

Fabiana Casara

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL AMEBICIDA DO EXTRATO
BRUTO E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Eugenia hiemalis*
FRENTE A *Acanthamoeba* spp.**

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. Miriam de
Barcellos Falkenberg

Florianópolis
2019

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

Cesara, Fabiana

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL AMEBICIDA DO EXTRATO BRUTO E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Eugenia hiemalis* FRENTE A *Acanthamoeba* spp. / Fabiana Cesara ; orientador, Karin Silva Caumo, coorientador, Miriam de Barcellos Falkenberg, 2019.

99 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Acanthamoeba*. 3. *Eugenia hiemalis*. I. Silva Caumo, Karin. II. de Barcellos Falkenberg, Miriam. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

**"INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL AMEBICIDA
DO EXTRATO BRUTO E COMPOSTOS ISOLADOS
DE Eugenia hiemalis FRENTE A Acanthamoeba spp."**

POR

Fabiana Casara

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). Lillian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro
Titular)



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



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



Prof(a). Dr(a). Miriam de Barcellos Falkenberg (UFSC – Co-
orientador(a))



Prof(a). Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 22 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar o dom da vida, me dar forças quando eu pensava estar frágil, discernimento, por me guiar e abençoar minha caminhada.

Aos meus pais e meu irmão, Clodoaldo, Maristela e Matheus Casara pelo carinho e dedicação, por sempre fazerem o possível e o impossível para me ver sempre sorrindo.

À toda minha família que, mesmo a 400 km longe de mim, sempre deram forças para continuar. Eu amo vocês!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Karin Silva Caumo, que me acolhe e divide seu conhecimento comigo desde 2014. Agradeço imensamente por toda paciência, dedicação e confiança durante esse período.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a Miriam de Barcellos Falkenberg, por todos os conhecimentos compartilhados e pela parceria, que foi fundamental para realização deste trabalho.

À querida professora Prof^a. Dr^a Fabiola Filippin Monteiro, que me acolheu. Obrigada pela paciência e pelo conhecimento dividido.

À Prof^a. Dr^a. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, por abrir as portas do seu laboratório e tornar possível a realização de alguns experimentos deste trabalho.

Ao Prof^o. Dr^o. Marcos José Machado, pelo auxílio em todas as análises estatísticas.

A todos os colegas que passaram pelo LAPEO, em especial as mestrandas que acompanharam e dividiram comigo todos os estresses deste último ano, Paula Monteiro e Barbara Czerniak,

e à doutoranda Maria Luiza Büchele pelas tardes escrevendo, pelos puxões de orelha, por todos os desabaços e nossos cafés. A vocês, dou o título de amigas para a vida! Obrigada!

À minha fiel escudeira desde a faculdade, Natália Marcelli Stefanos. Obrigada por ter compartilhado comigo todas as matérias e por ter tornado tudo mais leve.

Aos colegas dos laboratórios parceiros, GEPRONAS e GEIMM, em especial a Gabriele Zatelli e Laura Sartori pelas inúmeras conversas, contribuições e esforço para que este trabalho fosse possível.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, por todas as contribuições.

À Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia e Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, pelo conhecimento e formação.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que indireta, mas fundamentalmente, trouxeram mais luz, sorrisos e compreensão para que esta etapa fosse finalizada.

RESUMO

Acanthamoeba spp. são protozoários ubíquos na biosfera. Nos humanos são agentes causadores de infecções, como a encefalite amebiana granulomatosa e ceratite amebiana. O tratamento destas infecções é inespecífico, baseado em diversas combinações de fármacos. Novas estratégias terapêuticas a partir da busca por compostos ativos de plantas medicinais vêm sendo investigadas para encontrar novas alternativas para o tratamento das infecções acantamebianas. O gênero *Eugenia* é comumente utilizado na medicina popular e estudos demonstram atividade antimicrobiana, tripanocida e antifúngica. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial antiamebiano do extrato bruto e compostos isolados de *Eugenia hiemalis* Cambessèdes visando combater infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. Os testes de atividade amebicida foram realizados com a cepa de *Acanthamoeba castellanii* Neff e com um isolado clínico regional de *Acanthamoeba* spp. obtido a partir de raspado de córnea de paciente. Para a realização dos ensaios de atividade amebicida, os trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. foram expostos a diversas concentrações do extrato bruto de *E. hiemalis* e aos compostos isolados acetato de miconidina e O-metil-olivetol. As células viáveis foram quantificadas em hemocítômetro, observando-se uma inibição de trofozoítos concentração-dependente. O tipo de morte celular causada pelo composto acetato de miconidina foi avaliado por meio da citometria de fluxo. A nanoemulsão rica em lipídeos contendo o composto isolado acetato de miconidina foi preparada

apresentando um tamanho médio de 118,2 nm e características físico-químicas estáveis. A nanoemulsão contendo o acetato de miconidina foi testada frente aos trofozoítos de *A. castellanii* Neff, exibindo melhora significativa na atividade quando comparada ao composto livre, apresentando uma diminuição de cinco vezes o valor da CI50. A nanoemulsão contendo o composto foi capaz de reduzir parte da citotoxicidade frente a células de córnea de coelho quando comparada ao composto livre. Estes resultados sugerem que a nanoemulsão contendo o composto acetato de miconidina pode ser considerada uma potencial alternativa para o tratamento infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; *Eugenia hiemalis*; acetato de miconidina; nanoemulsão.

ABSTRACT

Acanthamoeba spp. are ubiquitous protozoa in the biosphere. In humans they are agents that cause infections, such as granulomatous amoebic encephalitis and amoebic keratitis. Treatment of these infections is non-specific, based on several combinations of drugs. New therapeutic strategies from the search for active compounds of medicinal plants have been investigated to find new alternatives for the treatment of amoebic infections. The genus *Eugenia* is commonly used in popular medicine and studies show antimicrobial, trypanocidal and antifungal activity. In this context, the objective of this study was to investigate the acantamoebic potential of the crude extract and isolated compounds of *Eugenia hiemalis* Cambessèdes in order to combat infections caused by *Acanthamoeba* spp. Amoebicidal activity tests were performed with the *Acanthamoeba castellanii* Neff strain and with a regional clinical isolate of *Acanthamoeba* spp. obtained from scraping patient's cornea. For the amoebicidal activity assays, the trophozoites of *Acanthamoeba* spp. strains were exposed to various concentrations of the crude extract and to the isolated compounds miconidine acetate and O-methyl-olivetol. Viable cells were quantified in hemocytometer, with concentration-dependent inhibition of trophozoites. The type of cell death caused by the miconidine acetate compound was evaluated by flow cytometry. The lipid-rich nanoemulsion containing the miconidine acetate compound was prepared having an average size of 118.2 nm and stable physico-chemical characteristics. The nanoemulsion containing the miconidine

acetate was tested against *Acanthamoeba* spp. strains trophozoites, exhibiting significant improvement in activity when compared to the free compound, exhibiting a five-fold decrease in IC50 values. The nanoemulsion containing the miconidine acetate was able to reduce part of the cytotoxicity against rabbit corneal cells as compared to the free compound. These results suggest that the nanoemulsion containing the miconidine acetate compound may be considered a potential alternative for the treatment of infections caused by *Acanthamoeba* spp.

Key – words: *Acanthamoeba*, *Eugenia hiemalis*, miconidine acetate, nanoemulsion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas evolutivas de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	23
Figura 2. Infiltrado neutrofílico na córnea de paciente com ceratite amebiana.....	29
Figura 3. Aspecto das folhas e frutos de <i>Eugenia hiemalis</i>	37
Figura 4. Estrutura química do acetato de miconidina.....	39
Figura 5. Estrutura química do O-metil-olivetol.....	41
Figura 6. Atividade amebicida do extrato bruto frente a trofozoítos de <i>A. castellanii</i> Neff.....	54
Figura 7. Atividade amebicida do composto isolado acetato de miconidina frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	56
Figura 8. Atividade amebicida do composto isolado O-metil-olivetol frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	57
Figura 9. Determinação da CI50 dos compostos isolados para cada espécie de <i>Acanthamoeba</i> testada.	59
Figura 10. Microscopia de fluorescência com coloração laranja de acridina e brometo de etídeo em <i>A. castellanii</i> Neff frente a compostos ativos.....	61
Figura 11. Gráfico de pontos das células tratadas com CI50 do composto acetato de miconidina.....	63
Figura 12. Avaliação da atividade amebicida da nanoemulsão rica em lipídeos contendo o composto isolado frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	67
Figura 13. Comparação da atividade do composto acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão frente as cepas de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	68

Figura 14. Alterações morfológicas induzidas pelo composto acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão sobre células SIRC..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela representativa da dispersão celular (%) de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* Neff tratadas com acetato de miconidina e avaliadas por citometria de fluxo 62

Tabela 2. Tamanho médio de partícula, PDI e potencial zeta das nanoemulsões 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
ASA.S1	<i>Acanthamoeba Specific Amplimer S1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVL	Amebas de vida livre
CI50	Concentração inibitória média
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ICR1	Isolado clínico regional
LAPEO	Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PdI	Índice de polidispersão
PYG	Meio proteose peptona, extrato de levedura e glicose
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
SIRC	<i>Statens Seruminstitut Rabbit Cornea</i>
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Amebas de vida livre	21
2.2 O gênero <i>Acanthamoeba</i>	22
2.2.1 Classificação morfológica e molecular de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	24
2.2.2 Infecções humanas causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.	27
2.2.3 Vias de morte celular em <i>Acanthamoeba</i> spp.	33
2.3 Atividade antiamebiana de produtos naturais	35
2.3.1 Gênero <i>Eugenia</i>	36
2.3.2 Acetato de miconidina	39
2.3.3 O-metil-olivetol.....	40
2.4 Sistemas nanoemulsionados	41
2.4.1 Sistemas nanoemulsionados para aplicação ocular ..	42
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Cultura e obtenção de parasitos	45
4.2 Obtenção dos compostos isolados de <i>E. hiemalis</i>	45
4.3 Avaliação da atividade amebicida do extrato bruto e compostos isolados de <i>E. hiemalis</i> frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	46
4.4 Avaliação do tipo de morte celular	47
4.4.1 Seleção dos controles para a citometria de fluxo	47
4.4.2 Citometria de fluxo	48

4.5	Preparação da nanoemulsão rica em triglicérides contendo o composto isolado acetato de miconidina	48
4.5.1	Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta	49
4.5.2	Avaliação da atividade amebicida do composto isolado acetato de miconidina associado à nanoemulsão rica em triglicérides frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp....	50
4.5.3	Avaliação da citotoxicidade do composto isolado acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão frente a células de córnea de coelho	51
4.6	Análise estatística	52
5.	RESULTADOS	53
5.1	Atividade amebicida do extrato bruto de <i>E. hiemalis</i> sobre trofozoítos de <i>A. castellanii</i> Neff.....	53
5.2	Atividade amebicida dos compostos isolados acetato de miconidina e O-metil-olivetol de <i>E. hiemalis</i> sobre trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	54
5.3	Avaliação de morte celular	60
5.4	Citometria de fluxo	62
5.5	Nanoemulsão rica em lipídeos contendo o composto isolado acetato de miconidina	63
5.5.1	Características físico-químicas	63
5.5.2	Atividade amebicida do composto isolado acetato de miconidina associado a nanoemulsão rica em lipídeos frente trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	66
5.5.3	Avaliação da citotoxicidade em células SIRC	68
6.	DISCUSSÃO	70
7.	CONCLUSÕES	79
8.	PERSPECTIVAS	80
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) estão entre os protozoários mais frequentes encontrados na natureza. Distribuídas mundialmente, já foram encontradas em diversas fontes ambientais e antropogênicas, como água doce natural e tratada, estojos de lentes de contato e condicionadores de ar (CARLESSO et al., 2010; CASTRILLÓN; OROZCO, 2013; EDAGAWA et al., 2009; HASSAN et al., 2012; LIU et al., 2006; MOLMERET et al., 2005; ONICHANDRAN et al., 2013; PENS et al., 2008; REYES-BATLLE et al., 2016). O gênero *Acanthamoeba* têm sido amplamente estudado devido ao aumento das infecções relacionadas ao protozoário, como a ceratite amebiana e a encefalite amebiana granulomatosa (GOMES et al., 2016).

Os tratamentos destas infecções são inespecíficos e são baseados em diversas combinações de fármacos (GRAFFI et al., 2014). Alternativas para o tratamento da ceratite amebiana e da encefalite amebiana vêm sendo investigadas a partir da busca por compostos ativos de plantas medicinais, que possam ser ativos contra trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp., que não induzam ao encistamento e não sejam tóxicos aos tecidos.

O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae e, devido a sua grande quantidade de compostos fenólicos, assume destaque por serem utilizados como plantas medicinais (SIMÕES et al., 2018). Estudos relatam a atividade do gênero frente ao

Trypanosoma cruzi e cepas de *Mycoplasma* (BENFATTI et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

Os compostos acetato de miconidina e O-metil-olivetol de *E. hiemalis* são derivados fenólicos isolados de folhas e botões florais da planta (ZATELLI et al., 2016). A investigação da atividade do extrato bruto e compostos isolados de *E. hiemalis* contra *Acanthamoeba* spp. é um campo a ser explorado, visto a mínima existência de dados na literatura e evidências de atividade amebicida de plantas da família Myrtaceae.

Sistemas nanocarreadores são considerados uma estratégia para associação de compostos e produtos naturais devido ao seu tamanho reduzido. Estão associados ao aumento da biodisponibilidade com consequente aumento da atividade, além da diminuição da citotoxicidade de compostos (AL-JAMAL et al., 2013; ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018). Dentre os nanocarreadores, as nanoemulsões ganham destaque pela fácil preparação, estabilidade, por apresentarem ausência de coalescência, fácil escalonamento, além de serem biocompatíveis e possuírem capacidade de encapsular uma ampla gama de compostos bioativos (KAUR; KAKKAR, 2014).

Sendo assim, o presente trabalho avaliou a atividade amebicida do extrato bruto e compostos isolados de *E. hiemalis* a fim de combater as infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. O composto isolado acetato de miconidina foi incorporado a uma nanoemulsão rica em lipídeos, visando a melhora de atividade do composto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amebas de vida livre

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários ubiqüitários na biosfera, também denominadas seres anifizóicos devido a sua capacidade de viver na forma livre e ocasionalmente habitar um hospedeiro (SCHUSTER, VISVESVARA, 2004; GUIMARAES et al., 2016). Esses microrganismos se alimentam de bactérias, algas, fungos, protozoários e partículas orgânicas (CATEAU et al., 2014). Estas amebas já foram encontradas em diversas fontes como oceanos, lagos, solos e fontes antropogênicas, como água de torneira, piscinas, unidades de hemodiálise, unidades de tratamento dentário, condicionadores de ar e estojos de lentes de contato (MOLMERET et al., 2005; LIU et al., 2006; PENS et al., 2008; CAUMO et al., 2009; EDAGAWA et al., 2009; CARLESSO et al., 2010; HASSAN et al., 2012; ONICHANDRAN et al., 2013; REYES-BATLLE et al., 2016).

Entre as AVL, quatro gêneros são responsáveis por infecções oportunistas e não oportunistas em humanos e animais: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia* (TRABELSI et al., 2012). O gênero *Acanthamoeba* é o agente causador da encefalite amebiana granulomatosa, infecção grave do cérebro, dermatite acantamebiana em pacientes imunocomprometidos e a ceratite amebiana em indivíduos imunocompetentes, atingindo principalmente usuários de lentes

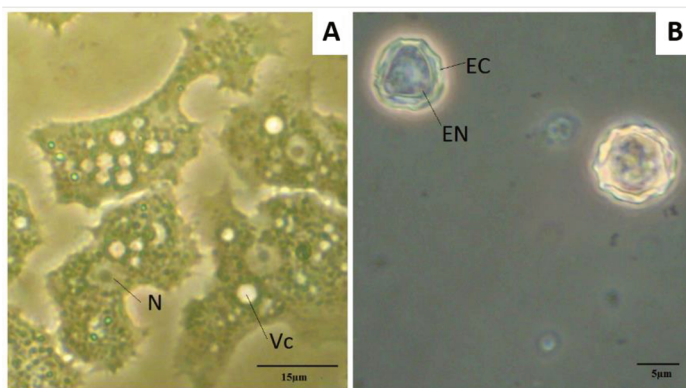
de contato (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). Dentre as 40 espécies do gênero *Naegleria*, *Naegleria fowleri* é o agente etiológico da meningoencefalite aguda e fulminante, que leva a morte de indivíduos saudáveis com histórico de contato com água e piscinas contaminadas (DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009). O gênero *Balamuthia* é responsável por uma encefalite semelhante à encefalite amebiana granulomatosa causada por *Acanthamoeba* spp., entretanto, pode infectar indivíduos saudáveis (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; VISVESVARA, 2013). A *Sappinia pedata* é encontrada em solo contaminado com fezes de alces, bisões e gado, identificada como espécie causadora de encefalite em um indivíduo saudável, não sendo relacionada a nenhum outro caso da doença (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

2.2 O gênero *Acanthamoeba*

O gênero *Acanthamoeba* foi descrito pela primeira vez por Castellani, a partir de uma cultura do fungo *Cryptococcus pararoseus* contaminada com amebas (KHAN, 2006). O primeiro indício que o gênero poderia ser patogênico foi relatado em 1958 durante testes de segurança da vacina da poliomielite, quando placas contaminadas por cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* causaram a morte de ratos e macacos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). *Acanthamoeba* spp. estão entre os protozoários mais prevalentes encontrados no ambiente

(MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). O gênero *Acanthamoeba* apresenta-se sob duas formas: a de trofozoíto, a forma metabolicamente ativa, com capacidade de motilidade, divisão e alimentação; e o cisto, a forma de resistência sob condições desfavoráveis (Figura 1) (CATEAU et al., 2014; ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018).

Figura 1. Formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp.



Trofozoíto e (B) Cisto: N: núcleo; VC: vacúolo contrátil; EC: ectocisto; EN: endocisto. Fonte: LAPEO/UFSC.

O trofozoíto apresenta tamanho entre 12 e 35 µm de diâmetro, variável entre espécies e genótipos. Caracteriza-se pela presença de pseudópodes, denominados acantopódios, desempenhando um importante papel na alimentação, adesão e movimentação celular (LORENZO-MORALES et al., 2013). O citoplasma é abundante e finamente granular, com núcleo central e denso nucléolo, contendo mitocôndrias, ribossomos, vacúolo digestivo e vacúolo contrátil, responsável pelo controle osmótico

celular (ODDÓ, 2006; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). A exposição do trofozoíto a condições desfavoráveis, como mudança de pH e temperatura, ausência de nutrientes e tratamento com agentes terapêuticos, acarreta a formação do cisto (ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018).

O cisto é formado por duas paredes denominadas endocisto e o ectocisto. O endocisto é a parede interna, apresenta-se espesso, e pode ter formato estrelado, ovalar, poligonal ou redondo, enquanto o ectocisto é a parede externa, fina e rugosa (VISVESVARA, 2013). Seu diâmetro varia de 12 a 25 μm , de acordo com a espécie e genótipo (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). O endocisto constitui-se de polissacarídeos, principalmente celulose, enquanto o ectocisto consiste em uma mistura de proteínas e polissacarídeos (ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018).

2.2.1 Classificação morfológica e molecular de *Acanthamoeba* spp.

Baseado nos critérios propostos por Pussard e Pons (1977), o gênero *Acanthamoeba* divide-se em três grupos (grupos I, II e III), de acordo com o tamanho e características morfológicas dos cistos (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013).

O grupo I é caracterizado por espécies que apresentam grandes cistos, que variam de 16 a 30 μm de tamanho (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). O endocisto possui forma estrelada, enquanto ectocisto possui uma parede lisa ou rugosa (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013). As amebas

desse grupo são principalmente ambientais, não associadas a infecções em humanos e animais (QVARNSTROM et al., 2013). Quatro espécies estão incluídas nesse grupo, sendo elas *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* e *A. tubiashi* (KHAN, 2006).

As acantamebas pertencentes ao grupo II são causadoras da maioria das infecções humanas relatadas, além de incluir as amebas mais comumente isoladas no ambiente (QVARNSTROM et al., 2013). O ectocisto apresenta-se rugoso, enquanto o endocisto pode possuir forma estrelada, poligonal, triangular ou ovalada, medindo 18 μm ou menos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). Este grupo inclui 11 espécies: *A. mauritanensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. paradivionensis* e *A. hatchetti* (TRABELSI et al., 2012).

Espécies do grupo III também demonstraram ser patogênicas (COSTA et al., 2010). As acantamebas desse grupo são caracterizadas por um ectocisto fino e ondulado, endocisto arredondado ou globoso, medindo 18 μm ou menos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). Esse grupo possui cinco espécies: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* e *A. pustulosa* (TRABELSI et al., 2012).

Cerca de 20 espécies são descritas com base nessa classificação, mas uma identificação específica é dificultada devido ao polimorfismo e a alterações resultantes das condições

da cultura (DUARTE et al., 2013). Critérios imunológicos, bioquímicos e fisiológicos foram aplicados para identificar as diferentes espécies de *Acanthamoeba*, porém, muitas delas compartilham das mesmas características, tornando esses critérios de classificação deficientes para a identificação (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013). Atualmente, estudos moleculares são utilizados em conjunto com a identificação morfológica. A metodologia mais aceita para classificação de *Acanthamoeba* spp. é baseada no sequenciamento da subunidade menor do gene 18S rDNA, permitindo a classificação em diferentes genótipos/espécies (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

O estudo do fragmento denominado ASA.S1 do gene 18S rDNA é a região mais utilizada para a identificação genotípica de isolados de *Acanthamoeba* spp. (SCHROEDER et al., 2001). O comprimento do produto amplificado varia entre 423 e 551 pares de base, sendo que cada genótipo exibe 5% ou mais de sequências divergentes entre diferentes genótipos (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Até o momento, o gênero *Acanthamoeba* é composto por 21 genótipos denominados de T1 a T21 (CORSARO et al., 2019; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). Destes, 11 genótipos já foram identificados como causadores de infecções em humanos, sendo eles: T1, T2a, T3, T4, T5, T6, T10, T11, T12, T13 e T15 (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; THAMMARATANA; LAUMMAUNWAI; BOONMARS, 2016).

A maioria das infecções humanas por *Acanthamoeba* spp. estão associadas ao genótipo T4, que inclui as espécies *A. castellanii*, *A. polyphaga* e *A. culbertsonii* (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). A prevalência do genótipo em casos de ceratite amebiana tem sido relacionada à maior abundância do mesmo no ambiente, sugerindo uma maior exposição do hospedeiro a essas amebas (HAJIALILO et al., 2016; MAGHSOOD et al., 2005).

2.2.2 Infecções humanas causadas por *Acanthamoeba* spp.

Devido a sua ampla distribuição na natureza e ubiquitariedade, infecções humanas causadas por *Acanthamoeba* spp. já foram relatadas mundialmente (KRÓL-TURMIŃSKA; OLENDER, 2017). As infecções acantamebianas podem acometer indivíduos saudáveis e indivíduos imunocomprometidos ou imunodeficientes. O gênero é o agente causador de duas infecções principais: a ceratite amebiana e a encefalite amebiana granulomatosa (LASS et al., 2017).

2.2.2.1 Ceratite Amebiana

A ceratite amebiana é uma infecção grave da superfície ocular, refratária à terapia antibiótica tradicional (MAYCOCK; JAYASWAL; ED, 2016). A doença acomete principalmente usuários de lentes de contato, como também indivíduos com trauma corneano associados à exposição a água contaminada, ferimentos com adornos de jardinagem e pesca e contato com

corpos estranhos veiculados pelo vento (GRAFFI et al., 2014; CARNT; STAPLETON, 2016).

Um aumento notável no número de casos de ceratite amebiana ocorreu em meados de 1980, devido à popularização do uso de lentes de contato (GRAFFI et al., 2014). Países com alta prevalência do uso de lentes de contato estimam que 85 a 88% dos casos de ceratite amebiana ocorrem em usuários de lentes, com casos de indivíduos não usuários predominando em ambientes rurais (SAW; KILVINGTON, 2009; CARNT; STAPLETON, 2016;).

Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. têm tendência à adesão em superfícies, passo chave para transmissão do gênero a partir das lentes de contato e estojos. A alteração da integridade da córnea, seja pelo uso excessivo das lentes de contato ou mesmo abrasão ou formação de fissuras, torna usuários de lentes de contato mais suscetíveis a infecções causadas por microrganismos como *Acanthamoeba* spp., pois permite a exposição de receptores de adesão, permitindo a adesão e após invasão da ameba ao epitélio corneano (GRAFFI et al., 2014).

O principal fator de risco para a ceratite amebiana é a falta de higiene dos estojos de lentes de contato (KHAN, 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). Outros fatores de risco estão associados, como o uso de lentes de contato por um longo período de tempo, trauma corneano, limpeza incorreta e formação de biofilme nos estojos de lentes de

contato, como também a exposição à água contaminada (TRABELSI et al., 2012; GOMES et al., 2016).

A ceratite amebiana geralmente é unilateral, mas casos bilaterais já foram relatados (CARNT; STAPLETON, 2016). Os sintomas estão associados à invasão e degradação dos componentes da córnea, o que resulta em inflamação com vermelhidão, infiltração estromal, edema, opacidade, perda epitelial, sensação de corpo estranho e edema nas pálpebras (Figura 2) (KHAN, 2006; TRABELSI et al., 2012). A dor relatada na ceratite amebiana é muito intensa e desproporcional aos achados biomicroscópicos (GRAFFI et al., 2014).

Figura 2. Infiltrado neutrofílico na córnea de paciente com ceratite amebiana



Presença de infiltrado neutrofílico. 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.

O diagnóstico precoce é essencial para o sucesso terapêutico (MAYCOCK; JAYASWAL; ED, 2016). Quando a doença é diagnosticada tardiamente, as amebas já penetraram o estroma corneano, agravando o caso e podendo evoluir para ulceração do epitélio da córnea, perfuração, perda da acuidade visual e até perda da visão (TRABELSI et al., 2012; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

O tratamento da ceratite amebiana é prolongado, a maioria dos regimes de tratamento iniciam-se com instilações tópicas de soluções contendo o fármaco de hora em hora, que podem ser reduzidas devido à alta toxicidade ao epitélio corneano, estendendo-se por mais de 6 meses (CARNT; STAPLETON, 2016). Atualmente, não há tratamento específico para a ceratite amebiana e diversos medicamentos são utilizados, os quais visam a erradicação dos cistos e trofozoítos viáveis associado à diminuição da resposta inflamatória (DART; SAW; KILVINGTON, 2009; MARTÍN-NAVARRO et al., 2010; ALKHARASHI et al., 2016).

2.2.2.2 Encefalite amebiana granulomatosa

A encefalite amebiana granulomatosa é uma infecção oportunista crônica e progressiva do sistema nervoso central, que pode atingir também os pulmões (MARCIANO-CABRAL;

CABRAL, 2003). A infecção atinge principalmente indivíduos soropositivos ou portadores de doenças crônicas como diabetes, tuberculose, lúpus eritematoso sistêmico, cirrose, falência renal ou doença de Hodgkin (ONG; KHAN; SIDDIQUI, 2017; SCHUSTER; VISVESVARA, 2004). Os fatores de risco incluem alcoolismo, abuso de drogas, tratamento com esteroides, pacientes transplantados e que fazem tratamento quimio ou radioterápico, além do contato com água e solos contaminados (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Ulcerações de pele e o neuroepitélio olfativo funcionam como portas de entrada para espécies de *Acanthamoeba*, que uma vez disseminados através da via hematogênica, invadem o cérebro, pulmões, rins e fígado (WALOCHNIK et al., 2008). Os sintomas iniciam-se de forma insidiosa, envolvendo mudanças de comportamento ou personalidade, dores de cabeça, confusão, convulsões, sonolência, letargia, déficits neurológicos focais e aumento da pressão intracraniana (SÜTÇÜ et al., 2018). Ao longo de semanas a vários meses, a infecção progride para coma, levando à morte como consequência ao aumento da pressão intracraniana, infecção secundária e insuficiência de múltiplos órgãos (OMANA-MOLINA et al., 2017).

A análise do líquido cefalorraquidiano demonstra pleocitose leve com predomínio de células mononucleares, glicose baixa ou normal e índices proteicos alterados. Os achados radiológicos são inespecíficos e variam de edema com ou sem sangramento intracraniano até lesões unifocais ou multifocais (COVEN et al., 2017). Devido a achados clínicos,

laboratoriais e radiológicos não específicos, o diagnóstico *ante mortem* da doença pode ser um desafio. A doença possui um mau prognóstico e menos de 5% dos pacientes sobrevivem se não iniciado precocemente o tratamento, além de ser subnotificada ou diagnosticada erroneamente devido à falta de ferramentas diagnósticas e similaridade dos sintomas com outras infecções comuns do SNC, como a meningite viral e bacteriana (ONG; KHAN; SIDDIQUI, 2017; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

2.2.2.3 Tratamento das infecções

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* são sensíveis a diversos medicamentos existentes, como antibióticos, antissépticos e antifúngicos, incluindo o metronidazol, alguns antivirais e antineoplásicos (MAYCOCK; JAYASWAL; ED, 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 (WALOCHNIK; SCHEIKL; HALLER-SCHOBBER, 2015; MAYCOCK; JAYASWAL; ED, 2016). No entanto, poucos desses agentes possuem atividade contra os cistos, o que causa recidiva da infecção (TRABELSI et al., 2012; GRAFFI et al., 2014). O tratamento 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; CABRAL, 2003).

A terapêutica da ceratite amebiana é realizado pela instilação tópica da solução contendo o fármaco na superfície da córnea (CARRIJO-CARVALHO et al., 2016). A maioria dos regimes de tratamento são de uso prolongado, por mais de 6 meses, iniciam-se com aplicações de hora em hora e são reduzidos gradualmente, devido à alta toxicidade dos fármacos ao epitélio corneano (CARNT; STAPLETON, 2016).

A encefalite amebiana granulomatosa raramente é tratada de forma eficaz, isto se deve a resposta imune insuficiente, diagnóstico tardio e antimicrobianos inespecíficos (SÜTÇÜ et al., 2018). Embora não haja um regime terapêutico padrão, os poucos casos de sucesso no tratamento envolveram o uso de combinações de antimicrobianos por via intravenosa, como cetoconazol, fluconazol, anfotericina B, azitromicina, isotionato de pentamidina e rifampicina em combinação com intervenção cirúrgica (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

2.2.3 Vias de morte celular em *Acanthamoeba* spp.

A apoptose, morte celular programada que controla o desenvolvimento de organismos multicelulares e tecidos, e a necrose, morte celular não planejada, são os principais tipos de morte celular. A apoptose é caracterizada por uma série de eventos bioquímicos e alterações que resultam em encolhimento celular, fragmentação do núcleo, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, levando a exposição da fosfatidilserina, detectada pela sua afinidade com a Anexina V (MARTÍN-NAVARRO et al., 2015). A necrose é caracterizada por

alterações morfológicas, como aumento do volume celular e ruptura da membrana citoplasmática, o que leva a liberação do conteúdo celular (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; MOON et al., 2018). Um mecanismo de morte por apoptose dos fármacos frente aos parasitos pode impedir a toxicidade das células hospedeiras, além de que células necróticas podem ser a causa de um processo inflamatório na córnea ou nos outros órgãos infectados (LOPEZ-ARENCIBIA et al., 2017).

As alterações da membrana celular, apoptose e necrose celular podem ser avaliadas por citometria de fluxo através da coloração das células com anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) e iodeto de propídeo. A anexina V é uma proteína ligada fortemente a fosfolipídeos de membrana, e quando incorporada com FITC, permite identificar e quantificar células apoptóticas através da citometria de fluxo (VAN ENGELAND et al., 1996). A utilização concomitante do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídeo, por sua vez, torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios de apoptose ou morte celular por necrose (WILLINGHAM, 1999).

A dupla coloração fluorescente laranja de acridina associada ao brometo de etídio, observadas em microscópio de fluorescência, também é utilizada para identificar alterações da membrana associadas a processos de morte celular (LIU et al., 2015). O laranja de acridina cora células viáveis e não viáveis e emite fluorescência como resultado da intercalação em ácidos nucleicos de cadeia dupla (principalmente DNA) ou ligação aos

ácidos nucleicos de fita simples (RNA), enquanto o brometo de etídio é absorvido por células não viáveis e emite fluorescência vermelha por intercalação em DNA (LEITE et al., 1999).

2.3 Atividade antiamebiana de produtos naturais

As plantas sintetizam metabólitos secundários, que apresentam a função primária de proteção contra patógenos, insetos e herbívoros, mas também podem ser explorados como potenciais fontes de novos produtos naturais bioativos para aplicações medicinais (DEGERLI et al., 2012). Alternativas para o tratamento da ceratite amebiana vêm sendo investigadas a partir da busca por compostos ativos de plantas medicinais, que possam ser ativos contra trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp., que não induzam ao encistamento e não sejam tóxicos ao tecido ocular (NIYYATI; DODANGEH; LORENZO-MORALES, 2016; SANTOS et al., 2016).

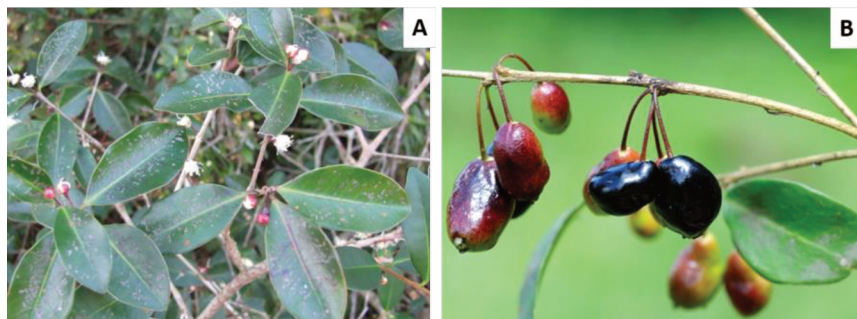
Estudos avaliando os efeitos antiamebianos de produtos naturais apresentam resultados promissores, como o extrato metanólico de alho e orégano, óleo essencial de *Lippia* spp., extratos de *Pterocaulon balansae* e complexos sintéticos de lapachol frente a *Acanthamoeba* spp. (MARTÍN-NAVARRO et al., 2010; PANATIERI et al., 2017; POLAT et al., 2008; RÓDIO et al., 2008; SANTOS et al., 2016). Esses estudos resultam em compostos com um efeito na proliferação das amebas de forma dose-dependente, sendo mais eficazes contra trofozoítos do que cistos.

2.3.1 Gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* é um dos maiores da família Myrtaceae, com mais de 500 espécies, das quais cerca de 400 encontram-se no Brasil e assumem destaque especial por serem utilizadas como plantas medicinais (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005). A família Myrtaceae possui representantes de grande interesse medicinal, como o gênero *Eugenia*, que é considerado o quarto gênero mais importante da família devido à produção de óleos essenciais, após os gêneros *Eucalyptus*, *Melaleuca* e *Psidium* (CARNEIRO et al., 2017; SOUZA et al., 2018). *Eugenia* spp. são comumente utilizadas na medicina popular como hipotensivo, diurético, antimicrobiano, anti-inflamatório, no tratamento de feridas e infecções intestinais (SIMÕES et al., 2018).

O gênero consiste em árvores ou arbustos verdes, possuindo fruto de até três centímetros de diâmetro, esférico e achatado nas extremidades, em gomos mais ou menos salientes (Figura 3) (AURICCHIO; BACCHI, 2003). Apresenta ampla distribuição, ocorrendo desde o México até a Argentina, estando presente em todas as regiões do Brasil (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005; ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

Figura 3. Aspecto das folhas e frutos de *Eugenia hiemalis*



Folhas (A) e frutos (B) de *E. hiemalis*. Fonte: Giehl, 2015.

Muitas espécies do gênero são apreciadas por seus frutos e utilizadas como alimentos, a exemplo de *Eugenia uniflora*, uma das espécies mais conhecidas do gênero, chamada popularmente de pitangueira e *Eugenia brasiliensis*, chamada de grumixama ou cereja-brasileira (BENFATTI et al., 2010). Além dela, são fornecedoras de frutos comestíveis: *Eugenia involucrata* DC. (cereja-do-mato), *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia) e *Eugenia neosilvestres* Sobral (grumixama), apreciadas tanto pelo homem como pelos animais (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006). Os frutos são consumidos frescos ou na forma de sucos e gelatinas e possuem alto valor nutricional, além de serem ricos em cálcio, fósforo, provitamina A, vitamina C e compostos fenólicos (antocianinas) (SOUZA et al., 2018).

O gênero *Eugenia* é conhecido por apresentar uma grande quantidade de compostos fenólicos com capacidade antioxidante, podendo-se citar os flavonoides e triterpenóides, embora taninos, ácidos fenólicos e antocianinas também estejam

presentes (EINBOND et al., 2004; MAGINA et al., 2012; MORESCO et al., 2016).

Estudos comprovam diversas atividades biológicas de espécies do gênero *Eugenia*. Santos *et al.* (2012) testaram o extrato etanólico das folhas de *Eugenia jambolana* L. frente ao *Trypanosoma cruzi*, obtendo 100% de inibição do parasito em uma concentração de 100 µg/mL e CI50 de 56,42 µg/mL, além de que, quando combinada com o metronizadol, potencializou seu efeito antifúngico.

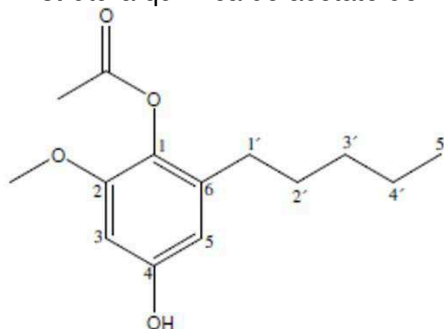
Benfatti *et al.* (2010) avaliaram a atividade de extratos brutos hidroalcoólicos de *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* e *Eugenia umbeliflora* frente a cepas de *Mycoplasma* capazes de infectar o homem. Observou-se que todos os extratos apresentaram atividade contra as cepas testadas, podendo constituir novas perspectivas para a prospecção de novos fármacos.

A investigação da atividade de *E. hiemalis* contra *Acanthamoeba* spp. ainda é um campo a ser explorado, visto a mínima existência de dados na literatura e evidências de atividade amebicida de plantas da família Myrtaceae. Um estudo de Albouchi *et al.* (2017) investigou a atividade do óleo essencial de *Melaleuca styphelioides* frente à *Acanthamoeba castellanii* Neff. O óleo possui uma composição rica em moléculas bioativas, as quais foram capazes de inibir o crescimento da cepa, com uma CI50 calculada de 69,03 ± 9,17 µg/mL.

2.3.2 Acetato de miconidina

O acetato de miconidina (2-metóxi-1-acetóxi-6-*n*-pentilfenol) (Figura 4) é um éster derivado de hidroquinona isolado das folhas e botões florais de *E. hiemalis*. Em estudos farmacológicos, as quinonas mostram variadas atividades biológicas, destacando-se as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, virucidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas (MURAYAMA et al., 2007; SALAS et al., 2008; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Figura 4. Estrutura química do acetato de miconidina



Fonte: Zatelli (2015).

A hidroquinona miconidina foi isolada de *Miconia* sp. (Melastomaceae), além de ser encontrada como composto minoritário em *Primula obconica* (MARINI-BETTOLO et al., 1971). Essa substância foi considerada o precursor biossintético da primina, sendo que o isolamento do acetato de miconidina dos botões florais de *E. hiemalis* sugere que esse metabólito é uma forma de armazenamento da primina, sendo relacionado a

proteção contra microrganismos e ataques herbívoros (ZATELLI et al., 2016).

A miconidina tem sido relatada na literatura por suas diversas atividades, incluindo atividade tripanocida (SEPÚLVEDA-BOZA; CASSELS, 1996). Apenas um estudo foi encontrado com o composto isolado acetato de miconidina, que destaca seu potencial antitumoral (MAIORAL et al., 2018). No estudo, o composto demonstrou um grande potencial citotóxico seletivo para células neoplásicas coletadas de pacientes com leucemia aguda e aumentou o efeito citotóxico dos quimioterápicos citarabina e vincristina.

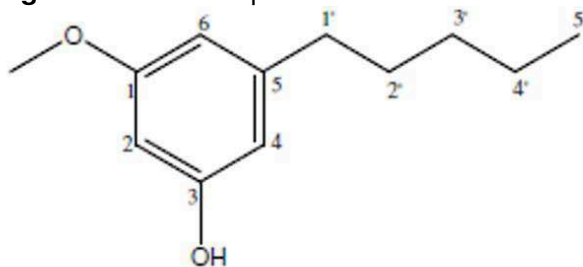
2.3.3 O-metil-olivetol

O O-metil-olivetol (1-metóxi-5-*n*-pentil-fenol) (Figura 5) é um composto fenólico que também foi isolado de *Eugenia hiemalis* (ZATELLI, 2015). Alguns derivados de olivetol são comumente encontrados em espécies de líquens, possuindo um papel fundamental nas espécies de *Cannabis sativa*, produzindo o ácido olivetoico, utilizado na biossíntese de tetra-hidrocanabinol (THC), podendo ser útil como intermediário na síntese de derivados (RAHARJO et al., 2004; SISA; DVORAKOVA; VANEK, 2017). O composto já foi encontrado como produto da biotransformação do olivetol por *Fusarium roseum* (MCCLANAHAN; ROBERTSON, 1985).

A citotoxicidade do composto O-metil-olivetol já foi relatada frente a células KB (células de carcinoma oral),

demonstrando uma potente atividade antitumoral concentração-dependente, variando de 1 a 100 μM (BAEK et al., 1998).

Figura 5. Estrutura química do O-metil-olivetol



Fonte: Zatelli (2015).

2.4 Sistemas nanoemulsionados

Sistemas nanoemulsionados são considerados uma ótima estratégia para associação de compostos devido ao seu tamanho, além de estarem associados ao aumento da biodisponibilidade com consequente aumento da atividade e aumento da estabilidade de muitos componentes ativos terapêuticos presentes em alimentos e produtos farmacêuticos (ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018). São sistemas considerados versáteis, capazes de encapsular compostos de diferentes solubilidades, protegê-los de hidrólise e degradação, além de ser um importante veículo para administração parenteral (ALSHHRANI, 2019; VERMELHO et al., 2018).

As principais vantagens dos sistemas nanoemulsionados são a alta estabilidade termodinâmica, aumento da precisão e taxa de absorção dos fármacos, aumento da solubilidade de

compostos, com conseqüente aumento da biodisponibilidade além da diminuição da toxicidade e irritabilidade (VERMELHO et al., 2018). A maioria das nanoemulsões são dispersões de gotículas de óleo em água com diâmetro entre 20 e 200 nm (VERMELHO et al., 2018). O tamanho reduzido das gotículas pode reduzir a degradação do composto ativo associado, impedir a floculação e manter o sistema disperso, além de ser uma ferramenta eficiente e confiável para melhorar sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, aumentar sua potência antimicrobiana, reduzindo a resistência aos medicamentos (IMRAN et al., 2016; ROLAND et al., 2003).

Os fosfolipídios, ou lecitinas, usados na preparação da maioria das emulsões são materiais bastante heterogêneos, atuando como emulsionantes que levam a formulações de estabilidade a longo prazo (FILIPPIN; SOUZA, 2008) . O tempo de degradação pode variar de meses a anos, dependendo da composição da emulsão (MAHBOOB et al., 2018).

2.4.1 Sistemas nanoemulsionados para aplicação ocular

A córnea é uma importante barreira química e mecânica que protege os tecidos intraoculares da entrada de microrganismos, além da absorção de compostos ativos (MOGHIMIPOUR; SALIMI; YOUSEFVAND, 2017). Sabe-se que administração tópica de colírios pode rapidamente ser eliminada do tecido ocular devido a drenagem do sistema lacrimal, diminuindo a biodisponibilidade do composto ativo, uma vez que observa-se pouca absorção pela superfície da córnea (AMMAR

et al., 2009). Aproximadamente 1% da dose aplicada do colírio é absorvida pela córnea, enquanto o restante será eliminado dentro de 90 segundos pela barreira pré corneal (ANJANA et al., 2014).

Sistemas nanoemulsionados são excelentes veículos para administração ocular, devido a sua capacidade de aumentar a bioatividade e biodisponibilidade de fármacos (KAUR; KAKKAR, 2014). A liberação sustentada de compostos associados a nanoemulsão permite que compostos bioativos penetrem nas camadas corneanas pela sua alta viscosidade e tamanho de partícula pequeno, reduzindo seu potencial citotóxico bem como o número de instilações diárias, com consequente aumento da adesão do paciente ao tratamento (AMMAR et al., 2009; LIM et al., 2016).

A associação de compostos ativos a nanoemulsões frente a *Acanthamoeba* spp. relatados na literatura são limitados. Um estudo de Panatieri *et al.* (2016) incorporou um extrato de *P. balansae* rico em cumarina a nanoemulsões compostas de triglicerídeos e lecitina de ovo. A atividade amebicida da nanoemulsão apresentou-se dose e tempo dependente, reduzindo em 95% a viabilidade em 24 h de incubação com 1,25 mg/mL de extrato e ensaio de citotoxicidade demonstrou que o composto é inócuo para células da córnea.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antiamebiano do extrato bruto e compostos isolados de *Eugenia hiemalis* Cambessèdes visando combater infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antiamebiana *in vitro* do extrato bruto e de compostos isolados de *E. hiemalis*;
- Investigar os mecanismos envolvidos na morte celular dos parasitos tratados pelos compostos ativos;
- Preparar e caracterizar uma nanoemulsão contendo o composto isolado acetato de miconidina quanto às suas propriedades físico-químicas;
- Avaliar a atividade amebicida da nanoemulsão contendo o acetato de miconidina frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.;
- Avaliar o efeito citotóxico da nanoemulsão contendo o composto acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão frente a células de epitélio de córnea de coelho;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura e obtenção de parasitos

Os testes de atividade amebicida foram realizados com a cepa de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010) e com um isolado clínico regional de *Acanthamoeba* spp. (genótipo T4 – número de acesso GenBank MF579529) obtido a partir de raspado de córnea de paciente com ceratite amebiana (ICR1). O ICR1 foi caracterizado no Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas/LAPEO-UFSC. As acantamebas foram cultivadas axenicamente em meio líquido PYG (proteose peptona – extrato de levedo – glicose) (PAGE E SIEMENSMA, 1991). Subcultivos foram realizados para manter as acantamebas em fase logarítmica de crescimento.

4.2 Obtenção dos compostos isolados de *E. hiemalis*

As partes aéreas de *E. hiemalis* foram coletadas em Blumenau (Santa Catarina, Brasil) e identificadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS) e uma exsicata foi depositada no Herbário Instituto de Ciências Naturais da UFRGS.

Os compostos foram obtidos por Zatelli (2015) através de maceração das folhas, galhos e botões florais com diclorometano. Após sete dias, os extratos obtidos foram filtrados e concentrados a temperatura inferior a 40 °C, originando os extratos diclorometânicos. Os resíduos da primeira maceração foram extraídos duas vezes com metanol, originando os extratos

metanólicos. Os extratos mais ativos foram submetidos ao fracionamento cromatográfico, sendo que os compostos das frações foram utilizados na avaliação de atividades biológicas.

O extrato bruto e compostos isolados foram filtrados com filtro de 0,22 µm de porosidade, a fim de remover possíveis contaminações. Neste estudo, foram utilizados os compostos isolados denominados acetato de miconidina e O-metil-olivetol.

4.3 Avaliação da atividade amebicida do extrato bruto e compostos isolados de *E. hiemalis* frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

Para a realização dos ensaios de atividade amebicida, 100 µL das culturas de *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) e ICR1 na densidade de 8×10^4 trofozoítos/mL em meio PYG foram dispostos em placas de 96 poços e expostos a 100 µL de cada concentração do extrato bruto (2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 7,5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL e 20 mg/mL) e os compostos isolados acetato de miconidina e O-metil-olivetol (0,156 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL). As placas foram seladas com Parafilm® e incubadas a 30 °C por até 48 h, com observação da cinética de crescimento das cepas em 6, 24 e 48 h de incubação. Como controle negativo foi utilizada solução de PBS-Tween 5% e como controle positivo utilizou-se uma solução de clorexidina 0,02% (0,2 mg/mL). A clorexidina é uma biguanida amplamente utilizada para o tratamento de ceratite amebiana em concentrações de 0,02% a 0,2% (LIU et al., 2006).

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 tripan 0,4%. Todas as concentrações foram testadas três vezes em triplicata.

Os resultados obtidos no teste de avaliação de atividade amebicida foram expressos como porcentagem de trofozoítos viáveis através da média e desvio padrão das triplicatas. A concentração inibitória média (CI50) foi calculada a partir de regressão linear utilizando um intervalo de confiança de 95%.

4.4 Avaliação do tipo de morte celular

4.4.1 Seleção dos controles para a citometria de fluxo

Alterações morfológicas nucleares nas células são características de apoptose, que podem ser avaliadas através de microscopia de fluorescência, pela coloração das células com laranja de acridina (3,6- dimetilaminoacridina) e brometo de etídio (brometo de 3,8-diamino-5- etil-6-fenilfenantridínio) (LEITE *et al.*, 1999). Para a seleção dos controles utilizados na citometria de fluxo, a cepa ATCC *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) na densidade de 8×10^4 trofozoítos/mL foi incubada com concentrações de anfotericina B (0,15 mg/mL e 0,30 mg/mL), biguanida (0,02 mg/mL) e clorexidina (0,02 mg/mL e 0,002 mg/mL) por 48 h. Após incubação, as células foram centrifugadas e o meio foi substituído por PBS, seguido da adição de uma solução contendo laranja de acridina (1,2 μ g/mL) e brometo de

etídeo (4 µg/mL). As acantamebas foram centrifugadas novamente e o PBS foi removido para observação em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100). Como controle negativo, foram utilizadas acantamebas sem tratamento nas mesmas condições de densidade e tempo. As alterações foram avaliadas microscopicamente.

4.4.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada conforme descrito por Assunção (2013) com modificações. As acantamebas foram incubadas com a CI50 e a concentração de 2,5 mg/mL do composto isolado acetato de miconidina por 48h. Posteriormente, as amebas foram centrifugadas e lavadas com PBS 1X. A solução de PBS 1X foi removida e as amebas foram ressuspensas em tampão de ligação 1X (Millipore) e marcadas por 15 min com anexina V-FITC. O iodeto de propídeo foi adicionado para subsequente avaliação em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences). As células viáveis, em apoptose e em necrose e/ou apoptose tardia foram detectadas utilizando o programa Flowing Software 2.5.1.

4.5 Preparação da nanoemulsão rica em triglicerídeos contendo o composto isolado acetato de miconidina

A nanoemulsão foi preparada conforme descrito anteriormente por Filippin & Souza (2008) com algumas modificações. Miglyol (70%), fosfatidilcolina (27%), colesterol (3%) e o composto isolado acetato de miconidina foram

dissolvidos em clorofórmio-metanol (2:1). A mistura foi seca por evaporação espontânea para remover o solvente orgânico. Após, adicionou-se 6 mL de PBS (1:10) e a mistura foi emulsionada em sonicador por 30 min. A nanoemulsão foi mantida à temperatura de 4 °C protegida de luz.

4.5.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta

O tamanho de partícula da nanoemulsão contendo o composto isolado acetato de miconidina foi analisado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas a 25 °C com laser HeNe (633 nm) como feixe incidente em ângulo de detecção de 173° em uma cubeta de quartzo. O índice de polidispersão (Pdl) da nanoemulsão foi determinado a partir dos dados obtidos da velocidade de decaimento da função de correlação de fótons. O tamanho médio das partículas foi avaliado a partir de três medidas durante 30 dias (dias 1, 2, 5, 8,12, 22, 30).

O potencial zeta foi medido através de microeletroforese Doppler a laser utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). A carga das partículas foi estimada através da mobilidade eletroforética, sendo calculado o potencial zeta.

4.5.2 Avaliação da atividade amebicida do composto isolado acetato de miconidina associado à nanoemulsão rica em triglicérides frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

Para a realização dos ensaios de atividade amebicida, 100 µL das culturas de *Acanthamoeba* na densidade de 8×10^4 trofozoítos/mL em meio PYG foram dispostos em placas de 96 poços e expostos a 100 µL de cada concentração da nanoemulsão contendo o composto isolado acetato de miconidina (0,156 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL). As placas foram seladas com Parafilm® e incubadas a 30 °C por 48 h. Como controle negativo, foi utilizada a nanoemulsão sem incorporação do composto.

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 tripan 0,4%. Todas as concentrações foram testadas três vezes em triplicata.

Os resultados obtidos no teste de avaliação de atividade amebicida foram expressos como porcentagem de trofozoítos viáveis através da média e desvio padrão das triplicatas. A concentração inibitória média (CI50) foi calculada a partir de regressão linear utilizando um intervalo de confiança de 95%.

4.5.3 Avaliação da citotoxicidade do composto isolado acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão frente a células de córnea de coelho

Para determinar a citotoxicidade do composto isolado acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão, foi utilizada a linhagem celular de córnea de coelho SIRC (ATCC® – CCL 60).

As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C em meio de cultivo DMEM suplementado com 2 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas e cultivadas após confluência.

Para a realização dos testes de citotoxicidade, foram inoculadas 10⁵ células/poço em placa de 96 poços e incubadas por 24 h. A CI50 do acetato de miconidina livre solubilizado em DMSO e associado a nanoemulsão foi adicionada ao poço e incubadas por mais 48 h. Como controle negativo, utilizou-se uma alíquota da cultura celular na densidade 10⁵ células/poço e correlacionado com 100% de viabilidade e, como controle positivo a clorexidina 0,02% (0,2 mg/mL).

Após incubação, adicionou-se a solução de laranja de acridina (1,2 µg/mL) e brometo de etídeo (4 µg/mL). O meio foi removido para observação em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100).

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos são apresentados com médias e desvio padrão e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido dos pós teste de Conover através do programa MedCalc. O nível de significância adotado para os testes foi definido como $p < 0,05$.

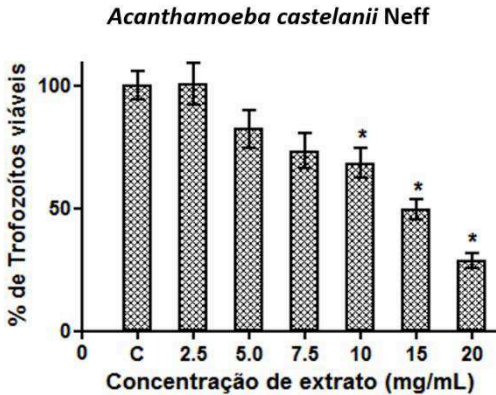
5. RESULTADOS

5.1 Atividade amebicida do extrato bruto de *E. hiemalis* sobre trofozoítos de *A. castellanii* Neff

Os estudos de viabilidade *in vitro* são importantes para a triagem de novos agentes terapêuticos e fornecem dados preliminares para subsequentes estudos *in vivo* (HEREDERO-BERMEJO et al., 2013). A figura 6 demonstra a porcentagem de viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) com diferentes concentrações do extrato bruto de *E. hiemalis*.

Os resultados de viabilidade dos trofozoítos avaliados após 48h em contato com o extrato bruto de *E. hiemalis* em relação ao controle negativo, apresentaram diminuição da viabilidade celular, sendo significativos em concentrações maiores de 10 mg/mL ($p < 0,05$). A atividade amebicida do extrato foi concentração dependente, ou seja, a inativação dos trofozoítos foi diretamente proporcional ao aumento da concentração. A CI50 do extrato foi calculada, obtendo-se um valor de 14,07 mg/mL.

Figura 6. Atividade amebicida do extrato bruto frente a trofozoítos de *A. castellanii* Neff.



Ensaio de viabilidade da cepa ATCC 30010 após incubação por 48 h com as concentrações do extrato bruto (2,5 mg/mL, 5 mg/mL, 7,5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL e 20 mg/mL). Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *Valor $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis).

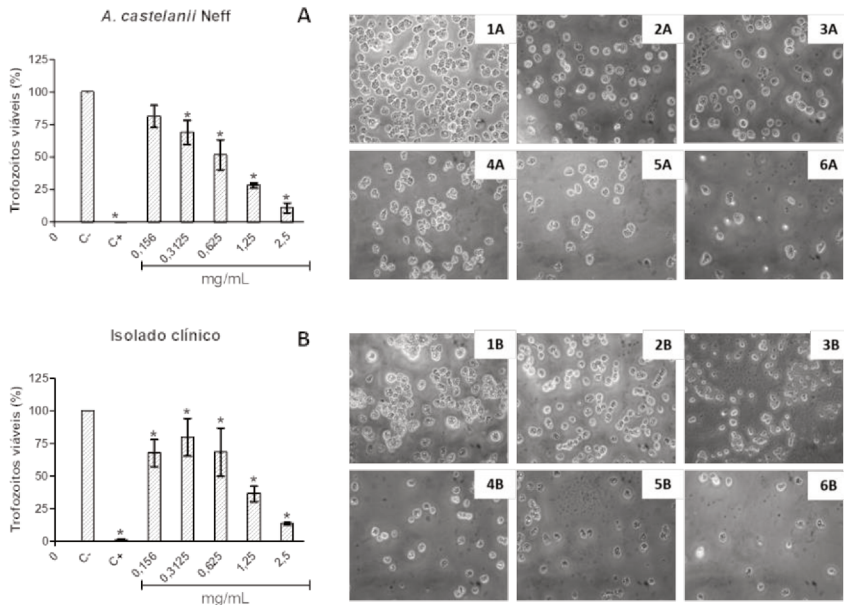
5.2 Atividade amebicida dos compostos isolados acetato de miconidina e O-metil-olivetol de *E. hiemalis* sobre trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

Os trofozoítos de *A. castellanii* Neff e ICR1 foram incubados com as concentrações dos compostos isolados testados e analisados após 6, 24 e 48 h. Após 6 h em contato com os compostos, os trofozoítos foram observados em microscópio invertido, onde os que estavam em contato com as maiores concentrações (1,25 e 2,5 mg/mL) apresentavam-se com alteração de morfologia celular e alteração de membrana.

Em 24 h de observação, houve uma redução do número de trofozoítos em todas as concentrações, quando comparadas ao controle, apresentando lise celular e alteração de morfologia de trofozoítos. As figuras 7 e 8 demonstram a porcentagem de trofozoítos viáveis após 48h de incubação de *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) e do ICR1, respectivamente, com diferentes concentrações dos compostos acetato de miconidina e O-metil-olivetol avaliados.

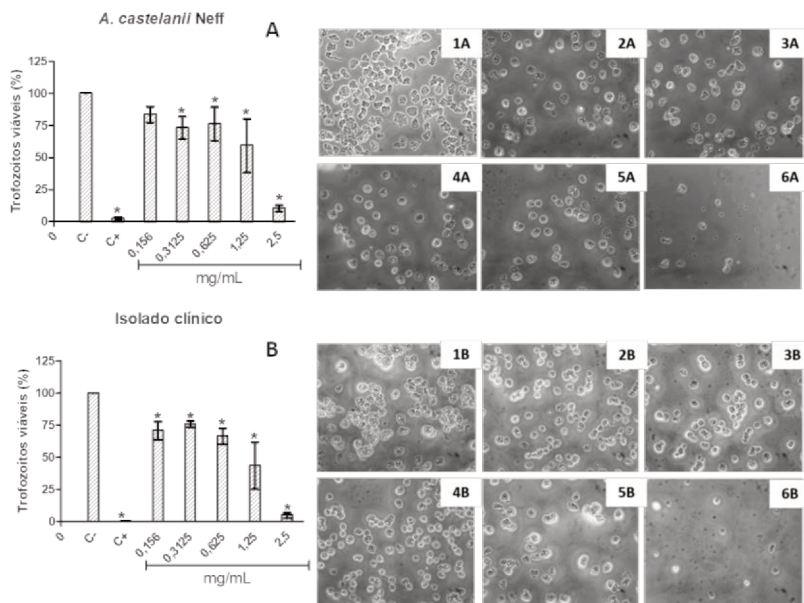
Os resultados de viabilidade dos trofozoítos avaliados após o tratamento com acetato de miconidina e O-metil-olivetol em relação ao controle negativo, apresentaram diminuição da viabilidade celular, com diferença significativa em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$).

Figura 7. Atividade amebicida do composto isolado acetato de miconidina frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.



Ensaio de viabilidade da cepa ATCC 30010 (A) e ICR1 (B) após incubação por 48 h com as concentrações de acetato de miconidina. As imagens demonstram a diminuição dose-dependente frente à diferentes concentrações do composto: (1A e 1B) controle negativo das cepas, (2A e 2B) 0,156 mg/mL; (3A e 3B) 0,3125 mg/mL; (4A e 4B) 0,625 mg/mL; (5A e 5B) 1,25 mg/mL; (6A e 6B) 2,5mg/mL. O controle positivo utilizado foi clorexidina 0,02% (0,2 mg/mL). Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *Valor $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis). Imagens com aumento de 200x.

Figura 8. Atividade amebicida do composto isolado O-metil-olivetol frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.



Ensaio de viabilidade da cepa ATCC 30010 (A) e ICR1 (B) após incubação por 48 h com as concentrações de O-metil-olivetol. As imagens demonstram a diminuição dose-dependente frente a diferentes concentrações do composto: (1A e 1B) controle negativo das cepas, (2A e 2B) 0,156 mg/mL; (3A e 3B) 0,3125 mg/mL; (4A e 4B) 0,625 mg/mL; (5A e 5B) 1,25 mg/mL; (6A e 6B) 2,5mg/mL. O controle positivo utilizado foi clorexidina 0,02% (0,2 mg/mL). Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *Valor $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis). Imagens com aumento de 200x.

A cepa ATCC, após 48h de incubação e na menor concentração testada (0,156 mg/mL), apresentou viabilidade de 81% e 83% para acetato de miconidina e O-metil-olivetol, respectivamente. Na maior concentração testada (2,5 mg/mL) de

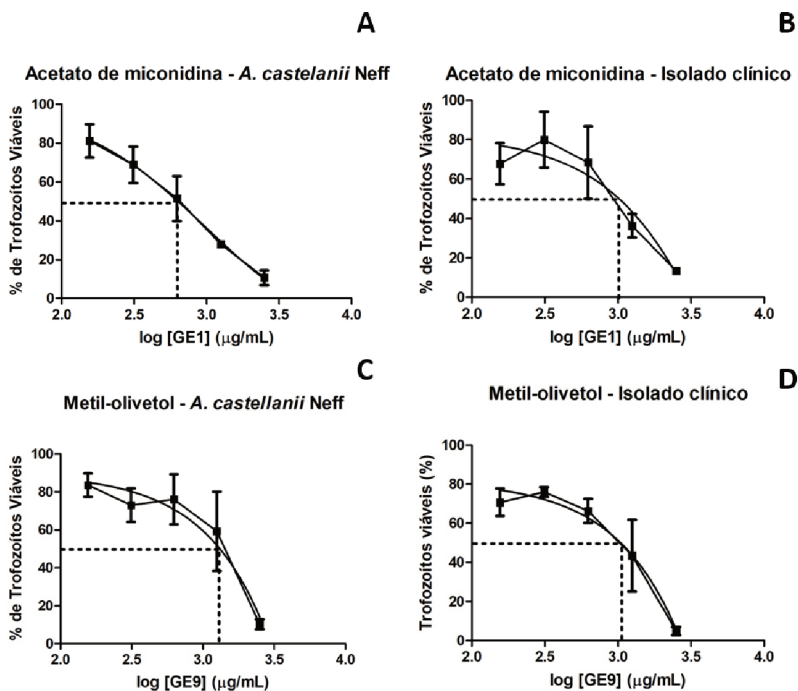
acetato de miconidina e O-metil olivetol, menos de 15% dos trofozoítos permaneceram viáveis.

O ICR1 apresentou sensibilidade semelhante à cepa ATCC em relação à ação de ambos os compostos isolados. Após 48 h de exposição na concentração de 0,156 mg/mL de acetato de miconidina e O-metil-olivetol, as viabilidades observadas foram de 67% e 71%, respectivamente, e menos de 14% de viabilidade na maior concentração testada dos compostos.

Os valores de viabilidade para a cepa ATCC e ICR1 frente ao fármaco clorexidina (0,2 mg/mL) apresentaram-se menores que 3% para os testes com ATCC em 48 h de incubação. Para o ICR1, a viabilidade foi menor que 5% para clorexidina (0,2 mg/mL) em 48 h de incubação.

Após a avaliação do perfil de viabilidade celular dos trofozoítos frente aos compostos isolados, os valores de CI50 (Figura 9) foram calculados. Para o acetato de miconidina, os valores de CI50 obtidos foram 0,635 mg/mL e 1,01 mg/mL para a cepa *A. castellanii* Neff e ICR1, respectivamente. O O-metil-olivetol apresentou CI50 de 1,31 mg/mL e 1,04 mg/mL para a cepa *A. castellanii* e ICR1, respectivamente.

Figura 9. Determinação da CI50 dos compostos isolados para cada espécie de *Acanthamoeba* testada.



Resultados expressos em log da concentração dos compostos pela viabilidade dos trofozoítos da cepa ATCC (A e C) e do ICR1 (B e D) em porcentagem. A linha tracejada indica a CI50 dos compostos. Calculado por regressão linear e interpolação de 50% (GraphPad Prism 5.0).

Observou-se que as atividades dos compostos isolados tiveram um comportamento dose-dependente, ou seja, a inativação dos trofozoítos das acantamebas testadas foi diretamente proporcional ao aumento das doses dos compostos isolados. Apesar dos resultados promissores, não foi possível dar

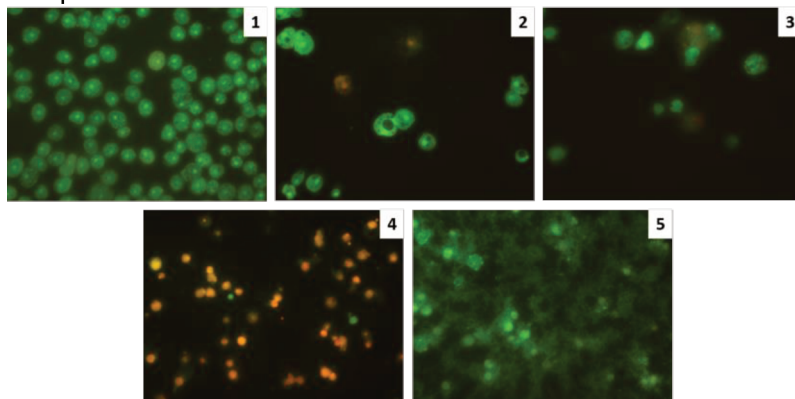
continuidade à investigação da atividade antiamebiana do composto O-metil-olivetol devido ao seu baixo rendimento.

Os compostos testados não induziram a formação de cistos nos tratamentos testados, característica importante para o tratamento de ceratite amebiana, visto que a habilidade dos trofozoítos passarem para a forma de cistos durante o período de tratamento é responsável por casos de recidivas da doença (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004).

5.3 Avaliação de morte celular

Para selecionar os controles, realizou-se a avaliação do tipo de morte celular induzida pelos medicamentos clorexidina, biguanida e anfotericina B, a partir da coloração laranja de acridina/brometo de etídio (Figura 10).

Figura 10. Microscopia de fluorescência com coloração laranja de acridina e brometo de etídeo em *A. castellanii* Neff frente a compostos ativos.



(1) Controle de acantamebas não tratadas. Acantamebas tratadas por 48 h com os fármacos anfotericina B em concentrações 0,15 mg/mL (2) e 0,30 mg/mL (3); biguanida em concentração 0,02 mg/mL (4) e clorexidina em concentração 0,02 mg/mL (5). Microscopia de fluorescência com aumento de 200x.

O controle contendo trofozoítos de *A. castellanii* Neff não tratados apresentou células com núcleos verdes e membrana celular intactos, indicando células viáveis e saudáveis. Todas as células expostas aos fármacos controles demonstraram alguma alteração celular. A anfotericina B na concentração 0,15 mg/mL apresentou células viáveis coradas em verde, semelhantes ao controle e poucas células em necrose. Quando há um aumento na concentração (0,30 mg/mL), é possível observar apenas borrões celulares, com algumas células em necrose. A biguanida em concentração 0,02 mg/mL apresentou células em necrose, mantendo a estrutura da célula. A clorexidina em concentração 0,02 mg/mL demonstrou apenas restos celulares.

Diante dos resultados, como marcador de necrose (iodeto de propídeo positivo), foi selecionado como controle a biguanida em concentração 0,02 mg/mL por ter apresentado células em necrose, coradas em laranja com fluorescência laranja uniforme. Para o marcador de apoptose, a concentração de clorexidina foi diminuída para 0,002 mg/mL, a fim de observar-se maior quantidade de células em apoptose.

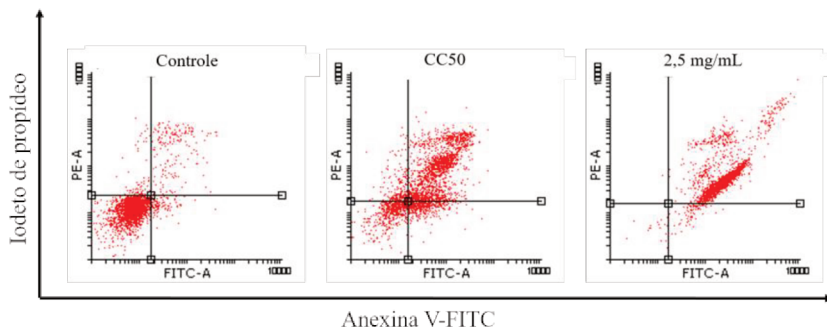
5.4 Citometria de fluxo

Para avaliação das respostas celulares induzidas pelo tratamento com o composto isolado acetato de miconidina, realizou-se a citometria de fluxo da cepa *A. castellanii* Neff (ATCC) tratadas por 48 h com a CI50 e a maior concentração do composto isolado testado (2,5 mg/mL).

Tabela 1. Tabela representativa da dispersão celular (%) de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* Neff tratadas com acetato de miconidina e avaliadas por citometria de fluxo

COMPOSTOS	Quadrantes (% celular)			
	Inferior esquerdo	Inferior direito	Superior esquerdo	Superior direito
Controle	87	4	3	6
CI50	19	16	8	57
2,5 mg/mL	1	3	1	95

Figura 11. Gráfico de pontos das células tratadas com CI50 do composto acetato de miconidina.



Trofozoítos de *A. castellanii* Neff foram incubadas por 48 h com a CI50 (0,635 mg/mL) e 2,5 mg/mL do composto acetato de miconidina, marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. As análises foram realizadas pelo o Flowing Software 2.5.1.

Os resultados obtidos (Tabela 1; Figura 11) demonstram um aumento na população celular em processo de apoptose tardia ou necrose, aumentando para 57% e 95% para a CI50 e para a concentração de 2,5 mg/mL, respectivamente. Esse resultado indicou que o acetato de miconidina danifica diretamente o trofozoíto de *A. castellanii* Neff e corrobora os resultados avaliados por contagem de células viáveis.

5.5 Nanoemulsão rica em lipídeos contendo o composto isolado acetato de miconidina

5.5.1 Características físico-químicas

As características físico químicas constituem parâmetros importantes no que diz respeito a estabilidade de sistemas

nanoemulsionados. A nanoemulsão foi preparada e incorporou-se o composto em uma concentração final de 5 mg/mL. O aspecto final da formulação apresentava-se de coloração branca leitosa, sem quaisquer agregados, separação de fases ou precipitação visível na amostra estocada a 4 °C, protegida de luz.

A manutenção do diâmetro das partículas suspensas na formulação indicou que não houve aglomeração das mesmas. Em trinta dias, a nanoemulsão apresentou um tamanho médio de $118,2 \pm 1,8$ nm. O índice de polidispersão (PDI) é uma medida de homogeneidade de dispersão e varia de 0 a 1. O valor de PDI encontrado foi de $0,205 \pm 0,010$. O potencial zeta apresentou resultado negativo de $-44,8 \pm 5,1$ mV (Tabela 2)

Tabela 2. Tamanho médio de partícula, PDI e potencial zeta das nanoemulsões

Formulação	Dias	Tamanho Médio de Partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Nanoemulsão branca	1	148,5 ± 0,6	0,165 ± 0,005	- 48,0 ± 2,4
	2	155,5 ± 0,4	0,177 ± 0,008	- 46,2 ± 0,8
	5	145,0 ± 1,1	0,184 ± 0,030	- 46,7 ± 3,4
	8	151,0 ± 1,6	0,175 ± 0,009	- 43,8 ± 3,1
	12	143,7 ± 0,6	0,194 ± 0,009	- 43,7 ± 1,2
	22	142,4 ± 1,2	0,174 ± 0,005	-39,6 ± 1,1
	30	145,4 ± 1,9	0,187 ± 0,007	- 38,8 ± 1,9
Nanoemulsão contendo o composto isolado acetato de miconidina	1	115,6 ± 0,7	0,213 ± 0,004	- 51,1 ± 5,6
	2	121,5 ± 1,1	0,207 ± 0,005	- 51,7 ± 1,7
	5	117,3 ± 0,6	0,193 ± 0,009	- 46,0 ± 2,6
	8	119,0 ± 2,3	0,219 ± 0,009	- 43,1 ± 3,1
	12	117,2 ± 1,7	0,195 ± 0,003	- 42,7 ± 3,3
	22	118,3 ± 1,6	0,200 ± 0,003	- 40,6 ± 3,2
	30	118,6 ± 2,8	0,207 ± 0,013	- 38,1 ± 4,0

Resultados expressos em média ± desvio padrão das leituras no decorrer de 30 dias, n = 3.

5.5.2 Atividade amebicida do composto isolado acetato de miconidina associado a nanoemulsão rica em lipídeos frente trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

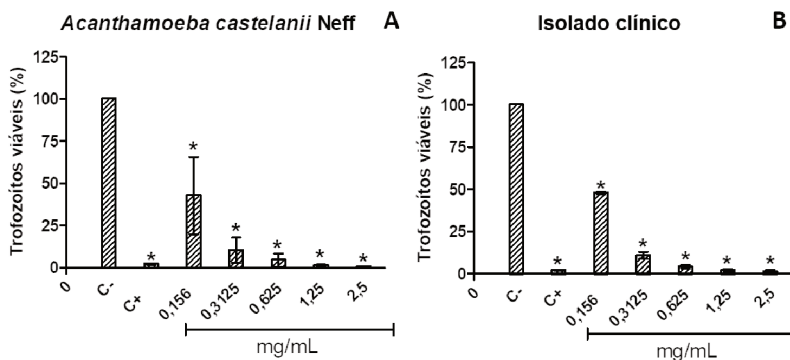
Nanoemulsões são sistemas estáveis de fácil preparação com grande capacidade de solubilização de compostos, com intuito de melhorar a biocompatibilidade com as células alvo (IMRAN et al., 2016). A figura 12 demonstra a porcentagem de trofozoítos viáveis após 48 h de incubação de *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) e do ICR1, respectivamente, com diferentes concentrações da nanoemulsão rica em lipídeos contendo o composto isolado acetato de miconidina.

Os resultados de viabilidade dos trofozoítos avaliados após o tratamento com a nanoemulsão contendo o composto isolado acetato de miconidina, quando comparados ao controle negativo apresentaram diminuição da viabilidade celular significativa em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$).

A cepa ATCC, após 48 h de incubação e na menor concentração testada (0,156 mg/mL), apresentou viabilidade de 42% e, na maior concentração testada (2,5 mg/mL) menos de 1% dos trofozoítos permaneceram viáveis.

O ICR1 apresentou sensibilidade semelhante à cepa ATCC em relação à ação da nanoemulsão. Após 48 h de exposição na concentração de 0,156 mg/mL, a viabilidade observada foi 47% e 1% dos trofozoítos permaneceram viáveis na maior concentração testada (2,5 mg/mL).

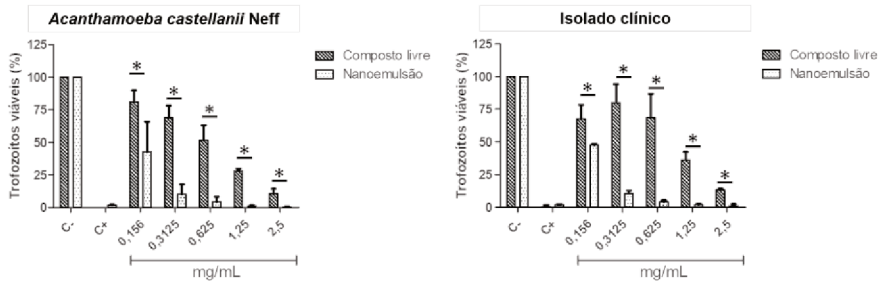
Figura 12. Avaliação da atividade amebicida da nanoemulsão rica em lipídeos contendo o composto isolado frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.



Ensaio de viabilidade da cepa ATCC 30010 (A) e IRC1 (B) após incubação por 48 h com as concentrações da nanoemulsão rica em lipídeos contendo o composto isolado acetato de miconidina. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis).

Após a avaliação do perfil de viabilidade celular dos trofozoítos, foram calculados os valores de CI50 e CI90. A CI50 calculada foi de 0,126 mg/mL e 0,139 mg/mL para a cepa ATCC e ICR1, respectivamente, demonstrando uma melhora significativa na CI50 quando comparada ao composto livre (Figura 13). A CI90 calculada foi de 0,448 mg/mL para a cepa ATCC e 0,482 mg/mL para o ICR1.

Figura 13. Comparação da atividade do composto acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão frente as cepas de *Acanthamoeba* spp.



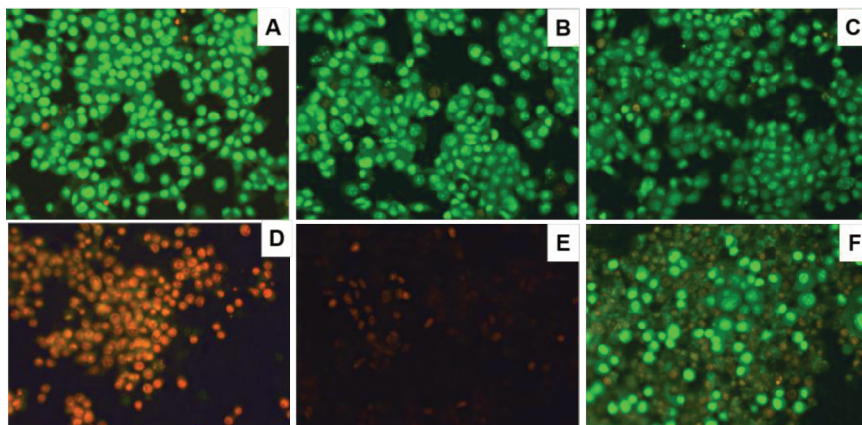
Ensaio de viabilidade da cepa ATCC 30010 e ICR1 após incubação por 48 h com o composto isolado acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis).

5.5.3 Avaliação da citotoxicidade em células SIRC

A citotoxicidade do composto livre acetato de miconidina e associado a nanoemulsão foi avaliada frente a linhagem SIRC. Alterações morfológicas foram observadas por microscopia de fluorescência após coloração com laranja de acridina e brometo de etídio (Figura 13). Após a incubação das células por 48 h com a CI50 de cada tratamento, observou-se que a célula tratada com o composto livre demonstrou características morfológicas típicas de células em necrose, com coloração vermelha uniforme. Quando tratadas com a CI50 da nanoemulsão, algumas células apresentam ainda características necróticas, porém, em menor quantidade com presença de células viáveis, demonstrando que nanoemulsão foi capaz de reduzir parte da citotoxicidade do

composto isolado. A nanoemulsão sem ativos e o controle com DMSO não apresentaram efeito citotóxico.

Figura 14. Alterações morfológicas induzidas pelo composto acetato de miconidina livre e associado a nanoemulsão sobre células SIRC



(A) Controle de células SIRC não tratadas; (B) Células SIRC tratadas DMSO sem o composto isolado; (C) Células SIRC tratadas com a nanoemulsão branca; (D) Controle positivo com clorexidina (0,2 mg/mL); (E) Células SIRC tratadas com a CI50 do composto livre; (F) Células SIRC tratadas com a CI50 composto associado a nanoemulsão. Microscopia de fluorescência com aumento de 200x.

6. DISCUSSÃO

Estudos de produtos naturais com potencial atividade antiamebiana ganhou importância nos últimos anos devido ao aumento na incidência de infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. Os primeiros casos de infecções em humanos foram relatados na década de 1970, que incluem a encefalite amebiana granulomatosa, a ceratite amebiana e lesões de pele (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

A falta de protocolos para o tratamento das infecções causadas por *Acanthamoeba* spp., associada à alta resistência das formas císticas do gênero, leva à necessidade da busca por novas moléculas que apresentem efeito antiamebiano, que sejam eficazes contra as formas trofozoíticas e císticas e que apresentem baixa citotoxicidade para as células (LLOYD, 2014; QVARNSTROM et al., 2013).

Nesse contexto, o presente trabalho investigou a atividade antiamebiana do extrato bruto e de compostos isolados de *E. hiemalis*. Durante a triagem inicial com o extrato bruto de *E. hiemalis*, avaliado frente a trofozoítos de *A. castellanii* Neff, os resultados mostraram evidente atividade amebicida, com uma CI50 de 14,07 mg/mL após 48 h de incubação (Figura 6). Não se observou a indução da formação de cistos após aplicação do extrato bruto, característica fundamental aos compostos, somada ao seu efeito amebostático e amebicida, o que o torna promissor na procura de potenciais compostos eficazes contra formas de *Acanthamoeba* spp.

Estudos relatados na literatura já avaliaram a atividade amebicida de extratos de plantas frente a *Acanthamoeba* spp. Um estudo de Malatyali *et al.* (2012) avaliou a atividade amebicida de extratos metanólicos de espécies de *Peucedanum* frente a *A. castellanii*. Em 48 h de incubação, o extrato de *P. caucasicum* na concentração de 32 mg/mL foi capaz de eliminar 44,7% dos trofozoítos e o extrato metanólico de *P. palimbioides*, apenas 40,4%. O extrato metanólico de *Melissa officinalis* apresentou um efeito amebicida moderado frente a trofozoítos de *A. castellanii* (MALATYALI *et al.*, 2012). Em uma concentração de 16 mg/mL, o extrato foi capaz de eliminar 32,3% dos trofozoítos viáveis.

A espécie *E. hiemalis* é uma planta neotropical típica de zonas ribeirinhas e pertence à família Myrtaceae (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Este gênero é amplamente utilizado na medicina popular para o tratamento de doenças (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006). Devido à grande quantidade de compostos fenólicos, as espécies possuem ampla atividade biológica, tais como atividade antioxidante, atividade citotóxica, antibacteriana e anti-*Trypanosoma* já relatadas na literatura (BENFATTI *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2012; VICTORIA *et al.*, 2012).

Inúmeros estudos são encontrados na literatura relacionando espécies do gênero *Eugenia* investigando a composição química e atividades biológicas de extratos e frações, porém nenhum estudo relata a atividade antiamebiana. O óleo essencial de *E. hiemalis* já foi testado frente a cepas de

Mycoplasma, demonstrando uma boa atividade com MIC < 500 µg mL⁻¹ (ZATELLI et al., 2015). *Eugenia uniflora*, frequentemente utilizada na medicina popular, apresenta potencial atividade antibacteriana, antioxidante, anti-*Trypanosoma* e antifúngica descritas (BIASI-GARBIN et al., 2016; SANTOS et al., 2012; SOBEH et al., 2016; SOUSA et al., 2015). *Eugenia klotzschiana* demonstrou atividade antimicrobiana frente bactérias como *Streptococcus mutans* e *Prevotella nigrescens* (CARNEIRO et al., 2017).

Tendo em vista o potencial antiamebiano de *E. hiemalis*, avaliou-se no presente estudo, a atividade de dois compostos contra trofozoítos da cepa *A. castellanii* Neff e ICR1. Todos os compostos inibiram significativamente a viabilidade celular de *A. castellanii* Neff e ICR1, sendo que o composto acetato de miconidina foi o que apresentou maior atividade antiamebiana, no entanto, a atividade foi semelhante entre os dois compostos avaliados para o ICR1 (Figuras 7 e 8). Apesar dos resultados promissores, não foi possível dar continuidade à investigação da atividade antiamebiana do composto O-metil-olivetol devido ao seu baixo rendimento. Diante disso, o composto acetato de miconidina foi considerado o mais promissor para dar continuidade às investigações, uma vez que, além de inibir significativamente a viabilidade de *Acanthamoeba* spp., também teve um bom rendimento. Outros estudos relatam as mesmas dificuldades causadas pelo isolamento demorado e dispendioso do material vegetal e pela falta de métodos eficientes de extração

que apresentem alto rendimento a partir de compostos acessíveis (SISA; DVORAKOVA; VANEK, 2017).

A viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba* após a exposição ao extrato e compostos foi avaliada por meio de contagem em hemocitômetro, utilizando azul de tripan 0,4%. Para a avaliação da atividade amebicida do composto promissor selecionado (acetato de miconidina), utilizou-se a citometria de fluxo como técnica complementar para avaliar a atividade, observar alterações celulares induzidas e alterações de permeabilidade, como em outros trabalhos de estudo de atividade amebicida (HEREDERO-BERMEJO et al., 2015). Esta abordagem mostrou-se útil, devido ao número maior de eventos analisados e às informações fornecidas sobre morte celular.

Neste estudo, observou-se que com o aumento da concentração do composto ativo, aumentou o número de eventos duplo marcados com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (Figura 11), indicando que os trofozoítos de *Acanthamoeba* se encontravam em apoptose tardia ou necrose, uma vez que são observadas características sugestivas, que incluem externalização da fosfatidilserina, protrusões e dano da membrana celular. Mais estudos devem ser realizados para que se investiguem os mecanismos de sinalização de atuação do composto, bem como a sua relação estrutura-atividade.

Os compostos extraídos de *E. hiemalis* e avaliados neste estudo, acetato de miconidina e O-metil-olivetol, são derivados fenólicos, sendo o primeiro uma forma de reserva natural da quinona primina. Vale destacar que nos organismos vivos, as

quinonas são facilmente convertidas em seus correspondentes fenólicos hidroquinonas (e vice-versa) em processos de oxirredução. Quinonas naturais e sintéticas já tiveram suas atividades antiprotozoárias relatadas, como a embelina que mostrou atividade contra o *T. cruzi*, com 100% de lise dos protozoários, em uma concentração de 100 µg/mL (FERESIN et al., 2003). Alguns derivados de naftoquinona β-lapachona, por atuarem contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, podem ser utilizados como fármacos alternativos em bancos de sangue (CASTRO, 1993). A primina demonstrou uma potente atividade frente ao *Trypanosoma brucei rhodesiense* com CI50 calculada de 0,144 µM e *Leishmania donovani*, CI50 de 0,711 µM (TASDEMIR et al., 2006). Viegas et al. (2017) testaram a primina frente a vermes adultos de *S. mansoni*, observando um efeito concentração-dependente e uma CI50 calculada de 7,08 µg/mL, possuindo um efeito máximo em concentrações acima de 20 µg/mL.

A primina chegou a ser utilizada no tratamento de câncer de pele humana, porém seu uso tornou-se restrito devido ao seu efeito irritativo (NASCIMENTO et al., 2015). No estudo de Brondani et al. (2006) análogos sintéticos da primina foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica, demonstrando-se que todos os análogos foram menos citotóxicos frente a células de carcinoma oral em comparação ao composto original. Esse resultado demonstrou o potencial citotóxico da primina.

Atualmente, a nanotecnologia vem sendo utilizada para o estudo de novas formulações visando o tratamento de infecções

acantamebianas, pois o nanoencapsulamento pode ajudar a melhorar a solubilidade dos fármacos, bem como sua eficácia e diminuir a citotoxicidade (AQEEL et al., 2016; IMRAN et al., 2016; MAHBOOB et al., 2018).

Neste estudo, foi produzida uma nanoemulsão rica em lipídeos contendo o composto isolado – acetato de miconidina – de *E. hiemalis*, obtendo-se um tamanho de partícula médio de 118,2 nm. De forma complementar à análise do tamanho de partícula, propriedades físico-químicas do sistema nanoemulsionado como tamanho médio e distribuição de tamanho das gotículas, potencial zeta e o Pdl foram avaliados (Tabela 2).

O potencial zeta é uma propriedade de partículas em suspensão resultante das cargas presentes que reflete a composição da interface das nanoemulsões. Valores negativos, como o observado nesse estudo, já foram relatados anteriormente na literatura e estão relacionados ao fato da nanoemulsão possuir a fosfatidilcolina como surfactante na formulação (PANATIERI et al., 2017). Valores acima de 25 mV (valor absoluto) conferem estabilidade física ao sistema, o que indica que as partículas estão dispersas e o sistema é defloculado, enquanto valores abaixo de 25 mV indicam que as forças de atração excedem as forças de repulsão, levando a floculação (ROLAND et al., 2003; JINAN et al., 2018;).

De forma a verificar a homogeneidade das partículas da nanoemulsão, foi analisado o índice de polidispersão (Pdl) ao longo de 30 dias. O Pdl indica a uniformidade do tamanho de

partículas e variações ao longo de tempo indicam o aparecimento de populações que não existiam inicialmente (SOUZA et al., 2012). Valores próximos de zero indicam uma dispersão homogênea, enquanto aqueles acima de 0,3 indicam alta heterogeneidade (ZHANG; KOSARAJU, 2007). O PDI não se mostrou alterado no período avaliado no estudo, indicando homogeneidade da dispersão.

A nanoemulsão contendo o composto isolado acetato de miconidina proporcionou uma melhora na atividade amebicida quando comparada ao composto isolado livre (Figura 13), apresentando uma diminuição de cinco vezes no valor da CI₅₀, de 0,635 mg/mL e 1,01 mg/mL para a cepa *A. castellanii* e ICR1 quando em contato com o composto livre para 0,126 mg/mL e 0,139 mg/mL com a nanoemulsão contendo o composto.

Outros estudos relatados na literatura demonstram a melhora da atividade amebicida de compostos quando associados a sistemas nanoemulsionados. No estudo de Aqeel et al. (2016), a clorexidina conjugada a nanopartículas de ouro apresentou níveis mais elevados de toxicidade frente a *A. castellanii* quando comparada com a clorexidina isolada. Em outro estudo, a periglucina A e o ácido betulínico foram encapsulados em nanopartículas de PLGA (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) e testados frente a trofozoítos de *Acanthamoeba triangularis* (MAHBOOB et al., 2018). As nanopartículas de periglucina A e ácido betulínico, em concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, inibiram a viabilidade dos

trofozoítos em 74,9%, 59,9%, 49,9% e 71,2%, 52,2%, 88%, respectivamente.

Neste estudo, observou-se uma citotoxicidade elevada do composto isolado livre. Quando associado a nanoemulsão, parte da sua citotoxicidade é reduzida, apresentando aumento de células viáveis (Figura 14). Observa-se que, quando comparado ao controle positivo (clorexidina), a nanoemulsão com acetato de miconidina foi capaz de induzir a morte de um número inferior de células, apresentando ainda células viáveis coradas em verde. A clorexidina é um fármaco utilizado na terapia de infecções amebianas, relatada na literatura como causadora de efeitos colaterais devido a sua alta toxicidade (AQEEL et al., 2016; CARNT; STAPLETON, 2016).

Situações como essa não são incomuns e já foram relatadas na literatura. A prevenção da toxicidade dos compostos bioativos é um dos objetivos dos sistemas nanocarreadores (AL-JAMAL et al., 2013). Um estudo de Gündel *et al.* (2018) avaliou a citotoxicidade do óleo de manjeriço livre e associado a nanoemulsão, demonstrando que o óleo livre reduziu a viabilidade celular em concentrações mais altas. No entanto, a nanoemulsão contendo óleo de manjeriço não causou redução da viabilidade celular, fato relacionado à capacidade de liberação controlada do ativo, reduzindo o dano celular gerado.

A biodistribuição de nanocarreadores por via parenteral ajuda a atingir objetivos como a redução dos efeitos colaterais e o aumento da eficácia terapêutica em doses menores de compostos bioativos (SHUKLA et al., 2014). A encefalite

amebiana granulomatosa atinge o SNC de indivíduos imunocomprometidos através da disseminação pela via hematogênica para outros órgãos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). A infecção não possui tratamento específico, sendo utilizada uma combinação de diversos fármacos por via intravenosa.

O composto acetato de miconidina associado a nanoemulsão rica em lipídeos inibiu significativamente a viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba* sem levar a formação de cistos, além de melhorar a toxicidade frente a células de córnea. Sendo assim, o composto pode ser utilizado como protótipo para outros compostos bioativos para o tratamento de infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

7. CONCLUSÕES

- O extrato bruto de *E. hiemalis* apresentou atividade antiamebiana frente a *Acanthamoeba* spp.;
- Os compostos isolados da planta acetato de miconidina e O-metil-olivetol, inibiram significativamente a viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba*;
- Os compostos isolados de *E. hiemalis* apresentaram uma melhor atividade frente a *Acanthamoeba* spp. quando comparado ao extrato bruto da planta;
- A citometria de fluxo demonstrou-se uma técnica eficaz e complementar aos dados obtidos pela contagem de trofozoítos viáveis em hemocitômetro;
- O composto acetato de miconidina induziu processos de apoptose tardia ou necrose em trofozoítos de *Acanthamoeba*;
- A nanoemulsão contendo o composto acetato de miconidina é estável macroscopicamente, monodispersa e apresentou características físico-químicas ideais para sua aplicação em sistemas biológicos;
- O sistema nanoemulsionado proporcionou uma melhora significativa na atividade do composto isolado acetato de miconidina frente a *Acanthamoeba* spp.;
- O nanoencapsulamento do acetato de miconidina reduziu parte a toxicidade do composto livre sobre células de córnea.

8. PERSPECTIVAS

- Investigação o potencial antiamebiano dos compostos isolados de *E. hiemalis* frente a cistos de *Acanthamoeba* spp.;
- Avaliação da citotoxicidade do composto O-metil-olivetol frente a células de córnea;
- Análise da nanoemulsão contendo o composto isolado através de microscopia eletrônica de transmissão;
- Determinação do teor e eficiência de encapsulação do acetato de miconidina livre na nanoemulsão e determinação do teor de acetato de miconidina total.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUMANEI, M. H. et al. Design and development of microemulsion systems of a new antineoplaston A10 analog for enhanced intravenous antitumor activity: In vitro characterization, molecular docking, 125 I-radiolabeling and in vivo biodistribution studies. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 545, n. 1–2, p. 240–253, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.010>>

AL-JAMAL, K. T. et al. Cationic poly-L-lysine dendrimer complexes doxorubicin and delays tumor growth in vitro and in vivo. **ACS Nano**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 1905–1917, 2013.

ALBOUCHI, F. et al. Chemical composition and anti-*Acanthamoeba* activity of Melaleuca styphelioides essential oil. **Journal of Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 183, p. 104–108, 2017.

ALKHARASHI, M. et al. Medical interventions for *Acanthamoeba* keratitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–28, 2016.

ALSHAHRANI, S. M. Preparation, Characterization and in vivo Anti-inflammatory Studies of Ostrich Oil Based Nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**, [s. l.], v. 2018, p. 1–6, 2019.

AMMAR, H. O. et al. Nanoemulsion as a Potential Ophthalmic Delivery System for Dorzolamide Hydrochloride. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 808–819, 2009.

ANJANA, D. et al. Development of Curcumin Based Ophthalmic Formulation. **American Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v.

8, n. April, p. 41–49, 2014.

ANWAR, A.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: what are the options? **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 26, 2018. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2572-z>>

ASSUNÇÃO, Laura Sartori. Avaliação da citotoxicidade de derivados de sais de isotiourônio e tiazinodionas para estudo de leucemia *in vitro*. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

AQEEL, Y. et al. Gold Nanoparticle Conjugation Enhances the Antiacanthamoebic Effects of Chlorhexidine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 1283–1288, 2016.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 55–61, 2003.

BAEK, S. H. et al. Boron Trifluoride Etherate on Silica-A Modified Lewis Acid Reagent (VII). Antitumor Activity of Cannabigerol Against Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 353–356, 1998.

BENFATTI, C. S. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 33–39, 2010.

BIASI-GARBIN, R. P. et al. ANTIFUNGAL POTENTIAL OF PLANT SPECIES FROM BRAZILIAN CAATINGA AGAINST DERMATOPHYTES. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 58:18, p. 18–22, 2016.

BRONDANI, D. J. et al. Síntese, Avaliação da Atividade Citotóxica e Toxicidade Aguda de Análogos da Primina 3 e 6 Alquil-Substituídas. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, [s. l.], n. February 2015, p. 3–7, 2006.

CARLESSO, A. M. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 185–190, 2010.

CARNEIRO, N. S. et al. Chemical composition , antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, [s. l.], v. 89, p. 1907–1915, 2017.

CARNT, N.; STAPLETON, F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: A review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 77–92, 2016.

CARRIJO-CARVALHO, L. C. et al. Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus. **Survey of Ophthalmology**, [s. l.], v. 62, p. 203–218, 2016.

CASTRILLÓN, J.; OROZCO, L. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. **Revista chilena de infectología**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 147–155, 2013.

- CASTRO, S. L. De. The challenge of Chagas ' disease chemotherapy : An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 53, p. 83–98, 1993.
- CATEAU, E. et al. Free-living amoebae: What part do they play in healthcare-associated infections? **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 131–140, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.001>>
- CORSARO, D. et al. Recovery of an *Acanthamoeba* strain with two group I introns in the nuclear 18S rRNA gene. **European Journal of Protistology**, [s. l.], v. 68, p. 88–98, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejop.2019.01.007>>
- COSTA, A. O. et al. Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 70–75, 2010.
- COVEN, S. L. et al. *Acanthamoeba* granulomatous amoebic encephalitis after pediatric hematopoietic stem cell transplant. **Pediatric Transplantation**, [s. l.], v. 21, p. 1–6, 2017.
- DA ROCHA-AZEVEDO, B.; TANOWITZ, H. B.; MARCIANO-CABRAL, F. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, [s. l.], v. 2009, p. 1–14, 2009. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/251406/>>
- DART, J. K. G.; SAW, V. P. J.; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. **American Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 148, n. 4, p. 487–499.e2, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajo.2009.06.009>>

- DEGERLI, S. et al. In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 20–24, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.020>>
- DUARTE, J. L. et al. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 135, n. 1, p. 9–14, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.013>>
- EDAGAWA, A. et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 1109–1117, 2009.
- EINBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 23–28, 2004.
- FERESIN, G. E. et al. Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 88, p. 241–247, 2003.
- FERREIRA, F. P. S. et al. *Eugenia calycina* Cambess extracts and their fractions : Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 99, p. 89–96, 2014.
- FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Amphotericin b associated with triglyceride-rich nanoemulsion: stability studies and in vitro

antifungal activity. **Química Nova**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 591–594, 2008.

GOMES, T. D. S. et al. *Acanthamoeba* spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1–12, 2016.

GRAFFI, S. et al. [*Acanthamoeba* keratitis]. **Journal français d’ophtalmologie**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 640–52, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25169145>>

GUIMARAES, A. J. et al. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. **Microbiological Research**, [s. l.], v. 193, p. 30–38, 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501316305183?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

GÜNDEL, S. et al. Basil oil-nanoemulsions: Development, cytotoxicity and evaluation of antioxidant and antimicrobial potential. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 46, n. March, p. 378–383, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.038>>

HAJIALILO, E. et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains (T4, T9, and T11) from amoebic keratitis patients in Iran. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 8, p. 3147–3151, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5072-8>>

HASSAN, A. et al. *Acanthamoeba* contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: A neglected potential source of infection. **Journal of Infection and Public Health**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 304–310, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2012.06.001>>

HEREDERO-BERMEJO, I. et al. In vitro comparative assessment of different viability assays in *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 112, n. 12, p. 4087–4095, 2013.

HEREDERO-BERMEJO, I. et al. Evaluation of the activity of new cationic carbosilane dendrimers on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba polyphaga*. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 114, p. 473–486, 2015.

IMRAN, M. et al. Biology Synthesis , characterization and amoebicidal potential of locally synthesized TiO₂ nanoparticles against pathogenic *Acanthamoeba* trophozoites in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 159, p. 125–132, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.014>>

ISLAM, M. T. et al. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, [s. l.], v. 177, p. 93–101, 2017.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 104, 2010.

Disponível em:

<<http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/104>>

JINAN, L. et al. **Preparation optimization and storage stability of nanoemulsion-based lutein delivery systems**. [s.l.] : Taylor & Francis, 2018. v. 0 Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1080/02652048.2018.1559245>>

KAUR, I. P.; KAKKAR, S. Nanotherapy for posterior eye

- diseases. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 193, p. 100–112, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.031>>
- KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006.
- KRÓL-TURMIŃSKA, K.; OLENDER, A. Human infections caused by free-living amoebae. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 254–260, 2017.
- LASS, A. et al. Science of the Total Environment Detection of *Acanthamoeba* spp . in water samples collected from natural water reservoirs , sewages , and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 584–585, p. 489–494, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.046>>
- LEITE, M. et al. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60. **Analytical cellular pathology**, [s. l.], v. 19, n. 3–4, p. 139–51, 1999. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10866276>%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4618583>
- LIM, C. et al. Journal of Drug Delivery Science and Technology Preparation and characterization of a lutein loading nanoemulsion system for ophthalmic eye drops. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 36, p. 168–174, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2016.10.009>>
- LIU, H. et al. Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolates from

ocean sediments. **The Korean journal of parasitology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 117–125, 2006.

LIU, K. et al. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. **Medical Science Monitor Basic Research**, [s. l.], v. 21, p. 15–20, 2015.

LLOYD, D. Experimental Parasitology Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 145, p. S20–S27, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.026>>

LOPEZ-ARENCEBIA, A. et al. Experimental Parasitology In vitro activity of 1 H -phenalen-1-one derivatives against *Acanthamoeba castellanii* Neff and their mechanisms of cell death. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 183, p. 218–223, 2017.

LORENZO-MORALES, J. et al. *Acanthamoeba* keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, [s. l.], v. 22, p. 10, 2015. Disponível em: <<http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2015010>>

MAGHSOOD, A. H. et al. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 8, p. 755–759, 2005.

MAGINA, M. D. A. et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 35, n. 6,

p. 1184–1188, 2012.

MAHBOOB, T. et al. Preparation of Poly (DL-Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles Encapsulated with Periglaucine A and Betulinic Acid for In Vitro Anti- *Acanthamoeba* and Cytotoxicity Activities. **Pathogens**, [s. l.], p. 1–12, 2018.

MAIORAL, M. F. et al. MICONIDINE acetate, a new selective and cytotoxic compound with synergic potential, induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. **Investigational New Drugs**, [s. l.], 2018.

MALATYALI, E. et al. In vitro amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 110, p. 2175–2180, 2012.

MALATYALI, E.; TEPE, B.; DEGERLI, S. In vitro amoebicidal activity of four *Peucedanum* species on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 110, p. 167–174, 2012.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 273–307, 2003.

MARTÍN-NAVARRO, C. M. et al. *Acanthamoeba castellanii* Neff: In vitro activity against the trophozoite stage of a natural sesquiterpene and a synthetic cobalt(II)-lapachol complex. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 106–108, 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.12.015>>

MARTÍN-NAVARRO, C. M. et al. Statins and Voriconazole Induce

Programmed Cell Death in *Acanthamoeba castellanii*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 2817–2824, 2015.

MAYCOCK, N. J. R.; JAYASWAL, R.; ED, F. Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes.

Cornea, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 713–720, 2016.

MCCLANAHAN, R. H.; ROBERTSON, L. W. Microbial Transformation of Olivetol by *Fusarium Roseum*. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 660–663, 1985.

MOGHIMIPOUR, E.; SALIMI, A.; YOUSEFVAND, T. Preparation and Evaluation of Celecoxib Nanoemulsion for Ocular Drug Delivery. **Asian Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], n. 3, p. 543–550, 2017.

MOLMERET, M. et al. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 20–28, 2005.

MOON, E. et al. Experimental Parasitology Polyhexamethylene biguanide and chloroquine induce programmed cell death in *Acanthamoeba castellanii*. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 191, n. June, p. 31–35, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.06.002>>

MORESCO, H. H. et al. Chemical constituents of *Eugenia catharinae* and their antioxidant activity. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 30, n. 22, p. 2624–2628, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2015.1131981>>

MURAYAMA, T. et al. Anticytomegalovirus activity of pristimerin, a triterpenoid quinone methide isolated from *Maytenus*

heterophylla (Eckl. & Zeyh.). **Antiviral Chemistry &**

Chemotherapy, [s. l.], v. 18, p. 133–139, 2007.

NASCIMENTO, K. C. et al. Do *Eugenia hiemalis* seedling leaves under different light conditions develop phenotypic plasticity?

Plant Ecology, [s. l.], v. 216, n. 11, p. 1571–1581, 2015.

NIYYATI, M.; DODANGEH, S.; LORENZO-MORALES, J. A Review of the Current Research Trends in the Application of Medicinal Plants as a Source for Novel Therapeutic Agents

Against *Acanthamoeba* Infections. **Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 893–900, 2016.

ODDÓ, B. Infecciones por amebas de vida libre.: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. **Revista chilena de infectología**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 200–214, 2006. Disponível em:

<http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182006000300002&script=sci_arttext>

OLIVEIRA, R. N. De; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 39–43, 2005.

OMÑANA-MOLINA, M. et al. In vivo CNS infection model of *Acanthamoeba* genotype T4 : the early stages of infection lack presence of host inflammatory response and are a slow and contact-dependent process. **Parasitology Research**, [s. l.], p. 725–733, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5338-1>>

ONG, T. Y. Y.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Brain-Eating Amoebae: Predilection Sites in the Brain and Disease Outcome. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 1989–1997, 2017.

ONICHANDRAN, S. et al. Waterborne parasites and physico-chemical assessment of selected lakes in Malaysia. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 112, n. 12, p. 4185–4191, 2013.

PANATIERI, L. F. et al. Nanoemulsions Containing a Coumarin-Rich Extract from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) for the Treatment of Ocular *Acanthamoeba* Keratitis. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 18, n. 3, 2017.

PENS, C. J. et al. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 103, n. 6, p. 1241–1245, 2008.

POLAT, Z. A. et al. In Vitro Evaluation of the Amoebicidal Activity of Garlic (*Allium sativum*) Extract on *Acanthamoeba castellanii* and its Cytotoxic Potential on Corneal Cells. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 8–14, 2008. Disponível em:

<<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jop.2007.0035>>

QVARNSTROM, Y. et al. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. **J Eukaryot Microbiol**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 626–633, 2013.

RAHARJO, T. J. et al. Olivetol as product of a polyketide synthase in *Cannabis sativa* L. **Plant Science**, [s. l.], v. 166, n. 2,

p. 381–385, 2004.

REYES-BATLLE, M. et al. Acanthamoeba genotypes T2, T4, and T11 in soil sources from El Hierro island, Canary Islands, Spain.

Parasitology Research, [s. l.], v. 115, n. 8, p. 2953–2956, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5048-8>>

RÓDIO, C. et al. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitol Res**, [s. l.], v. 104, p. 191–194, 2008.

ROLAND, I. et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of**

Pharmaceutics, [s. l.], v. 263, p. 85–94, 2003.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. De. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica**

Brasilica, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 529–548, 2006.

SALAS, C. et al. Trypanosoma cruzi : Activities of lapachol and a - and b -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 16, p. 668–674, 2008.

SANTOS-FILHO, S. D. Erythrocyte Membrane and Hemolysis: Effects of Natural Products. **International Journal of Life Sciences and Technology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 28–35, 2016.

SANTOS, I. G. de A. et al. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 535–540, 2016.

- SANTOS, K. K. A. et al. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of Eugenia uniflora L. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 130–132, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.019>>
- SCHROEDER, J. M. et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of Acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 1903–1911, 2001.
- SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 1001–1027, 2004.
- SEPÚLVEDA-BOZA, S.; CASSELS, B. Plant Metabolites Active against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, [s. l.], v. 62, n. 02, p. 98–105, 1996.
- SHUKLA, P. et al. Optimization of novel tocopheryl acetate nanoemulsions for parenteral delivery of curcumin for therapeutic intervention of sepsis. **Expert Opin. Drug Deliv.**, [s. l.], v. 11, p. 1–16, 2014.
- SIDDIQUI, U.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 5, n. 6, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2191436>>
- SILVA, M. N. Da; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. De. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000300019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>

SIMÕES, R. R. et al. *Eugenia brasiliensis* leaves extract attenuates visceral and somatic inflammatory pain in mice.

Journal of ethnopharmacology, [s. l.], v. 217, n. February, p. 178–186, 2018. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874117333408%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29462700>>

SISA, M.; DVORAKOVA, M.; VANEK, T. Concise access to primin, miconidin and related natural resorcinols. **Tetrahedron**, [s. l.], v. 73, n. 35, p. 5297–5301, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2017.07.029>>

SOBEH, M. et al. Chemical Profiling of the Essential Oils of *Syzygium aqueum*, *Syzygium samarangense* and *Eugenia uniflora* and Their Discrimination Using Chemometric Analysis.

Chem. Biodiversity, [s. l.], v. 13, p. 1537–1550, 2016.

SOUSA, R. M. F. et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 65, p. 71–78, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.050>>

SOUZA, A. M. De et al. Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species – A Review Authors The *Eugenia* Genus. **Planta Med**, [s. l.], v. 84, p. 1232–1248, 2018.

SOUZA, P. M. S. et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química**

Nova, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 132–137, 2012.

SÜTÇÜ, M. et al. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in an immunocompetent child. **The Turkish Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 60, p. 340–343, 2018.

TASDEMİR, D. et al. Antituberculous and Antiprotozoal Activities of Primin, a Natural Benzoquinone : In vitro and in vivo Studies. **Chemistry & Biodiversity**, [s. l.], v. 3, p. 1230–1237, 2006.

THAMMARATANA, T.; LAUMMAUNWAI, P.; BOONMARS, T. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from natural water sources in the northeastern part of Thailand. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 4, p. 1705–1709, 2016.

TRABELSI, H. et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 399–405, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>>

VAN ENGELAND, M. et al. A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Proc. Natl. Ac. Sci. USA**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 1–9, 1996. Disponível em: <<http://arno.unimaas.nl/show.cgi?fid=1825>>

VERMELHO, A. B. et al. Nanoemulsions of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors strongly inhibit the growth of *Trypanosoma cruzi* Nanoemulsions of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors strongly inhibit the. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 139–146, 2018.

Disponível em:

<<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1405264>>

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia*

- uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.002>>
- VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 1–26, 2007.
- WALOCHNIK, J. et al. Granulomatous Amoebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba* Amoebae of Genotype T2 in a Human Immunodeficiency Virus-Negative Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 338–340, 2008.
- WALOCHNIK, J.; SCHEIKL, U.; HALLER-SCHÖBER, E. M. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 3–11, 2015.
- WANG, J. et al. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 38, p. 138–146, 2009.
- ZATELLI, G. et al. Miconidin Acetate and Primin as Potent 5-Lipoxygenase Inhibitors from Brazilian *Eugenia hiemalis* (Myrtaceae). **Planta Medica Letters**, [s. l.], v. 3, n. 01, p. e17–e19, 2016. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-102460>>
- ZATELLI, G. A. et al. Antimycoplasmic activity and seasonal variation of essential oil of *Eugenia hiemalis* Cambess. (Myrtaceae). **Natural Product Research Formerly**, [s. l.], v.

6419, p. 4–8, 2015.

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 43, p. 2956–2966, 2007.