

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Leonardo Fideles de Souza

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS POLIOXIDONIOMBATOS NA
INATIVAÇÃO DE *Acanthamoeba*

Belo Horizonte

2023

Leonardo Fideles de Souza

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS POLIOXIDONIOBATOS NA
INATIVAÇÃO DE *Acanthamoeba***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Oliveira Costa

Coorientador: Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira

Belo Horizonte

2023

S719a Souza, Leonardo Fideles de.
Avaliação de compostos polioxidoniobatos na inativação de *Acanthamoeba* [recurso eletrônico] / Leonardo Fideles de Souza. – 2023.
1 recurso eletrônico (70 f. : il.) : pdf
Orientadora: Adriana Oliveira Costa.
Coorientador: Luiz Carlos Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Acanthamoeba – Teses. 2. Ceratite – Teses. 3. Inativação de vírus – Teses. 4. Compostos de nióbio – Teses. I. Costa, Adriana Oliveira. II. Oliveira, Luiz Carlos Alves de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.96



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS POLIOXIDONIÓBATO NA INATIVAÇÃO DE *Acanthamoeba*"

LEONARDO FIDELIS DE SOUZA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia quatorze de novembro de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Profa. Cristiane Alves da Silva Menezes
UFMG

Profa. Raquel Virginia Rocha Vilela
UFMG

Prof. Luiz Carlos Alves de Oliveira - Coorientador
UFMG

Profa. Adriana Oliveira Costa, Orientadora
UFMG

Belo Horizonte, 14 de novembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério Superior**, em 14/11/2023, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Alves da Silva Menezes, Subcoordenador(a)**, em 14/11/2023, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Virginia Rocha Vilela, Professora do Magistério Superior**, em 16/11/2023, às 15:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Alves de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 21/11/2023, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2775487 e o código CRC 09C6F0EC.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à memória da minha querida mãe Maria Neide Fidelis de Souza e do meu amado avô Jonas Bispo, que já não estão mais entre nós. Eles foram fontes inesgotáveis de amor, sabedoria e inspiração ao longo da minha vida.

Minha mãe, mulher forte e corajosa. Seu amor incondicional e sua dedicação incansável foram fundamentais para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Sua partida deixou um vazio imenso em meu coração, mas sua presença continua viva em minhas lembranças e em cada passo que dou em direção aos meus sonhos.

Meu avô, sábio e gentil, sempre foi um exemplo de integridade e bondade. Suas histórias e ensinamentos me guiaram ao longo da vida, mostrando-me o valor da honestidade, do respeito e da perseverança. Sua ausência é sentida profundamente, mas sua memória permanece como uma luz que ilumina meu caminho.

A ambos, minha mãe e meu avô, dedico este trabalho como uma forma de honrar suas vidas e agradecer por todo o amor e apoio que me deram. Sei que, onde quer que estejam, estão orgulhosos de mim e torcendo pelo meu sucesso.

Que suas almas descansem em paz e que eu possa honrar sua memória através do meu trabalho e das minhas realizações. Vocês serão para sempre lembrados e amados.

Com amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus, a ele toda honra e toda glória, autor e consumidor dos nossos planos e projetos. Gratidão, por ter proporcionado saúde e determinação para não desanimar durante a caminhada e pela fé fortalecida que nos fez capazes de ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho e, sobretudo pelo dom da vida. Sou grato a Deus por ter me dado perseverança e resiliência para superar os obstáculos encontrados ao longo do caminho. Foram momentos de desafio e cansaço, mas sua presença constante me sustentou, fortalecendo minha fé e impulsionando meu desejo de avançar.

Agradeço a Deus por todas as oportunidades de aprendizado que ele colocou no meu caminho ao longo dessa jornada acadêmica. Sejam por meio de professores, colegas, livros, artigos ou mesmo por experiências pessoais, cada momento foi uma oportunidade para crescer e amadurecer como estudante e indivíduo.

Aos meus familiares por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuiu. Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período: “Evelyn Santos, Larissa Souza Silva, Joselita Bispo, José Robson de Souza, João Vitor, Jeane Luana, George Góis, Janekely Buriti, RayaneNovais, Valderez Aparecida Oliveira, Icaro Freitas, Patrícia Gardênia, Fernanda Ribeiro, Amanda Lopes, Micaele Anjos, Marcelo Xavier, Jeangêla Matos, Géssica Cruz, Jaqueline Sousa, Ana Clara Almeida, Tayná Rocha, Andreza Marques e Deivison Santos”.

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento à minha orientadora Prof.^a Dra. Adriana Oliveira Costa, que foi uma verdadeira inspiração durante todo o processo de elaboração desta dissertação. Sua sabedoria e humanidade foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Desde o início, pude contar com sua orientação precisa, que me ajudou a delimitar o tema e os objetivos da pesquisa. Sua experiência e conhecimento na área foram essenciais para que eu pudesse desenvolver esse trabalho.

Além disso, sua dedicação em acompanhar de perto cada etapa do processo de pesquisa e escrita foi fundamental para o meu sucesso. Sempre disponível para tirar dúvidas, discutir ideias e oferecer sugestões, sempre incentivando a ir além e a explorar novas perspectivas. Mas além de sua competência profissional, gostaria de destacar a sua humanidade e empatia. Em momentos de dificuldade e desânimo, ela soube me acolher e me motivar a continuar. Sua compreensão e paciência foram essenciais para que eu pudesse superar os obstáculos e seguir em frente.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira, pela coorientação, confiança, paciência e por disponibilizar as substâncias juntamente com a pós-doutoranda Ana Pacheli que contribuiu significativamente para realização desse trabalho. Agradeço por todo o suporte que você ofereceu e por ser um exemplo notável de profissional comprometido e dedicado.

Gostaria de expressar meu sincero agradecimento à pós-doutoranda Isabela Aurora Rodrigues e ao técnico do laboratório de Parasitologia Clínica da UFMG Norberto de Souza Fernandes pelo apoio e orientação durante a realização das atividades desenvolvidas. A experiência e conhecimento a mim repassados foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Através das orientações, pude aprofundar meu entendimento sobre o tema e adquirir novas habilidades na área de parasitologia clínica. Além disso, agradeço pela disponibilidade de ambos em responder minhas dúvidas e pela paciência em me auxiliar.

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos aos professores Vicente Toledo, Carlos Tagliati e ao residente pós-doutoral Jonas Pereira Ramos que contribuíram para a realização desta dissertação. Agradeço pelo apoio ao longo de todo o processo e pela experiência e conhecimento, que foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho e para o aprofundamento dos temas abordados. Gostaria ainda de expressar o meu apreço pela paciência e pelos incentivos constantes e pelos *feedbacks* valiosos que ajudaram a moldar e aperfeiçoar o trabalho.

Gostaria de expressar meu mais profundo agradecimento à minha vizinha Alvina Fidelis que desempenhou um papel fundamental em minha vida e em meu crescimento. Mesmo não sendo minha mãe biológica, ela assumiu esse papel com toda a dedicação e amor. Desde os primeiros momentos em que pisei neste mundo, minha vizinha esteve ao meu lado, cuidando de mim e me ensinando os valores mais importantes da vida. Ela me mostrou o que significa ter compaixão, generosidade e empatia pelos outros, e esses ensinamentos se tornaram a base da pessoa que sou hoje.

Minha vizinha sempre manteve presente para me apoiar, me incentivar e me motivar a ser a melhor versão de mim mesmo. Ela me ensinou a importância do trabalho árduo, da perseverança e do respeito a todos ao meu redor. Ela sempre acreditou em mim, mesmo quando eu duvidava de mim mesmo, e eu sou eternamente grato por isso.

RESUMO

As amebas do gênero *Acanthamoeba* são protozoários amplamente distribuídos no ambiente e que apesar de serem de vida livre, estão associados a graves infecções em humanos. Uma dessas infecções é a ceratite por *Acanthamoeba* (CA), doença que afeta a córnea e tem como principal fator de risco o uso de lentes de contato (LC). A manipulação inadequada e hábitos incorretos de higiene por parte dos usuários pode favorecer a contaminação das lentes. Por isso, novas abordagens para eliminar o protozoário de forma eficaz são necessárias. Os polioxidoniobatos são compostos à base de nióbio que recentemente foram comprovados como eficientes na inativação do Coronavírus, servindo de base para um produto comercial usado em desinfecção de superfícies. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito biocida de quatro polioxidoniobatos na inativação de trofozoítos e de cistos de *Acanthamoeba*. Os ensaios foram realizados com uma cepa de *A.castellanii* (ATCC #30010) cultivada axenicamente. A ação dos compostos INNIB41® (200ppm), M (125ppm), M-Cu(125ppm) e M-CoE (125 ppm) foi inicialmente avaliada sobre trofozoítos, por tempos de contato de 15 minutos a 6 horas, por avaliação de viabilidade por exclusão de azul de tripan 0,2%. Apenas o composto M apresentou efeito amebicida significativo e desta forma, foi utilizado nos seguintes ensaios: (a) citotoxicidade para células HEK-293, com determinação de concentração citotóxica 50% (CC50), (b) efeito amebicida, por curva concentração-resposta sobre trofozoítos e determinação de concentração letal 50% (CL50); (c) efeito amebistático, por avaliação do crescimento em meio nutritivo; (d) efeito cisticida, em método de viabilidade por cultura e (e) efeito no perfil de proteases secretadas, em ensaio de zimografia. A CC50 para células HEK-293 após 24 h de contato foi estimada em 227,1 ppm e CL50 foi estimada em 288,1 ppm. O composto M a 225 ppm (concentração similar a CC50 e abaixo de CL50), teve ação amebistática, inibindo em cerca de 20% a multiplicação dos trofozoítos após 48h. Além disso, induziu a formação de pré-cistos e cistos (8,3%) em relação ao controle. Não houve ação cisticida do composto M a 225 ppm, porém a 500 ppm a viabilidade dos cistos caiu para 60% em relação ao controle. Não houve efeito no perfil de proteases secretadas de trofozoítos, porém maior intensidade de áreas de digestão foi observada nas amostras tratadas por M a 225 ppm. Em conclusão, o composto M tem ação sobre trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* e tem potencial para ser um componente de produtos para desinfecção e limpeza de lentes. Estudos adicionais são necessários para avaliar concentrações seguras e possíveis interações e efeitos sinérgicos dos compostos polioxidoniobatos com outros amebicidas.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; inativação; polioxidoniobatos.

ABSTRACT

The amoebas from the genus *Acanthamoeba* are protozoa widely distributed in the environment. Despite free-living organisms, they can cause serious infections in humans. One of them is *Acanthamoeba* keratitis (CA), a disease that affects the cornea and has the contact lenses (CL) wearing as the main risk factor. Improper handling and incorrect hygiene habits with the lens contribute to contamination. Therefore, new approaches aiming effectively eliminate the protozoan are needed. Polyoxidoniobates are niobium-based compounds that inactivate Sars-Cov-2 virus. These compounds are the basis for a commercial product used in surface disinfection. In this context, the objective of this work was to evaluate the biocidal effect of four polyoxidoniobates in the inactivation of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. The assays were performed with a strain of *A. castellanii* (ATCC #30010) cultivated axenically. The action of the compounds INNIB41® (200ppm), M (125ppm), M-Cu (125ppm) and M-CoE (125 ppm) was initially evaluated on trophozoites, for contact times of 15 minutes to 6 hours, by viability assessment by exclusion of 0.2% trypan blue. Only the compound M had a significant amoebicidal effect and then used in subsequent assays, as follows. (a) cytotoxicity for HEK-293 cells by determination of 50% cytotoxic concentration (CC50); (b) amoebicidal effect on trophozoites in a concentration-response assay and determination of 50% lethal concentration (LC50); (c) amoebistatic effect, by evaluating growth in a nutrient medium; (d) cysticidal effect, determining viability by a culture method, and (e) effect on the profile of secreted proteases, through a zymography assay. The CC50 for HEK-293 cells and the LC50 after 24 h of contact was 227.1 ppm and 288.1 ppm, respectively. Compound M at 225 ppm (concentration close to CC50 and below LC50) had an amoebistatic action, inhibiting the multiplication of trophozoites by 20% after 48h. Furthermore, it induced the formation of pre-cysts and cysts (8.3%) compared to the control. There was no cysticidal action of compound M at 225 ppm, however at 500 ppm the viability of the cysts decreased to 60% compared to the control. There was no effect on the profile of trophozoites secreted proteases, but samples treated with M at 225 ppm showed greater intensity of digestion areas. In conclusion, compound M has an action on *Acanthamoeba* trophozoites and cysts and has the potential to be a component of products for disinfecting and cleaning lenses. Additional studies could determine safe concentrations and the possible interactions and synergistic effects of polyoxidoniobate compounds with other amoebicides.

Key words: *Acanthamoeba*; inactivation; polyoxidoniobates.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Atual classificação filogenética de *Acanthamoeba* em relação às outras amebas de vida livre. Fonte: adaptado de KHAN, 2006.....18
- Figura 2:** Formas evolutivas de *Acanthamoeba* em microscopia óptica de campo claro. (A) trofozoíto, forma metabolicamente ativa, com setas indicando os acantopódios e asterisco indicando um vacúolo contrátil. (B) forma cística resistente, com seta preta indicando ectocisto e seta branca, o endocisto. Barra: 10 µm. Fonte: acervo pessoal Profa. Adriana Oliveira Costa 20
- Figura 1:** Infecção ocular por *Acanthamoeba*. Infiltrado estromal em forma de anel. Hipópio, condensação de material inflamatório na parte inferior da córnea, é observado na imagem à esquerda. Fonte: ANJOS, 2014.....24
- Figura 4:** Representação esquemática do ensaio cisticida e avaliação de viabilidade por cultura. Os cistos permaneceram em contato com o composto M por 24 horas, em triplicata. Cada amostra da triplicata foi distribuída em três diluições em 10 replicatas em placa de 96 poços em PYG. Os poços (90 aferições) foram periodicamente examinados em microscópio invertido para detectar a presença de trofozoítos, por até 20 dias..... 38
- Figura 5:** Viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellani* expostos a polioxidoniobatos INNIB 41®, M, M-Cu e M-CoE nos tempos de 15 minutos a 6 horas, sob luz ambiente com lâmpada fluorescente. Os asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.....40
- Figura 6:** Citotoxicidade do composto M para células (HEK-293) em ensaio por MTT A. Viabilidade das células em ensaio por MTT, após 24 h de contato com o composto nas concentrações de 4,7 a 300 ppm. CP: controle positivo, DMSO 2,5%, CN: controle negativo: H₂O. Asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle CN ($p < 0,05$) B. Curva de regressão e determinação da concentração citotóxica (CC₅₀), estimada em 227,1 µg/mL (=227,1 ppm).....41
- Figura 7:** Atividade amebicida do composto M contra trofozoítos de *Acanthamoeba* em PBS 7,2, incubados por 24h a 25 + 2° C. A. Percentagem de viabilidade, avaliada por exclusão de

azul de tripan, CV: controle de viabilidade (não tratado), CI: controle de inviabilidade (trofozoítos inativados por calor). B. Curva de regressão e determinação da concentração letal 50 % (CL50) estimada em 288,1 ppm. 42

Figura 8: Aspecto da cultura de *Acanthamoeba* exposta a 225 ppm do composto M por 2 a 24 h. Os trofozoítos formam monocamada e vão se destacando ao longo do tempo de contato. Registro em microscópio invertido. Barra: 100 μ m.....43

Figura 9: Atividade amebicida do composto M contra trofozoítos de *Acanthamoeba*, com viabilidade avaliada por citometria de fluxo com iodeto de propídio (PI). A: Percentagem de células que absorveram iodeto de propídio no ensaio de citometria, B: percentagem de viabilidade dos trofozoítos calculada subtraindo 100 do valor absorção de PI. CV: controle de viabilidade (não tratado), CI: controle de inviabilidade (trofozoítos inativados por calor). Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (CV). C. Correlação entre os dados da citometria de fluxo com PI e exclusão por azul de tripan, indicando baixa correlação (Índice de Pearson=0,39).....44

Figura 10: Efeito amebistático do composto M a 225 ppm sobre trofozoítos em meio PYG após 24h e 48h de incubação a $25 \pm 2^\circ$ C. A. Percentagem média de trofozoítos viáveis contabilizados por azul de tripan em relação ao total de formas contabilizadas. B. Percentagem média de formas em encistamento em relação ao total de formas evolutivas contabilizadas. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.....45

Figura 11: Efeito cisticida do polioxidoniobato M sobre cistos de *Acanthamoeba*, avaliado por cultura em diluições sucessivas após 24h. A. Percentagem de desencistamento, indicando viabilidade, no 3º dia. B. Avaliação no 10º dia. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. 46

Figura 12: Atividade das proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* não tratados e tratados com o composto M. As amostras foram aplicadas sem inibidor e com os inibidores EDTA (metaloprotease), PMSF (de serinoprotease) e E64 (de cisteínoprotease). M: padrão de massa molecular. As setas pretas indicam as bandas correspondente a áreas de digestão.....47

SIGLAS E ABREVIACÕES

% - Porcentagem

± - Aproximadamente

≤ - menor igual

°C - Grau Celsius

µg - Micrograma

30010 - cepa referenciada

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AVL - Amebas de Vida Livre

CA – Ceratite Amebiana

CFW - Calcofluor White

CI50 - Concentração Inibitória de 50%

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

EAG – Encefalite Amebiana Granulomatosa

EDTA – Etilene diaminotetra-acetato ou Edetático Dissódico

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

LMA - Laboratório de Materiais Avançados

LC - Lentes de Contato

LINBIO-UFMG - Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

mL - Mililitro

MTT - Brometo de 3,4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium

NB - Nióbio

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

PHMB – Polihexametileno biguanidas

PI - Iodeto de Propídio

POM - Polioxometalatos

RPM rotação por minuto

SDS - Solução de Dodecil Sulfato

SM - Soluções Multiuso

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 O gênero <i>Acanthamoeba</i>	17
3.2 Infecções por <i>Acanthamoeba</i> e a Ceratite Amebiana.....	21
3.3 Uso de lentes de contato e a ceratite amebiana	26
3.4 Polioxidoniobatos com potencial uso na medicina	30
4. METODOLOGIA	33
4.1 Cultura axênica de <i>Acanthamoeba</i> e preparo dos trofozoítos para os ensaios	33
4.2 Obtenção de cistos por encistamento <i>in vitro</i>	33
4.3 Polioxidoniobatos	34
4.4 Avaliação preliminar da ação dos polioxidoniobatos na viabilidade de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i>	34
4.5 Avaliação de segurança do composto Mem ensaio de citotoxicidade	35
4.6 Ação amebicida em curva concentração-resposta sobre trofozoítos.....	35
4.7 Avaliação do efeito amebistático.....	36
4.8 Avaliação do efeito cisticida.....	37
4.9 Efeito do composto M na produção de proteases	38
4.10 Análises Estatísticas	39
5.1 O polioxidoniobato M apresentou ação amebicida sobre trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> ..	40
5.2 O composto M apresenta CC50 para células de embrião humano de 227,2 ppm	41
5.3 O composto M apresenta ação amebicida contra <i>Acanthamoeba</i> a partir de concentração de 100 ppm.	42

5.4 O composto M apresenta ação amebistática sobre <i>Acanthamoeba</i> e induz a formação de pré-cistos e cistos.....	45
5.5. Avaliação da atividade cisticida	46
5.7. Meio condicionado por trofozoítos tratados com o composto M apresenta maior atividade de proteases.....	47
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	53
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente disseminados no ambiente, que podem ser encontradas no ar, solo, águas tratadas e poluídas, poeira e biofilmes. Apesar de serem primariamente de vida livre, ocasionalmente possuem a capacidade de agir como patógenos em humanos, sendo responsáveis por infecções oportunistas e não oportunistas (BULLÉ, BENITTEZ e ROTT, 2020). As amebas classificadas no gênero *Acanthamoeba* fazem parte das AVL com potencial patogênico, apresentando importância clínica por serem capazes de causar infecções em humanos. Principalmente em pacientes imunocomprometidos, *Acanthamoeba* pode causar lesões cutâneas e afetar as vias pulmonares, evoluindo para o acometimento cerebral, em uma forma conhecida como Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) (KHAN, 2006; SIDDIQUI, KHAN, 2012). Além disso, estas amebas podem causar infecções na córnea, condição referida como ceratite amebiana ou ceratite por *Acanthamoeba* (CA) (LORENZO-MORALES, KHAN, WALOCHNIK, 2015).

O número de casos de CA tem aumentado nos últimos anos e o fator de risco principal é o uso de lentes de contato não higienizadas corretamente, como por exemplo, o emprego de soluções salinas caseiras que se contaminam com o tempo e exposição ao ambiente, ou por utilização de água de torneira para lavar as lentes. Além disso, hábitos como o uso de forma prolongada, não obedecendo ao tempo de validade e a não remoção durante o sono, ou banho são comportamentos que aumentam o risco de infecção (LORENZO-MORALES, KHAN, WALOCHNIK, 2015). Quadros com diagnósticos tardios podem resultar em perda da visão e necessidade de transplante de córnea (ceratoplastia), e muitas vezes sem sucesso devido à recidiva da infecção, induzindo à necessidade da remoção do globo ocular (KAM et al., 2017).

Dessa forma, o usuário deve ser bem orientado quanto aos cuidados para uso seguro das lentes, adotando as recomendações adequadas para evitar infecções como a CA e outras ceratites microbianas (CARNT et al., 2020). Atualmente, vários produtos para limpeza e conservação das lentes estão disponíveis no mercado. Esses produtos têm eficácia para outros patógenos, mas nem sempre para *Acanthamoeba* (HASLER et al., 2019), o que ocorre devido às características do protozoário, que tem em seu ciclo tanto as formas vegetativas, os trofozoítos, como as formas císticas. Sabe-se que a maioria desses produtos age sobre os

trofozoítos, todavia são pouco efetivos contra a forma cística, que exibe alta resistência devido à dupla parede (endocisto e ectocisto) (NICHOLS et al., 2019). Dessa forma, a investigação de novas abordagens preventivas que consigam eliminar o parasito de forma eficaz é necessária (CARRIJO-CARVALHO et al.; 2017). Os polioxometalatos (POMs) são um grupo de substâncias que consistem em agrupamentos discretos de óxido metálico de transição. POMs produzidos a partir de nióbio, um metal de transição do grupo 5 da classificação periódica dos elementos e vêm sendo investigados para várias aplicações. Recentemente, com a pandemia do SARS-CoV-2, o produto INNIB41® foi proposto e patenteado para desinfecção de superfícies, com efetividade contra o coronavírus (Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102019029704). A ação de polioxidoniobatos em células eucarióticas também foi demonstrada em ensaio com linhagem celular de leucemia mielogênica e por sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (PEREIRA-MAIA et al. 2018). Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade biocida de diferentes compostos sintéticos (polioxoniobatos) contra cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba*.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar efetividade de compostos polioxoniobatos na inativação de *Acanthamoeba*.

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Avaliar preliminarmente o efeito dos compostos INNIB41®, M, M-Cu, M-CoE na viabilidade dos trofozoítos de *Acanthamoeba*, em diferentes tempos de contato.
2. Avaliar a segurança do composto de melhor eficácia contra *Acanthamoeba* no ensaio preliminar, por teste de citotoxicidade *in vitro* em células HEK-293.
3. Avaliar o efeito amebicida do composto selecionado em curva de concentração-resposta, comparando as técnicas de exclusão por azul de tripan e citometria de fluxo para análise de viabilidade.
4. Avaliar o efeito amebistático do composto selecionado.
5. Avaliar o efeito do composto selecionado como cisticida.
6. Avaliar se ocorre alteração no perfil de proteases secretadas após tratamento de trofozoítos com o composto selecionado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O gênero *Acanthamoeba*

Dentre os muitos gêneros e espécies de amebas de vida livre que existem na natureza, apenas quatro representantes têm associação com doenças humanas: *Acanthamoeba spp*, *Balamuthiamandrilis*, *Naegleriafowleri* e *Sappiniadiploidea*. São protozoários denominados anfizóicos por sua capacidade de viver livremente no ambiente sem a necessidade de um hospedeiro, mas que podem às vezes agir como patógenos (MARCIANO-CABRAL, CABRAL, 2009).

As espécies do gênero *Acanthamoeba*, objeto do presente estudo, provocam uma infecção que ameaça a visão/integridade da córnea, denominada ceratite por *Acanthamoeba*, que ocorre principalmente em usuários de lentes de contato. *Acanthamoeba* também pode agir como patógeno oportunista ao causar infecções do sistema nervoso central, pulmões, seios da face e pele, principalmente em humanos imunocomprometidos (KRÓL-TURMIŃSKA; OLENDER, 2017).

A ocorrência de *Acanthamoeba* em ambientes naturais como o solo, na água para consumo humano, poeira doméstica e hospitalar, em vegetais e em diferentes tipos de ambientes tem sido descrita na literatura (COSTA et al., 2010; POSSAMAI et al., 2018). Como está entre os protozoários mais comuns e tem uma distribuição ubíqua no meio ambiente, a exposição é inevitável, sendo que é comum encontrar anticorpos específicos contra *Acanthamoeba* em pacientes saudáveis (LARES-JIMÉNEZ et al., 2018; LACERDA; LIRA, 2020). A presença de *Acanthamoeba* em ambientes aquáticos, como lagos, rios e piscinas, é bem documentada. Esses organismos são capazes de sobreviver e se reproduzir em ambientes com altos níveis de umidade, especialmente se houver matéria orgânica disponível para alimentação (COSTA et al., 2010).

Além disso, *Acanthamoeba* também pode ser encontrada em ambientes artificiais, incluindo locais domésticos, como torneiras, chuveiros, banheiras e recipientes de armazenamento de água. Esses ambientes fornecem condições adequadas para a sobrevivência e crescimento desses organismos, especialmente se houver presença de biofilmes (camadas microbianas aderentes) nas superfícies. A poeira que se acumula em ambientes fechados também pode conter *Acanthamoeba*, especialmente se houver presença de outras fontes de matéria orgânica, como pelos de animais, fungos e bactérias. A inalação da poeira contaminada pode levar à infecção pulmonar que pode evoluir para sistêmica, como

ocorre nos casos de acantamebíases em pacientes imunocomprometidos (GUIMARAES et al.; 2016).

A denominação do gênero *Acanthamoeba* vem do termo “*Acanth*” ou do Grego “*akantha*”, que significa “espinhos” ou “picos”, que se refere aos pseudópodes afilados ou estruturas “*spin-like*” da superfície (SIDDIQUI & KHAN, 2012). O protozoário foi descoberto em 1930 pelo cientista Castellani, como um contaminante de uma cultura do fungo *Cryptococcus parvovirus*, sendo nomeado inicialmente como *Hartmannella castellanii*. Em 1931 Volkonsky criou o gênero *Acanthamoeba* pela aparência de fusos pontiagudos na mitose e que possuem cistos de parede dupla com ostíolos e camada externa irregular (KHAN, 2006).

Depois da passagem de duas décadas, Singh (1975), Pussard (1966) e Page (1967) examinaram a classificação dessas amebas e, após avaliar diferentes cepas de *Hartmannella* e *Acanthamoeba*, concluíram que a presença de acantopódios e as características dos cistos eram satisfatórias para uma proposta de classificação do gênero fundamentada nas características morfológicas. Em 1975, Sawyer propôs uma nova classificação filogenética incluindo a família *Acanthamoebidae* e (KHAN, 2006). Em 1988, o gênero *Hartmannella* foi alocado na família *Hartmannellidae* e estabeleceu-se a atual classificação filogenética das amebas de vida livre (**Figura 2**).

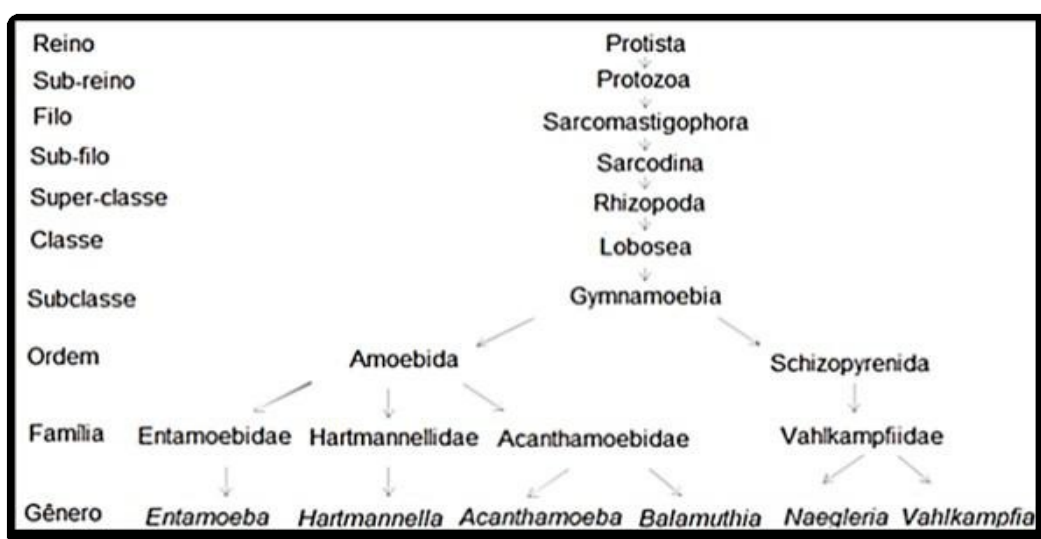


Figura 2: Atual classificação filogenética de *Acanthamoeba* em relação às outras amebas de vida livre. Fonte: adaptado de KHAN, 2006.

No gênero *Acanthamoeba* diversas espécies já foram descritas, como *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. healy*, *A. triangularis*, dentre outras (VISVESVARA, 1991).

A diferenciação das espécies é realizada com base na morfologia dos cistos incluindo formato e número de braços do endocisto, aspecto do ectocisto e de outras estruturas como os ostíolos, embora sempre houvesse questionamentos sobre esta forma de classificação (PAGE, 1967). Devido às dificuldades para identificar as diferentes espécies, um novo sistema de classificação composto por três grupos morfológicos foi proposto (GRÜN et al.; 2014). Este sistema inclui grupos morfológicos I, II e III. O Grupo I inclui *Acanthamoeba* cujos cistos são maiores que 18 µm apresentam ectocisto liso e endocisto com braços formando um aspecto estrelado. No grupo II estão as linhagens que apresentam cistos menores que 18 µm, com ectocisto rugoso e endocisto de formato variável, constituindo o grupo que contém a maior parte das espécies consideradas patogênicas. O grupo III, que também tem cistos pequenos, tem como principal característica o ecto e endocisto bem justapostos e de aspecto arredondado (VISVESVARA, MOURA, SCHUSTER, 2010).

As técnicas moleculares, que têm sido amplamente utilizadas para identificação e classificação de microrganismos, também foram aplicadas para classificação de *Acanthamoeba*. A abordagem mais utilizada atualmente é a genotipagem do gene 18S rDNA, que é uma sequência de DNA conservada e altamente informativa para a identificação de espécies (STOTHARDT et al., 1998; MOHAMMADY et al., 2023). Por meio da comparação das sequências de 18S rDNA, foi possível determinar 23 genótipos de *Acanthamoeba*, designados T1 a T23 (LATIFI, SALIMI et al., 2021). A classificação genotípica da *Acanthamoeba* tem sido útil para entender a diversidade e evolução do gênero, assim como para estudos epidemiológicos e identificação de fatores de virulência. O genótipo T4, por exemplo, é o mais encontrado nos casos de infecção por *Acanthamoeba*, indicando que tem mais propensão à patogenicidade (DIEHL et al., 2021). Essa abordagem tem contribuído significativamente para a compreensão da patogenicidade dessa ameba e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle de infecções relacionadas (JERCIC et al.; 2019).

As espécies de *Acanthamoeba* exibem no seu ciclo de vida uma fase trofozoítica, ativa, que se alimenta e se reproduz; e outra forma cística (KHAN, 2006). Em relação ao tamanho o trofozoíto tem as dimensões variáveis de 13 µm a 40 µm. Sua membrana citoplasmática é composta de proteínas, fosfolipídios, esteróis e lipofosfoglicanos. Exibem projeções aciculiformes, nomeadas de acantopódios, importantes para locomoção e nutrição do protozoário (KOT, ŁANOCHA-ARENDARCZYK, KOSIK-BOGACK, 2018). O núcleo tem um aspecto esférico ou oval, localizado no centro da célula. O núcleo contém o material genético da célula, como o DNA, que controla todas as atividades celulares. Internamente, o

núcleo está envolvido por uma membrana nuclear que o separa do citoplasma. O citoplasma é preenchido por diversas organelas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, que desempenham funções vitais para a célula (ITHOI et al., 2011). O citoplasma apresenta-se finamente granuloso, contém um vacúolo contrátil responsável pela regulação osmótica e numerosos vacúolos digestivos. A forma trofozoítica é metabolicamente ativa, capaz de se reproduzir por fissão binária, de aderir e envolver as células do hospedeiro, por conseguinte, ocasionando infecções (KOT, LANOCHA-ARENDARCZYK, KOSIK-BOGACK, 2018).

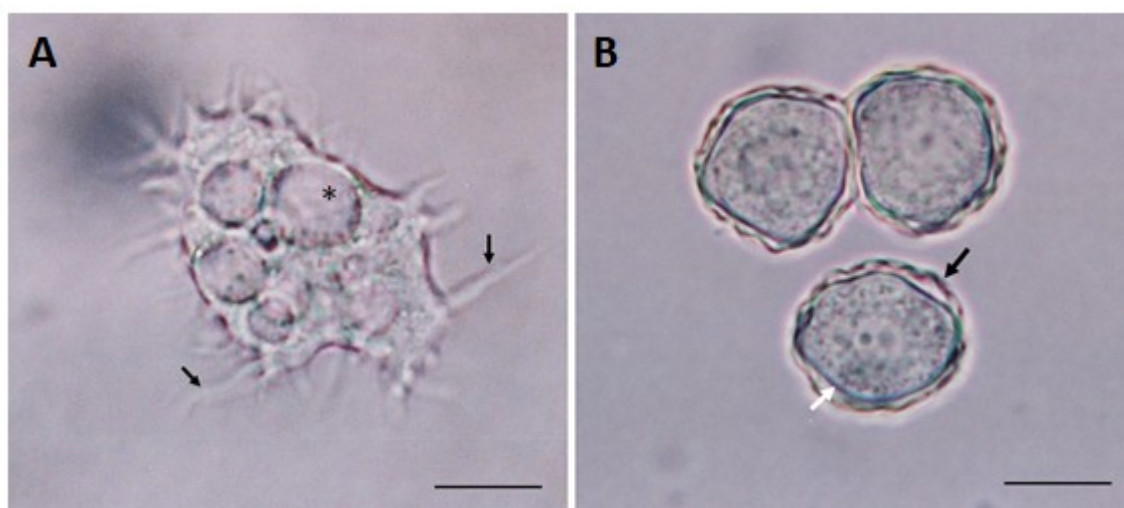


Figura 3: Formas evolutivas de *Acanthamoeba* em microscopia óptica de campo claro. (A) trofozoíto, forma metabolicamente ativa, com setas indicando os acantopódios e asterisco indicando um vacúolo contrátil. (B) forma cística resistente, com seta preta indicando ectocisto e seta branca, o endocisto. Barra: 10 µm. Fonte: acervo pessoal Profa. Adriana Oliveira Costa

Os trofozoítos podem ser mantidos *in vitro* em culturas a partir de isolamento do ambiente ou de tecidos, por plantio da amostra em placas de meio ágar não nutritivo contendo bactérias como *Escherichia coli* viva ou inativada pelo calor. A placa é incubada à temperatura ambiente ou a 32 °C, durante vários dias ou semanas. Durante este tempo, se o parasito estiver presente na amostra, ocorrerá a multiplicação sendo possível visualizar os trofozoítos e cistos em microscópio invertido. As formas podem ser tratadas com antibióticos para eliminação de bactérias do ambiente da qual foi isolada, a fim de obter culturas axênicas (DUARTE et al.; 2013). Estas devem ser cultivadas em meios mais complexos, contendo maior quantidade de nutrientes. O mais usado para *Acanthamoeba* é o meio PYG, composto

por proteose-peptona, extrato de levedo e glicose, no qual normalmente os trofozoítos se multiplicam com abundância (SCHUSTER, 2007).

Estes dois sistemas de cultivo podem ser utilizados para testes de resistência a medicamentos, permitindo determinar a sensibilidade das amebas a diferentes agentes antimicrobianos (DUARTE et al., 2013).

Os cistos são formas de resistência que *Acanthamoeba* adota em resposta a condições ambientais adversas, como falta de nutrientes, temperaturas extremas ou presença de agentes químicos (LLOYD et al., 2014). Outras condições como a alteração de pH e osmolaridade podem desencadear o encistamento (KOT, LANOCHA-ARENDARCZYK, KOSIK-BOGACK, 2018; GARAJOVÁ et al., 2019).

Os cistos apresentam tamanhos entre de 13 µm a 23 µm, com dupla parede, sendo a mais interna denominada endocisto, que pode apresentar diferentes formatos, como por exemplo: estrelado, oval, poligonal e esférico, e a mais externa é o ectocisto, composto principalmente de proteínas, polissacarídeos/carboidratos, dentre eles a celulose como principal constituinte (SIDDIQUI, KHAN, 2012). Apresentam também poros, denominados de ostíolos, responsáveis pela detecção de um ambiente favorável para realizar o desencistamento. A composição das paredes dos cistos e o mecanismo de encistamento são amplamente estudados com a finalidade de encontrar alvos farmacológicos, pois os cistos são de difícil eliminação pelos protocolos de tratamentos atuais e responsáveis pelas recidivas da infecção (GARAJOVÁ et al., 2019; ROLLAND et al., 2020). A obtenção de cistos *in vitro* pode ser realizada por cultivo dos trofozoítos em meios de indução de encistamento, tendo como princípio a depleção de nutrientes ou aumento da concentração de MgCl₂. A indução de encistamento de *Acanthamoeba* com salina de Neff é um método comumente utilizado para estimular o protozoário a se transformar em seu estado de cisto nas condições axênicas (NEFF, 1964). Os trofozoítos retirados do meio PYG, lavados para remoção dos nutrientes e incubados na salina de encistamento de Neff iniciam a formação de cistos em período de 24 a 48 horas (LONNEN et al., 2010).

3.2 Infecções por *Acanthamoeba* e a Ceratite Amebiana

Em 1958, Culbertson e colaboradores demonstraram pela primeira vez o potencial patogênico de *Acanthamoeba*, ao observarem o efeito citopático em cultura de células de rim de macaco, além da morte de animais por encefalite, após a inoculação intra cerebral e intra espinhal de fluido de cultura celular contaminado com amebas (MARCIANO-CABRAL,

CABRAL, 2003; CULBERTSON, SMITH, MINNER, 1958). Atualmente, *Acanthamoeba* é reconhecida como causadora de infecções cutâneas, sistêmicas e encefálicas, esta última denominada encefalite amebiana granulomatosa (EAG).

A EAG é uma infecção de curso crônico e evolução comumente prolongada, sendo a porta de entrada as lesões na pele ou a partir do acometimento pulmonar, após o que o protozoário atravessa a barreira hematoencefálica (KRÓL-TURMIŃSKA, OLENDER, 2017). O período de incubação é ainda desconhecido, todavia semanas ou meses se passam até o desfecho (MARCIANO-CABRAL, CABRAL, 2003). À medida que a infecção progride, podem ocorrer sintomas mais graves, como convulsões, perda de consciência, alterações no comportamento e coma (KALRA et al., 2020).

A mortalidade da EAG é extremamente alta, com menos de 5% de casos de sobrevivência registrados globalmente. O diagnóstico precoce é fundamental para um melhor prognóstico, no entanto, os sintomas iniciais são inespecíficos e raros são os serviços de saúde que possuem capacidade para identificar o protozoário (LIU et al., 2023).

Acanthamoeba também é causadora da ceratite amebiana ou ceratite por *Acanthamoeba* (CA), infecção grave e progressiva da córnea. Diferentemente da EAG e infecções sistêmicas, a CA não está associada a indivíduos imunodeprimidos. Traumas acidentais, como contusões causadas por galhos de árvore, lodo ou terra, além de lesar o epitélio, podem carrear os protozoários do ambiente à córnea, estabelecendo a infecção (MARCIANO-CABRAL, CABRAL, 2003, SIDDIQUI, KHAN, 2012). Este tipo de fator para CA é reportado entre trabalhadores rurais, como descritos na Índia, também associado à falta de acesso a cuidados de saúde adequados e à água de boa qualidade (RAMMOHAN et al., 2023). No entanto, é reconhecido em nível mundial que a CA tem como principal fator de risco o uso de lentes de contato, pois o acessório funciona como veículo e promove a adesão dos trofozoítos na córnea, caso não seja higienizada corretamente (PADZIK, HENDIGER, CHOMICZ, 2018). Em achados históricos, os primeiros episódios da acantamebíase ocular foram relacionados a traumas na córnea, contudo, a popularização do uso de lentes de contato tornou este o principal fator de risco predisponente à doença (BUNSUWANSAKUL et al., 2019). Os indivíduos que não seguem as práticas corretas de higiene ao lidar com suas lentes de contato têm maior probabilidade de contrair essa infecção. Hábitos como não lavar as mãos adequadamente, lavar as lentes na água de torneira ou dormir com este acessório favorecem infecções como a CA (CARNT et al., 2023; NIEDERKORN et al., 2021).

O número de casos de CA é variável entre países e por se tratar de uma infecção que não é de notificação compulsória, os dados são provenientes de estudos com

acompanhamento em institutos/clínicas oftalmológicas ou vinculados à pesquisa em universidades. Nos Estados Unidos da América, a taxa de casos é de 1,36 a cada 1.000.000 de habitantes, enquanto na Polônia esse número é quase 10 vezes maior, sendo de 10,3 novos casos a cada 1.000.000 de habitantes por ano. Já na França o número de casos de CA pode chegar a um caso a cada 30.000 usuários de lentes de contato (KRÓL-TURMIŃSKA, OLENDER, 2017).

No estudo de Diehl e colaboradores (2021), foi realizado o levantamento de casos de CA pelo mundo, através da revisão sistemática dos casos publicados na literatura. Os autores observaram um total de 675 casos relatados de CA distribuídos mundialmente, dentre esses, 253 eram da Ásia, 150 da América, 233 da Europa e 40 da África. No entanto, devido à falta de notificação, o número de casos é provavelmente bem maior.

No Brasil, alguns estudos foram realizados em São Paulo e Porto Alegre, porém a incidência e prevalência são desconhecidas devido à falta de dados oficiais e registros sistemáticos. Em São Paulo, a CA é mais comum em pessoas que utilizam lentes de contato, principalmente as lentes de contato de uso prolongado, como demonstra um estudo em um centro oftalmológico de referência na capital (CARVALHO et al., 2009). Os autores analisaram um total de 582 solicitações para diagnóstico de CA, obtendo culturas positivas para 185 dos pedidos, dos quais 83% eram de usuários de lentes de contato, confirmando a tendência em outros países. Em Porto Alegre, também há relatos de casos de ceratite amebiana associados ao uso de lentes de contato, assim como em outras regiões do Brasil (DOS SANTOS et al., 2018; POSSAMAI et al., 2018).

As espécies mais relatadas na CA são *A.castellanii* e *A.polyphaga*, porém atualmente, com a classificação por genótipos sendo a mais adotada, é reconhecido que o genótipo T4 é o mais prevalente em infecções, embora outros possam ser encontrados com menos frequência (MACIVER et al., 2013). Em um estudo de revisão sistemática mais recente sobre os casos de CA descritos no mundo, o genótipo T4 apresenta uma prevalência de 85,92%, enquanto T3 apresenta prevalência de 5,92% e os demais genótipos apresentam porcentagens abaixo de 2,5% (DIEHL et al., 2021).

A CA se manifesta na maioria dos casos unilateral, com o paciente relatando dor importante, fotofobia e lacrimejamento. Não há predileção de sexo, sendo mais encontrada em adultos jovens por serem estes mais frequentemente usuários de lentes de contato (FANSELOW et al., 2021). No estágio inicial da CA, observa-se o aparecimento de irregularidades epiteliais, lesões epiteliais pseudodendríticas e opacidade da córnea

(CLARKE et al., 2012, LORENZO-MORALES, KHAN, WALOCHNIK, 2015, KRÓL-TURMINSKA, OLENDER, 2017).

Os sintomas iniciais podem ser semelhantes aos de outras infecções oculares, incluindo vermelhidão, dor, irritação e visão turva. Conforme a infecção progride, podem surgir úlceras na córnea, o que resulta em dor intensa, sensibilidade à luz e uma sensação de corpo estranho no olho. Pode ocorrer a perda permanente da visão se não for tratada adequadamente, devido à opacidade da córnea ou ainda, devido à inflamação nos tecidos adjacentes, conforme **Figura 3**.



Figura 4: Infecção ocular por *Acanthamoeba*. Infiltrado estromal em forma de anel. Hipópio, condensação de material inflamatório na parte inferior da córnea, é observado na imagem à esquerda. Fonte: ANJOS,2014.

A patogênese da CA abrange uma série de processos prévios, como a adesão do trofozoíto às células do epitélio do hospedeiro, secreção de proteases para a desorganização do tecido e por último a fagocitose celular (AGI et al., 2021). A adesão dos trofozoítos ao epitélio corneano ocorre através das proteínas de ligação a manose (mannosebindingprotein-MBP). Este processo acarreta a liberação de serino-, cisteíno- e metalo- proteases, entre outras proteínas facilitadoras, que permitem que os trofozoítos envolvam camadas intermediárias do estroma corneano, além de atrair células, especialmente neutrófilos, que mediam a resposta inflamatória (MARCIANO-CABRAL, CABRAL, 2003; NIEDERKORN, 2021). Após o epitélio, os trofozoítos atravessam a membrana de Bowman, que separa o epitélio do estroma da córnea. Ocorre então a degradação do estroma e a ação dos trofozoítos em torno dos nervos corneanos pode gerar a ceratoneurite, resultando em dor intensa. Os trofozoítos normalmente não ultrapassam a membrana de Descemet, que separa o estroma da córnea da câmara anterior, portanto permanecem na córnea. A serino-protease MIP-133 (133 kDa mannose-

induced protease) liberada durante o processo é responsável por causar a apoptose dos ceratócitos, ou seja, é a protease facilitadora mais importante na invasão tecidual (NIEDERKORN et al., 1999). Ocorre também a dissolução do estroma colagenoso, por meio da produção de múltiplas proteases com propriedades colagenolíticas que levam ao efeito citopático (NIEDERKORN, 2021). O processo também envolve o avanço da concentração de cálcio, acarretando mudanças na morfologia e estruturado citoesqueleto celular, gerando aumento da permeabilidade da membrana celular, degradação da matriz extracelular e a morte da célula (BAHRAMI et al., 2023).

As principais questões que ainda permanecem um desafio no manejo da CA são seu diagnóstico e tratamento. Em relação ao diagnóstico, nas suas fases iniciais, a infecção na maioria das vezes pode ser confundida com outras ceratites infecciosas, principalmente herpética e fúngica (CHU et al., 2023). Com a progressão, os protozoários que inicialmente se instalaram no epitélio da córnea, atingem o estroma, dificultando o tratamento. O diagnóstico da ceratite amebiana pode ser feito através da detecção das formas nas amostras obtidas em raspados de lesões na córnea, sendo feito a pesquisa direta ou por coloração dessas estruturas. Nestes casos, os oftalmologistas devem realizar o raspado da lesão, depositando o material em lâmina.

Existem várias técnicas de coloração que permitem visualizar as formas de *Acanthamoeba*, como PAS (Ácido Periódico de Schiff), que destaca as estruturas da parede celular e membranas, evidenciando a forma cística, que possui uma parede espessa e o calcofluor White (CFW), que é um corante quimiofluorescente com afinidade pelos polímeros polissacarídeos dos cistos amebianos. É usado em conjunto com a microscopia de fluorescência para identificar a presença de cistos de *Acanthamoeba* em amostras clínicas. O corante se liga à quitina presente na parede celular dos cistos, emitindo uma fluorescência azul brilhante quando exposto a luz ultravioleta (EL-SAYED et al., 2014).

A cultura do material pode ser realizada, sendo mais recomendado o esgotamento em placa de ágar não nutriente contendo bactérias vivas ou inativadas pelo calor, como *Escherichia coli*, que servem de alimento para propiciar a multiplicação dos protozoários (ZHANG et al., 2023). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e a microscopia confocal são duas técnicas que podem ser utilizadas no diagnóstico de infecções causadas por *Acanthamoeba*. A PCR pode ser usada para detectar patógeno o DNA em amostras de raspado, mas também em outros materiais como pele e biópsia de órgãos no caso das infecções cutâneas, sistêmicas ou encefálicas (ROTH et al., 2023; NORGAN et al., 2019). A microscopia confocal *in vivo*, pode ser uma ferramenta valiosa e sensível para o diagnóstico

de infecções graves identificadas tardiamente, principalmente com cepas de forte viabilidade. A visualização microscópica de amebas em lâminas preparadas diretamente a partir de raspagem de córnea e exames laboratoriais de amostras de isolados de córnea cultivados *in vitro* permitem confirmar ou verificar resultados de exames *in vivo*, além de identificar diretamente os patógenos e esclarecer diagnósticos errados anteriores (PADZIK, HENDIGER, CHOMICZ, 2022). Porém, estes testes não são amplamente disponíveis, e mesmo os métodos de identificação do protozoário demandam experiência para assimilação, além de haver dificuldade de identificar o protozoário nos materiais de raspado.

As dificuldades diagnósticas refletem no tratamento, que muitas vezes não são iniciados precocemente. Os tratamentos utilizados são inespecíficos e baseiam-se no uso de múltiplos fármacos, como o polihexametilenobiguanidas (PHMB), gluconato de clorexidina, diamidinas, isotionato de propamida (Brolene®) e hexamida (Desomedine®). Ainda podem ser utilizados antifúngicos como miconazol, fluconazol, cetoconazol (BÜCHELE et al., 2023). Os tratamentos são de longo prazo e baseados em combinações de fármacos, que na sua grande maioria agem com maior eficiência sobre a forma trofozoítica (LORENZO-MORALES, KHAN, WALOCHNIK, 2015). Assim, fatores como a resistência da forma cística de *Acanthamoeba* aos biocidas, baixos níveis de penetração de fármacos no estroma profundo da córnea e a toxicidade dos componentes químicos ainda são as preocupações fundamentais na terapêutica da CA (BAHRAMI et al., 2023).

Considerando as dificuldades no diagnóstico e no tratamento da CA, a prevenção da infecção torna-se um pilar de grande importância para o principal grupo de risco da doença, os usuários de lentes de contato.

3.3 Uso de lentes de contato e a ceratite amebiana

Vários estudos comprovam que *Acanthamoeba* pode aderir-se às lentes de contato, tanto nas novas quanto nas usadas, assim como em estojos utilizados na sua manutenção (MORGAN et al., 2020; LINDSAY, 2007). A contaminação pode ocorrer quando entra em contato com água contaminada ou quando a lente é armazenada em um estojo de lentes contaminado. Além de atuarem como carreadoras do protozoário, as lentes causam micro abrasões na córnea que levam a pequenas rupturas epiteliais, que facilitam o processo de adesão do patógeno (MAIER et al., 2022).

As primeiras lentes de contato disponíveis para uso humano eram de uso prolongado fabricado em material rígido, causando desconforto na adaptação e uso, além de apresentar dificuldades para limpeza e manutenção. Com a evolução dos materiais utilizados para confecção das lentes, as lentes rígidas passaram a ser fabricadas com material gás-permeável, facilitando a permeabilidade ao oxigênio (MOREDDU et al., 2019). A partir dos anos 1970 as lentes gelatinosas (*soft lens*) dominaram o mercado e o polímero de silicone-hidrogel é o material mais usado para sua fabricação atualmente (MOREDDU et al., 2019).

O primeiro caso de ceratite amebiana no mundo ocorreu na década de 1960. Foi relatado o primeiro caso de doença em humanos, sendo assim, o gênero *Acanthamoeba* então descrito como um agente causador da ceratite amebiana. Logo depois, na década de 1970, foi relatado o primeiro caso de CA por *Acanthamoeba* em indivíduo que usava lentes de contato para correção visual. (AUSTIN, LIETMAN, 2017). O paciente foi submetido a um tratamento intensivo, que incluiu o uso de medicamentos antifúngicos e antibióticos para combater a infecção. Além disso, ele teve que lidar com vários procedimentos, como enxágue ocular, raspagem da córnea.

A contaminação geralmente ocorre quando as pessoas não seguem as diretrizes adequadas de higiene ao manusear seu acessório, tais como: deixar as lentes em contato com a água do chuveiro ou torneira, dormir com as lentes, não respeitar o prazo de validade, usar soluções inadequadas para a limpeza como solução salina e armazenamento das lentes ou não trocar regularmente as soluções podem facilitar a infecção (HAJIALILO et al., 2015).

Em relação aos tipos de lentes de contato, correlacionado ao uso inadequado é abordado que todos os modelos já foram associados à ceratite por *Acanthamoeba*, constituindo que o maior problema está entre os usuários e principalmente as de material gelatinosas (MUNGROO, SIDDIQUI, KHAN, 2021). As lentes de contato gelatinosas são mais propícias ao acúmulo de sujeira e micro-organismos do que as lentes rígidas. Isso ocorre porque as lentes gelatinosas são mais porosas e retêm mais umidade, o que pode criar um ambiente favorável ao crescimento de *Acanthamoeba* (JALILEHVAND et al., 2022).

Os princípios de desinfecção e armazenamento de lentes de contato são fundamentais na vigilância da infecção da córnea. Os sistemas de desinfecção de lentes de contato atualmente mais utilizados são os à base de peróxido de hidrogênio e as soluções multipropósito (YAMASAKI et al., 2021).

O processo de desinfecção com peróxido de hidrogênio geralmente envolve a imersão das lentes de contato em uma solução especial por certo período de tempo, seguindo as instruções do fabricante. Durante esse período, ocorre a eliminação de microrganismos presentes nas lentes.

É importante seguir corretamente as instruções do fabricante ao utilizar soluções multipropósito com peróxido de hidrogênio para desinfecção de lentes de contato. Essas soluções podem causar irritação ocular se utilizadas de forma incorreta, por isso é fundamental ler e seguir as recomendações de uso (ORTEGA-RIVAS et al., 2016).

Uma desvantagem do peróxido de hidrogênio como solução multipropósito para desinfecção de lentes de contato é o tempo necessário para que a desinfecção seja concluída. O peróxido de hidrogênio requer um tempo de imersão mais longo do que outras soluções, geralmente entre 6 e 8 horas, antes que as lentes possam ser usadas novamente. Isso pode ser um inconveniente para as pessoas que precisam usá-las imediatamente (BOYCE et al., 2017). Outra desvantagem é o potencial de irritação ocular. Essa substância tem a característica por ser mais forte do que outras soluções de desinfecção, e se usado inadequadamente, pode causar irritação, desconforto ou até mesmo danos ao olho. Portanto, é essencial seguir cuidadosamente as instruções de uso e enxaguar bem as lentes de contato antes de colocá-las nos olhos (GARCÍA-ESPINOZA et al., 2021).

As soluções multiuso possuem um valor extremamente importante, isto porque são estabelecidas visando garantir a manutenção das lentes de contato a partir da sua desinfecção e lubrificação. A importância desses medicamentos no tratamento da ceratite amebiana reside no fato de que a infecção pode causar danos irreversíveis à córnea, levando à perda da visão. Deste modo, é fundamental iniciar o tratamento o mais rápido possível para evitar complicações graves (WILLCOX, 2013). Além disto, elas são compostas por substâncias ativas que devem ser eficazes na inibição do crescimento de patógenos, evitando assim possíveis infecções oculares aos seus usuários.

Para que as soluções multiuso possam ser eficientes, elas devem conter diferentes classes de componentes em sua composição, onde cada um desempenhará sua função específica. Entre estas classes estão: os surfactantes, os desinfetantes antimicrobianos, os preservantes, os agentes quelantes, os estabilizadores (solução tampão), os agentes de tonicidade, os agentes umectantes, as enzimas, e os agentes iônicos (GONZÁLEZ-MÉIJOME et al., 2013).

Enquanto os surfactantes agem na limpeza das ajudando a desprender resíduos das lentes, os preservantes contribuem para impedir a propagação de microrganismos após a abertura do frasco. Os agentes quelantes vão atuar diminuindo o acúmulo de cálcio na superfície das lentes e a solução tampão atuará mantendo o pH da solução multiuso. Os agentes umectantes atuam diminuindo a tensão superficial entre o olho e a lente, para proporcionar um uso mais confortável. O uso de enzimas tem o objetivo de diminuir a

incidência de depósito protéico, através da atividade proteolítica e os agentes iônicos atuam prevenindo a formação os depósitos (MURPHY, FRIEDMAN, 2019). Quando aos agentes antimicrobianos, são usados em concentrações que não sejam tóxicas. O timerosal, por exemplo, é uma substância derivada do mercúrio, que associada ao EDTA (etilenediaminotetra-acetato ou EDTA dissódico) torna-se eficaz contra bactérias Gram negativas e fungos. A clorhexidina é uma biguanida muito eficaz na eliminação de bactérias Gram positivas, tendo também ação sobre trofozoítos de *Acanthamoeba*. O ácido ascórbico também pode ser associado ao EDTA como agente antimicrobiano. As soluções multipropósito tem eficácia antimicrobiana, o Polyquad® (poly-quaternium-1), um composto quaternário que evita a absorção nos poros das lentes hidrofílicas e o Dymed® (poliaminopropilbiguanida), polímeros formados por biguanidas repetidas, separadas por uma cadeia carbônica, ambos com ação antimicrobiana (UZER CELIK et al., 2016). As biguanidas de polihexametileno (PHMB) são um dos mais populares biocidas e têm sido utilizados desde meados dos anos 70 em soluções oftálmicas. São surfactantes poliméricos catiônicos que pertencem à família das biguanidas e, atualmente, são usadas em inúmeras soluções multiuso (SM) comercializadas. As PHMB atuam permitindo a rotura da membrana e lise das bactérias, resultando na sua morte (GIRIJA, BALASUBRAMANIAN, COWIN, 2022).

Tais soluções podem conter ainda o PHMB (polihaxametileno de biguanida). Seu mecanismo de ação baseia-se em interações eletrostáticas a partir de cargas elétricas distribuídas na parede celular bacteriana, ocasionando a perda de suas funções. Ela tem a capacidade de eliminar seletivamente microrganismos sem afetar os tecidos, uma vez que, influencia muito pouco nos lipídeos presentes nas membranas celulares; sendo considerado muito eficaz para limpeza e tratamento de tecidos, atuando também na descontaminação, desinfecção e descolonização de microrganismos (TAKAHASHI et al., 2021).

Apesar da eficácia das substâncias presentes nas soluções multipropósito, os cistos podem persistir, o que se torna um risco aos usuários (NICHOLS et al., 2019). *Acanthamoeba* é um patógeno resistente e pode ser difícil de ser completamente eliminado. Algumas soluções multipropósito podem ter maior efetividade na eliminação da *Acanthamoeba* do que outras, portanto, é essencial seguir as recomendações. Considerando as dificuldades encontradas no tratamento da CA, a busca de novos medicamentos é desejável, dada a intolerância dos pacientes aos antimicrobianos atuais, ao regime terapêutico, o aparecimento de efeitos adversos e a resistência cística (LAKHUNDI et al., 2014; ANWAR et al., 2019).

3.4 Polioxidoniobatos com potencial uso na medicina

O composto químico denominado como nióbio (Nb) foi descoberto por Charles Hatchett, na Inglaterra em 1801, quando ele examinava uma amostra de rocha enviada dos Estados Unidos para o Museu Britânico, o qual resolveu chamar de “columbium”. Em 1822, Heinrich Rose, um químico alemão, acreditou ter descoberto um novo elemento enquanto trabalhava com amostras de tantalita e resolveu chamá-lo de “niobium”, inspirando-se em Níobe, a filha do Tântalo, da mitologia grega (ROHAIZAD et al., 2020).

Em 1950, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) determinou o nome oficial de nióbio para o elemento com número atômico 41 e massa molar 92,9064 g. Desenvolvimentos científicos expandiram o raio de aplicação do nióbio, que está presente em materiais intermediários, ligas metálicas, revestimentos, dispositivos optoeletrônicos, nanomateriais e catalisadores (ROHAIZAD et al., 2020).

O Brasil se enquadra como uma das maiores reservas mundiais de nióbio e em seguida o Canadá, Egito, República Democrática do Congo, Rússia, Finlândia, entre outros. O Brasil também é o maior produtor de nióbio, concebendo mais de 95% do total produzido mundialmente. Os principais estados com empresas produtoras de nióbio no Brasil são Minas Gerais e Goiás, com competência de produção do minério pirocloro de 6 Mt/ano e 0,9 Mt/ano, respectivamente. Os teores de nióbio nesse minério podem variar de 0,51% a 2,71%. As duas principais cidades produtoras são Araxá – MG e Catalão - GO, constituindo que a demanda brasileira é atendida por Minas Gerais (ALVES, COUTINHO, 2015).

Esse composto possui uma ampla disponibilidade e as evidenciadas características catalíticas do nióbio tornam justificável o grande empenho no estudo do comportamento desse material em distintos processos catalíticos. Os principais óxidos de nióbio são o Nb_2O_5 (sólido branco), o NbO_2 (sólido preto – azulado) e o NbO (sólido cinza). Nesses óxidos, os estados de oxidação do nióbio são +5, +4 e +2, respectivamente, porém o mais estável é o Nb_2O_5 , que também é chamado de nióbia. Nos estados de oxidação mais baixos, o nióbio forma muitos retículos, com grupo de átomos metálicos ligados entre si (SASAKI, KODA, MORITA, 2020).

Materiais contendo nióbio apresentam a habilidade de formação, na presença de H_2O_2 , de espécies altamente oxidantes conhecidos como grupos peroxos (OLIVEIRA et al., 2019). Essas espécies liberam átomos de oxigênio ativos, que são capazes de promover oxidação de substratos orgânicos em meio aquosos (LAURIOL-GARBEY, 2011).

O polioxometalatos (POM) são formados geralmente com metais dos grupos 5 ou 6 em seu estado de oxidação mais alto. As estruturas e tamanhos dos polioxometalatos são muito diversificados, com uma combinação versátil de íons metálicos que garante propriedades diferenciadas, possibilitando uma versatilidade de aplicações. A elevada solubilidade dos POM em água, a baixa toxicidade sobre o corpo humano e sua capacidade redox e fotoquímica, garantem diversificadas aplicações, principalmente na área da catálise e medicina, como antiviral e antitumoral (WANG et al., 2017).

Polioxometalatos (POMs) representam uma classe de compostos fundamentados em metais de transição (Mo^{6+} , W^{6+} , V^{5+} , Nb^{5+}) em altos estados de oxidação, interligados por oxigênios em ponte e contendo grupos -oxo (O^{2-}) terminais.1–3,21–24. O primeiro relato de POM à base de molibdênio data de 1826 e foi sintetizado por Berzelius, consistindo em um material de coloração amarela, conhecido hoje como, 12-molibdofosfato $(\text{NH}_4)_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$, a partir da reação de molibdato de amônio com ácido fosfórico.1,21–23,25 (GUO et al., 2022).

Os polioxometalatos (POMs) são descritos como sendo aglomerados de óxido metálicos de metais de transição, tais como molibdênio (Mo), tungstênio (W), vanádio (V) e niobato (Nb). Foram descritas aplicações em áreas como catálise, ciência dos materiais, fotoquímica, eletroquímica e ainda na biomedicina, demonstrando atividade biológica *in vitro* e *in vivo* como antivirais, antibacterianos, antiprotozoários, antidiabéticos e anticancerígenos(DUVANOVA et al., 2022, BIJELIC, AURELIANO, ROMPEL, 2019; GUMEROVA et al., 2018; YAMASE, 2013).

Concomitantemente, a partir desta data, devido aos desafios conceituais e experimentais à época, esta classe de compostos inorgânicos, com propriedades físico-químicas intrínsecas (composição molecular, tamanho, forma, alta carga superficial, potenciais redox, acidez, estabilidade térmica) interligadas a versatilidade do método de síntese e, principalmente, com o advento de técnicas de diferenciação de estrutura moderna, como difração de raios-X, espectroscopia, espectrometria de massas, começaram a ganhar a atenção no meio científico. Cada vez mais, tais compostos são explorados e aplicados em várias áreas do conhecimento, incluindo a química medicinal, catálise (processos oxidativos, fotocatalíticos, eletroquímicos) e materiais avançados (LIMA et al., 2014).

Os POM são estudados e utilizados pela atividade antitumoral e por seu efeito antiviral. Os estudos envolvendo polioxometalatos de nióbio (POM-Nb) aplicados à área medicinal são menos frequentes. O nióbio presente nos POM-Nb apresenta elevado estado de oxidação (+5), influenciando as propriedades redox do material. Levando isso em

consideração, os POM-Nb apresentam-se como potenciais materiais para a inibição de desenvolvimento dos tumores, uma vez que podem afetar a densidade eletrônica das células doentes, inibindo seu crescimento, por exemplo, via estresse oxidativo (PEREIRA MAIA et al., 2018). Um POM-Nb também é base de um produto patenteado como desinfetante de superfícies, o INNIB 41®, que apresentou efetividade contra o SarsCov-2. Com relação a ação biocida de POMs contra *Acanthamoeba*, apenas um único estudo foi relatado, referindo-se ao uso de polioxotungstato com ação amebicida (RAZA et al., 2012).

4. METODOLOGIA

4.1 Cultura axênica de *Acanthamoeba* e preparo dos trofozoítos para os ensaios

A cepa de referência *A. Castellanii* ATCC # 30010 foi utilizada nos experimentos. A cultura foi mantida a 32° C em 5 mL de meio PYG (proteose-peptona, 20g/L; extrato de levedura, 1g/L; glicose 0,1M; 0,4mM CaCl₂; 4mM MgSO₄.7H₂O; citrato de sódio 3,4 mM; 0,05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 2,5mM Na₂HPO₄.7H₂O; 2,5mM KH₂HPO₄) (Alfieri *et al*, 2000), completado com 10% de soro bovino fetal e enrofloxacino (20g/mL), em tubos cônicos de 15 mL na posição inclinada, para multiplicação dos trofozoítos. Os repiques foram realizados uma vez por semana. Para obtenção de maior quantidade celular, os trofozoítos foram transferidos para garrafas de área cultivável de 25 cm², com 10 mL de PYG completo e de forma escalonada, para garrafas maiores de área 75 cm² com 20 mL de PYG completo. Após o período de 72h (fase de crescimento exponencial), os trofozoítos foram destacados da placa após resfriamento em placa de gelo por 5 a 10 minutos, recuperados em tubos cônicos de centrifugados a 300 x g por 5 minutos em solução estéril de PBS pH 7,2 (tampão fosfato-salino), por duas vezes seguidas. A contagem dos trofozoítos, com avaliação da viabilidade celular foi realizada por microscopia em câmara de Neubauer, usando corante azul de tripan na concentração final de 0,4%.

4.2 Obtenção de cistos por encistamento *in vitro*

O encistamento foi realizado em salina de encistamento de Neff, em (20mM Tris-HCl, 100mM KCl, 8mM MgSO₄.7H₂O, 0,4 mM CaCl₂, 1mM NaHCO₃) (Neff, 1964). Os trofozoítos quantificados (1,0 a 5,0 x 10⁶ formas) e lavados em PBS pH 7,2 foram transferidos para 20mL de salina de Neff em tubos cônicos de 50 mL. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente (25 ± 2°C) por dez dias, em agitador tipo gangorra. Após esse período, os cistos foram centrifugados e suspensos em solução de dodecil sulfato de sódio 0,5% (SDS) por 5 minutos, para que os trofozoítos e cistos imaturos fossem lisados, permanecendo assim somente cistos maduros (DUDLEY *et al* 2005). Após nova centrifugação (300 x g, 5 minutos) para remover o SDS, o sedimento com os cistos foi suspenso em 3 a 5 mL de PBS pH 7.2, quantificados em câmara de Neubauer e utilizados em até cinco dias nos ensaios.

4.3 Polioxidoniobatos

Foram utilizados quatro polioxidoniobatos denominados **INNIB41®**, **M**, **M-CoE** e **M-Cu**. O **INNIB®** é um dos produtos desenvolvidos pela Nanotecnologia e Inovação em Nióbio (Nanonib), startup mineira que explora as propriedades do material para fins não metálicos. O processo de produção está registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102019029704. Depósito: 14/11/2019). O Innib41® está em fase de aprovação na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e é uma solução antisséptica aplicada como gel ou líquido, capaz de proteger superfícies do Sars-CoV-2 por até 24 horas, não apresentando toxicidade humana e ambiental. Os demais produtos M, M-Cu e M-CoE foram produzidos com tecnologia similar e fornecidos pelo Laboratório de Materiais Avançados (LMA) do Departamento de Química - UFMG. Para os ensaios preliminares, os compostos foram fornecidos nas concentrações estoque de 3000ppm (Innib41®) e 150 ppm (demais compostos), em água como diluente. Os demais testes realizados utilizaram estoques na concentração 3000 ppm.

4.4 Avaliação preliminar da ação dos polioxidoniobatos na viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba*

Os trofozoítos preparados conforme item 4.1 foram distribuídos em placas de 24 poços, na proporção de 5×10^5 formas por poço, em triplicata. Os compostos foram adicionados aos poços na concentração final de 200 ppm (INNIB41®) e 125 ppm para os compostos M, M-Cu e M-CoE. As placas foram incubadas a 32° C/ mantidas sob luz ambiente (lâmpada fluorescente) por 15 minutos, 60 minutos, 2 horas ou 6 horas. Após cada período, foi adicionado 40 µl de tiosulfato de sódio para suspender o efeito das espécies reativas de oxigênio, o conteúdo dos poços foi transferido para tubo cônico com PBS pH 7,2 e centrifugado (3000 xg, 5 minutos) para remover o composto. O sedimento foi suspenso em 500 µL de PBS, adicionando-se azul de tripan na concentração final de 0,2 % para avaliação da viabilidade. Campos aleatórios foram examinados para contagem de 100 a 200 formas, considerando viáveis as formas não coradas e não viáveis as formas coradas. A percentagem de viabilidade foi determinada pela razão entre trofozoítos viáveis e o número total, multiplicado por 100 e os resultados expressos em média de percentagem de viabilidade.

4.5 Avaliação de segurança do composto M em ensaio de citotoxicidade

Considerando a ação do composto M sobre os trofozoítos de *Acanthamoeba* nos testes preliminares, um teste de segurança usando metodologia OECD 301B foi realizado, utilizando a linhagem celular HEK-293, derivada de rim de embrião humano. As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Aldrich, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY), e 1% de solução antibiótica (100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (GIBCOBRL, Grand Island, NY) e mantidas a 37°C em estufa umidificada com 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de 96 poços (5 x 10³ células/poço) e pré-incubadas por 24 horas em estufa de 5% de CO₂, a 37°C. Para determinar a interação do composto M com o meio DMEM, foi realizado um teste prévio de avaliação de solubilidade, testando-se as concentrações de 100 a 1000 µg/mL em DMEM.

A solução estoque a 3000 ppm do composto M foi acrescentada aos poços em volume de até 10% do volume final de cada poço, em sete diluições seriadas (1:2) com concentrações entre 300 e 4,7 µg/mL. A viabilidade celular foi avaliada pela redução metabólica do brometo de 3,4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT) a cristais de formazan. Para isso, o meio foi removido do poço, acrescentando-se 100 µL da solução de MTT em cada poço. A intensidade do corante formazan é correlacionada com o número de células viáveis (Mosmann, 1983). Os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de DMSO e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a 570 nm em leitor de placas (Epoch–Molecular Devices®). Os ensaios foram realizados em seis replicatas em pelo menos três experimentos independentes, utilizando-se H₂O 10% v/v como controle negativo e DMSO 2,5% como controle positivo. Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle negativo, calculado pela seguinte equação: porcentagem da viabilidade celular (%): [(Média da densidade ótica do tratado/média da densidade ótica do controle negativo) x 100]. O valor de CC50 (concentração citotóxica de 50%) foi obtido através de uma regressão não linear utilizando software GraphPadPrism® Version 8.0 (GraphPad Software Inc).

4.6 Açãoamebicidaem curva concentração-resposta sobre trofozoítos

Os trofozoítos preparados conforme item 4.1 foram distribuídos em placas de 48 poços, em volume total de 250 µL contendo 1.0 x 10⁴ formas por poço. O composto M foi

adicionado nas concentrações finais de 100 a 500 ppm, escolhidas com base no CC50 determinado no ensaio de segurança. Poços controle foram mantidos sem o composto M. A placa foi mantida à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) sob luz ambiente (lâmpada fluorescente) por 24 horas. O ensaio foi realizado em triplicata. Finalizado o tempo, 10 μL do conteúdo de cada poço foi removido após homogeneização e transferido a tubo de hemólise contendo o mesmo volume de azul de tripan a 0,4%, para contagem em câmara de Neubauer (conforme item 4.4). Os resultados foram expressos em média porcentagem de viabilidade e a concentração letal 50% (CL50) foi determinada por regressão não linear utilizando software GraphPadPrism® Version 8.0 (GraphPad Software Inc). Imagens dos trofozoítos tratados com 225 ppm do composto M foram captadas e registradas em microscópio invertido nos tempos de 2h, 6h, 18h e 24 h de contato.

Alternativamente, a citometria de fluxo com iodeto de propídio (PI) foi aplicada para determinação de viabilidade celular. Para isso, 50 μL do conteúdo homogeneizado dos poços foram transferidos para um tubo específico utilizado em citometria, adicionando-se 5 μL de iodeto de propídeo (BD Biosciences™) e 200 μL de solução salina (PBS 7,2). As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos. A mistura foi analisada em citômetro de fluxo BD LSRFortessa do Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores – LINBIO-UFMG. Um tubo com amostras viáveis em que não foi adicionado PI foi usado para calibração do equipamento e as demais amostras em triplicata foram avaliadas conforme os seguintes parâmetros: FSC (tamanho, voltagem 150, curva linear), SSC (granulosidade interna, 244, curva linear) e marcação com PI (viabilidade 390, curva logarítmica). Os dados foram adquiridos pelo software FACS DIVA, e processados no software FlowJo.

4.7 Avaliação do efeito amebistático

Os trofozoítos preparados conforme item 4.1 foram centrifugados ($300 \times g$ 5 minutos) para remoção do PBS e ao sedimento foi adicionado de meio PYG sem soro, ou seja, em ambiente de abundância nutricional. A suspensão foi distribuída em placas de 48 poços, em volume de 250 μL contendo 1.0×10^4 formas/ poço. Em seguida, o composto M foi adicionado aos poços na concentração de 225 ppm (próxima ao CC50 e abaixo de CL50). Poços controle foram mantidos sem o composto M. A placa foi incubada à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) e após 24 e 48h, 10 μL da suspensão previamente homogeneizada por aspiração com a pipeta foi removida para avaliação de viabilidade, realizada por contagem em câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes. A

percentagem média de formas viáveis em relação ao número total de formas foi comparada entre o controle e a amostra tratada, nos tempos de 24h e 48 após a incubação.

4.8 Avaliação do efeito cisticida

Os cistos preparados conforme item 4.2 foram distribuídos em placas de 48 poços, em volume total de 250 μL contendo a quantidade de 1.0×10^5 cistos por poço, em triplicata. O composto M, com a exceção dos poços controle dos quais não houve adição do mesmo, foi inserido nos poços em concentrações finais de 225ppm e 500 ppm. A placa foi mantida à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) sob luz ambiente (lâmpada fluorescente), por 24 horas. A placa foi centrifugada ($300 \times g$ por 5 minutos) para remoção do composto M, seguido de uma lavagem com PBS (pH 7,2), nas mesmas condições e reconstituição do volume com PBS para 1 mL. Uma contagem em câmara de Neubauer com azul de tripan a 0,2% foi realizada com 10 μL do conteúdo do poço e 50 μL foram retirados para realização de citometria de fluxo com PI, com os mesmos procedimentos do item 4.7.

Adicionalmente, a viabilidade foi avaliada por técnica de cultura. Para isso, o conteúdo de cada poço foi centrifugado a, e o sobrenadante foi descartado para remoção do composto M, anteriores. O sedimento foi suspenso em 1 mL de PYG e quantidades de 100 μL , 10 μL e 1 μL foram transferidas para placas 96 poços, em dez replicatas para cada diluição, contendo, portanto, a quantidade final de 10^4 , 10^3 e 10^2 cistos por poço (**Figura 4**).

As placas foram incubadas a 32°C por até 20 dias e examinadas periodicamente em microscópio invertido quanto à presença de trofozoítos, indicando presença de cistos viáveis. O efeito cisticida foi calculado com base na percentagem média de poços viáveis após 10 dias de avaliação, considerando a menor diluição em que houve ação cisticida do composto M sobre os cistos.

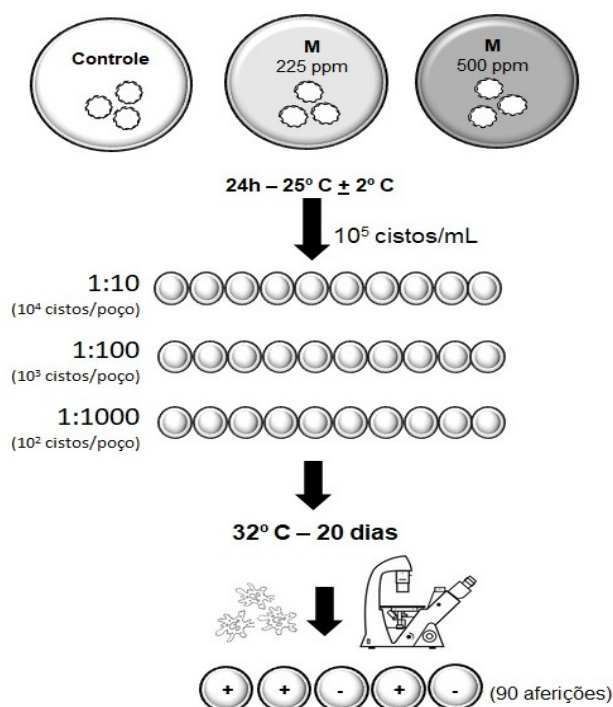


Figura 5: Representação esquemática do ensaio cisticida e avaliação de viabilidade por cultura. Os cistos permaneceram em contato com o composto M por 24 horas, em triplicata. Cada amostra da triplicata foi distribuída em três diluições em 10 replicatas em placa de 96 poços em volume final de 200 µL de PYG. Os poços (90 aferições) foram periodicamente examinados em microscópio invertido para detectar a presença de trofozoítos, por até 20 dias.

4.9 Efeito do composto M na produção de proteases

Para avaliar um possível efeito do composto M na produção de proteases, 5 x 10⁵ trofozoítos em 5mL de PBS 7,2, em garrafa de área 25cm², foram incubados por 24 h com o composto na concentração final de 225 ppm, à temperatura ambiente (25° C ± 2° C) em agitador do tipo gangorra. Uma garrafa com a mesma quantidade de trofozoítos, sem o composto M, foi mantida nas mesmas condições. Após 24 horas, o meio sobrenadante foi coletado, transferido para tubo cônico e centrifugado (300g, 5 minutos) para remoção dos trofozoítos. O sobrenadante foi dividido em quatro alíquotas, três delas para incubação com inibidores de proteases, por 30 minutos a temperatura ambiente, em volume final de 200 µL. Os inibidores utilizados foram fluoreto de fenil metilsulfonil (PMSF) na concentração de 1mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 50 mM e E64 a 10 mM, inibidores de serino, metalo e cisteíno protease, respectivamente.

As amostras tratadas com inibidores e não tratada foram utilizadas para o ensaio de zimografia, com base nos procedimentos de DE SOUZA CARVALHO et al. (2011). Para o

ensaio, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, com sódio duodecil sulfato (SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida foi copolimerizado com 100 mg/mL de gelatina. As amostras foram diluídas em tampão de amostra não redutor 6X (BIORAD ®) e analisados em gel de poliacrilamida copolimerizado com 100 mg/mL de gelatina. A corrida foi realizada em tampão pH 7,4 a 80 V para a largada do gel de compactação e a 100 V para a corrida no gel de fracionamento. Após a separação das proteínas, o gel foi incubado em 2,5% de solução de Triton X-100 por 60 minutos para hidratação, sendo em seguida transferido para os tampões de desenvolvimento para a atividade proteolítica, sendo um tampão de pH neutro (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, contendo 10 mM de CaCl_2) e um tampão ácido (acetato de sódio, pH 3,5) na temperatura de 37°C por 48 horas. Após esse período, o gel foi incubado em *Coomassie Brilliant Blue* para coloração por três horas, em seguida, foi descorado por três vezes sequenciais (tempos de 15, 30 e 60 minutos) em solução descorante de metanol (30%) e ácido acético (10%) para a visualização das bandas claras correspondentes às áreas de digestão pelas proteases.

4.10 Análises Estatísticas

Para realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa Excel 2016 da Microsoft e GraphPad Prism® Version 8.0. Os dados foram expressos pela média e desvio padrão da média (média $\pm$ desvio padrão). As variáveis foram categorizadas segundo a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Bartlett.

Dessa forma, as variáveis paramétricas foram analisadas pela Análise de Multivariância de uma via (ANOVA One-Way) seguida de teste pós teste de Tukey para comparação de três ou mais grupos independentes ou Teste t de Student não pareado quando foram analisados dois grupos. Ao passo que as variáveis não paramétricas foram avaliadas estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todas as análises foi adotado um índice de significância de 95% e um dado foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

Ademais, os valores de concentração inibitória 50% (IC50) e concentração letal 50% (CC50) foram estimados por regressão não linear com gráficos apresentados com média e desvio e feita a respectiva análise de comparação das médias e dos desvios.

Por fim, o teste de correlação de Pearson (r) foi utilizado para comparar os resultados na viabilidade por exclusão com Azul de tripan e Citometria de fluxo no ensaio concentração-resposta amebicida.

5. RESULTADOS

5.1 O polioxidoniobato M apresentou ação amebicida sobre trofozoítos de *Acanthamoeba*

Para realizar uma avaliação preliminar da ação dos quatro polioxidoniobatos sobre *Acanthamoeba*, os compostos foram adicionados a trofozoítos em PBS pH (potencial Hidrogeniônico) 7,2 por tempos e 15 minutos a 6 horas, à temperatura e luz ambiente e em concentração constante (200 ppm para INNIB41® e 125 ppm para M, M-Cu e M-CoE). Nos tempos de 15 e 60 minutos, a queda de viabilidade em relação ao controle não foi significativa para nenhum dos compostos (**Figura 5**). Após 120 minutos, os trofozoítos em contato com os compostos INNIB-41®, M-Cu e M-CoE apresentaram viabilidade diminuída para 87%, 80% e 78%, respectivamente, porém voltaram a apresentar viabilidade próxima ao controle após 6 h (**Figura 5 A, C e D**). Somente o composto M apresentou ação amebicida significativa, afetando cerca de 40% os trofozoítos após 6h de contato (**Figura 5 B**).

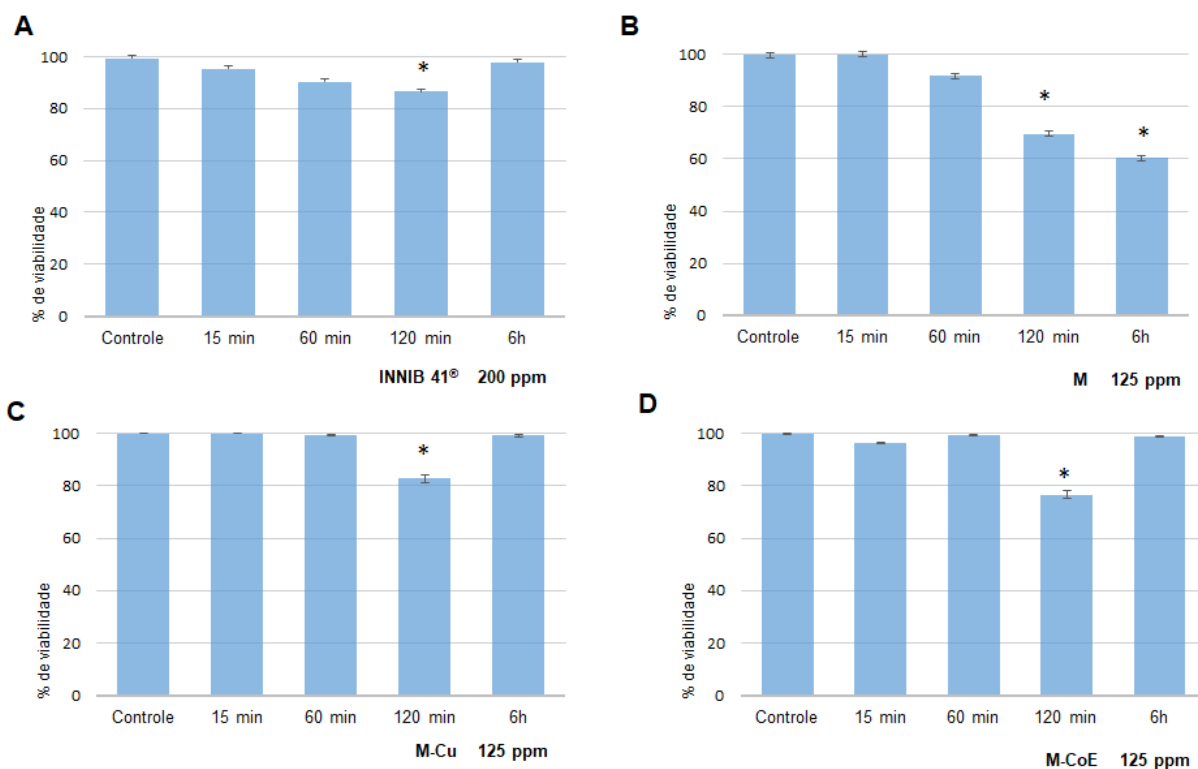


Figura 5: Viabilidade de trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* expostos a polioxidoniobatos INNIB 41®, M, M-Cu e M-CoE nos tempos de 15 minutos a 6 horas, sob luz ambiente com lâmpada fluorescente. Os asteriscos indicam diferença significativa (* $p < 0,05$) em relação ao controle.

5.2 O composto M apresenta CC₅₀ para células de embrião humano de 227,2 ppm

Considerando a ação do composto M contra trofozoítos de *Acanthamoeba*, ele foi selecionado para ensaios posteriores. Em ensaio de segurança conforme metodologia OECD 301B (VITA et al.; 2016), o composto M em diferentes concentrações foi inicialmente avaliado quanto à solubilidade no meio DMEM, usado para manutenção das células HEK-293. Nesta avaliação, a concentração máxima a ser adotada no ensaio de segurança foi de 300 ppm. Desta forma, o composto M foi adicionado às células nas concentrações de 4,7 ppm a 300 ppm. A queda de viabilidade após 24h determinada por método de MTT foi dose dependente e acima de 20% de inibição a partir de 37,5 ppm, chegando a 60% a 300 ppm (**Figura 6A**). Para determinação da concentração inibitória 50% (CC₅₀), os dados foram convertidos para escala logarítmica e por meio de regressão não linear, a concentração inibitória de 50% (CC₅₀) foi estimada em 227,1 mg/mL (correspondente a 227,1 ppm) (**Figura 6B**).

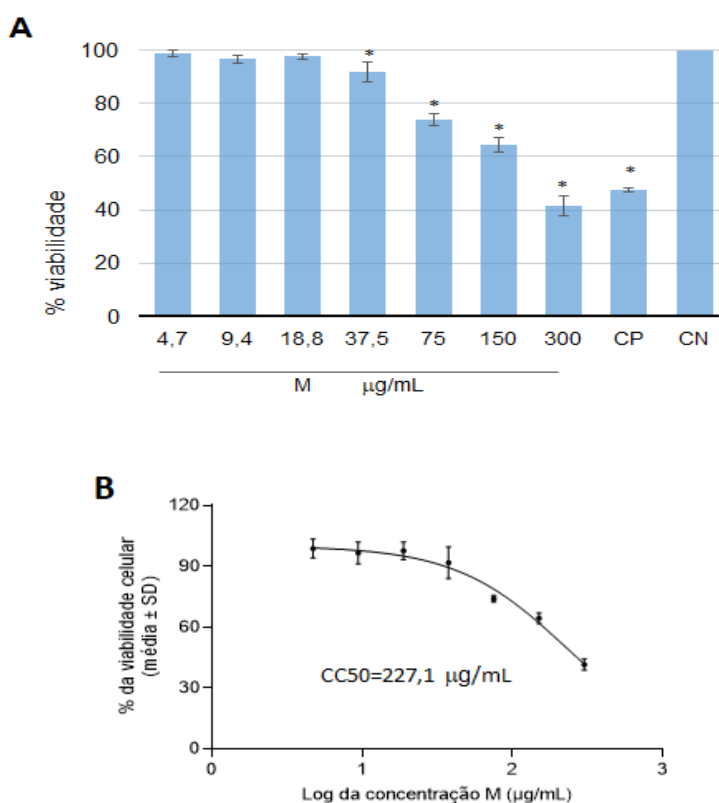
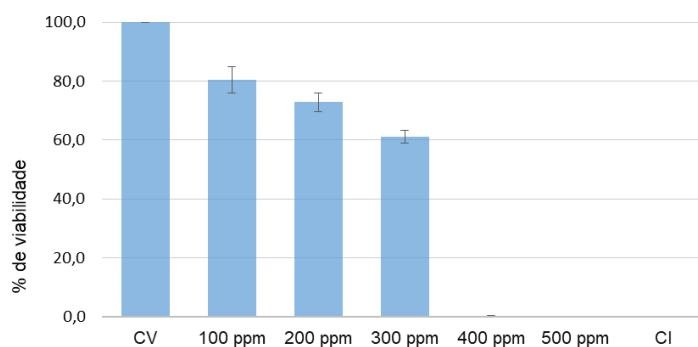


Figura 6: Citotoxicidade do composto M para células (HEK-293) em ensaio por MTTA. Viabilidade das células em ensaio por MTT, após 24 h de contato com o composto nas concentrações de 4,7 a 300 ppm. CP: controle positivo, DMSO 2,5%, CN: controle negativo: H₂O. Asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle CN (p<0,05) **B.** Curva de regressão e determinação da concentração citotóxica (CC₅₀), estimada em 227,1 µg/mL (=227,1 ppm).

5.3 O composto M apresenta ação amebicida contra *Acanthamoeba* a partir de concentração de 100 ppm.

Os trofozoítos foram interagidos com o composto M por 24 horas, em concentrações variáveis de 100 a 500 ppm e sua viabilidade foi avaliada pela exclusão por azul de tripan. Conforme **Figura 7A**, a viabilidade dos trofozoítos diminuiu à medida que a concentração do composto M aumentou, sendo que nas dosagens de 400 e 500 ppm, a presença de células viáveis foram próximas a zero. Para determinar um valor de concentração letal 50% (CL50), um gráfico de regressão não linear foi elaborado, obtendo-se um valor de CL50 de 288,1 ppm (**Figura 7B**). O índice de seletividade, representado pela razão entre o CC50 e CL50, foi estimado em 0,79. Também por estimativa da curva concentração-resposta, a CL100 para o composto M foi próxima de 500ppm.

A



B

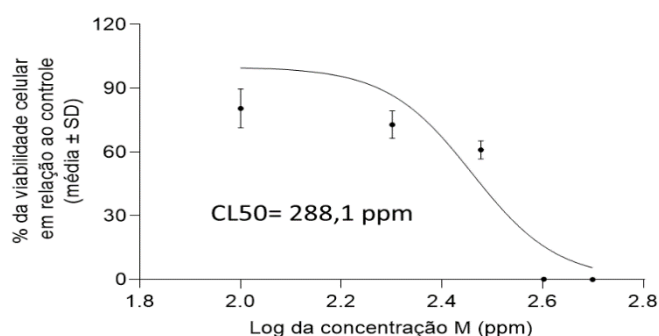


Figura 7:Atividade amebicida do composto M contra trofozoítos de *Acanthamoeba* em PBS 7,2, incubados por 24h a $25 \pm 2^\circ \text{C}$. **A.** Percentagem de viabilidade, avaliada por exclusão de azul de tripan,. CV: controle de viabilidade (não tratado), CI: controle de inviabilidade (trofozoítos inativados por calor). **B.** Curva de regressão e determinação da concentração letal 50 % (CL50) estimada em 288,1 ppm.

O composto M também teve efeito no aspecto dos trofozoítos em cultura, com aumento de células arredondadas e desprendidas da superfície, à medida que aumentava o tempo de exposição (**Figura 8C-F**). Também foi observado que o PBS 7,2 usado no ensaio amebicida não alterou a morfologia e aspecto de monocamada dos trofozoítos quando comparado ao meio de crescimento, PYG (**Figura 8 A e B**).

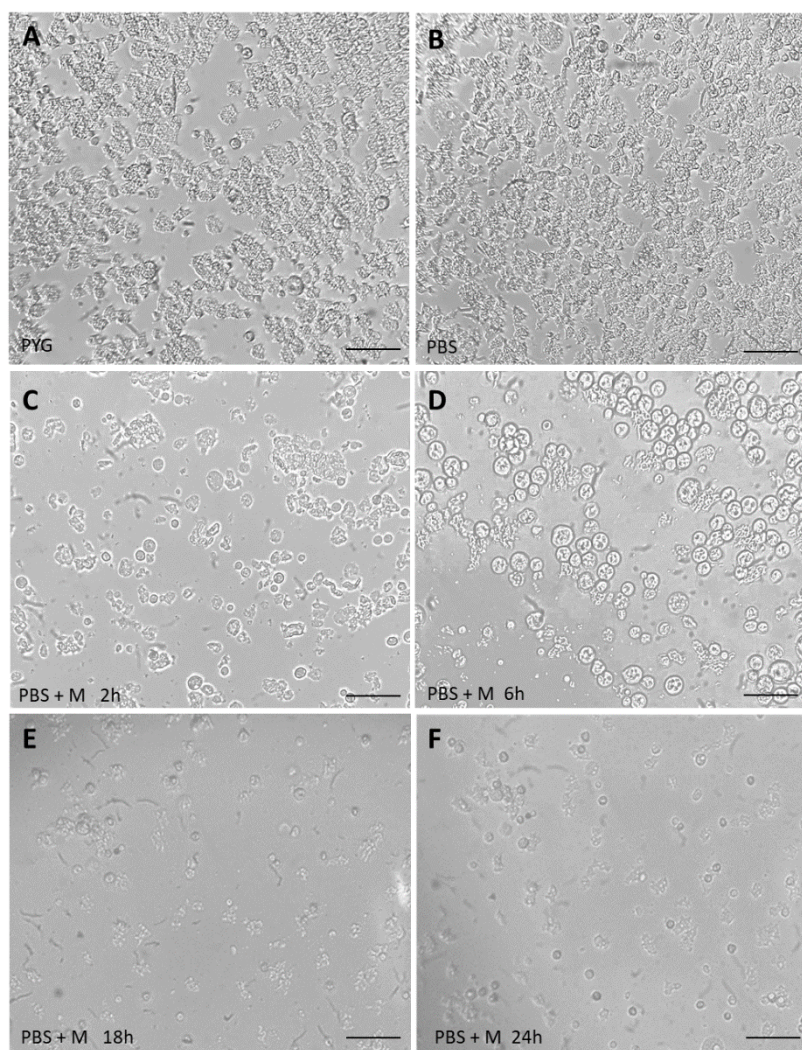


Figura 8: Aspecto da cultura de *Acanthamoeba* exposta a 225 ppm do composto M por 2 a 24 h. Os trofozoítos formam monocamada e vão se destacando ao longo do tempo de contato. Registro em microscópio invertido. Barra: 100 μ m.

Para avaliar outra técnica mais rápida de aferição de viabilidade, as amostras foram tratadas com iodeto de propídio (PI), corante que é absorvido por células não viáveis, e avaliadas por citometria de fluxo. A absorção de PI foi irregular e não teve padrão concentração-dependente, sendo menor que 20% até 300 ppm, de 67% a 400 ppm e não detectável a 500 ppm (**Figura 9 A**). Desta forma, a percentagem de viabilidade, que seria

definida pelo quantitativo de células que não absorveram o PI, permaneceu acima de 80% até 300 ppm e caiu para 33% (400 ppm) ou próximo de 0% (500 ppm) (**Figura 9 B**). Ao realizar a correlação entre os resultados obtidos por técnica de azul de tripan e citometria de fluxo com PI, obteve-se baixa correlação ($R^2 = 0,15$), com índice de Pearson de 0,39 (**Figura 9 C**).

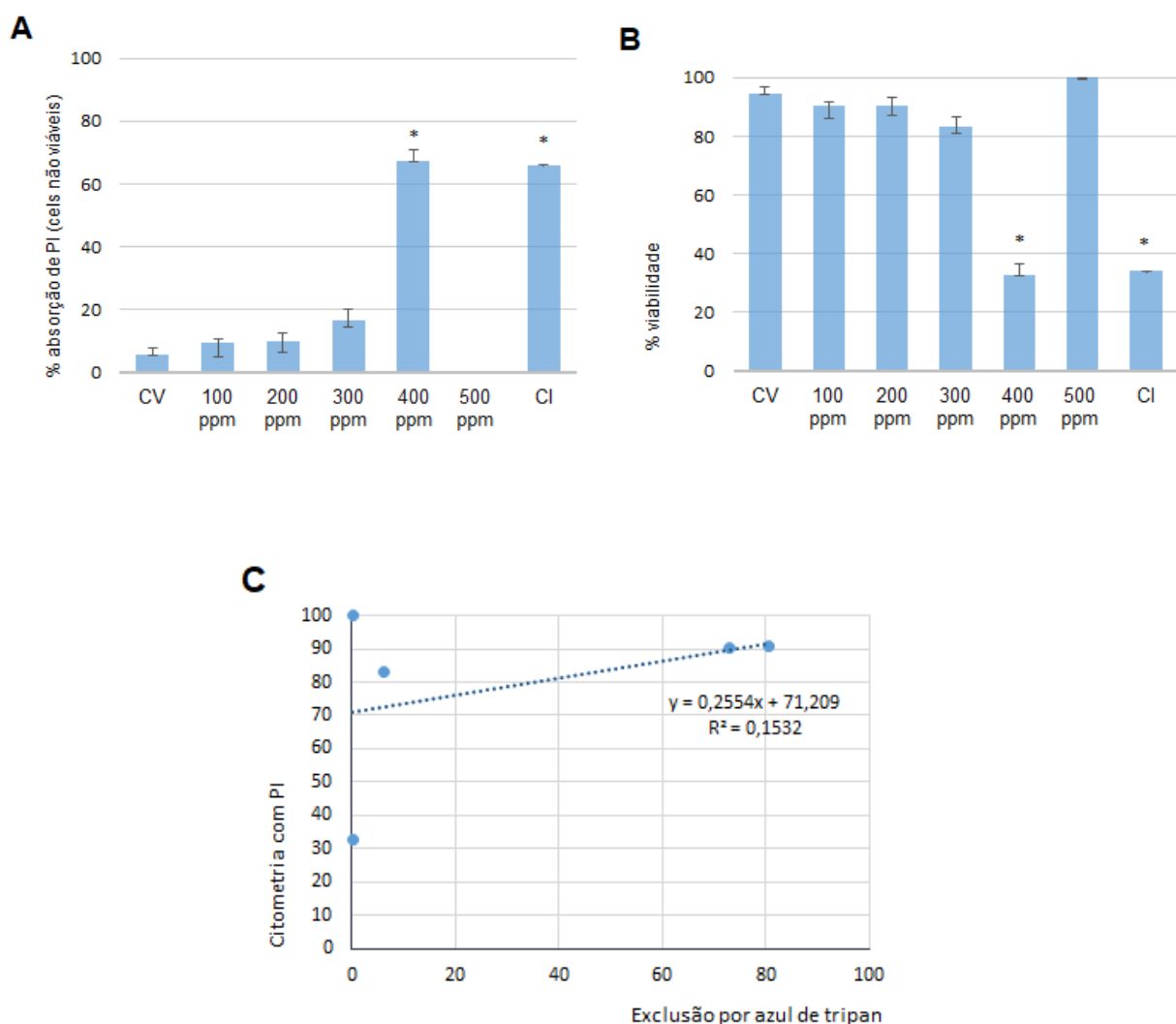


Figura 9: Atividade amebicida do composto M contra trofozoítos de *Acanthamoeba*, com viabilidade avaliada por citometria de fluxo com iodeto de propídio (PI). **A:** Percentagem de células que absorveram iodeto de propídio no ensaio de citometria, **B:** percentagem de viabilidade dos trofozoítos calculada subtraindo 100 do valor absorção de PI. CV: controle de viabilidade (não tratado), CI: controle de inviabilidade (trofozoítos inativados por calor). Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (CV). **C.** Correlação entre os dados da citometria de fluxo com PI e exclusão por azul de tripan, indicando baixa correlação (Índice de Pearson=0,39). Fonte: autoria própria.

5.4 O composto M apresenta ação amebistática sobre *Acanthamoeba* e induz a formação de pré-cistos e cistos

O composto M a 225 ppm apresentou efeito inibitório sobre a multiplicação dos trofozoítos no meio PYG, usado para simular um ambiente de abundância nutricional. A quantidade de trofozoítos viáveis em relação ao total de formas apresentou tendência esperada de aumento entre os tempos 24h e 48h, enquanto nas amostras tratadas, a proporção destas formas viáveis foi menor em relação ao controle. No tempo de 48h a diminuição de formas viáveis foi de 20% em relação ao controle (**Figura 10 A**).

Durante as contagens microscópicas, observou-se a presença de pré-cistos e cistos nas amostras e por este motivo, estas formas foram também quantificadas. A percentagem de pré-cistos e cistos foi significativamente maior nas amostras tratadas do que nos controles (**Figura 10B**), indicando que o composto M induz o processo de encistamento.

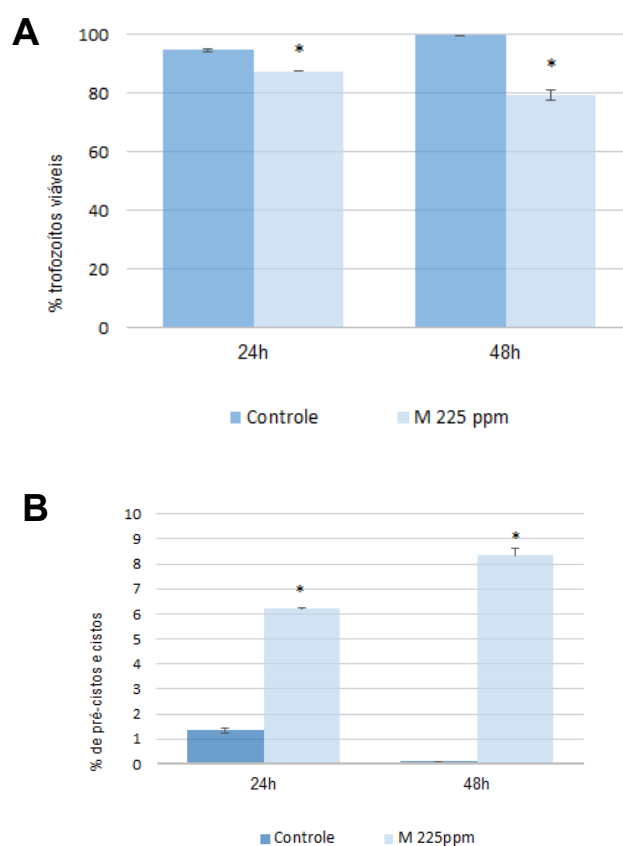


Figura 10: Efeito amebistático do composto M a 225 ppm sobre trofozoítos em meio PYG após 24h e 48h de incubação a $25 \pm 2^\circ$ C. **A.** Percentagem média de trofozoítos viáveis contabilizados por azul de tripan em relação ao total de formas contabilizadas. **B.** Percentagem média de formas em encistamento em relação ao total de formas evolutivas contabilizadas. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Fonte: autoria própria.

5.5. Avaliação da atividade cística

Os cistos de *Acanthamoeba* foram interagidos por 24 h com o composto M a 225 e 500 ppm e sua viabilidade avaliada por exclusão com azul de tripan. Devido a pouca distinção entre formas viáveis e não viáveis à microscopia, não foi possível determinar a viabilidade por esse método.

No 3º dia, as amostras do controle apresentaram trofozoítos em todas as diluições, indicando 100% de viabilidade, enquanto nas amostras tratadas, houve queda de viabilidade na diluição 1:100 e ausência de crescimento de trofozoítos na diluição 1:1000 (Figura 11 A).

No 10º dia, houve crescimento de trofozoítos em todos os poços de amostras tratadas com M a 225ppm. Apenas no tratamento com 500 ppm houve inativação parcial dos cistos, observada pela queda de viabilidade para 60% (Figura 11 B). Não houve crescimento de trofozoítos em poços adicionais após 10 dias.

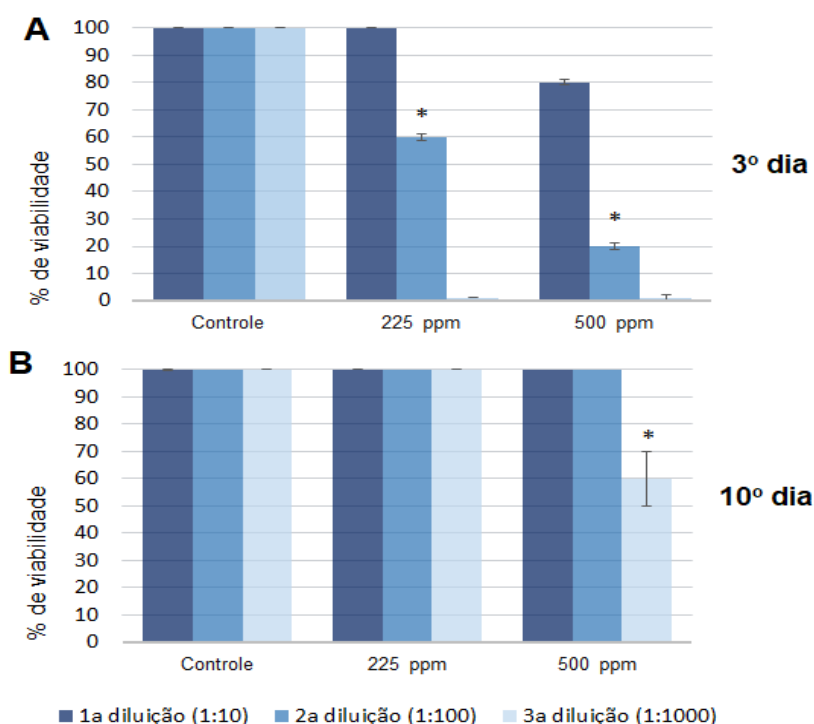


Figura 11. Efeito cisticida do polioxidoniobato M sobre cistos de *Acanthamoeba*, avaliado por cultura em diluições sucessivas após 24h. **A.** Percentagem de desencistamento, indicando viabilidade, no 3º dia. **B.** Avaliação no 10º dia. Asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Fonte: autoria própria.

5.7. Meio condicionado por trofozoítos tratados com o composto M apresenta maior atividade de proteases

O meio condicionado por trofozoítos não tratados (controle) e tratados com M a 225ppm por 24 h foi submetido à técnica zimográfica, indicando que não houve diferença no perfil de proteases produzidas, pois ambas as amostras apresentaram três bandas principais de digestão (**Figura 12**, setas). No entanto, a amostra tratada pelo composto M exibiu maior atividade de proteases, conforme sinais mais intensos de digestão no gel. Houve inibição total por EDTA de bandas de aproximadamente 150 kDa e 50kDa e por PMSF na banda de 50 kDa, indicando atividade de metaloprotease e serinoprotease na amostra controle. No entanto, na amostra tratada, o efeito inibitório do EDTA não ocorreu na banda de 50kDa.

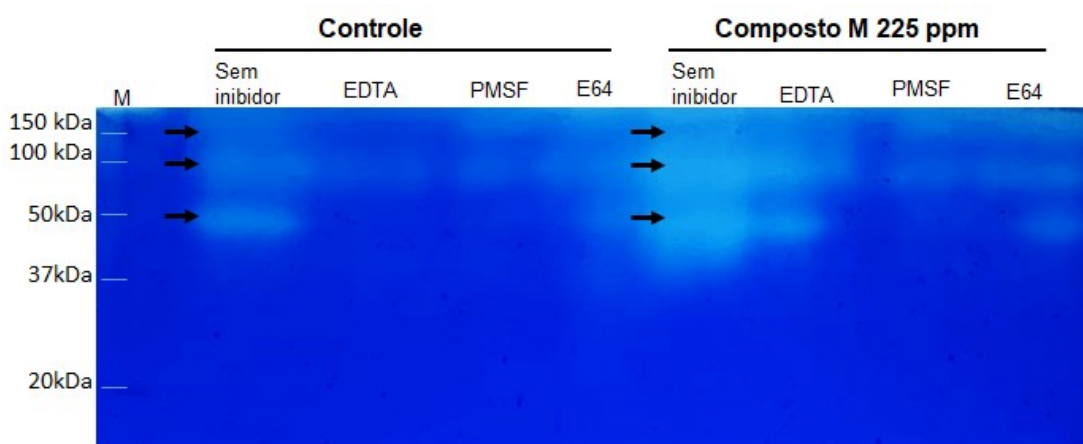


Figura 12: Atividade das proteases secretadas por trofozoítos de *Acanthamoeba* não tratados e tratados com o composto M. As amostras foram aplicadas sem inibidor e com os inibidores EDTA (metaloprotease), PMSF (de serinoprotease) e E64 (de cisteínoprotease). M: padrão de massa molecular. As setas pretas indicam as bandas correspondente a áreas de digestão. Fonte: autoria própria.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, compostos polioxidoniobatos foram investigados como possíveis amebicidas. A estrutura química dos compostos é desconhecida por estarem sob patente, como no caso do INNIB 41® ou terem o potencial de patenteamento (M, M-Cu e M-CoE).

Inicialmente, um teste preliminar foi realizado com concentração fixa dos compostos e variando-se o tempo de exposição, mostrando maior eficiência do composto M, que foi então selecionado para os ensaios posteriores. Os compostos INNIB41®, M-Cu e M-CoE ocasionaram pouca queda de viabilidade e somente a partir de 2h de interação, porém no tempo posterior de 6h as células viáveis aumentaram de proporção, sugerindo um possível mecanismo de adaptação dos trofozoítos ao agente.

Na sequência, o composto M foi avaliado quanto à citotoxicidade para células HEK, em um ensaio de segurança conforme método OECD (PACHECO, 2015). A baixa citotoxicidade é uma característica desejável para desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, incluindo com finalidade amebicida, pois os tratamentos atuais têm como fator limitante a possibilidade de causar agressão às células da córnea e levar à ceratopatiatóxica (LORENZO- MORALES, KHAN, WALOCHNIK; 2015). A cloroexidina, usada no tratamento de CA e que faz parte da composição de algumas soluções oftálmicas para lentes de contato (CARUSO et al.; 2020), apresenta CC50 de 30 µg/mL a 97,8 µg/mL, dependendo do tipo de célula utilizada no ensaio, conforme alguns estudos (SHIRUR et al., 2022; ALI, JAFAR, 2022). Comparado ao da clorexidina, o valor de 227,1 µg/mL para o composto M no presente estudo pode ser considerado alto, mas uma vez que o ensaio preliminar de eficiência foi realizado até 6h, a caracterização amebicida do composto M foi realizada em um ensaio concentração-resposta após interação por 24 h (mesmo tempo de contato do ensaio de segurança). A CL50 (concentração letal 50%) foi estimada em 288,1 ppm, sendo um maior que CC50, indicando baixo índice de seletividade. Em conjunto, esses dados poderiam limitara utilização do composto M como agente terapêutico, porém, não pode ser descartada sua aplicação em soluções de limpeza de lentes, pois nesse caso, a ação do produto em maior tempo seria durante o acondicionamento, com curto período de contato diretamente na córnea.

A avaliação da viabilidade de microrganismos é uma etapa essencial para os estudos de possíveis substâncias que inibam o desenvolvimento de patógenos (LUZAK et al., 2022; LLOYD, 2014). Neste estudo, a técnica de exclusão por azul de tripan foi usada para avaliar a viabilidade das formas de *Acanthamoeba* e foi adequada na demonstração de uma relação dose-dependência da capacidade do composto inativar o trofozoítos.

Alguns trabalhos prévios de avaliação de amebicidas usando azul de tripan para viabilidade já foram publicados (THONGSEESUKSAI et al., 2020; SHI et al., 2020; ERGÜDEN et al., 2016), porém devido ao fato de ser uma técnica trabalhosa, outras técnicas alternativas de avaliação de viabilidade também são estudadas (SHING et al., 2021). Assim, no presente estudo a citometria de fluxo com marcação por iodeto de propídio foi testada em paralelo à técnica com azul de tripan.

Nas condições avaliadas, os dados não foram conclusivos, pois a absorção do PI por células inviáveis não foi regular, resultando em pouca relação entre a dose do composto e a viabilidade celular. Em um estudo anterior de nosso grupo, a citometria de fluxo apresentou alta correlação com a técnica de azul de tripan (FERREIRA, 2023), porém a padronização do ensaio utilizou trofozoítos inativados pelo calor. É possível que o composto M possa ter interagido com o PI ou que o estresse causado pelo composto pode ter induzido a formação de cistos e pré-cistos conferindo resistência à penetração de PI e consequentemente sua marcação por fluorescência.

Os trofozoítos são as formas responsáveis pelo processo de infecção, pois interagem com as células da córnea (NIEDERKORN et al., 1999), assim, produtos que possam inibir sua multiplicação contribuem para diminuir o risco de infecção. Desta forma, foi realizado um ensaio adicional amebistático, que buscou determinar se ocorria inibição de multiplicação dos trofozoítos em um meio com abundância nutricional. O composto foi capaz de induzir uma menor velocidade de crescimento no meio PYG, confirmando seu efeito agressor sobre *Acanthamoeba*.

De acordo com Fiori et al. (2006), alguns fármacos anti-*Acanthamoeba* têm efeito amebistático e não amebicida, o que para o tratamento das infecções, pode ser uma limitação. No entanto, no contexto da conservação e acondicionamento de lentes de contato, a inibição de crescimento pode ser uma vantagem atribuída ao composto M. Por outro lado, o composto induziu a formação de pré-cistos e cistos no meio de cultivo em quantidade significativamente maior que no controle. A indução da formação de cistos por substâncias contra *Acanthamoeba* é considerada um dos fatores que dificultam o tratamento e desinfecção, pois as formas císticas são mais resistentes (JOO et al.; 2022). Nas condições desse estudo, não foi determinado se os cistos produzidos sob efeito do composto M seriam viáveis e poderiam retornar à forma de trofozoítos, necessitando de outros experimentos para avaliar esta hipótese.

Considerando a capacidade de *Acanthamoeba* de encistar e permanecer no ambiente em estado latente, foi realizado o ensaio cisticida. A maior resistência dos cistos foi

confirmada, indicando que 60% foram ainda capazes de desencistar e, portanto, permanecer viáveis após o tratamento por 24h com composto M a 500 ppm. Vários trabalhos anteriores com substâncias anti-*Acanthamoeba* confirmam a menor efetividade para cistos, a começar pelos fármacos usados para tratamento da CA, como PHMB e clorexidina (ELDIN,SARHAN; 2014; NIRO et al.; 2022). Devido ao aumento de casos clínicos registrados de infecções por *Acanthamoeba*, bem como a resistência desses microrganismos aos fármacos e seus efeitos tóxicos sobre as células humanas, o desenvolvimento de medicamentos naturais a fim de promover um tratamento mais eficaz é uma alternativa. Sangkanu et al (2021), usando um agente extraído de uma planta, obtiveram significativos níveis de inativação de *Acanthamoeba*. Também a ação do extrato de própolis contra o protozoário já foi demonstrada (TOPALKARA et al., 2007). Nestes estudos, da mesma forma observou-se a menor eficiência contra cistos, que demandam maior dose ou tempo de contato para inativação. Na estrutura do cisto de *Acanthamoeba*, a parede externa é dupla, apresentando duas camadas (ectocisto e endocisto), tendo carboidratos e estruturas proteicas em sua maioria na composição (SIDDIQUI e KHAN 2012). Esta característica dificulta a penetração dos compostos e sua ação no citoplasma de *Acanthamoeba*, o que deve ter acontecido com o composto M. No entanto, dada a ação cisticida parcial, o composto M poderia ser utilizado para aumentar o efeito sinergicamente a outras substâncias. Um exemplo desta possibilidade é a utilização de enzimas como a celulase ou inibidores de celulose junto com outros fármacos como proposto em alguns estudos (ABJANI et al., 2016; MOON et al., 2015).

As características da parede cística também parecem influenciar a penetração de corantes e, por conseguinte, as técnicas de avaliação, conforme foi observado quando testado o método de exclusão por azul de tripan e citometria de fluxo com PI para o ensaio cisticida. Apesar de haver autores que usam a exclusão por azul de tripan para avaliar a viabilidade dos cistos (THONGSEESUKSAI et al., 2020;OZPINAR, et al., 2020; CHAO et al., 2020), não foi possível realizar a contagem microscópica de viabilidade de forma confiável neste trabalho. Também na técnica de citometria de fluxo o PI a leitura de absorção do agente fluorescente foi irregular e sem padrão dose-dependente. Estas observações corroboram com um estudo anterior em que foi relatada a dificuldade da análise de viabilidade de cistos por citometria de fluxo, em que menos de 10% de cistos absorveram PI após tratamento com biguanidas. Há a hipótese de que corantes fluorescentes não são capazes de penetrar na dupla parede dos cistos maduros (BORAZJANI et al., 2000).

Devido a essas dificuldades, outra estratégia de avaliação de viabilidade foi adotada no teste cisticida, baseando-se na determinação de viabilidade por quantificação do desencistamento em meio PYG. O método foi uma adaptação do método do número mais provável (NMP) descrito por Beattie et al (2003), em que três diluições da suspensão tratada, são semeadas em cinco replicatas com meio de cultivo. A partir de uma tabela com cálculos probabilísticos, o número mais provável de formas viáveis remanescentes é determinado, permitindo então a avaliação da queda de viabilidade em relação ao controle. Para simplificar o processo, no presente estudo as três diluições foram semeadas em dez replicatas e o número percentual daquelas positivas para trofozoítos foi considerado como medida de viabilidade.

Por fim, para avaliar um possível efeito do composto M em processos celulares, comparou-se o perfil de proteases secretadas de trofozoítos não tratados e tratados. Não houve alteração no perfil das proteases, porém as amostras tratadas apresentaram maior atividade. A produção e liberação de proteases é um processo biológico característico de *Acanthamoeba* que tem importância na digestão de alimentos no ambiente (KHAN, 2006; CIRELLI et al., 2020), além de também estar envolvido na fisioapatogenia das infecções pelo protozoário (NIEDERKORN et al., 2021). As principais classes de proteases produzidas por *Acanthamoeba* são as serinoproteases, metaloproteases e cisteínoproteases. As serinoproteases são as mais abundantes e são também cruciais para o processo de diferenciação celular, com envolvimento na formação dos cistos (CIRELLI et al., 2020; DUDLEY et al., 2008). Portanto, a maior intensidade de sinais de digestão poderia estar associada ao estímulo ao encistamento induzido pelo composto M. Observou-se também que nas amostras tratadas por M, uma banda 50 kDa permaneceu visível e não foi inibida pelo EDTA, ao contrário do observado no controle. Uma possível explicação seria a interação de M com esse inibidor enzimático, impedindo seu mecanismo de ação. Na análise zimográfica realizada, uma única concentração do composto M foi utilizada. Estudos adicionais poderiam abordar as diferentes concentrações de M para avaliar se o efeito na produção de proteases é concentração dependente.

Em resumo, os dados apresentados indicaram que o polioxidoniobato M apresentou efeito amebicida, amebistático e cisticida contra *Acanthamoeba* nas condições desse estudo, realizado com interações na presença de luz natural sob lâmpada fluorescente. Como já comentado anteriormente, devido às concentrações de M contra cistos e trofozoítos terem sido maiores que o CC50 no ensaio de segurança, outros testes associando o composto a substâncias anti-*Acanthamoeba* poderão ser realizados para avaliar um efeito sinérgico. Destaca-se ainda que os complexos de peroxidoniobatos possam ser ativados por luz UV,

gerando radicais de oxigênio que aumentam a citotoxicidade para linhagens de células tumorais (PEREIRA-MAIA et al.; 2018). Assim, como continuidade a esse estudo, a aplicação de luz UV poderá ser testada para avaliar o aumento da eficiência de inativação.

7. CONCLUSÃO

Dos quatro polioxidoniobatos avaliados, apenas o composto M exibiu efeito significativo sobre *Acanthamoeba*, com ação amebicida, amebistática e cisticida, mostrando potencial para uso como agente biocida.

Apesar de sua maior eficácia em concentrações acima da determinada no ensaio de segurança e efeito parcial em cistos, o composto M tem o potencial de promover a diminuição da quantidade de formas infectantes, o que pode contribuir para a prevenção da ceratite por *Acanthamoeba*.

Como perspectivas de continuidade de estudos sobre a ação dos polioxidoniobatos sobre *Acanthamoeba*, estão à realização de ensaios de segurança com células de linhagem de córnea (exemplo: célula SIRC, de córnea de coelho) e testes de sinergismo com outros amebicidas já usados na prática clínica, com soluções de conservação de lentes comercialmente disponíveis ou ainda, o uso de luz UV para avaliar se ocorre aumento da inativação. E por fim, é importante buscar compreender os mecanismos envolvidos na inativação causada pelo composto M, o que pode ser investigado por, por exemplo, uso de marcadores de caracterização de morte celular e fotografia de microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

ABJANI, Farhat; KHAN, Naveed Ahmed; YOUSUF, FarzanaAbubakar; SIDDIQUI, Ruqaiyyah. Targeting cyst wall is an effective strategy in improving the efficacy of marketed contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoebacastellanii* cysts. **Contact Lens and Anterior Eye**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 239-243, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2015.11.004>.

AGI, Jorge; ROCCHETTI, Talita Trevizani; YU, Maria Cecília Zorat; FARAH, Michelle Lima; RAMOS, Fabio; FREITAS, Denise de; HÖFLING-LIMA, Ana Luisa. Three Decades of Contact Lens-associated Microbial Keratitis in a Referral Hospital in São Paulo, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [S.L.], v. 84, n. 5, p. 1-7, 2021. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0004>.

ALI, Sumaia Hussein; JAFAR, Zainab Juma. In vitro cytotoxic effect of *Annona squamosa* pulp extract as a mouthwash for children onhuman normal cell line.**Journal of Baghdad College of Dentistry**, v. 34, n. 1, p. 1817-1869, 2022. ISSN (E): 2311-5270).

ALVES, Adilson Rangel; COUTINHO, Aparecido dos Reis. The Evolution of the Niobium Production in Brazil. **Materials Research**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 106-112, fev. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1516-1439.276414>.

ANJOS, Rita; VICENTE, André; VIEIRA, Luísa; MADURO, Vítor; ALVES, Nuno; FEIJÃO, João; CANDELÁRIA, Pedro; TRIGO, Miguel. Queratite por *Acantamoeba* – Revisão de 6 casos clínicos . Centro Hospitalar Lisboa Central. **Revista Sociedade Portuguesa de Oftalmologia**, [S.L.], p. 1-8, 25 nov. 2014. Revista Sociedade Portuguesa de Oftalmologia. <http://dx.doi.org/10.48560/RSPO.6145>.

ANWAR, Ayaz; SHAHBAZ, Muhammad Saquib; SAAD, Syed Muhammad; KANWAL; KHAN, Khalid Mohammed; SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Novel anti-acanthamoebic compounds belonging to quinazolinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 182, p. 111575, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111575>.

AUSTIN, Ariana; LIETMAN, Tom; ROSE-NUSSBAUMER, Jennifer. Update on the Management of Infectious Keratitis. **Ophthalmology**, [S.L.], v. 124, n. 11, p. 1678-1689, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.05.012>.

BAHRAMI, Somayeh; ASADI, Zeinab; ZAREI, Mehdi; HAMIDINEJAT, Hossein; HENRIQUEZ, Fiona L. Exposure to sublethal concentrations of chlorine enhances the cytotoxicity of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 122, n. 6, p.

1371-1380, 11 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-023-07837-z>.

BEATTIE, Tara K.; SEAL, David; V.; TOMLINSON, Alan; MCFADYEN, Angus K.; GRIMASON, Anthony M. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. **Journal of Clinical Microbiology**; v. 41, n. 7, p. 2992–3000, jul. 2003. ASM Journals. doi: 10.1128/JCM.41.7.2992-3000.2003.

BIJELIC, Aleksandar., AURELIANO, Manuel; ROMPEL, Annette. Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer. **Angewandte Chemie** (International ed. in English), v. 58, n. 10, p. 2980–2999, mar 2019. <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>

BORAZJANI, Roya N.; MAY, L.L.; NOBLE, J.A.; AVERY, S.V.; AHEARN, D.G. Flow cytometry for determination of the efficacy of contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1057-1061, 2000.

BOYCE, John M.; GUERCIA, Kerri A.; SULLIVAN, Linda; HAVILL, Nancy L.; FEKIETA, Renee; KOZAKIEWICZ, Janet; GOFFMAN, David. Prospective cluster controlled crossover trial to compare the impact of an improved hydrogen peroxide disinfectant and a quaternary ammonium-based disinfectant on surface contamination and health care outcomes. **American Journal of Infection Control**, [S.L.], v. 45, n. 9, p. 1006-1010, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2017.03.010>.

BÜCHELE, Maria Luiza Carneiro; NUNES, Bruno Fonseca; FILIPPIN-MONTEIRO, Fabíola Branco; CAUMO, Karin Silva. Diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* Keratitis: a scoping review demonstrating unfavorable outcomes. **Contact Lens and Anterior Eye**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 101844, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2023.101844>.

BULLÉ, Danielly Joani; BENITTEZ, Lisianne Brittes; ROTT, Marilise Brittes. Occurrence of *Acanthamoeba* in hospitals: a literature review. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 1-7, 5 abr. 2020. APESC - Associacao Pro-Ensino em Santa Cruz do Sul. <http://dx.doi.org/10.17058/jeic.v10i2.13702>.

BUNSUWANSAKUL, Chooseel; MAHBOOB, Tooba; HOUNKONG, Kruawan; LAOHAPRAPANON, Sawanya; CHITAPORN PAN, Sukhuma; JAWJIT, Siriuma; YASIRI, Atipat; BARUSRUX, Sahapat; BUNLUEPUECH, Kingkan; SAWANGJAROEN, Nongyao. *Acanthamoeba* in Southeast Asia – Overview and Challenges. **The Korean Journal of Parasitology**, [S.L.], v. 57, n. 4, p. 341-357, 31 ago. 2019. Korean Society for Parasitology. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2019.57.4.341>.

CARNT, Nicole; MINASSIAN, Darwin C.; DART, John K.G.. *Acanthamoeba* Keratitis Risk Factors for Daily Wear Contact Lens Users. **Ophthalmology**, [S.L.], v. 130, n. 1, p. 48-55, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2022.08.002>.

CARNT, Nicole; STAPLETON, Fiona. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 77-92, 21 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/opo.12271>.

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

CARUSO, Ciro; ELETTO, Daniela; RINALDI, Michele; PACENTE, Luigi; TROISI, Salvatore; SEMERARO, Francesco; DELL'OMO, Roberto; COSTAGLIOLA, Ciro. Effectiveness and Safety of Topical Chlorhexidine and Vitamin E TPGS in the Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis: a survey on 29 cases. **Journal of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 3775, nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9113775>.

CARVALHO, Fabio Ramos de Souza; FORONDA, Annette Silva; MANNIS, M. J., HÖFLING-LIMA, A. L., BELFORT, R., JR, & DE FREITAS, Denise. Twenty years of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**, v. 28, n. 5, p. 516–519, jun. 2009. Wolters Kluwer Health. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318193e0fe>.

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J.W.; MINNER, H. *Acanthamoebae*: observations on animal pathogenicity. **Science**. v.127, p. 1506, 1958.

UZER CELIK, Esra; TUNAC, AyseTugce; ATES, Mustafa; SEN, Bilge Hakan. Antimicrobial activity of different disinfectants against cariogenic microorganisms. **Brazilian Oral Research**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 1-6, 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2016.vol30.0125>.

CHAO, Malin; THONGSEESUKSAI, Thaksaporn; BOONMARS, Thidarut; LAUMMAUNWAI, Porntip. Investigation of the in vitro cysticidal activity of miltefosine against *Acanthamoeba* spp. **Journal of Parasitic Diseases**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 491-495, 17 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-020-01204-w>.

CHU, Ki-Back; LEE, Hae-Ahm; PFLIEGER, Marc; FISCHER, Fabian; ASFAHA, Yodita; AVELAR, Leandro A. Alves; SKERHUT, Alexander; KASSACK, Matthias U.; HANSEN, Finn K; SCHÖLER, Andrea. Antiproliferation and *Antiencystation* Effect of Class II Histone Deacetylase Inhibitors on *Acanthamoeba castellanii*. **ACS Infectious Diseases**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 271-279, 7 jan. 2022. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00390>.

CIRELLI, Cecília; MESQUITA, Elaine Isabela Soares; CHAGAS, Isabela Aurora Rodrigues; FURST, Cinthia; POSSAMAI, Cynara Oliveira; ABRAHÃO, Jônatas Santos; DOS SANTOS SILVA, Ludmila Karaen; GROSSI, Marina Felipe; TAGLIATI, Carlos Alberto; COSTA, Adriana Oliveira. Extracellular protease profile of *Acanthamoeba* after prolonged axenic culture and after interaction with MDCK cells. **Parasitology Research**, v. 119, p. 659-666, fev. 2020. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06562-w>.

CLARKE, Benjamin; SINHA, Arti; PARMAR, Dipak N.; SYKAKIS, Evripidis. Advances in the Diagnosis and Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. **Journal of Ophthalmology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-6, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/484892>.

COSTA, Adriana O.; CASTRO, Edilene A.; FERREIRA, Gabriela A.; FURST, Cinthia; CROZETA, Marcos A.; THOMAZ-SOCCOL, Vanete. Characterization of *Acanthamoeba* Isolates from Dust of a Public Hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 70-75, jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00453.x>.

DE SOUZA CARVALHO, Fabio Ramos; CARRIJO-CARVALHO Linda Christian, CHUDZINSKI-TAVASSI, Ana Marisa, FORONDA, Annette Silva; DE FREITAS, Denise. Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, n. 4, p.603-609, 2011. ESCMID. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03252.x

DIEHL, Maria Luisa Nunes; PAES, Júlia; ROTT, Marilise Brittes. Genotype distribution of *Acanthamoeba* in keratitis: a systematic review. **Parasitology Research**, v. 120, p. 3051-3063, 2021.

DOS SANTOS, Denise Leal; KWITKO, Sergio; MARINHO, Diane Ruschel; DE ARAÚJO, Bruni Schneider; LOCATELLI, Claudete Inês; ROTT, Marilise Brittes. *Acanthamoeba* keratitis in Porto Alegre (southern Brazil): 28 cases and risk factors. **Parasitology Research**, v. 117, n.3, p. 747–750, 2018. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5745-y>

DUARTE, Juliana L.; FURST, Cinthia; KLISIEWICZ, Débora R.; KLASSEN, Giseli; COSTA, Adriana O. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 135, n. 1, p. 9-14, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.013>.

DUDLEY, Ricky; ALSAM, Selwa; KHAN, Naveed Ahmed. The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. **FEMS microbiology letters**, v. 286, n. 1, p. 9-15, 2008.

DUVANNOVA, Ella; KRASNOU, Illia; KRUMME, Andres; MIKLI, Valdek; RADIO, Serhii; ROZANTSEV, Georgiy M.; KARPICHEV, Yevgen. Development of Functional Composite

Cu(II)-Polyoxometalate/PLA with Antimicrobial Properties. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 2510, 13 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27082510>.

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

EL-SAYED, NagwaMostafa; HIKAL, Wafaa Mohamed. Several staining techniques to enhance the visibility of *Acanthamoeba* cysts. **Parasitology Research**, [S.L.], v. 114, n. 3, p. 823-830, 28 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4190-4>.

ERGÜDEN, Ceren et al. *Melissa officinalis* L., *Mentha x piperita* L. ve *Ocimum basilicum* L.(Lamiaceae) Uçucu Yağlarının *Acanthamoeba castellani* Kist ve Trofozoitleri Üzerine İn Vitro Etkisinin Araştırılması. **Mikrobiyol Bul**, v. 50, n. 4, p. 569-579, 2016.

FANSELOW, Nicholas; SIRAJUDDIN, Nadia; YIN, Xiao-Tang; HUANG, Andrew J. W.; STUART, Patrick M..*Acanthamoeba* Keratitis, Pathology, Diagnosis and Treatment. **Pathogens**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 323, 10 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10030323>.

FERREIRA, Nayara Beatriz Rosa. Citometria de fluxo na avaliação de viabilidade de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* [recurso eletrônico] / Nayara Beatriz Rosa Ferreira. – 2023.

FIORI, Pier Luigi; MATTANA, Antonella; DESSÌ, Danielle; CONTI, Stefania; MAGLIANI, Walter; POLONELLI, L.In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 891-898, 2006. Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw494>.

GARAJOVÁ, Mária; MRVA Martin; VAŠKOVICOVÁ Nadezda; MARTINKA Michael; MELICHEROVÁ, Janka; VALIGUROVÁ, Andrea.Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4466, mar. 2019. Nature Research. doi: 10.1038/s41598-019-41084-6.

GARCÍA-ESPINOZA, Josué Daniel; ROBLES, Irma; DURÁN-MORENO, Alfonso; GODÍNEZ, Luis A..Photo-assisted electrochemical advanced oxidation processes for the disinfection of aqueous solutions: a review. **Chemosphere**, [S.L.], v. 274, p. 129957, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129957>.

GIRIJA, AswathyRavindran; BALASUBRAMANIAN, Sivakumar; COWIN, Allison J..Nanomaterials-based Drug Delivery Approaches for Wound Healing. **Current**

Pharmaceutical Design, [S.L.], v. 28, n. 9, p. 711-726, mar. 2022. Bentham Science Publishers Ltd..<http://dx.doi.org/10.2174/1381612828666220328121211>.

GONZÁLEZ-MÉIJOME, José Manuel; SILVA, Ana Carla da; NEVES, Helena; LOPES-FERREIRA, Daniela; QUEIRÓS, António; JORGE, Jorge. Clinical performance and “ex vivo” dehydration of silicone hydrogel contact lenses with two new multipurpose solutions. **Contact Lens and Anterior Eye**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 86-92, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2012.10.071>.

GRÜN, Anna-Lena; STEMPLEWITZ, Birthe; SCHEID, Patrick. First report of an *Acanthamoeba* genotype T13 isolate as etiological agent of a keratitis in humans. **Parasitology research**, v. 113, p. 2395-2400, 2014.

GUIMARAES, Allan J.; GOMES, Kamilla Xavier; CORTINES, Juliana Reis; PERALTA, José Mauro; PERALTA, Regina H.Saramago. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: one bridge from environment to host virulence. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 193, p. 30-38, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.001>.

GUMEROVA, Naddia I.; AL-SAYED, Emir; KRIVOSUDSKÝ, Lukas; ČIPČIĆ-PALJETAK Hana; VERBANAC, Donatella; ROMPEL, Annette. Antibacterial Activity of Polyoxometalates Against *Moraxella catarrhalis*. **Frontiers in Chemistry**. V. 6, a. 336, ago. 2018. Frontiers. 6:336. doi: 10.3389/fchem.2018.00336.

GUO, Ranran; WANG, Siqi; ZHAO, Lin; ZONG, Qida; LI, Tiancheng; LING, Guixia; ZHANG, Peng. Engineered nanomaterials for synergistic photo-immunotherapy. **Biomaterials**, [S.L.], v. 282, p. 121425, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121425>.

HAJIALILO, Elham; NIYYATI, Maryam; SOLAYMANI, Mohammad; REZAEIAN, Mostafa. Pathogenic free-living amoebae isolated from contact lenses of keratitis patients. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 10, n. 4, p. 541, 2015. Iranian Society of Parasitology & Tehran University of Medical Sciences.

HASLER, Simon; DEDES, Wasiliki; MATHIS, Alexander; GRIMM, Felix; A THIEL, Michael. MoisturePlus Contact Lens Solution as a Source of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 219-220, fev. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0b013e318183a34b>.

ITHOI, Init; AHMAD, Arine-Fadzlan; MAK, J.K.; NISSAPATORN, Veeranoot; LAU, Yee-Ling; MAHMUD, Rohela. Morphological characteristics of developmental stages of *Acanthamoeba* and *Naegleria* species before and after staining by various techniques. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 42, n. 6, p. 1327, 2011.

JALILEHVAND, Masoomah; HAJIALILO, Elham; GHIASI, Yasaman; ROSTAMIAN, Saba; TAHERKHANI Fatemeh; KAZEMI, Fatemeh; HASHEMIPOUR, Sima; BADRI, Miladi; BIJANI, Behzad; JAVADI, Amir; SARAEL, Mehrzad; HAJIAN, Sepideh; HEYDARIAN, Peyman; SARBAZI GOLEZARI, Ali. Isolation and Identification of Free Living Amoeba from Patients and Contact Lens Users in Iran. Isolation and Identification of Free Living Amoeba from Patients and Contact Lens Users in Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 167, 2022.

JERCIC, MARÍA ISABEL. Genotypic diversity of *Acanthamoeba* strains isolated from Chilean patients with *Acanthamoeba* keratitis. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-7, 2019.

JOO, So-Young; AUNG, Ja Moon; SHIN, Minsang; MOON, Eun-Kyung; KONG, Hyun-Hee; GOO, Youn-Kyoung; CHUNG, Dong-Il; HONG, Yeonchul. Sirtinol Suppresses Trophozoites Proliferation and Encystation of *Acanthamoeba* via Inhibition of Sirtuin Family Protein. **The Korean Journal of Parasitology**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 1-6, 23 fev. 2022. Korean Society for Parasitology. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2022.60.1.1>.

KALRA, Sonali K.; SHARMA, Palvi; SHYAM, Kirti; TEJAN, Nidhi; GHOSHAL, Ujjala. *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 208, p. 107788, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107788>.

KAM, KaWai; YUNG, Wing; LI, Gabriel KaHin; CHEN, Li Jia; YOUNG, Alvin L. Infectious keratitis and orthokeratology lens use: a systematic review. **Infection**, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 727-735, 22 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-017-1023-2>.

KHAN, Naveed Ahmed. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 30, n. 4, p. 564-595, maio, 2006. WILEY. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>

KHURANA, Sumeeta; SHARMA, Chayan; RADOTRA, Bishan Dass; MEWARA, Abhishek; TANWAR, Parveen; DATTA, Priya; SEHGAL, Rakesh. Molecular Diagnosis of Encephalitis/Meningoencephalitis Caused by Free-Living Amoebae from a Tertiary Center in India. **Pathogens**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1509, 9 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens11121509>.

KOSRIRUKVONGS, P. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with chlorhexidine. **Ophthalmology**, [S.L.], v. 106, n. 4, p. 798-802, 1 abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0161-6420\(99\)90169-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0161-6420(99)90169-0).

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

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

LACERDA, Ana Gomes de; LIRA, Madalena. *Acanthamoeba* keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. **Ophthalmic and Physiological Optics**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 116-135, 29 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/opo.12752>.

LAKHUNDI, Sahreena; KHAN, Naveed Ahmed; SIDDIQUI, Ruqaiyyah. Inefficacy of marketed contact lens disinfection solutions against keratitis-causing *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 141, p. 122-128, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.018>.

LARES-JIMÉNEZ, Luis Fernando; BORQUEZ-ROMÁN, Manuel Alejandro; ALFARO-SIFUENTES, Rosalía; MEZA-MONTENEGRO, María Mercedes; CASILLAS-HERNÁNDEZ, Ramón; LARES-VILLA, Fernando. Detection of serum antibodies in children and adolescents against *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba* T4. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 189, p. 28-33, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2018.04.011>.

LATIFI, Alireza; SALIMI, Mahboobeh. Growth comparison of *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 in several culture media. **Heliyon**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04805>.

LAURIOL-GARBAY, P. Acid-base properties of niobium-zirconium mixedoxide catalysts for glycerol dehydration by calorimetric and catalytic investigation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 106, n. 1-2, p. 94-102,

LIMA, Carolina G. S.; SILVA, Sandrina; GONÇALVES, Ricardo H.; LEITE, Edson R.; SCHWAB, Ricardo S.; CORRÊA, Arlene G.; PAIXÃO, Márcio W. Highly Efficient and Magnetically Recoverable Niobium Nanocatalyst for the Multicomponent Biginelli Reaction. **Chemcatchem**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 3455-3463, 16 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cctc.201402689>.

LIU, Jun. A clinical case report of *Balamuthia* granulomatous amoebic encephalitis in a non-immunocompromised patient and literature review. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1-6, 2023.

LLOYD, David. Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: a review. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 145, p. 1-10, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.026>.

LONNEN, James; HEASELGRAVE, Wayne; NOMACHI, Miya; MORI, Osamu; SANTODOMINGO-RUBIDO, Jacinto. Disinfection Efficacy and Encystment Rate of Soft

Contact Lens Multipurpose Solutions Against *Acanthamoeba*. **Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 26-32, jan. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/icl.0b013e3181c6e184>.

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

LUZAK, Bogusława; SIARKIEWICZ, Przemysław; BONCLER, Magdalena. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA. hy926 endothelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 83, p. 105407, 2022.

MACIVER, Sutherland K; ASIF, Muhamad; SIMMEN, Martin W; LORENZO-MORALES Jacob. 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. 217-221, 2013. doi:10.1016/j.ejop.2012.11.004

MAIER, Philip; BETANCOR, Paola Kammrath; REINHARD, Thomas. Contact Lens–Associated Keratitis - an Often Underestimated Risk. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 119, n. 40, p. 669, 2022.

MARCIANO-CABRAL, Francine; CABRAL, Guy. Free-Living Amoebae as Agents of Human Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 199, n. 8, p. 1104-1106, 15 abr. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/597474>.

MOHAMMADY, Alireza et al. Genotyping of *Acanthamoeba* Isolated from Hospital Environments and Thermal Water of Recreational Baths in Markazi Province, Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 38, 2023.

MOON, Eun-Kyung; HONG, Yeonchul; CHUNG, Dong-Il; GOO, Youn-Kyoung; KONG, Hyun-Hee. Potential Value of Cellulose Synthesis Inhibitors Combined With PHMB in the Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, [S.L.], v. 34, n. 12, p. 1593-1598, dez. 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0000000000000642>.

MORAN, Siobhan; MOONEY, Ronnie; HENRIQUEZ, Fiona L. Diagnostic Considerations for Non-*Acanthamoeba* Amoebic Keratitis and Clinical Outcomes. **Pathogens**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 219, 8 fev. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens11020219>.

MOREDDU, Rosalia; VIGOLO, Daniele; YETISEN, Ali K. Contact Lens Technology: From Fundamentals to Applications. **Adv Healthc Mater**. 2019 Aug;8(15):e1900368. doi: 10.1002/adhm.201900368. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31183972.

MORGAN, Siân R.; PILIA, Nicole; HEWITT, Melissa; MOSES, Rachael L.; MOSELEY, Ryan; LEWIS, Philip N.; MORRISON, Peter W.J.; KELLY, Steven L.; PARKER, Josie E.;

WHITAKER, David. Controlled in vitro delivery of voriconazole and diclofenac to the cornea using contact lenses for the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 579, p. 119102, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119102>.

MUNGROO, Mohammad Ridwane; SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. War of the microbial world: *Acanthamoeba* spp. interactions with microorganisms. **Folia Microbiologica**, [S.L.], v. 66, n. 5, p. 689-699, 18 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-021-00889-7>.

MURPHY, Emily C.; FRIEDMAN, Adam J. Hydrogen peroxide and cutaneous biology: translational applications, benefits, and risks. **Journal Of the American Academy Of Dermatology**, [S.L.], v. 81, n. 6, p. 1379-1386, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2019.05.030>.

NEFF, R.J.; RAY, S.A.; BENTON, W.F.; WILBORN, M.. Chapter 4 Induction of Synchronous Encystment (Differentiation) in *Acanthamoeba* sp. **Methods in Cell Biology**, [S.L.], p. 55-83, 1964. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)62086-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(08)62086-5).

NICHOLS, Jason J.; CHALMERS, Robin L.; DUMBLETON, Kathy; JONES, Lyndon; LIEVENS, Christopher W.; MERCHEA, Mohinder M.; SZCZOTKA-FLYNN, Loretta. The Case for Using Hydrogen Peroxide Contact Lens Care Solutions: a review. **Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 69-82, mar. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/icl.0000000000000542>.

NIEDERKORN, Jerry Y.. The biology of *Acanthamoeba* keratitis. **Experimental Eye Research**, [S.L.], v. 202, p. 108365, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2020.108365>.

NIEDERKORN, Jerry Y.; ALIZADEH, Hassan; LEHER, Henry; MCCULLEY, James P.. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 1, n. 6, p. 437-443, maio 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)80047-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1286-4579(99)80047-1).

NIRO, Alfredo; PIGNATELLI, Francesco; FALLICO, Matteo; SBORGIA, Alessandra; PASSIDOMO, Fedele; GIGLIOLA, Samuele; NACUCCHI, Annalisa; SBORGIA, Giancarlo; BOSCIA, Giacomo; ALESSIO, Giovanni. Polyhexamethylenebiguanide hydrochloride (PHMB)-properties and application of an antiseptic agent. A narrative review. **European Journal of Ophthalmology**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 655-666, 9 set. 2022. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/11206721221124684>.

NORGAN, Andrew P; SLOAN, Lynne M; PRITT, Bobbi s. Detection of *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp, and *Balamuthia mandrillaris* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 152, n. 6, p. 799-807, 15 ago. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/aqz103>.

OLIVEIRA, Adilson; BRUZIQUESI, Carlos; BALENA, Jose; PEREIRA, Márcio; SILVA, Luiz. NIÓBIO: um elemento químico estratégico para o Brasil. **Química Nova**, [S.L.], p. 1184-1188, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170442>.

OMAHNA-MOLINA, Maritza et al. Acanthamoeba genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. **Parasitology Research**, v. 115, p. 873-878, 2016.

ORTEGA-RIVAS, Antonio; PADRÓN, José M.; VALLADARES, Basilio; ELSHEIKHA, HanyM. *Acanthamoeba castellanii*: a new high-throughput method for drug screening in vitro. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 164, p. 95-99, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.006>.

OZPINAR, Necati; OZPINAR, Hulya; BAKAY, Berna Baysal; TUNC, Tutku. Amoebicidal activity of benzothiazole on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites and its cytotoxic potentials. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 203, p. 105322, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105322>.

PACHECO, Ítalo da Cruz. Aplicabilidade do ensaio de citotoxicidade seguindo o guidance document nº 129 da OECD para avaliação de nanopartículas. 2015. PAGE, Frederick C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **The Journal of Protozoology**, v. 14, n. 4, p. 709-724, 1967.

PADZIK, Marcin; CHOMICZ, Lidia; BLUSZCZ, Julita; MALESZEWSKA, Karolina; GROBELNY, Jaroslaw; CONN, David Bruce; HENDIGER, Edyta B. Tannic Acid-Modified Silver Nanoparticles in Conjunction with Contact Lens Solutions Are Useful for Progress against the Adhesion of *Acanthamoeba* spp. to Contact Lenses. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 1076, 24 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10061076>.

PEREIRA-MAIA, Elene C.; SOUZA, Ivina P.; NUNES, Kelen J. R. C.; CASTRO, Alexandre A.; RAMALHO, Teodorico C.; STEFFLER, Fernando; DUARTE, Helio A.; PACHELI, Ana; CHAGAS, Poliana; OLIVEIRA, Luiz C. A. Peroxonibiuminhibits leucemia cellgrowth. **RSC Advances**, [S.L.], v. 8, n. 19, p. 10310-10313, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8ra00898a>.

POSSAMAI, Cynara Oliveira; LOSS, Ana Carolina; COSTA, Adriana Oliveira; FALQUETO Aloísio; FURST, Cinthia. Acanthamoeba of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties [published correction appears in Parasitol Res. 2018 Apr 30;]. **Parasitology Research**.v. 117, n. 5, p. 1389-1400, maio 2018. Springer. doi:10.1007/s00436-018-5824-8

PUSSARD, M. Le genre *Acanthamoeba* Volkonsky 1931 (Hartmannellidae-Amoebida). **Protistologica**, v. 2, p. 71-93, 1966.

RAMMOHAN, Ram; BAIDWAL, Shaffie; VENKATAPATHY, Narendran; LORENZO-MORALES, Jacob; RAGHAVAN, Anita. A 5-Year Review of Coinfections in *Acanthamoeba* keratitis From South India. **Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice**, [S.L.], v. 49, n. 8, p. 334-338, 24 maio 2023. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/icl.0000000000001005>.

RAZA, Rabia; MATIN, Abdul; SARWAR, Sundas; BARSUKOVA-STUCKART, Maria; IBRAHIM, Masooma; KORTZ, Ulrich; IQBAL, Jamshed. Polyoxometalates as potent and selective inhibitors of alkaline phosphatases with profound anticancer and amoebicidal activities. **Dalton Transactions**, [S.L.], v. 41, n. 47, p. 14329, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2dt31784b>.

ROHAIZAD, Nasuha; MAYORGA-MARTINEZ, Carmen C.; SOFER, Zdeněk; WEBSTER, Richard D.; PUMERA, Martin. Niobium-doped TiS₂: formation of tis₃ nanobelts and their effects in enzymatic biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, [S.L.], v. 155, p. 112114, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2020.112114>.

ROLLAND, Steven; MENGUE, Luce; NOËL, Cyril; CRAPART, Stéphanie; MERCIER, Anne; AUCHER, Willy; HÉCHARD, Yann; SAMBA-LOUAKA, Ascel. Encystment Induces Down-Regulation of an Acetyltransferase-Like Gene in *Acanthamoeba castellanii*. **Pathogens**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 321, 26 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9050321>.

ROTH, Mathias; BALASIU, Adriana; DAAS, Loay; HOLTSMANN, Christoph; SERVERA, Anna; WALCKLING, Marcus; MACKENZIE, Colin R.; FUCHSLUGER, Thomas A.; GEERLING, Gerd. Impact of implementation of polymerase chain reaction on diagnosis, treatment, and clinical course of *Acanthamoeba* keratitis. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, [S.L.], v. 261, n. 7, p. 1951-1959, 16 fev. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-023-05993-7>.

SANGKANU S, MITSUWAN W, MAHABUSARAKAM W, Anti-*Acanthamoeba* synergistic effect of chlorhexidine and *Garciniamangostana* extract or α -mangostin against *Acanthamoeba triangularistrophozoite* and cyst forms. *Sci Rep*. 2021;11(1):8053.)

SASAKI, Haruna; KODA, Toshinari; MORITA, Hiroshi. Anti-*Acanthamoeba* effect of potassium isostearate for use as a multipurpose solution. **Biocontrol Science**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 73-80, 2020. The Society for Antibacterial and Antifungal Agents, Japan. <http://dx.doi.org/10.4265/bio.25.73>

SCHUSTER, Frederick L. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 342-354, jul. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.15.3.342-354.2002>.

SHI, Lei et al. The effect of anti-amoebic agents and Ce6-PDT on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts, in vitro. **Translational Vision Science & Technology**, v. 9, n. 12, p. 29-29, 2020.

SHING, Brian; BALEN, Mina; MCKERROW, James H.; DEBNATH, Anjan. *Acanthamoeba* Keratitis: an update on amebicidal and cysticidal drug screening methodologies and potential treatment with azole drugs. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 1427-1441, 19 maio 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2021.1924673>.

SHIRUR, KrishnarajSomyaji; PADYA, Bharath Singh; PANDEY, Abhijeet; HEGDE, ManasaManjunath; NARAYAN, Aparna I.; RAO, Bola SadashivaSatish; BHAT, Varadaraj G.; MUTALIK, Srinivas. Development of Lipidic Nanoplatform for Intra-Oral Delivery of Chlorhexidine: characterization, biocompatibility, and assessment of depth of penetration in extracted human teeth. **Nanomaterials**, [S.L.], v. 12, n. 19, p. 3372, 27 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano12193372>.

SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 1-13, 2012.

SINGH, B. N. Description of some identified aerobic free-living amoebae. In: **Pathogenic and Non-Pathogenic Amoebae**. Palgrave, London, 1975. p. 65-100.

STOTHARD, Diane R.; SCHROEDER-DIEDRICH, Jill M.; AWWAD, Mohammad H.; GAST, Rebecca J.; LEDEE, Dolena R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, Salvador; DEAN, Chantal L.; FUERST, Paul A.; BYERS, Thomas J. The Evolutionary History of the Genus *Acanthamoeba* and the Identification of Eight New 18S rRNA Gene Sequence Types. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 45-54, jan. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x>.

TAKAHASHI, Yu; SASAHIRA, Naoki; SASAKI, Takashi; INOUE, Yosuke; MISE, Yoshihiro; SATO, Takafumi; ONO, Yoshihiro; OBA, Atsushi; SAIURA, Akio; ITO, Hiromichi. The role of stent placement above the papilla (inside-stent) as a bridging therapy for perihilar biliary malignancy: an initial experience. **Surgery Today**, [S.L.], v. 51, n. 11, p. 1795-1804, abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00595-021-02268-8>.

TOPALKARA, Aysen; VURAL, Ayse; POLAT, Zubeide; TOKER, Mustaga I.; ARII, Mustafa K.; OZAN, Fatih; CETIN, Ali. In vitro amoebicidal activity of propolis on *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n.1, p. 40-45, 2007. Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics <https://doi.org/10.1089/jop.2006.0053>.

THONGSEESUKSAI, Thaksaporn; WONGWAI, Phanthipha; THIDARUT BOONMARS, Thidarut; SANPOOL, Oranuch; LAUMMAUNWAI, Porntip. Evaluating the in vitro efficacy

of gatifloxacin, levofloxacin and gentamicin against *Acanthamoeba* cysts. **International Ophthalmology**, v. 40, p. 361-368, 2020.

VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 369-372, 1 mar. 1991. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/clind/13.supplement_5.s369.

VISVESVARA, Govinda S.; MOURA, Hercules; SCHUSTER, Frederick L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 1-26, jun. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2007.00232.x>.

WANG, Shunyi; SUN, Wuji; HU, Qin; YAN, Hong; ZENG, Yi. Synthesis and evaluation of pyridiniumpolyoxometalates as anti-HIV-1 agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 27, n. 11, p. 2357-2359, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.025>.

WILLCOX, Mark D. P.. Solutions for Care of Silicone Hydrogel Lenses. **Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 24-28, jan. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/icl.0b013e318275e0>.

YAMASAKI, Katsuhide; MIZUNO, Yohei; KITAMURA, Yoshiyuki; MCCANNA, David J.; NGO, William; JONES, Lyndon W. The efficacy of povidone-iodine, hydrogen peroxide and a chemical multipurpose contact lens care system against *Pseudomonas aeruginosa* on various lens case surfaces. **Contact Lens and Anterior Eye**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 18-23, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2020.02.012>.

YAMASE, Toshihiro. (2013). Polyoxometalates active against tumors, viruses, and bacteria. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 54, p. 65–116, nov. 2013. Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41004-8_4

ZHANG, Yuheng; XU, Xizhan; WEI, Zhenyu; CAO, Kai; ZHANG, Zijun; LIANG, Qingfeng. The global epidemiology and clinical diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Journal of Infection and Public Health**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 841-852, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2023.03.020>.