trabalho denominado IC01. As amebas foram cultivadas axenicamente em meio líquido PYG (Proteose peptona 0,75%, extrato de levedura 0,75% e glicose 1,5%).

Foram testadas as seguintes formulações de AB:

- ABDOC (Sigma-Aldrich®)
- hABDOC (Sigma-Aldrich®) aquecida a 70°C por 20 minutos.

4.6.2 Avaliação da atividade da AB frente à trofozoítos de *Acanthamoeba* spp..

Para a realização deste ensaio, alíquota das culturas amebianas suspensas em meio PYG (8×10^4 trofozoítos/mL) e alíquotas de cada solução AB (ABDOC e hABDOC) foram inoculadas em placas para cultura de células de 96 cavidades. As formulações de AB foram testadas nas seguintes concentrações: 2,5, 5, 10,1, 20,3, 40,6, 81,2, 162,5e 325 µg/mL. As placas foram incubadas a 30°C por 48 e 96 h em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, as células viáveis foram quantificadas utilizando a câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal e a viabilidade analisada utilizando azul de tripano 0,4%. Como controle

negativo foi utilizada uma alíquota da cultura amebiana, na densidade de 8×10^4 trofozoítos/mL e correlacionado com 100% de viabilidade, assim como foram preparados controles positivos, representados pelas cavidades onde foram adicionados iguais volumes de CLX e PHMB, ambos na concentração de 0,02%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.3 Avaliação da atividade de AB frente a cistos de *Acanthamoeba* spp..

Alíquotas das culturas axênicas foram transferidas de meio PYG para placas de Petri contendo ágar não nutriente acrescido de 0,5 M de manitol e recoberto de *Escherichia coli* (ATCC25922) inativada a 56°C por 2h. As placas foram mantidas em estufa a 30°C por uma semana para a obtenção de cistos.

Após obtenção dos cistos, uma alíquota desta suspensão na densidade de 8×10^4 cistos/mL e uma alíquota de cada solução teste foram inoculadas em microplaca de 96 cavidades e incubadas a 30°C por 48 h. As formulações de AB foram testadas nas seguintes concentrações: 2,5, 5, 10,1, 20,3, 40,6, 81,2, 162,5 e 325 µg/mL. As placas foram incubadas a 30°C por 48 e 96h em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, as células viáveis foram quantificadas utilizando a câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal e a viabilidade analisada utilizando azul de tripano 0,4%. Como controle negativo foi utilizada uma alíquota da cultura amebiana, na densidade de 8×10^4 cistos/mL e correlacionado com 100% de viabilidade, assim como foram preparados os controles positivos, representados pelas cavidades onde foram adicionados iguais volumes de CLX e PHMB, ambos na concentração de 0,02%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Avaliação do comportamento amebiano frente à formulação geleificante

Para determinar o comportamento amebiano frente à formulação geleificante, os géis contendo 0,15%, 0,3% e 0,5% de

ABDOC e hABDOC e a mesma proporção de cultivo amebiano na densidade de 10^5 células/mL foram inoculados em placas de 96 cavidades e incubados a 30°C em estufa bacteriológica por 48h. Após o período de incubação, alíquotas de 25uL foram retiradas das cavidades das placas de cultura de células e transferidos para lâminas de microscopia óptica para análise observacional (aumentos de 200X, 400X), outros 25uL foram transferidas para placas de Petri contendo ágar não-nutriente 1,5% cobertas com suspensão de *E. coli* (ATCC25922) inativada a 56°C por 2h e incubadas a 30°C.

O comportamento amebiano na formulação geleificante foi avaliado conforme em cultivo monoxênico após 6 horas de incubação para quantificação das formas amebianas viáveis, determinado por contagem do número de trofozoítos a uma distância de cerca de 20 mm do ponto de inoculação, e evidênciação de caminhos formados pelos trofozoítos sobre a camada de *E. coli*. Para cada placa, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100x). Todos os testes foram realizados em triplicata.

As placas de cultivo monoxênico foram monitoradas diariamente durante 7 dias, com observação e contagem das formas no último dia de incubação para avaliar a viabilidade amebiana.

4.8 Avaliação da citotoxicidade frente a células endoteliais

Para determinar a citotoxicidade das formulações de ABDOC e hABDOC foram utilizadas células de endotélio vascular/cordão umbilical “*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*” – HUVEC-EC-C (ATCC CRL-1730).

As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute Medium/RPMI1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram repicadas e expandidas até atingirem 80% de confluência. Todos os experimentos foram realizados entre as passagens 3 e 8 e em triplicata.

Para realização dos testes de citotoxicidade foram utilizadas placas para cultura de células de 96 cavidades, onde alíquotou-se 10^5 células/poço em meio de cultura por 24h. Foi avaliada a citotoxicidade dos tratamentos com ABDOC, hABDOC nas concentrações de 2,5, 5, 10,1, 20,3, 40,6, 81,2, 162,5 e 325 µg/mL e as células foram incubadas a

37°C por 48h. Como controle negativo foi utilizada uma alíquota da cultura celular, na densidade de 10^5 células/poço e correlacionado com 100% de viabilidade, assim como foram preparados controles positivos, representados pelas cavidades onde foram adicionados CLX e PHMB, ambos na concentração de 0,02%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Ao término da incubação das células foi adicionada uma solução de resazurina (AlamarBlue®/Sigma-Aldrich) na concentração de 1mg/mL e incubadas por 2 horas. Após esta etapa, foi avaliada a concentração do produto fluorescente formado, resofurina e a leitura das placas para cultura de células foi realizada em fluorímetro (multileitora spectramax paradigm), utilizando o comprimento de onda de 530 nm para excitação e 590 nm para emissão. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada em relação ao controle contendo somente células (100% de viabilidade).

4.9 Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) é um indicativo *in vitro* da seletividade da substância em teste para o parasito (*Acanthamoeba* spp.) do que para células de mamíferos, sendo determinado através da razão entre a área sob a curva de gráficos obtidos nos ensaios de citotoxicidade com células HUVEC e a área sob a curva dos testes de viabilidade amebiana. O IS foi calculado utilizando o software Graph Pad Prism (La Jolla, CA, EUA).

4.10 Análise estatística

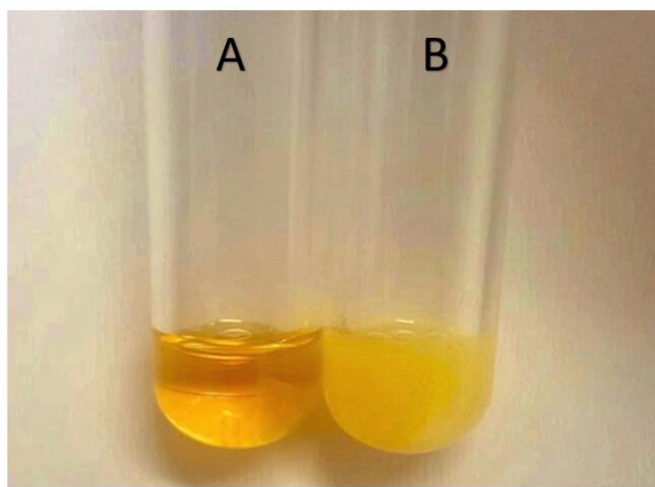
As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Graph Pad Prism (La Jolla, CA, EUA) para as análises de variância (ANOVA) com comparação de médias, seguido do teste de Bonferroni e test t, assim como o MedCalc software para as análises que envolviam comparação entre ABDOC e hABDOC. Os resultados obtidos nos testes de avaliação da atividade amebicida e citotoxicidade foram expressos como porcentagem de viabilidade, média \pm desvio padrão (DP) para no mínimo 3 replicatas, sendo os valores de p menor que 0,05 considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Preparação da formulação pré-aquecida de ABDOC e obtenção de superagregados

Para a realização dos estudos de desenvolvimento de hABDOC, a forma convencional da Anfotericina B (ABDOC) foi aquecida a 70°C por 20 minutos, de forma a obter os superagregados de AB, conforme descrito por (GABORIAU, *et al.*, 1997). O pré-aquecimento da ABDOC aumentou a turbidez da formulação, devido à formação de superagregados como mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Aspecto macroscópico da formulação ABDOC antes do aquecimento (A) ABDOC e após o aquecimento (B) hABDOC.



Fonte: A autora.

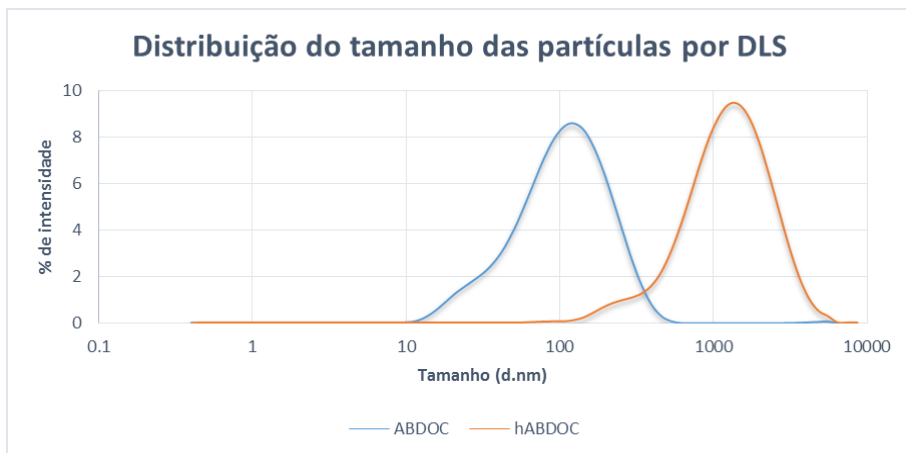
5.1.1 Análise do tamanho de partícula

Para efeito de comparação e análise da obtenção dos superagregados, após a obtenção de hABDOC, amostras de ABDOC e

hABDOC foram submetidas a técnica de DLS para a determinação do tamanho médio das partículas e índice de polidispersão (PDI).

A Figura 10 mostra a distribuição do tamanho das partículas obtidas. Observou-se um aumento no tamanho dos agregados de AB após seu aquecimento. A média cumulante (Z-average) das partículas antes do aquecimento foi de $82,16 \pm 9,93$ nm enquanto que após o aquecimento a média passou para $982 \pm 12,10$ nm. Os índices de polidispersão apresentaram-se $0,317 \pm 0,03$ para ABDOC e $0,303 \pm 0,020$ para hABDOC. O pré-aquecimento de ABDOC aumentou significativamente o tamanho das partículas (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Figura 10 – Distribuição do tamanho das partículas por DLS antes e após o seu aquecimento.



Fonte: A autora.

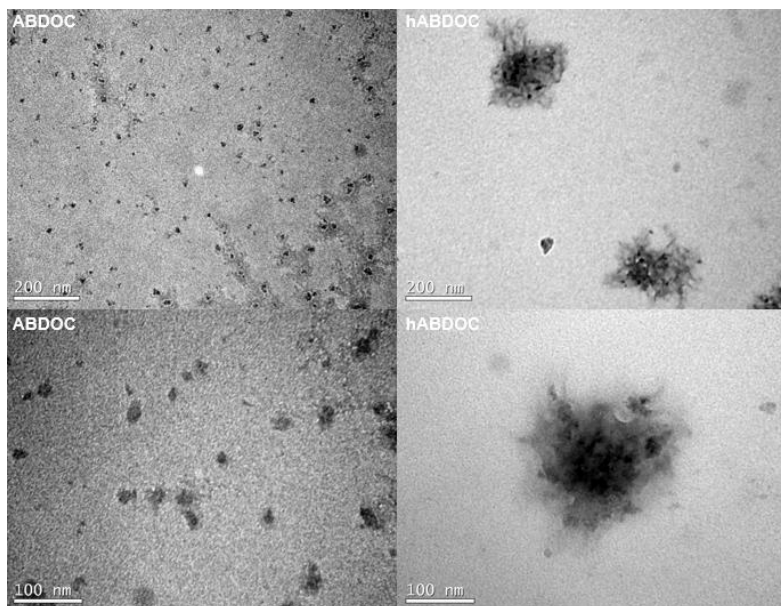
5.2 Análise morfológica dos superagregados de hABDOC por MET

Na figura 11 estão representadas fotomicrografias da análise da ultra-estrutura dos agregados de ABDOC e superagregados de hABDOC por microscopia eletrônica de transmissão.

Foi possível observar de pequenas micelas de ABDOC antes do aquecimento e, estruturas pleomórficas de ABDOC após seu

aquecimento, com aumento do tamanho dos agregados resultando na formação de superagregados. As imagens de hABDOC da figura 11, mostram superagregados de diâmetro médio entre 150 – 200 nm.

Figura 11 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formulações de ABDOC e hABDOC.



Fonte: A autora.

5.3 Estudo da estabilidade física dos superagregados

De forma a investigar a estabilidade física dos superagregados de hABDOC, analisou-se as formulações ABDOC e hABDOC em diferentes temperaturas de armazenamento. As amostras foram submetidas às temperaturas de 4, 25 e 37°C durante 90 dias. As análises do tamanho das partículas em solução e PDI foram avaliadas nos dias de produção, após 24 h e ao longo de 10, 15, 25, 40, 50, 65, 80, 90 dias de armazenamento.

A tabela 2 apresenta resultados obtidos quanto ao tamanho de partículas avaliado por DLS ao longo do período de 90 dias.

Tabela 2 – Tamanho médio (Z-average) das partículas das formulações de ABDOC e hABDOC.

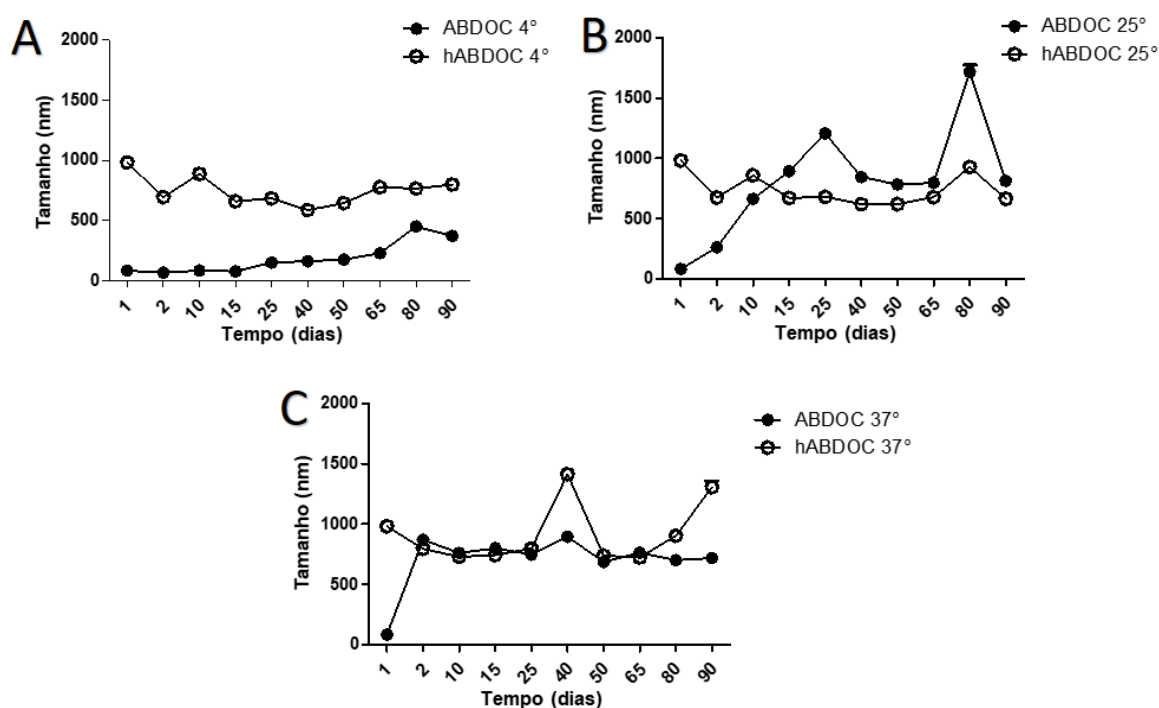
TEMPO	Z – AVERAGE					
	ABDOC 4°C	hABDOC 4°C	ABDOC 25°C	hABDOC 25°C	ABDOC 37°C	hABDOC 37°C
DIA 1	82,16 ± 9,93	982,43 ± 12,10	82,16 ± 9,93	982,43 ± 12,10	82,16 ± 9,93	982,43 ± 12,10
DIA 2	65,99 ± 2,88	694,13 ± 4,89	264,8 ± 0,85	676,63 ± 8,95	871,26 ± 28,90	796,2 ± 18,98
DIA 10	82,94 ± 2,92	888,1 ± 17,31	664,4 ± 7,70	859,66 ± 32,87	760,83 ± 4,96	728,53 ± 30,57
DIA 15	76,55 ± 3,79	658,86 ± 11,70	893,4 ± 78,63	672,4 ± 22,85	800,5 ± 14,14	743,43 ± 7,53
DIA 25	148,83 ± 0,58	683,6 ± 15,21	1208 ± 43,84	681,4 ± 26,84	747,73 ± 9,19	797,73 ± 15,98
DIA 40	161,1 ± 2,54	585,43 ± 3,30	846,6 ± 15,49	620,6 ± 8,22	895,33 ± 12,81	1414,33 ± 52,53
DIA 50	174,15 ± 5,16	644,96 ± 2,99	784,9 ± 21,38	621,6 ± 2,76	687,56 ± 21,19	739,56 ± 49,81
DIA 65	227,1 ± 11,55	776,06 ± 5,38	796,73 ± 14,43	679,16 ± 9,13	764,93 ± 20,66	723,83 ± 28,26
DIA 80	448,5 ± 19,29	765,4 ± 7,21	1719 ± 94,75	928,46 ± 19,74	700,6 ± 14,74	903,63 ± 20,09
DIA 90	371,0 ± 35,03	799,86 ± 16,15	814,3 ± 17,24	666,43 ± 14,91	719,26 ± 3,95	1308,3 ± 88,31

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=3.

Pode-se observar pelos dados apresentados na tabela 2, que o pré-aquecimento de ABDOC alterou o tamanho das partículas em suspensão pela formação de superagregados. Ao final do período de 90 dias de armazenamento, a formulação pré-aquecida (hABDOC) apresentou tamanhos de partículas de $799,86 \pm 16,15$ a 4°C , $666,43 \pm 14,91$ em 25°C e 1308 ± 88 a 37°C . A hABDOC apresentou tamanho médio de partículas maior do que a ABDOC ($p < 0,05$) ao longo de 90 dias.

A formulação ABDOC apresentou tamanho médio das partículas variando de 371 ± 35 nm a 4°C ; 673 ± 12 nm armazenada a 25°C e 719 ± 3 nm a 37°C ao final do período de 90 dias.

Figura 12 – Diâmetro médio das partículas de ABDOC e hABDOC avaliados durante o período de 90 dias. (A) Amostras estocadas a 4°C , (B) Amostras estocadas a 25°C e (C) Amostras estocadas a 37°C .



Na figura 12, observa-se a instabilidade da formulação ABDOC e sua tendência em formar agregados, uma vez que com o passar dos dias há um aumento progressivo nos tamanhos das partículas; principalmente para as formulações estocadas a 25°C e 37°C . A formulação estocada a 37°C houve a formação de agregados, e permaneceu ao longo de 90 dias com partículas de tamanho médio 700 nm.

Na mesma figura, pode-se observar que o tamanho das partículas das formulações previamente aquecidas, permaneceu estável pelo período de 90 dias. As partículas apresentaram tamanho médio de 750 nm para hABDOC armazenada a 4°C , 740 nm para hABDOC armazenada a 25°C e 910 nm para hABDOC armazenada a 37°C .

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos quanto ao PDI avaliados por DLS durante o período de 90 dias. Pode-se observar na tabela 2, que pelo período avaliado, as partículas de hABDOC apresentam-se pouco polidispersas, com índices de polidispersão próximos a 0,3, indicando a presença de um sistema monodisperso estável.

A formulação ABDOC armazenada a 4°C , apresentou aumento progressivo em seu PDI a partir do 25º dia de incubação, demonstrando o surgimento de novas populações de partículas através da sua capacidade de auto agregação. As amostras de ABDOC armazenadas a 25°C e 37°C apresentaram índices de dispersão majoritariamente próximos 0,3, com exceções nos dias 2, 10 e 80 em que também foi verificado a presença de outros picos de populações, conforme dados apresentados no apêndice A.

Tabela 3 – Índices de polidispersão (PDI) das partículas das formulações de ABDOC e hABDOC.

TEMPO	PDI					
	ABDOC 4°C	hABDOC 4°C	ABDOC 25°C	hABDOC 25°C	ABDOC 37°C	hABDOC 37°C
DIA 1	0,317 ± 0,03	0,303 ± 0,020	0,317 ± 0,03	0,303 ± 0,020	0,317 ± 0,03	0,303 ± 0,020
DIA 2	0,279 ± 0,002	0,273 ± 0,04	0,56 ± 0,004	0,238 ± 0,003	0,534 ± 0,08	0,257 ± 0,002
DIA 10	0,293 ± 0,001	0,345 ± 0,04	0,489 ± 0,035	0,286 ± 0,024	0,140 ± 0,023	0,238 ± 0,013
DIA 15	0,292 ± 0,007	0,246 ± 0,07	0,367 ± 0,04	0,204 ± 0,050	0,128 ± 0,012	0,224 ± 0,012
DIA 25	0,457 ± 0,014	0,276 ± 0,011	0,388 ± 0,091	0,214 ± 0,040	0,147 ± 0,019	0,242 ± 0,014
DIA 40	0,493 ± 0,008	0,199 ± 0,015	0,148 ± 0,048	0,217 ± 0,021	0,282 ± 0,046	0,282 ± 0,016
DIA 50	0,423 ± 0,029	0,274 ± 0,009	0,152 ± 0,030	0,191 ± 0,009	0,185 ± 0,022	0,221 ± 0,015
DIA 65	0,579 ± 0,148	0,366 ± 0,057	0,153 ± 0,028	0,210 ± 0,021	0,180 ± 0,074	0,146 ± 0,059
DIA 80	0,465 ± 0,003	0,438 ± 0,013	0,519 ± 0,034	0,134 ± 0,008	0,207 ± 0,031	0,234 ± 0,016
DIA 90	0,958 ± 0,036	0,383 ± 0,043	0,184 ± 0,004	0,233 ± 0,034	0,213 ± 0,064	0,204 ± 0,074

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=3.

5.4 Preparação do sistema de geleificação *in situ* termorreversível e determinação da temperatura de geleificação

Foi selecionada a formulação ótima para uma temperatura média da superfície ocular de 34,5°C, segundo critérios descritos por Lou e colaboradores (2014). Esta formulação consistiu de 26% de Pluronic F-127 e 4% de Pluronic F-68 como matriz do gel.

A determinação da temperatura de geleificação do sistema *in situ* termorreversível foi realizado pelo teste de inversão de tubo conforme descrito por Lou *et al* (2014), com modificações. A temperatura na qual o líquido no tubo permaneceu estável por pelo menos 30 segundos foi estabelecida como a temperatura de transição entre sol-gel (LOU *et al.*, 2014).

A formulação é um líquido de escoamento livre em 30°C e convertida para um gel semissólido a 35°C, após diluição com solução lacrimal artificial (STF). Os resultados obtidos estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Determinação da temperatura de geleificação dos polímeros pelo teste de inversão de tubo.

Temperatura (° C)	Tempo (segundos)
4°	2
25°	2,3
30°	4
35°	29,3
37°	30+
40°	30+

Após a incorporação da Anfotericina B no gel termorreversível, houve mudança na temperatura de geleificação em todas as amostras analisadas. A nova temperatura de transição entre sol-gel passou de 35°C para 30°C. A incorporação da Anfotericina B na formulação parece ter aumentado a formação de micelas, necessárias para a formação do gel *in situ*.

Os dados referentes à temperatura de geleificação após a incorporação da AB no gel polimérico são apresentados nos quadros 2, 3 e 4.

Quadro 2 - Determinação da temperatura de geleificação após a incorporação de AB a 0,15% pelo teste de inversão de tubo.

Temperatura (°C)	0,15% ABDOC	0,15% hABDOC
	Tempo (segundos)	Tempo (segundos)
4°	0,66	0,66
25°	2	2
30°	30+	30+
35°	30+	30+
37°	30+	30+

Quadro 3 - Determinação da temperatura de geleificação após a incorporação de AB a 0,3% pelo teste de inversão de tubo.

Temperatura (°C)	0,3% ABDOC	0,3% hABDOC
	Tempo (segundos)	Tempo (segundos)
4°	0,66	0,66
25°	2	2
30°	30+	30+
35°	30+	30+
37°	30+	30+

Quadro 4 - Determinação da temperatura de geleificação após a incorporação de AB a 0,5% pelo teste de inversão de tubo.

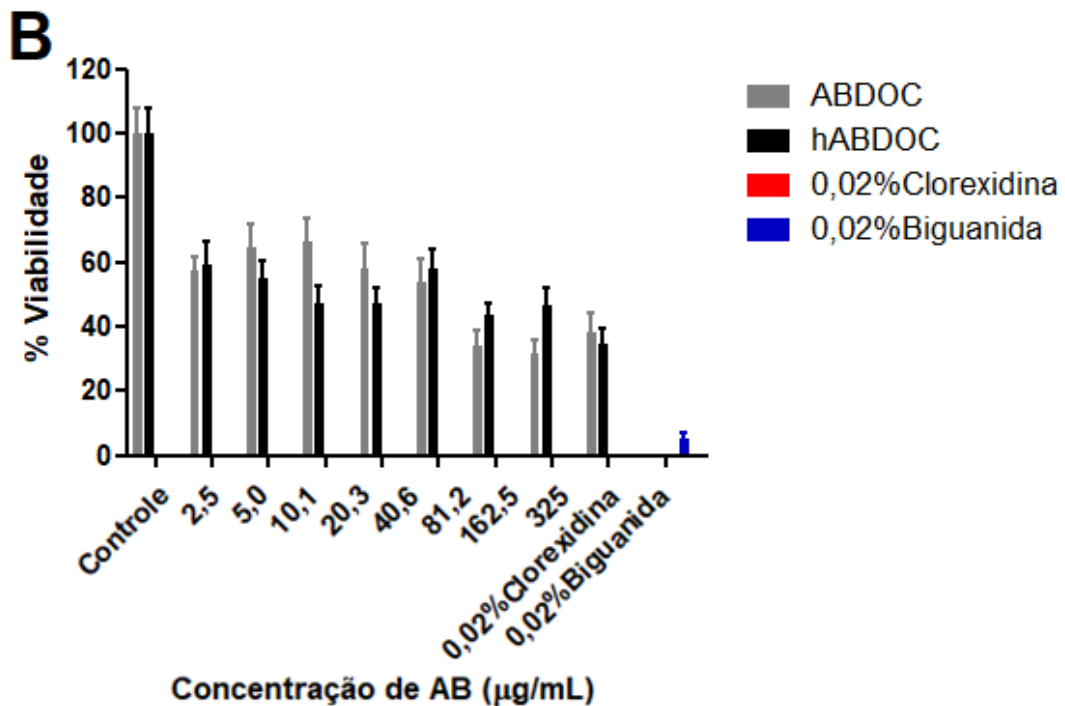
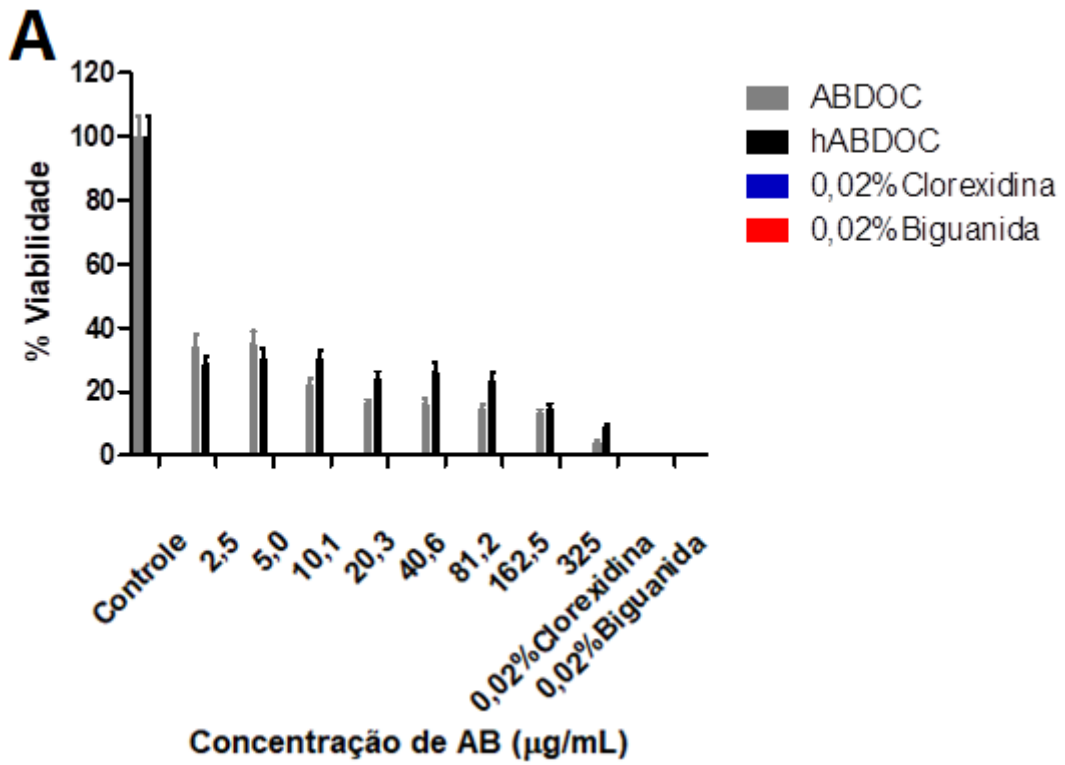
Temperatura (°C)	0,5% ABDOC	0,5% hABDOC
	Tempo (segundos)	Tempo (segundos)
4°	1,33	1,66
25°	1,33	1,33
30°	30+	30+
35°	30+	30+
37°	30+	30+

5.5 Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B

5.5.1 Avaliação da atividade contra trofozoítos

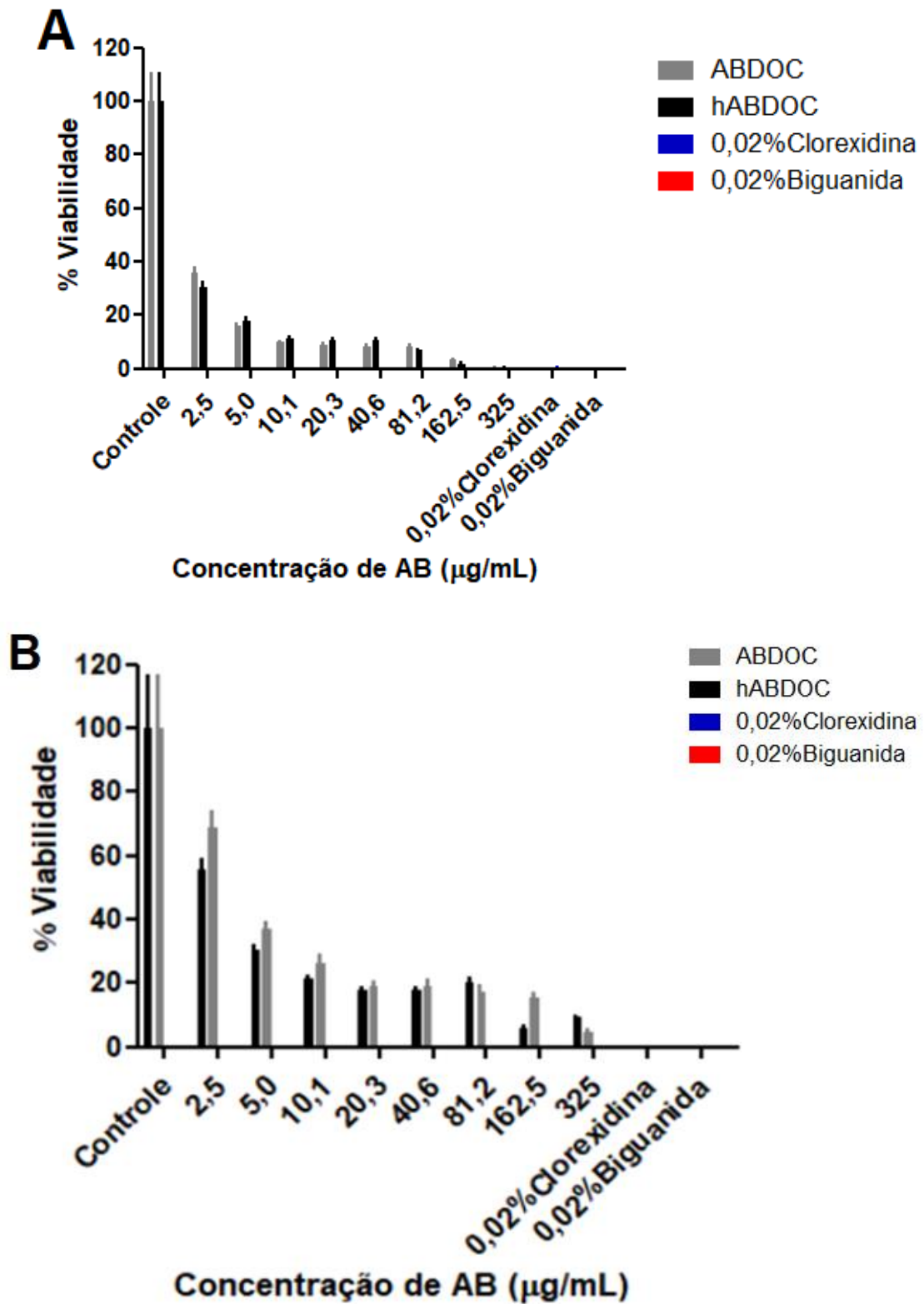
As Figuras 13 e 14 representam as porcentagens da viabilidade dos trofozoítos de *A. castellanii* (ATCC50492) e do isolado clínico regional (IC01), após 48 e 96h de incubação com diferentes concentrações das formulações utilizadas (ABDOC e hABDOC). Os resultados de viabilidade dos trofozoítos avaliados após o tratamento com ABDOC e hABDOC em relação aos seus respectivos controles, apresentaram diminuição da viabilidade celular, sendo estatisticamente significativos (ANOVA $p < 0,05$).

Figura 13 – Viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* (A) e IC01 (B) frente às formulações ABDOC e hABDOC após 48h de tratamento.



Valores expressos pela média e desvio padrão (n=3).

Figura 14 – Viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* (A) e IC01 (B) frente às formulações ABDOC e hABDOC após 96h de tratamento.



Valores expressos pela média e desvio padrão (n=3).

A cepa ATCC, após 48h de incubação e na menor concentração testada (2,5 µg/mL), apresentou viabilidade de 34% e 28% para ABDOC e hABDOC, respectivamente. Na maior concentração testada (325µg/mL) de ABDOC e hABDOC, menos de 10% dos trofozoítos permaneceram viáveis. Enquanto que após 96h de incubação com as formulações de AB, a viabilidade dos trofozoítos expostos a 2,5 µg/mL foi de 35% para ABDOC e 30% para hABDOC para a mesma cepa, e menor que 1% na concentração de 325 µg/mL.

O isolado regional IC01 apresentou menor sensibilidade à ação de ambas as formulações de AB, quando comparado com a cepa ATCC. Após 48h de exposição na concentração de 2,5 µg/mL de AB, as viabilidades observadas foram de 57% e 59% para ABDOC e hABDOC respectivamente, e cerca de 35% de viabilidade na maior concentração testada para ambas as apresentações de AB. Quando exposto por 96h frente às formulações de AB, as viabilidades deste mesmo isolado apresentaram-se em 68% para ABDOC e 55% para hABDOC em 2,5 µg/mL. Já em 325 µg/mL a viabilidade demonstrou ser menor que 10% tanto para ABDOC quanto para hABDOC.

Os valores de viabilidade para a cepa ATCC e isolado regional IC01 frente aos fármacos CLX e PHMB (0,02%) apresentaram-se menores que 1% para os testes com ATCC em ambos os períodos de incubação; com exceção dos cistos incubados por 48h que apresentou viabilidade de 14%. Para o isolado regional IC01, a maior viabilidade encontrada foi de 5% para PHMB em 48h de incubação.

Após a avaliação do perfil de viabilidade celular dos trofozoítos de *A. castellanii* e IC01 frente às formulações ABDOC e hABDOC, foram calculados os valores de área sob a curva (ASC), estes estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de área sob a curva da citotoxicidade induzida por ABDOC e hABDOC em trofozoítos de *A. castellanii* e Isolado Regional IC01.

	ABDOC		hABDOC	
	Média	Desvio	Média	Desvio
ATCC Trofozoítos 48h	69	10	77	10
ATCC Trofozoítos 96h	51	10	50	8
IC01 Trofozoítos 48h	141	6	133	48
IC01 Trofozoítos 96h	163	104	205	143

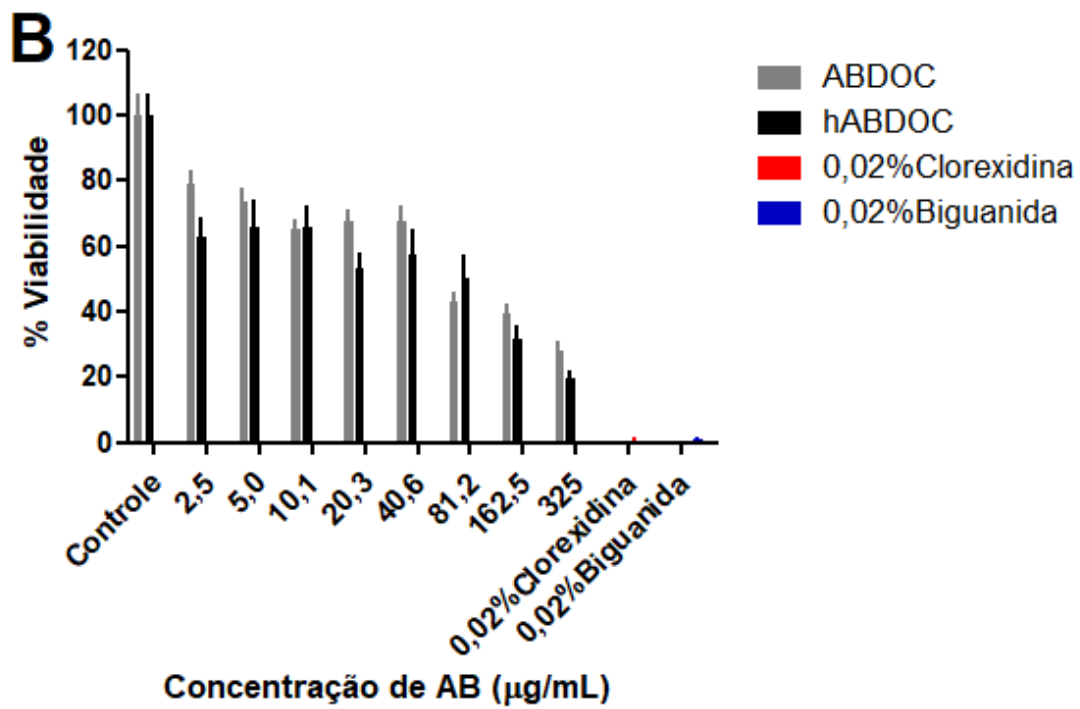
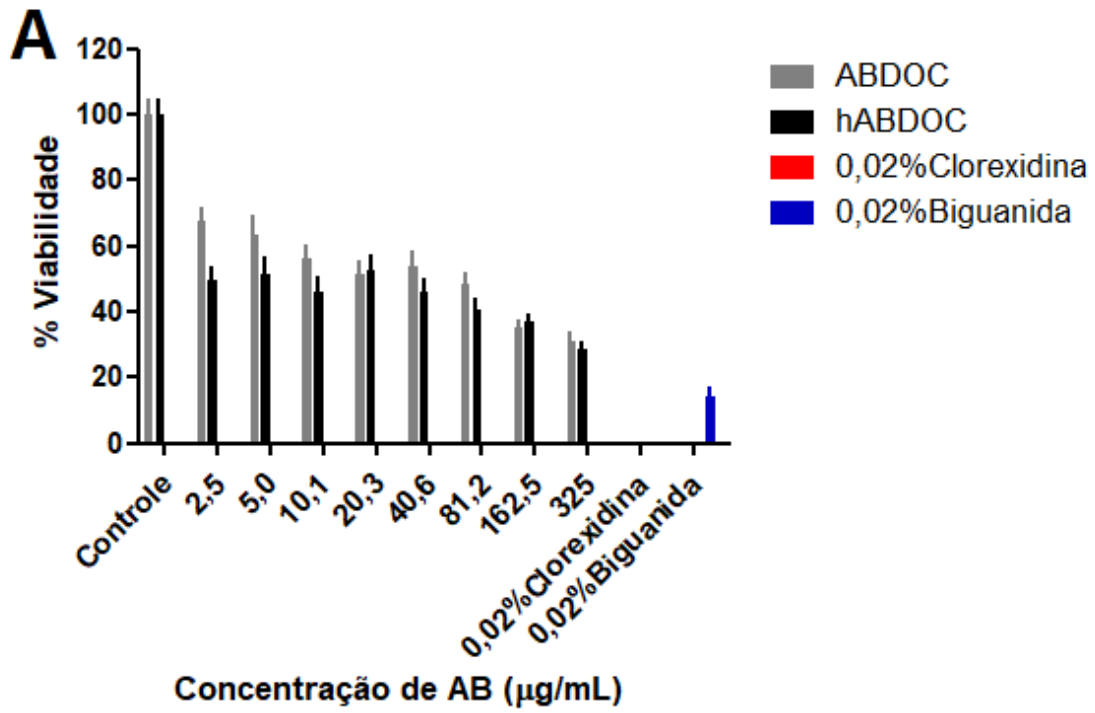
Valores expressos pela média ± desvio padrão, n=3. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni, $p>0,05$.

Os valores de ASC da tabela 4 demonstram que não há diferença significativa (ANOVA $p>0,05$) entre o tratamento das amebas com ABDOC ou hABDOC. Desta forma, observa-se que o aquecimento de AB não leva a perda da atividade farmacológica do fármaco, como descrito por Gaboriau *et al.* (1997) e Van Etten *et al.* (2000).

5.5.2 Avaliação da atividade cisticida

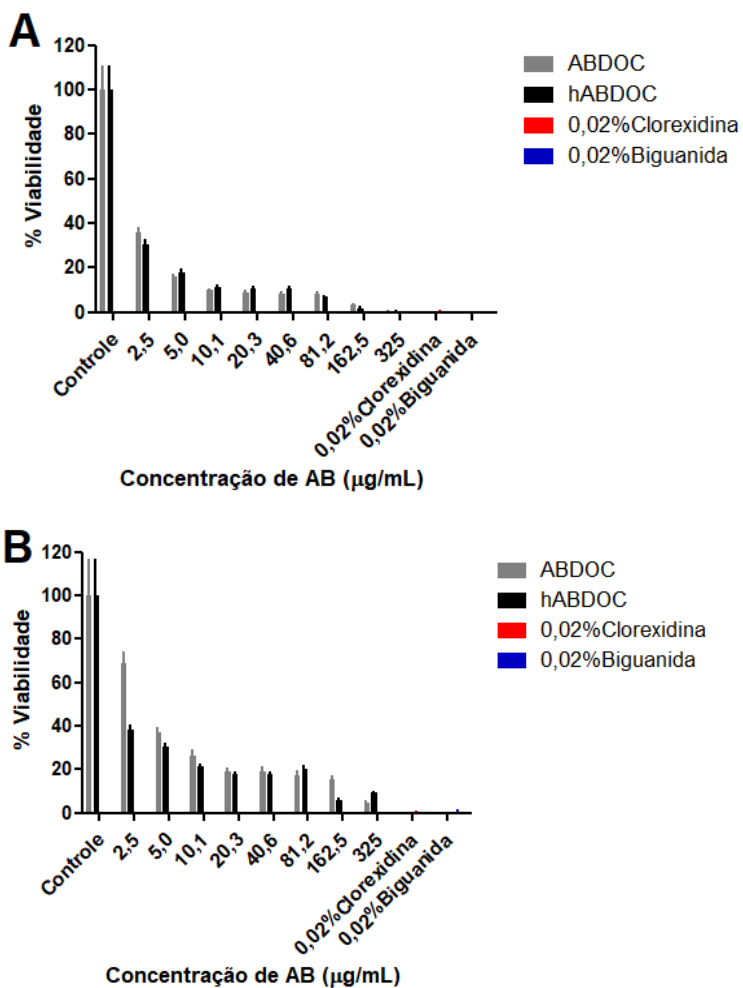
As figuras 15 e 16 representam a viabilidade celular (%) de cistos de *A. castellanii* (ATCC 50492) e IC01 após incubação por 48 e 96 horas com diferentes concentrações das formulações ABDOC e hABDOC.

Figura 15 – Viabilidade de cistos de *A. castellanii* (A) e IC01 (B) frente às formulações ABDOC e hABDOC após 48h de tratamento.



Valores expressos pela média e desvio padrão (n=3).

Figura 16 – Viabilidade de cistos de *A. castellanii* (A) e IC01 (B) frente às formulações de ABDOC e hABDOC após 96h de tratamento.



Valores expressos pela média e desvio padrão (n=3).

Comparando com o grupo controle (100% de viabilidade dos cistos), os resultados demonstram que ambas as formulações de AB, apresentaram atividade cisticida, com diminuição significativa da viabilidade dos cistos em relação ao controle negativo (ANOVA $p < 0,05$).

A cepa ATCC após 48h de incubação e na menor concentração testada (2,5 $\mu\text{g/mL}$), apresentou viabilidade de 67% e 49% para ABDOC e hABDOC, respectivamente. Na maior concentração testada (325 $\mu\text{g/mL}$) de ABDOC e hABDOC, a viabilidade dos cistos diminuiu para 31% e 28%, respectivamente. Enquanto que em 96h de incubação com as formulações de AB, a viabilidade dos cistos expostos a menor concentração testada foi de 38% para ABDOC e 35% para hABDOC para a mesma cepa na menor concentração e menor que 1% na concentração de 325 $\mu\text{g/mL}$.

O isolado regional IC01 apresentou menor sensibilidade à ação de ambas as formulações de AB. Após 48h de exposição na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de AB, as viabilidades observadas foram de 78 e 62% para ABDOC e hABDOC, respectivamente e cerca de 24% de viabilidade na maior concentração testada para ambas as apresentações de AB.

Quando exposto a 96h na presença das formulações de AB, as viabilidades deste mesmo isolado apresentaram-se em 68% para ABDOC e 38% para hABDOC em 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Já em 325 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade demonstrou ser menor que 10% tanto para ABDOC quanto para hABDOC.

Os resultados referentes aos testes com CLX e PHMB apresentaram resultados de viabilidade de 0% e 14%, respectivamente para os cistos ATCC em 48h de incubação. Os cistos IC01 também em 48h apresentaram resultados menores que 1% para ambos os medicamentos acima mencionados. Em 96h de incubação, as viabilidades tanto para CLX quanto para a PHMB foram menores que

1% em ambos, a cepa ATCC e isolado IC01 avaliados. Os resultados obtidos demonstraram não haver diferença entre os tratamentos com CLX, PHMB e hABDOC na concentração de 325 µg/mL para o período de incubação de 96 horas, tanto para a ATCC como para IC01 (ANOVA $p < 0,05$).

Após a realização do perfil de viabilidade celular dos cistos de *A. castellanii* e IC01 foram calculados os valores de ASC, estes estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 - Valores de área sob a curva da citotoxicidade induzida por ABDOC e hABDOC em cistos de *A. castellanii* e Isolado Regional IC01.

	ABDOC		hABDOC	
	Média	Desvio	Média	Desvio
ATTC Cisto 48h	143	18	12	11
ATTC Cisto 96h	169	126	93	44
IC01 Cisto 48h	166	36	150	40
IC01 Cisto 96h	205	143	144	94

Valores expressos pela média \pm desvio padrão, n=3. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni, $p > 0,05$.

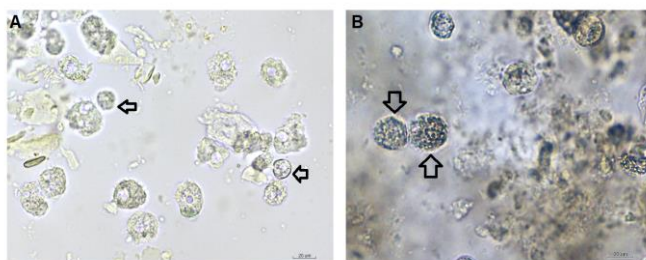
Os resultados demonstram que não há diferença entre os tratamentos realizados, independente da cepa/isolado e tempo de incubação dos cistos com ABDOC e hABDOC (ANOVA $p > 0,05$).

5.3 Avaliação do comportamento amebiano frente à formulação geleificante

De forma a verificar o comportamento amebiano frente às formulações geleificantes, contendo 0,15%, 0,3%

e 0,5% de ABDOC e hABDOC, alíquotas de trofozoítos de *A. castellanii* e de IC01 foram expostos por 48h. Após avaliação observacional das células amebianas frente às formulações testadas, foi possível perceber o arredondamento das formas trofozoíticas das amebas e indução a morte celular a partir de 48h de incubação com o gel para todas as concentrações de ABDOC e hABDOC testadas, conforme ilustrado na figura 17.

Figura 17 – Formas morfológicas de *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492) após 48h de incubação frente à formulação geleificante com hABDOC na concentração de 0,15%.



As figuras A e B são representativas do comportamento amebiano frente à formulação geleificante com hABDOC, que levou ao arredondamento e morte celular como indicado pelas setas. Aumento de 400x.

Fonte: A autora.

Após o período de incubação de 48h dos trofozoítos de *A. castellanii* (ATCC 50492) e IC01 com as diferentes formulações geleificantes, realizou-se o cultivo monoxênico para avaliar o grau de viabilidade das formas amebianas.

Os resultados apresentados na tabela 6 demonstram que com o aumento da concentração de AB

nas formulações testadas, houve decréscimo na viabilidade e na migração da cepa ATCC e do isolado regional IC01. Não houve diferença na atividade amebicida das concentrações testadas para as concentrações de 0,3 e 0,5%, porém para a concentração de 0,15%, a formulação geleificante com hABDOC demonstrou-se mais efetiva frente as formas trofozoíticas, devido a presença de um menor número de células nos pontos de contagem no cultivo monoxênico.

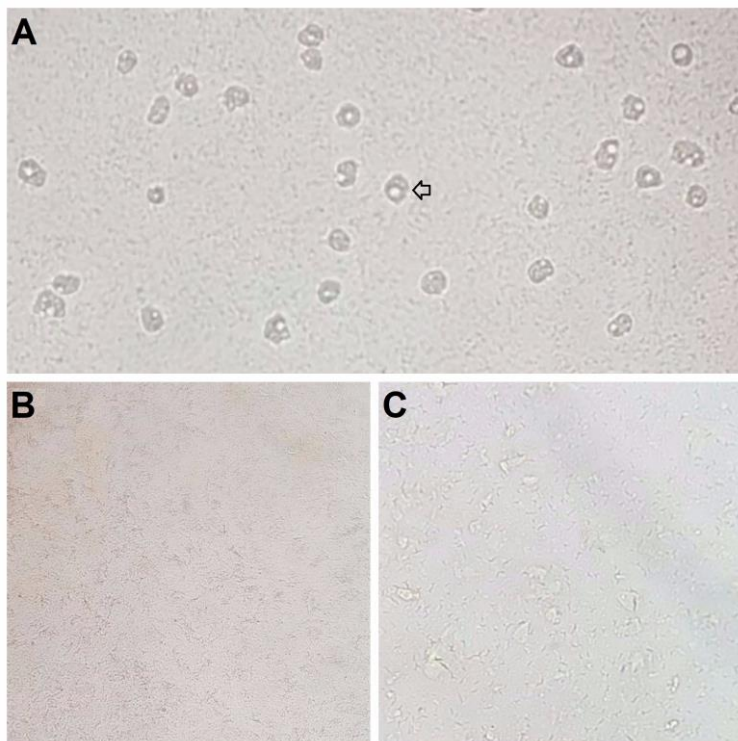
Tabela 6 - Crescimento amebiano nas formulações avaliadas 48h após a sua inoculação em cultivo monoxênico.

	ABDOC			hABDOC		
	0,15%	0,3%	0,5%	0,15%	0,3%	0,5%
Controle Negativo	+++	+++	+++	+++	+++	+++
A. castellanii – ATCC	+++	+	+	+	+	+
Isolado regional – IC01	+++	-	-	+	-	-

(-) ausência de crescimento amebiano, (+) 1 a 15 cistos e/ou trofozoítos, (++) 16 a 29 cistos e/ou trofozoítos e, (+++) >30 cistos e/ou trofozoítos. Avaliação feita em cinco campos microscópicos a 20mm do ponto de inoculação, aumento de 400X.

As placas de cultivo monoxênico foram acompanhadas por setes dias, e ao final deste período nenhuma forma amebiana foi observada em ambos os isolados avaliados e nas diferentes formulações geleificantes testadas, como representado pela figura 18.

Figura 18 – Representação do comportamento amebiano de *A. castellanii* (ATCC 50492) frente a formulação geleificante com ABDOC e hABDOC após 7 dias de incubação.



(A) Controle negativo, (B) gel a 0,15% ABDOC e (C) gel a 0,15% hABDOC.

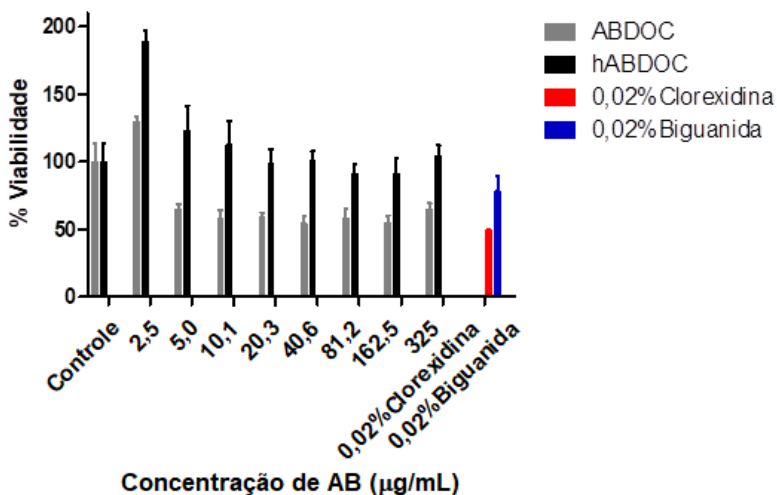
Trofozoíto indicado pela seta. Aumento de 40x.

Fonte: A autora.

5.4 Avaliação da citotoxicidade frente a células endoteliais

A avaliação da toxicidade das formulações de ABDOC e hABDOC foi realizada frente a células HUVEC. A figura 19 apresenta a viabilidade celular (%) das células HUVEC após incubação por 48h com diferentes concentrações de ABDOC e hABDOC.

Figura 19 – Viabilidade de células HUVEC frente à ABDOC e hABDOC após 48h de tratamento.



Valores expressos pela média e desvio padrão (n=3).

A exposição das células HUVEC à ABDOC afetou a viabilidade celular em 32% (variando entre 64% a 54%) para a maioria das concentrações, com exceção da concentração de 2,5 µg/mL, que a viabilidade foi de 129%.

Enquanto a formulação hABDOC mostrou-se inócua frente às células HUVEC e manteve a viabilidade próxima a 100% (variando entre 189 e 91%) para todas as concentrações testadas.

Nas concentrações de uso avaliadas para os fármacos mais utilizados para o tratamento de CA (PHMB e CLX 0,02%) frente a células HUVEC, a viabilidade celular foi de 48% para CLX e 78% para PHMB, com diferença significativa em relação ao controle negativo e a hABDOC (ANOVA $p < 0,05$).

Foi possível observar que o tratamento com PHMB não diferiu de forma significativa do tratamento com ABDOC 325 $\mu\text{g/mL}$ e do tratamento com hABDOC 162,5 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto o tratamento das células com CLX demonstrou diferença significativa (ANOVA $p < 0,05$) em relação a todas as concentrações testadas em hABDOC, e equivalentes ao tratamento com 10,1; 20,3; 40,6; 81,2 e 162,5 $\mu\text{g/mL}$ de ABDOC.

Após a avaliação do perfil de viabilidade celular de HUVEC frente aos fármacos testados, foram calculados os valores de ASC para células HUVEC demonstrados no quadro 5. O resultado apresenta diferença significativa entre o tratamento das células com ABDOC e hABDOC (teste t, $p < 0,05\%$). A citotoxicidade para as células HUVEC foi avaliada utilizando-se o índice de seletividade. Os resultados são mostrados no quadro 6.

Quadro 5 - Valores de área sob a curva da citotoxicidade induzida por ABDOC e hABDOC em células HUVEC.

ABDOC		hABDOC	
Média	Desvio	Média	Desvio
160	26	297	44

Quadro 6 - Valores de IS da citotoxicidade induzida por ABDOC e hABDOC em células HUVEC.

	Trofozoítos				Cistos				
	A. <i>castellani</i> <i>i</i>		IC01		A. <i>castellani</i> <i>i</i>		IC01		
	48h	96h	48h	96h	48h	96h	48h	96h	
ABDOC	2,6 1	3,5 2	1,2 8	1, 1	ABDOC	1,2 6	0,3 5	1,0 8	0,8 8
hABDOC	3,7 2	5,7 3	2,1 5	1, 4	hABDOC	2,2 9	3,0 9	1,9 1	2

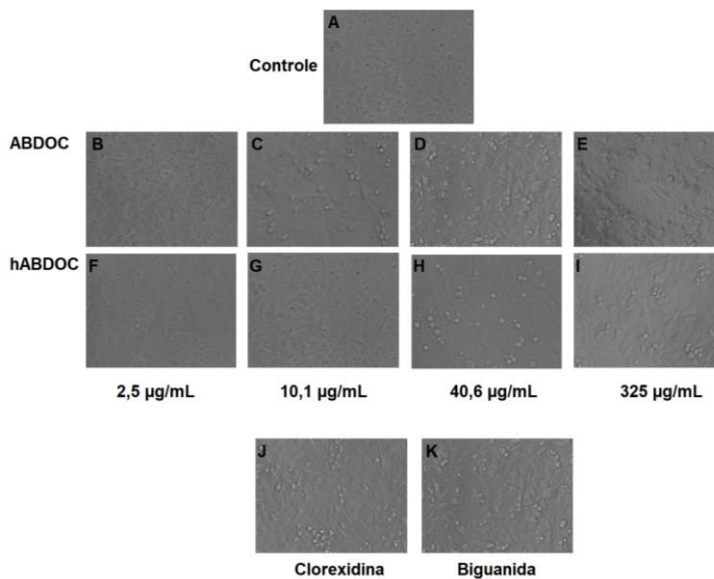
O IS tem por objetivo medir a atividade do fármaco testado em causar dano celular ao protozoário, diminuindo a viabilidade celular sem causar danos à viabilidade das células do hospedeiro. Neste trabalho, o IS foi calculado a partir da razão entre as ASC das células HUVEC e ASC dos testes de viabilidade amebiana.

Pode-se observar pelos resultados apresentados, que em todos os testes realizados, a formulação hABDOC mostra-se com maior índice de seletividade. Dessa forma, é possível inferir que apesar de não haver diferença significativa entre o tratamento com ABDOC e hABDOC ($p > 0,05$) quanto a atividade antiamebiana; nesta última há

uma tendência de melhor atividade biológica contra *Acanthamoeba* spp. e menor citotoxicidade sobre as células do hospedeiro.

Observou-se por microscópio de luz invertido, a morfologia celular de HUVEC após o período de tratamento com ABDOC, hABDOC, CLX e PHMB. Durante a análise observacional da morfologia das células foi possível perceber o arredondamento celular e seu desprendimento da monocamada devido ao aumento da concentração de ABDOC e nos controles com CLX e PHMB, conforme demonstrado pela figura 20, enquanto nos tratamentos com hABDOC as células apresentaram morfologia e características da monocamada semelhantes ao controle negativo.

Figura 20 - Representação esquemática da morfologia das células HUVEC após 48h de tratamento com ABDOC e hABDOC.



(A) Controle negativo; ABDOC (B, C, D, E), hABDOC (F, G, H, I), CLX (J) e PHMB (K). Aumento de 100x.

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, objetivou-se desenvolver e avaliar uma formulação tópica de uso ocular de AB previamente aquecida e associada a um sistema de geleificação termorreversível *in situ* para o tratamento da ceratite amebiana. A CA é uma infecção grave da córnea, que pode levar a casos definitivos de cegueira e indicação para transplante de córnea (LORENZO-MORALES *et al.*, 2015). A falta de protocolos para o tratamento de CA (VISVESVARA, 2013) associado a alta resistência das formas císticas de *Acanthamoeba* spp. (LLOYD, 2014), leva a necessidade do estudo de novas alternativas para a terapêutica da CA, que sejam eficazes contra as formas trofozoíticas e císticas e que apresentem baixa citotoxicidade para as células de córnea.

A AB é um composto de origem natural, descoberta na década de 1950 e ainda amplamente utilizada em casos de infecções fúngicas (SILVA-FILHO *et al.*, 2012). Está disponível comercialmente como uma suspensão coloidal, na qual o DOC é utilizado para a sua solubilização (VYAS e GUPTA, 2006; BARRATT e BRETAGNE, 2007) e exerce ação alterando a permeabilidade celular, induzindo a formação de poros através das membranas lipídicas dos microrganismos resultando em morte celular (BOLARD, 1986; MESA-ARANGO *et al.*, 2012; NEUMANN *et al.*, 2016).

Desde sua aprovação para uso clínico pela FDA em meados de 1960, continua sendo amplamente utilizada e considerada medicamento padrão – ouro para infecções fúngicas sistêmicas (TOLLEMAR *et al.*, 2001; JOHNSON e EINSTEIN, 2007), devido a seu amplo espectro de ação e baixas taxas de resistência (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2003).

No final dos anos 1970, Ernst *et al.*, descreveram mudanças nas propriedades físico-químicas da Anfotericina B após aquecimento (Apud SILVA-FILHO *et*

al., 2012). Em 1997, Gaboriau e colaboradores descreveram que o aquecimento de AB leva a produção de superagregados e que este aquecimento não acarreta prejuízo na atividade do fármaco.

Este aumento no tamanho das partículas foi relatado também por Van Etten e colaboradores (2000) e está relacionado à característica anfifílica da AB e sua tendência de associação e formação de agregados (KAMÍŃSKI, 2014). Quando em meio aquoso (polar), a região apolar (hidrofóbica) tende a proteger-se, deixando a região polar (hidrofílica) em contato com o meio e o contrário será verdadeiro caso a ABDOC seja exposta a um ambiente apolar (OLIVEIRA, 2008).

Neste trabalho, pretendeu-se obter os superagregados de AB através do seu aquecimento a 70°C por 20 minutos. Após o seu aquecimento, as amostras de ABDOC apresentaram mudanças em sua turbidez e coloração; esta última passou de amarelo límpido para amarelo opaco. Também foi avaliada a obtenção dos superagregados de AB através da sua visualização por MET. Esta análise permitiu a observação de grandes “aglomerados” de AB, após seu aquecimento comprovando a obtenção dos superagregados.

De forma a caracterizar a estabilidade física dos superagregados, foram analisados os tamanhos de partícula e índices de polidispersão (PDI) de ABDOC e hABDOC por DLS. Esta técnica é amplamente disseminada no meio científico, trata-se de uma metodologia na qual é fornecida a média de intensidade de espalhamento de luz das partículas que estão em movimento browniano em um sistema de suspensão (GOLDBURG, 1999). De fato, os resultados encontrados demonstraram um aumento do tamanho de partícula após o aquecimento. De acordo com estudos supracitados, a formação destes superagregados se dá pela condensação das formas monoméricas de AB, e atinge seu pico de formação a 70°C.

O PDI indica heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão; variações em seus valores em função do tempo indicam formação de populações de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente, podendo ser decorrente de agregação ou quebra/degradação de partículas (SOUZA et al, 2011).

O índice de polidispersão pode variar de 0 a 1, e valores próximos a zero demonstram dispersões homogêneas enquanto que valores maiores que 0,7 indicam alta heterogeneidade das populações dispersas (ZHANG e KOSARAJU, 2007; Malvern Instruments Manuel Guide, 2011). Os resultados demonstraram que há estreita faixa de diâmetros para as formulações de hABDOC, estando sempre próximas a 0,3, comprovando a estabilidade térmica da formulação aquecida conforme os dados descritos na literatura (VAN ETTEN *et al.*, 2000; ZIA *et al.*, 2016). A formulação ABDOC, por sua vez, demonstra aumento progressivo do PDI na formulação armazenada a 4°C, e índices instáveis para o armazenamento em 25°C e 37°C.

Sabe-se que em soluções aquosas, a AB existe na forma de um sistema heterogêneo (PETIT *et al.*, 1998), apresentando forma monoméricas, oligoméricas, agregados de ABDOC e micelas puras de DOC (LAMY-FREUND *et al.*, 1989; FILIPPIN e SOUZA, 2006). O aquecimento da AB resulta em condensação dos monômeros e aumento do tamanho de seus agregados, levando a um novo equilíbrio entre as formas (PETIT *et al.*, 1998). Por consequência, há redução na toxicidade da formulação (GABORIAU, *et al.*, 1997; PETIT *et al.*, 1998), que apresentam maior seletividade pelo ergosterol presente nas membranas dos microrganismos.

A recomendação da indústria farmacêutica para o armazenamento da suspensão de AB após a sua reconstituição (5mg/mL), é estocá-la sob refrigeração (2° a 8°C) e protegida da luz. Dessa forma, é possível estocar o

medicamento para utilização por até uma semana (Bristol-Myers Squibb – *PRODUCT MONOGRAPH*, 2009). Para uso ocular, a AB é utilizada empiricamente através da sua diluição em água esterilizada, sendo necessárias instilações a cada 1h por parte do paciente (MÜLLER, 2013). Entre seus efeitos colaterais estão listados: irritação, dor, ardor; o que acarretam em baixa tolerabilidade e adesão ao tratamento (MORAND *et al.*, 2007; CHHONKER *et al.*, 2015).

Muitos estudos vêm reportando o objetivo de diminuir os efeitos colaterais associados tanto ao uso sistêmico, quanto o uso ocular de AB (VYAS e GUPTA, 2006; BARRATT e BRETAGNE, 2007; MORAND *et al.*, 2007; CHHONKER *et al.*, 2015; DA SILVEIRA *et al.*, 2016). Nestes últimos, os pesquisadores pretendem escapar da fisiologia ocular, formada por diversas barreiras que objetivam proteger o olho da entrada de agentes externos e aumentar o tempo de retenção de medicamentos na córnea; para aumentar a biodisponibilidade dos fármacos no olho e para diminuir a frequência de uso das formulações (LUDWIG, 2005; MAYOL *et al.*, 2008; SHASTRI, D. *et al.*, 2010).

Este estudo propôs a incorporação de ABDOC e hABDOC em um sistema de geleificação *in situ* termorreversível para o tratamento da CA. Estes sistemas, em baixas temperaturas são aplicados como uma solução, mas quando em contato com a temperatura pré-corneal sofrem uma reorganização micelar tornando-se mais viscosos e permanecendo por mais tempo no local de ação desejado (NIE *et al.*, 2011; LOU *et al.*, 2014; DESTRUDEL *et al.*, 2017). Para tanto, foram utilizados como polímeros os poloxamers F-127 e F-68.

Quando em baixas temperaturas, os blocos de polímeros são hidratados e relativamente solúveis em água. Com o aumento da temperatura, as cadeias químicas tornam-se menos solúveis resultando em interações

hidrofóbicas e formação de micelas (GRATIERI *et al.*, 2010; LOU *et al.*, 2014). A desidratação da região hidrofóbica das cadeias de PEO e PPO é o passo inicial para a formação da estrutura do gel (ABELHA, 2012). O teste de verificação da temperatura de geleificação demonstrou um sistema que escoava livremente em temperaturas abaixo de 35°C e que ao ser aquecido geleifica-se. Com a incorporação de AB no sistema, houve diminuição da temperatura de geleificação para 30°C, indicando que a incorporação de AB no gel termorreversível auxiliou na formação de micelas, necessárias para a geleificação. Estes resultados representam um sistema de geleificação adequado para a aplicação ocular, uma vez que a temperatura da córnea se aproxima da temperatura fisiológica (CANNING *et al.*, 2002).

Para obter boa penetração através da córnea, um fármaco precisa apresentar características hidrofílicas e hidrofóbicas simultaneamente, uma vez que a córnea pode ser observada com uma estrutura trilaminar: “lipídeo-água-lipídeo”, correspondentes ao epitélio, estroma e endotélio corneal, respectivamente (MELO-FILHO, 2010). Os géis oftálmicos prolongam seu contato com a córnea por apresentarem propriedades mucoadesivas, decorrentes de sua elevada viscosidade e liberam o medicamento por difusão após erosão do polímero que se hidrolisa (AL KHATEB *et al.*, 2016; DESTRUDEL *et al.*, 2017).

Para o paciente em tratamento de ceratite infecciosa, o ideal é o uso de uma formulação farmacêutica que possa aumentar o tempo de retenção do fármaco no sítio de ação. Um aumento de minutos no tempo de residência pré-corneal pode significar aumento na biodisponibilidade, redução da dosagem administrada e frequência de instilação. Dessa maneira, há aumento na aceitação do medicamento e permanência do paciente no

esquema de tratamento (EDSMAN *et al.*, 1998; SHASTRI *et al.*, 2010).

Naginton *et al.*, (1974) descreveram o primeiro caso de ceratite por *Acanthamoeba* spp. e, desde então não há um único tratamento específico e de baixa citotoxicidade sob a córnea humana descrito para casos de infecções oculares acantamebianas (LORENZO-MORALES *et al.*, 2015; CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2017). Fatores como a ausência de um tratamento que erradique ambas as formas de vida, trofozoítos e cistos, associado aos efeitos colaterais devido ao uso a longo prazo dos medicamentos antimicrobianos, fazem da CA uma urgência oftálmica, considerada um problema de saúde pública (CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2017).

Atualmente dentre as recomendações medicamentosas para o tratamento da CA, estão compostos pertencentes à classe das biguanidas e diamidinas em concentrações que variam de 0,02% a 0,1%, sendo utilizados a cada hora pelos primeiros 3 dias de tratamento (TRABELSI *et al.*, 2012; VISVESVARA, 2013; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015; CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2017). E, devido à toxicidade destes agentes no tecido ocular, os pacientes são acompanhados de perto até o decréscimo na frequência de instilação dos colírios (CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2017).

A CLX e PHMB são comumente utilizados para o tratamento da CA, mas seu uso diário e em longo prazo acarreta o surgimento de efeitos colaterais como falta de regeneração corneal, ocorrência de catarata, atrofia da íris, ulceração de córnea, glaucoma, hiperemia e fotofobia (KOSRIRUKVONGS *et al.*, 1999; FURRER *et al.*, 2002; EHLERS e HJORTDAL, 2004; HERZ *et al.*, 2008; PALME *et al.*, 2017). De forma a fornecer maior conforto ao paciente durante o tratamento, na maioria dos casos são associados o uso de colírios cicloplégicos para analgesia e paralisação da acomodação visual.

De acordo com Ehlers e Hjortdal (2004), CLX e PHMB não apresentam especificidade de interação com o metabolismo do protozoário, e acabam afetando a integridade das membranas celulares do hospedeiro, levando a morte celular. Herz e seus colaboradores (2008), afirmam que a CLX é capaz de provocar estresse oxidativo e contribuir para a formação de cataratas, alterando as membranas lipídicas e induzindo alterações eletrolíticas.

Ainda nesse contexto, quando usuários de lentes de contato utilizam CLX e PHMB poderá ocorrer piora dos efeitos colaterais; uma vez que estes fármacos são capazes de ligar-se as lentes de contato e, por consequência, terão aumentado seu tempo de retenção na córnea induzindo aumento de sua permeabilidade (CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2017).

De modo complementar, os medicamentos antifúngicos também são considerados no tratamento da CA; estão dentre estes a neomicina, itraconazol, clotrimazol e voriconazol (TU *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2011; TRABELSI *et al.*, 2012; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

O uso tópico ocular de AB é indicado em casos de ceratites fúngicas, especialmente aquelas causadas por espécies de *Candida* (SAID *et al.*, 2011). Entretanto, alguns relatos na literatura descrevem casos de pacientes utilizando colírio de AB para o tratamento da CA, como por exemplo, o estudo publicado por SIDDIQUI *et al.* (2014).

Neste estudo, foram relatados dois casos de pacientes do sexo feminino, usuárias de lentes de contato, que obtiveram o diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba* spp. e realizaram como tratamento inicial uma associação de fármacos utilizados a cada hora; dentre eles, colírios de Moxifloxacino, Vancomicina, Amikacina, Anfotericina B e uma pomada de Propamidina. Apesar de não ser amplamente citada entre os fármacos utilizados para CA, a

AB é utilizada pelos oftalmologistas durante o início do tratamento de casos de ceratite infecciosa, pois poderá ser fúngica ou mesmo coinfeção. É necessário considerar que em casos de ceratites infecciosas não se pode esperar o resultado do exame laboratorial para se iniciar o tratamento.

Em casos de ceratites infecciosas justifica-se o uso da combinação de diversos antimicrobianos, levando-se em consideração que em muitos dos casos há a incorreta avaliação do agente causador, uma vez que os sinais e sintomas entre as ceratites infecciosas são semelhantes (CLAERHOUT *et al.*, 2004; ANANE *et al.*, 2008; KOVACEVIĆ *et al.*, 2008; LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

A AB é estudada em diversos trabalhos que objetivam avaliar sua atividade amebicida potencial contra *Acanthamoeba* spp. (LIM *et al.*, 2000; MATTANA *et al.*, 2004; IOVIENO *et al.*, 2014; NAKAMINAMI *et al.*, 2017) e outros protozoários (LACHAUD *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2010; PURKAIT *et al.*, 2012; PURKAIT *et al.*, 2015).

No presente estudo, os testes de avaliação da atividade biológica das formulações de AB (ABDOC e hABDOC) tiveram como finalidade avaliar a efetividade das formulações frente a trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp. Neste sentido, observou-se que ambas as formulações de AB, apresentaram atividade contra trofozoítos e cistos, tanto para a cepa padrão ATCC 50492, isolada de um paciente com CA no início da década de 1980 e muito utilizada para testes de novos fármacos visando atividade amebicida (RÓDIO *et al.*, 2008; SIDDIQUI e KHAN, 2012b; BORASE *et al.*, 2013; VERÍSSIMO *et al.*, 2013); quanto para o isolado regional obtido pelo LAPEO no ano de 2015 e ainda com suas características de patogenia e virulência preservadas, pois

foram utilizados entre o 3° ao 5° subcultivos pós-isolamento.

Devido a estas características, observou-se um perfil de menor sensibilidade do isolado regional em comparação com a cepa ATCC (cultivada por longo tempo no laboratório), tanto nos testes das formulações frente aos trofozoítos quanto aos cistos, provavelmente já não expressando vários fatores de virulência. Isolados mais virulentos de *Acanthamoeba* spp. apresentam-se mais resistentes aos fármacos, pois tem maior capacidade de encistamento, altas taxas de reprodução, tolerância a altas temperaturas (WALOCHNIK *et al.*, 2000). Estudos demonstram que essa perda de virulência não é permanente, podendo ser atenuada através da passagem do protozoário por modelo animal (MAZUR e HADAŚ, 1994; KÖHLER *et al.*, 2008; VERÍSSIMO *et al.*, 2013).

Além disso, os resultados dos testes de atividade amebicida permitiram observar que não somente a ABDOC apresenta atividade contra *Acanthamoeba* spp., mas a formulação de ABDOC pré-aquecida também, demonstrando que o aquecimento prévio de ABDOC não acarretou em perda ou prejuízos de atividade farmacológica. E mais, hABDOC demonstrou ser tão efetiva quanto CLX e PHMB em sua atividade cisticida quando avaliada após 96 h de tratamento das amebas.

A atividade amebicida *in vitro* das formulações de AB foi dependente da dose e do tempo de incubação. Este perfil dose e tempo dependente de AB é amplamente relatado em diversos estudos (COHEN, 1986; BURGESS *et al.*, 2000; WALSH *et al.*, 2000; ANDES, 2003). Neste trabalho observou-se que a viabilidade amebiana variou entre 48 e 96 horas, ocorrendo diminuição da viabilidade quanto maior o tempo de incubação e maior concentração das formulações de AB.

O pré-aquecimento da AB não influenciou em sua atividade antimicrobiana, como reportado por Gaboriau *et*

al. (1997) e Van Etten *et al.* (2000), que não encontraram diferenças entre o tratamento com ABDOC e hABDOC em células de *Candida albicans* em relação a ação fungicida/fungistática. Petit *et al.* (1999) avaliaram o uso de hABDOC para o tratamento da leishmaniose. Neste estudo, foi reportado uma melhor atividade biológica de hABDOC quando comparada a ABDOC frente às formas amastigotas de *Leishmania donovani*, assim como uma menor toxicidade relacionada a hABDOC. CHÉRON *et al.* (2003), avaliou os mecanismos pelos quais há melhora na atividade biológica de hABDOC frente a *Leishmania donovani*, evidenciando o aumento de absorção do medicamento por células de macrófagos, como também a menor citotoxicidade apresentada por hABDOC devido a menor quantidade de AB livre no soro.

No presente estudo, os resultados de avaliação citotóxica frente a HUVEC demonstraram que hABDOC apresentou menor ação citotóxica em relação a ABDOC, como em relação aos fármacos mais utilizados para o tratamento da CA, como a CLX e PHMB.

Vários trabalhos têm aplicado sistemas de geleificação *in situ* termorreversível para uso tópico ocular visando a entrega de antimicrobianos, permitindo o aumento do tempo de retenção de fármacos e melhoramento na biodisponibilidade frente à córnea (SHASTRI, D. H. *et al.*, 2010; NANJWADE *et al.*, 2012; KESAVAN *et al.*, 2016; MAKWANA *et al.*, 2016).

Tendo em vista a fisiopatologia da CA e as complicações decorrentes desta desordem, além das características de atividade amebicida de ABDOC e hABDOC (atividade amebicida dependente da dose e tempo de contato), o emprego de um sistema de geleificação *in situ* termorreversível de uso tópico ocular associado a hABDOC poderá ser promissor para o tratamento da CA.

Para a avaliação do comportamento amebiano frente à formulação geleificante *in vitro*, foi necessário garantir a aplicação de concentrações de uso das formulações de AB, visando avaliar o grau de recuperação dos trofozoítos e mesmo se as formulações induziam ao encistamento. Com o tempo de contato por 48 horas e aumento da concentração das formulações de AB, pode-se perceber a diminuição do número de trofozoítos recuperados, além disso, observou-se que o maior tempo de retenção inibiu a formação de cistos. O contato das formas recuperadas em cultivo monoxênico por 7 dias com as diferentes concentrações das formulações de AB (alíquotas de 25 μ l do gel termorreversível), já não era mais possível observar formas amebianas. O tratamento de ceratites infecciosas é longo; o uso de AB tópico para o tratamento de ceratites fúngicas pode alcançar cerca de 12 semanas (SUN *et al.*, 2007). Portanto, mais estudos sobre formulação geleificante associada à hABDOC, que por atividade amebicida e por aumentar o tempo de residência do fármaco no sítio de ação, assim como diminuir a frequência de instilação de colírio, poderá ser uma nova alternativa para a terapêutica da CA.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a hABDOC não afetou a viabilidade das células HUVEC e apresentou menor toxicidade comparada a ABDOC convencional. A partir do aquecimento prévio de ABDOC, houve o rearranjo molecular das partículas em suspensão e formação de superagregados. O aumento no tamanho das partículas pela formação de superagregados está relacionado com a menor citotoxicidade da formulação pré-aquecida quando comparada a AB-DOC convencional, isto porque a maior estabilidade termodinâmica apresentada por hABDOC influencia sua associação com membranas lipídicas (ZIA *et al.*, 2016).

Buscando-se novas alternativas para a terapia da CA, a hABDOC pode vir a tornar-se uma estratégia a ser

utilizada como um potente antiamebiano, com baixa citotoxicidade, baixo custo, como também poderá ser aplicado em casos de coinfeções fúngicas da córnea. Aliado a isso, a associação de hABDOC a um sistema de geleificação *in situ* poderá ser promissor para o tratamento da ceratite amebiana pelo aumento de retenção do fármaco na superfície ocular. Ressalta-se a necessidade de estudos complementares para caracterização reológica da formulação tópica ocular de superagregados de anfotericina B associada a um sistema de geleificação *in situ* termorreversível para o tratamento da ceratite amebiana desenvolvido no presente estudo.

7 CONCLUSÕES

O pré-aquecimento de ABDOC leva ao seu rearranjo molecular, levando a formação de grandes partículas denominadas de superagregados;

- Os superagregados obtidos pelo aquecimento a 70°C por 20 min de ABDOC demonstram estabilidade térmica após seu armazenamento por 90 dias em diferentes temperaturas;
- ABDOC e hABDOC demonstraram ação antitrofozoítica e anticística contra diferentes cepas/isolados de *Acanthamoeba* spp.;
- A atividade amebicida *in vitro* das formulações contra a cepa *A. castellanii* isolado regional de *Acanthamoeba* spp. foi dependente do tempo de incubação e da dose.
- hABDOC demonstrou menor citotoxicidade e maior seletividade frente a células HUVEC quando comparada ao tratamento com ABDOC;
- A associação entre um sistema de geleificação *in situ* e hABDOC pode representar uma alternativa promissora para o tratamento para a CA.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliação da integridade das membranas de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. após a exposição às formulações de AB por microscopia eletrônica – análise ultraestrutural;
- Avaliação da toxicidade das formulações ABDOC e hABDOC através de ensaios de membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha;
- Avaliação reológica de ABDOC e hABDOC para verificação de alteração na viscosidade e turbidez após o aquecimento;
- Realização dos testes de citotoxicidade celular sob células da córnea;
- Realização de coculturas celulares de amebas e células da córnea;
- Realização dos testes de liberação de ABDOC e hABDOC do sistema de geleificação *in situ* termorreversível.

REFERÊNCIAS

ABELHA, T. F. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica para veiculação de siRNA na terapia gênica da córnea: gel termorreversível e nanodispersões de cristal líquido**. 2012. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2012.

AL KHATEB, K. et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. **Int J Pharm**, v. 502, n. 1-2, p. 70-9, Apr 2016. ISSN 1873-3476. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26899977> >.

ALKHARASHI, M. et al. Medical interventions for acanthamoeba keratitis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD010792, 2015. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25710134> >.

AMENDOLA, V. A general technique to investigate the aggregation of nanoparticles by transmission electron microscopy. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 15, n. 5, p. 3545-51, May 2015. ISSN 1533-4880. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26504975> >.

ANANE, S. et al. [Acanthamoeba keratitis: diagnosis to consider]. **Sante**, v. 18, n. 4, p. 209-13, 2008 Oct-Dec 2008. ISSN 1157-5999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19810616> >.

ANDES, D. *In vivo* pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 4, p. 1179-86, Apr 2003. ISSN 0066-

4804. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654644> >.

BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. **Curr Drug Metab**, v. 10, n. 5, p. 459-69, Jun 2009. ISSN 1875-5453. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19689243> >.

BARRATT, G.; BRETAGNE, S. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. **Int J Nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 301-13, 2007. ISSN 1176-9114. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18019830> >.

BOLARD, J. Interaction of polyene antibiotics with membrane lipids: physicochemical studies of the molecular basis of selectivity. **Drugs Exp Clin Res**, v. 12, n. 6-7, p. 613-8, 1986. ISSN 0378-6501. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3527632> >.

BORASE, H. P. et al. Amoebicidal activity of phytosynthesized silver nanoparticles and their in vitro cytotoxicity to human cells. **FEMS Microbiol Lett**, v. 345, n. 2, p. 127-31, Aug 2013. ISSN 1574-6968. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746354> >.

BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. **J Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 95-111, Oct 1968. ISSN 0021-9525. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5678452> >.

BOWERS, B.; KORN, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. **J Cell Biol**, v. 41, n. 3, p. 786-805, Jun 1969. ISSN 0021-

9525. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5768875>>.

BURGESS, D. S. et al. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 36, n. 1, p. 13-8, Jan 2000. ISSN 0732-8893. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10744363>>.

CALDEIRA, L. R. **Nanoemulsões carregadas com anfotericina B para o tratamento das leishmanioses: uma nova abordagem**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CANNING, C. R. et al. Fluid flow in the anterior chamber of a human eye. **IMA J Math Appl Med Biol**, v. 19, n. 1, p. 31-60, Mar 2002. ISSN 0265-0746. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408223>>.

CAO, J. et al. Prevalence of infectious keratitis in Central China. **BMC Ophthalmol**, v. 14, p. 43, Apr 2014. ISSN 1471-2415. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690368>>.

CARIELLO, A. J. et al. Microbial keratitis at a referral center in Brazil. **Int Ophthalmol**, v. 31, n. 3, p. 197-204, Jun 2011. ISSN 1573-2630. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21448786>>.

CARLESSO, A. M. **Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes do hospital de clínicas de Porto Alegre - RS**. 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e

do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CARNT, N.; STAPLETON, F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. **Ophthalmic Physiol Opt**, v. 36, n. 2, p. 77-92, Mar 2016. ISSN 1475-1313. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691018>>.

CARRIJO-CARVALHO, L. C. et al. Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus. **Surv Ophthalmol**, v. 62, n. 2, p. 203-218, 2017 Mar - Apr 2017. ISSN 1879-3304. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27836717>>.

CARVALHO, F. R. et al. Twenty years of acanthamoeba keratitis. **Cornea**, v. 28, n. 5, p. 516-9, Jun 2009. ISSN 1536-4798. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421047>>.

CASTRILLÓN, J. C.; OROZCO, L. P. [*Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites]. **Rev Chilena Infectol**, v. 30, n. 2, p. 147-55, Apr 2013. ISSN 0716-1018. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23677153>>.

CAUMO, K. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 103, n. 6, p. 477-85, Sep 2009. ISSN 1364-8594. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695153>>.

CHHONKER, Y. S. et al. Amphotericin B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 1451-8, Jan

2015. ISSN 1879-0003. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453292>>.

CHOMICZ, L. et al. Emerging Threats for human health in Poland: pathogenic isolates from drug resistant *Acanthamoeba* keratitis Monitored in terms of Their In Vitro Dynamics and Temperature Adaptability. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 231285, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26682216>>.

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B. et al. Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. **J Eukaryot Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 153-8, 2005 Mar-Apr 2005. ISSN 1066-5234. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817120>>.

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B. et al. *Acanthamoeba culbertsoni*: Electron-Dense Granules in a Highly Virulent Clinical Isolate. **J Eukaryot Microbiol**, Apr 2016. ISSN 1550-7408. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27087641>>.

CHÉRON, M. et al. Heat-induced reformulation of amphotericin B-deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 6, p. 904-10, Dec 2003. ISSN 0305-7453. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613963>>.

CLAERHOUT, I. et al. Delay in diagnosis and outcome of acanthamoeba keratitis. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 242, n. 8, p. 648-53, Aug 2004. ISSN 0721-832X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15221303>>.

CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The immunobiology of *acanthamoeba* keratitis. **Microbes Infect**, v. 8, n. 5, p. 1400-5, Apr 2006a. ISSN 1286-4579. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697233> >.

CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 4, p. 175-80, Apr 2006b. ISSN 1471-4922. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500148> >.

COHEN, B. E. Concentration and time dependence of amphotericin B induced permeability changes across ergosterol-containing liposomes. **Biochim Biophys Acta**, v. 857, n. 1, p. 117-22, May 1986. ISSN 0006-3002. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3964702> >.

COPE, J. R. et al. Contact lens wearer demographics and risk behaviors for contact lens-related eye infections -- United States, 2014. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 64, n. 32, p. 865-70, Aug 2015. ISSN 1545-861X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26292204> >.

COPE, J. R. et al. *Acanthamoeba* Keratitis among rigid gas permeable contact lens wearers in the United States, 2005 through 2011. **Ophthalmology**, v. 123, n. 7, p. 1435-41, Jul 2016. ISSN 1549-4713. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27117780> >.

CURRY, Eunice Stella Jardim. **Ceratite microbiana: diagnóstico, tratamento e evolução clínica**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em

Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

DA SILVEIRA, W. L. et al. Development and characterization of a microemulsion system containing amphotericin b with potential ocular applications. **Curr Drug Deliv**, v. 13, n. 6, p. 982-93, 2016. ISSN 1875-5704. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26549650>>.

DART, J. K.; SAW, V. P.; KILVINGTON, S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009. **Am J Ophthalmol**, v. 148, n. 4, p. 487-499.e2, Oct 2009. ISSN 1879-1891. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19660733>>.

DE OLIVEIRA, T. R. **Caracterização estrutural de agregados formados pelo antifúngico Anfotericina B e lipídios catiônicos**: uma possível formulação farmacêutica. 2008. 156 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DESTRUEL, P. L. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of in situ gelling systems for sustained topical ophthalmic delivery: state of the art and beyond. **Drug Discov Today**, v. 22, n. 4, p. 638-651, Apr 2017. ISSN 1878-5832. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28017837>>.

DINI, L. A. et al. Unusual case of *Acanthamoeba polyphaga* and *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in a contact lens wearer from Gauteng, South Africa. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 826-9, Feb 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655392>>.

DUARTE, A. G. et al. Disseminated acanthamoebiasis after lung transplantation. **J Heart Lung Transplant**, v. 25, n. 2, p. 237-40, Feb 2006. ISSN 1557-3117. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446227> >.

DUARTE, M. C. B. **Ceratites infecciosas: fatores associados à positividade das culturas**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

DUDLEY, R.; JARROLL, E. L.; KHAN, N. A. Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. **Exp Parasitol**, v. 122, n. 4, p. 338-43, Aug 2009. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389397> >.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. **Eur J Pharm Sci**, v. 6, n. 2, p. 105-12, Apr 1998. ISSN 0928-0987. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9795025> >.

EHLERS, N.; HJORTDAL, J. Are cataract and iris atrophy toxic complications of medical treatment of acanthamoeba keratitis? **Acta Ophthalmol Scand**, v. 82, n. 2, p. 228-31, Apr 2004. ISSN 1395-3907. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15043548> >.

EL SAHLY, H. et al. Survival of an AIDS patient after infection with *Acanthamoeba* sp. of the central nervous system. **Infection**, Jun 2017. ISSN 1439-0973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28639141> >.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista**

Brasileira de Ciências Farmacêuticas, [s.l.], v. 42, n. 2, p.167-194, jun. 2006.

FOUQUE, E. et al. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae.

Eukaryot Cell, v. 11, n. 4, p. 382-7, Apr 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366126> >.

FURRER, P.; MAYER, J. M.; GURNY, R. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 53, n. 3, p. 263-80, May 2002. ISSN 0939-6411. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11976014> >.

GABORIAU, F. et al. Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B. **Biophys Chem**, v. 66, n. 1, p. 1-12, May 1997. ISSN 0301-4622. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17029866> >.

GABORIAU, F. et al. Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its in vitro toxicity: a new way to improve its therapeutic index. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 11, p. 2345-51, Nov 1997. ISSN 0066-4804. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371331> >.

GANIS, P. et al. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. **J Am Chem Soc**, v. 93, n. 18, p. 4560-4, Sep 1971. ISSN 0002-7863. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5131155> >.

GOLDBURG, W. I. Dynamic light scattering. **American Journal of Physics**, [s.l.], v. 67, n. 12, p.1152-1160, dez. 1999. American Association of Physics Teachers (AAPT). <http://dx.doi.org/10.1119/1.19101>.

GRÜN, A. L.; STEMPLEWITZ, B.; SCHEID, P. First report of an *acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. **Parasitol Res**, v. 113, n. 6, p. 2395-400, Jun 2014. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24802868> >.

GUPTA, S. et al. Role of voriconazole in combined *acanthamoeba* and fungal corneal ulcer. **Cont Lens Anterior Eye**, v. 34, n. 6, p. 287-9, Dec 2011. ISSN 1476-5411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21733740> >.

HAMILTON-MILLER, J. M. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. **Bacteriol Rev**, v. 37, n. 3, p. 166-96, Sep 1973. ISSN 0005-3678. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4202146> >.

HERZ, N. L.; MATOBA, A. Y.; WILHELMUS, K. R. Rapidly progressive cataract and iris atrophy during treatment of *acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology**, v. 115, n. 5, p. 866-9, May 2008. ISSN 1549-4713. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452764> >.

HONG, J. et al. An unusual case of *Acanthamoeba Polyphaga* and *Pseudomonas Aeruginosa* keratitis. **Diagn Pathol**, v. 9, p. 105, 2014. ISSN 1746-1596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24894486> >.

IBRAHIM, Y. W.; BOASE, D. L.; CREE, I. A.
Epidemiological characteristics, predisposing factors and
microbiological profiles of infectious corneal ulcers: the
Portsmouth corneal ulcer study. **Br J Ophthalmol**, v. 93,
n. 10, p. 1319-24, Oct 2009. ISSN 1468-2079. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502241> >.

ILLINGWORTH, C. D.; COOK, S. D. Acanthamoeba
keratitis. **Surv Ophthalmol**, v. 42, n. 6, p. 493-508, 1998
May-Jun 1998. ISSN 0039-6257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9635900> >.

IOVIENO, A. et al. Cysticidal activity of antifungals
against different genotypes of Acanthamoeba. **Antimicrob
Agents Chemother**, v. 58, n. 9, p. 5626-8, Sep 2014.
ISSN 1098-6596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001304> >.

JOHNSON, R. H.; EINSTEIN, H. E. Amphotericin B and
coccidioidomycosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1111, p. 434-
41, Sep 2007. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513463> >.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV,
V. Y. Pluronic block copolymers as novel polymer
therapeutics for drug and gene delivery. **J Control
Release**, v. 82, n. 2-3, p. 189-212, Aug 2002. ISSN 0168-
3659. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175737> >.

KAJI, Y. et al. Toxicities and pharmacokinetics of
subconjunctival injection of liposomal amphotericin B.
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, v. 247, n. 4, p. 549-
53, Apr 2009. ISSN 1435-702X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043733> >.

KASHIWABUCHI, R. T. et al. Corneal graft survival after therapeutic keratoplasty for Acanthamoeba keratitis. **Acta Ophthalmol**, v. 86, n. 6, p. 666-9, Sep 2008. ISSN 1755-3768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752517> >.

KESAVAN, K.; KANT, S.; PANDIT, J. K. Therapeutic effectiveness in the treatment of experimental bacterial keratitis with ion-activated mucoadhesive hydrogel. **Ocul Immunol Inflamm**, v. 24, n. 5, p. 489-92, Oct 2016. ISSN 1744-5078. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26133969> >.

KOSRIRUKVONGS, P.; WANACHIWANAWIN, D.; VISVESVARA, G. S. Treatment of acanthamoeba keratitis with chlorhexidine. **Ophthalmology**, v. 106, n. 4, p. 798-802, Apr 1999. ISSN 0161-6420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10201605> >.

KOVACEVIĆ, D. et al. Acanthamoeba keratitis: importance of the early diagnosis. **Coll Antropol**, v. 32 Suppl 2, p. 221-4, Oct 2008. ISSN 0350-6134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138028> >.

KU, J. Y.; CHAN, F. M.; BECKINGSALE, P. Acanthamoeba keratitis cluster: an increase in acanthamoeba keratitis in Australia. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 37, n. 2, p. 181-90, Mar 2009. ISSN 1442-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723126> >.

KÖHSLER, M. et al. Acanthamoeba strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. **Parasitol Res**, v. 102, n. 5, p. 1069-72, Apr 2008. ISSN 0932-0113. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18247052> >.

LACHAUD, L. et al. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 2, p. e16-22, Jan 2009. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19093811> >.

LAKHUNDI, S.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Pathogenesis of microbial keratitis. **Microb Pathog**, Dec 2016. ISSN 1096-1208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27998732> >.

LASJERDI, Z. et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. **Parasitol Res**, v. 109, n. 3, p. 575-80, Sep 2011. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21365453> >.

LEGRAND, P. et al. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 11, p. 2518-22, Nov 1992. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1489196> >.

LIM, L.; COSTER, D. J.; BADENOCH, P. R. Antimicrobial susceptibility of 19 Australian corneal isolates of *acanthamoeba*. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 28, n. 2, p. 119-24, Apr 2000. ISSN 1442-6404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933775> >.

LINDSAY, R. G. et al. *Acanthamoeba* keratitis and contact lens wear. **Clin Exp Optom**, v. 90, n. 5, p. 351-60, Sep 2007. ISSN 0816-4622. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17697181> >.

LLOYD, D. Encystment in *acanthamoeba castellanii*: a review. **Exp Parasitol**, v. 145 Suppl, p. S20-7, Nov 2014. ISSN 1090-2449. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24726698> >.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, v. 22, p. 10, 2015. ISSN 1776-1042. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687209> >.

LORENZO-MORALES, J. et al. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends Parasitol**, v. 29, n. 4, p. 181-7, Apr 2013. ISSN 1471-5007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433689> >.

LORENZO-MORALES, J. et al. Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5151-5, Dec 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855732> >.

LOU, J. et al. Optimization and evaluation of a thermoresponsive ophthalmic in situ gel containing curcumin-loaded albumin nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 2517-25, 2014. ISSN 1178-2013. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24904211> >.

LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 11, p. 1595-639, Nov 2005. ISSN 0169-409X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16198021> >.

MAKWANA, S. B.; PATEL, V. A.; PARMAR, S. J.
Development and characterization of in-situ gel for
ophthalmic formulation containing ciprofloxacin
hydrochloride. **Results Pharma Sci**, v. 6, p. 1-6, 2016.
ISSN 2211-2863. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26949596>>.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. Acanthamoeba
spp. as agents of disease in humans. **Clin Microbiol Rev**,
v. 16, n. 2, p. 273-307, Apr 2003. ISSN 0893-8512.
Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692099>>.

MARTÍN-NAVARRO, C. M. et al. Inhibition of 3-
hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and
application of statins as a novel effective therapeutic
approach against Acanthamoeba infections. **Antimicrob
Agents Chemother**, v. 57, n. 1, p. 375-81, Jan 2013. ISSN
1098-6596. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114753>>.

MARUJO, F. I. et al. [Distribution of infectious keratitis
in a tertiary hospital in Brazil]. **Arq Bras Oftalmol**, v. 76,
n. 6, p. 370-3, 2013 Nov-Dec 2013. ISSN 1678-2925.
Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510086>>.

MATTANA, A. et al. *In vitro* evaluation of the
effectiveness of the macrolide rokitamycin and
chlorpromazine against *acanthamoeba castellanii*.
Antimicrob Agents Chemother, v. 48, n. 12, p. 4520-7,
Dec 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561820>>.

MAYCOCK, N. J.; JAYASWAL, R. Update on acanthamoeba keratitis: diagnosis, treatment, and outcomes. **Cornea**, v. 35, n. 5, p. 713-20, May 2016. ISSN 1536-4798. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26989955> >.

MAYOL, L. et al. A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 70, n. 1, p. 199-206, Sep 2008. ISSN 0939-6411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644705> >.

MAZUR, T.; HADAŚ, E. The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. **Parasitol Res**, v. 80, n. 5, p. 431-4, 1994. ISSN 0932-0113. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7971931> >.

MELLO FILHO, Paulo Augusto de Arruda et al. Farmacologia ocular aplicada no tratamento de doenças do vítreo, retina e coróide. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, ., p.294-299, 2010.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Front Microbiol**, v. 3, p. 286, 2012. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23024638> >.

MOORE, M. B. et al. Acanthamoeba keratitis. A growing problem in soft and hard contact lens wearers. **Ophthalmology**, v. 94, n. 12, p. 1654-61, Dec 1987. ISSN 0161-6420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3431835> >.

MORAND, K. et al. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: physico-chemical and formulation stability. **Int J Pharm**, v. 344, n. 1-2, p. 150-3, Nov 2007. ISSN 0378-5173. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17669608> >.

MORESCO, G. **Eventos adversos e custo da terapia com Anfotericina B**. 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MORRISON, A. O. et al. Disseminated acanthamoeba infection presenting with cutaneous lesions in an immunocompromised patient: a case report, review of histomorphologic findings, and potential diagnostic pitfalls. **Am J Clin Pathol**, v. 145, n. 2, p. 266-70, Feb 2016. ISSN 1943-7722. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26800765> >.

MUBAREKA, S. et al. Acanthamoeba species keratitis in a soft contact lens wearer molecularly linked to well water. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, v. 17, n. 2, p. 120-2, Mar 2006. ISSN 1712-9532. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418487> >.

MÜLLER, Guilherme Gubert; KARA-JOSÉ, Newton; CASTRO, Rosane Silvestre de. Antifungals in eye infections: drugs and routes of administration. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, 72(2), p.132-141, 2013

NAGATA, M. et al. JBP485 promotes corneal epithelial wound healing. **Sci Rep**, v. 5, p. 14776, Oct 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424376> >.

NAGINTON, J. et al. Amoebic infection of the eye. **Lancet**, v. 2, n. 7896, p. 1537-40, Dec 1974. ISSN 0140-6736. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4140981> >.

NAKAMINAMI, H. et al. Evaluation of *in vitro* antiamebic activity of antimicrobial agents against clinical acanthamoeba isolates. **J Ocul Pharmacol Ther**, Jul 2017. ISSN 1557-7732. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28704121> >.

NANJWADE, B. K. et al. Formulation and evaluation of micro hydrogel of moxifloxacin hydrochloride. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 37, n. 2, p. 117-23, Jun 2012. ISSN 0378-7966. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22015966> >.

NATH, R. et al. Keratitis due to *Staphylococcus aureus* and *acanthamoeba* species following injury. **Trop Parasitol**, v. 3, n. 1, p. 86-8, Jan 2013. ISSN 2229-5070. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23961451> >.

NEELAM, S.; NIEDERKORN, J. Y. Pathobiology and immunobiology of acanthamoeba keratitis: insights from animal models. **Yale J Biol Med**, v. 90, n. 2, p. 261-268, Jun 2017. ISSN 1551-4056. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656012> >.

NEUMANN, A. et al. Membrane sterols modulate the binding mode of amphotericin b without affecting its affinity for a lipid bilayer. **Langmuir**, v. 32, n. 14, p. 3452-61, Apr 2016. ISSN 1520-5827. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27007267> >.

NIE, S. et al. Thermoreversible Pluronic F127- based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 151-66, 2011. ISSN 1178-2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499415> >.

NIYADURUPOLA, N.; ILLINGWORTH, C. D. Acanthamoeba keratitis associated with misuse of daily disposable contact lenses. **Cont Lens Anterior Eye**, v. 29, n. 5, p. 269-71, Dec 2006. ISSN 1367-0484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945570> >.

NIYYATI, M.; REZAEIAN, M. Current Status of Acanthamoeba in Iran: A Narrative Review Article. **Iran J Parasitol**, v. 10, n. 2, p. 157-63, 2015 Apr-Jun 2015. ISSN 1735-7020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26246812> >.

OLIVEIRA, T. R.; BENATTI, C. R.; LAMY, M. T. Structural characterization of the interaction of the polyene antibiotic Amphotericin B with DODAB bicelles and vesicles. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 11, p. 2629-37, Nov 2011. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839723> >.

OMAHÑA-MOLINA, M. et al. Acanthamoeba genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. **Parasitol Res**, v. 115, n. 2, p. 873-8, Feb 2016. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26581373> >.

ONDARZA, R. N.; ITURBE, A.; HERNÁNDEZ, E. In vitro antiproliferative effects of neuroleptics, antimycotics and antibiotics on the human pathogens Acanthamoeba polyphaga and Naegleria fowleri. **Arch Med Res**, v. 37, n.

6, p. 723-9, Aug 2006. ISSN 0188-4409. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824931> >.

ONG, T. Y. Y.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Brain-eating amoebae: predilection sites in the brain and disease outcome. **J Clin Microbiol**, v. 55, n. 7, p. 1989-1997, Jul 2017. ISSN 1098-660X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28404683> >.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Amphotericin B: time for a new "gold standard". **Clin Infect Dis**, v. 37, n. 3, p. 415-25, Aug 2003. ISSN 1537-6591. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12884167> >.

PACELLA, E. et al. Results of case-control studies support the association between contact lens use and Acanthamoeba keratitis. **Clin Ophthalmol**, v. 7, p. 991-4, 2013. ISSN 1177-5467. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23761962> >.

PAGE, M. A.; MATHERS, W. D. Acanthamoeba keratitis: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. **J Ophthalmol**, v. 2013, p. 670242, 2013. ISSN 2090-004X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23840938> >.

PAILA, Y. D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of Leishmania donovani into primary macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 399, n. 3, p. 429-33, Aug 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20678487> >.

PALME, C. et al. Severe reactive ischemic posterior segment inflammation in Acanthamoeba keratitis: Case report of a patient with Sjögren's syndrome. **Spektrum**

Augenheilkd, v. 31, n. 1, p. 10-13, 2017. ISSN 0930-4282. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386159> >.

PANJWANI, N. Pathogenesis of acanthamoeba keratitis. **Ocul Surf**, v. 8, n. 2, p. 70-9, Apr 2010. ISSN 1542-0124. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20427010> >.

PAPPAS, P. G. et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 5, p. 690-9, Sep 2001. ISSN 1058-4838. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477526> >.

PATEL, H. R.; PATEL, R. P.; PATEL, M. M. Poloxamers: pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. **Inter J of Pharmtech Res**, v. 1, n. 2, p.299-303, 2009.

PATEL, D. V.; MCGHEE, C. N. Acanthamoeba keratitis: a comprehensive photographic reference of common and uncommon signs. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 37, n. 2, p. 232-8, Mar 2009. ISSN 1442-9071. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723132> >.

PENS, C. J. et al. Acanthamoeba spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitol Res**, v. 103, n. 6, p. 1241-5, Nov 2008. ISSN 0932-0113. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18661282> >.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591.

Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

PETIT, C. et al. *In-vivo* therapeutic efficacy in experimental murine mycoses of a new formulation of deoxycholate-amphotericin B obtained by mild heating. **J Antimicrob Chemother**, v. 42, n. 6, p. 779-85, Dec 1998. ISSN 0305-7453. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10052902> >.

PETIT, C. et al. Activity of a heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (fungizone) against *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 390-2, Feb 1999. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925541> >.

PURKAIT, B. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 1031-41, Feb 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123699> >.

PURKAIT, B. et al. Up-regulation of silent information regulator 2 (Sir2) is associated with amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 5, p. 1343-56, May 2015. ISSN 1460-2091. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25667407> >.

RAHIMI, F. et al. Chlorhexidine monotherapy with adjunctive topical corticosteroids for *Acanthamoeba* keratitis. **J Ophthalmic Vis Res**, v. 10, n. 2, p. 106-11, 2015 Apr-Jun 2015. ISSN 2008-2010. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26425310> >.

ROBAEI, D. et al. The impact of topical corticosteroid use before diagnosis on the outcome of *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology**, v. 121, n. 7, p. 1383-8, Jul 2014. ISSN 1549-4713. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24630688> >.

ROBERTS, C. W.; HENRIQUEZ, F. L. Drug target identification, validation, characterisation and exploitation for treatment of *Acanthamoeba* (species) infections. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 1, p. 91-6, Sep 2010. ISSN 1090-2449. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035751> >.

RÓDIO, C. et al. *In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitol Res**, v. 104, n. 1, p. 191-4, Dec 2008. ISSN 0932-0113. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18795331> >.

SACRAMENTO, Rogério Silva do et al. Estudo dos fatores epidemiológicos e influentes na ceratite microbiana em serviço universitário. **Rev Bras Oftalmol.**, v. 1, n. 64, p.7-14, 2005. Bimestral.

SAEED, A. et al. Risk factors, microbiological findings, and clinical outcomes in cases of microbial keratitis admitted to a tertiary referral center in Ireland. **Cornea**, v. 28, n. 3, p. 285-92, Apr 2009. ISSN 1536-4798. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19387229> >.

SAID, D. G. et al. The challenge of fungal keratitis. **Br J Ophthalmol**, v. 95, n. 12, p. 1623-4, Dec 2011. ISSN 1468-2079. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22096205> >.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 9, p. 1001-27, Aug 2004a. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313128> >.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 1, p. 41-51, Feb 2004b. ISSN 1368-7646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15072770> >.

SHARMA, A.; TANIGUCHI, J. Emerging strategies for antimicrobial drug delivery to the ocular surface: Implications for infectious keratitis. **Ocul Surf**, Jun 2017. ISSN 1937-5913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28602948> >.

SHARMA, R. et al. Coinfection with *Acanthamoeba* and *Pseudomonas* in contact lens-associated keratitis. **Optom Vis Sci**, v. 90, n. 2, p. e53-5, Feb 2013. ISSN 1538-9235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334312> >.

SHASTRI, D.; PATEL, L.; PARIKH, R. Studies on *in situ* hydrogel: a smart way for safe and sustained ocular drug delivery. **J Young Pharm**, v. 2, n. 2, p. 116-20, Apr 2010. ISSN 0975-1505. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264112> >.

SHASTRI, D. H.; PRAJAPATI, S. T.; PATEL, L. D. Design and development of thermoreversible ophthalmic in situ hydrogel of moxifloxacin HCl. **Curr Drug Deliv**, v. 7, n. 3, p. 238-43, Jul 2010. ISSN 1875-5704. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497100> >.

SIDDIQUI, R. et al. Failure of chemotherapy in the first reported cases of *Acanthamoeba* keratitis in Pakistan. **Pathog Glob Health**, v. 108, n. 1, p. 49-52, Jan 2014. ISSN 2047-7732. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24548160> >.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *acanthamoeba*. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 6, Jan 2012a. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229971> >.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Photochemotherapeutic strategies against *acanthamoeba* keratitis. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 47, Sep 2012b. ISSN 2191-0855. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22950898> >.

SILVA-FILHO, M. A. et al. How can micelle systems be rebuilt by a heating process? **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 141-50, 2012. ISSN 1178-2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22275830> >.

SILVEIRA, Walteçá Louis Lima et al. Aspectos fundamentais no desenvolvimento de sistemas microemulsionados contendo anfotericina B para uso oftálmico. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 1, n. 34, p.9-15, 213.

SMITH, F. R.; KORN, E. D. 7-Dehydrostigmasterol and ergosterol: the major sterols of an amoeba. **J Lipid Res**, v. 9, n. 4, p. 405-8, Jul 1968. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5725873> >.

STAPLETON, F.; CARNT, N. Contact lens-related microbial keratitis: how have epidemiology and genetics helped us with pathogenesis and prophylaxis. **Eye**, v. 26,

n. 2, p. 185-93, Feb 2012. ISSN 1476-5454. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134592> >.

STEHR-GREEN, J. K. et al. Acanthamoeba keratitis in soft contact lens wearers. A case-control study. **JAMA**, v. 258, n. 1, p. 57-60, Jul 1987. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3586292> >.

SOBRAL, Régia Maria Gondim Ramos. **Análise do perfil microbiológico das úlceras de córnea: estudo retrospectivo de 20 anos no hospital das clínicas da faculdade de medicina de ribeirão preto**. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013

SUN, R. L.; JONES, D. B.; WILHELMUS, K. R. Clinical characteristics and outcome of candida keratitis. **Am J Ophthalmol**, v. 143, n. 6, p. 1043-1045, Jun 2007. ISSN 0002-9394. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524775> >.

TAWFEEK, G. M. et al. Genotypic, physiological, and biochemical characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from the environment in Cairo, Egypt. **Parasitol Res**, v. 115, n. 5, p. 1871-81, May 2016. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26841771> >.

THOMAS, P. A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 4, p. 730-97, Oct 2003. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557297> >.

TOLLEMAR, J.; KLINGSPOR, L.; RINGDÉN, O. Liposomal amphotericin B (AmBisome) for fungal infections in immunocompromised adults and children. **Clin Microbiol Infect**, v. 7 Suppl 2, p. 68-79, 2001. ISSN

1198-743X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525221>>.

TORRADO, J. J. et al. Amphotericin B formulations and drug targeting. **J Pharm Sci**, v. 97, n. 7, p. 2405-25, Jul 2008. ISSN 1520-6017. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893903>>.

TRABELSI, H. et al. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. **Pathol Biol**, v. 60, n. 6, p. 399-405, Dec 2012. ISSN 1768-3114. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22520593>>.

TU, E. Y.; JOSLIN, C. E.; SHOFF, M. E. Successful treatment of chronic stromal acanthamoeba keratitis with oral voriconazole monotherapy. **Cornea**, v. 29, n. 9, p. 1066-8, Sep 2010. ISSN 1536-4798. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539217>>.

VAN ETTEN, E. W. et al. Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: effects on ultrastructure, *in vitro* activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 6, p. 1598-603, Jun 2000. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817715>>.

VERANI, J. R. et al. National outbreak of Acanthamoeba keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 8, p. 1236-42, Aug 2009. ISSN 1080-6059. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751585>>.

VERÉB, Z. et al. Role of human corneal stroma-derived mesenchymal-like stem cells in corneal immunity and wound healing. **Sci Rep**, v. 6, p. 26227, May 2016. ISSN

2045-2322. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27195722>>.

VERÍSSIMO, C. E. M. et al. Infection in a rat model reactivates attenuated virulence after long-term axenic culture of *Acanthamoeba* spp. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 832-5, Nov 2013. ISSN 1678-8060.

Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271042>>.

VISVESVARA, G. S. Infections with free-living amebae. **Handb Clin Neurol**, v. 114, p. 153-68, 2013. ISSN 0072-9752. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829906>>.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 1-26, Jun 2007. ISSN 0928-8244.

Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428307>>.

VYAS, S. P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **Int J Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 417-32, 2006. ISSN 1176-9114. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722276>>.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 10, p. 4408-13, Oct 2000. ISSN 0099-2240.

Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11010891>>.

WALOCHNIK, J.; SCHEIKL, U.; HALLER-SCHOBER, E. M. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. **J Eukaryot Microbiol**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 1550-7408. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25047131> >.

WALSH, T. J. et al. Dose-dependent pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex in rabbits. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 8, p. 2068-76, Aug 2000. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898677> >.

WANACHIWANAWIN, D.; BOORANAPONG, W.; KOSRIRUKVONGS, P. Clinical features of acanthamoeba keratitis in contact lens wearers and non-wearers. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 43, n. 3, p. 549-56, May 2012. ISSN 0125-1562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23077833> >.

WANG, Y.; FENG, X.; JIANG, L. Current advances in diagnostic methods of *Acanthamoeba* keratitis. **Chin Med J (Engl)**, v. 127, n. 17, p. 3165-70, 2014. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189964> >.

WINCK, M. A.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in rio grande do Sul, Brazil. **Curr Microbiol**, v. 63, n. 5, p. 464-9, Nov 2011. ISSN 1432-0991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21882008> >.

XU, X. et al. Properties of novel polyvinyl alcohol/cellulose nanocrystals/silver nanoparticles blend membranes. **Carbohydr Polym**, v. 98, n. 2, p. 1573-7,

Nov 2013. ISSN 1879-1344. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053842> >.

YATERA, K. et al. [Retrospective analysis of the safety of four hours administration of liposomal amphotericin B in patients with chronic necrotizing pulmonary aspergillosis]. **Jpn J Antibiot**, v. 64, n. 5, p. 311-8, Oct 2011. ISSN 0368-2781. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22428214> >.

ZAMORA, A.; HENDERSON, H.; SWIATLO, E. Acanthamoeba encephalitis: A Case Report and Review of Therapy. **Surg Neurol Int**, v. 5, p. 68, 2014. ISSN 2229-5097. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991471> >.

ZHANG, Liyan; KOSARAJU, Shantha L.. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, [s.l.], v. 43, n. 7, p.2956-2966, jul. 2007. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.04.033>.

ZIA, Q. et al. Super aggregated form of Amphotericin B: a novel way to increase its therapeutic index. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 7, p. 792-803, 2016. ISSN 1873-4286. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26648472> >.

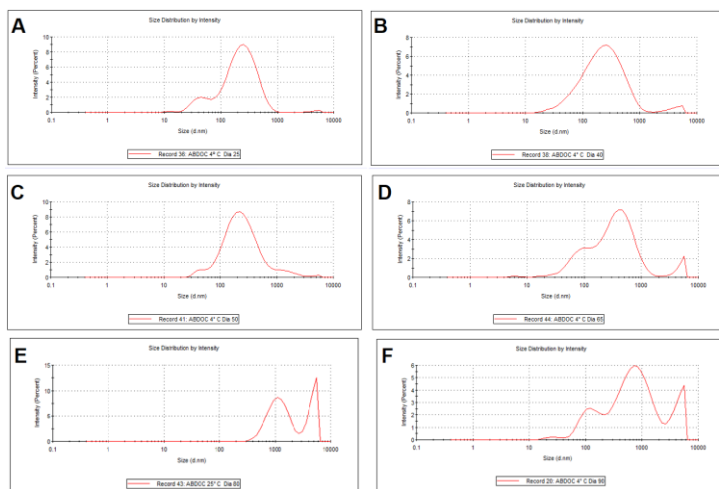
APENDICE A - Estudo da estabilidade física dos superagregados

Populações de partículas presentes em ABDOC armazenada a 4°C nos dias 25, 40, 50, 65, 80 e 90 de incubação.

ABDOC 4° C

		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 25	Pico 1	268,8	86,1	147
	Pico 2	45,11	12,5	13,7
	Pico 3	4647	0,8	808
		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 40	Pico 1	276,5	96,6	210,2
	Pico 2	4093	3,4	1128
	Pico 3	0	0	0
		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 50	Pico 1	338,5	95,7	380,3
	Pico 2	42,18	3,5	6,892
	Pico 3	4800	0,8	715,5
		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 65	Pico 1	445,9	73,6	278,2
	Pico 2	79,15	20,7	28,59
	Pico 3	4727	5,4	877,2
		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 80	Pico 1	639,5	95,5	308,7
	Pico 2	4698	4,5	763,4
	Pico 3	0	0	0
		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 90	Pico 1	865,6	64	541,7
	Pico 2	130,7	19,1	48,45
	Pico 3	4380	15,8	953,5

Diâmetro médio das estruturas presentes em ABDOC armazenada a 4°C nos dias 25 (A), 40 (B), 50 (C), 65 (D), 80 (E) e 90 (F) de incubação.

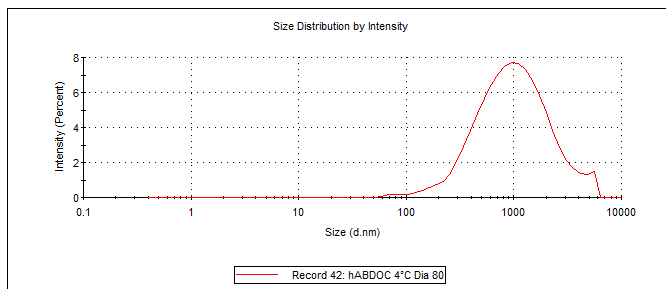


Populações de partículas presentes em hABDOC armazenada a 4°C no dia 80.

hABDOC 4° C

		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 80	Pico 1	1224	96,7	922
	Pico 2	5198	2,7	379
	Pico 3	77,03	0,5	10,89

Diâmetro médio das estruturas presentes em hABDOC armazenada a 4°C no 80º dia de incubação.

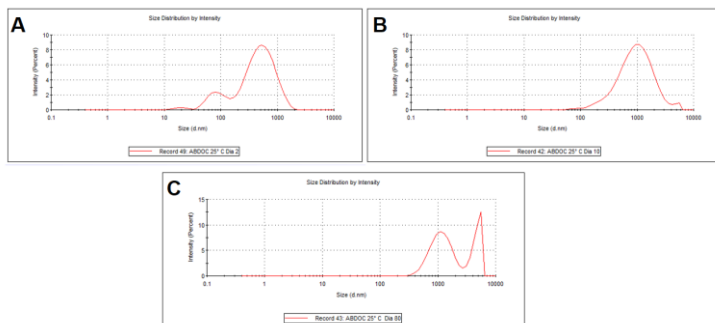


Diâmetro médio das estruturas presentes em ABDOC armazenada a 25°C nos dias 2, 10 e 80 de incubação.

ABDOC 25° C

		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 2	Pico 1	579	82,9	314
	Pico 2	86,68	15,7	28,76
	Pico 3	20,32	1,4	5,295
		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 10	Pico 1	1111	96,9	721,3
	Pico 2	4899	2,3	578,1
	Pico 3	86,9	0,7	14,6
		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 80	Pico 1	1199	64,7	502,5
	Pico 2	4642	35,3	866,6
	Pico 3	0	0	0

Diâmetro médio das estruturas presentes em ABDOC armazenada a 25°C nos dias 2 (A), 10 (B) e 80 (C) de incubação.



Diâmetro médio das estruturas presentes em ABDOC armazenada a 37°C no segundo dia de incubação.

ABDOC 37° C

		Tamanho	% Intensidade	Desvio
Dia 2	Pico 1	1003	79,7	430,9
	Pico 2	4745	11,5	846,9
	Pico 3	181,3	8,8	54,66

Diâmetro médio das estruturas presentes em ABDOC armazenada a 37°C nos dias 2 (A), 10 (B) e 80 (C) de incubação.

