

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da atividade amebicida de nanoemulsões contendo extrato hexânico de *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) frente à *Acanthamoeba* sp.

Lua Ferreira Panatieri

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da atividade amebicida de nanoemulsões contendo extrato hexânico de *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) frente à *Acanthamoeba* sp.

Dissertação apresentada por Lua Ferreira Panatieri para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Coorientador: Dr. Giovanni Konat Zorzi

Porto Alegre, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 31 de março de 2015, pela banca examinadora constituída por:

Prof^a. Dra. Angela Machado de Campos

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dra. Letícia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Tiana Tasca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ferreira Panatieri, Lua
Avaliação da atividade amebicida de nanoemulsões
contendo extrato hexânico de *Pterocaulon balansae*
(Asteraceae) frente à *Acanthamoeba* sp. / Lua Ferreira
Panatieri. -- 2015.
85 f.

Orientador: Helder Ferreira Teixeira.
Coorientador: Giovanni Konat Zorzi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. nanoemulsões. 2. *Acanthamoeba*. 3. *Pterocaulon*
balansae. 4. cumarinas. 5. ceratite ocular. I.
Ferreira Teixeira, Helder, orient. II. Konat Zorzi,
Giovanni, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio grande do Sul (UFRGS), onde foram realizados os ensaios biológicos deste trabalho.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) da Faculdade de Farmácia da UFRGS onde foram realizadas a produção e análise das formulações.

Ao Professor e Doutor Helder Ferreira Teixeira pela orientação deste trabalho de mestrado no LDG, à Professora e Doutora Marilise Brittes Rott pela colaboração, pelo laboratório de Parasitologia, e a ambos, pela idealização e realização deste estudo envolvendo a Nanotecnologia com a Parasitologia.

À Professora e Doutora Gilsane Lino von Poser pela colaboração nas análises farmacognósticas.

Ao apoio dos colegas da Parasitologia e do LDG.

Ao apoio e colaboração daqueles que contribuíram significativamente para a realização prática deste trabalho: Doutor Giovanni Konat Zorzi (coorientador) e Nathalya Tesch Brazil (iniciação científica).

RESUMO

O tratamento da ceratite por *Acanthamoeba* é longo, inespecífico e de baixa adesão do paciente. Assim, a busca por novas estratégias de tratamento é necessária. Extratos não aquosos de algumas espécies de *Pterocaulon* exibem efeito antimicótico e antiparasitário, sendo esta atividade correntemente relacionada à presença de cumarinas. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo o desenvolvimento de nanoemulsões contendo extrato hexânico de *Pterocaulon balansae* Chodat (rico em cumarinas) visando à obtenção de um produto de uso ocular com atividade amebicida. Em uma primeira etapa, o extrato hexânico foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, detectando-se a presença de quatro cumarinas majoritárias, entre elas, a 5-metoxi-6,7-metileno dioxicumarina (5MMDC), selecionada como marcador químico do extrato vegetal. O extrato foi na sequência incorporado em nanoemulsões constituídas de um núcleo de triglicerídeos de cadeia média estabilizado por lecitina de gema de ovo, preparadas por emulsificação espontânea. Tal procedimento conduziu à obtenção de nanoemulsões monodispersas com diâmetro médio de gotícula de aproximadamente 200-300 nm, independente da quantidade de extrato adicionado à formulação (1,0 a 5,0 mg/mL). A atividade amebicida das formulações contra *Acanthamoeba castellanii* foi dependente da dose e do tempo de incubação, sendo 24 horas e a concentração de 1,25 mg/mL de extrato considerada como ótima (~5% de viabilidade), com efeito similar ao controle clorexidina. Enfim, os estudos de citotoxicidade *in vitro* demonstraram que as células de epitélio de córnea humana (HCE) não foram afetadas com a incubação com as nanoemulsões através do ensaio de MTT. Esses resultados sugerem o potencial do extrato hexânico, rico em cumarinas de *Pterocaulon balansae*, associado a nanoemulsões como uma nova estratégia para o tratamento da ceratite ocular causada por *Acanthamoeba*.

Palavras-chave: nanoemulsões, *Acanthamoeba*, *Pterocaulon balansae*, cumarinas, ceratite ocular.

ABSTRACT

Treatment for keratitis caused by *Acanthamoeba* is unspecific, long term and with low patient compliance, being the search of new treatment strategies a need. Non-aqueous extracts of some species of *Pterocaulon* exhibit antimycotic and anti-parasitic activity, usually attributed to the presence of coumarins. In this scenario, the aim of this work is the development of nanoemulsion to associate the coumarin-rich *n*-hexane extract of *Pterocaulon balansae*. Previously, the extract was prepared and characterized by high performance liquid chromatography with photodiode array detector. The presence of 4 major coumarins was detected, where 5-methoxy-6,7-methylene dioxycoumarin (5MMDC) was selected as chemical marker. This extract was associated to nanoemulsions composed of egg lecithin and medium chain triglycerides, prepared by spontaneous emulsification. The physicochemical characterization showed the formation of monodisperse nanoemulsions with 200-300 nm diameter, regardless the amount of extract incorporated (1.0-5.0 mg/mL). The amoebicidal activity of the formulations against *Acanthamoeba castellanii* was both dose-dependent and incubation time-dependent, being 24h of incubation and concentration of 1.25 mg/mL of the extract the optimal (~5% viability), with effect similar to chlorhexidine control. Finally, *in vitro* cytotoxicity studies showed that human corneal epithelial cells were unaffected after incubation with nanoemulsions by MTT assay. These results suggest a potential of the coumarin-rich *n*-hexane extracts of *Pterocaulon balansae* associated to nanoemulsion as a new strategy for the treatment of ocular keratitis caused by *Acanthamoeba*.

Keywords: nanoemulsion, *Acanthamoeba*, *Pterocaulon balansae*, coumarins, ocular keratitis

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. Ciclo de vida da *Acanthamoeba*. 34
- Figura 2. Distribuição geográfica do gênero *Pterocaulon* (Asteraceae). 39
- Figura 3. *Pterocaulon balansae* Chodat (A) Mendoza, Uruguai e (B) exsicata do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 40
- Figura 4. Estrutura química da 5-metóxi-6,7-metilenodioxicumarina (1), 7-(2',3'-epoxi-3'-metilbutoxi)-6-metóxicumarina (2), 6,7-metilenodioxicumarina (3), 6-hidróxi-7-(3'-metilbutil-2'-en-oxi) cumarina (4) e 6-metóxi-7-(3'-metilbutil-2'-en-oxi) cumarina (5). 41

CAPÍTULO II

- Figure 1. Chromatogram and PDA spectra of *n*-hexane extract of *P. balansae* obtained by maceration. Signals refer to 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin (1), 7-(2',3'-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-methoxy coumarin (2), 5-(2',3'-epoxy-3-methylbutyloxy)-6,7-methylenedioxy coumarin (3) and 5,6-dimethoxy-7-(2',3'-epoxy-3-methylbutyloxy) coumarin (4). 66
- Figure 2. Chromatograms of: A) *n*-hexane extract, B) blank nanoemulsions (NEB), and C) extract-loaded nanoemulsion (NEE; 5 mg/mL). UV detection at 327 nm. 67
- Figure 3. Transmission electron microscopy images of the nanoemulsion: A) blank nanoemulsion (NEB); B) nanoemulsion with extract at 1.0 mg/mL (NEE 1.0); C) nanoemulsion with extract at 2.5 mg/mL (NEE 2.5); D) nanoemulsion with extract at 2.5 mg/mL (NEE 5.0). 71
- Figure 4. Viability of T4 trophozoites after incubation with A) NEB and B) NEE 5.0 during different times. Chlorhexidine 0.1% was used as positive control (24h treatment). *Statistically significant vs. Negative control # Equivalent to chlorhexidine control (p < 0.05). 73

Figure 5. Comparison between the amoebicidal activity of NEB and NEE incubated for 3, 6 or 24 h. *Statistical difference of NEE vs. NEB of same concentration and incubation time. 75

Figure 6. Cell viability of HCE cell after 3 h incubation with the formulations: A) blank nanoemulsion (NEB); and B) extract-loaded nanoemulsion (NEE). For the NEB it was used the equivalent volume for a given concentration of NEE, and the results expressed in this concentration.....77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1. Intra-day and inter-day precision of LC assay of 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin.....	68
Table 2. Accuracy of LC assay for 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin. .	67
Table 3. Physicochemical properties of nanoemulsions prepared in this study.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

5-MMDC – 5-metóxi-6,7-metileno dioximarina

AVL – amebas de vida livre

CA – ceratite por *Acanthamoeba*

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – dimethyl sulfoxide

EGA – encefalite amebiana granulomatosa

HCE – human corneal cell

HPLC – high performance liquid chromatography

ICH – International Conference on Harmonisation

IgA – imunoglobulina A

LC – liquid chromatography

MAP – meningoencefalite amebiana primária

MCT – medium chain triglyceride

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NBL – nanoemulsões de base lipídica

NE - nanoemulsões

NEB – blank nanoemulsion

NEE – nanoemulsion with extract

PBS – phosphate buffer saline

PDA – photo diode array

PDI – polydispersity index

PYG – proteose peptone yeast glucose

RSD – relative standard deviation

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC – sistema nervoso central

TCL – triglicerídeo de cadeia longa

TCM – triglicerídeo de cadeia média

TEM – transmission electron microscopy

UV – ultraviolet

VIS – visible

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
REFERÊNCIAS	23
OBJETIVOS	25
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
CAPÍTULO I	29
Revisão da Literatura	29
Amebas de Vida Livre	31
<i>Gênero Acanthamoeba</i>	33
<i>Ciclo de vida e morfologia</i>	33
<i>Classificação genotípica</i>	35
<i>Patologias</i>	35
<i>Diagnóstico</i>	37
<i>Tratamento</i>	38
Gênero <i>Pterocaulon</i> (Asteraceae)	39
Nanoemulsões	42
<i>Composição</i>	42
<i>Técnicas de Preparação</i>	43
<i>Caracterização físico-química</i>	44
<i>Nanoemulsões de uso ocular</i>	45
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO II	55
Parte experimental	55
ABSTRACT	58
1 INTRODUCTION	59
2 EXPERIMENTAL SECTION	60
2.1 Materials	60
2.2 Plant specimen	60
2.3 Preparation and characterization of the extract	61
2.4 Chromatographic conditions and apparatus	61
2.5 Validation of an HPLC method for 5MMDC determination	62
2.6 Preparation and characterization of the nanoemulsions	63
2.6 <i>Acanthamoeba</i> culture	63
2.7 Amoebicidal activity experiments.....	64
2.8 Cell culture.....	64
2.9 <i>In vitro</i> cytotoxicity	64
2.10 Statistics	65
3 RESULTS AND DISCUSSION	65
3.1 Extract characterization	65
3.2. Validation of an HPLC method for 5MMDC quantification	66
3.3 Characterization of the nanoemulsions	69
3.4 Amoebicidal activity	72
3.5 Cytotoxicity	76
4 CONCLUSION	78
5 ACKNOWLEDGMENTS	78

6 REFERENCES	78
CONCLUSÕES	83

As amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* estão entre os protozoários de maior prevalência no ambiente, sendo mundialmente distribuídas e encontradas no solo, água e ar. Apresentam-se na natureza como trofozoítos metabolicamente ativos, convertendo-se em cistos resistentes sob condições ambientais desfavoráveis. São consideradas “cavalos de Tróia” por carrearem e dispersarem outros micro-organismos patogênicos, e possuem capacidade de se adaptar tanto na forma de vida livre como na forma de parasito oportunista (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

A principal doença associada ao gênero é a ceratite ocular, a qual acomete indivíduos saudáveis, podendo levar à perda da visão quando não tratada ou tardiamente diagnosticada, e apresenta alta prevalência por estar associada ao uso de lentes de contato (SIDDIQUI & KHAN, 2012). O tratamento é inespecífico e de longa duração, realizado com antissépticos de uso tópico os quais são ineficazes para a forma de cisto do protozoário (GRAFFI et al., 2013; KHAN, 2006; SIDDIQUI & KHAN, 2012). Estas dificuldades no tratamento levam à busca por novas estratégias terapêuticas como o estudo de plantas medicinais que possam apresentar atividade antimicrobiana (SAUTER et al., 2011).

Espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae) são amplamente utilizadas na medicina tradicional como antisséptico, antifúngico e antiparasitário (STEIN et al., 2005). Alguns estudos têm demonstrado a atividade antifúngica de amplo espectro do extrato hexânico de *Pterocaulon* spp., bem como de cumarinas isoladas obtidas a partir desta fração (STEIN et al., 2005, STEIN et al., 2006; STOPIGLIA et al., 2011). Em outros estudos a atividade antiparasitária das cumarinas (DEL RAYO CAMACHO et al., 2004; IQBAL et al., 2009; SCHMIDT et al., 2012), tornando assim esses compostos, candidatos ao estudo da atividade amebicida frente *Acanthamoeba* spp. No entanto, as cumarinas presentes no extrato hexânico de *Pterocaulon* spp. apresentam uma reduzida solubilidade em meio aquoso, limitando assim a sua incorporação em formulações líquidas aquosas indicadas para a via ocular (VIANNA et al., 2011).

Para o tratamento das ceratites, as formas farmacêuticas oftálmicas aquosas apresentam vantagens quanto à simplicidade da administração. No entanto, a complexa estrutura do olho e o reflexo de lacrimejamento limitam a disponibilidade ocular dos fármacos, podendo assim afetar a eficácia destes medicamentos (GAN et al., 2013; LIU et al., 2012). As formas farmacêuticas ideais devem ter liberação controlada e direcionada, para menores efeitos adversos e maior eficiência (LIU et al., 2012).

Com o objetivo de contornar os inconvenientes das formas oftálmicas aquosas, bem como a baixa solubilidade de fármacos ou compostos naturais, a nanotecnologia representa uma alternativa para o desenvolvimento de produtos para o tratamento de doenças oculares. Estudos têm demonstrado as vantagens das nanoemulsões de base lipídica no uso ocular, quanto à liberação de fármacos de baixa hidrossolubilidade, e elevada interação com a superfície do olho, promovendo assim, aumento da biodisponibilidade de fármacos e melhora na adesão do tratamento (GAN et al., 2013).

As nanoemulsões são definidas como dispersão nanométrica de gotículas oleosas em fase aquosa externa, estabilizada por sistema tensoativo adequado, apresentando-se como líquido de aspecto leitoso. Podem ser preparadas por diferentes técnicas, sendo a homogeneização à alta pressão e emulsificação espontânea, consideradas as mais tradicionais et al., 2004; TAMILVANAN & BENITA, 2004). Inicialmente, nanoemulsões óleo-em-água foram desenvolvidas para nutrição parenteral, e mais tarde foram estudadas para incorporação de compostos ativos, como estratégia para aumentar a biodisponibilidade de fármacos. Além do mais, sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, capacidade de obtenção de forma estéril e estabilidade cinética fazem das nanoemulsões um promissor veículo para administração tópica ocular.

Assim, a presente dissertação descreve o desenvolvimento de nanoemulsões contendo extrato hexânico de *Pterocaulon balanseae* visando a obtenção de produto com atividade frente à *Acanthamoeba* sp.

REFERÊNCIAS

DEL RAYO CAMACHO, M.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; SOLIS, P. N. *In vitro* antiprotozoal and cytotoxic activities of some alkaloids, quinones, flavonoids, and coumarins. **Planta medica**, v. 70, n. 1, p. 70–2, jan. 2004.

FRONZA, T.; CAMPOS, Á.; TEIXEIRA, H. **Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos** *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2004. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10915/6702>>. Acesso em: 10 jul. 2013

GAN, L.; WANG, J.; JIANG, M.; BARTLETT, H.; OUYANG, D.; EPERJESI, F.; LIU, J.; GAN, Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5-6, p. 290–7, mar. 2013.

GRAFFI, S.; PERETZ, A.; JABALAY, H.; NAFTALI, M. *Acanthamoeba* keratitis. **The Israel Medical Association journal** □ : **IMAJ** v. 15, n. 4, p. 182–5, abr. 2013.

IQBAL, P. F.; BHAT, A. R.; AZAM, A. Antiamoebic coumarins from the root bark of *Adina cordifolia* and their new thiosemicarbazone derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 5, p. 2252–9, maio 2009.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 4, p. 564–95, jul. 2006.

LIU, S.; JONES, L.; GU, F. X. Nanomaterials for ocular drug delivery. **Macromolecular bioscience**, v. 12, n. 5, p. 608–20, maio 2012.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 2, p. 273–307, abr. 2003.

SAUTER, I. P.; DOS SANTOS, J. C.; APEL, M. A.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; VON POSER, G. L.; ROTT, M. B. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. **Parasitology research**, v. 109, n. 5, p. 1367–71, nov. 2011.

SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M.V.; LAGO, J. H.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIM, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; DE N C SOEIRO M.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2176–228, jan. 2012.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 6, jan. 2012.

STEIN, A. C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 211–4, 3 jun. 2005.

STEIN, A. C.; ALVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 95–8, 11 ago. 2006.

STOPIGLIA, C. D. O.; DA ROCHA VIANNA, D.; DE CARVALHO MEIRELES, G.; TEIXEIRA, H.; VON POSER, G. Antifungal activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*. **Journal de mycologie médicale**, v. 21, n. 3, p. 169–72, set. 2011.

TAMILVANAN, S.; BENITA, S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics** □ : official journal of **Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 58, n. 2, p. 357–68, set. 2004.

VIANNA, D.; CORVELLO, F.; RÓDIO, C.; BRUXEL, F.; VELHO, A.; CARVALHO, E. S.; VON POSER, G.; TEIXEIRA, H. Spectrophotometric determination of coumarins incorporated into nanoemulsions containing *Pterocaulon balansae* extract. **Latin American Journal of pharmacy**, V. 30, n. 8, p. 1487-91, jun. 2011.

OBJETIVOS

Objetivo geral

A presente dissertação teve como objetivo investigar a atividade amebicida de nanoemulsões contendo o extrato hexânico de *Pterocaulon balansae* Chodat frente à trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*.

Objetivos específicos

- Preparar o extrato hexânico de *P. balansae* e caracterizá-lo através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Validar o método de determinação de cumarinas em nanoemulsão por CLAE;
- Preparar e caracterizar nanoemulsões contendo o extrato hexânico de *P. balansae* quanto às suas propriedades físico-químicas;
- Avaliar a atividade amebicida das nanoemulsões contendo o extrato hexânico de *P. balansae* frente à trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*;
- Avaliar o efeito citotóxico das nanoemulsões contendo o extrato hexânico de *P. balansae* frente a células de epitélio de córnea humana.

CAPÍTULO I

Revisão da Literatura

Amebas de Vida Livre

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários ubiqüitários e anifizóicos, amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser encontrados no solo, ar, poeira, águas (naturais, tratadas, poluídas) biofilmes, lentes de contato, unidades de diálises e de tratamento dentário. Esses organismos possuem a capacidade de sobreviver em hospedeiro mamífero, sendo os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia* responsáveis por infecções oportunistas e não oportunistas em humanos e animais (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; TRABELSI et al., 2012). Muitas espécies de *Acanthamoeba* são conhecidas por causar infecções, enquanto somente as espécies *Balamuthia mandrilaris*, *Naegleria fowleri* e *Sappinia pedata* são patogênicas (VISVESVARA et al., 2007; QVARNSTROM et al, 2009). Estas AVL também podem ser carreadoras de outros microrganismos, como bactérias patogênicas, podendo dispersá-las no ambiente (KHAN, 2006).

As AVL estão classificadas dentro de duas ordens pertencentes ao filo Amebozoa: a ordem Centramoebida, que engloba as famílias Acanthamoebidae e Balamuthiidae, e os respectivos gêneros *Acanthamoeba* e *Balamuthia*, e a ordem Thecamoebida, que engloba a família Thecamoebidae, e o gênero *Sappinia* (SMIRNOV et al., 2011). O gênero *Naegleria* está classificado dentro do filo Percolozoa, que pertence à ordem Schizopyrenida, e família Vahlkampfiidae (SYSTEMA NATURAE 2000).

O gênero *Acanthamoeba* foi descoberto em 1930 por Castellani, como contaminante de uma cultura do fungo *Cryptococcus pararoseus* (CASTELLANI, 1930; KHAN, 2006). Mas em 1958, Culbertson e colaboradores demonstraram pela primeira vez o potencial patogênico das AVL ao observarem o efeito citopático em cultura de células de rim de macaco, e a morte de animais por encefalite, após a inoculação intracerebral e intra espinhal de fluido de cultura celular contaminado com amebas (CULBERTSON et al., 1958; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004). O primeiro caso de meningoencefalite por AVL em humanos foi relatado em 1965 na Austrália, como sendo causado pelo gênero *Acanthamoeba*, porém, mais tarde o agente etiológico foi identificado como sendo *Naegleria fowleri* (FOWLER & CARTER,

1965; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004). O primeiro caso confirmado causado por *Acanthamoeba* foi em 1972, em um paciente sob tratamento do linfoma de Hodgkin's (JAGER & STAMM, 1972; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004). Em 1980, Martínez caracterizou as infecções por *Acanthamoeba* como oportunistas, pois reconheceu sua ocorrência em pacientes debilitados, ou doentes crônicos, distinguindo as patologias causadas por *Acanthamoeba* e *Naegleria* (MARTÍNEZ, 1980; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004). O primeiro caso de infecção por *Balamuthia* foi reportado em 1990, com a morte de um babuíno mandril por meningoencefalite em um zoológico, e em 1993 foi reportado o primeiro caso em humanos (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; VISVESVARA et al., 1993; VISVESVARA et al., 1990). Em 2001, Gelman e colaboradores, relataram um único caso de encefalite por *Sappinia diploidea*, outra AVL normalmente encontrada em solo contaminado por fezes de alce, bisão e gado. Este paciente era imunocompetente e teve a infecção eliminada após tratamento, o que sugere que esta AVL seja menos virulenta do que as outras. No entanto, em 2009 Qvarnstrom e colaboradores confirmaram a espécie deste caso de encefalite, como sendo *S. pedata* através da identificação molecular (GELMAN et al., 2001; QVARNSTROM et al., 2009; VISVESVARA et al., 2007).

Em geral, o gênero *Acanthamoeba* está associado com doenças como encefalite granulomatosa amebiana (EGA), lesões cutâneas, infecções pulmonares e renais em pacientes imunocomprometidos, e ceratite ocular em pacientes imunocompetentes. *Balamuthia mandrillaris* causa infecções de pele e pulmão, e EGA principalmente em crianças imunocompetentes. Já *Naegleria fowleri* causa uma meningoencefalite amebiana primária (MAP) não oportunista em crianças saudáveis, e adultos jovens. Apenas um caso de meningoencefalite por *Sappinia diploidea* foi relatado (TRABELSI et al., 2012).

As doenças por AVL são emergentes e têm ganhado muita atenção em saúde pública, devido aos casos de infecções fatais do sistema nervoso central, e dos inúmeros casos de ceratite ocular. Nas últimas décadas houve um aumento de pacientes suscetíveis a infecções, como os imunocomprometidos em decorrência da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e do crescente uso de lentes de contato (KHAN, 2006;

TRABELSI et al., 2012). Inicialmente, a incidência de ceratite por *Acanthamoeba* era de um a dois casos por milhão de usuários de lentes, na década de 80 e início da década de 90, e hoje, são relatados de 17 a 70 casos por milhão de usuários de lentes pelo mundo (LORENZO-MORALES et al., 2013). Nos últimos anos tem-se observado também, alguns casos de EGA em indivíduos imunocompetentes (KHANNA et al., 2014; REDDY et al., 2011), pacientes de transplantes (AFSHAR et al., 2013; SATLIN et al., 2013) e portadores de Lupus (ALKHUNAIZI et al., 2013; CASTILLO et al.,).

Gênero *Acanthamoeba*

As AVL do gênero *Acanthamoeba* estão entre os protozoários de maior prevalência no ambiente, sendo mundialmente distribuídas. Elas têm sido isoladas dos mais diversos ambientes naturais e artificiais, como solo, ar, poeira, águas naturais, água potável, mares, piscinas, ar-condicionado, lava-olhos, colírios, lentes de contato, estojos de lentes de contato, unidades de diálise, unidades de tratamento dentário, biofilmes e hospitais. Ademais dos isolados ambientais, também têm sido isoladas de plantas, animais, mucosas nasais e gargantas de indivíduos saudáveis, bem como de órgãos infectados, lesões cutâneas em imunodeficientes e lesões na córnea por ceratite (CARLESSO et al., 2010; CAUMO et al., 2009; LANDELL et al., 2013; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; PENS et al., 2008; WINCK et al., 2011).

Ciclo de vida e morfologia

Acanthamoeba apresenta dois estágios morfológicos no seu ciclo de vida, em função das condições impostas pelo ambiente: o de trofozoíto vegetativo e o de cisto resistente (**Figura 1**). Durante o estágio de trofozoíto, este organismo alimenta-se de outros microrganismos, ou pequenas moléculas orgânicas, e se reproduz assexuadamente por divisão binária. Morfologicamente, apresenta um tamanho ente 12 e 50 μm , variando entre isolados de diferentes espécies, exibindo na superfície estruturas semelhantes a espinhos denominadas acantopódios, responsáveis pela adesão em

superfícies, captura de alimento e locomoção. Apresenta um citoplasma granular contendo inúmeros vacúolos digestivos, mitocôndrias, ribossomos, um vacúolo contrátil para controle osmótico da célula, e um único núcleo centralizado, com um nucléolo denso e bem definido. Em situações adversas como diminuição da oferta de alimento, extremos de temperatura, pH e osmolaridade, os trofozoítos transformam-se em cistos resistentes. Os cistos apresentam um tamanho entre 5 e 25 µm e possuem uma dupla parede celular, formada por um ectocisto e um endocisto composto de celulose, sendo PAS (ácido periódico-Schiff) positivo. O endocisto pode apresentar um formato estrelado, poligonal ou arredondado, em função do encontro das duas paredes em pontos denominados ostíolos, sendo classificado como tipo I, tipo II e tipo III, respectivamente (PAGE, 1967; PUSSARD & PONS, 1977). Os ostíolos servem também para monitoramento do ambiente. Em situações favoráveis de temperatura, pH, osmolaridade e oferta de alimento, os trofozoítos emergem da forma de cisto através de uma estrutura denominada opérculo, voltando a se alimentar, se reproduzir e causar patologias, pois os cistos são muito resistentes aos extremos ambientais, bem como a antissépticos e fármacos, e podem permanecer viáveis por muitos anos. Além disso, são amplamente distribuídos devido à capacidade de serem transportados pelo ar (KHAN, 2006; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; VISVESVARA et al., 2007).

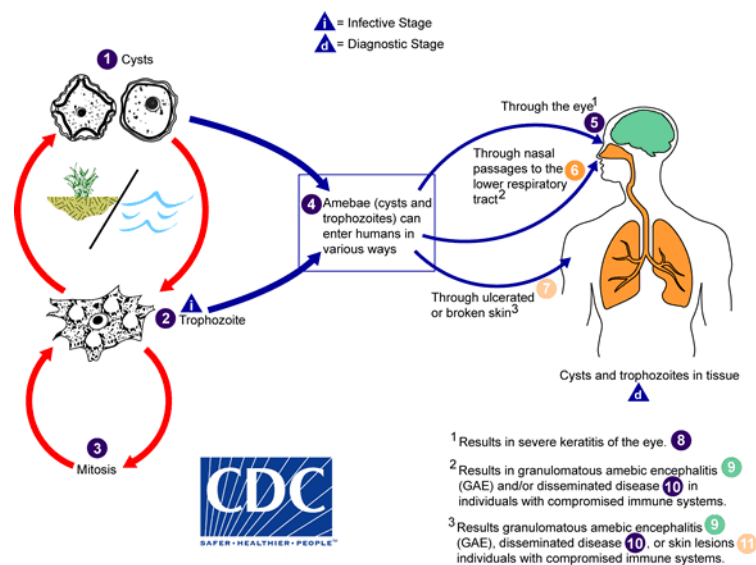


Figura 1. Ciclo de vida da *Acanthamoeba*. A ameba pode viver em duas formas cistos (1) ou trofozoíto (2). Na fase trofozoíto é onde o parasito

encontra-se metabolicamente ativo (3). As amebas podem entrar no corpo por diferentes formas (4): ocular (5); nasal (6), ou; cutânea (7). Infecções oculares são responsáveis por ceratite (8), enquanto infecções nasais ou cutâneas podem levar à encefalite amebiana granulomatosa(9) ou infecção disseminada(10). Infecções cutâneas também podem resultar em lesões na pele (11). Fonte: CDC- *Center for Disease Control and Prevention*.

Classificação genotípica

No gênero *Acanthamoeba* existe uma classificação genotípica baseada no sequenciamento total do gene 18S do rRNA, em que o gênero divide-se em 20 genótipos: T1 ao T20 (FUERST et al., 2015; GAST et al., ; MAGNET et al., 2014). Esta classificação permite apreciar a diversidade do gênero, e explicar a distribuição mundial, bem como a capacidade de colonizar diferentes ambientes (MACIVER et al., 2013; MAGNET et al., 2014). Observou-se que o genótipo T4 é o mais abundante no ambiente humano e o mais associado com doenças humanas (MAGNET et al., 2014). Como regra de classificação, cada novo genótipo deve ter no mínimo 5% de diferença entre o genótipo previamente descrito (MACIVER et al., 2013).

Patologias

Ao gênero *Acanthamoeba* estão associadas duas patologias importantes: a EGA, que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, e a ceratite ocular, que acomete indivíduos imunocompetentes, e é a patologia mais prevalente relacionada ao gênero.

A EGA é uma infecção rara, quase sempre fatal, e considerada oportunista por estar muito relacionada com pacientes imunocomprometidos: pacientes com SIDA, em terapia imunossupressora, em quimioterapia antitumoral, distúrbios hematológicos, transplantes, doenças hepáticas e em uso de antibióticos de amplo espectro. As vias aceitáveis de infecção pela *Acanthamoeba* incluem o trato respiratório, onde o organismo invade os vasos alveolares, seguindo para a corrente sanguínea, até chegar à barreira hematoencefálica, e por lesões cutâneas por onde o organismo atinge a

corrente sanguínea. O período de incubação pode ser de semanas a meses. A EGA se caracteriza por edema e necrose hemorrágica devido a uma indução de resposta pró-inflamatória, e os sintomas são semelhantes a outras infecções do SNC. O diagnóstico pode ser feito por ressonância magnética, por tomografia computadorizada, ou por identificação do protozoário no órgão afetado, em casos de necropsia (KHAN, 2006; SIDDIQUI & KHAN, 2012).

A ceratite por *Acanthamoeba* (CA) foi relatada pela primeira vez em 1974 na Inglaterra (NAGINTON et al., 1974). É uma infecção na córnea caracterizada por muita dor, fotofobia, intensa resposta inflamatória, dano epitelial e edema de pálpebra, e se não tratada adequadamente pode levar à necrose estromal e perda da visão, ou à necessidade de enucleação (LORENZO-MORALES et al., 2015; PANJWANI, 2010; SIDDIQUI & KHAN, 2012).

Esta patologia está muito associada ao uso de lentes de contato, principalmente quando cuidados básicos são negligenciados como uso das lentes por longos períodos de tempo, falta de higiene pessoal, limpeza inapropriada das lentes, seguido de formação de biofilme e exposição à água contaminada (KHAN, 2006). Estudos também mostram que *Acanthamoeba* possui maior afinidade pela superfície ocular de usuários de lentes em relação a não usuários, pois em apenas 30 minutos de uso, a superfície das lentes apresenta uma série de substâncias como sacarídeos, proteínas, lipídios e imunoglobulinas (IgA), que podem agir como receptores de trofozoítos, como por exemplo, a interação dos resíduos de manose nas lentes com proteínas de ligação à manose expressas por *Acanthamoeba* (BEATTIE et al., 2003; GUDMUNDSSON et al., 1985; KHAN, 2006; KLOTZ et al., 1987; TRIPATHI & TRIPATHI, 1984). Observou-se também uma maior afinidade pelas lentes contendo biofilmes bacterianos, do que pelas limpas, pois os biofilmes são fonte de nutrientes, contribuindo assim para uma maior permanência dos trofozoítos na superfície (BEATTIE et al., 2003; KHAN, 2006). Outro estudo sugere que o uso prolongado de lentes de contato pode prejudicar a imunidade inata na superfície do olho, por alteração dos níveis de citocinas e quimiocinas, alteração na habilidade quimiotática dos leucócitos polimorfonucleares, bem como diminuição do seu recrutamento (LI & SUN, 2008). Mesmo que haja o

contato dos parasitos com o olho, quando as lentes contaminadas são colocadas, a invasão da córnea e produção de patologia dependerá da virulência do isolado e do estado fisiológico da córnea. Estudos mostram que um trauma na córnea é a porta de entrada para a infecção, pois ocorre uma maior exposição das substâncias as quais o trofozoíto tem afinidade, como por exemplo, a manose (KHAN, 2006).

A crescente popularidade das lentes de contato, desde a década de 80, foi responsável pelo aumento do número de casos de ceratite pelo mundo, tornando esta patologia a mais prevalente de todas as outras causadas pelo gênero. No entanto, os casos de ceratite não são exclusivos em usuários de lentes, podendo ocorrer devido a lesões seguidas de exposição à água contaminada ou solo, muitas vezes envolvendo trabalhadores rurais (GRAFFI et al., 2013; MENGHI et al., 2012; SYAM & NARENDRAN; VAN DER HOEK, 2005).

Diagnóstico

O diagnóstico da CA pode ser realizado em amostras de biópsia ou raspado de córnea, coleta de biofilmes em lentes de contato e seus estojos, e em soluções de limpeza de lentes. Estes materiais podem então ser submetidos à microscopia pelo exame direto à fresco, em caso de infecção grave ou contaminação de estojos, ou à coloração, em casos de detecção de cistos em material fresco ou em soluções de limpeza ou em cortes histológicos, à cultura em ágar não nutriente com sobrecamada de *Escherichia coli* (considerado padrão ouro no diagnóstico), e ao diagnóstico molecular, onde é feita a confirmação do gênero e genotipagem (LORENZO-MORALES et al., 2015). Atualmente, alguns estudos estão demonstrando a microscopia confocal *in vivo* como vantajosa no diagnóstico da CA, uma vez que este método apresenta imagens das estruturas da superfície do olho em boa resolução, cistos, trofozoítos nervos anormais da córnea, cavidade intraestromal e células de infiltração inflamatória, além de ser um procedimento não invasivo (ZHANG et al., 2014).

Tratamento

No caso da EGA, o tratamento não é eficaz nos casos mais graves, quando o diagnóstico somente ocorre *post-mortem* devido à rápida evolução da doença. Os casos reversíveis de EGA envolvem o uso de cetoconazol, fluconazol, sulfadiazina, isetionato de pentamidina, anfotericina B, azitromicina, itraconazol, ou rifampicina (SIDDIQUI & KHAN, 2012) e, se possível, ressecção cirúrgica da lesão no SNC (SEIJO MARTINEZ et al., 2000).

Para o tratamento da CA são utilizadas biguanidas em combinação com diamidinas: clorexidina 0,02% e isetionato de propamidina 0,1% (Brolene® - Sanofi, Reino Unido), clorexidina 0,02%, dibromopropamidina 0,15% e hexamidina 0,1% (Desomedine® - Chauvin, França), e neomicina. As biguanidas são consideradas classes de primeira escolha no tratamento da CA, pois poli-hexametileno biguanida (PHMB) e clorexidina têm sido relatadas como as mais efetivas, em combinação, contra trofozoítos e cistos (Dart et al., 2009; Lorenzo-Morales et al., 2015). Estes compostos interagem com a membrana citoplasmática, resultando em perda de material celular e inibição de enzimas respiratórias. Um recente estudo apresenta a combinação de miltefosina, uma alquilfosfocolina, com PHMB, como candidata ao tratamento da CA, através da observação da atividade *in vivo* em animais, pois estudos anteriores mostraram a atividade da miltefosina frente *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* e *Entamoeba* (POLAT et al., 2014).

Embora existam fármacos no mercado para o tratamento das doenças por *Acanthamoeba*, eles são inespecíficos e muitas vezes ineficazes para a forma de cisto. No caso da CA, o diagnóstico é difícil, o tratamento é prolongado, o que muitas vezes prejudica a adesão do paciente. E, se o tratamento não for adequado, e o paciente não for acompanhado após interrupção da terapia, será grande a chance de reincidência da doença, em função da resistência cística.

Devido a estas dificuldades ligadas ao tratamento da CA, novas estratégias terapêuticas estão sendo estudadas, como a busca por compostos

de plantas medicinais, os quais possam ser ativos contra trofozoítos e cistos, não sendo tóxicos aos tecidos oculares (SAUTER et al., 2011).

Gênero *Pterocaulon* (Asteraceae)

O gênero *Pterocaulon*, descrito em 1823 por Elliot, pertence à família Asteraceae, à subfamília Asteroideae, e à tribo Plucheeae (ELLIOTT, 1821; LIMA & MATZENBACHER, 2008). Possui 18 espécies distribuídas em uma área bicêntrica, onde 12 são americanas, estendendo-se do sul dos Estados Unidos ao centro da Argentina, e seis são australianas alcançando a Nova Caledônia, Indonésia e Sudeste Asiático (CABRERA & RAGONESE, 1978) (**Figura 2**).

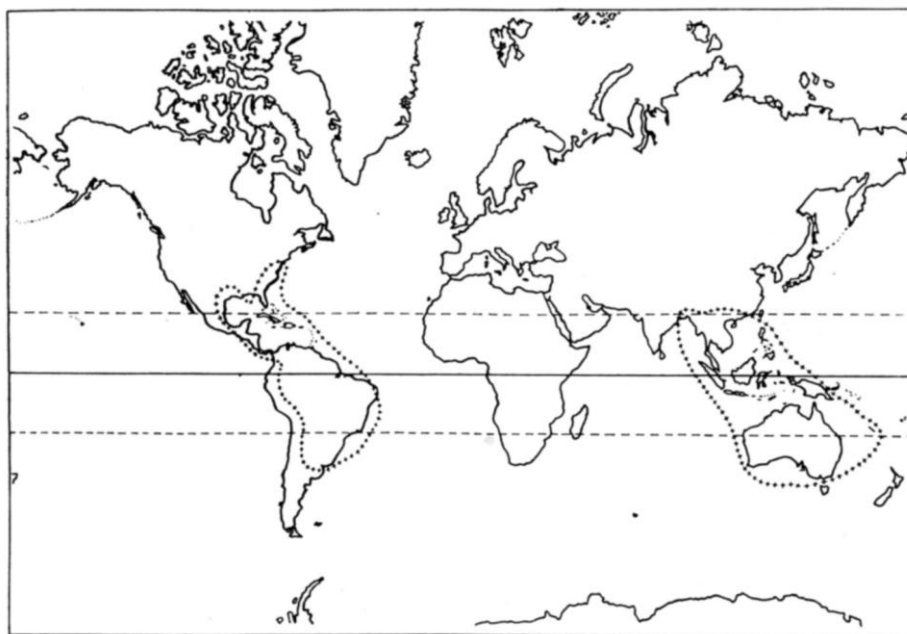


Figura 2. Distribuição geográfica do gênero *Pterocaulon* (Asteraceae), circunscrita nas linhas pontilhadas- Cabrera & Ragonese, 1978.

No Rio Grande do Sul, são encontradas as espécies *P. alopecuroides* (Lam.) DC., *P. angustifolium* DC., *P. balansae* Chodat (**Figura 3**), *P. cordobense* Kuntze, *P. lorentzii* Malme, *P. polypterum* (DC.) Cabrera, *P. polystachyum* DC., *P. rugosum* (Vahl.) Malme e *P. virgatum* (L.) DC. (LIMA & MATZENBACHER, 2008).

Espécies do gênero *Pterocaulon* são comumente utilizadas na medicina veterinária para o tratamento de micoses em animais, mas também são utilizadas na medicina tradicional como digestivas, antifúngicas, antissépticas, antiparasitárias e inseticidas (AVANCINI, 2002). Estudos confirmam a atividade antifúngica *in vitro* e de amplo espectro, de diferentes extratos de *Pterocaulon* spp. No estudo publicado por Stein, e colaboradores (2005), foi demonstrada a atividade do extrato metanólico bruto, e das frações *n*-hexano, diclorometano e metanol de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* frente cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum gypseum* (STEIN et al., 2005).



Figura 3. *Pterocaulon balansae* Chodat. A) Mendoza, Uruguai; B) Exsicata 186321- Jardim botânico do Rio de Janeiro. Lista de Espécies da Flora do Brasil:

<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=3290350>

Stopiglia e colaboradores (2011) demonstraram a atividade do extrato metanólico bruto de *P. polystachyum*, *P. balansae*, *P. lorentzii*, *P. lanatum* e *P. cordobense* frente *Sporothrix schenckii* (STOPIGLIA et al., 2011). Outros estudos demonstram a atividade amebicida *in vitro* de diferentes extratos de *P. polystachyum*. Rodio e colaboradores (2008) demonstraram a atividade do

extrato metanólico bruto, e das frações *n*-hexano, diclorometano e metanol de *P. polystachyum* frente *Acanthamoeba castellanii*, e Sauter e colaboradores (2011) demonstraram a atividade do óleo essencial de *P. polystachyum* frente *A. polyphaga* (RÓDIO et al., 2008; SAUTER et al., 2011). Stein e colaboradores (2006) avaliaram não só a atividade antifúngica *in vitro* do extrato hexânico de *Pterocaulon* spp., como a de cumarinas isoladas destes extratos: 5-metóxi-6,7-metilenodioxicumarina (1) e 7-(2', 3'-epoxi-3'-metilbutiloxi)-6-metóxicumarina (2) de *P. alopecuroides*, 5-metóxi-6,7-metilenodioxicumarina de *P. balansae*, 5-metóxi-6,7-metilenodioxicumarina, 6,7-metilenodioxicumarina (3), 6-hidróxi-7-(3'-metilbutil-2'-em-oxi)-cumarina (4), e 6-metóxi-7-(3'-metilbutil-2'-em-oxi)-cumarina (5) de *P. polystachyum* (**Figura 4**). No entanto, os valores de concentração inibitória mínima para os compostos isolados foram superiores aos valores do extrato hexânico, não sendo possível atribuir a atividade antifúngica a estas cumarinas, podendo outras não identificadas nos extratos estarem relacionadas à ação observada (STEIN et al., 2006).

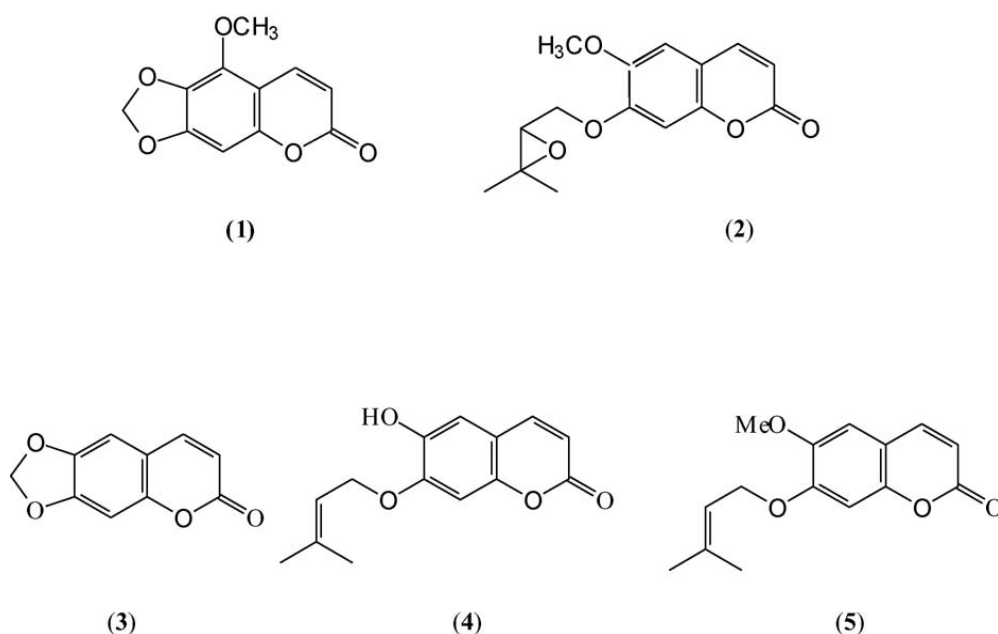


Figura 4. Estrutura química de cumarinas presentes em *Pterocaulon* spp.: 5-metóxi-6,7-metilenodioxicumarina (1), 7-(2', 3'-epoxi-3'-metilbutiloxi)-6-metóxicumarina (2), 6,7-metilenodioxicumarina (3), 6-hidróxi-7-(3'-metilbutil-2'-en-oxi)-cumarina (4) e 6-metóxi-7-(3'-metilbutil-2'-en-oxi)-cumarina (5).

As cumarinas são compostos fenólicos pertencentes à classe das benzopironas, e são classificadas em seis tipos, de acordo com a estrutura química dos compostos: simples, furano, diidrofurano, linear, angular e di-cumarinas. Mais de 1300 delas já foram identificadas como metabólitos secundários de plantas, bactérias e fungos (VENUGOPALA et al., 2013).

Muitos estudos já demonstraram uma série de atividades farmacológicas relacionadas às cumarinas, dentre estas, anti-inflamatória, antitumoral, e antioxidante (VENUGOPALA et al., 2013). Recente estudo demonstrou a atividade antiparasitária *in vitro* das cumarinas frente à promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani*, amastigotas de *Trypanossoma cruzi*, tripomastigotas de *T. brucei brucei*, e *Plasmodium falciparum* (DEL RAYO CAMACHO et al., 2004).

Nanoemulsões

As nanoemulsões (NEs) podem ser definidas como a dispersão manométrica de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizadas por um sistema tensoativo adequado (FRONZA et al., 2004). Estas são atrativas como formulações farmacêuticas devido à capacidade de emulsificar espontaneamente, da estabilidade termodinâmica e da capacidade de incorporação de compostos insolúveis em água (KOO et al., 2005; TAMILVANAN & BENITA, 2004).

Composição

Estas formulações são compostas basicamente por óleos, tensoativos e outros adjuvantes. O núcleo oleoso da NE pode representar de 2,5 a 20% da composição final, sendo que a escolha do óleo, bem como da concentração, depende da solubilidade do composto a ser incorporado. Óleos vegetais ou óleos semi-sintéticos, constituídos de cadeia longa (TCL) e média (TCM) são muito empregados no preparos das NEs. Porém, os TCM, obtidos da hidrólise do óleo de coco, seguindo a esterificação dos ácidos graxos livres (caprílico, capróico) com glicerol, apresentam uma miscibilidade em água muito maior do

que os análogos de cadeia longa, sendo assim capazes de dissolver grandes quantidades de compostos lipossolúveis (FRONZA et al., 2004).

Os tensoativos utilizados são muito variados, e a escolha depende muito da via de administração, pois estes compostos estão relacionados com reações inflamatórias e irritação local. As lecitinas são tensoativos naturais amplamente utilizados na produção de NE devido a sua grande biocompatibilidade, e constituem-se de fosfolipídios extraídos da gema do ovo ou da soja, tendo a fosfatidilcolina como componente majoritário. No entanto, esta composição heterogênea das lecitinas pode alterar a estabilidade das NE, sendo necessária a combinação com outros tensoativos sintéticos, como o polissorbato 80, o poloxâmico 188 que confere maior estabilidade e resistência frente à desidratação e esterilização por calor úmido. Da mesma maneira, é possível a adição de lipídios catiônicos, como estearilamina ou oleilamina, que conferem carga positiva à superfície da gotícula. Usualmente a concentração de lecitinas compreende entre 1,2 e 2,4% em formulações de 10 a 20% de fase interna, respectivamente (FRONZA et al., 2004).

Outros componentes podem ser utilizados com o fim de manter a estabilidade da formulação, como soluções aquosas de HCl e NaOH para ajuste de pH por razões fisiológicas e para evitar hidrólise de TCL, TCM e fosfolipídios. Os eletrólitos têm função isotonzante e tamponante, mas podem interagir com o colóide, desestabilizando a formulação, assim como os conservantes, os quais são recomendados em caso de formas multidosas. Antioxidantes também são recomendados em formulações contendo fosfolipídios e óleos vegetais, pois os produtos da oxidação podem ser desestabilizantes (FRONZA et al., 2004).

Técnicas de Preparação

As NE podem ser preparadas por dois diferentes métodos: o método físico, ou “de novo”, consiste na redução do diâmetro médio das partículas após a emulsificação clássica. Em uma primeira etapa, as fases aquosa e oleosa, contendo seus respectivos compostos, são emulsionadas por um

homogeneizador de alta velocidade, e na segunda etapa, esta emulsão é submetida à redução do diâmetro de partícula, em torno de 100 a 200 nm, por homogeneização à alta pressão. Este processo tem como vantagens a incorporação de compostos voláteis às NEs, pois nem sempre é necessário o aquecimento das fases antes da emulsificação, e não necessita do uso e evaporação de solventes orgânicos. O método da emulsificação espontânea consiste na formação da emulsão por deslocamento do solvente. O composto lipofílico, o óleo da fase interna e o tensoativo lipofílico, são dissolvidos em solvente orgânico, formando a fase oleosa, a qual será vertida, sob agitação, na fase aquosa formada pelo tensoativo hidrofílico dissolvido no solvente aquoso. Essa mistura é então submetida à destilação do solvente à pressão reduzida, e em baixas temperaturas. Este processo tem como vantagens o preparo de pequenos volumes, e a incorporação de compostos termolábeis (FRONZA et al., 2004; TAMILVANAN & BENITA, 2004).

A preparação extemporânea consiste na incorporação de compostos em NE previamente preparadas. Este método apresenta desvantagens sobre a estabilidade da formulação final, devido a mudanças físicas como separação de fases, nanoprecipitação ou cremeação (FRONZA et al., 2004; TAMILVANAN & BENITA, 2004).

Caracterização físico-química

Várias propriedades físico-químicas de NEs devem ser caracterizadas, incluindo o tamanho das nanogotículas. O tamanho é diretamente relacionado com a área superficial do núcleo oleoso. Variações na técnica de preparo, bem como na composição qualitativa e quantitativa dos constituintes, estão entre os principais fatores que governam o tamanho médio final das estruturas. Mesmo sendo cineticamente estáveis, as nanoemulsões podem tornar-se instáveis. O acompanhamento do tamanho médio através do tempo pode dar indicativos de dessa estabilidade. Pode ser analisado por diferentes técnicas como espalhamento de luz, difração à laser e microscopia eletrônica de transmissão. Mesmo não sendo uma propriedade físico-química, mas uma medida de dispersão estatística, o índice de polidispersão é utilizado para caracterizar

nanoestruturas. Esse índice, que pode variar de 0 a 1, indica a homogeneidade da distribuição de tamanho. Valores próximos a “1” indicam que o sistema está polidisperso, ou seja, apresenta mais de uma população com diferente tamanho de partícula, enquanto valores próximos a “0” indicam uma distribuição unimodal (FRONZA et al., 2004; NEMEN & LEMOS-SENN, 2011).

O potencial zeta é uma diferença de potencial criada no plano de cisalhamento da partícula e que está relacionada diretamente com sua carga de superfície, refletindo a composição da interface das NE e suas interações com o meio. Entre os métodos de determinação do potencial zeta estão métodos eletroforéticos, eletroacústicos e eletro-osmóticos. Uma vez que, juntamente com impedimento estérico, a carga superficial está relacionada com a estabilidade de uma estrutura coloidal, potenciais elevados (em módulo) são importantes para evitar agregações da fase interna, devido às forças repulsivas (FRONZA et al., 2004).

Nanoemulsões de uso ocular

O tratamento convencional das doenças oftalmológicas da porção anterior, como as ceratites, é feito pela aplicação tópica de colírios, suspensões ou pomadas. Estas formas farmacêuticas apresentam vantagens como facilidade de administração, simplicidade, segurança, boa adesão, baixo custo, e ação localizada sem provocar efeitos sistêmicos. No entanto, a complexa estrutura do olho e os mecanismos de *clearance* na superfície da córnea, como lacrimação, limitam a aplicação de medicamentos e prejudicam a biodisponibilidade de fármacos. Devido a estas barreiras, menos de 5% dos fármacos administrados conseguem alcançar o humor aquoso, pois a lacrimação provoca diluição e diminuição do tempo de permanência do medicamento no olho, e as células muito justapostas da córnea impedem a penetração de fármacos nas camadas mais internas do olho. Além disso, os tecidos oculares apresentam transportadores de efluxo, como a glicoproteína-P e proteínas de resistência a fármacos (GAN et al., 2013; LIU & JONES; GU, 2012).

Um sistema ideal de entrega de fármacos para a forma ocular deve ter propriedades como: liberação controlada e sustentada, mantendo as concentrações terapêuticas do fármaco no local de aplicação, reduzindo a frequência de administração, alvo específico e retenção prolongada no tecido tratado, aumentando a eficiência e diminuindo os efeitos adversos do medicamento (LIU & JONES; GU, 2012). Em vista destes inconvenientes relacionados ao uso de formas farmacêuticas oftalmológicas, e a necessidade de se ter sistemas mais adequados a esta via, a nanotecnologia representa uma alternativa para o desenvolvimento de produtos para o tratamento de doenças oculares.

A superfície do olho apresenta um filme lacrimal composto por uma lâmina de muco, a qual separa a superfície da porção aquosa e lipofílica, uma lâmina aquosa, e uma lâmina lipídica, que impede a evaporação da lâmina aquosa. Os nanocarreadores de base lipídica (NBL) possuem propriedades semelhantes às três camadas do filme lacrimal, podendo assim interagir com a superfície do olho. Quando instilada, a porção aquosa da emulsão melhora a fase aquosa do filme, umedecendo a córnea. Os eletrólitos presentes nessa fase aquosa contribuem para a desestabilização da emulsão, e consequente liberação dos seus componentes internos. A lâmina lipídica mantém a córnea hidratada, fazendo com que a formulação permaneça bastante tempo na lâmina aquosa do filme lacrimal. Dessa forma, os NBL contribuem para uma melhora na biodisponibilidade dos fármacos na via ocular (GAN et al., 2013).

Além da capacidade de interação com a superfície do olho, as NE apresentam uma série de vantagens para o uso ocular, como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, possibilidade de esterilização, e capacidade de incorporação de compostos insolúveis. O reduzido tamanho de partícula também é uma propriedade importante, pois confere às NE reduzido diâmetro de gotícula e baixa viscosidade (FRONZA et al., 2004; TAMILVANAN & BENITA, 2004).

Nos últimos anos, muitas estratégias de liberação de fármacos oftálmicos têm emergido devido às vantagens das NE sobre as formulações convencionais. Na última década, algumas formulações deste tipo foram

aprovadas. NE de uso ocular contendo ciclosporina (Restasis[®]), para síndrome do olho seco, e difluprednato (Durezol[™]), para inflamação, já se encontram no mercado, assim como Lipimix [™] e Soothe[®]XP Emollient, para lubrificação ocular (GAN et al., 2013).

REFERÊNCIAS

AFSHAR, K. BOYDKING, A.; GANESH, S.; HERRINGTON, C; MCFADDEN, P. M. Rapidly fatal disseminated acanthamoebiasis in a single lung transplant recipient. **Annals of transplantation**: quarterly of the Polish Transplantation Society, v. 18, p. 108–11, jan. 2013.

ALKHUNAIZI, A. M. DAWAMNEH, M. F.; BANDA, R. W.; DAABIL, R. A.; AL-TAWFIQ, J. A.; AKKAD, S. A.; BOUKHAMSEEN, A. H. *Acanthamoeba* encephalitis in a patient with systemic lupus treated with rituximab. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 75, n. 2, p. 192–4, fev. 2013.

AVANCINI, C. Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil. **Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2002.

BEATTIE, T. K. TOMLINSON, A.; MCFADYEN, A. K.; SEAL, D. V.; GRIMASON, A. M. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? **Ophthalmology**, v. 110, n. 4, p. 765–71, abr. 2003.

CABRERA, A.; RAGONESE, A. Revisión del género *Pterocaulon* (Compositae). **Darwiniana**, 1978.

CARLESSO, A. M. ARTUSO, G. L.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Current microbiology**, v. 60, n. 3, p. 185–90, mar. 2010.

CASTELLANI, A. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. **J Trop Med Hyg**, 1930.

CASTILLO, R. D. GARZA, J. X.; SHAMSADEH, M.; REIFF, A. O.; MARZAN, K. A.; *Acanthamoeba* meningoencephalitis presenting as neuropsychiatric lupus in a pediatric patient. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 30, n. 2, p. 272–6, jan 2012.

CAUMO, K. FRASSON, A. P.; PENS, C. J.; PANATIERI, L. F.; FRAZZON, A. P.; ROTT, M. B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 103, n. 6, p. 477–85, set. 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.
<http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html> . 24 de agosto de 2012. Último acesso em 06 de março de 2015.

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; MINNER, J. R. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 127, n. 3313, p. 1506, 27 jun. 1958.

DART, J. K. G.; SAW, V. P. J.; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. **American journal of ophthalmology**, v. 148, n. 4, p. 487–499.e2, out. 2009.

DEL RAYO CAMACHO, M. PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; YARDLEY, V.; SOLIS, P. N. In vitro antiprotozoal and cytotoxic activities of some alkaloids, quinones, flavonoids, and coumarins. **Planta medica**, v. 70, n. 1, p. 70–2, jan. 2004.

ELLIOTT, S. A sketch of the botany of South-Carolina and Georgia. 1821.

FOWLER, M.; CARTER, R. F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. **British medical journal**, v. 2, n. 5464, p. 740–2, 25 set. 1965.

FRONZA, T.; CAMPOS, Á.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-556, 2004.

FUERST, P. A.; BOOTON, G. C.; CRARY, M. Phylogenetic Analysis and the Evolution of the 18S rRNA Gene Typing System of *Acanthamoeba*. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 62, n. 1, p. 69–84, jan. 2015.

GAN, L.; WANG, J.; JIANG, M.; BARTLETT, H.; OUYANG, D.; EPERJESI, F.; LIU, J.; GAN, Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5-6, p. 290–7, mar. 2013.

GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 43, n. 6, p. 498–504, jan. .

GELMAN, B. B. RAUF, S. J; NADER, R, POPOV, V.; BORKOWSKI, J.; CHALJUB, G.; NAUTA, H. W.; VISVESVARA, G. S. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. **JAMA**, v. 285, n. 19, p. 2450–1, 16 maio 2001.

GRAFFI, S.; PERETZ, A, JABALY, H.; NAFTALI, M. *Acanthamoeba* keratitis. **The Israel Medical Association journal** □ : **IMAJ**, v. 15, n. 4, p. 182–5, abr. 2013.

GUDMUNDSSON, O. G.; WOODWARD, D. F; FOWLER, S. A; ALLANSMITH, M. R. Identification of proteins in contact lens surface deposits by

immunofluorescence microscopy. **Archives of ophthalmology**, v. 103, n. 2, p. 196–7, fev. 1985.

IQBAL, P. F.; BHAT, A. R.; AZAM, A. Antiamoebic coumarins from the root bark of *Adina cordifolia* and their new thiosemicarbazone derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 5, p. 2252–9, maio 2009.

JAGER, B. V; STAMM, W. P. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. **Lancet**, v. 2, n. 7791, p. 1343–5, 23 dez. 1972.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 4, p. 564–95, jul. 2006.

KHANNA, V.; SHASTRI, B.; ANUSHA, G.; MUKHOPADHAYAY, C.; KHANNA, R. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in immunocompetent: A case report and review of literature. **Tropical parasitology**, v. 4, n. 2, p. 115–8, jul. 2014.

KLOTZ, S. A.; MISRA, R. P.; BUTRUS, S. I. Carbohydrate deposits on the surfaces of worn extended-wear soft contact lenses. **Archives of ophthalmology**, v. 105, n. 7, p. 974–7, jul. 1987.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine** : **nanotechnology, biology, and medicine**, v. 1, n. 3, p. 193–212, set. 2005.

LANDELL, M. F. et al. Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in Southern Brazil. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 290–4, jul. 2013.

LI, L.; SUN, X. Impaired innate immunity of ocular surface is the key bridge between extended contact lens wearing and occurrence of *Acanthamoeba* keratitis. **Medical hypotheses**, v. 70, n. 2, p. 260–4, jan. 2008.

LIMA, L.; MATZENBACHER, N. O gênero *Pterocaulon* Ell.(Asteraceae–plucheeae) no estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Sér. Bot**, 2008.

LIU, S.; JONES, L.; GU, F. X. Nanomaterials for ocular drug delivery. **Macromolecular bioscience**, v. 12, n. 5, p. 608–20, maio 2012.

LOEUILLE, B.; MONGE, M. *PTEROCAULON* IN **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.ibri.gov.br/jabot/floradobrasil/FB27336>>. Última edição em 27 de setembro de 2014. Último acesso em 22 de junho de 2015

LORENZO-MORALES, J. KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in parasitology**, v. 29, n. 4, p. 181–7, abr. 2013.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite (Paris, France)**, v. 22, p. 10, jan. 2015.

MACIVER, S. K.; ASIF, M.; SIMMEN, M. W.; LORENZO-MORALES, J. A systematic analysis of *Acanthamoeba* genotype frequency correlated with source and pathogenicity: T4 is confirmed as a pathogen-rich genotype. **European journal of protistology**, v. 49, n. 2, p. 217–21, maio 2013.

MAGNET, A.; HENRIQUES-GIL, N.; GALVÁN-DIAZ, A. L.; IZQUIEDO, F.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. **Parasitology research**, v. 113, n. 8, p. 2845–50, ago. 2014.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 2, p. 273–307, abr. 2003.

MARTÍNEZ, A. J. Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection? **Neurology**, v. 30, n. 6, p. 567–74, jun. 1980.

MENGHI, C.; GATTA, C.; CARIDE, M. C. *Acanthamoeba* sp.: un caso de queratitis no relacionada con el uso de lentes de contacto. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 44, n. 4, p. 275–277, 2012.

NAGINTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE, A. D. Amoebic infection of the eye. **Lancet**, v. 2, n. 7896, p. 1537–40, 28 dez. 1974.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, 2011.

PAGE, F. C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **The Journal of protozoology**, v. 14, n. 4, p. 709–24, nov. 1967.

PANJWANI, N. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **The ocular surface**, v. 8, n. 2, p. 70–9, abr. 2010.

PENS, C. J.; DA COSTA, M.; FADANELLI, C.; CAUMO, K.; ROTT M. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology research**, v. 103, n. 6, p. 1241–5, nov. 2008.

POLAT, Z. A.; WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; VURAL, A.; DURSUN, A.; ARICI, M. K. Miltefosine and polyhexamethylene biguanide: a new drug combination for the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical & experimental ophthalmology**, v. 42, n. 2, p. 151–8, mar. 2014.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphology of cystic wall and taxonomy of genus *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, 1977.

QVARNSTROM, Y.; DA SILVA, A. J.; SCHUSTER, F. L.; GELMAN, B. B.; VISVESVARA, G. S. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 8, p. 1139–42, 15 abr. 2009.

REDDY, R.; VIJAYASARADHI, M.; UPPIN, M. S.; CHALLA, S.; JABEEN, A.; BORGHAIN, R. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in an immunocompetent patient: an autopsy case report. **Neuropathology** : official journal of the Japanese Society of Neuropathology, v. 31, n. 2, p. 183–7, abr. 2011.

RÓDIO, C.; DA ROCHA VIANNA, D.; KOWALSKI, K. P.; PANATIERI, L. F.; VON POSER, G.; ROTT, M. B. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology research**, v. 104, n. 1, p. 191–4, dez. 2008.

SATLIN, M. J.; GRAHAM, J. K.; VISVESVARA, G. S.; MENA, H.; MARKS, K. M.; SAAL, S. D.; SOAVE, R. Fulminant and fatal encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a kidney transplant recipient: case report and literature review. **Transplant infectious disease** : an official journal of the Transplantation Society, v. 15, n. 6, p. 619–26, dez. 2013.

SAUTER, I. P.; DOS SANTOS, J. C.; APEL, M. A.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; VON POSER, G. L.; ROTT, M. B. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. **Parasitology research**, v. 109, n. 5, p. 1367–71, nov. 2011.

SCHMIDT, T. J. KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M.V.; LAGO, J. H.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIM, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; DE N C SOEIRO M.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2176–228, jan. 2012.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 9, p. 1001–27, ago. 2004.

SEIJO MARTINEZ, M. et al. Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3892–5, out. 2000.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 6, jan. 2012.

SMIRNOV, A. V.; CHAO, E.; NASSONOVA, E. S.; CAVALIER-SMITH, T. A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). **Protist**, v. 162, n. 4, p. 545–70, out. 2011.

STEIN, A. C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 211–4, 3 jun. 2005.

STEIN, A. C.; ALVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 95–8, 11 ago. 2006.

STOPIGLIA, C. D. O.; DA ROCHA VIANNA, D.; DE CARVALHO MEIRELES, G.; TEIXEIRA, H.; VON POSER, G. Antifungal activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*. **Journal de mycologie médicale**, v. 21, n. 3, p. 169–72, set. 2011.

SYAM, P. P.; NARENDRAN, R.; VAN DER HOEK, J. Persistent *Acanthamoeba* keratitis in a non-contact lens wearer following exposure to bird seed dust. **The British journal of ophthalmology**, v. 89, n. 3, p. 388–9, mar. 2005.

TAMILVANAN, S.; BENITA, S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics** □ : official journal of **Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 58, n. 2, p. 357–68, set. 2004.

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**, v. 60, n. 6, p. 399–405, dez. 2012.

TRIPATHI, R.; TRIPATHI, B. Lens spoilage. **Contact Lenses: The Contact Lens Assoc. Opth. Guide to Basic Science and Clinical Practice** (Diabetes O, ed.). pp. 45.1-45.33, 1984.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed research international**, v. 2013, p. 963248, jan. 2013.

VIANNA, D.; CORVELLO, F.; RÓDIO, C.; BRUXEL, F.; VELHO, A.; CARVALHO, E. S.; VON POSER, G.; TEIXEIRA, H. Spectrophotometric determination of coumarins incorporated into nanoemulsions containing *Pterocaulon balansae* extract. **Latin American Journal of pharmacy**, V. 30, n. 8, p. 1487-91, jun. 2011.

VISVESVARA, G. S.; MARTINEZ, A. J.; SCHUSTER, F. L.; LEITCH, G. J.; WALLACE, S.V.; SAWYER, T.K.; ANDERSON, M. Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2750–6, dez. 1990.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1–26, jun. 2007.

VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L.; MARTINEZ, A. J. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 40, n. 4, p. 504–14, jan. 1993.

WINCK, M. A. T.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in rio grande do Sul, Brazil. **Current microbiology**, v. 63, n. 5, p. 464–9, nov. 2011.

ZHANG, X.; SUN, X.; JIANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; DENG, S.; LABBÉ, A.; A new in vivo confocal microscopy prognostic factor in *Acanthamoeba* keratitis. **Journal français d'ophtalmologie**, v. 37, n. 2, p. 130–7, fev. 2014.

CAPÍTULO II

Parte experimental

A parte experimental está apresentada na forma de artigo científico em elaboração

NANOEMULSION CONTAINING *n*-HEXANE EXTRACT OF *PTEROCAULON BALANSEAE* FOR THE TREATMENT OF OCULAR *ACANTHAMOEBA* KERATITIS

Lua Ferreira Panatieri¹, Gilsane Lino von Poser¹, Nathalya Tesch Brazil¹, Bruna Medeiros Neves¹, Marilise Brittes Rott², Giovanni Konat Zorzi¹, Helder Ferreira Teixeira^{1,#}

¹ Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, 2752 Ipiranga, 90610-000, Porto Alegre, Brazil.

² Graduate Program of Agricultural and Environmental Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, 500 Sarmiento Leite, 90050-110, Porto Alegre, Brazil.

#Corresponding author: Helder Ferreira Teixeira

E-mail: helder.teixeira@ufrgs.br

Telephone: +55 51 33085514

Fax: +55 51 33085437

ABSTRACT

This study described the incorporation of a coumarin-rich extract from *Pterocaulon balansae* into nanoemulsions intended to local treatment of ocular keratitis caused by *Acanthamoeba*. The *n*-hexane extract of *P. balansae* was first characterized by high performance liquid chromatography with photodiode array detector. The presence of 4 major coumarins was detected, where 5-methoxy-6,7-methylene dioxy coumarin was selected as chemical marker. This extract was then incorporated into nanoemulsions composed of medium chain triglycerides and egg-lecithin, through spontaneous emulsification. Such a procedure showed the formation of monodisperse nanoemulsions in a sub 300 nm range, regardless the amount of extract incorporated (1.0-5.0 mg/mL). The amoebicidal activity against *Acanthamoeba castellanii* was both dose-dependent and incubation time-dependent. A reduction of 95% of trophozoites viability was detected after 24h of incubation with nanoemulsion at 1.25 mg/mL of extract, being a similar effect detected for chlorhexidine. Finally, *in vitro* cytotoxicity studies showed that human corneal epithelial cells were unaffected after incubation with nanoemulsions by MTT assay. These results suggest a potential of the formulations developed in this study as a new strategy for the treatment of ocular keratitis caused by *Acanthamoeba*.

Keywords: nanoemulsion, *Acanthamoeba*, *Pterocaulon balansae*, coumarins, ocular keratitis

1 INTRODUCTION

Free-living amoeba of *Acanthamoeba* genus are among the protozoa with broadest distribution, being found in soil, water and air [1]. They are present in two different forms: the metabolic active trophozoite and the resistant form of cyst. Some species can behave as facultative parasites, where the infection is either accidental or opportunistic, in immunosuppressed patients [2-4]. The main pathology associated to *Acanthamoeba* infection is the ocular keratitis, a chronic inflammation of the eye surface (especially cornea) that may eventually lead to blindness [5]. The treatment is unspecific and usually restrict to combination of topical antiseptic, as chlorhexidine and biguanides [6, 7]. The presence of the cyst form adds additional obstacles for the treatment, which may take a few months to several years, even involving corneal transplantation [8]. In this scenario, the search for new therapeutic strategies is a need for this emergent parasite.

Many compounds that show amoebicidal activity also share other activities as bactericidal or antifungal. The folk medicine has attributed to some species of *Pterocaulon* (Asteraceae) antiseptic, antifungic and antiparasitic activity which has been corroborated by extensive literature [9-13]. Broad spectrum activity against pathogenic fungi and amoebicidal activity against *Acanthamoeba castellanii* has been reported to the *n*-hexane extract of *Pterocaulon* spp., as well as isolated compounds of this extract [14-16]. The most import secondary metabolites found in *n*-hexane fraction extract are coumarins. The antiparasitic activity of coumarins has been reported against some species of protozoa [17-19]. However, the low aqueous solubility of these coumarins limits their application.

Due to the particular characteristics of the ocular route, which significantly reduces drug bioavailability, the design of pharmaceutical dosage forms only allows a few approaches to be successful for highly lipophilic compounds. Among them there is the use of oil-in-water nanoemulsions for topical application on the ocular surface. These nanoemulsions are composed of fine

oil droplets, dispersed in water, stabilized by a surfactant. So, lipophilic coumarins could be associated to the oil core-surfactant phase, whereas maintain the major aqueous behavior of the formulations. Furthermore, the kinetic stability of the nanoemulsion, the high surface area provided due to the small size and possibility to control the release of the active compound are some of the important feature that add values to this approach [20, 21].

So, the aim of this study is to investigate the potential of nanoemulsions associating the hexanic extract of *P. balansae* as a new treatment for ocular keratitis caused by *Acanthamoeba*. For this, the characterization of the physicochemical properties of the nanoemulsion, and their biological activity in terms of amoebicidal and cytotoxic effect were evaluated.

2 EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Materials

The materials for the nanoemulsion preparation were egg lecithin (Lipoid E-80, Lipoid, Germany) and medium chain triglyceride (MCT) (Delaware, Brazil). Ethanol and acetone were purchased from Nuclear Ltda., Brazil). 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma-Aldrich (MO, United States). The preparation of the culture media took DMEM/F12 (Gibco, NY, United States), yeast extract (Acumedia, MI, United States), Peptone (Himedia, India). Sodium chloride, glucose and sodium bicarbonate were obtained from Vetec (Brazil).

2.2 Plant specimen

The aerial parts of *Pterocaulon balansae* Chodat were collected in the city of Canoas, RS-Brazil, in February 2013. The species was identified by Dr. Sérgio A. L. Bordignon (Centro Universitário La Salle- Canoas, UNILASALLE, Brazil). Voucher specimen was deposited in the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN 157762). Plant collection was authorized by Environment Ministry (Ministério do Meio Ambiente- MMA), Chico Mendes

Institute for Biodiversity Conservation (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade- ICMBio), Authorization System and Information on Biodiversity (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade- SISBIO) (number 38017-1).

2.3 Preparation and characterization of the extract

The extract was prepared by maceration of *Pterocaulon balansae* leaves in *n*-hexane in the ratio of (1:10 [w/v]). The *n*-hexane was removed and replaced by fresh solvent every 24 h, during 4 days. The solvent of the pool of *n*-hexane extract was filtered and evaporated in rotavapor. Dewaxing was performed by solubilizing the dry extract in acetone and filtering with paper filter. The filtered acetone solution was evaporated to dryness and this residue redissolved in 1 mL of dichloromethane. This final solution was evaporated and the final dry residue used in the further experiments. The coumarins content present in the *n*-hexane extract was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). For this, 5.0 mg of the extract were solubilized in 800 mg of MCT and 10 mL of acetone, and 60 μ L of this solution were solubilized in a final volume of 5 mL of acetonitrile:water (1:1[v/v]). The sample was filtered in a 0.45 μ m filter to the HPLC vial.

2.4 Chromatographic conditions and apparatus

The HPLC apparatus consisted of a Shimadzu liquid chromatography system (Proeminence LC-20AT, Shimadzu, Japan) equipped with autosampler (Proeminence SIL-20A, Shimadzu, Japan) and column oven (Proeminence CTO-20A, Shimadzu, Japan). Two similar equipments with different detectors were used: an UV/VIS detector at 327 nm (Proeminence SPD-20AV, Shimadzu, Japan) was used for determination of coumarin content in the formulation, while a diode array detector (Proeminence SPD-M20A, Shimadzu, Japan) that recorded UV spectra in the range of 230–400 nm was used for the characterization of the *n*-hexane extract. Coumarins were analyzed using a Phenomenex-C₁₈ Synergi column (150 mm \times 4.6 mm, 4 μ m) coupled to a refillable pre-column filled with C₁₈ silica. The mobile phase consisted of a gradient of acetic acid 2% (A) and acetonitrile (B) filtered and degassed. The

gradient elution was 17% B in 0.01 min, 17–20% B in 10 min, 20% B in 15 min, 20–25% B in 20 min, 25–27% B in 22 min, 27–30% B in 25 min, 30–35% B in 30 min, 35% B in 35 min, 35–17% B in 40 min. LC system operated at flow rate of 1 mL/min for 45 min at 30 °C with the injection volume of 20 µL.

2.5 Validation of an HPLC method for 5MMDC determination

To determine the total coumarins content in the *P. balansae* *n*-hexane extract-loaded nanoemulsions, an LC method was developed and validated using 5-methoxy-6,7-methylenedioxcoumarin (5MMDC) as a reference compound, based on the ICH [22], as follows:

- a) The specificity of the method was examined through the presence of interference or overlaps with the *n*-hexane extract of *P. balansae* in comparison with solutions of the blank nanoemulsions.
- b) For linearity experiments, solutions of 5MMDC were prepared at five concentrations within the range of 0.5–10.0 µg/mL on 3 different days. The results were represented graphically, which allowed for the evaluation of the calibration curve and coefficient of determination. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined based on the standard deviation of the response and the slope, using the calibration curve data. Analysis was performed in triplicate.
- c) The intra-day precision (repeatability) of the method was determined by analysis of five samples of 5MMDC for each point of the calibration curve (three replicates each), during the same day, under the same experimental conditions. Inter-day precision values were obtained by assaying freshly prepared solutions of 5MMDC on 3 different days. The results were expressed in relative standard deviation (RSD %).
- d) To determine the accuracy, the aqueous extract was prepared and spiked with known amounts of analyte at the three concentrations of the 5MMDC solution: low, medium and high, corresponding to 0.5; 4.0 and 7.0 µg/mL, respectively, performing five determinations for each concentration. The results represent the mean recovery (%) for three independent samples.

2.6 Preparation and characterization of the nanoemulsions

The nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification as previously described. Blank nanoemulsion (NEB) were prepared mixing an ethanolic phase, consisting of 200 µg of lecithin and 800 mg of MCT in 30 mL of ethanol, to an aqueous phase (60 mL) under magnetic stirring. For the preparation of nanoemulsions with extract (NEE), different amounts of extract (10, 25 or 50 mg) were previously solubilized in 6 mL of acetone and added the ethanolic phase. After that, the solvent was removed and the volume reduced in a rotavapor (Büchi, Germany) until 10 mL of formulation.

Both size and the zeta potential of the formulations were measured in a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK) after proper dilution of the samples in 1mM NaCl solution (1:1000 dilution). The average size of the nanoemulsion was characterized by dynamic light scattering at the angle of 90° and 25°C, using the method of the cumulants; meanwhile the zeta potential was characterized by mixed laser Doppler velocimetry and phase analysis light scattering (M3-PALS).

Morphological evaluation was performed by transmission electron microscopy (Jeol, JEM-1200 EX II, Japan). The samples were conveniently diluted in water and 2% uranyl acetate was used as contrast agent. The coumarins content of the formulations were evaluated by HPLC-UV, under the chromatographic conditions described above. Aliquots of 300, 120 and 60 µL of the 1.0, 2.5 and 5.0 mg/mL NEE, respectively, and 60 µL of the NEB were prepared as described for the extract.

2.6 *Acanthamoeba* culture

The experiments were conducted with a clinical strain of *Acanthamoeba castellanii* (American Type Culture Collection 50492), genotype T4. The trophozoites were axenically grown in PYG medium (0.75% [w/v] proteose peptone, 0.75% [w/v] yeast extract, and 1.5% [w/v] glucose) containing 100 U penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively) (Sigma-Aldrich,

Germany). Amoebae were grown in 25 cm² flask-bottles at 30 °C. When necessary, the detachment of the amoeba from the bottom of the flask was performed by chilling on ice for 5 minutes.

2.7 Amoebicidal activity experiments

For testing the amoebicidal activity of the nanoemulsions, 2×10^4 trophozoites were seeded in 96-well plate 24h before the experiment. The media was replaced for fresh media and different concentrations of extract in NEE (0.25, 0.625 or 1.25 mg/mL) were added, or the respective volume of NEB, as control. The trophozoites were incubated with the formulation during 3, 6 or 24 h. After this period the formulations were removed and replaced with fresh media. The number of viable trophozoites was counted using trypan blue (0.4% in PBS, Sigma-Aldrich, Germany) in Fuchs-Rosenthal chamber at the end of 24h of the beginning of the experiment.

2.8 Cell culture

Human corneal epithelial (HCE) cells were kindly supplied by Dr. Araki Sasaki and RIKEN Cell Bank (Japan). The cells were cultured in DMEM/F-12 with 15% fetal bovine serum (Gibco, Brazil), penicillin-streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively), 0.5% DMSO (Sigma, Germany), 10 ng/mL EGF (Gibco, Brazil), and 0.1 µg/mL human insulin (Gibco, Brazil). The cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Passage numbers 68 to 73 were used for the following experiments.

2.9 *In vitro* cytotoxicity

Cell viability of HCE cells was evaluated by MTT after incubation with the formulations at different concentrations[23]. For that, the formulations were prepared in aseptic conditions to minimized possible interference, as described in previous sections. HCE cells were seeded in a density of 1.2×10^4 cell/well in a 96-well microtiter plate (Nest Biotech Co., China). After 24 h, the culture medium was replaced by a serial dilution of formulations from 0.2 mg/mL to 2.4 mg/mL of extract (for NEE), or its equivalent in terms of volume (for NEB), and incubated for 3h. After this time the formulation was removed and washed with

PBS. After that, the cells were incubated for 3h with 5 mg/mL MTT solution, solubilized in PBS, for the conversion of MTT to insoluble formazan. Then, the media was removed and washed with PBS and the insoluble purple crystals were solubilized in DMSO (100 μ L/well). The absorbance of this solution was read spectrophotometrically at 570nm. The results were expressed as percentage of the negative control (untreated cells) and positive control (0.1% Triton X-100) was also used of experiment control. Each data point was replicated six times for each of the independent experiments (n=3).

2.10 Statistics

All experiments were performed in triplicate in three independent experiments, except if stated otherwise. The results were analyzed by ANOVA, followed by Tukey test ($p < 0.05$).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Extract characterization

The *n*-hexane extract of the aerial parts of *P. balansae* was analyzed by HPLC-PDA showing the presence of four main coumarins (**Figure 1**): 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin; 7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-methoxy coumarin; 5-(2,3-epoxy-3-xmethylbutyloxy)-6,7-methylenedioxy coumarin; 5,6-dimethoxy-7-(2',3'-epoxy-3-methylbutyloxy) coumarin. The presence of these coumarins corroborates to previous studies about chemical constitution of *P. balansae* Chodat [19, 24, 25], and the 5MMDC shows retention time of approximately 24 min. The total content of coumarin corresponding to 14.91% of the *n*-hexane extract.

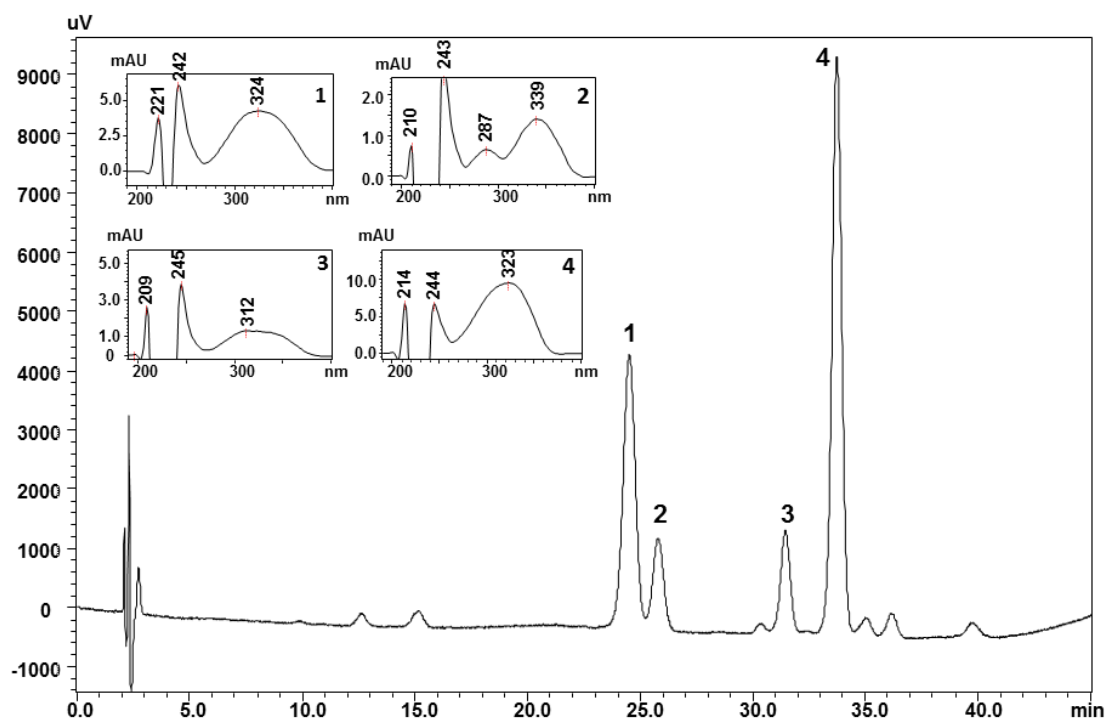


Figure 1. Chromatogram and PDA spectra of *n*-hexane extract of *P. balansae* obtained by maceration. Signals refer to 5-methoxy-6,7-methylenedioxcoumarin (1), 7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-methoxycoumarin (2), 5-(2,3-epoxy-3-xmethylbutyloxy)-6,7-methylenedioxcoumarin (3) and 5,6-dimethoxy-7-(2',3'-epoxy-3-methylbutyloxy) coumarin (4).

3.2. Validation of an HPLC method for 5MMDC quantification

The first analytical experiments were performed in order to evaluate whether nanoemulsion excipients could interfere over 5MMDC quantification since they are stabilized by egg- lecithin, which is a complex mixture of phospholipids (mainly phosphatidylcholine) combined with other substances such as carbohydrates, fatty acids, and triglycerides [26, 27]. The mobile phase composition, as well as the other chromatographic conditions, was chosen in order to obtain efficient routine analysis. The specificity was carried out through the comparison of the peak retention time of the coumarins and a blank nanoemulsion. No interference of the emulsion excipients was noticed since no peak was detected after injection of blank nanoemulsion at set wavelengths (**Figure 2**). In the employed chromatographic conditions, 5MMDC presented a retention time of approximately 23 min.

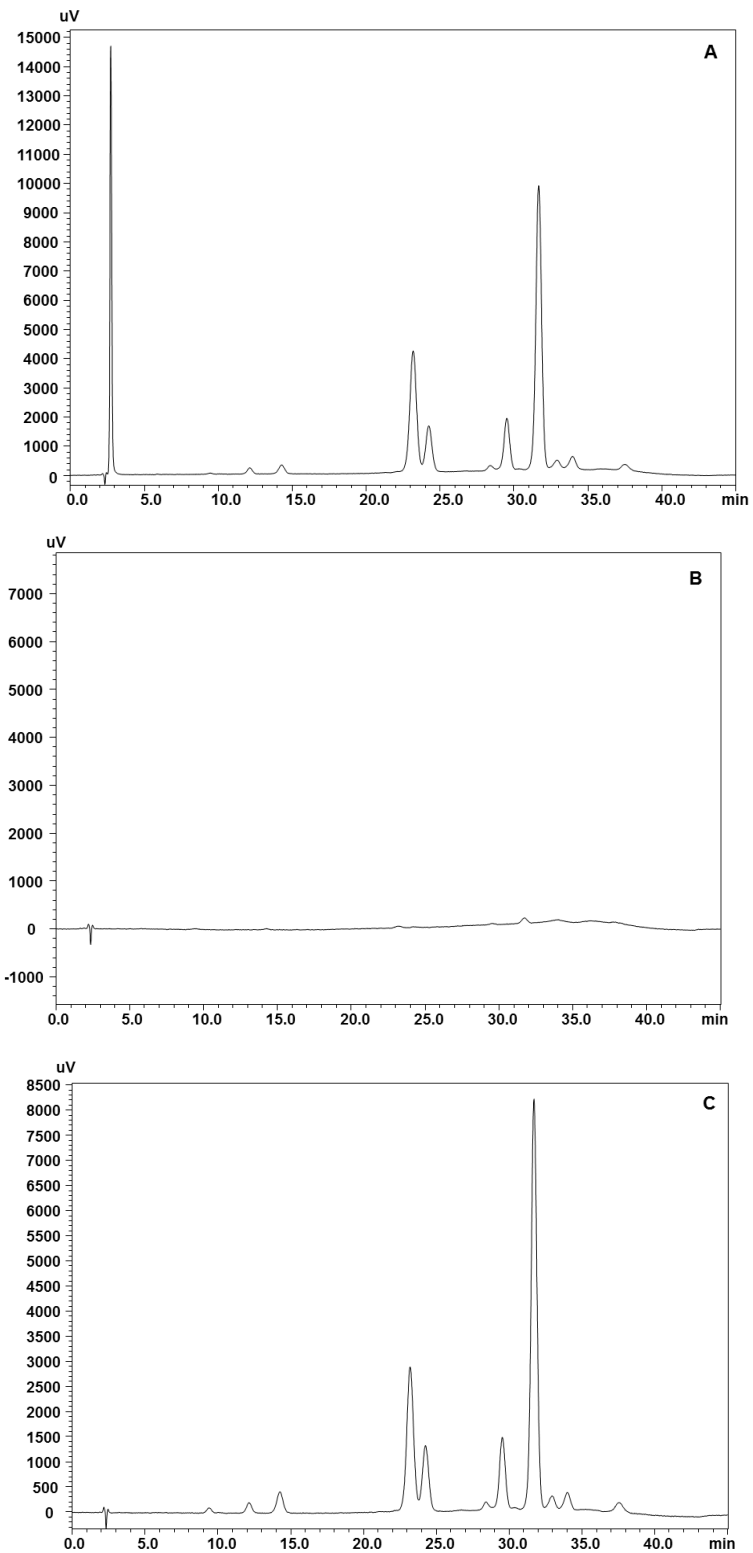


Figure 2. Chromatograms of: A) *n*-hexane extract, B) blank nanoemulsions (NEB), and C) extract-loaded nanoemulsion (NEE; 5 mg/mL). UV detection at 327 nm.

The linearity of the method was assessed by means of the concentration of 5-MMDC *versus* the corresponding mean peak area. The standard curve for quantitation of 5-MMDC was obtained in a concentration range between 0.5 and 10 µg/mL. The equation of the straight line obtained by linear regression by the least squares method was $y = 54389x + 1563.5$. The coefficient of determination (r^2) obtained was 0.9991, which demonstrates the high relationship between the concentration of 5-MMDC and the area of the chromatogram. Thus, the results demonstrate that the method is linear within the concentration range specified, showing a significant linear regression ($p < 0.05$). The sensitivity of the method was evaluated by determining the limits of detection and quantification. In this context, the determination of limits of detection and quantification was based on standard deviation of the response and slope of the calibration. The LOD and LOQ were 0.062 and 0.187 µg/mL, respectively, demonstrating satisfactory sensitivity of the method.

The precision of the method was assessed considering repeatability (intra-day analysis) and intermediate precision (inter-day analysis). The results were expressed as relative standard deviation and are shown in **Table I**. The intra- and inter-day precisions presented R.S.D. values lower than 2.38 % for 5MMDC, which were considered satisfactory for the purpose of the analysis[22].

Table I. Intra-day and inter-day precision of LC assay of 5MMDC.

Concentration (µg/mL)	Day 1 peak area (µV s) ^a	Day 2 peak area (µV s) ^a	Day 3 peak area (µV s) ^a	Intra-day R.S.D. (%) ^b	Inter-day R.S.D. (%)
0.50	29082	29976	29074	1.08-3.84	1.76
1.01	55785	55539	54498	0.29-1.69	1.23
2.54	142009	139755	137642	0.30-0.63	1.56
5.08	283052	279569	278308	0.15-0.40	0.88
7.62	422658	415623	407857	0.29-0.33	1.78
10.16	565399	555755	539283	0.21-0.28	2.38

The accuracy of the method was determined by the recovery test. As can be seen in **Table II**, whatever the amount of 5MMDC added in blank nanoemulsions, the recoveries ranged from 99.31 to 102.04% of 5MMDC, indicating a good agreement between amounts added and found.

Table II. Accuracy of LC assay for 5-methoxy-6,7-methylenedioxcoumarin.

Added ($\mu\text{g/mL}$)	Found ($\mu\text{g/mL}$)	Recovered (%)
3.599	3.595	99.31
7.155	7.237	102.04
10.203	10.210	100.11

3.3 Characterization of the nanoemulsions

The relevance of *Acanthamoeba* infection in the past years has grown due to increase in the numbers of cases. Treatment for keratitis is unspecific, long term and with low patient compliance, being the search of new treatment strategies a need. The plant genus *Pterocaulon* is used in folk medicine as topical antimycotic, and non-aqueous extracts of some species had their activity proved. In this way they may as well exhibit amoebicidal activity once many fungicides also present amoebicidal effect. Nevertheless these extracts present poor water solubility, which may limit their application. In this scenario, nanoemulsions are a fine strategy for association of lipophilic drugs and due to their high surface area are especially suitable for topical application, such as the ocular surface. So, lecithin/MCT nanoemulsions were prepared to incorporate the dry *n*-hexane extract of *Pterocaulon balansae* in the final concentration of 1.0, 2.5 and 5.0 mg/mL. The final aspect was a milky greenish formulation without any aggregates or visible precipitation. Relevant physicochemical parameters of the resulting formulations were analyzed and the results are exposed in **Table III**.

Table III. Physicochemical properties of nanoemulsions prepared in this study.

	Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	Content of total coumarins (mg/mL)
NEB	254 ±56	0.188	-34.3 ±0.7	-
NEE 1.0	295 ±86	0.178	-32.4 ±8.9	0.154 ± 0.015
NEE 2.5	251 ±37	0.140	-19.6 ±4.6	0.380 ± 0.055
NEE 5.0	276 ±54	0.215	-21.5 ±5.9	0.705 ± 0.037

The final size of nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification is dependent on the final interfacial tension of the oil-water interface and the free energy provided by the solvents. The average size observed was around 250-300 nm, in accordance to other formulation with similar composition [28, 29]. The incorporation of extract did not change statistically the mean average size of the droplets even for final concentration as high as 5 mg/mL. In this way the diffusion of solvents remained unchanged, as well as the final surface tension, regardless the presence of the extract. Sizes higher than 120 nm could be beneficial for ocular administration once they may result in escape from the normal endocytic routes [30]. Endocytosis generally happens for mean sizes of 80 and 90-120 nm for clathrin and caveolin, respectively [31].

The zeta potential of NEE was negative, ranging from -32 mV to -20 mV. Even though no statistical significance was observed between de NEE ($p < 0.05$), increasing amount of the extract seems to change the ion distribution on the surface of the nanoemulsion. The result of this new layout of ions would be the increase of zeta potential detected. Many coumarins are known to interact with phospholipid bilayers, changing the transition temperature and resulting in loss of homogeneity [32]. The zeta potential will play both roles in the stability and biological interactions of colloidal structures. Colloids as nanoemulsion are basically stabilized by electrostatical repulsion and steric hindrance [33]. Higher the value of the zeta potential, higher will be the repulsion and thus the stability [34]. In terms of biological effect, the surface charge of the particle denoted by the zeta potential may restrict administration routes and favor interaction with

cells. Intraocular administration for instance demand negatively charge structures to avoid undesired interaction to glycosaminoglycans [35]. Concretely for the ocular surface, negative nanostructures interact less to the ocular surface than positively charged ones, but also exhibit a more favorable toxic profile [36, 37]. This interaction, however, is higher than for neutral colloids. The final content of total coumarins (expressed in terms of 5MMDC) exhibited a linear dose-dependency on the amount of coumarins added to the formulation, as expected. This may indicate that the amount of dry extract used did not extrapolate the capacity of the internal phase in associate the coumarins.

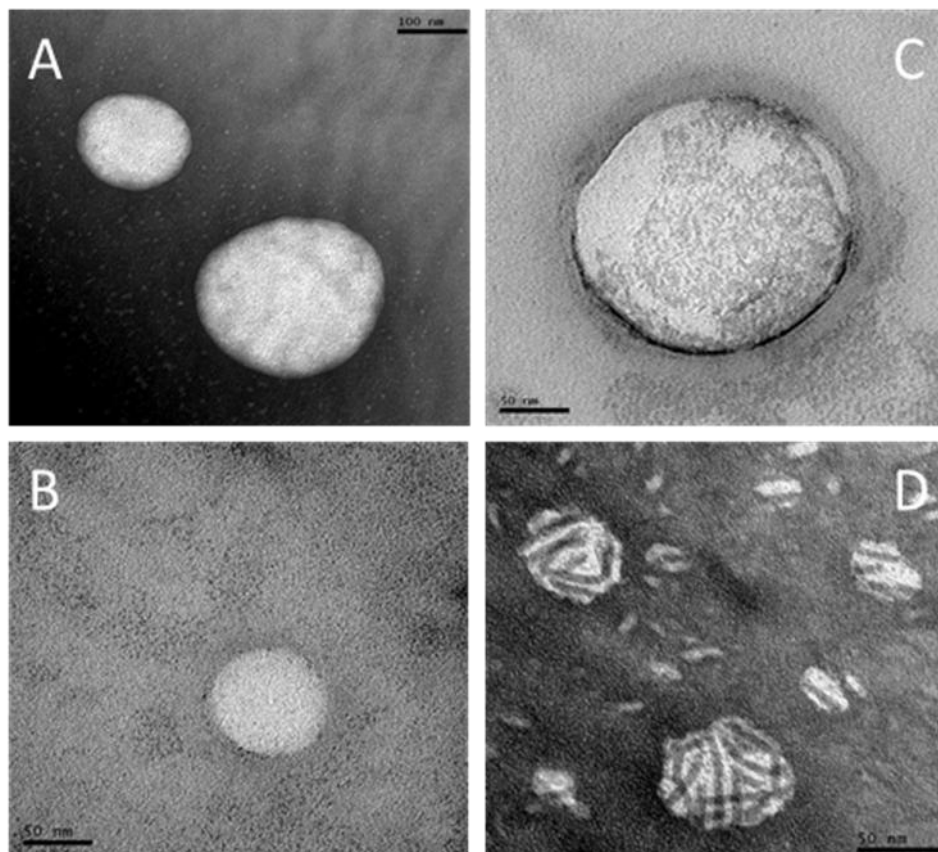


Figure 3. Transmission electron microscopy images of the nanoemulsion: A) blank nanoemulsion (NEB); B) nanomulsion with extract at 1.0 mg/mL (NEE 1.0); C) nanoemulsion with extract at 2.5 mg/mL (NEE 2.5); D) nanoemulsion with extract at 5.0 mg/mL (NEE 5.0).

The morphological analysis of the formulation is important to corroborate to the size results obtained by dynamic light scattering. The mathematical interpretation of the intensity of light scatter assumes the presence of spherical structures and will correlate the translational diffusion coefficient obtained to a sphere of same size. So, TEM analysis is an important tool to understand the structuration and formation of nanoemulsions. As observed in **Figure 3**, the nanoemulsion presented spherical shape with well define edges. All of them had size similar to observed by light scattering analysis (around 200 nm) (**Figure 3A-D**). It is not uncommon to observe smaller sizes for TEM than for dynamic light scattering, as for **Figure 3D**. This difference relies in technical principles: dynamic light scattering measures the hydrodynamic (structure + solvation water + solvation ions) radius whereas TEM identifies the real radius [38, 39]. Another explanation is because the dynamic light scattering results are usually expressed in terms of intensity of the light scattered. Once bigger particles scatter more light than smaller particles, in a non-linear relationship, distortions often occur [39].

3.4 Amoebicidal activity

The next step was the evaluation of the amoebicidal activity of the NEE. Once no major difference was found between the NEE formulations, the one with highest incorporation of extract was chosen to proceed the experiments (NEE 5.0). Previous studies have shown that keeping the volume of formulation to a minimum is of utmost importance (data not shown).

For better understanding the real effect of the extract the results were compared with both untreated control and 0.1% chlorhexidine solution (positive control). Especially for ocular route, not only the concentration of the desired formulation is important but also the exposure time. Thus the influence of the incubation time in the final result was also evaluated for 3, 6 and 24 h. The effect of NEB 5.0 on the viability of trophozoites of *Acanthamoeba* can be observed in **Figure 4**.

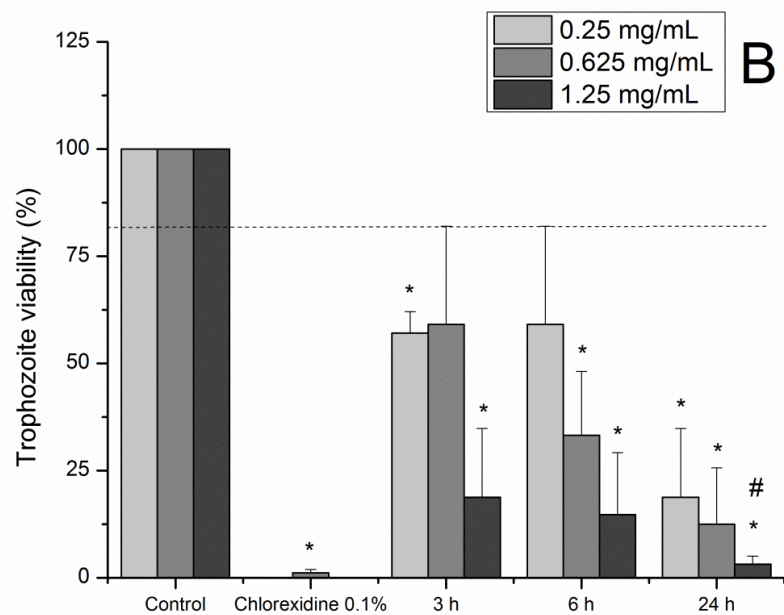
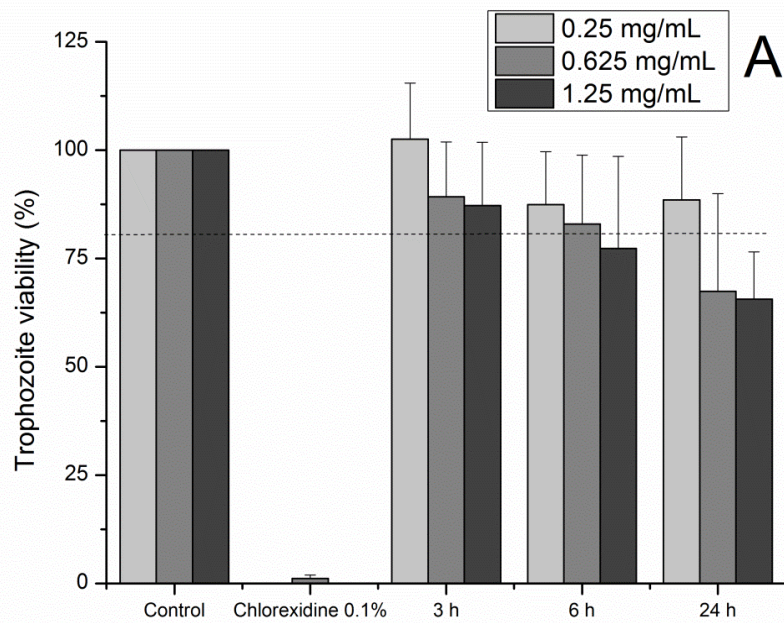


Figure 4. Viability of T4 trophozoites after incubation with A) NEB and B) NEE 5.0 during different times. Chlorhexidine 0.1% was used as positive control (24h treatment). *Statistically significant vs. Negative control # Equivalent to chlorhexidine control ($p < 0.05$).

As it can be seen in **Figure 4A**, the NEB did not have any statistical amoebicidal effect over the T4 trophozoite for the concentrations and incubation times tested. However, there seems to be a tendency towards the reduction of trophozoites count. These would be a dose-dependent and time-dependent influence, where the trophozoite viability fluctuates between 100-65%. There are a few reports in the literature about the antiparasitic effect of blank nanostructures. Recently blank nanocapsules were described to have anti parasitic effect against *Trichomonas vaginalis* [40]. The behavior shown in this experiment is yet to be understood.

The effect of NEE 5.0 is much more pronounced, being statistically different from the untreated control for all time points, except for the concentration of 0.625 and 3h incubation, where the high standard deviation observed for the experiment resulted in no significance (**Figure 4B**). As for the NEB, here a dose and time dependency was observe, however more pronounced. The mortality of trophozoites was around 45-98%. It is important to highlight that with long incubation times (24 h) and higher concentration of 1.25 mg/mL the amoebicidal activity was ~98 %, similar to chlorhexidine positive control (~99%).

Unfortunately, the extract itself could not be solubilized to provide a proper control of efficacy, due to the high lipophilicity. There are also some reports concerning the amoebicidal of surfactants, which could mask the effect of the extract, making this approach not a viable option [41]. DMSO also failed in solubilize the whole extract for comparison purposes. In this way the activity of the extract was obtained by comparing the activity of the NEE with the NEB. The NEB amoebicidal effect seems to stabilize at 65%, once no decrease in the trophozoite count was observed after 24 h for concentration of 0.625 mg/mL and 1.25 mg/mL. For almost all concentrations and time points tested there was a significant difference between NEB and NEE, meaning that the slight concentration, as low as 0.25 mg/mL, with a considerable low incubation time (3 h) could bring down the trophozoite viability. However, due to the high standard deviations no difference could be observed for the concentration of 0.25 mg/mL after 6 h of incubation.

Direct comparison between the effect of NEB and NEE 5.0 (**Figure 5**) makes clear the effect of the incorporation of the extract into the formulation. The incubation time of 24 h was the most effective, but even contacts as short as 3 h was also able to show a viability of ~55%. This highlights the importance of attaining a satisfactory residence time of the nanoemulsion on the ocular surface for possible *in vivo* application. Some studies have been reported the antiprotozoal activity of coumarines, but no one proposed to analyze the activity of the extracts, or isolated coumarins incorporated in formulation against *Acanthamoeba* spp [17, 19].

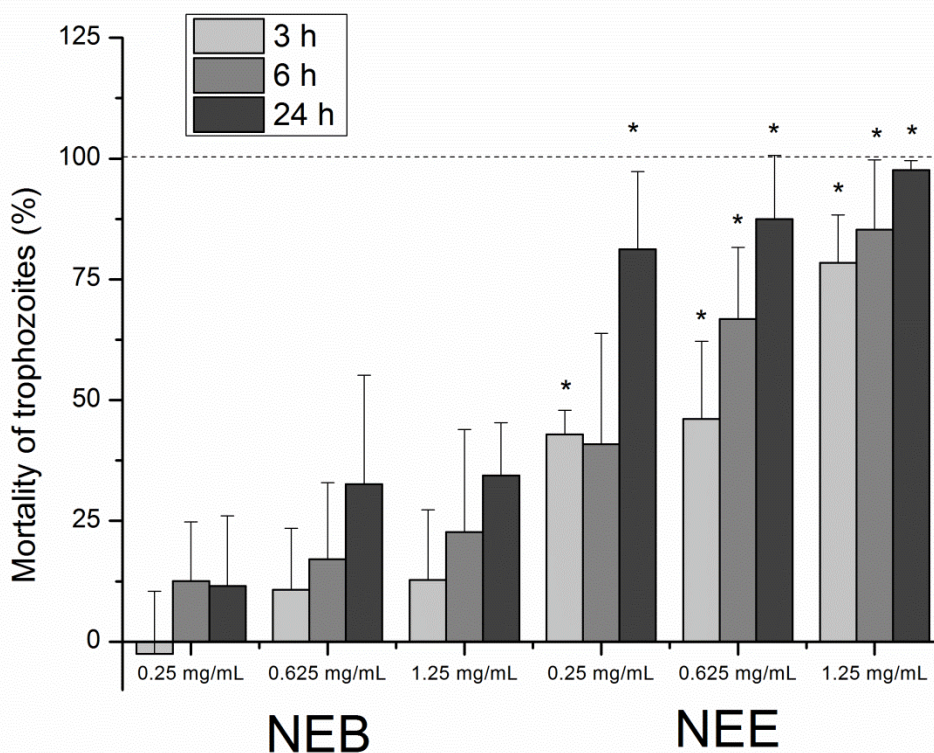


Figure 5. Comparison between the amoebicidal activity of NEB and NEE incubated for 3, 6 or 24 h. *Statistical difference of NEE vs. NEB of same concentration and incubation time.

3.5 Cytotoxicity

Estimation of ocular toxicity of new compounds is not a straightforward question. Many physiological conditions cannot be reproduced *in vitro*. Among the phenomena that face several difficulties to be reproduced with conventional techniques are the presence of tear and lacrimation, fast clearance due the metabolism and naso-lacrimal duct drainage, low retention of the formulation, presence of mucus, especially free soluble mucin and eyelid movement. This normally result in an over estimation of ocular when the results are compared to the *in vitro* tolerance and toxicity [42, 43]. Nevertheless, *in vitro* assays still are a valuable source to understand the biological behavior of new drug entities. The use of human corneal epithelial cells culture (HCE) is a well-established technique for the evaluation of cytotoxicity. In this study, the toxicity of both NEB and NEE was tested with the MTT assay after 3h of incubation, with concentrations ranging from 0.2 mg/mL to 2.4 mg/mL (**Figure 6**).

In respect to NEE (**Figure 6B**), they seem to be well tolerated for the HCE cells in a dose dependent fashion. As for the NEB, no significance from the control was observed ($p < 0.05$), but an apparent influence in the cell metabolism could be detected for concentrations starting from 2.0 mg/mL. Concentrations of 0.2-1.6 mg/mL resulted in viability up to 140%, for 0.2 mg/mL, but caution must be taken in order to draw any conclusion. This increasing in viability is yet to be fully understood but increase in cell proliferation or increasing metabolism due to the presence of exogenous material, the extract in special, are the main possibilities. The biological effect of coumarins in mammalian cells is usually antiproliferative [44-46]. The inhibition of growth can include mitochondria as primary target site [47, 48]. Taking this *in vitro* profile of toxicity, the formulations would be candidates for further *in vivo* studies to better understand the behavior of both NEE and NEB.

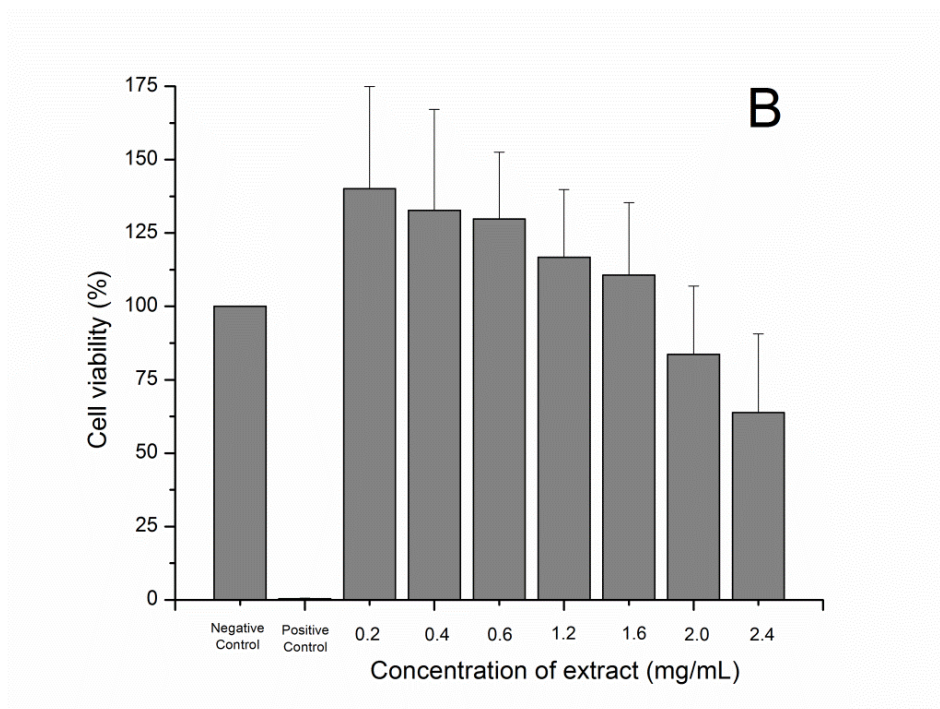
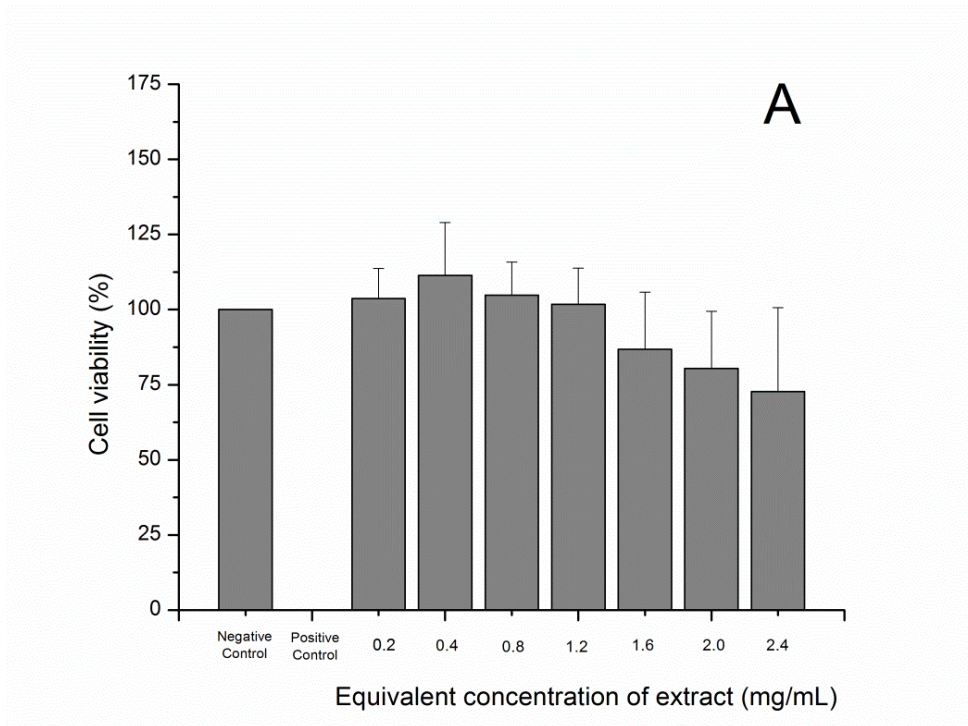


Figure 6. Cell viability of HCE cell after 3h incubation with the formulations: A) blank nanoemulsion (NEB); and B) extract-loaded nanoemulsion (NEE). For the NEB it was used the equivalent volume for a given concentration of NEE, and the results expressed in this concentration.

4 CONCLUSION

Treatment of ocular keratitis caused by *Acanthamoeba* is non-specific and with low patient compliance. The results suggest a promising potential in the use of the coumarin rich-*n*-hexane extract of *Pterocaulon balansae* as a new amoebicidal formulation. This highly lipophilic extract showed to be efficiently associated to oil-in-water nanoemulsions were its effect against trophozoites was comparable to current drugs. Allied to that, the low toxicity observed make this formulation a candidate for new strategies in the treatment of *Acanthamoeba*-related keratitis.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the financial support of CNPq and CAPES.

6 REFERENCES

- [1] Illingworth, C.D.; Cook, S.D., *Acanthamoeba* keratitis. *Surv Ophthalmol* **1998**, *42*, 493-508.
- [2] Visvesvara, G.S.; Moura, H.; Schuster, F.L., Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, **2007**, *50*, 1-26.
- [3] Panjwani, N., Pathogenesis of *Acanthamoeba* Keratitis. *Ocular Surface*, **2010**, *8*, (2), 70-79.
- [4] 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*, **2012**, *No prelo*, 7 páginas.
- [5] Khan, N.A., *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *Microbiological Review*, **2006**, *30*, 564-595.
- [6] Clarke, B.; Sinha, A.; Parmar, D.N.; Sykakis, E., Advances in the Diagnosis and Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. *Journal of Ophthalmology*, **2012**, *2012*, 6.
- [7] Control, C.o.D., <http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/>. **2012**, Last access on the 3rd of July 2012.

- [8] Marciano-Cabral, F.; Cabral, G., Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, *16*, 273-307.
- [9] Regner, G.G.; Giancesini, J.; Von Borowski, R.G.; Silveira, F.; Semedo, J.G.; Ferraz, A.d.B.F.; Wiilland, E.; Von Poser, G.; Allgayer, M.; Picada, J.N.; Pereira, P., Toxicological evaluation of Pterocaulon polystachyum extract: A medicinal plant with antifungal activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2011**, *31*, (1), 242-249.
- [10] Stopiglia, C.D.O.; da Rocha Vianna, D.; de Carvalho Meirelles, G.; Teixeira, H.; von Poser, G.L.; Scroferneker, M.L., Antifungal activity of Pterocaulon species (Asteraceae) against Sporothrix schenckii. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, **2011**, *21*, (3), 169-172.
- [11] Daboit, T.C.; Stopiglia, C.D.O.; Von Poser, G.L.; Scroferneker, M.L., Antifungal activity of Pterocaulon alopecuroides (Asteraceae) against chromoblastomycosis agents. *Mycoses*, **2010**, *53*, (3), 246-250.
- [12] Sauter, I.; dos Santos, J.; Apel, M.; Cibulski, S.; Roehe, P.; von Poser, G.; Rott, M., Amoebicidal activity and chemical composition of Pterocaulon polystachyum (Asteraceae) essential oil. *Parasitol Res*, **2011**, *109*, (5), 1367-1371.
- [13] Alarcón, R.; Flores, R.C.; Ocampos, S.; Lucatti, A.; Galleguillo, L.F.; Tonn, C.; Sosa, V., Flavonoids from Pterocaulon alopecuroides with Antibacterial Activity,. *Planta Medica*, **2008**, *74*, (12), 1463-1467.
- [14] Stein, A.C.; Sortino, M.; Avancini, C.; Zacchino, S.; von Poser, G., Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of Pterocaulon (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, *99*, (2), 211-214.
- [15] Stein, A.C.; Álvarez, S.; Avancini, C.; Zacchino, S.; von Poser, G., Antifungal activity of some coumarins obtained from species of Pterocaulon (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **2006**, *107*, (1), 95-98.
- [16] Ródio, C.; da Rocha Vianna, D.; Kowalski, K.; Panatieri, L.; von Poser, G.; Rott, M., In vitro evaluation of the amebicidal activity of Pterocaulon polystachyum (Asteraceae) against trophozoites of Acanthamoeba castellanii. *Parasitol Res*, **2008**, *104*, (1), 191-194.
- [17] Iqbal, P.F.; Bhat, A.R.; Azam, A., Antiamoebic coumarins from the root bark of Adina cordifolia and their new thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, *44*, (5), 2252-2259.
- [18] Camacho, M.d.R.; Phillipson, J.D.; Croft, S.L.; Yardley, V.; Solis, P.N., In vitro Antiprotozoal and Cytotoxic Activities of Some Alkaloids, Quinones, Flavonoids, and Coumarins. *Planta Medica*, **2004**, *70*, (1), 70-72.

- [19] Schmidt, T.J.; Khalid, S.A.; Romanha, A.J.; Alves, T.M.; Biavatti, M.W.; Brun, R.; Da Costa, F.B.; de Castro, S.L.; Ferreira, V.F.; de Lacerda, M.V.; Lago, J.H.; Leon, L.L.; Lopes, N.P.; das Neves Amorim, R.C.; Niehues, M.; Ogungbe, I.V.; Pohlit, A.M.; Scotti, M.T.; Setzer, W.N.; de N.C. Soeiro, M.; Steindel, M.; Tempone, A.G., The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. *Current Medicinal Chemistry*, **2012**, *19*, (14), 2176-2228.
- [20] Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J., Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2005**, *10*, (3-4), 102-110.
- [21] Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C., Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2004**, *108-109*, 303-318.
- [22] Committee., I.S. In *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*: Geneva, Switzerland, **2005**.
- [23] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, *65*, (1-2), 55-63.
- [24] Debenedetti, S.L.; De Kimpe, N.; Boeykens, M.; Coussio, J.D.; Kesteleyn, B., Structural revision of four coumarins from *Pterocaulon* species. *Phytochemistry*, **1997**, *45*, (7), 1515-1517.
- [25] Magalhães, A.F.; Magalhães, E.G.; Leitão Filho, H.F.; Frighetto, R.T.S.; Barros, S.M.G., Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *P. lanatum*. *Phytochemistry*, **1981**, *20*, (6), 1369-1371.
- [26] Rowe, R.C.; Sheskey, P.J.; Owen, S.C., Handbook of Pharmaceutical Excipients - In: Lecithin. **2003**, *APhA Publications*, (6th edition), 385-387.
- [27] Rowe, R.C.; Sheskey, P.J.; Owen, S.C., Handbook of Pharmaceutical Excipients - In: Medium-chain Triglycerides. **2003**, *APhA Publications*, (6th edition), 429-431.
- [28] Bidone, J.; Zorzi, G.K.; Carvalho, E.L.S.; Simões, C.M.O.; Koester, L.S.; Bassani, V.L.; Teixeira, H.F., Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts into topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. *Industrial Crops and Products*, **2014**, *62*, (0), 421-429.
- [29] Carvalho, E.L.S.; Poser, G.L.v.; Zorzi, G.K.; Teixeira, H.F.; Moreira, J.C.F.; Bassani, V.L. Nanoestrutura compreendendo extratos vegetais, processo de produção de nanoestrutura compreendendo extratos vegetais e composições compreendendo as mesmas. PI0805156-9 A2, 2008.

- [30] Iversen, T.-G.; Skotland, T.; Sandvig, K., Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, **2011**, 6, (2), 176-185.
- [31] Doherty, G.J.; McMahon, H.T., Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, **2009**, 78, (1), 857-902.
- [32] Sarpietro, M.G.; Giuffrida, M.C.; Ottimo, S.; Micieli, D.; Castelli, F., Evaluation of the Interaction of Coumarins with Biomembrane Models Studied by Differential Scanning Calorimetry and Langmuir–Blodgett Techniques. *Journal of Natural Products*, **2011**, 74, (4), 790-795.
- [33] Hunter, R.J. *Foundations of Colloid Science* 2nd edition ed. Oxford University Press: Oxford, **2001**.
- [34] Hunter, R.J. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications* Academic Press: London, **1989**.
- [35] Peeters, L.; Sanders, N.N.; Braeckmans, K.; Boussery, K.; de Voorde, J.V.; De Smedt, S.C.; Demeester, J., Vitreous: A barrier to nonviral ocular gene therapy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **2005**, 46, (10), 3553-3561.
- [36] Rabinovich-Guilatt, L.; Couvreur, P.; Lambert, G.; Dubernet, C., Cationic Vectors in Ocular Drug Delivery. *Journal of Drug Targeting*, **2004**, 12, (9-10), 623–633.
- [37] Sahoo, S.K.; Dilnawaz, F.; Krishnakumar, K., Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discovery Today*, **2008**, 13, (3/4), 144-151.
- [38] Amelinckx, S.; van Dyck, D.; van Landuyt, J.; van Tendeloo, G. *Electron Microscopy. Principles and Fundamentals*. Wiley-VCH: Darmstadt, Germany, **2008**.
- [39] Berne, B.J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Dover Publications, Inc.: Mineola, New York, **2003**.
- [40] Pradines, B.; Bories, C.; Vauthier, C.; Ponchel, G.; Loiseau, P.; Bouchemal, K., Drug-Free Chitosan Coated Poly(isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles Are Active Against *Trichomonas vaginalis* and Non-Toxic Towards Pig Vaginal Mucosa. *Pharm Res*, **2014**, 1-8.
- [41] Ezz Eldin, H.; Sarhan, R., Cytotoxic effect of organic solvents and surfactant agents on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Parasitol Res*, **2014**, 113, (5), 1949-1953.
- [42] Contreras-Ruiz, L.; Zorzi, G.K.; Hileeto, D.; Lopez-Garcia, A.; Calonge, M.; Seijo, B.; Sánchez, A.; Diebold, Y., A nanomedicine to treat ocular surface

inflammation: performance on an experimental dry eye murine model. *Gene Therapy*, **2013**, *20*, (5), 10.

[43] Zorzi, G.K.; Párraga, J.E.; Seijo, B.; Sánchez, A., Design of hybrid nanoparticles based on cationized gelatin and the polyanions dextran sulfate and chondroitin sulfate for ocular gene therapy. *Macromolecular Bioscience*, **2011**, *11*, (7), 905-913.

[44] Nasr, T.; Bondock, S.; Youns, M., Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide–hydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, *76*, (0), 539-548.

[45] El-Gamal, M.I.; Oh, C.-H., Synthesis, in vitro antiproliferative activity, and in silico studies of fused tricyclic coumarin sulfonate derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, *84*, (0), 68-76.

[46] Medeiros-Neves, B.; de Barros, F.M.C.; Teixeira, H.F.; von Poser, G.L., Phytochemical analysis of coumarins in aqueous extract of *Pteurocaulon balansae* (Asteraceae). *Industrial Crops and Products (submitted)*, **2015**.

[47] Mirunalini, S.; Deepalakshmi, K.; Manimozhi, J., Antiproliferative effect of coumarin by modulating oxidant/antioxidant status and inducing apoptosis in Hep2 cells. *Biomedicine & Aging Pathology*, **2014**, *4*, (2), 131-135.

[48] Thati, B.; Noble, A.; Rowan, R.; Creaven, B.S.; Walsh, M.; McCann, M.; Egan, D.; Kavanagh, K., Mechanism of action of coumarin and silver(I)–coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in Vitro*, **2007**, *21*, (5), 801-808.

CONCLUSÕES

- O extrato hexânico de *P. balansae* é constituído de quatro cumarinas majoritárias, sendo uma delas, a 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina (5MMDC), selecionada como marcador químico deste extrato;
- A validação da metodologia analítica para quantificação das cumarinas totais (calculadas em 5MMDC) nas nanoemulsões, por cromatografia líquida de alta eficiência, mostrou-se linear, precisa, exata e específica;
- O procedimento de emulsificação espontânea mostrou-se adequado para a obtenção de nanoemulsões monodispersas contendo o extrato hexânico de *P. balansae*, apresentando diâmetro de gotícula inferior a 300 nm, independente da quantidade de extrato incorporada.
- O estudo de atividade amebicida *in vitro* das formulações contra uma cepa de *Acanthamoeba castellanii* foi dependente da dose e do tempo de incubação. Após 24 horas de incubação, a formulação na concentração de 1,25 mg/mL reduz em cerca de 95% a viabilidade dos trofozoítos;
- Os estudos de citotoxicidade *in vitro* demonstraram que as células de epitélio de córnea humana (HCE) não foram afetadas com a incubação com as nanoemulsões, no tempo de 3 horas, através do ensaio de MTT;
- O conjunto dos resultados obtidos demonstra as potencialidades do extrato hexânico, rico em cumarinas de *Pterocaulon balansae*, associado à nanoemulsões como uma nova estratégia para o tratamento da ceratite ocular causada por *Acanthamoeba*.