



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

Jaqueline da Silveira

**Avaliação da atividade antiamebiana de compostos sintéticos e semissintéticos contra
formas de *Acanthamoeba castellanii***

Florianópolis

2021

Jaqueline da Silveira

Avaliação da atividade antiamebiana de compostos sintéticos e semissintéticos contra formas de *Acanthamoeba castellanii*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em farmácia.
Orientadora: Prof^ª. Karin Silva Caumo

Florianópolis

2021

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

Silveira, Jaqueline da
Avaliação da atividade antiamebiana de compostos
sintéticos e semissintéticos contra formas de *Acanthamoeba
castellanii* / Jaqueline da Silveira ; orientador, Karin
Silva Caumo, 2021.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Acanthamoeba. 3. Compostos de
Coordenação. 4. Ceratite Amebiana. I. Silva Caumo, Karin .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. III. Título.

Jaqueline da Silveira

Avaliação da atividade antiamebiana de compostos sintéticos e semissintéticos contra formas de *Acanthamoeba castellanii*

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Alexandre Meneghello Fuentefria, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.(a) Lílian Sibelle Campos Bernardes, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Karin Silva Caumo, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e ao grupo de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concebido forças necessárias para superar todas as dificuldades impostas a mim.

Aos meus pais, que fizeram toda a diferença e apoiaram as minhas escolhas, pelo amor, carinho, dedicação e principalmente incentivo para realizar esta conquista.

Ao meu namorado Giovani Reinert Junior pelo amor, carinho, paciência e, principalmente apoio, por estar presente para enxugar as lágrimas que deixei cair durante os momentos mais difíceis dessa caminhada.

A professora Dra. Karin Silva Caumo pelos conhecimentos repassados com maestria, os quais foram de grande importância para minha formação.

Aos grupos colaboradores do presente estudo, Grupo Estudo de Produtos Naturais e Sintéticos (GEPRONAS/UFSC) e Laboratório Interdisciplinar de Química Inorgânica Medicinal e Catálise (LIQIMeC/UFSC).

A todos os meus colegas do Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes Oportunistas (LAPEO), por me acolherem e me ajudar nos momentos de necessidade. Com todos aprendi muito, agradeço por me ouvirem. Muito obrigada, Barbara, Carol, Malu, Arthur, Paula, Higor, Paulo e tantos outros que passaram por esse laboratório. Vocês são incríveis.

Por fim, agradeço a todos que compreenderam as ausências, compartilharam de lágrimas e sorrisos. Família, colegas e amigos com vocês divido esta conquista.

RESUMO

Nas últimas décadas, *Acanthamoeba* spp. emergiram como patógenos de importância clínica por ocasionarem infecções oportunistas e não oportunistas graves, como a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e ceratite amebiana (CA). Embora existam opções de tratamento, os fármacos são inespecíficos e pouco ativos frente as formas císticas de *Acanthamoeba* spp. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade amebicida de diferentes classes de compostos sintéticos e semissintéticos. Inicialmente, realizou-se a triagem de derivados isoxazolil-sulfonamidas, derivados triazólicos de *O*-metil-olivetol e compostos de coordenação frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492). Para os compostos selecionados, foi realizada a avaliação da atividade amebicida frente a trofozoítos e cistos, avaliação da interação de fármacos frente a tofozoítos, e citotoxicidade dos compostos utilizando linhagem celular de córnea de coelho (ATCC - CCL 60). Durante a triagem, observou-se maior potencial amebicida para o derivado triazólico do *O*-metil-olivetol (Me2) que apresentou inibição da viabilidade de $31,5 \pm 3,6\%$ dos trofozoítos em 24 h. Os compostos de coordenação de ferro e cobre demonstraram alto potencial amebicida, com inibição da viabilidade de trofozoítos acima de 80%. Os compostos de coordenação de cobre(II) selecionados (Cp12 e Cp13) apresentaram concentração amebicida inibitória mínima (CAIM) de 200 μM e valores de concentração inibitória média (CI50) inferiores a 10 μM . Frente aos cistos, o composto Cp12 apresentou redução na viabilidade de $47,6 \pm 2,53\%$ na concentração de 200 μM em 48 h de incubação. O ensaio de interação de fármacos demonstrou um efeito sinérgico para o composto Cp12 com a clorexidina, reduzindo as concentrações de CAIM de ambos os fármacos. No ensaio de citotoxicidade foi possível observar que os compostos selecionados possuem um efeito dose-dependente frente as células de córnea de coelho. Os resultados obtidos demonstram que os compostos de coordenação utilizados são promissores e inéditos para ação anti-*Acanthamoeba* e apresentam ação frente a trofozoítos e cistos, como também ação sinérgica com a clorexidina em baixas concentrações de de ambos os compostos. Os compostos de coodenação selecionados são promissores para o tratamento e prevenção de infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

Palavras-chave: *Acanthamoeba* spp.; compostos de coordenação; ceratite amebiana; apoptose

ABSTRACT

In recent decades, *Acanthamoeba* spp. emerged as clinically important pathogens for causing severe opportunistic and non-opportunistic infections, such as granulomatous amoebic encephalitis (EAG) and amoebic keratitis (AC). Although there are treatment options, the drugs are nonspecific and not very active against the cystic forms of *Acanthamoeba* spp. In this context, the present work aimed to evaluate the amebicidal activity of different classes of synthetic and semi-synthetic compounds. Initially, the screening of isoxazolyl-sulfonamide derivatives, triazole derivatives of *o*-methyl-olivetol, and coordination compounds against *Acanthamoeba castellanii* trophozoites (ATCC 50492) was carried out. For the selected compounds, the evaluation of the amebicidal activity against trophozoites and cysts, evaluation of the interaction of drugs against trophozoites, and cytotoxicity of the compounds using rabbit corneal cell line (ATCC - CCL 60) were carried out. During the screening, there was a greater amebicidal potential for the triazole derivative of *O*-methyl-olivetol (Me2), which showed inhibition of viability of $31.5 \pm 3.6\%$ of trophozoites in 24 h. The coordination compounds of iron and copper showed high amebicidal potential, with inhibition of trophozoite viability above 80%. The selected copper(II) coordination compounds (Cp12 and Cp13) had a minimum inhibitory concentration (CAIM) of 200 μ M and mean inhibitory concentration (IC50) values below 10 μ M. Against the cysts, the compound Cp12 showed a reduction in viability of $47.6 \pm 2.53\%$ at a concentration of 200 μ M in 48 h of incubation. The drug interaction assay demonstrated a synergistic effect for the compound Cp12 with chlorhexidine, reducing the CAIM concentrations of both drugs. In the cytotoxicity assay, it was possible to observe that the selected compounds have a dose-dependent effect against rabbit corneal cells. The results obtained demonstrate that the coordination compounds used are promising and novel for anti-*Acanthamoeba* action and show action against trophozoites and cysts and synergistic action with chlorhexidine at low concentrations of both compounds. The selected coordinating compounds hold promise for the treatment and prevention of infections caused by *Acanthamoeba* spp.

Keywords: *Acanthamoeba*; coordination compounds; amoebic keratitis; apoptosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	18
Figura 2: Esquema da fisiopatologia da ceratite amebiana e sinais correlacionados apresentados pelo paciente	24
Figura 3: Relação estrutura-atividade triazóis	29
Figura 4: Estruturas moleculares dos compostos de coordenação de cobre(II) e clorexidina	42
Figura 5: Combinações ensaio de associação entre o composto de coordenação de cobre(II) e clorexidina	45
Figura 6: Curva de crescimento ATCC50492	48
Figura 7: Curva de densidade de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> (ATCC 50492) para otimização do método de viabilidade celular pelo AlamarBlue®	50
Figura 8: Avaliação da viabilidade dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> frente a clorexidina pelo ensaio de alamarBlue®	52
Figura 9: Avaliação da atividade anti- <i>Acanthamoeba</i> dos compostos derivados isaxolil-sulfonamidas.....	54
Figura 10: Avaliação da atividade anti- <i>Acanthamoeba</i> dos compostos semissintéticos derivados do <i>O</i> -metil-olivetol.....	55
Figura 11: Efeito do composto de coordenação cobre(II) Cp12 na morfologia de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	57
Figura 12: Avaliação da atividade anti- <i>Acanthamoeba</i> dos compostos de coordenação, sais metálicos e ligantes.....	58
Figura 13: Avaliação da citotoxicidade dos compostos de coordenação de cobre(II) e ferro(III).....	59
Figura 14: Avaliação da atividade anti- <i>Acanthamoeba</i> dos compostos de coordenação de cobre(II), sal metálico, ligantes e clorexidina frente a trofozoítos	59
Figura 15: Efeito do composto de coordenação cobre(II) na morfologia de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	60
Figura 16: Avaliação da atividade cisticida dos compostos de coordenação de cobre(II), sal metálico, ligantes e clorexidina frente a cistos	64

Figura 17: Avaliação da citotoxicidade dos compostos de coordenação de cobre(II), ligantes, sal metálico e clorexidina	66
Figura 18: Avaliação da associação do composto de coordenação de cobre(II) e clorexidina	69
Figura 19: Efeito da associação de clorexidina e composto Cp12 na morfologia de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	71
Figura 20: Microscopia de fluorescência para avaliação de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> tratados com compostos de coordenação de cobre(II) CP12 marcados laranja de acridina e brometo de etídeo.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Métodos de avaliação de viabilidade <i>in vitro</i>	33
Quadro 2: Compostos de coordenação, ligantes e sais metálicos.....	40
Quadro 3: Interpretação da associação dos compostos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas moleculares dos derivados isoxazolil-sulfonamida (SF) e derivados triazólicos do <i>O</i> -metil-olivetol (ME).....	38
Tabela 2: Taxa média de crescimento	48
Tabela 3: Valores de CI50, CC50 e IS para os compostos de coordenação de cobre(II) e clorexidina	67
Tabela 4: Concentração amebicida inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionada da associação entre clorexidina e Cp12 contra <i>Acanthamoeba castellanii</i>	69

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Avaliação do crescimento dos trofozoítos.....	36
Equação 2: Cálculo do índice de seletividade	44
Equação 3: Índice de Concentração Inibitória Fracionada.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C Graus Celsius

ANN Ágar não-nutriente

ATCC *American Type Culture Collection*

CA Ceratite amebiana

CAIM Concentração Amebicida Inibitória Mínima

CI50 Concentração inibitória média

CC50 Concentração citotóxica média

CLX Digluconato de clorexidina

DMEN *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO Dimetilsufóxido

EAG Encefalite amebiana granulomatosa

FDA Food and Drugs Administration

IS Índice de seletividade

LA/BE laranja de acridina e brometo de etídio

LAPEO Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas

LC Lentes de contato

M Molar

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

PCR Reação em cadeia da polimerase

PBS Tampão fosfato salino

pH Potencial Hidrogeniônico

PYG Meio proteose peptona, extrato de levedura e glicose

SIRC *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	<i>Acanthamoeba</i> spp.	17
2.2	PATOLOGIAS ASSOCIADAS A <i>Acanthamoeba</i> spp.....	19
2.2.1	Encefalite amebiana granulomatosa	19
2.2.2	Ceratite amebiana	21
2.3	BUSCA DE NOVOS FARMÁCOS.....	26
2.3.1	Reposicionamento de fármacos	27
2.3.2	Extratos e derivados de plantas	28
2.3.3	Composto de coordenação	30
2.4	MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA FRENTE <i>Acanthamoeba</i> spp.	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	CULTURA E OBTENÇÃO DO PROTOZOÁRIO	36
4.2	CURVA DE CRESCIMENTO DE TROFOZOÍTOS	36
4.3	OTIMIZAÇÃO DO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR COM ALAMAR BLUE®	37
4.3.1	Determinação das densidades de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	37
4.3.2	Avaliação da viabilidade dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> frente à clorexidina pelo ensaio de alamarBlue®	37
4.4	TRIAGEM DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTI- <i>ACANTHAMOEBA</i> FRENTE A TROFOZOÍTOS.....	38

4.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE FERRO(III) E COBRE(II) FRENTE CÉLULAS DE CórNEA DE COELHO	40
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) FRENTE A TROFOZOÍTOS	41
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CISTICIDA DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12.....	43
4.8	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12 E CP13 FRENTE CÉLULAS DE CórNEA DE COELHO	43
4.9	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12 E CLOREXIDINA.....	44
4.10	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA DE TROFOZOÍTOS APÓS TRATAMENTO COM COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12.	46
4.10.1	Coloração com Laranja de Acrídina e Brometo de Etídio	46
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1	PERFIL DE CRESCIMENTO EM MEIO PYG	48
5.2	OTIMIZAÇÃO DE TESTE DE VIABILIDADE CELULAR COM ALAMAR BLUE®.....	49
5.2.1	Determinação das densidades de trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> para avaliação da viabilidade por AlamarBlue®	49
5.2.2	Susceptibilidade dos trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> à clorexidina pelo ensaio de AlamarBlue®	51
5.3	TRIAGEM DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTI- <i>ACANTHAMOEB</i> A FRENTE A TROFOZOÍTOS.....	53
5.3.1	Derivados isoxazolil-sulfonamidas	53
5.3.2	Derivados triazolicos do <i>O</i>-metil-olivetol.....	55
5.3.3	Compostos de coordenação.....	56

5.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE FERRO(III) E COBRE(II) FRENTE CÉLULAS SIRC	59
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) (CP12 E CP13) FRENTE A TROFOZOÍTOS	60
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CISTICIDA DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12.....	63
5.7	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) FRENTE A CÉLULAS DE CórNEA.....	65
5.8	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12 E CLOREXIDINA.....	68
5.9	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA	72
6	CONCLUSÃO.....	75
7	PERSPECTIVAS.....	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários encontrados em diferentes nichos ambientais, distribuídas mundialmente e consideradas seres anfitriões, pois podem viver no ambiente ou causando infecções em humanos e animais (SAMBA-LOUAKA et al., 2019). Dentre as AVL, o gênero *Acanthamoeba* ganha destaque como patógeno emergente e oportunista, por estar relacionado a infecções em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. O gênero *Acanthamoeba* possui duas formas em seu ciclo de vida: trofozoíto (forma metabolicamente ativa, capaz de se alimentar e reproduzir) e cistos (forma dormente, considerada a forma de resistência) (SIDDIQUI; KHAN, 2012; SAMBA-LOUAKA et al., 2019).

Dentre as infecções causadas pelo gênero *Acanthamoeba*, a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é considerada rara, porém fatal, pois acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, como por exemplo, pacientes HIV/AIDS, transplantados e recentemente descrita em caso de paciente com COVID-19 (KALRA et al., 2020; SIRIPURAPU et al., 2021). A EAG manifesta-se como uma infecção crônica progressiva do sistema nervoso central e mais de 90% dos casos evoluem para óbito (KALRA et al., 2020). Outra infecção causada por *Acanthamoeba* spp. é a ceratite amebiana (CA), que acomete pacientes imunocompetentes, principalmente usuários de lentes de contato ou com trauma de córnea, na qual o paciente apresenta sinais e sintomas pouco específicos, assemelhando-se a outras infecções oculares, como por exemplo, fúngicas e herpéticas, porém se não diagnosticada precocemente pode levar a diminuição da acuidade visual, necessidade de transplante de córnea e cegueira (DAAS, et al., 2015; SZENTMÁRY et al., 2019).

Existem fatores determinantes para o bom prognóstico do paciente com CA, dentre eles, o diagnóstico precoce para o início do tratamento, pois a maioria dos fármacos atuam sobre os trofozoítos, mas são pouco efetivos contra os cistos (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; KALRA et al., 2020). Os tratamentos são de longo prazo, difíceis e baseados em combinações de fármacos, que na sua grande maioria agem com maior eficiência sobre a forma trofozoítica e podem induzir a formação de cistos, além da alta toxicidade devido à baixa especificidade dos fármacos (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). No caso de EAG, o maior problema encontrado na combinação de fármacos é a habilidade da molécula atravessar a barreira hematoencefálica em concentrações adequadas para eliminar as formas amebianas. Já na CA dois problemas são considerados

importantes, a indução da formação de cistos, responsáveis pelas recidivas da infecção e a toxicidade às células da córnea, que pode ocasionar ao paciente outras doenças em decorrência do tratamento, como atrofia do tecido corneano, catarata, entre outros efeitos adversos (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; KALRA et al., 2020). Considerando as dificuldades encontradas no tratamento de infecções acantamebianas, alternativas para a terapêutica da EAG e CA são desejáveis e vem sendo investigadas a partir de reposicionamento de fármacos, produtos naturais, e síntese de novas moléculas (CARRIJO-CARVALHO et al., 2017).

Sendo assim, o presente trabalho busca através da triagem de diferentes classes de compostos sintéticos e semissintéticos avaliar a atividade amebicida, com a finalidade de encontrar moléculas promissoras no combate às infecções causadas pelo gênero *Acanthamoeba*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Acanthamoeba* spp.

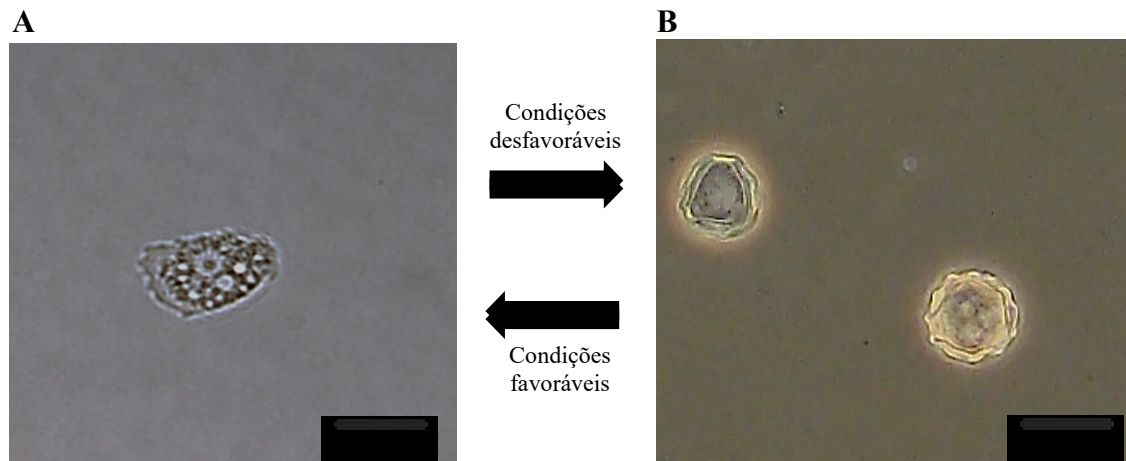
O gênero *Acanthamoeba* pertence a um grupo de protozoários denominados de amebas de vida livre (AVL), considerados organismos anfizóicos, pois podem viver tanto na forma livre, como também causar infecções em humanos e animais. As AVL compartilham a capacidade de movimento ameboide através de pseudópodes, e se alimentam de bactérias, algas, fungos e outros protozoários por fagocitose (SAMBA-LOUAKA et al., 2019). Esses organismos já foram isolados em diversos ambientes naturais e antropogênicos, como piscinas, oceano, lagos, água de torneira, solo, estojos e lentes de contato, sistemas de ar condicionado, unidades de diálise, dentre outros (CAUMO; ROTT, 2011; HASSAN et al., 2012; GOMES et al. 2016; LEAL et al., 2018; WOPEREIS, 2018 CARNT et al., 2020).

A primeira descrição de *Acanthamoeba* spp. foi realizada por Castellani em 1930, como um contaminante de cultura de leveduras. Apenas em 1960, o gênero foi citado como agente causador de encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e em 1970 relacionado à ceratite amebiana (CA) (CASTELLANI, 1930; SIDDIQUI; KHAN, 2012). Outras infecções, como ulcerações na pele denominada dermatite acanthamebiana, sinusites, e infecções disseminadas, também podem ser ocasionadas por esse gênero em pacientes imunocomprometidos (KRÓL-TURMIŃSKA; OLENDER, 2017).

Acanthamoeba spp. apresentam duas formas em seu ciclo de vida: trofozoíto e cisto (figura 1). O trofozoíto possui um tamanho variável de 13 μm a 40 μm , a membrana composta de proteínas, fosfolipídios, esteróis e lipofosfoglicanos, apresenta projeções aciculiformes, denominadas de acantopódios, importantes para movimentação e alimentação do protozoário (KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACK, 2018). O citoplasma finamente granuloso contém um vacúolo contrátil, responsável pela regulação osmótica e numerosos vacúolos digestivos. A forma trofozoítica é metabolicamente ativa, capaz de se reproduzir por fissão binária, de aderir e invadir as células do hospedeiro, consequentemente causando infecções (SIDDIQUI; KHAN, 2012; KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACK, 2018). Quando em condições desfavoráveis como a escassez de nutrientes, exposição a desinfetantes, alteração de pH, temperatura e osmolaridade, os trofozoítos sofrem diferenciação celular formando os cistos, a partir do

processo chamado de encistamento (KOT; ŁANOCHA-ARENARCZYK; KOSIK-BOGACK, 2018; GARAJOVÁ et al 2019).

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



Trofozoito de *Acanthamoeba* spp. (A); Cistos do grupo II (B). Barra: 20 μ m.

Fonte: LAPEO, 2021

Os cistos apresentam tamanho de 13 μ m a 23 μ m e são considerados altamente resistentes, permanecendo viáveis durante anos (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Os cistos apresentam dupla parede, endocisto (camada mais interna, lisa e que pode apresentar diferentes formatos, como por exemplo: estrelado, oval, poligonal e esférico) e ectocisto (camada mais externa ao ambiente e rugosa), composto principalmente de proteínas, polissacarídeos/carboidratos, dentre eles a celulose como principal constituinte.

Os cistos também apresentam poros, denominados de ostíolos, responsáveis pela detecção de um ambiente favorável para realizar o desencistamento (DUDLEY; JARROLL; KHAN, 2009; GARAJOVÁ et al. 2019). A composição das paredes dos cistos e o mecanismo de encistamento são amplamente estudados com a finalidade de encontrar alvos farmacológicos, pois os cistos são de difícil eliminação pelos protocolos de tratamentos atuais e responsáveis pelas recidivas da infecção (DUDLEY; JARROLL; KHAN, 2009; GARAJOVÁ et al. 2019).

De acordo com a classificação taxonômica inscrita no Sistema Integrado de Informação Taxonômica (ITIS), o gênero *Acanthamoeba* pertence ao reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Classe Lobosea e Família Acanthamoebidae (ITS, 2021). Inicialmente o gênero *Acanthamoeba* era classificado pelas características morfológicas do

cisto, incluindo o tamanho e a forma do endocisto e ectocisto. Em 1977, Pussard e Pons sugeriram uma classificação dividindo as espécies descritas em três grupos morfológicos (I, II e III), porém anos depois essa classificação foi considerada inconsistente, pois a morfologia dos cistos sofre alterações dependendo das condições de cultura (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; GARAJOVÁ et al. 2019).

Com o avanço das metodologias moleculares, a classificação de *Acanthamoeba* spp. passou a basear-se no sequenciamento da subunidade menor do gene 18S rDNA, desse modo as espécies são classificadas em genótipos. Até o momento 23 genótipos foram identificados (T1-T23), todos os genótipos já foram encontrados causando algum tipo de infecção em humanos, sendo que o genótipo T4 foi o mais relatado, provavelmente devido a ampla dispersão ambiental, as propriedades de virulência e a baixa susceptibilidade aos agentes quimioterápicos, desinfetantes e antissépticos (SIDDIQUI; KHAN, 2012; BEHERA; SATPATHY; TRIPATHI, 2016; KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACK, 2018; PUTAPORNTIP et al., 2021). Os genótipos T1, T4, T2, T5, T10, T12 e T18 já foram identificados causando EAG e os genótipos T2, T3, T4, T5, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13 e T15 associados a casos de CA (KALRA et al., 2020; DIEHL et al., 2021)

2.2 PATOLOGIAS ASSOCIADAS A *Acanthamoeba* spp.

Devido ao caráter cosmopolita de *Acanthamoeba* spp., casos de infecções já foram relatados em muitos países. As principais infecções acantamebianas são a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e a ceratite amebiana (CA), que podem acometer indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; SZENTMÁRY et al., 2019).

2.2.1 Encefalite amebiana granulomatosa

A EAG é a principal infecção sistêmica oportunistica causada por *Acanthamoeba* spp., caracterizada como uma infecção rara, crônica e progressiva do sistema nervoso central, com taxa de mortalidade superior a 90% (KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACK, 2018; KALRA et al., 2020). A infecção acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles com HIV/AIDS, transplantados, pacientes em tratamento de câncer com quimioterápicos ou radioterápicos, pacientes em uso excessivo de esteroides e pacientes com SARS-COV-2, porém há relatos na literatura desta infecção em

pacientes imunocompetentes (REDDY et al., 2011; KALRA et al., 2020; SIRIPURAPU et al., 2021).

A patogênese da EAG não é totalmente compreendida. É amplamente aceito que a infecção ocorre inicialmente pela penetração de trofozoítos pelo trato respiratório, com acesso ao sistema nervoso central por disseminação hematogênica, no qual inicia-se pela invasão das amebas nos vasos sanguíneos alveolares com posterior entrada através da barreira hematoencefálica, ou acesso através do nervo olfatório (SIDDIQUI; KHAN, 2012; KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACK, 2018).

Os sintomas iniciais da infecção são cefaleia, náuseas, irritabilidade, tontura e febre baixa. Os pacientes acometidos progressivamente podem apresentar sintomas neurológicos mais graves como convulsões, alucinações, confusão mental, paralisia do nervo craniano, aumento da pressão intracraniana e coma (SIDDIQUI; KHAN, 2012; KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACK, 2018). Não há sintomas clínicos específicos para a EAG, frequentemente confunde-se com meningite ou encefalite bacteriana ou viral, sendo assim, muitos casos são subdiagnosticados, fazendo-se necessário corpo clínico treinado para realização do diagnóstico precoce e intervenção terapêutica rápida (SIDDIQUI; KHAN, 2012; KALRA et al., 2020).

Kalra e colaboradores (2020) realizaram um levantamento de casos publicados de EAG entre 1990 e 2018 na base de dados do PUBMED. Do total de casos validados no estudo (69), 43,3% (30) foram nos Estados Unidos da América, seguido pela Índia com 33,3% (23) e Áustria com 10,2% (7) (KALRA et al., 2020). Khan (2006) sugeriu que a taxa de mortalidade seria de 1,57 mortes para 10.000 pacientes com HIV/AIDS, quando considerada que a EAG é uma infecção secundária para os pacientes soropositivos. Outro fato abordado é que em países de climas mais quentes, devido ao protozoário estar onipresente nos ambientes, a taxa de infecção e mortalidade devem ser maiores, assim como o fato de que países em desenvolvimento possuem casos não relatados, devido à falta de monitoramento adequado, problemas de notificação e mesmo a falta de conhecimento da doença (KHAN, 2006).

Estudo recentemente publicado por Siripurapu e colaboradores (2021), relata o caso de EAG em um paciente pós COVID-19, demonstrando que a infecção causada pelo SARS-COV-2 reduziu os níveis de células T CD4 e o índice oxidativo de neutrófilos, oportunizando a infecção por *Acanthamoeba* spp. O paciente foi tratado empiricamente com antifúngicos e antibióticos até a identificação da ameba e posteriormente foi adicionada a terapia

Miltefosina. O relato de caso aborda a importância de considerar a infecção por *Acanthamoeba* spp. em todos os pacientes que apresentam deficits na imunidade celular, como em paciente que tiveram COVID-19 (SIRIPURAPU et al., 2021).

O diagnóstico da EAG é realizado em conjunto através dos achados clínicos, exames microscópicos do líquido cefalorraquidiano ou biopsias e exames de imagem. Os casos evoluem a óbito rapidamente, em consequência, na maioria dos casos, o diagnóstico é *post mortem* (SIDDIQUI; KHAN, 2012; KALRA et al., 2020).

Para o tratamento de EAG, os medicamentos são utilizados em combinação, no entanto poucos casos possuem bom prognóstico. Segundo dados publicados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em parceria com a revista *The Medical Letter on Drugs and Therapeutics*, os medicamentos como sulfametoxazol/trimetropim, cetoconazol, fluconazol, sulfadiazina, isotionato de pentamidina, anfotericina B, azitromicina, itraconazol, ou rifampicina foram utilizados em pacientes que tiveram sucesso na resolução da infecção (SIDDIQUI; KHAN, 2012; KALRA et al., 2020; THE MEDICAL LETTER, 2020).

Alguns medicamentos utilizados para EAG são considerados tóxicos e possuem baixa permeabilidade à barreira hematoencefálica. Outra dificuldade no uso desses medicamentos é que são amebostáticos, sendo assim, podem induzir ao encistamento e agem com maior efetividade sobre as formas trofozoíticas (DUGGA, et al., 2017; KALRA, et al., 2020). Essas dificuldades demonstram a necessidade da busca por novos compostos e fármacos com ação amebicida contra todas as formas do protozoário (DUGGA, et al., 2017).

2.2.2 Ceratite amebiana

A ceratite amebiana (CA) é uma infecção ocular grave e progressiva, causada por diferentes espécies do gênero *Acanthamoeba*, dentre elas *Acanthamoeba castellanii* e *Acanthamoeba polyphaga* pertencentes ao genótipo T4. Outros genótipos já foram relatados causando CA, sendo eles, T3, T15, T11, T5, T2, T12, T7, T8, T10, T9 e T13. Segundo estudo de Diehl e colaboradores (2021), o genótipo T4 apresenta uma prevalência de 85,92% dos casos de CA, enquanto que T3 apresenta prevalência de 5,92% e os demais genótipos apresentam porcentagens abaixo de 2,5% (DIEHL et al., 2021).

A CA é a infecção mais comum ocasionada por *Acanthamoeba* spp. e acomete principalmente usuários de lentes de contato. Estudos datam que em meados da década de 1980, o número dos casos de ceratite causados por protozoários aumentou progressivamente,

atribuído ao aumento do número de usuários de lentes de contato e ao uso de soluções caseiras não estéreis para o manuseio das lentes (SEAL; HAY, 1993; KOT et al., 2017). A CA pode acometer, com menor frequência pacientes não usuários de lentes de contato, decorrente de lesão mecânica no epitélio da córnea com posterior exposição ao solo ou água contaminada (KOT et al., 2017).

O número de casos de CA é variável entre países, por se tratar de uma infecção que não é de notificação compulsória, os dados são provenientes de estudos com acompanhamento em institutos/clínicas oftalmológicas ou vinculados à pesquisa em universidades. Estudos relatam que nos Estados Unidos da América, a taxa de casos é de 1,36 a cada 1.000.000 de habitantes, enquanto na Polônia esse número é quase 10 vezes maior, 10,3 novos casos a cada 1.000.000 de habitantes por ano, já na França o número de casos de CA pode chegar a um caso a cada 30.000 usuários de lentes de contato (TRABELSI et al. 2012; CHOMICZ et al., 2015; KRÓL-TURMIÍNSKA; OLENDER, 2017).

O estudo de Diehl e colaboradores (2021), realizou o levantamento de casos de CA pelo mundo, através da revisão sistemática dos casos publicados na literatura, os autores observaram um total de 675 casos relatados de CA distribuídos mundialmente, dentre esses, 253 eram da Ásia, 150 da América, 233 da Europa e 40 da África.

Os primeiros casos relatados no Brasil foram em 1988 por Nosé e colaboradores (1988), no qual 4 casos de CA em pacientes usuários de lentes de contato foram relatados e trouxeram alerta de que a patologia deve ser considerada como diagnóstico diferencial em casos de úlceras de córnea. Carvalho e colaboradores (2009) acompanharam o crescente número de casos de ceratites amebianas durante 20 anos, encontraram uma positividade de 31,8% de casos de CA e a maioria correlacionados a usuários de lentes de contato. Carriello e colaboradores (2011) observaram positividade de 3,6% (246/3.309) de casos para *Acanthamoeba* spp., durante o período de 1975 a 2007, quando avaliaram os casos registrados de ceratite microbiana em um centro de referência oftalmológica no Brasil (CARVALHO, et al., 2009; CARIELLO, et al., 2011).

O fator de risco mais importante para o desenvolvimento de CA é o desgaste das lentes de contato, já que essas são consideradas vetores para a transmissão do protozoário até a superfície ocular, além deste fator, o uso de soluções caseiras e água de torneira para o manuseio dos estojos e lentes, também considerados importantes fontes de infecção (CHOMICZ, et al., 2015; NEELAM; NIEDERKORN, 2017; LIST et. al., 2021).

Um estudo retrospectivo recente de List e colaboradores (2021) reforçam os fatores de risco da CA. Neste estudo os autores acompanharam o número de casos de CA em uma universidade na Áustria. Durante o período de 1997 e 2018, 42 pacientes apresentaram CA, sendo dois casos de infecção bilateral, 93,2% (41) dos casos estão associados ao uso de lentes de contato associados ao histórico de banho ou natação em piscinas, lagos e mares com as lentes de contato e também a lavagem do estojo de lentes com água da torneira (LIST et. al., 2021).

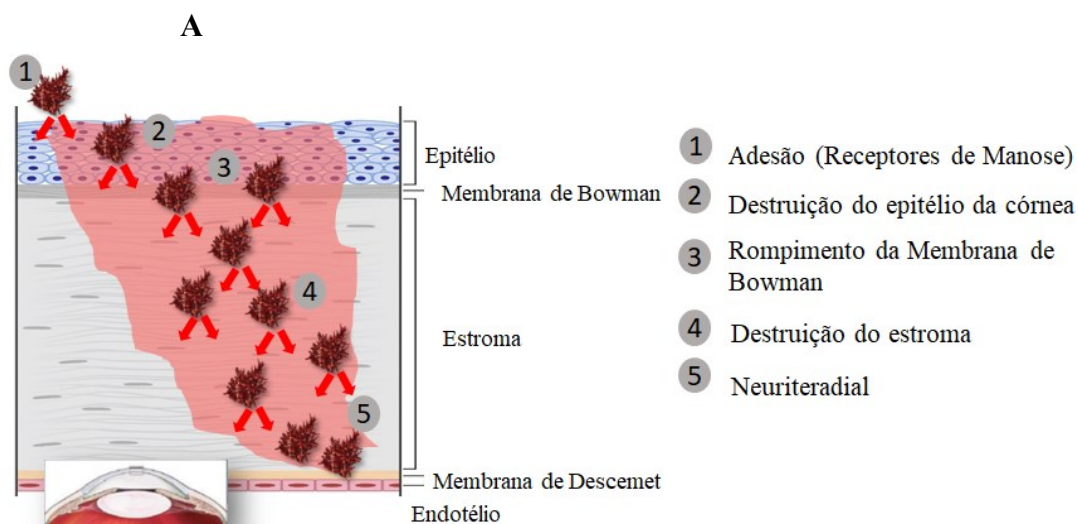
No Brasil, o estudo retrospectivo de Santos e colaboradores (2018), avaliou o número de casos de CA em Porto Alegre, o qual obtiveram prontuários de uma clínica privada e de hospital público durante o período de 1994 a 2016. Neste estudo foram observados 28 casos de CA, e todos os pacientes eram usuários de lentes de contato, a maioria dos pacientes utilizava soluções multipropósito específicas para o armazenamento e limpeza das lentes, porém relataram o uso das lentes para nadar e/ou tomar banho, ou seja, as lentes eram expostas a possíveis fontes de contaminação. A maioria dos pacientes acompanhados utilizaram uma combinação de medicamentos para o tratamento e a maioria também precisou de intervenção cirúrgica para melhor prognóstico (SANTOS et. al., 2018).

Os principais sintomas da CA são relacionados com a fisiopatologia da infecção, apresentada na figura 2, que se inicia pela adesão dos trofozoítos ao epitélio corneano através das proteínas de ligação a manose, esse processo acarreta a liberação de proteases responsáveis por induzir a apoptose das células epiteliais via fosfolipases, facilitando a penetração dos trofozoítos, causando ao paciente sintomas leves da infecção, como vermelhidão, lacrimejamento, hiperemia, sensação de corpo estranho, fotofobia e dor. No estágio inicial da avaliação clínica, observa-se o aparecimento de irregularidades epiteliais, lesões epiteliais pseudodendríticas e opacidade da córnea (CLARKE et al., 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; KRÓL-TURMIŃSKA; OLENDER, 2017).

À medida que a doença progride, as amebas avançam ao estroma da córnea subjacente e podem atingir o nervo corneano, causando um processo inflamatório moderado a grave. Neste estágio da infecção, o paciente apresenta fortes dores na córnea, desproporcionais ao tamanho da lesão observada e ocorre o aparecimento de infiltrado em forma de anel, que é característico da CA (CLARKE et al., 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; SZENTMÁRY et al., 2019). Quando o diagnóstico e tratamento é

tardio, os sintomas progridem rapidamente para ulceração epitelial da córnea, perda de acuidade visual e cegueira (KRÓL-TURMIŃSKA; OLENDER, 2017).

Figura 2: Esquema da fisiopatologia da ceratite amebiana e sinais correlacionados apresentados pelo paciente



B



Representação esquemática do processo de infecção da córnea por *Acanthamoeba* spp. (A). Fonte: Adaptado de Clarke et. al. (2006). Fotografia do olho de um paciente diagnosticado com CA (B). Seta vermelha: infiltrado em forma de anel, hiperemia conjuntiva e opacidade da córnea. Fonte: Adaptado de Buchele et. al. (2018).

Os casos de CA mais recentes publicados no Brasil foram em 2018, trata-se de duas pacientes do sexo feminino, usuárias de lentes de contato que não mantinham bons cuidados de limpeza e armazenamentos das lentes de contato (ALVES et. al., 2018; BUCHELE et. al.,

2018). No relato de Buchele e colaboradores (2018), além da presença de *Acanthamoeba* spp. genótipo T4, a córnea também estava acometida por *Candida albicans*, um caso de co-infecção, caracterizado pela dificuldade de diagnóstico e consequentemente o início do tratamento. Os sinais e sintomas apresentados pela paciente foram fortes dores ocular, vermelhidão, fotofobia, opacidade da córnea e infiltrados profundos na região inferior da córnea. Estes sinais e sintomas estão fortemente relacionados a fisiopatologia da CA, porém inespecíficos, já que outras ceratites infecciosas também apresentam esses sinais e sintomas (BUCHELE et. al., 2018)

No estágio inicial da infecção, acima de 75% dos casos são diagnosticados de maneira incorreta, na maioria das vezes, a CA é confundida com ceratite herpética ou fúngica, sendo assim é de grande importância a suspeita clínica precoce para a infecção causada por *Acanthamoeba* spp. (DAAS, et al., 2015). Estudo de Papa e colaboradores (2019) identificou uma taxa de 44% de casos de pacientes que iniciaram o tratamento com antivirais e esteroides antes de serem devidamente diagnosticados com CA, devido um diagnóstico tardio ou errôneo.

O padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial da CA é a cultura do protozoário a partir do raspado de córnea, no entanto outras metodologias possuem boa sensibilidade, como é o caso das técnicas moleculares por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Outros métodos podem ser utilizados, como a visualização direta do protozoário no raspado de córnea ou através da microscopia confocal *in vivo*, porém a sensibilidade dessas metodologias depende da carga parasitária no momento da análise e também da habilidade do profissional com a observação dessas formas. Quanto mais rápido a infecção for diagnosticada, melhor o prognóstico do paciente (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Até o momento não há um único medicamento para o tratamento de casos de CA. Desde a descoberta da infecção, diferentes combinações terapêuticas são utilizadas para o tratamento, devido a diferentes fatores como: patogenicidade variável de diferentes cepas, o que torna difícil estabelecer uma correlação entre eficácia *in vitro* e *in vivo*, as diferentes formas do parasito, a manifestação da infecção, como também o estado da córnea no momento do diagnóstico, que pode alterar o manejo da infecção (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; PAPA et. al., 2019; LIST et. al., 2021).

Inúmeros medicamentos já foram utilizados para o tratamento de CA, como antibióticos, antissépticos, antifúngicos, antivirais e terapias antineoplásicas. A grande

maioria dos fármacos tem boa eficácia contra as formas trofozoíticas, com potencial amebicida ou amebostático, porém sabe-se que diferente de outras ceratites infecciosas, na CA os trofozoítos podem entrar em processo de encistamento no tecido corneano (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016).

Os cistos são resistentes a grande maioria dos medicamentos disponíveis, sendo assim o paciente pode apresentar recidiva da CA nos casos em que não houve total erradicação dessas formas em decorrência da baixa ação dos medicamentos utilizados, processo denominado de resistência cística (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; CARRIJO-CARVALHO et al., 2017).

A primeira linha para o tratamento tópico-ocular da CA é a combinação de diamidinas (isotionato de propamidina 0,01% ou hexamidina 0,01%) e as biguanidas (PHMB 0,02% ou clorexidina 0,02%), apesar de apresentar bons efeitos sobre as duas formas de vida do protozoário, essas moléculas são extremamente citotóxicas às células da córnea, necessitando de alterações no plano terapêutico (CARRIJO-CARVALHO et al., 2017; PAPA et. al., 2019). Os pacientes em tratamento com esses medicamentos podem apresentar sinais e sintomas semelhantes aos causados pela CA em decorrência da citotoxicidade. Estudos demonstram que as biguanidas e diamidinas em concentrações terapêuticas ou mesmo abaixo dessas concentrações podem levar a opacidade da córnea e irritação leve a moderada, dificultando o acompanhamento terapêutico (FURRER; MAYER; GURNY, 2002; CARRIJO-CARVALHO et al., 2017; PAPA et. al., 2019).

O tratamento tópico-ocular da CA é difícil, independente do medicamento de escolha, pois as instilações devem ser realizadas a cada hora, durante um longo período, além disso, o tratamento é prolongado e pode levar de 6 a 12 meses para a total erradicação das formas parasitárias (MAYCOCK; JAYASWAL, 2016; PAPA et. al., 2019).

Considerando as dificuldades encontradas no tratamento da CA, a busca de novos medicamentos é desejável, dada a intolerância dos pacientes aos antimicrobianos atuais, ao regime terapêutico, o aparecimento de efeitos adversos e a resistência cística.

2.3 BUSCA DE NOVOS FARMÁCOS

Na última década, observa-se um aumento do número de publicações e estudos de prospecção de novas moléculas com ação anti-*Acanthamoeba*, que demonstram compostos com potencial terapêutico, sendo esses, novas moléculas, produtos naturais como por exemplo

extratos de plantas e derivados e fármacos reposicionáveis. Apesar dos esforços na busca de novas moléculas, a investigação *in vivo* ainda é pouco executada, por se tratar de infecções consideradas raras e de pouco investimento (NIYYATI; DODANGEH; LORENZO-MORALES, 2016; BUNSUWANSAKUL et al., 2019).

2.3.1 Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento ou reaproveitamento de fármacos é uma das práticas da indústria farmacêutica para acompanhar os enormes aumentos dos gastos em P&D, juntamente com baixa produtividade e os desafios de competitividade de preços do mercado. Esses fatores pressionaram muitos desenvolvedores a identificar novos usos para medicamentos aprovados ou em investigação para outras indicações médicas (PUSHPAKOM et al., 2018). A estratégia de reposicionamento de fármacos possui muitas vantagens, sendo a principal delas a redução no tempo e dinheiro gastos – dependendo do estágio de desenvolvimento que o fármaco se encontra – em ensaios pré-clínicos, pois esses medicamentos já foram avaliados quanto a segurança, sendo assim, o risco de fracasso no desenvolvimento do medicamento é reduzido (PUSHPAKOM et al., 2018).

Devido a dificuldade no tratamento de infecções causadas por *Acanthamoeba* spp., a abordagem de reposicionamento de fármacos também vem sendo utilizada, já que até o momento não existe um medicamento específico para o tratamento dessas infecções e o uso de combinações de medicamentos de diferentes classes é necessário (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; PAPA et al., 2019). Os principais estudos de reposicionamento de fármacos para infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. trazem o uso dos antifúngicos azólicos, antibióticos e antineoplásicos (NAKAMINAMI et al., 2017; SHING et al., 2020; ANWAR et al., 2020).

Recentemente, um estudo realizou a triagem de mais de 12.000 compostos frente amebas de vida livre. Moléculas quimicamente diversas com perfil de segurança conhecidos, pois foram previamente testados em humanos e animais, cerca de 38% desses compostos já aprovados pela FDA (RICE et al., 2020). Durante a triagem, foram identificados 32 compostos ativos, inibidores em concentrações de nanomolar e micromolar contra trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. Destes compostos, 16 eram antifúngicos, 6 antineoplásicos, 5 antissépticos, 1 antimicina, 1 antihiperlipidêmico, 1 antibacteriano, 1 corante e 1 diaminida (RICE et al., 2020).

Os azóis inibem a biossíntese do ergosterol, conhecido por integrar a membrana de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. Os antifúngicos azólicos mais utilizados são iconazol, fluconazol, cetoconazol e voriconazol (ANWAR et. al., 2020). No estudo de Shing e colaboradores (2020), a atividade antiamebiana de antifúngicos azóis foram avaliados, destacando-se a ação do posaconazol e isavuconazol frente a cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba*, com ação em concentrações nanomolares e micromolares, com potencial de 40 a 300 vezes maior que a clorexidina.

Os antibióticos muitas vezes são utilizados no tratamento da CA e EAG para evitar infecções bacterianas junto com infecções causadas pelo protozoário, porém também aparecem em estudos na avaliação da sua ação isolada frente as formas de *Acanthamoeba* spp. (NAKAMINAMI et. al., 2017; ANWAR et. al., 2020).

As sulfonamidas são os mais antigos agentes antibacterianos em uso clínico, são classificadas como anti-metabólicos análogos do ácido para-aminobenzóico. São moléculas inicialmente aplicadas para o uso em infecções bacterianas, porém mostram-se eficazes no tratamento de infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. O uso das sulfas, em destaque o sulfametoxazol e a sulfadiazina, são descritos em diferentes casos para o tratamento EAG com sucesso, porém são escassos os estudos *in vitro* dessa classe (KALRA et al., 2020).

As moléculas pertencentes a classe das sulfonamidas demonstram versatilidade, pois alterações estruturais na sua molécula proporcionaram novas aplicações, como por exemplo, o uso como antidiabéticos, anti-inflamatório e como inibidor da anidrase carbônica (JAIN; SARAVANAN; SINGH, 2013; PATRICK, 2017). O estudo de Rosa e colaboradores (2018), realizou a síntese de moléculas derivadas do isoxazolil-sulfonamidas, que apresentaram baixa ação citotóxica em diferentes linhagens celulares e alta atividade biológica contra os protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*, mostram-se como potenciais candidatos para estudos de avaliação da atividade biológica contra *Acanthamoeba* spp.

2.3.2 Extratos e derivados de plantas

As plantas produzem metabólitos primários e secundários que são essenciais para a manutenção da vida vegetal e pela sua proteção contra patógenos, tornando-se alvos para a pesquisa de novas moléculas com ação antimicrobiana. Além disso, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de derivados com propriedades terapêuticas melhoradas (PATRICK, 2017). Niyiyati e colaboradores (2016) realizaram um

levantamento sobre a aplicação de plantas medicinais como fonte de novos agentes terapêuticos para o tratamento de ceratite amebiana, neste contexto, mais de 15 extratos apresentaram resultados promissores com ação anti-*Acanthamoeba*.

O Brasil é uma fonte rica de produtos naturais, dentre eles destaca-se a família Myrtaceae, com cerca de 3000 espécies, sendo o gênero *Eugenia* L. um dos maiores, com cerca de 400 espécies encontradas no Brasil (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005). Espécies pertencentes a família Myrtaceae já foram descritas com ação anti-*Acanthamoeba*, como por exemplo óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L (alecrim); *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry (cravo-da-india); *Melaleuca styphelioides*; *Melaleuca alternifolia* e extratos brutos de *Eugenia hiemalis* (ANACARSO et al., 2017; ALBOUCHI et al., 2017; HADAŚ; DERDA; CHOLEWIŃSKI, 2017; CASARA, 2019). Casara (2019) realizou a avaliação da atividade frente às formas trofozoíticas e císticas de *Acanthamoeba* spp. utilizando além do extrato bruto de *Eugenia hiemalis*, os compostos isolados acetato de miconidina e o *O*-metil-olivetol apresentaram ação amebicida dose-dependente, não induzindo a formação de cistos, característica importante, visto que essas são formas consideradas de resistência e relacionadas com recidivas das infecções causadas por esse gênero (CARRIJO-CARVALHO et al., 2017). Os resultados promissores indicam a necessidade de ampliar a investigação quanto ao potencial amebicida dos compostos isolados, assim como a possibilidade de semissíntese de derivados com vista à obtenção de novas entidades químicas com maior potencial terapêutico (PATRICK, 2017).

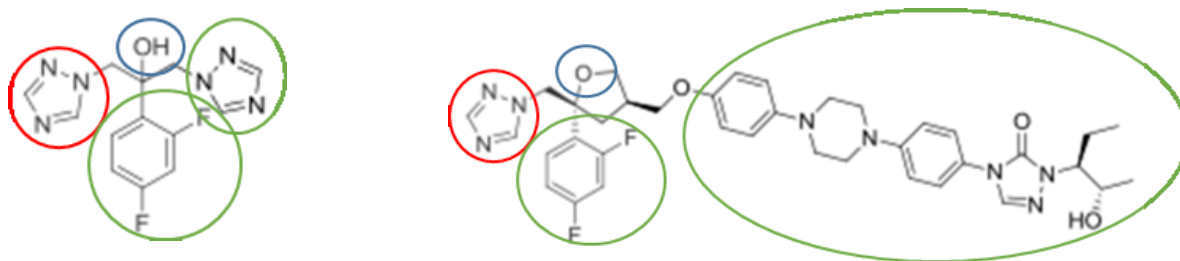
Vieira (2020) realizou a semissíntese de compostos derivados do *O*-metil-olivetol, a fim de melhorar a atividade dos compostos e suas propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas. As alterações foram classificadas em dois grupos: os derivados *o*-glicosilados e triazólicos (1,2,3-triazólicos). Um total de 23 compostos foram sintetizados dos quais dezesseis foram análogos triazólicos.

Os antifúngicos azóis são inibidores da síntese do ergosterol, agindo sobre a enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51). Essa enzima está presente nos fungos como também já foi relatada em *T. cruzi* e *Acanthamoeba* spp. (FRANÇA et. al., 2014; ZHOU et al., 2018).

Figura 3: Relação estrutura-atividade triazóis

A

B



Círculo vermelho: região de coordenação com ferro do grupo heme; círculo azul: interação de ligação de hidrogênio; círculo verde: interações hidrofóbicas. Fluconazol (A); Posaconazol (B) Fonte: Autora

Os antifúngicos azóis possuem quatro regiões de interação com a enzima (figura 3), a complexação do anel azol (imidazol ou triazol) com o grupo heme da enzima, uma porção para ligação de hidrogênio e regiões para interação hidrofóbica, sendo assim o antifúngico impossibilita a ligação do substrato e inibi a ação da enzima. Dentre os antifúngicos azóis, os compostos contendo o anel triazólico possuem maior interação com a enzima.

2.3.3 Composto de coordenação

Uma abordagem recente sobre a busca de novas terapias para o tratamento de infecções causadas por protozoários é o uso de nanopartículas ou complexos contendo metais, no entanto, são limitados os estudos com a aplicação para infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. (PADZIK et al., 2018; ANWAR et al., 2019). Uma revisão realizada por Sharma e colaboradores (2020) apontou os principais trabalhos utilizando nanopartículas contendo metais como cobalto, prata, ouro e zinco, os quais apresentaram bons resultados frente a cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., porém são escassos os estudos utilizando os metais em forma de complexos (AQEEL et al., 2015; PADZIK et al., 2018; ANWAR et al., 2019).

Os complexos metálicos estão inseridos dentro da química inorgânica como compostos de coordenação, regidos pela teoria de ligações coordenadas, de forma simplificada, essa teoria é compreendida como ligações covalentes formadas através de pares de elétrons compartilhados, sendo que o par de elétrons da ligação se origina de apenas um dos átomos da reação (LAWRANCE, 2010; TUREL, 2015). No caso dos complexos, a ligação coordenada se forma através da doação de elétrons provenientes dos ligantes ricos em elétrons para um átomo central, nesse caso, os metais deficientes em elétrons (LAWRANCE, 2010; TUREL, 2015). Os compostos de coordenação foram amplamente estudados para o

tratamento das mais diversas doenças, obtendo-se com sucesso compostos para o tratamento de artrite (complexos de ouro), controle da pressão arterial (complexos de ferro), diabetes (complexos de vanádio), câncer (complexos de platina e titânio) e antibacterianos (compostos de prata, mercúrio, zinco, entre outros) (LAWRANCE, 2010; TUREL, 2015).

Estudos recentes avaliaram a atividade de compostos de coordenação frente a protozoários, como por exemplo o uso de complexos de cobre e ferro sobre as formas taquizoíticas de *Toxoplasma gondii*, obtendo-se resultados de concentração inibitória de 50% (CI50) de 0,78 μM e 3,56 μM , respectivamente, em 48 h de exposição (PORTES et al., 2015; PORTES et al., 2017).

Kusrini e colaboradores (2016, 2018) demonstraram a ação anti-*Acanthamoeba* de complexos lantanídeos de térbio e samário frente às formas trofozoíticas, com CI50 abaixo de 10 $\mu\text{g/mL}$, representando uma opção terapêutica contra as infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

O uso de compostos de coordenação são escassos na literatura para ensaio com *Acanthamoeba* spp., porém por demonstrarem ação contra outros protozoários, podem ser promissores na busca de novas opções terapêuticas e de prevenção para infecções acanthamebianas, com ação antitrofozoítica e anticística e com baixo potencial citotóxico às células hospedeiras.

2.4 MÉTODOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA FRENTE *Acanthamoeba* spp.

A avaliação da viabilidade ou citotoxicidade celular *in vitro* causada por um composto é uma prática fundamental para a pesquisa inicial de moléculas bioativas, pois fornece dados preliminares para estudos *in vivo*.

Atualmente duas organizações auxiliam na padronização de métodos para avaliação da viabilidade celular, Organização Internacional de Normalização (ISSO) e Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Essas organizações trazem inúmeras metodologias que podem ser utilizadas para os mais diversos tipos celulares. Os métodos especificam a incubação das células com extratos/compostos diretamente ou por difusão, possibilitando a determinação da resposta biológica das células (ISO, 2009).

No anexo I do documento de orientação sobre boas práticas do método *in vitro* (GIVIMP) desenvolvido pela OECD traz uma lista de 13 métodos de teste de viabilidade (não inclusivo) de culturas celulares, os quais são subdivididos em categorias: Avaliação de danos celulares estruturais (não invasivo); Avaliação de dano celular estrutural (invasivo); Avaliação de crescimento celular e Avaliação do metabolismo celular (OECD, 2018). No quadro 1 é possível observar os métodos descritos na literatura por suas categorias.

Quadro 1: Métodos de avaliação de viabilidade *in vitro*

Avaliação de danos celulares estruturais (não invasivo)	Avaliação de dano celular estrutural (invasivo)	Avaliação de crescimento celular	Avaliação do metabolismo celular
Avaliação da forma geral da célula, estrutura citoplasmática, planicidade e propriedades de contorno em um bom microscópio de luz de contraste de fase	Penetração da membrana usando corantes para detectar 'citotoxicidade' (por exemplo, preto naftaleno, azul de tripano, iodeto de propídio, brometo de etídio, EH-1)	Contagem de células	Ensaio de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) ou ensaios de redução de corante de tetrazólio semelhantes (por exemplo, WST-8) Ensaio de redução de resazurina (às vezes chamado de azul Alamar)
	Retenção de corantes dentro das células intactas para detectar 'viabilidade' (por exemplo, diacetato de fluoresceína ou calceína-AM)	Incorporação BrdU ou EdU	Ensaios de despolarização mitocondrial (com base em corantes indicadores fluorescentes)
Teste de liberação de LDH	Avaliação de marcadores de morte celular / apoptose programada	Coloração de componentes celulares que são proporcionais à massa celular total (proteínas por exemplo, sulforhodamina B ou cristal violeta; DNA por Hoechst H-33342)	Captação de vermelho neutro (NRU) (ISO 10993) Ensaios de ATP

Fonte: Adaptado de OECD, 2018

Dentre os métodos da OECD, muitos já foram descritos na literatura para determinar a eficiência de agentes anti-*Acanthamoeba*. Os mais frequentemente utilizados são a contagem manual dos trofozoítos e cistos usando hemocítmetro e corantes de exclusão com azul de tripan ou vermelho congo (HEREDERO-BERMEJO et al. 2013; NAKAMINAMI et. al., 2017; CASARA, 2019), ensaio alamarBlue[®] para trofozoítos (MCBRIDE et al. 2005; JHA et. al., 2015), ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) e lactato desidrogenase para trofozoítos (ZHAO et al. 2003; KUSRINI et. al., 2016; KUSRINI et. al., 2018).

Apesar do grande avanço na padronização de métodos para avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* de compostos, a metodologia amplamente aceita ainda é a contagem manual com corantes de exclusão, porém é um método oneroso, demanda muito tempo do

analista, requer um analista treinado na observação das formas do protozoário, pode ser subjetivo e também limita o número de compostos utilizados para triagens amplas (MCBRIDE et al. 2005; HEREDERO-BERMEJO et al. 2013).

Segundo McBride e colaboradores 2005, o método ideal é aquele que possibilita a análise das formas vivas, os resultados não são lidos de maneira subjetiva e o ensaio não depende de contagem manual, para isso, os autores padronizaram o método utilizando alamarBlue[®] em placas de microtitulação, que vem sendo amplamente utilizado para avaliar a viabilidade dos trofozoítos.

O alamarBlue[®] (Invitrogen) é uma solução contendo resazurina que funciona como indicador de viabilidade celular devido ao processo de oxirredução. A resazurina é um composto atóxico, permeável às células de cor azul pouco fluorescente (INVITROGEN, 2020). Ao permear as células, a resazurina é reduzida nas mitocôndrias em resorufina, composto de cor róseo/vermelho e altamente fluorescente, sendo assim, as células viáveis reduzem constantemente a resazurina em resorufina, gerando uma medida quantitativa da viabilidade (INVITROGEN, 2020).

Vários trabalhos vêm utilizando o alamarBlue[®] para avaliar de atividade anti-trofozoítos, como por exemplo: Hernández-Martínez e colaboradores (2019) avaliaram a atividade voriconazol, itraconazol e clorexidina, Jha e colaboradores (2015) avaliaram a atividade da tigeciclina, Fears e colaboradores (2018) e Sifaoui e colaboradores (2017) avaliaram a eficiência de nove e duas soluções multipropósitos, respectivamente; Souhail e colaboradores (2017) e Zouaghi e colaboradores (2017) avaliaram óleos essenciais de *Ammoides pusilla* e extratos de *Citrus sinensis*, respectivamente, dentre outros, mostrando que independente do composto utilizado seja, extrato, composto isolado, soluções comerciais o método pode ser utilizado.

A padronização do alamarBlue[®] para trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. traz inúmeras vantagens, como alto rendimento, facilidade de preparação e leitura, robustez, baixo custo, alta sensibilidade, muitos testes podem ser realizados rapidamente, além disso permite avaliação de extratos e fármacos que possam apresentar cor, já que o método também permite a leitura por fluorescência. (MCBRIDE et. al., 2005; OECD, 2018)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a triagem de compostos sintéticos e semissintéticos para a avaliação da atividade contra formas de *A. castellanii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar do método alamarBlue® para avaliação da viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii*;
- Avaliar a atividade anti-*Acanthamoeba* de compostos derivados do isoxazolil-sulfonamida;
- Avaliar a atividade anti-*Acanthamoeba* de compostos derivados triazólicos do *O*-metil-olivetol;
- Avaliar a atividade anti-*Acanthamoeba* de compostos de coordenação de cobre(II) e ferro(III);
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos de coordenação de cobre(II) e ferro(III) em células do epitélio da córnea de coelho;
- Avaliar a associação do composto de coordenação de cobre(II) e clorexidina;
- Avaliar a integridade da membrana dos trofozoítos de *A. castellani* após tratamento com composto de coordenação de cobre(II).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA E OBTENÇÃO DO PROTOZOÁRIO

Os testes de triagem para avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* dos compostos sintéticos e semissintéticos foram realizados utilizando a cepa *A. castellanii* genótipo T4 (ATCC 50492). Os trofozoítos foram cultivados axenicamente em meio proteose peptoná-extrato de levedura-glucose (PYG) em temperatura de 30 °C durante 5 dias.

Os cistos foram obtidos de culturas de trofozoítos utilizando o meio de encistamento Tris-HCl (95 mM NaCl; 5 mM KCl; 8 mM MgSO₄.7H₂O; 0,4 mM CaCl₂. 2H₂O; 1 mM NaHCO₃; 20 mM Tris- base, pH 8,9 ajustado com HCl 1%) incubados em temperatura de 30 °C por 72 h. Ao término do período de incubação com solução de encistamento, os trofozoítos remanescentes e pré-cistos foram eliminados com lavagem utilizando solução de SDS a 0,5%.

4.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE TROFOZOÍTOS

Para realização da curva de crescimento, 100 µL da suspensão de trofozoítos a 1x10⁵ trofozoítos/mL foram inoculados em tubos contendo 2,5 mL de PYG e incubados a 30 °C de 1 a 8 dias. A cada 24 horas foi realizada a contagem dos trofozoítos em câmara de Fuchs-Rosenthal, utilizando o corante de viabilidade azul de tripan 0,4%. Com os dados obtidos foi possível avaliar a taxa de velocidade média de crescimento dos trofozoítos e a taxa de gerações, calculados partir da equação 1:

Equação 1: Avaliação do crescimento dos trofozoítos

$$\text{Velocidade média de crescimento (k)} = \frac{(\log NT - \log N0)}{0,301} \times T$$

$$\text{Taxa de gerações (g)} = \frac{1}{k}$$

Fonte: Finco, 2012

Sendo, NT o número máximo de trofozoítos, N0 é o número de trofozoítos do inóculo inicial e T o tempo em que foi atingida a densidade máxima (FINCO,2012).

4.3 OTIMIZAÇÃO DO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR COM ALAMAR BLUE®

4.3.1 Determinação das densidades de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*

Os ensaios de determinação das densidades de trofozoítos foram conduzidos segundo McBride e colaboradores (2005) e Jha e colaboradores (2015), com modificações. O ensaio foi realizado a partir de uma suspensão celular estoque de 2×10^6 trofozoítos/mL da cepa ATCC 50492, seguido de diluições seriadas, com volume final de 100 μ L por poço, em placas de 96 poços em triplicata, com finalidade de obter-se uma curva de calibração com os seguintes pontos: 1×10^6 , 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$, $1,25 \times 10^5$, $6,25 \times 10^4$, $3,12 \times 10^4$, $1,56 \times 10^4$, $7,8 \times 10^3$ trofozoítos/mL. Os trofozoítos foram incubados a 30 °C durante 24 h e 48 h livres de luz. Foi adicionado 10% do volume final do poço de alamarBlue® (Invitrogen) 6 h ou 8 h antes do final do período de incubação. Após esse período, realizou-se a leitura por fluorescência com os comprimentos de onda de 530 nm de emissão e 615 nm excitação e 530 nm emissão e 590 nm excitação. O meio PYG (100 μ L) foi utilizado como branco. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.2 Avaliação da viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* frente à clorexidina pelo ensaio de alamarBlue®

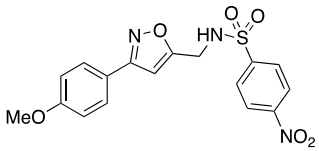
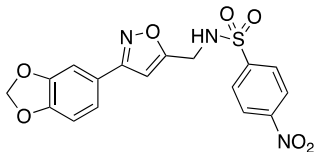
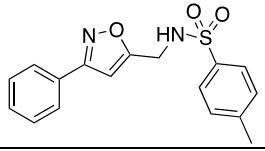
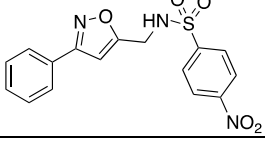
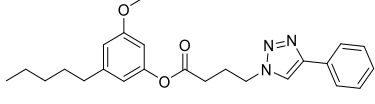
O ensaio utilizando a clorexidina contra trofozoítos de *A. castellanii* (ATCC 50492) foram realizados da seguinte forma: 8×10^5 trofozoítos/mL e 8×10^4 trofozoítos/mL foram incubados com diferentes concentrações de clorexidina (50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,2 μ M, 3,1 μ M, 1,5 μ M) em placas de 96 poços, com volume final de 100 μ L. As placas foram incubadas a 30 °C durante 24 h e 48 h livres de luz. Oito horas antes do período final de incubação, adicionou-se 10% do volume final do poço de alamarBlue® (Invitrogen). Após o período de incubação, realizou-se a leitura por fluorescência nos seguintes comprimentos de onda: 530 nm de emissão e 615 nm excitação e 530 nm emissão e 590 nm excitação. O DMSO 0,1% em meio PYG foi utilizado como controle negativo, considerado 100% de viabilidade. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. Os resultados foram expressos como porcentagem de trofozoítos viáveis e erro padrão da média.

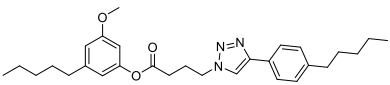
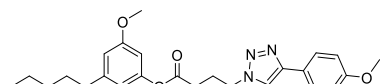
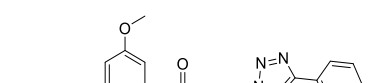

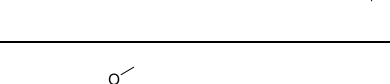
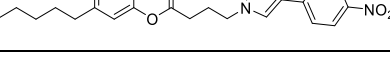
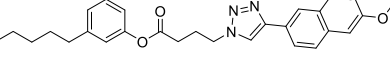
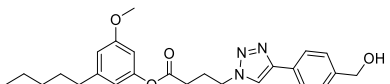
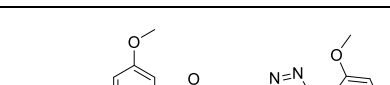
4.4 TRIAGEM DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTI-*Acanthamoeba* FRENTE A TROFOZOÍTOS

O ensaio de avaliação da atividade dos derivados isoxazolil-sulfonamidas, derivados triazólicos de *O*-metil-olivetol (Tabela 1) e compostos de coordenação, ligantes e sais metálicos (Quadro 1) foi conduzido da seguinte maneira: foi preparada uma suspensão contendo 8×10^4 trofozoítos/mL, inoculados em placas de 96 poços contendo as concentrações de 100 μ M ou 50 μ M das soluções teste. As placas foram incubadas a 30 °C no período de 24 h e 48 h. Como controle negativo foi utilizado dimetilsulfóxido a 0,1% em PYG.

Os derivados isoxazolil-sulfonamidas e derivados triazólicos de *O*-metil-olivetol foram cedidos gentilmente pelo Grupo Estudo de Produtos Naturais e Sintéticos (GEPRONAS/UFSC) e os compostos de coordenação, ligantes e sais metálicos pelo Laboratório Interdisciplinar de Química Inorgânica Medicinal e Catálise (LIQIMeC/UFSC), grupos colaboradores do presente estudo.

Tabela 1: Estruturas moleculares dos derivados isoxazolil-sulfonamida (SF) e derivados triazólicos do *O*-metil-olivetol (ME)

	Identificação	Estrutura	Massa molecular (g/mol)	Nomenclatura IUPAC
Derivados isoxazolil-sulfonamida	SF104		390,4	N-([3-(4-metoxifenil)-1,2-oxazol-5-yl]metil)-4-nitrobenzeno-1-sulfonamida
	SF110		404,4	N-([3-(2H-1,3-benzodioxol-5-yl)-1,2-oxazol-5-yl]metil)-4-nitrobenzeno-1-sulfonamida
	SF113		351,4	4-metil-N-([3-fenol-1,2-oxazol-5-yl]metil]benzeno-1-sulfonamida
	SF114		360,4	4-nitro-N-([3-fenil-1,2-oxazol-5yl]metil]benzeno-1-sulfonamide
Derivados triazólicos do <i>O</i> -metil-olivetol	Me1		407,5	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-fenil-1,2,3-triazol-1-il)butanoato

Me2		477,6	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(4-pentilfenil)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato
Me3		437,5	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(4-metoxifenil)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato
Me4		421,5	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(p-toluil)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato
Me5		463,6	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(4-(terc-butil)fenil)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato
Me6		452,5	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(4-nitrofenil)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato
Me7		487,6	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(6-metoxinaftalen-2-il)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato
Me8		437,5	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(4-(hidroximetil)fenil)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato
Me9		437,5	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(2-metoxifenil)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato
Me10		467,5	<i>O</i> -metil-olivetol 4-(4-(3,5-dimetoxifenil)-1,2,3-triazol-1-il)butanoato

Fonte: Autora

Quadro 2: Compostos de coordenação, ligantes e sais metálicos

Sais metálicos	Ligantes	Compostos de coordenação
Cp1: FeCl ₃ .6H ₂ O Cp2: CuCl ₂ .2H ₂ O	Cp3: α-naftol-BMPA Cp4: β-naftol-BMPA Cp5: α-naftol-HBPA Cp6: β-naftol-HBPA Cp7: Metformina Cp15: HBPA	Cp8: Feα-naftol-BMPA Cp9: Feβ-naftol-BMPA Cp10: Feα-naftol-HBPA Cp11: Feβ-naftol-HBPA Cp12: Cuα-naftol-HBPA Cp13: Cuβ-naftol-HBPA Cp14: CuCl ₂ +Metformina Cp16: Cu-HBPA

Fonte: Autora

Os trofozoítos viáveis foram quantificados em câmara de Fuchs-Rosenthal, utilizando o corante de viabilidade azul de tripan 0,4%. Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes. Os resultados obtidos foram expressos como percentagem de trofozoítos viáveis, média e erro padrão da média das triplicatas.

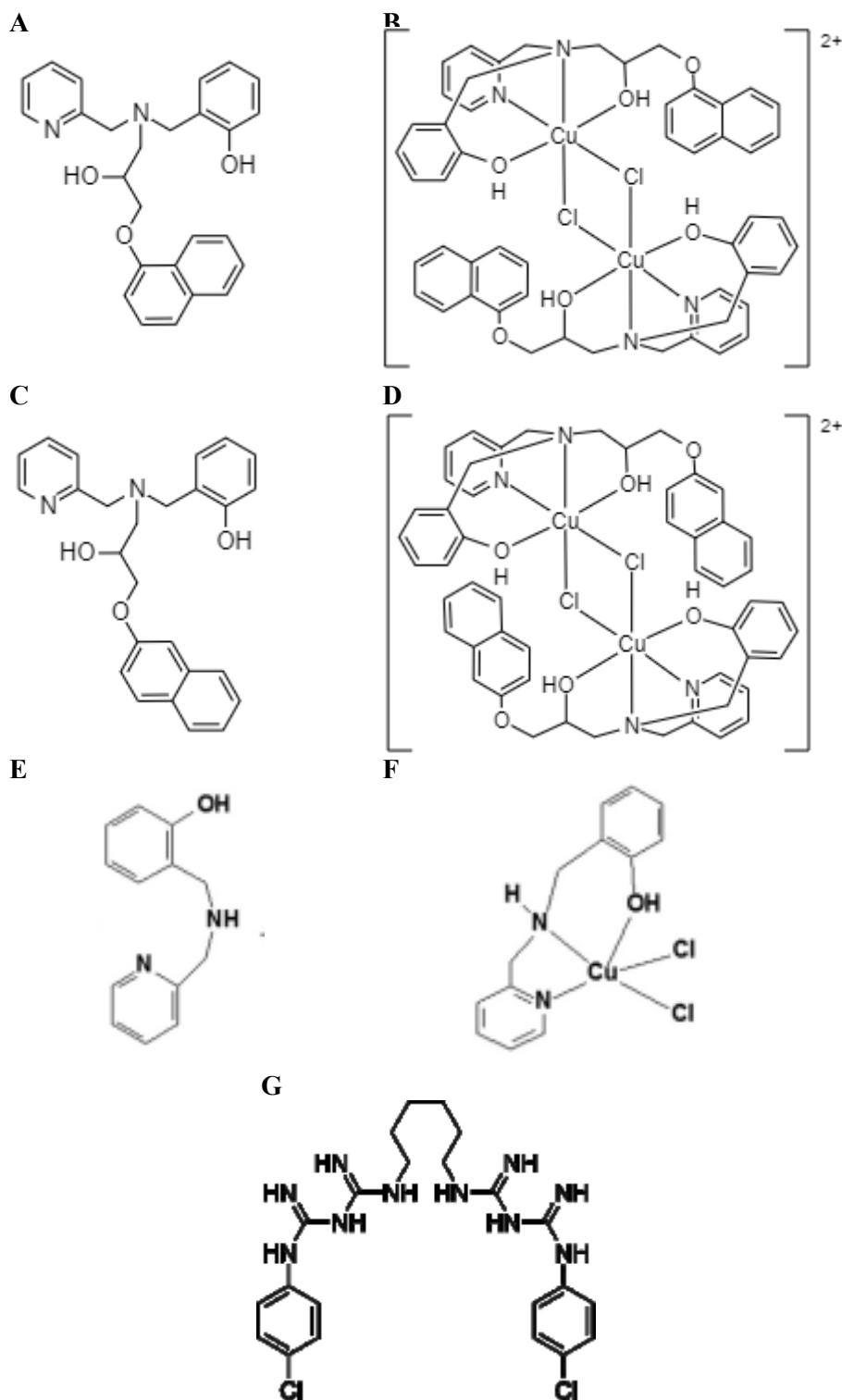
4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE FERRO(III) E COBRE(II) FRENTE CÉLULAS DE CórNEA DE COELHO

A avaliação da citotoxicidade dos composto de coordenação de ferro(III) e cobre(II) foi realizada para selecionar compostos com baixo potencial citotóxico para dar continuidade aos estudos de avaliação de atividade anti-*Acanthamoeba*. Células de córnea de coelho (SIRC - ATCC® – CCL 60) foram mantidas em garrafas de 75 cm² em meio de cultivo DMEM suplementado com 2 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após atingir confluência de 95%, as células SIRC foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5x10⁵ células/poço, e tratadas com as concentrações de 100, 50 e 25 µM dos compostos selecionados na triagem, incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Como controle negativo foi utilizado meio DMEM, como controle de viabilidade foi utilizado meio DMEM com DMSO 0,1%. Após o tratamento, foi retirado totalmente o volume dos poços e adicionado MTT 0,5 mg/mL, com leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados obtidos foram expressos como percentagem de células viáveis, média e erro desvio padrão das triplicatas.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) FRENTE A TROFOZOÍTOS

Os compostos de cobre(II) (Cu- α -naftol-HBPA [Cp12] e Cu- β -naftol-HBPA [Cp13]) foram selecionados para dar continuidade aos estudos de atividade antiamebiana. Os compostos de coordenação Cp12 e Cp13 foram avaliados nas concentrações de 200, 100, 75, 50, 25, 10, 7,5 e 5 μ M dos compostos frente à 8×10^5 trofozoítos/mL, em placas de 96 poços. Os ligantes e sais metálicos também foram avaliados. As placas foram incubadas a 30 °C no período de 24 h. Oito horas antes do período final de incubação, adicionou-se 10% do volume final do poço de alamarBlue® (Invitrogen). Após o período de incubação, realizou-se a leitura por fluorescência nos seguintes comprimentos de onda: 530 nm de emissão e 615 nm excitação. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,1% em meio PYG. Como controle positivo foi utilizada a clorexidina, antisséptico utilizado como primeira linha para o tratamento do CA nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 μ M. Com a finalidade de comparar a atividade dos compostos de coordenação de cobre(II), foi avaliada a atividade do análogo Cu-HBPA (Cp15) e seu respectivo ligante, HBPA (Cp16), nas mesmas concentrações. Os compostos de coordenação utilizados estão apresentados na figura 4.

Figura 4: Estruturas moleculares dos compostos de coordenação de cobre(II) e clorexidina



Estruturas moleculares dos compostos de coordenação de cobre(II). A: Cp5 – ligante α -HBPA (1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(1-naftiloxi)-2-propanol); B: Cp12 – Cu- α -naftol-HBPA; C: Cp6 – ligante β -HBPA (1-[2-hidroxibenzil(2-piridilmetil)amino]-3-(2-naftiloxi)-2-propanol); D: Cp13 – Cu- β -naftol-HBPA; E: Cp16 – ligante HBPA ((2-hidroxibenzil) (2-piridilmetil) amina); F: Cp15 – Cu-HBPA; G: CLX – Clorexidina. Fonte: FERNANDES et al.,2015; BORGES et al., 2016.

Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. Os resultados foram expressos como porcentagem de trofozoítos viáveis e erro padrão da média. A CAIM foi estabelecida pela observação da inibição de >90% do crescimento visível dos trofozoítos (MITSUWAN *et al.*, 2021; SANGKANU *et al.*, 2021) e a concentração inibitória média (CI50) foi calculada a partir de regressão linear utilizando um intervalo de confiança de 95%.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CISTICIDA DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12

A avaliação da atividade cisticida do composto 12 (Cu- α -naftol-HBPA), ligante (α -naftol-HBPA) e sal de cobre (CuCl₂.2H₂O) foi realizada da seguinte forma: após a obtenção dos cistos conforme descrito no item 4.1, cistos maduros foram centrifugados e lavados duas vezes com PBS 1X. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, no qual foi adicionado 100 μ L de uma suspensão de 8×10^4 cistos/mL aos poços contendo 100 μ L das seguintes concentrações de composto: 200, 50 e 25 μ M. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 e 48 h. Como controle positivo foi utilizada clorexidina a 200 μ M e o como controle negativo foi utilizado dimetilsulfóxido a 0,1%. Após o período de incubação foi realizado dois procedimentos independentes: a avaliação da viabilidade e a capacidade de desencistamento.

Os cistos viáveis foram quantificados em câmara de Fuchs-Rosenthal, utilizando o corante de viabilidade azul de tripan 0,4%. Os ensaios foram realizados em triplicatas independentes. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem média de cistos viáveis e erro padrão da média das triplicatas.

4.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12 E CP13 FRENTE CÉLULAS DE CórNEA DE COELHO

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando os compostos selecionados na triagem (Cu- α -naftol-HBPA [Cp12] e Cu- β -naftol-HBPA [Cp13]), seus respectivos ligantes (α -naftol-HBPA [Cp5] e β -naftol-HBPA [Cp6]) e sal de cobre (CuCl₂.2H₂O [Cp2]). Para a avaliação foram utilizadas células de córnea de coelho (SIRC - ATCC® – CCL 60). As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em meio de cultivo DMEM suplementado com 2 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após atingir confluência de

95%, as células SIRC foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^5 células/poço, no dia seguinte foram tratadas com as concentrações de 200, 100, 75, 50, 25 e 10 μM dos compostos e incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 . Como controle negativo foi utilizado meio DMEM, como controle de viabilidade foi utilizado meio DMEM com DMSO 0,1%. Após o tratamento, foi retirado totalmente o volume dos poços e adicionado MTT 0,5 mg/mL para posterior leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de células viáveis média e erro padrão das triplicatas. A concentração citotóxica média (CC50) foi calculada a partir de regressão linear utilizando um intervalo de confiança de 95%. O índice de seletividade foi calculado utilizando a seguinte equação:

Equação 2: Cálculo do índice de seletividade

$$IS = \frac{CC50 \text{ (células SIRC)}}{CI50 \text{ (trofozoítos)}}$$

Fonte: NAVA-ZUAZO et al., 2010

4.9 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12 E CLOREXIDINA

O ensaio de tabuleiro de damas (MITSUWAN *et al.*, 2021; SANGKANU *et al.*, 2021) com modificações foi utilizado para avaliar a interação entre o composto selecionado e a clorexidina, a fim de observar efeitos sinérgicos. Uma suspensão de 8×10^5 trofozoítos/mL foi inoculada em placas de 96 poços contendo os compostos diluídos em PYG com as seguintes concentrações 1/64 MIC, 1/32 MIC, 1/16 MIC, 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC, MIC, obtendo-se um volume final de 100 μL . As diluições foram distribuídas de forma que todas as concentrações do composto 12 disposto na vertical (A) combinassem com todas as concentrações da clorexidina dispostas na horizontal (B), obtendo-se um total de 49 combinações, apresentadas esquematicamente na figura 5.

Figura 5: Combinações ensaio de associação entre o composto de coordenação de cobre(II) e clorexidina

Cp12		Clorexidina	
Identificação	Concentração	Identificação	Concentração
A	CAIM - 200 μ M	1	CAIM - 200 μ M
B	1/2 CAIM - 100 μ M	2	1/2 CAIM - 100 μ M
C	1/4 CAIM - 50 μ M	3	1/4 CAIM - 50 μ M
D	1/8 CAIM - 25 μ M	4	1/8 CAIM - 25 μ M
E	1/16 CAIM - 12,5 μ M	5	1/16 CAIM - 12,5 μ M
F	1/32 CAIM - 6,25 μ M	6	1/32 CAIM - 6,25 μ M

As letras e o números correspondem a uma concentração específica, unindo-se uma letra a um número tem-se uma associação de compostos. Exemplo: Combinação A1 = 200 μ M de Cp12 + 200 μ M de clorexidina; Combinação F2 = 6,25 μ M de Cp12 + 100 μ M de clorexidina. Fonte: Autora.

As placas foram incubadas a 30 °C no período de 24 h. Oito horas antes do período final de incubação, adicionou-se 10% do volume final do poço de alamarBlue® (Invitrogen). Após o período de incubação, realizou-se a leitura por fluorescência nos seguintes comprimentos de onda: 530 nm de emissão e 615 nm excitação. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,1% em meio PYG, considerando-o 100% de viabilidade. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A avaliação dos resultados foi definida como o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), que foi calculado utilizando a equação 3 e o resultado foi interpretado conforme apresentado no quadro 2.

Equação 3: Índice de Concentração Inibitória Fracionada

$$ICIF = \frac{CAIM \text{ combinação do composto A + composto B}}{CAIM \text{ do composto A sozinho}} + \frac{CAIM \text{ combinação do composto B + composto A}}{CAIM \text{ do composto B sozinho}}$$

Fonte: MITSUWAN *et al.*, 2021; SANGKANU *et al.*, 2021; SANGKANU *et al.*, 2021

Quadro 3: Interpretação da associação dos compostos

Sinergia	ICIF $\leq 0,5$
Indiferença	ICIF $> 0,5$ e ≤ 2
Antagonismo	ICIF > 2

Fonte: MITSUWAN *et al.*, 2021; SANGKANU *et al.*, 2021

4.10 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA DE TROFOZOÍTOS APÓS TRATAMENTO COM COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12

4.10.1 Marcação com Laranja de Acrídina e Brometo de Etídio

O ensaio de marcação com laranja de acridina e brometo de etídio foi conduzido de seguinte forma: uma suspensão de 8×10^5 trofozoítos/mL foi incubada a 30 °C com a concentração de CI50 de 9,4 μM para Cp12 por 24 h em placas de 96 poços. Posteriormente, os trofozoítos foram recuperados e lavados com PBS 1X, o sobrenadante foi descartado e foi realizada a adição de uma solução previamente preparada contendo laranja de acridina 1,2 $\mu\text{g/mL}$ e brometo de etídio 4 $\mu\text{g/mL}$. Como controle negativo foi utilizado 0,1% de DMSO. As alterações morfológicas foram observadas por microscopia de fluorescência entre lâmina e lamínula. O ensaio foi realizado em duplicata. A integridade da membrana permite classificar as células da seguinte forma: 1) células viáveis – marcadas em verde; 2) células em apoptose – marcadas em verde e cromatina condensada ou marcadas em verde e laranja, indicando perda da permeabilidade da membrana; e 3) células em necrose – totalmente marcadas em alaranjado (FERNANDES *et al.*, 2015).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

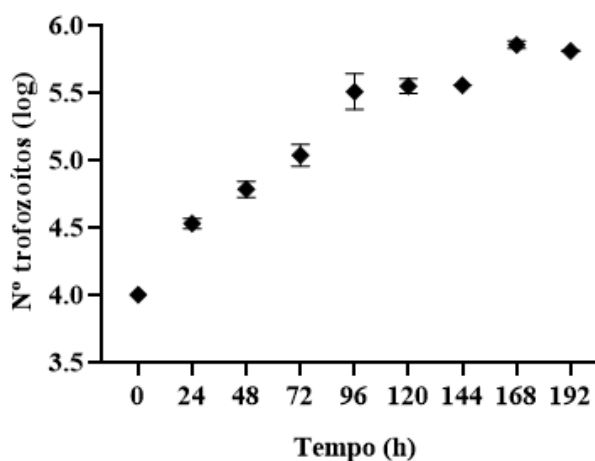
Para realização da análise estatística foi utilizado o programa GraphPadPrisma 5.0. Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média, e o teste ANOVA com pós teste de Turkey foi utilizado. O nível de significância adotado para os ensaios foi definido como $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DE CRESCIMENTO EM MEIO PYG

Para avaliar a característica de crescimento da cepa *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) utilizada para os ensaios de triagem, realizou-se o estudo da curva de crescimento em meio PYG ao longo de oito dias com leitura a cada 24 horas. A cepa apresentou crescimento exponencial entre 24 h e 96 h, com breve platô de crescimento em 120 h (figura 6). Com o resultado obtido foi possível calcular a taxa de crescimento e tempo de geração da cepa, pode-se verificar que o tempo de geração médio foi de 27,4 h (tabela 2).

Figura 6: Curva de crescimento ATCC50492



Fonte: Autora

Tabela 2: Taxa média de crescimento

	Taxa de crescimento (gerações/h)	Tempo de geração (h)
<i>Acanthamoeba castellanii</i> (ATCC50492)	0,0365	27,4

Fonte: Autora

Nesse ensaio também foi possível observar as características morfológicas dos trofozoítos no meio rico para o crescimento, no qual apresentaram-se ameboides, com presença de projeções citoplasmáticas características (acantopódios) e poucos vacúolos, demonstrando ausência de estresse osmótico. Sendo assim, optou-se por utilizar culturas em fase exponencial com 120 h de crescimento nos experimentos de triagem de compostos.

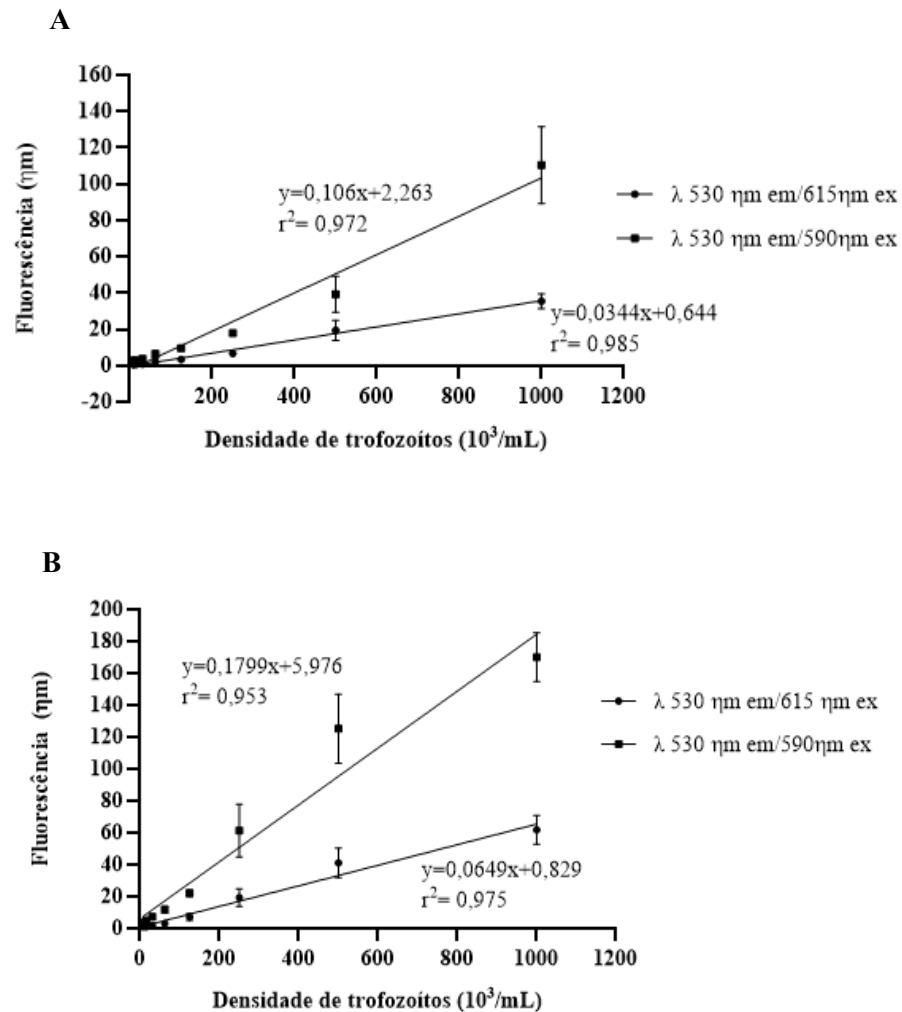
5.2 OTIMIZAÇÃO DE TESTE DE VIABILIDADE CELULAR COM ALAMAR BLUE[®]

5.2.1 Determinação das densidades de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* para avaliação da viabilidade por AlamarBlue[®]

No presente trabalho, a padronização da avaliação da viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* (ATCC 50492) por alamarBlue[®] (Invitrogen) foi realizada em dois tempos de exposição (6 h e 8 h). Quando o alamarBlue[®] foi adicionado seis horas antes do fim da incubação não houve diferença entre a fluorescência emitida em comparação com o controle negativo e com os poços contendo maior densidade. Sendo assim, optou-se por seguir os ensaios utilizando a leitura por fluorescência com adição de alamarBlue[®] oito horas antes do final do período de incubação. As faixas de emissão e excitação para a leitura foram selecionadas com base nos artigos publicados na literatura com a utilização de alamarBlue para *Acanthamoeba* spp. e para demais células, optando-se por utilizar 530nm/615nm e 530nm/590nm.

Os resultados encontrados no ensaio estão apresentados na figura 7. A partir dos dados encontrados de fluorescência emitida pelas células viáveis nas curvas de densidade celular foi possível calcular o coeficiente de determinação (r^2) da regressão linear. Quanto mais próximo o coeficiente de determinação for de 1, significa que os valores encontrados estão próximos a linha de regressão, ou seja, a variabilidade dos dados está mais próxima de sua média.

Figura 7: Curva de densidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492) para otimização do método de viabilidade celular pelo AlamarBlue®



Avaliação da viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492) por AlamarBlue®. Fluorescência avaliada em 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. Fonte: Autora

O valor de r^2 das curvas de densidade celular no qual a leitura da fluorescência foi realizada em 530 nm emissão e 615 nm de excitação apresentaram melhores resultados, 0,985 e 0,975 para 24 h e 48 h, respectivamente, sendo assim os resultados corroboram com utilizados por Jha e colaboradores (2015) no qual utilizaram a leitura de fluorescência para avaliar a viabilidade celular com AlamarBlue®. Neste ensaio, também foi possível avaliar o comportamento da fluorescência em relação à densidade de trofozoítos, no qual observa-se que a fluorescência emitida é maior quanto maior a densidade de células e no caso de baixas densidades o método é pouco eficaz, sendo necessário maiores períodos de incubação. Com

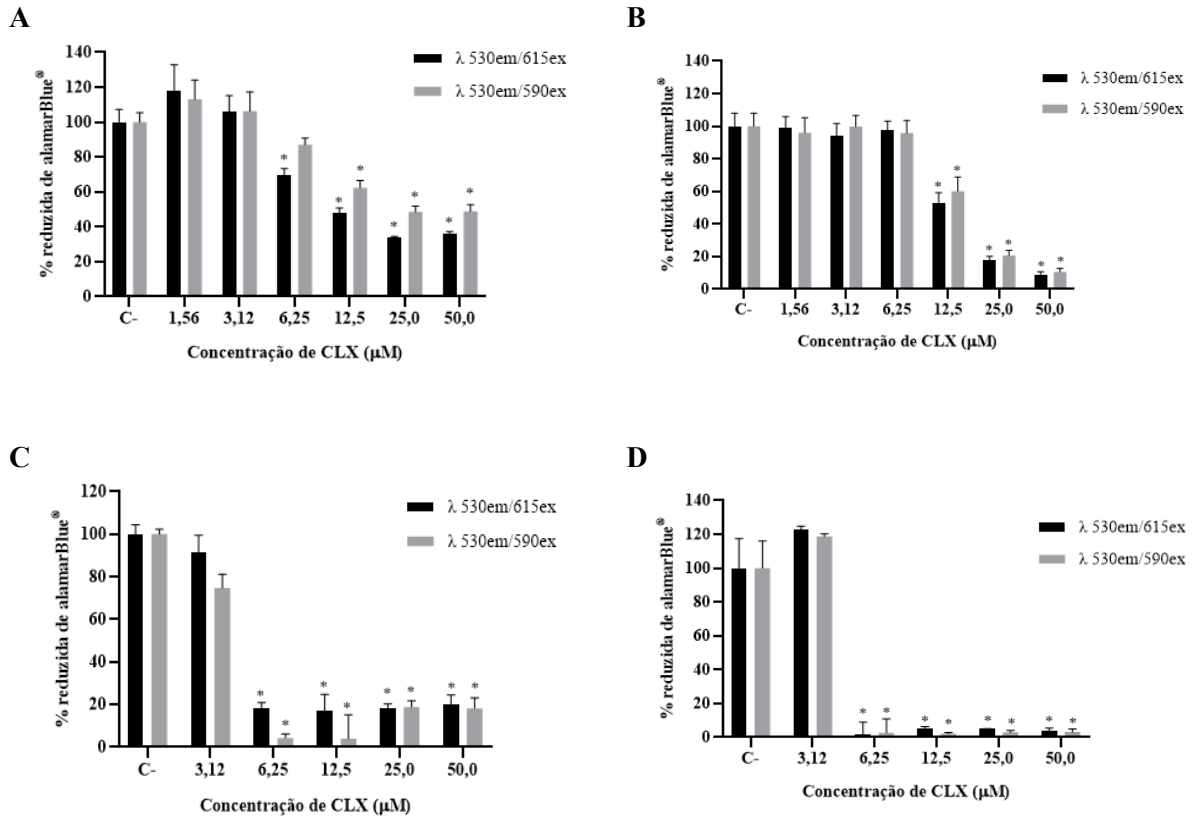
base nos resultados obtidos, optou-se por utilizar as densidades 8×10^5 trofozoítos/mL e 8×10^4 trofozoítos/mL nos ensaios subsequentes.

5.2.2 Susceptibilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* à clorexidina pelo ensaio de AlamarBlue®

Os trofozoítos foram avaliados em duas densidades diferentes, 8×10^5 trofozoítos/mL e 8×10^4 trofozoítos/mL frente a seis concentrações diferentes de clorexidina (50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,2 μ M, 3,1 μ M, 1,5 μ M), com período de incubação de 24 h e 48 h. A leitura da fluorescência foi realizada novamente em dois comprimentos de onda, 530 nm emissão e 615 nm de excitação – comprimento de onda utilizado na literatura para leitura de fluorescência em ensaios com AlamarBlue® e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. – e 530 nm emissão e 590 nm de excitação – comprimento de onda utilizado para demais células eucarióticas.

Os resultados obtidos são apresentados na figura 8, no qual observa-se a diminuição da densidade celular em decorrência do tratamento com concentrações altas de clorexidina. Os valores do número relativo (%) de trofozoítos viáveis pela redução de AlamarBlue® foram semelhantes para os dois comprimentos de onda avaliadas no ensaio.

Figura 8: Avaliação da viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* frente a clorexidina pelo ensaio de alamarBlue®



Ensaio de viabilidade da cepa ATCC 50492 em diferentes concentrações de clorexidina (50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,2 µM, 3,1 µM, 1,5 µM). A e B: Densidades de trofozoítos 8×10^5 trofozoítos/mL em 24 h e 48 h de incubação, respectivamente. C e D: Densidades de trofozoítos de 8×10^4 trofozoítos/mL em 24 h e 48 h de incubação, respectivamente C-: Controle negativo, trofozoítos em DMSO 0,1% PYG. *Valor de $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste Turkey). Fonte: Autora

Os ensaios realizados demonstram que as leituras realizadas com o comprimento de onda de 530 nm /590 nm, apresentaram valores de porcentagem maiores de redução do alamarBlue e maiores valores de desvio padrão quando comparadas aos resultados obtidos pela leitura no comprimento de 530 nm/615 nm, sendo assim, optou-se por realizar os experimentos seguindo o comprimento de onda de 530 nm/615 nm, como descrito na literatura para trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

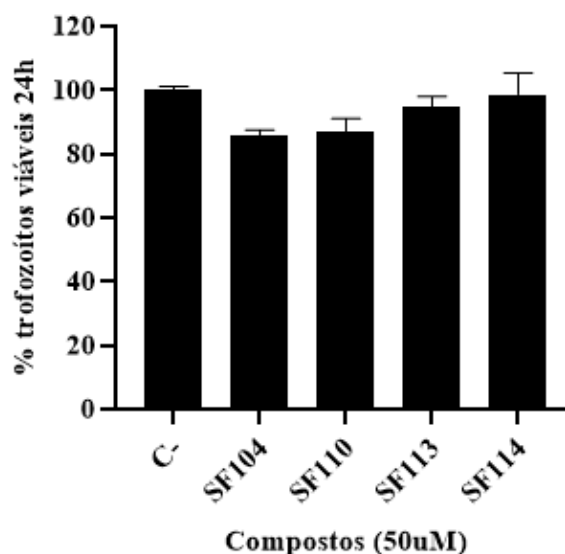
5.3 TRIAGEM DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTI-*Acanthamoeba* FRENTE A TROFOZOÍTOS

5.3.1 Derivados isoxazolil-sulfonamidas

As sulfonamidas estão entre os mais diversos fármacos utilizados para o tratamento de infecções causadas por *Acanthamoeba* spp., sendo relatado principalmente para o uso na EAG. A classe das sulfas são fármacos que possuem diferentes utilizações, sendo que, modificações na estrutura mostram sua versatilidade (PATRICK, 2017; KALRA et al., 2020). Neste contexto, o estudo recente de Rosa e colaboradores (2018) realizou a síntese de moléculas derivados do isaxolil-sulfonamidas, obtendo compostos com potencial tripanocidas e leishmanicidas.

No presente trabalho, quatro moléculas (tabela 1, pág. 37) derivadas do isoxazolil-sulfonamidas foram avaliadas frente trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. na concentração de 50 μ M após a incubação por 24 h. A figura 9 demonstra a porcentagem de viabilidade dos trofozoítos, no qual é possível observar baixa atividade das moléculas testadas, sendo que todas apresentaram viabilidades superiores a 80% e não houve diferença em relação ao controle negativo ($p>0,05$). A análise observacional dos trofozoítos também foi realizada em 6 h antes do fim do período de incubação e no momento da contagem, no qual foi possível observar trofozoítos com formas ameboides e presença de projeções citoplasmáticas (acantopódios), pouco vacuolizados e granuloso, características semelhantes encontradas no controle negativo.

Figura 9: Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* dos compostos derivados isaxolil-sulfonamidas



Ensaio de viabilidade de cepa ATCC 50492 após incubação por 24 h com 50 µM de derivados de sulfonamidas. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em PYG. Fonte: Autora

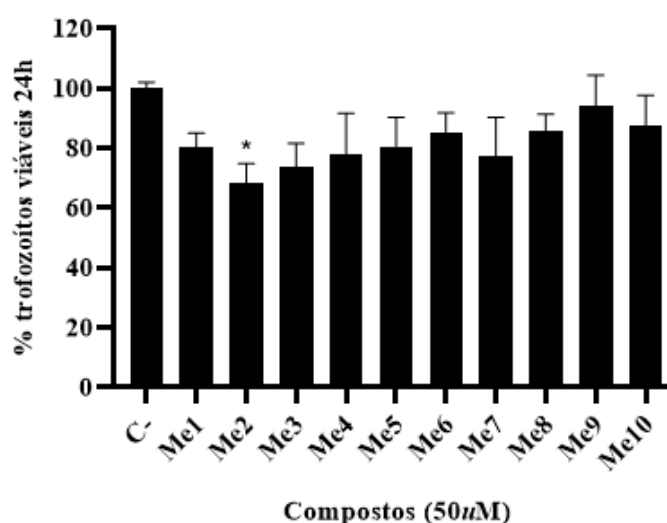
O mecanismo de ação das sulfonamidas nos microrganismos como bactérias, atua bloqueando sínteses que transformam o ácido para-aminobenzóico (PABA) em ácido fólico, inibindo a via de produção de bases nitrogenadas (purinas) que iriam originar os ácidos nucleicos, sendo assim são considerados bacteriostáticos, pois impedem a multiplicação dos microrganismos (RANG et al., 2016). Baseado neste conceito, uma das possibilidades para a baixa atividade observada dos compostos derivados de sulfonamidas testados nesse trabalho é o baixo período de incubação, uma vez que a taxa de geração da cepa estudada é de 27,4 horas. Para observar o efeito amebostático dos compostos em estudo, ensaios com maior tempo de incubação serão realizados futuramente. Mehlotra e Shukla (1993) foram os primeiros a avaliar sulfonamidas *in vitro* frente *Acanthamoeba* spp., no qual obtiveram CI50 variando entre 3,89 µM a 21,2 µM com um período de incubação de até 120 h. Já Nakaminami e colaboradores (2017) apenas obtiveram atividade anti-*Acanthamoeba* após 168 h (7 dias), com resultados de CI50 variando de 1,7 µM a 8,8 µM.

5.3.2 Derivados triazolicos do *O*-metil-olivetol

Inúmeras espécies de plantas da família Myrtaceae já foram descritas com atividade anti-*Acanthamoeba*, assim como alguns compostos extraídos de seus extratos (OLIVEIRA; DIAS; CÂMARA, 2005). Estudo de Casara (2019) descreveu o uso do *O*-metil-olivetol, um composto extraído de *Eugenia hiemalis*, com resultados promissores para a atividade anti-*Acanthamoeba*, sendo assim, no presente estudo, uma série de derivados do *O*-metil-olivetol com modificações moleculares foram avaliadas frente trofozoítos da cepa ATCC 50492 na concentração de 50 μ M.

Os resultados de viabilidade dos trofozoítos após 24 h de incubação são apresentados na figura 10, na qual é possível observar que não houve diminuição da viabilidade para a maioria dos compostos testados, exceto o composto Me2, que inibiu o crescimento de $31,5 \pm 3,6\%$ dos trofozoítos ($p \leq 0,05$).

Figura 10: Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* dos compostos semissintéticos derivados do *O*-metil-olivetol



Ensaio de viabilidade de cepa ATCC50492 após incubação por 24 h com 50 μ M de derivados do *O*-metil-olivetol. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em meio PYG. * Valor de $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste Turkey). Fonte: Autora

Considerando a enzima 14 α -desmetilase como possível alvo para as moléculas avaliadas neste trabalho é possível comparar as estruturas e deduzir a ação observada *in vitro*. Neste grupo de compostos, o derivado Me2 apresentou melhor atividade, a presença de uma

pentila ligados ao anel aromático, pode indicar melhor encaixe da molécula ao alvo, já que a enzima possui dois importantes sítios de ligação para interações hidrofóbicas. Quando observado o composto Me5, este também apresenta um ligante de carbonos, porém diferentemente do composto Me2, esse grupamento é volumoso e não linear, neste caso, obteve-se viabilidades de 82%. Já quando comparado o composto Me2 aos compostos Me1 e Me4, estes apresentam grupamentos menores, o que pode indicar que a molécula Me2 se encaixa a uma região hidrofóbica que pode estar relacionada a sua maior ação comparada aos demais compostos. Quando observada as moléculas Me3, Me7, Me8, Me9 e Me10, estas possuem grupamentos que permitiriam ligações de hidrogênio com o alvo, porém não se observa redução significativa da viabilidade quando comparada ao controle, indicando novamente que o alvo nos trofozoítos permitiria uma interação hidrofóbica com as moléculas.

O valor encontrado de redução de viabilidade para o composto Me2 ainda se mostra pequeno, já que quando comparado com os fármacos disponíveis para o uso contra *Acanthamoeba* spp. observa-se uma concentração amebicida inibitória mínima (CAIM; a menor concentração capaz de inibir 90-100 % dos trofozoítos) de 1 μ M a 25 μ M, e neste caso o composto Me2 a uma concentração de 50 μ M, inibiu o crescimento de aproximadamente 32% dos trofozoítos (CARRIJO-CARVALHO et al., 2017; TARAUAUD; LOISEAU; POMEL, 2017). O composto Me2 pode ser considerado uma molécula promissora, novas modificações na estrutura podem ser feitas com o objetivo de avaliar o alvo nos trofozoítos e potencializar a atividade, como também ampliar o tempo de avaliação do composto frente aos trofozoítos e ensaios de sinergismo com fármaco padrão ouro.

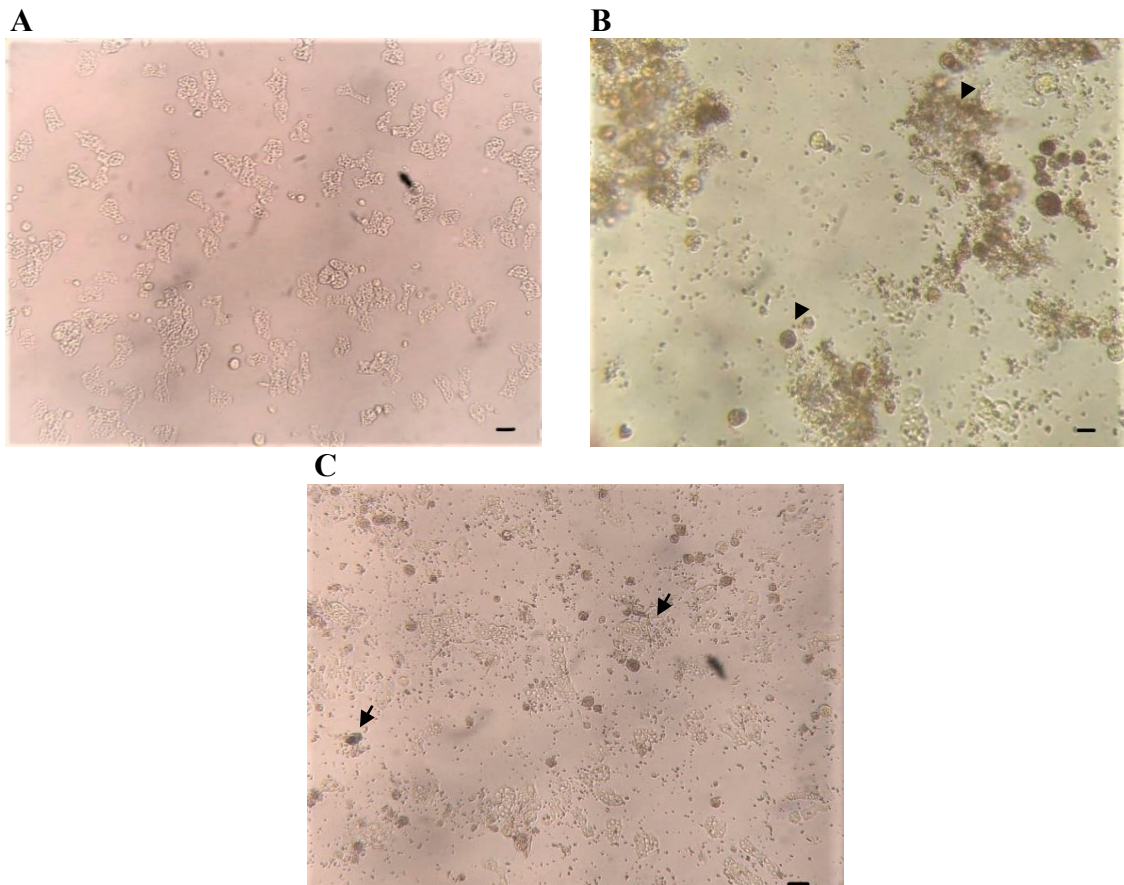
5.3.3 Compostos de coordenação

O uso de compostos de coordenação na busca de novos fármacos para infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. é uma abordagem recente. Neste trabalho foi realizada a avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* de sete compostos de coordenação, assim como os íons metálicos e ligantes que os compõem, totalizando 14 compostos testados, apresentados no quadro 1 da página 31.

O ensaio de triagem dos compostos de coordenação foi conduzido com concentrações de 100 μ M e 50 μ M, com período de incubação de 24 h e 48 h e como controle positivo foi utilizado clorexidina a 100 μ M. Foi realizada a análise observacional (figura 11) dos trofozoítos em contato com os compostos 6 h antes do final do período de incubação. Para os

compostos de coordenação foi possível observar trofozoítos arredondados, granulosos e hipervacuolizados. Com período de incubação de 24 h, observou-se a presença de debris celulares e lise celular em todos os poços, exceto no controle negativo e sais metálicos.

Figura 11. Efeito do composto de coordenação cobre(II) Cp12 na morfologia de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*.

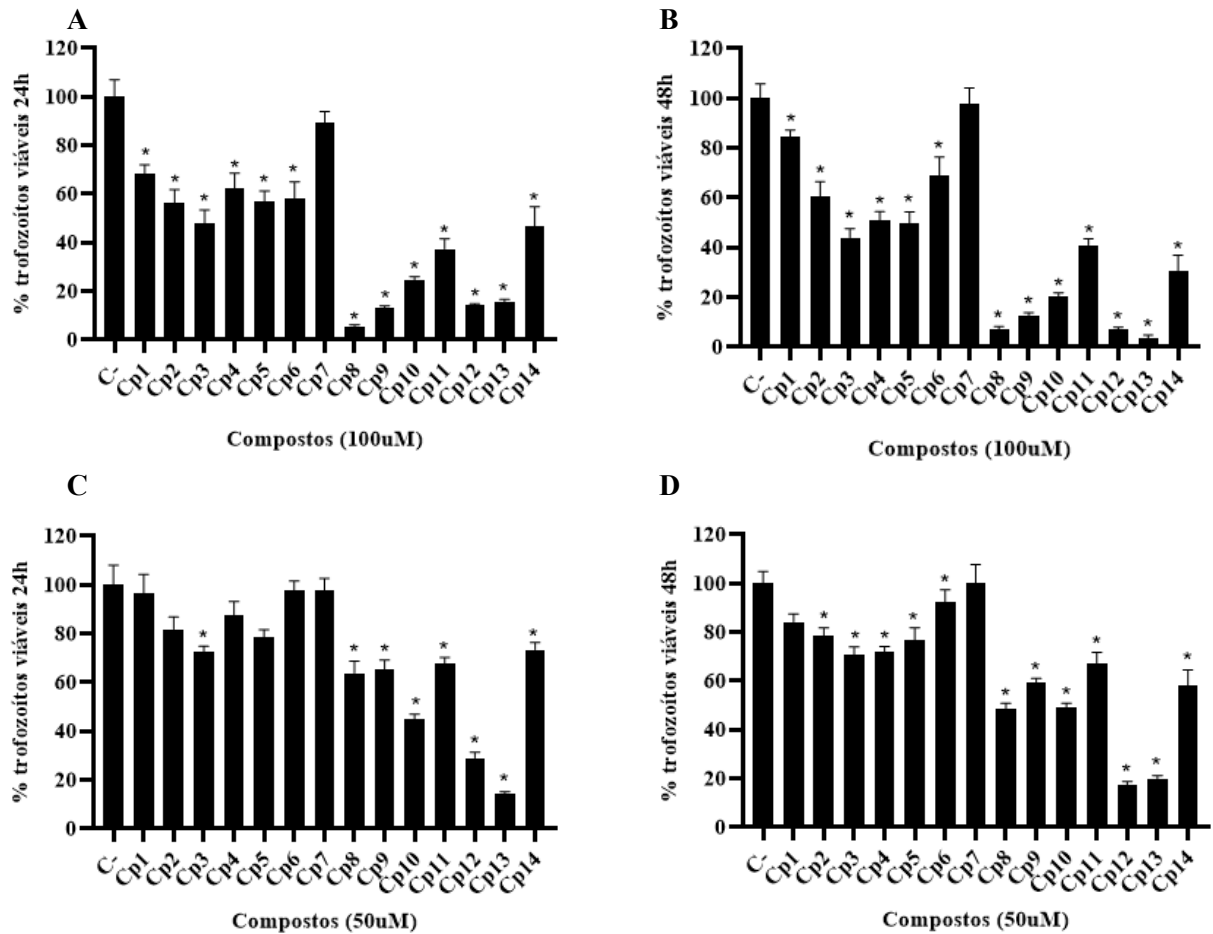


Controle negativo tratado com 0,1% de DMSO (A) composto de coordenação Cp12 a 100 μM (A) e 50 μM (B) após 24h de incubação. As setas indicam debris celulares e células arredondadas. Aumento de 20x; Barra 20 μm .

Fonte: Autora

Os resultados obtidos do ensaio de viabilidade estão apresentados na figura 12, na qual pode-se verificar que todos os compostos de coordenação apresentaram um efeito anti-*Acanthamoeba* maior quando comparados com os sais metálicos (Cp1 e Cp2) e seus ligantes (Cp3 – Cp7). O controle positivo, clorexidina a 200 μM promoveu 100% de morte dos trofozoítos (resultado não apresentado na figura).

Figura 12: Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* dos compostos de coordenação, sais metálicos e ligantes



Ensaio de viabilidade dos sais metálicos, ligantes e compostos de coordenação a uma concentração de 100 μM (A e B) e 50 μM (C e D) frente a cepa ATCC 50492 após incubação por 24 h e 48 h. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em PYG. * Valor de $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste Turkey). Fonte: Autora

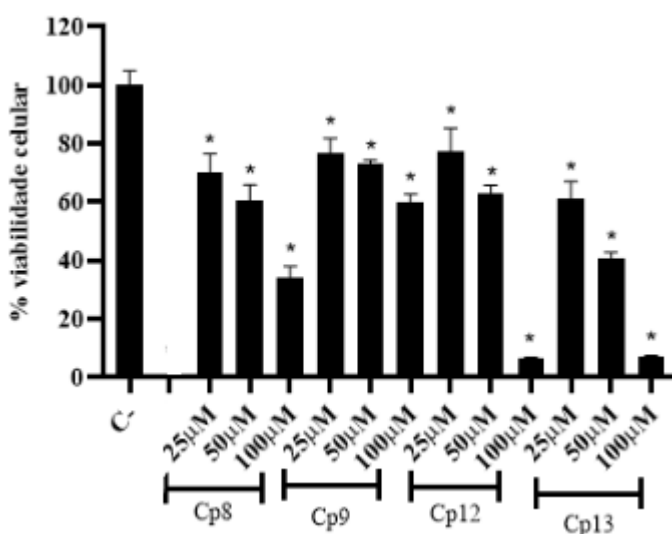
Dos compostos de coordenação avaliados, o complexo Cp8 e Cp9 contendo ferro(III) foram os que apresentaram maior efeito sobre os trofozoítos, com viabilidade de $5,29 \pm 0,92\%$ e $12,90 \pm 1,19\%$ respectivamente, em 24 h de exposição na concentração de 100 μM . Já para a exposição de 48 h a uma concentração de 100 μM , os compostos Cp8 e Cp9 apresentaram viabilidade de $7,28 \pm 1,02\%$ e $12,7 \pm 1,10\%$, respectivamente. Os compostos de coordenação

de cobre(II) Cp12 e Cp13, também apresentaram bons resultados na inibição dos trofozoítos, os quais demonstraram viabilidade de $14,3 \pm 0,57\%$ e $15,7 \pm 0,91\%$, respectivamente, com exposição por 24 h a $100 \mu\text{M}$. Já para a exposição de 48 h, na concentração de $100 \mu\text{M}$, os compostos Cp12 e Cp13 apresentaram viabilidade de $7,28 \pm 0,80\%$ e $3,49 \pm 1,32\%$, respectivamente. Nos testes com concentração de $50 \mu\text{M}$, observou-se viabilidades de $29,07 \pm 6,76\%$ e $14,29 \pm 2,86\%$ para os compostos Cp12 e Cp13, respectivamente, após 24 h de incubação. Já para a exposição por 48 h, obteve-se resultados de viabilidade dos trofozoítos de $17,44 \pm 3,87\%$ e $19,65 \pm 4,78\%$ para os compostos Cp12 e Cp13, respectivamente. Os compostos Cp8, Cp9, Cp12 e Cp13 foram selecionados para avaliação prévia da citotoxicidade.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE FERRO(III) E COBRE(II) FRENTE CÉLULAS SIRC

Foi realizado um ensaio de preliminar para avaliação da citotoxicidade dos compostos de coordenação que se mostraram mais ativos contra *A. castellanii*, sendo esses Cp8 e Cp9 compostos de coordenação de ferro(III), e Cp12 e Cp13 compostos de coordenação de cobre(II). As concentrações avaliadas foram de $100 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ e $25 \mu\text{M}$, período de incubação de 24 h. Os resultados obtidos são apresentados na figura 13.

Figura 13: Avaliação da citotoxicidade dos compostos de coordenação de cobre(II) e ferro(III)



Ensaio de citotoxicidade utilizando os compostos de coordenação Cp8; Cp9; Cp12 e Cp13 frente células SIRC após incubação de 24 h. C-: Controle de viabilidade DMSO 0,1%; * Valor de $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste Turkey). Fonte: Autora

Os resultados demonstram que a viabilidade celular variou conforme as concentrações dos compostos avaliados, quanto maior a concentração do composto, maior o dano às células SIRC. Os compostos de coordenação de ferro(III) (Cp8 e Cp9) foram menos citotóxicos nas maiores concentrações testadas quando comparados aos compostos de coordenação de cobre(II) (Cp12 e Cp13). O composto Cp8 apresentou viabilidade celular de $34,4 \pm 3,51\%$, $60,5 \pm 5,33\%$ e $70,3 \pm 6,25\%$ para as concentrações de 100 μM , 50 μM e 25 μM , respectivamente. Já o composto Cp9 apresentou resultados de viabilidade de $59,7 \pm 2,94\%$, $73,1 \pm 1,36\%$ e $76,5 \pm 5,3\%$ para as concentrações de 100 μM , 50 μM e 25 μM , respectivamente. Quando avaliado os compostos de coordenação de cobre(II), os resultados encontrados foram de $6,75 \pm 0,21\%$, $63,2 \pm 2,58\%$ e $77,53 \pm 7,69\%$ para o composto Cp12 nas concentrações de 100 μM , 50 μM e 25 μM , respectivamente. Já para o composto Cp13, os resultados encontrados foram de $7,14 \pm 0,36$, $40,9 \pm 1,81$ e $61,2 \pm 5,82$ para as concentrações de 100 μM , 50 μM e 25 μM , respectivamente. O controle de viabilidade, DMSO 0,1% apresentou resultados acima de 95% ($p > 0,05$) (resultado não apresentado na figura).

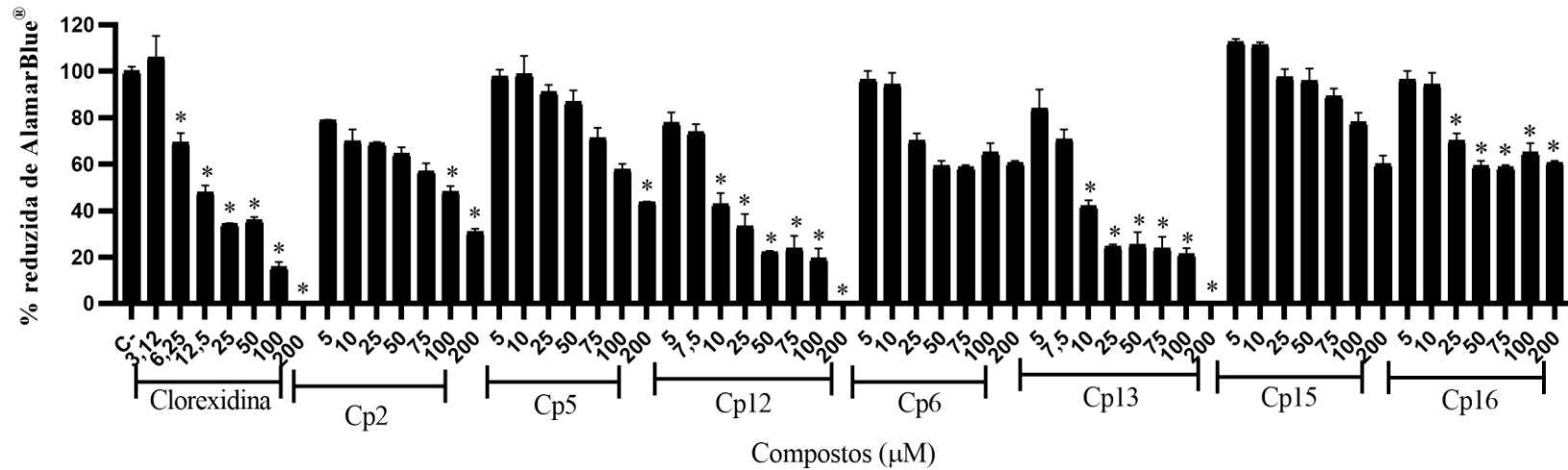
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) (CP12 E CP13) FRENTE A TROFOZOÍTOS

De acordo com os resultados apresentados no item 5.3 e 5.4, os compostos de coordenação de cobre(II) Cp12 e Cp13 foram selecionados para avaliar a sua atividade frente trofozoítos em faixa de concentração ampliada, pois apresentaram resultados de redução da viabilidade dos trofozoítos maiores que os compostos de coordenação de ferro(III) (Cp8 e Cp9), quando a concentração dos compostos foi reduzida (50 μM), além de apresentarem resultados satisfatórios para o ensaio de citotoxicidade.

O ensaio foi conduzido com concentrações de 200, 100, 75, 50, 25, 10, 7,5 e 5 μM dos compostos de coordenação, ligantes e sal metálico e as concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 μM de clorexidina frente a trofozoítos com período de incubação de 24 h. Para este ensaio também foi adicionado o análogo (Cp16) e ligante (Cp15) da estrutura dos compostos Cp12 e Cp13, o qual não possui em sua molécula o ligante naftol, afim de avaliar a

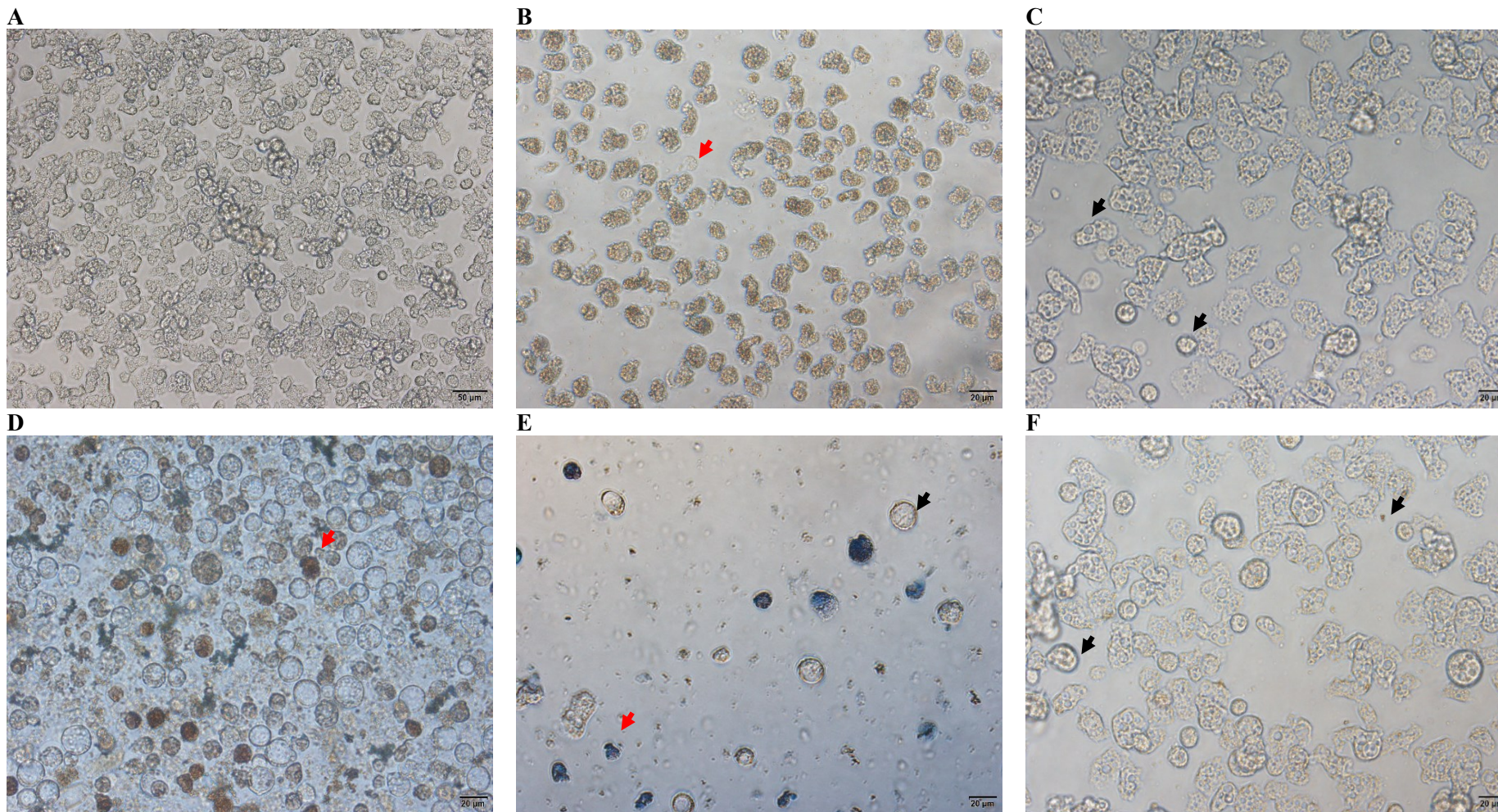
importância do grupamento para a ação dos composto. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,1%. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 14.

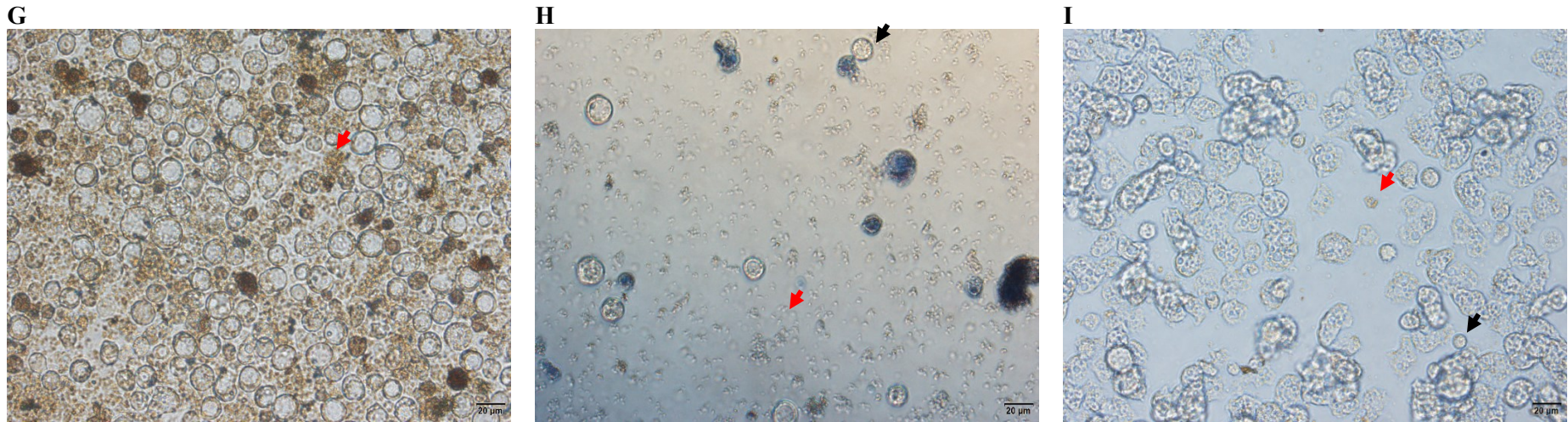
Figura 14: Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* dos compostos de coordenação de cobre(II), sal metálico, ligantes e clorexidina frente a trofozoítos



Ensaio de viabilidade do sal metálico, ligantes, compostos de coordenação de cobre e clorexidina frente a cepa ATCC 50492 após incubação por 24 h. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em PYG. Cp2: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Cp5: ligante α -HBPA; Cp12: Cu- α -naftol-HBPA; Cp6: ligante β -HBPA; Cp13: Cu- β -naftol-HBPA; Cp15: ligante HBPA; Cp16: Cu-HBPA * Valor de $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste Turkey). Fonte: Autora

Figura 15: Efeito do composto de coordenação cobre(II) na morfologia de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*.





G Controle negativo tratado com 0,1% de DMSO; (A) 200 μM de clorexidina (B); CI50 clorexidina (C); 200 μM de Cp12 (D); alíquota do tratamento de 200 μM de Cp12 corado com tripan 0,4% (E); CI50 de Cp12 (F); 200 μM de Cp13 (G); alíquota do tratamento de 200 μM do Cp13 corado com tripan 0,4% (H); CI50 de Cp12 (I) após 24h de incubação. Setas vermelhas: debris celulares e bactérias. Setas pretas: trofozoítos arredondados, hipervacuolizados. Aumento de 400x. Fonte: Autora

Quando comparada a concentração do composto com seu ligante individualmente, obteve-se diferença na redução da viabilidade dos trofozoítos, demonstrando que os compostos de coordenação de cobre(II) foram mais ativos que seus ligantes e sal metálico. Já quando realizada a mesma comparação com a clorexidina não foi possível observar diferença ($p > 0,05$) entre as concentrações, podendo indicar que os compostos de coordenação possuem atividade semelhante à clorexidina. Também foi possível observar que os compostos foram dose-dependentes, ou seja, quanto maior a concentração do composto, maior o efeito amebicida frente aos trofozoítos. A avaliação observacional apresentada na figura 15 demonstrou trofozoítos arredondados, hipervacuolizados e inúmeros debris celulares.

A clorexidina é uma biguanida catiônica com atividades antimicrobianas de amplo espectro que geralmente é usada como antisséptico, desinfetante ou conservante. O mecanismo de ação está relacionado a característica da molécula, por ser carregada positivamente, se liga a membrana celular carregada negativamente e aumenta a permeabilidade resultando em danos, lise celular, extravasamento do conteúdo citoplasmático e morte celular (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; CARRIJO-CARVALHO et al., 2017). A clorexidina é utilizada como fármaco de primeira escolha para o tratamento de CA em monoterapia ou em combinação com diamidinas. Também é encontrada em algumas formulações de soluções multipropósitos para limpeza e desinfecção de lentes de contato (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; CARRIJO-CARVALHO et al., 2017).

As células apresentaram características morfológicas semelhantes quando comparadas ao tratamento apenas com clorexidina, sendo assim os compostos de coordenação de cobre(II) podem agir da mesma forma que a clorexidina, ou seja, na membrana dos trofozoítos e cistos.

A ampliação da faixa de concentração dos compostos permitiu determinar o valor CAIM e CI50 para cada composto de coordenação. O resultado de CAIM para os compostos e clorexidina foi de 200 μM . Quanto aos valores de CI50, obteve-se resultados de $9,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$ para Cp12; $8,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$ para Cp13, $29,9 \pm 3,5 \mu\text{M}$ para Cp16 e $10,0 \pm 1,14 \mu\text{M}$ para clorexidina.

Os compostos de coordenação utilizados neste trabalho frente *A. castellanii* foram sintetizados e descritos a primeira vez por Lopes e colaboradores (2012). Fernandes e

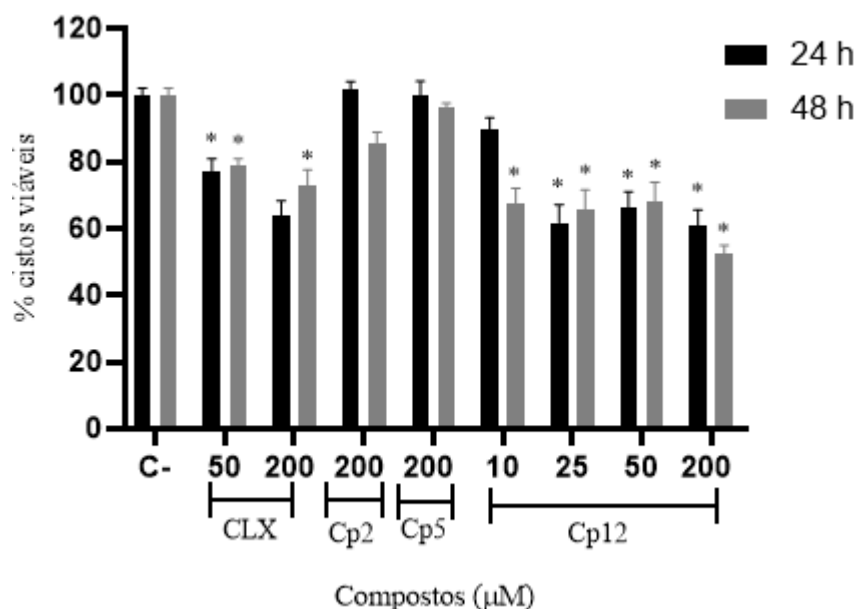
colaboradores (2015) e Borges e colaboradores (2016) avaliaram os compostos de coordenação de cobre(II) frente linhagens celulares de leucemia. Já Portes e colaboradores (2017) avaliaram o efeito frente *T. gondii*. Os compostos de coordenação de cobre(II) mostraram resultados promissores contra as linhagens celulares de leucemia, no qual apresentaram CI50 melhores que a cisplatina, medicamentos de escolha para o tratamento de leucemias. Os autores também evidenciaram o mecanismo de indução da morte celular por apoptose e comprometimento da cadeia respiratória das células (FERNANDES et al., 2015). Já na avaliação da atividade frente *T. gondii*, os compostos apresentaram resultados de CI50 de 0,78 e 3,57 μM para o composto Cp12 e Cp13, respectivamente. Quando comparado esses resultados a ensaios *in vitro*, utilizando a sulfadiazina, tratamento de escolha para toxoplasmose, observou-se que a CI50 obtida para os compostos de coordenação é aproximadamente 6 vezes menor que o tratamento de escolha (PORTES et al., 2017).

Os compostos Cp12 e Cp13 possuem o grupo naftol em sua molécula, diferentemente do composto Cp16 e apresentaram melhores resultados, com valores de CI50 três vezes menores que Cp16, mostrando a importância do grupamento naftol para ação do composto. Esse resultado corrobora com o apresentado por Lopes e colaboradores (2012), os quais também demonstram a melhor atividade dos compostos de coordenação de cobre(II) contendo o grupamento naftol, para as células de linhagem celular de leucemia.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CISTICIDA DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12

A atividade cisticida dos compostos selecionados foi avaliada utilizando cistos de *A. castellanii* (ATCC 50492), os quais foram expostos a concentrações de 200, 50, 25 e 10 μM dos compostos Cp12, nas concentrações de 200 e 50 μM de clorexidina e a concentração de 200 μM do íon metálico e ligante, durante 24 e 48 h. As viabilidades obtidas estão apresentadas na figura 16. Foi possível observar o efeito cisticida do composto de coordenação de cobre(II), quando comparado ao seu respectivo ligante e ao sal metálico, os quais permaneceram com viabilidades superiores a 99% para 24 h e superiores a 85% para 48 h, mostrando que a complexação do ligante com o cobre foi eficiente para potencializar a atividade biológica, sendo o composto 1,8 vezes mais eficiente que o ligante.

Figura 16: Avaliação da atividade cisticida dos compostos de coordenação de cobre(II), sal metálico, ligantes e clorexidina frente a cistos



Ensaio de viabilidade do sal metálico, ligantes, composto de coordenação de cobre(II) e clorexidina frente a cepa ATCC 50492 após incubação por 24 e 48 h. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em Tris-HCl. CLX: clorexidina. Cp2: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Cp5: ligante α -HBPA; Cp12: Cu - α -naftol-HBPA. * Valor de $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste Turkey). Fonte: Autora

Neste ensaio, foi possível observar a viabilidade dos cistos frente ao complexo de cobre(II) Cp12, a qual foi de $61,07 \pm 4,49\%$ e $52,4 \pm 2,53\%$ em 24 e 48 h de incubação, respectivamente, para a concentração de 200 μM . A clorexidina demonstrou viabilidade dos cistos de $63,7 \pm 4,51\%$ e $72,71 \pm 4,78\%$ em 24 e 48 h de incubação, respectivamente para a mesma concentração. Houve diferença quanto ao efeito cisticida ($p < 0,05$) do composto de coordenação de cobre(II) (CP12) quando comparada a clorexidina em 48 h de incubação, no qual Cp12 mostrou efeito cisticida mais eficaz que a clorexidina na concentração de 200 μM .

A atividade cisticida não foi dose dependente para as concentrações de 25, 50 e 200 μM , somente observou-se diferença ($p < 0,05$) para a concentração de 10 μM do composto de coordenação de cobre(II) (Cp12). Esse resultado mostra-se interessante, pois a concentração

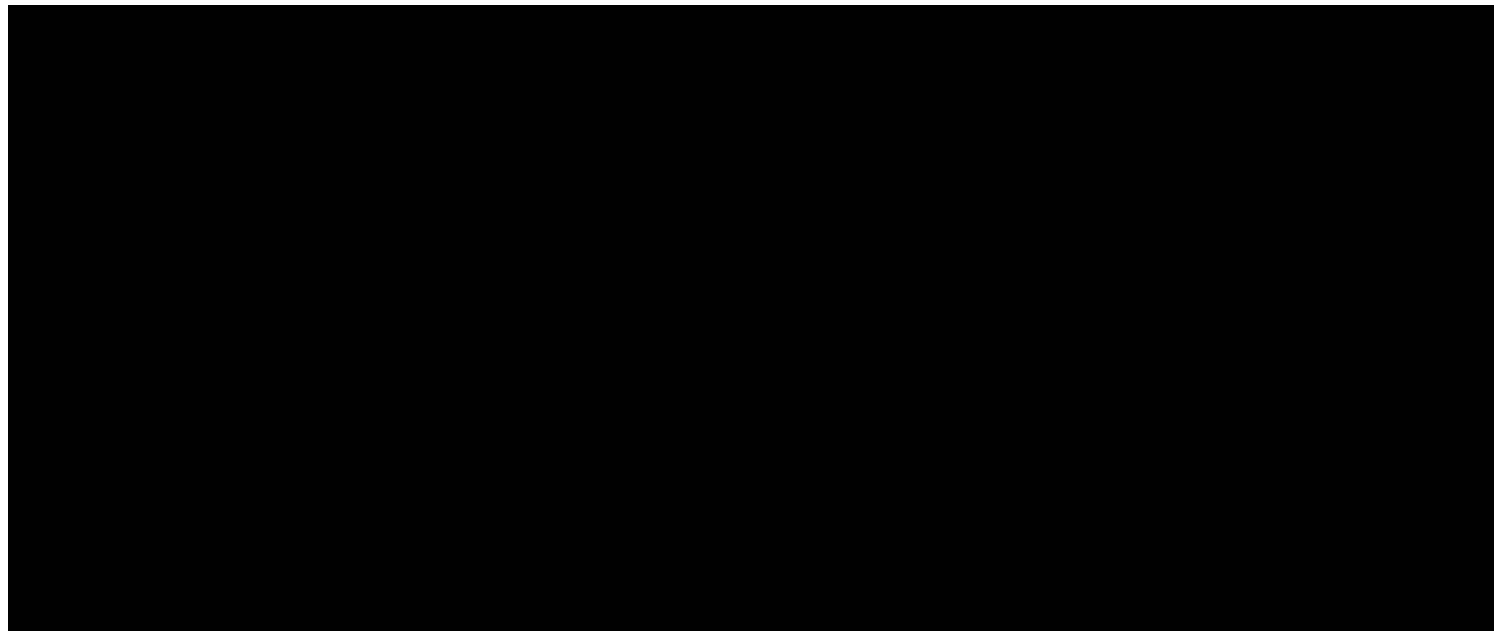
de 25 μM é bem tolerada por células de córnea com viabilidade acima de 80% (figura 13, pág. 58).

A ação da molécula sobre os cistos é muito importante quando nas infecções causadas por *Acanthamoeba* spp., já que os cistos são considerados a forma de resistência deste protozoário. Além da dupla parede altamente resistente, também se sabe que os cistos são muito imunogênicos e induzem a uma resposta inflamatória importante no processo fisiopatológico (MCCLELLAN et al., 2002). O processo de encistamento do trofozoíto na córnea ou no sistema nervoso central dificulta muitas vezes o tratamento, pois a maioria dos fármacos utilizados no tratamento das infecções acantamebianas possuem baixa atividade para os cistos (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; KRÓL-TURMIŃSKA; OLENDER, 2017).

5.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) FRENTE A CÉLULAS DE CórNEA

O ensaio de avaliação da citotoxicidade foi conduzido com linhagem de córnea de coelho frente aos compostos de coordenação de cobre(II) selecionados (Cp12, Cp13 e Cp15), seus respectivos ligantes (Cp5, Cp6 e Cp16), sal de cobre (Cp2) e clorexidina. As concentrações avaliadas foram de 200, 100, 75, 50, 25 e 10 μM com exposição de 24 h. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 17.

Figura 17: Avaliação da citotoxicidade dos compostos de coordenação de cobre(II), ligantes, sal metálico e clorexidina



Ensaio de citotoxicidade utilizando compostos de coordenação de cobre(II), ligantes, sal metálico e clorexidina frente a ATCC CCL-60 após incubação por 24 h. C-: Controle negativo, DMSO 0,1%. Cp2: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Cp5: ligante α -HBPA; Cp12: Cu- α -naftol-HBPA; Cp6: ligante β -HBPA; Cp13: Cu- β -naftol-HBPA; Cp15: ligante HBPA; Cp16: Cu-HBPA * Valor de $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste Turkey). Fonte: Autora

Os resultados demonstram que a viabilidade celular variou conforme as concentrações dos compostos avaliados para os compostos contendo naftol em sua molécula, ou seja, quanto maior a concentração do composto, maior o dano às células SIRC. Os compostos foram mais citotóxicos que seus ligantes exceto o composto Cp16, o qual não apresentou citotoxicidade às células SIRC, juntamente com seu ligante. Sendo assim, a atividade frente às formas de *A. castellanii* e a citotoxicidade desses compostos está relacionada à inserção do grupamento naftol na molécula. Ao observar os resultados de citotoxicidade mais próximos da CI50 dos compostos selecionados e da clorexidina, a concentração de 10 µM obteve-se viabilidades de $130,5 \pm 8,77$, $85,8 \pm 8,27$, $79,4 \pm 2,87\%$ para Cp12, Cp13 e clorexidina, respectivamente.

Este ensaio ainda permitiu realizar o cálculo de CC50 dos compostos e juntamente com o valor de CI50, pode-se calcular o IS que estão apresentados na tabela 3. Os resultados de CC50 foram de $62,0 \pm 3,5$ µM para Cp12, $36,5 \pm 2,6$ µM para Cp13 e $53,2 \pm 3,6$ µM para Clorexidina.

Tabela 3: Valores de CI50, CC50 e IS para os compostos de coordenação de cobre(II) e clorexidina

Compostos	CI*	CC*	IS**
Cp12	$9,4 \pm 1,9$ µM	$62,0 \pm 3,5$ µM	6,6
Cp13	$8,3 \pm 1,1$ µM	$36,5 \pm 2,6$ µM	4,4
Clorexidina	$10,0 \pm 1,14$ µM	$53,2 \pm 3,6$ µM	5,32

* Resultados expressos em média \pm EP; ** Razão entre CI50 dos trofozoítos/CC50 das células SIRC

O índice de seletividade (IS) permite avaliar a seletividade do composto entre as células da córnea e os trofozoítos. Segundo, Nava-Zuazo e colaboradores (2010) compostos com $IS \leq 10$, são considerados altamente citotóxicos e de baixa seletividade ao protozoário, sendo assim, a eficácia biológica é devida à citotoxicidade apresentada *in vitro*. Os resultados obtidos demonstram IS de 6,6 para o composto Cp12 e 5,32 para clorexidina, ou seja, o composto foi 6,6 vezes mais seletivo aos trofozoítos do que as células da córnea. Sendo

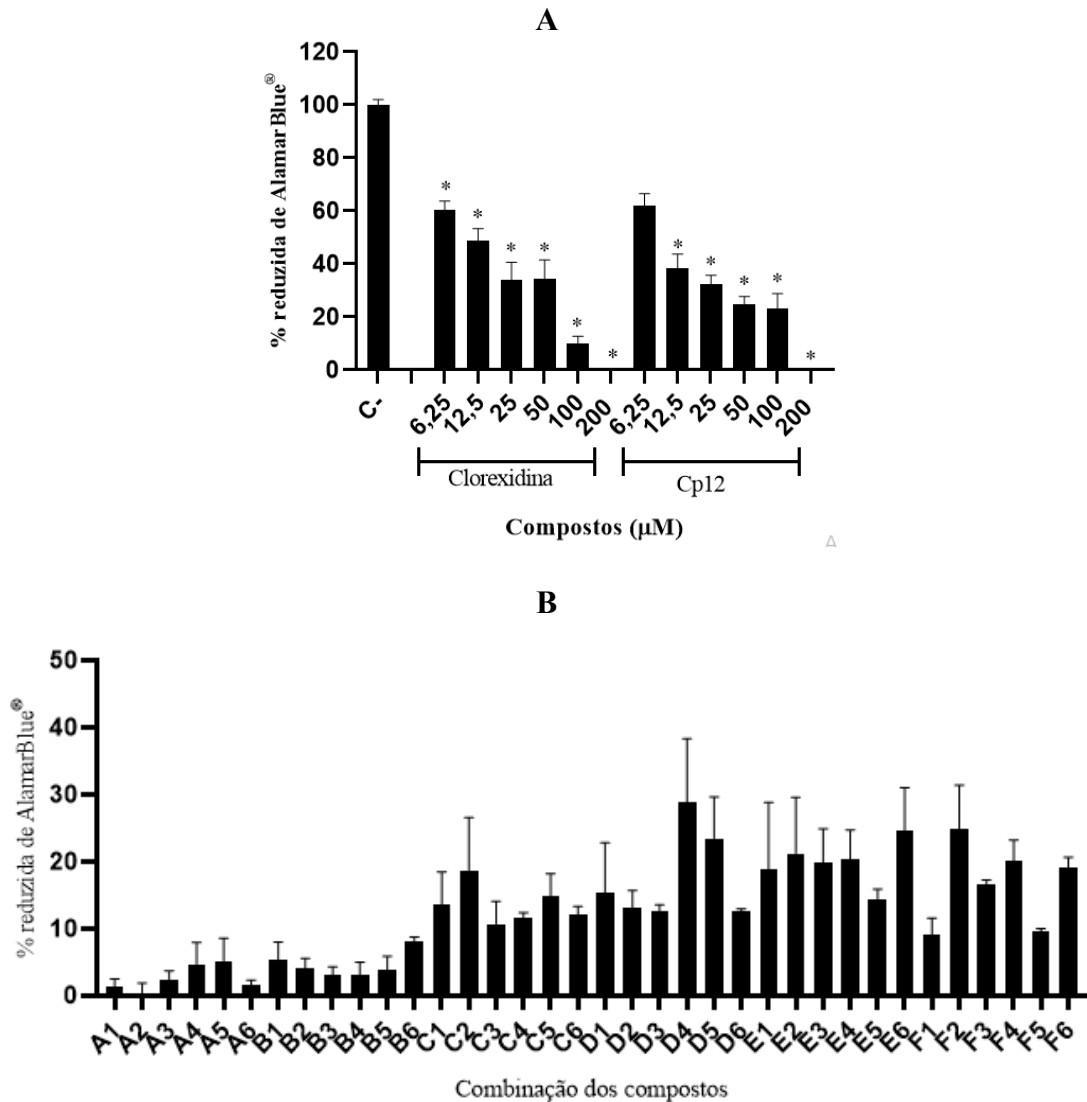
assim, mesmo o composto apresentando $IS < 10$, ele apresenta resultado superior ao apresentado pelo tratamento de primeira escolha para CA.

5.8 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO DE COBRE(II) CP12 E CLOREXIDINA

O uso de ensaios de associação de fármacos é muito utilizado para avaliar a interação sinérgica ou antagônica de dois ou mais compostos frente a diferentes microrganismos, como bactérias, fungos e protozoários. Dentre as metodologias utilizadas, o tabuleiro de damas (*checkerboard*) permite avaliar essas interações realizando múltiplas diluições dos compostos desejados em placas de microtitulação (ODDS et al., 2003; MITSUWAN *et al.*, 2021).

A avaliação da associação dos compostos selecionados foi conduzida utilizando 7 concentrações diferentes para cada composto, realizando diluições seriadas a partir do seu resultado de CAIM, obtendo-se assim 49 diferentes combinações. Os resultados obtidos do ensaio de associação estão apresentados na figura 18 e tabela 4.

Figura 18: Avaliação da associação do composto de coordenação de cobre(II) e clorexidina



Ensaio de viabilidade do composto de coordenação de cobre(II) e clorexidina frente a cepa ATCC 50492 após incubação por 24 h. A: viabilidade dos compostos isolados nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µM. B: viabilidade da associação de Cp12 e clorexidina. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em PYG. * Valor de $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste Turkey). Fonte: Autora

Tabela 4: Concentração amebicida inibitória mínima e índice de concentração inibitória fracionada da associação entre clorexidina e Cp12 contra *Acanthamoeba castellanii*

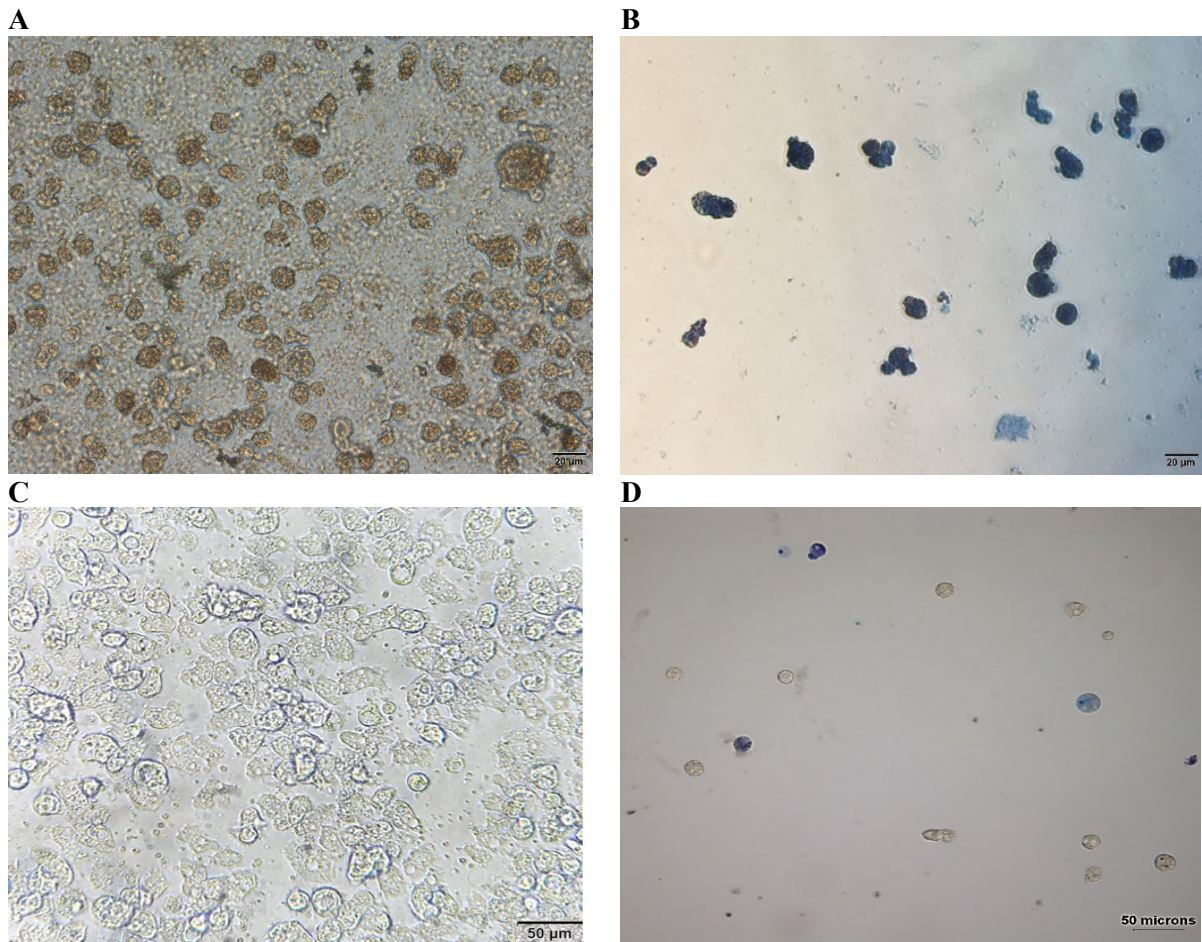
CAIM (µM)		ICIF		Relação
Clorexidina	Cp12	Clorexidina (F5)	CP12 (F5)	
200	200	12,5	6,25	
				0,09375 Sinergismo

Fonte: Autora

Apesar do potencial amebicida da clorexidina, o uso isolado na clínica para o tratamento da CA apresenta efeitos adversos devido ao uso por tempo prolongado e casos de recidiva devido à resistência do protozoário a este medicamento. Atualmente a clorexidina já vem sendo utilizada em combinação com diamidinas, azóis, polienos, entre outros, a fim de ampliar a ação frente as formas de vida do protozoário e reduzir os efeitos adversos (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; LACERDA et al., 2020).

Para todas as combinações avaliadas no presente estudo, obteve-se redução da viabilidade dos trofozoítos ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo e concentrações isoladas. A combinação F5 foi a que apresentou menores concentrações dos compostos, 6,25 μM de Cp12 + 12,5 μM de clorexidina, e maiores efeitos amebicidas, o qual obteve-se resultados de viabilidade $9,55 \pm 0,47\%$ de trofozoítos viáveis. A análise observacional das combinações demonstrou debris celulares e trofozoítos hipervacuolizados, granuloso, arredondado, caracterizando o estresse celular (figura 19).

Figura 19: Efeito da associação de clorexidina e composto Cp12 na morfologia de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*



Associação B2 (100 μ M de clorexidina + 100 μ M de Cp12) (A); Aliquota da associação B2 (100 μ M de clorexidina + 100 μ M de Cp12) Corado com tripan 0,4% (B); Associação F5 (12,5 μ M de clorexidina + 6,25 μ M de Cp12) (C); Aliquota da associação F5 (12,5 μ M de clorexidina + 6,25 μ M de Cp12) Corado com tripan 0,4% (D). Aumento de 400x. Fonte: Autora

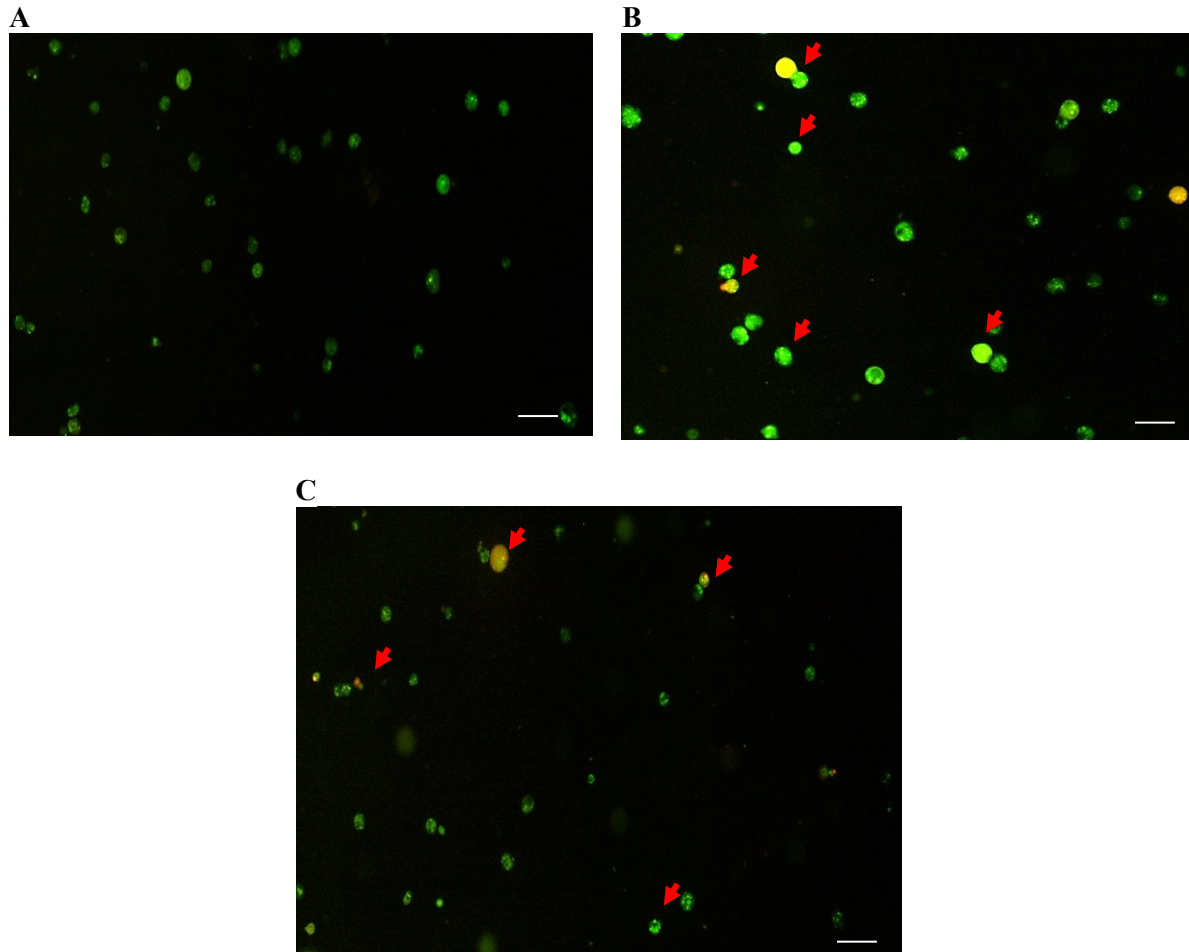
As interações sinérgicas entre compostos apresentam benefícios importantes, como no trabalho de Heredero-Bermejo e colaboradores (2016), que demonstrou sinergia entre a associação de clorexidina e dendrímeros. Já Sangkanu e colaboradores (2021) evidenciaram sinergia entre a clorexidina com dendrímeros e extratos de *Garcinia mangostana*. Ambos os trabalhos observaram uma redução expressiva da concentração dos dois compostos utilizados na associação.

5.9 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA

Neste ensaio foi realizada a avaliação da integridade da membrana de trofozoítos utilizando a dupla marcação de laranja de acridina e brometo de etídio. A cepa ATCC 50492 foi exposta a CI50 do composto Cp12 durante 24 h. Após este período, as células foram observadas por microscopia de fluorescência.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 20, o qual é possível observar no controle negativo os trofozoítos marcados totalmente em verde, mostrando células integras sem perda na permeabilidade da membrana, já para os trofozoítos tratados com a CI50 do composto Cp12, observa-se células marcadas em verde, condensação de cromatina e células com a dupla coloração podendo indicar um processo de apoptose.

Figura 20: Microscopia de fluorescência para avaliação de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* tratados com compostos de coordenação de cobre(II) CP12 marcados laranja de acridina e brometo de etídeo



Ensaio de avaliação da permeabilidade da membrana de trofozoítos, utilizando cepa ATCC 50492 exposta a CI50 do composto Cp12 por 24 h. Controle negativo, DMSO 0,1% (A); Trofozoítos tratados com CI50 de Cp12 (B e C). Setas vermelhas: células com dupla coloração e cromatina condensada, apoptose tardia. Barra 20 μ m. Aumento de 400x.

As observações realizadas demonstram que os trofozoítos morreram por apoptose. Os resultados obtidos corroboram com Fernandes e colaboradores (2015) que também avaliaram a ação do composto Cp12 frente a células de linhagens de leucemia, o qual também evidenciaram a morte por apoptose. Novos ensaios devem ser realizados a fim de consolidar o mecanismo de morte celular e mecanismo de ação envolvido dos compostos de coordenação de cobre(II) frente as formas de *Acanthamoeba* spp.

6 CONCLUSÃO

- O método de alamarBlue[®] foi otimizado para avaliação da viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* (ATCC 50492) e foram otimizadas as condições de densidade celular de 8×10^5 trofozoítos/mL, tempo para adição do alamarBlue[®] de 8 h antes do término da incubação durante o tratamento dos trofozoítos e leitura de fluorescência em comprimento de onda de 530 nm/615 nm.
- Durante a triagem dos derivados isoxazolil-sulfonamidas não foi possível observar atividade antiamebiana nas condições avaliadas. A triagem dos derivados do *O*-metil-olivetol, demonstrou o composto Me2 com atividade antiamebiana, o qual reduziu $31,5 \pm 3,6\%$ a viabilidade dos trofozoítos nas condições avaliadas. Os compostos de coordenação avaliados apresentaram atividades anti-*Acanthamoeba* relevantes reduzindo aproximadamente 80% da viabilidade dos trofozoitos, sendo mais ativos que seus ligantes isolados e sais metálicos.
- Dentre os compostos de coordenação avaliados, foram selecionados dois compostos de coordenação de cobre(II), Cp12 e Cp13, os quais apresentaram atividade dose-dependente, com CI50 inferiores a 10 μ M, demonstrando atividade semelhante a clorexidina.
- Os compostos de coordenação Cp12 demonstrou perfil de citotoxicidade inferior a clorexidina, o qual apresentou seletividade aos trofozoítos 6,6 vezes maior que as células de córnea de coelho.
- O composto de coordenação Cp12 apresentou melhor ação cisticida na concentração de 200 μ M no tempo de 48 h de incubação quando comparado a clorexidina.
- No ensaio de associação de moléculas (*checkerboard*), a combinação F5 (6,25 μ M de Cp12 + 12,5 μ M de clorexidina) foi a menor concentração de combinação encontrada capaz de reduzir 90% da viabilidade de trofozoítos, determinando uma associação sinérgica entre os compostos e redução da concentração utilizada.
- A avaliação do tipo de morte celular pela marcação de LA/BE demonstrou células em apoptose inicial quando tratadas com o composto Cp12.
- A atividade biológica de compostos de coordenação de cobre(II) e ferro(III) frente a formas de *A. castellanii* é inédita, descrita pela primeira vez quanto ao potencial antiamebiano. O composto de coordenação de cobre(II) Cp12 demonstrou ação

promissora anti-*Acanthamoeba*,, com potencial aplicação para o tratamento de infecções acantamebianas e uso em soluções multipropósito para lentes de contato.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliação da integridade das membranas de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. por microscopia eletrônica – análise ultraestrutural;
- Avaliar a citotoxicidade da combinação sinérgica entre o composto de coordenação de cobre (II) Cp12 e clorexidina;
- Avaliação da atividade dos compostos utilizando isolados regionais;
- Avaliação da citotoxicidade dos compostos em cultura tridimensional de córnea;
- Avaliar a atividade dos compostos de coordenação de cobre(II) encapsulados a nanopartículas;
- Avaliar alvos moleculares e mecanismo de ação dos compostos de coordenação;
- Avaliação de atividade antiamebiana e citotoxicidade do composto CP12 *in vivo* utilizando o modelo de infecção de CA.

REFERÊNCIAS

- ALBOUCHI, Ferdaous; SIFAOU, Ines; REYES-BATLLE, Maria; LÓPEZ-ARENCEBIA, Atteneri; PIÑERO, José E.; LORENZO-MORALES, Jacob; ABDERRABBA, Manef. Chemical composition and anti- *Acanthamoeba* activity of Melaleuca styphelioides essential oil. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 183, p. 104-108, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.014>.
- ALVES, Daniella de Sousa Mendes Moreira et al. The first *Acanthamoeba* keratitis case in the Midwest region of Brazil: diagnosis, genotyping of the parasite and disease outcome. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 716-719, out. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0010-2018>.
- ANWAR, Ayaz *et al.* Repurposing of Drugs Is a Viable Approach to Develop Therapeutic Strategies against Central Nervous System Related Pathogenic Amoebae. **Acs Chemical Neuroscience**, [S.L.], v. 11, n. 16, p. 2378-2384, 19 fev. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00613>.
- ANWAR, Ayaz; NUMAN, Arshid; SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHALID, Mohammad; KHAN, Naveed Ahmed. Cobalt nanoparticles as novel nanotherapeutics against *Acanthamoeba castellanii*. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1-10, 3 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3528-2>.
- AQEEL, Yousuf; SIDDIQUI, Ruqaiyyah; ANWAR, Ayaz; SHAH, Muhammad Raza; KHAN, Naveed Ahmed. Gold Nanoparticle Conjugation Enhances the Antiacanthamoebic Effects of Chlorhexidine. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n. 3, p. 1283-1288, 14 dez. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01123-15>.
- BEHERA, Himanshu Sekhar; SATPATHY, Gita; TRIPATHI, Manjari. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/ meningoencephalitis (AME) patients in India. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-6, 9 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1729-5>.
- BORGES, Layla J.H. *et al.* In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 123, p. 128-140, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.018>.
- BUCHELE, Maria Luiza Carneiro et al. Contact lens-related polymicrobial keratitis: acanthamoeba spp. genotype t4 and candida albicans. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 117, n. 11, p. 3431-3436, 10 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-018-6037-x>.
- BUNSUWANSAKUL, Chooseel et. al. *Acanthamoeba* in Southeast Asia – Overview and Challenges. **The Korean Journal Of Parasitology**, [s.l.], v. 57, n. 4, p. 341-357, 31 ago. 2019. Korean Society for Parasitology. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2019.57.4.341>.

CARIELLO, Angelino Julio; PASSOS, Renato Magalhães; YU, Maria Cecilia Zorat; HOFLING-LIMA, Ana Luisa. Microbial keratitis at a referral center in Brazil. **International Ophthalmology**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 197-204, 30 mar. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10792-011-9441>.

CARNT, Nicole A.; SUBEDI, Dinesh; CONNOR, Sophie; KILVINGTON, Simon. The relationship between environmental sources and the susceptibility of *Acanthamoeba* keratitis in the United Kingdom. **Plos One**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.1-11, 11 mar. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229681>.

CARRIJO-CARVALHO, Linda Christian; SANT'ANA, Viviane Peracini; FORONDA, Annette Silva; FREITAS, Denise de; CARVALHO, Fabio Ramos de Souza. Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus. **Survey Of Ophthalmology**, [s.l.], v. 62, n. 2, p. 203-218, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.survophthal.2016.10.009>.

CARVALHO, F R S; FORONDA, A S; MANNIS, M J; HÖFLING-LIMA, A L; BELFORT, R; FREITAS, Denise de. Twenty Years of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, [s.l.], v. 28, n. 5, p. 516-519, jun. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0b013e318193e0fe>.

CASARA, Fabiana. **INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL AMEBICIDA DO EXTRATO BRUTO E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Eugenia hiemalis* FRENTE A *Acanthamoeba* spp.** 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

CASTELLANII, A., An amoeba found in cultures of a yeast Preliminary note-Third note-An amoeba growing in cultures of a yeast Second note-Fourth note. **Journal Of Tropical Medicine London**, [s.l.], v. 160, n. 33, p.1-5, nov. 1930.

CAUMO, Karin; ROTT, Marilise B.. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 117, n. 3, p.233-235, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.12.008>.

CHOMICZ, Lidia et. al. Emerging Threats for Human Health in Poland: pathogenic isolates from drug resistant *Acanthamoeba* keratitis monitored in terms of their in vitro dynamics and temperature adaptability.: Pathogenic Isolates from Drug Resistant *Acanthamoeba* Keratitis Monitored in terms of Their In Vitro Dynamics and Temperature Adaptability. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2015, p. 1-8, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/231285>.

CLARKE, Daniel W. *et al.* The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 175-180, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.004>.

DAAS, L. et al. Das Deutsche Akanthamöbenkeratitis-Register. **Der Ophthalmologe**, [S.L.], v. 112, n. 9, p. 752-763, 3 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00347-014-3225-7>.

DIEHL, Maria Luisa Nunes et al. Genotype distribution of *Acanthamoeba* in keratitis: a systematic review. *Parasitology Research*, [S.L.], p. 1-12, 5 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-021-07261-1>.

DUDLEY, Ricky; JARROLL, Edward L.; KHAN, Naveed Ahmed. Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. *Experimental Parasitology*, [s.l.], v. 122, n. 4, p.338-343, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.04.009>.

DUGGA, Shalini Dewan; RONGPHARPI, Sharon Rainy; DUGGA, Ashish Kumar; KUMAR, Avinash; BISWA, Indu. Role of *Acanthamoeba* in Granulomatous Encephalitis: A Review. *Journal Of Infectious Diseases & Immune Therapies*, India, v. 1, n. 1, p. 1-12, 20 dez. 2017.

ELDIN, Hayam Mohamed Ezz; SARHAN, Rania Mohamed. Cytotoxic effect of organic solvents and surfactant agents on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Parasitology Research*, [s.l.], v. 113, n. 5, p. 1949-1953, 18 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-3845-5>.

FEARS, Alyssa C. et al. Comparative in vitro effectiveness of a novel contact lens multipurpose solution on *Acanthamoeba castellanii*. *Journal Of Ophthalmic Inflammation And Infection*, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-12, 24 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12348-018-0161-8>.

FERNANDES, Christiane et. al. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by new copper(II) complexes containing naphthyl groups via interaction with death receptors. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, [s.l.], v. 153, p. 68-87, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.09.014>.

FRANÇA, Rodolfo Rodrigo F. *et al.* Potent Inhibitors of the Enzyme Sterol 14 α -demethylase Against *Trypanosoma cruzi*. *Revista Virtual de Química*, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 1-12, 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140096>.

FURRER, Pascal; MAYER, Joachim M; GURNY, Robert. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, [s.l.], v. 53, n. 3, p. 263-280, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411\(01\)00246-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411(01)00246-6).

GALVAO, Joana et. Al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The Faseb Journal*, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 10 dez. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-235440>.

GARAJOVÁ, Mária; MRVA, Martin; VALKOVICOVÁ, Naděžda; MARTINKA, Michal; MELICHEROVÁ, Janka; VALIGUROVÁ, Andrea. Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-21, 14 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-41084-6>. Catarina, Florianópolis, 2018.

GOMES, Thiago dos Santos; MAGNET, Angela; IZQUIERDO, Fernando; VACCARO, Lucianna; REDONDO, Fernando; BUENO, Sara; SÁNCHEZ, Maria Luisa; ANGULO,

Santiago; FENOY, Soledad; HURTADO, Carolina. *Acanthamoeba* spp. in Contact Lenses from Healthy Individuals from Madrid, Spain. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.1-15, 22 abr. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0154246>

HADAŚ, Edward; DERDA, Monika; CHOLEWIŃSKI, Marcin. Evaluation of the effectiveness of tea tree oil in treatment of *Acanthamoeba* infection. **Parasitology Research**, [s.l.], v. 116, n. 3, p. 997-1001, 26 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-017-5377-2>.

HASSAN, Azza; FAROUK, Hanan; HASSANEIN, Faika; ABDUL-GHANI, Rashad; ABDELHADY, Ahmed H.. *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, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2012.06.001>.

HE, Bin *et al.* Cellular and nuclear degradation during apoptosis. **Current Opinion In Cell Biology**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 900-912, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.008>.

HEREDERO-BERMEJO, I. *et al.* In vitro anti-*Acanthamoeba* synergistic effect of chlorhexidine and cationic carbosilane dendrimers against both trophozoite and cyst forms. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 509, n. 1-2, p. 1-7, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.075>

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Dolores *et al.* Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 197, p. 29-35, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2019.01.006>.

INVITROGEN, Thermo Fisher Scientif -. **PRODUCT INFORMATION SHEET:** alamarblue cell viability reagent. alamarBlue™ Cell Viability Reagent. 2020. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1025#/DAL1025>. Acesso em 01 de junho de 2020

ITS: Retrieved [august, 27, 2021], from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database, www.itis.gov, CC0 <https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>

JAIN, Pranjali; SARAVANAN, Chinnadurai; SINGH, Sushil Kumar. Sulphonamides: deserving class as mmp inhibitors?. : Deserving class as MMP inhibitors?. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 60, p. 89-100, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.016>.

JHA, Bijay Kumar *et al.* Tigecycline inhibits proliferation of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, [s.l.], v. 114, n. 3, p. 1189-1195, 7 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4302-1>.

KALRA, Sonali *et al.* *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 208, p. 1-11, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107788>.

KHAN, Naveed Ahmed. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health.: biology and increasing importance in human health. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 30, n. 4, p. 564-595, jul. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>.

KOT, Karolina; ŁANOCHA-ARENDARCZYK, Natalia A.; KOSIK-BOGACK, Danuta I.. Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. **Annals Of Parasitology**, Polonia, v. 4, n. 64, p. 299-308, abr. 2018.

KROEMER, G *et al.* Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 1463-1467, 25 out. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>

KRÓL-TURMIŃSKA, Katarzyna; OLENDER, Alina. Human infections caused by free-living amoebae. **Annals Of Agricultural And Environmental Medicine**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.254-260, 11 maio 2017. Institute of Rural Health. <http://dx.doi.org/10.5604/12321966.1233568>.

KUSRINI, Eny; HASHIM, Fatimah; AZMI, Wan Nor Nadhirah Wan Noor; AMIN, Nakisah Mat; ESTUNINGTYAS, Ari. A novel anti-amoebic agent against *Acanthamoeba* spp. — A causative agent for eye keratitis infection. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 153, p. 714-721, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.021>.

KUSRINI, Eny; HASHIM, Fatimah; GUNAWAN, Cindy; MANN, Riti; AZMI, Wan Nor Nadhirah Wan Noor; AMIN, Nakisah Mat. Anti-amoebic activity of acyclic and cyclic-samarium complexes on *Acanthamoeba*. **Parasitology Research**, [s.l.], v. 117, n. 5, p. 1409-1417, 12 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-018-5814-x>.

LACERDA, Ana Gomes *et al.* *Acanthamoeba* keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. **Ophthalmic And Physiological Optics**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 116-135, 29 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/opo.1275>

LAWRANCE, Geoffrey A. **Introduction to Coordination Chemistry**. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2010. 290 p.

LEAL, Diego Averaldo Guiguet; SOUZA, Doris Sobral Marques; CAUMO, Karin Silva; FONGARO, Gislaine; PANATIERI, Lua Ferreira; DURIGAN, Maurício; ROTT, Marilise Brittes; BARARDI, Célia Regina Monte; FRANCO, Regina Maura Bueno. Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. **Water Research**, [s.l.], v. 137, p.273-280, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.024>.

LIST, Wolfgang *et al.* Evaluation of *Acanthamoeba* keratitis cases in a tertiary medical care centre over 21 years. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-12, 13 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-80222-3>.

LOPES, Bruna Figueredo *et al.* **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antineoplásica de compostos orgânicos e de coordenação de cobre: influência do naftol e da cumarina na atividade biológica.** 2012. 235 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012

LORENZO-MORALES, Jacob; KHAN, Naveed A.; WALOCHNIK, Julia. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. : diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, [s.l.], v. 22, p. 10-30, 2015. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2015010>.

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, 1 abr. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.16.2.273-307.2003>.

MAYCOCK, Nicholas J. R.; JAYASWAL, Rakesh. Update on *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 713-720, maio 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0000000000000804>.

MCBRIDE, J.; INGRAM, P. R.; HENRIQUEZ, F. L.; ROBERTS, C. W.. Development of Colorimetric Microtiter Plate Assay for Assessment of Antimicrobials against *Acanthamoeba*. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 2, p. 629-634, 1 fev. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.43.2.629-634.2005>.

MCCLELLAN, Kathy *et al.* Adaptive Immune Responses to *Acanthamoeba* Cysts. **Experimental Eye Research**, [S.L.], v. 75, n. 3, p. 285-293, set. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/exer.2002.2015>.

MEHLOTRA, Rajeev K.; SHUKLA, Onkar P.. In Vitro Susceptibility of *Acanthamoeba Culbertsoni* to Inhibitors of Folate Biosynthesis. **The Journal Of Eukaryotic Microbiology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p. 14-17, jan. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04875.x>

MITSUWAN, Watcharapong *et al.* Potential anti-*Acanthamoeba* and anti-adhesion activities of *Annona muricata* and *Combretum trifoliatum* extracts and their synergistic effects in combination with chlorhexidine against *Acanthamoeba triangularis* trophozoites and cysts. **Heliyon**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 1-12, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06976>

MOON, Eun-Kyung *et al.* Polyhexamethylene biguanide and chloroquine induce programmed cell death in *Acanthamoeba castellanii*. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 191, p. 31-35, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2018.06.002>.

MORCELLI, Samila R.; KANASHIRO, Milton M.; CANDELA, Dalber R.s.; ALZAMORA, M.; HORN, Adolfo; FERNANDES, Christiane. Synthesis, characterization and antitumoral activity of new di-iron(III) complexes containing naphthyl groups: effect of the isomerism on the biological activity. : Effect of the isomerism on the biological activity. **Inorganic Chemistry Communications**, [s.l.], v. 67, p. 22-24, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.inoche.2016.02.016>.

NACARSO, Immacolata; SABIA, Carla; NIEDERHÄUSERN, Simona de; ISEPPI, Ramona; CONDÒ, Carla; BONDI, Moreno; MESSI, Patrizia. In vitro evaluation of the amoebicidal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and cloves (*Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry) essential oils against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 606-611, 8 nov. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1399390>.

NAKAMINAMI, Hidemasa et al. Evaluation of In Vitro Antiamoebic Activity of Antimicrobial Agents Against Clinical *Acanthamoeba* Isolates. **Journal Of Ocular Pharmacology And Therapeutics**, [s.l.], v. 33, n. 8, p. 629-634, out. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jop.2017.0033>.

NAVA-ZUAZO, Carlos *et al.* Design, synthesis, and in vitro antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethyl}ureas. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 17, p. 6398-6403, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.008>

NEELAM, Sudha; NIEDERKORN, Jerry Y.. Pathobiology and Immunobiology of *Acanthamoeba* Keratitis: Insights from Animal Models. **Yale Journal Of Biology And Medicine**, Texas, v. 90, n. 23, p. 261-268, jun. 2017.

NIYYATI, Maryam; DODANGEH, Samira; LORENZO-MORALES, Jacob. A Review of the Current Research Trends in the Application of Medicinal Plants as a Source for Novel Therapeutic Agents Against *Acanthamoeba* Infections. **Iranian Journal Of Pharmaceutical Research**, Irã, v. 4, n. 15, p. 893-900, jan. 2016.

NOSÉ, Walton; SATO, Elcio Hideo; FREITAS, Denise de; RIBEIRO, Moacyr P; FORONDA, Annette S; KWITTKO, Sérgio; BELFORT JÚNIOR, Rubens; BUNIER JÚNIOR, Miguel; FONT, Ramon. Ulcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos de Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [s.i.], v. 6, n. 51, p. 223-226, out. 1988.

ODDS, F. C. *et al.* Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 1-1, 12 jun. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg301>.

OECD (2018), Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD Series on Testing and Assessment, No. 286, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>.

OLIVEIRA, R.n. de; DIAS, I.j.m.; CÂMARA, C.a.g.. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 39-43, mar. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2005000100009>.

PADZIK, Marcin; HENDIGER, Edyta B.; CHOMICZ, Lidia; GRODZIK, Marta; SZMIDT, Maciej; GROBELNY, Jarosław; LORENZO-MORALES, Jacob. Tannic acid-modified silver nanoparticles as a novel therapeutic agent against *Acanthamoeba*. **Parasitology Research**,

[s.l.], v. 117, n. 11, p. 3519-3525, 15 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-018-6049-6>.

PAPA, Vincenzo *et al.* *Acanthamoeba* keratitis therapy: time to cure and visual outcome analysis for different antiamebic therapies in 227 cases. **British Journal Of Ophthalmology**, [S.L.], v. 104, n. 4, p. 575-581, 10 ago. 2019. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-314485>.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 6th ed. Oxford (UK) : Oxford University Press, 2017.

PORTES, J. A.; SOUZA, T. G.; SANTOS, T. A. T. dos; SILVA, L. L. R. da; RIBEIRO, T. P.; PEREIRA, M. D.; HORN, A.; FERNANDES, C.; DAMATTA, R. A.; SOUZA, W. de. Reduction of *Toxoplasma gondii* Development Due to Inhibition of Parasite Antioxidant Enzymes by a Dinuclear Iron(III) Compound. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 59, n. 12, p. 7374-7386, 21 set. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00057-15>.

PORTES, J.a.; MOTTA, C.s.; AZEREDO, N.f.; FERNANDES, C.; HORN, A.; SOUZA, W. de; DAMATTA, R.a.; SEABRA, S.h.. In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper(II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 245, p. 141-152, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.002>.

PUSHPAKOM, Sudeep *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 41-58, 12 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.

PUTAPORNTIP, Chaturong *et al.* Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. nov. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-12, 27 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-96690-0>.

RANG, Harry Potter *et al.* **Dale & Rang Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REDDY, Rajesh; VIJAYASARADHI, Mudumba; UPPIN, Megha S.; CHALLA, Sundaram; JABEEN, Afshan; BORGHAIN, Rupam. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in an immunocompetent patient: an autopsy case report. : An autopsy case report. **Neuropathology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 183-187, 17 mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1789.2010.01151.x>.

RICE, Christopher A. *et al.* Discovery of repurposing drug candidates for the treatment of diseases caused by pathogenic free-living amoebae. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 1-12, 24 set. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008353>.

ROSA, Rafael da; ZIMMERMANN, Lara Almida; MORAES, Milene Höehr de; SCHNEIDER, Naira Fernanda Zanchett; SCHAPPO, Alice Duarte; SIMÕES, Claudia Maria de Oliveira; STEINDEL, Mario; SCHENKEL, Eloir Paulo; BERNARDES, Lílian Sibelle

Campos. Synthesis and biological evaluation of isoxazolyl-sulfonamides: a non-cytotoxic scaffold active against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* and herpes simplex virus. : A non-cytotoxic scaffold active against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* and Herpes Simplex Virus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 28, n. 20, p. 3381-3384, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.08.040>.

SAMBA-LOUAKA, Ascel; DELAFONT, Vincent; RODIER, Marie-hélène; CATEAU, Estelle; HÉCHARD, Yann. Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.415-434, 2 maio 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuz011>

SANGKANU, Suthinee et al. Anti-Acanthamoeba synergistic effect of chlorhexidine and *Garcinia mangostana* extract or α -mangostin against *Acanthamoeba triangularis* trophozoite and cyst forms. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-12, 13 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-87381-x>.

SANGKANU, Suthinee et al. Anti-Acanthamoeba synergistic effect of chlorhexidine and *Garcinia mangostana* extract or α -mangostin against *Acanthamoeba triangularis* trophozoite and cyst forms. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-12, 13 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-87381-x>.

SANTOS, Denise Leal dos et al. *Acanthamoeba* keratitis in Porto Alegre (southern Brazil): 28 cases and risk factors. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 117, n. 3, p. 747-750, 14 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-017-5745-y>.

SEAL, D. V.; HAY, J.; The microbiologist as a contact lens wearer. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 1-2, 1 jul. 1993. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-39-1-1>.

SHARMA, Geetansh *et al.* Nanoparticles based therapeutic efficacy against *Acanthamoeba*: updates and future prospect. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 218, p. 108008, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108008>.

SHING, Brian *et al.* The Antifungal Drug Isavuconazole Is both Amebicidal and Cysticidal against *Acanthamoeba castellanii*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 64, n. 5, p. 1-12, 21 abr. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02223-19>.

SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-13, 10 jan. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-6>.

SIFAOU, Ines et al. Evaluation of the anti- *Acanthamoeba* activity of two commercial eye drops commonly used to lower eye pressure. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 183, p. 117-123, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.07.012>.

SIFAOU, Ines *et al.* In vitro evaluation of commercial foam Belcils® on *Acanthamoeba* spp. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S.L.], v. 14, p. 136-143, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.10.002>

SIRIPURAPU, Govinda et al. Successful management of post-COVID-19 acanthamoebic encephalitis. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 110, p. 226-228, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2021.07.046>.

SOUHAIEL, Najet et al. Ammoides pusilla (Apiaceae) essential oil: activity against acanthamoeba castellanii neff. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 183, p. 99-103, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.011>.

SZENTMÁRY, Nóra; DAAS, Loay; SHI, Lei; LAURIK, Kornelia Lenke; LEPPER, Sabine; MILIOTI, Georgia; SEITZ, Berthold. *Acanthamoeba* keratitis – Clinical signs, differential diagnosis and treatment. **Journal Of Current Ophthalmology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 16-23, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joco.2018.09.008>.

TARVAUD, Alexandre; LOISEAU, Philippe M.; POMEL, Sébastien. In vitro evaluation of antimicrobial agents on *Acanthamoeba* spp. and evidence of a natural resilience to amphotericin B. **International Journal For Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 328-336, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.09.002>.

THE MEDICAL LETTER. **AMEBIC MENINGOENCEPHALITIS, primary and granulomatous**. 2020. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/resources/Amebic_Meningoencephalitis.pdf. Acesso em: 13 abr. 2020.

TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A.. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, [s.l.], v. 60, n. 6, p. 399-405, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>.

TUREL, Iztok. Special Issue: practical applications of metal complexes. : Practical Applications of Metal Complexes. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 5, p. 7951-7956, 30 abr. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20057951>.

VERMES, I. *et al.* Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 243, n. 1-2, p. 167-190, set. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00233-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00233-7).

WOPEREIS, Débora Borgert. **CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. E MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS AMEBAS OBTIDOS DE APARELHOS DE AR CONDICIONADO DE AMBIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DE FLORIANÓPOLIS, SC**. 2018. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa

ZHOU, Wenxu *et al.* Functional importance for developmental regulation of sterol biosynthesis in *Acanthamoeba castellanii*. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1863, n. 10, p. 1164-1178, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.004>.

ZOUAGHI, Ghaya et al. The effect of viroid infection of citrus trees on the amoebicidal activity of ‘Maltese half-blood’ (*Citrus sinensis*) against trophozoite stage of *Acanthamoeba*

castellanii Neff. *Experimental Parasitology*, [S.L.], v. 183, p. 182-186, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.006>.