

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMEBICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE  
PRÓPOLIS VERDE SOBRE TROFOZOÍTOS E CISTOS DE *Acanthamoeba  
castellanii***

CARLA DE MAGALHÃES KARUSKY

Porto Alegre  
Agosto/2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMEBICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE  
PRÓPOLIS VERDE SOBRE TROFOZOÍTOS E CISTOS DE *Acanthamoeba  
castellanii***

CARLA DE MAGALHÃES KARUSKY

Licenciado em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilise Brittes Rott  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dra. Gilsane Lino Von Poser

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Agosto/2014

CIP - Catalogação na Publicação

Karusky, Carla de Magalhães  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMEBICIDA DO EXTRATO  
AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE TROFOZOÍTOS E CISTOS  
DE *Acanthamoeba castellanii* / Carla de Magalhães  
Karusky. -- 2014.  
55 f.

Orientador: Marilise Brittes Rott.  
Coorientador: Gilsane Lino Von Poser.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Acanthamoeba. 2. Própolis. 3. Extrato. 4.  
Amebicida. 5. Citotoxicidade. I. Rott, Marilise  
Brittes, orient. II. Von Poser, Gilsane Lino,  
coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me agraciado com uma família maravilhosa, que sempre esteve ao meu lado em todas as minhas escolhas, me dando muito amor, apoio e compreensão. Especialmente aos meus pais Boris e Neiva e à minha querida e amada avó Malta Terezinha Karusky, que sempre compreenderam a minha ausência em diversos momentos importantes em família, que abduquei para hoje realizar esse sonho.

À Dra. Marilise Brittes Rott, minha orientadora, pela oportunidade que me concedeu, pela sua dedicação e incentivo profissional com este trabalho, e pela sua amizade e confiança comigo. Obrigada por colaborar com o meu crescimento profissional e, conseqüentemente, meu crescimento pessoal.

À Dra. Gilsane Lino Von Poser, minha co-orientadora, pelo seu profissionalismo e comprometimento em me ajudar a desenvolver este trabalho. Pela sua atenção, carinho e amizade que fortaleceu e aperfeiçoou este trabalho.

Aos meus amigos e colegas Ismael, Lua, Laura, Vinícius, Ana Maris, especialmente ao João e a Thais pela amizade e companheirismo, pelos ensinamentos, conselhos e paciência nos momentos em que precisei.

Às minhas queridas amigas Grazi, Carol, Nina, Mariella, Amanda e Tássia que estiveram presentes em vários momentos de minha vida, mas em especial nesses dois últimos anos, e acompanharam de perto a minha dedicação e comprometimento com o meu trabalho. Obrigada meninas pelo carinho, amizade, generosidade e compreensão em todos esses momentos.

A todos meus colegas e professores de mestrado, que participaram e contribuíram de alguma maneira com o meu aprendizado, pela amizade, coleguismo, dedicação e cumplicidade.

Às técnicas Silvia e Clarissa e aos professores do Laboratório de Parasitologia, em especial aos Prof. Carlos, Márcia e Onilda, pelo companheirismo, ensinamentos, amizade e carinho durante o tempo em que estive presente. Obrigada pelas longas conversas durante os cafezinhos da manhã e da tarde que sempre renderam algumas risadas, conversas divertidas e debates interessantes.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Agrícola e do Ambiente da UFRGS e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fomento.

Enfim, a todos que colaboraram de alguma forma com a realização deste trabalho. Muito obrigada!

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMEBICIDA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE TROFOZOÍTOS E CISTOS DE *Acanthamoeba castellanii*<sup>1</sup>

Autor: Carla de Magalhães Karusky

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilsane Lino Von Poser

## RESUMO

O gênero *Acanthamoeba* compreende protozoários que pertencem ao grupo das amebas de vida livre e estão amplamente dispersos na natureza. São conhecidos por causarem duas graves doenças, a Encefalite Amebiana Granulomatosa, em pacientes imunodeprimidos e a Ceratite Amebiana, principalmente em usuários de lentes de contatos imunocompetentes. A própolis verde é uma substância resinosa e balsâmica, conhecida na medicina alternativa por apresentar diversas atividades biológicas. Neste trabalho foi avaliada a atividade amebicida de um extrato aquoso de própolis verde contra trofozoítos e cistos de *A. castellanii*. Nas concentrações de 10 e 20 mg/mL, o extrato foi capaz de inativar 100% dos trofozoítos em 24 e 48 horas. A dose de 5 mg/mL inativou 100% dos trofozoítos em 72 horas. Os cistos foram inativados na concentração de 40 mg/mL após 24 horas de exposição ao extrato. O efeito citotóxico do extrato foi avaliado sobre células VERO e HCE através do ensaio MTT. O extrato não causou efeito citotóxico significativo nas concentrações 0,312, 0,625, 1,25 e 2,5 mg/mL sobre as células HCE e nas concentrações 2,5 e 5 sobre as células VERO. O ensaio de adesão realizado mostrou que a ligação de *Acanthamoeba* às células HCE possui comportamento dose-dependente em relação ao extrato de própolis verde. Assim, o presente estudo demonstrou a atividade antiparasitária da própolis verde frente a ambas às formas de *Acanthamoeba*, mostrando-se uma substância promissora para o desenvolvimento de fármaco alternativo, bem como para utilização na composição de soluções de limpeza de lentes de contato ou superfícies. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender seus mecanismos de ação.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (55 p.) Agosto, 2014

# EVALUATION OF AMOEBICIDAL ACTIVITY OF GREEN PROPOLIS AQUEOUS EXTRACT AGAINST *Acanthamoeba castellanii* TROPHOZOITES AND CYSTS<sup>2</sup>

Author: Carla de Magalhães Karusky

Professor: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Gilsane Lino Von Poser

## Abstract

The genus *Acanthamoeba* comprises protozoa belonging to the group of free-living amoebas and it is widely scattered in nature. These protozoa are known to cause two serious diseases, Granulomatous Amebic Encephalitis in immunocompromised patients and amebic keratitis, especially in immunocompetent contact lens wearers. Green Propolis is a resinous and balsamic substance, known in alternative medicine because of its several biological activities. In this study we evaluated the amoebicide activity of an aqueous extract of propolis against trophozoites and cysts of *A. castellanii*. At concentrations of 10 and 20 mg/mL, the extract was able to inactivate 100% of trophozoites within 24 and 48 hours. The dose of 5 mg/mL inactivated 100% of trophozoites within 72 hours. The cysts were inactivated at a concentration of 40 mg/mL after 24 hours of exposure to the extract. The cytotoxic effect of the extract was evaluated on VERO and HCE cells by MTT assay. The extract had no significant cytotoxic effect at concentrations of 0.312, 0.625, 1.25 and 2.5 mg/ml about HCE cells and at concentrations of 2.5 and 5 on VERO cells. The adhesion test performed showed that the attachment of *Acanthamoeba* to HCE cells have dose-dependent behavior in relation to the propolis extract. Thus, this study demonstrated the antiparasitic activity of propolis against both forms of *Acanthamoeba* and proved to be a promising substance for the development of an alternative drug, as well as its use in the formulation of cleaning solutions for contact lenses or surfaces. However, more studies are needed to understand their mechanisms of action.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (55 p.) August, 2014

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 <i>Acanthamoeba</i> spp.</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.1 Ceratite amebiana</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1.2 Tratamento da Ceratite Amebiana</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1.3 Encefalite Amebiana Granulomatosa</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1.4 Tratamento da Encefalite Amebiana Granulomatosa</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2 Própolis</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.1 Própolis Verde</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.2 Composição da Própolis Verde</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.3 Atividades Biológicas de Extratos de Própolis</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Objetivo Geral</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3.1 objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Local de desenvolvimento do trabalho</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Amostras de Própolis</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2.1 Preparo do Extrato Aquoso Bruto de Própolis Verde (EAPV)</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3 Cultivo Monoxênico de <i>Acanthamoeba</i></b> .....	<b>16</b>
<b>3.3.1 Cultivo Axênico de <i>Acanthamoeba</i></b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.2 Produção dos cistos</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.3 Avaliação da Atividade Amebicida</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.4 Análise morfológica</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4 Cultivo de células HCE e VERO</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4.1 Ensaio de Citotoxicidade Celular</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4.2 Ensaio de Adesão</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5 Análise estatística</b> .....	<b>20</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1 Atividade amebicida do Extrato Aquoso Bruto de Própolis Verde (EAPV) sobre trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i></b> .....	<b>21</b>
<b>4.2 Análise morfológica dos trofozoítos de <i>A. castellanii</i> após o tratamento com as soluções testes do EAPV</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3 Atividade amebicida do Extrato Aquoso Bruto de Própolis Verde sobre</b>	



<b>cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4 Análise morfológica dos cistos de <i>A. castellanii</i> após o tratamento com as soluções testes do EAPV. ....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Ensaio de Adesão.....</b>	<b>28</b>
<b>4.6 Ensaio citotóxico sobre as células HCE .....</b>	<b>29</b>
<b>4.7 Ensaio citotóxico sobre as células VERO.....</b>	<b>32</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>34</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A: Preparo de meios de cultivo e soluções utilizadas .....</b>	<b>44</b>

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de vida de <i>Acanthamoeba</i> e suas características morfológicas...4	
Figura 2: Coleta e elaboração da própolis pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> . .... 10	
Figura 3: Atividade amebicida do extrato aquoso bruto de própolis verde frente aos trofozoítos de <i>A. castellanii</i> (ATCC 50492).....21	
Figura 4: Trofozoíto de <i>A. castellanii</i> após 24 horas de exposição às concentrações do extrato de própolis.. .....24	
Figura 5: Trofozoítos de <i>A. castellanii</i> cultivados em meio ágar Page por 7 dias após tratamento com o extrato de própolis. .... 25	
Figura 6: Trofozoíto de <i>A. castellanii</i> após 24 horas e 72 horas de exposição às concentrações do extrato de própolis.....25	
Figura 7: Atividade amebicida do EAPV frente cistos de <i>A. castellanii</i> . ....26	
Figura 8: Cistos de <i>A. castellanii</i> após 24 e 48 horas de exposição às concentrações do EAPV.....27	
Figura 9: Avaliação da atividade inibitória do EAPV na adesão de <i>A. castellanii</i> às células HCE.....29	
Figura 10: Avaliação do EAPV sobre células HCE.....30	
Figura 11: Avaliação do EAPV sobre células da linhagem VERO.....33	

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANN	Ágar Não Nutriente
ANOVA	Análise da Variância
ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
AVL	Amebas de vida livre
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doença (do inglês: <i>Center for Disease Control and Prevention</i> )
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Mínima de 50%
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
EAPV	Extrato Aquoso de Própolis Verde
EPP	Extrato Etanólico de Própolis
FBS	Soro Fetal Bovino (do inglês: <i>Fetal Bovine Serum</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCE	Célula Epitelial da Córnea Humana (do inglês: <i>Human Corneal Epithelial</i> )
HSV	Vírus de Herpes Simples (do inglês: <i>Herpes Simplex Virus</i> )
MBP	Proteína Ligante à Manose (do inglês: <i>Mannose binding protein</i> )
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PYG	Meio proteose peptona, extrato de levedo e glicose
PHMB	Biguanida polioxametileno
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
VERO	Célula epitelial de rim de macaco verde Africano

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o estudo de produtos naturais tem despertado o interesse no campo da medicina, principalmente devido ao aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos comumente utilizados. Diversas substâncias naturais, provindas de plantas, têm sido pesquisadas quanto as suas atividades antimicrobianas para o desenvolvimento de novos fármacos.

Substâncias naturais apresentam vantagens econômicas e são menos nocivas à saúde, mostrando-se promissoras no tratamento alternativo de infecções. Dentre elas, a própolis é muito conhecida na medicina humana por apresentar atividades como antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante e antitumoral.

A própolis é uma mistura complexa heterogênea, produzida pelas abelhas a partir da coleta de metabólitos secundários de diversas estruturas da planta, tais como ramos, flores, pólen, brotos florais e exudatos. Apresenta uma composição complexa e heterogênea de compostos químicos que são dependentes da sua origem botânica e região geográfica. Possui baixa toxicidade e várias atividades biológicas que reforçam o seu emprego na área da saúde.

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários que estão amplamente distribuídos na natureza. São conhecidos por serem potencialmente patogênicos podendo causar infecções em humanos e animais. Dentre as AVL, o gênero *Acanthamoeba* tem despertado grande interesse, principalmente por causar duas doenças bem conhecidas, a encefalite amebiana granulomatosa e a ceratite amebiana.

Em pacientes imunocomprometidos, *Acanthamoeba* spp. atuam como patógenos oportunistas causando a encefalite amebiana granulomatosa, uma grave infecção do sistema nervoso central que leva ao óbito na maioria dos casos, devido à dificuldade de se estabelecer um tratamento eficaz contra esse microrganismo. Desta forma, com o agravamento da doença as amebas podem invadir e colonizar diversos tecidos ocasionando infecções disseminadas. Atualmente o tratamento para esta doença envolve uma combinação de medicamentos como cetoconazol, fluconazol e sulfadiazina. Entretanto, a falta de sintomas visíveis e a dificuldade encontrada por profissionais inexperientes em analisar os exames prejudicam a eficiência do tratamento.

A ceratite amebiana é uma doença crônica e dolorosa que ameaça a visão podendo acometer tanto indivíduos imunocomprometidos quanto saudáveis. Está associada principalmente a usuários de lentes de contatos devido a diversos fatores como: a utilização de soluções caseiras para a limpeza das lentes e ao seu uso prolongado. Esses fatores contribuem para a proliferação de microrganismos nos estojos e a formação de biofilmes nas superfícies.

O tratamento da ceratite amebiana é difícil e requer o uso prolongado da combinação de diversas drogas devido à resistência dos cistos quando se formam no local da infecção. Isso favorece o estabelecimento do patógeno e dificulta o tratamento, pois pode ocorrer o desencistamento e o ressurgimento da doença, mesmo após o tratamento. A confirmação da presença da infecção por *Acanthamoeba* spp., na maioria dos casos, requer um raspado ou biópsia da córnea, tornando-se um procedimento demorado para a aplicação do tratamento específico. Contudo, devido ao aumento de casos clínicos registrados de infecções por *Acanthamoeba*, bem como a resistência desses microrganismos às drogas e aos efeitos tóxicos de muitas dessas drogas sobre as células humanas, o desenvolvimento de medicamentos naturais a fim de promover um tratamento mais eficaz é de suma importância.

Diversos estudos já relataram que extratos alcoólicos, metanólicos, hidroalcoólicos e aquosos de própolis verde possuem atividade antimicrobiana e antiparasitária. Embora, extratos de própolis já tenham sido testados sobre *Acanthamoeba*, para o nosso conhecimento, não se dispõe da avaliação da atividade amebicida de própolis verde sobre esses microrganismos. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade amebicida do extrato aquoso bruto de própolis verde sobre trofozoítos e cistos de *A. castellanni*, a fim de desenvolver um tratamento alternativo, bem como utilizá-lo na composição de soluções de limpeza de lentes de contato ou superfícies.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Acanthamoeba* spp.

O gênero *Acanthamoeba* compreende protozoários unicelulares que junto com *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia* constituem o grupo das Amebas de Vida Livre (AVL). Este gênero é o mais estudado, pois é responsável por diversas patologias em humanos e animais como encefalites, ceratites, infecções na pele, nos pulmões e generalizada (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SCHUSTER e VIVESVARA, 2004). Espécies de *Acanthamoeba* estão amplamente dispersas na natureza devido a sua habilidade de sobreviver em ambientes adversos. Estas amebas já foram isoladas do solo, ar, água de torneira, piscinas, água do mar, soluções de lentes de contato, ambientes hospitalares entre outros (MAGLIANO et al., 2009; CARLESSO et al., 2010; PENS et al., 2008; CAUMO e ROTT, 2011; WINCK et al., 2011).

Atualmente têm aumentado os estudos do gênero *Acanthamoeba* e, conseqüentemente, o número de pesquisas e publicações. Isso, devido à capacidade desse protozoário em, além de produzir infecções em indivíduos tanto imunocomprometidos como saudáveis, também servir como hospedeiro de microrganismos patogênicos. Dois outros fatores que elevam a importância do gênero são o papel que esses microrganismos exercem na natureza e a possibilidade de servirem como modelo de motilidade de células eucarióticas para outros organismos (SIDDIQUI e KHAN, 2012; KINDE et al., 2007).

Como anteriormente descrito, *Acanthamoeba* spp. podem viver livres na natureza ou ainda invadir organismos e viverem como patógenos oportunistas, por isso são chamadas de anfizóicas (VIVESVARA e SCHUSTER, 2008). Espécies do gênero *Acanthamoeba*, quando se oportunizam de seus hospedeiros, podem causar várias patologias como é o caso da Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), infecções cutâneas, nos pulmões e ainda generalizada. Entretanto, quando em contato com a córnea lesada de indivíduos saudáveis esse protozoário pode se comportar como agente potencialmente patogênico e causar uma infecção conhecida como Ceratite Amebiana (SHARMA et al., 1990).

O seu ciclo de vida compreende dois estágios: o trofozoíto e o cisto (Figura 1). O trofozoíto é a sua forma metabolicamente ativa, na qual se alimenta de bactérias, fungos e partículas orgânicas por fagocitose ou por inclusão de partículas

líquidas (PAGE, 1988). É sob essa forma que *Acanthamoeba* se reproduz por divisão celular assexuada conhecida como fissão binária. Apresentam o tamanho aproximado de 12 - 35  $\mu\text{m}$  e são maiores que os cistos, porém o seu tamanho pode variar entre isolados pertencentes a diferentes espécies e genótipos (KHAN, 2006). Durante esse estágio podem ser observados em seu citoplasma lisossomos, vacúolos fagocíticos, vacúolos contráteis e ainda vacúolos contendo glicogênio (TURNER et al., 2006). Possuem grande mobilidade, por meio da emissão de pseudópodes globosos e hialinos de onde emergem pseudópodes menores e finos, conhecidos como acantopódios, que são estruturas características desse gênero. São microprojeções da membrana celular, utilizadas para a adesão, movimentos e captura de alimentos do trofozoíto (PAGE, 1988). Além disso, essa habilidade em se movimentar rapidamente é atribuída à presença de um citoesqueleto de actina que lhe permite locomover-se em torno de 0,8  $\mu\text{m/s}$  (SIDDIQUI e KHAN, 2012).

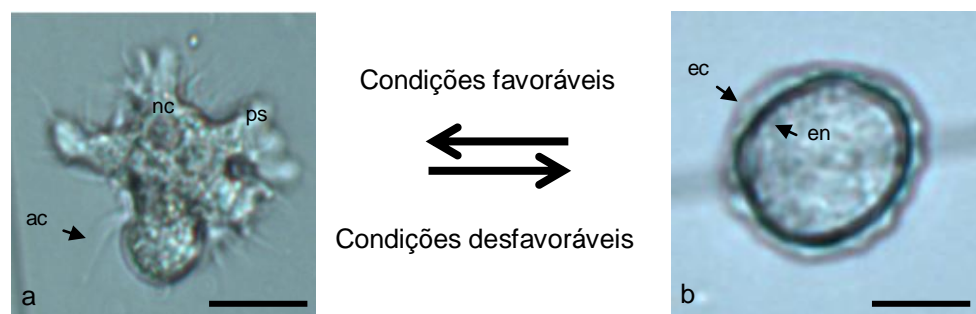


Figura 1: Estágios de vida de *Acanthamoeba* e suas características morfológicas. a. Trofozoíto. nc. Núcleo. ps. Pseudópodes. ac. Acanthopódios. b. Cisto. en. Endocisto. ec. Ectocisto. Barra= 10  $\mu\text{m}$   
Fonte: Carla Karusky, 2014.

O cisto é a forma de resistência de *Acanthamoeba*, formado quando o trofozoíto é exposto a ambientes adversos como alterações de pH, temperatura, deficiência nutricional e à dessecação (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). O cisto possui duas paredes: o endocisto e o ectocisto. O endocisto, a parede interna do cisto, é formado principalmente por celulose podendo apresentar a forma estrelada, poligonal ou arredondada. A parede externa do cisto, o ectocisto, possui uma forma mais esférica e é composta de proteínas e polissacarídeos (SHUSTER e VIVESVARA, 2004; KHAN, 2006). Essa dupla parede confere resistência a esta estrutura quando exposta a ambientes hostis, como variações de temperaturas, radiação ultravioleta, congelamento, cloro e a diversos agentes químicos desinfetantes (SIDDIQUI e KHAN, 2012). Pode ainda se manter viável por

aproximadamente 25 anos no meio ambiente ou em laboratório (MAZUR et al., 1995). Em condições favoráveis de sobrevivência, ocorre o desencistamento e o trofozoíto emerge pelo ostíolo do cisto (SHUSTER e VIVESVARA, 2004).

O seu papel na natureza é de grande importância uma vez que essas amebas podem servir como hospedeiros para diversos microrganismos em seu citoplasma, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* spp., *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* sorotipo O157, entre outras (GREUB e RAOULT, 2004). Além de manterem equilibrada a população de bactérias, atuando como decompositores secundários, aumentam a reciclagem de nutrientes no meio ambiente (SINCLAIR, 1981).

Com base no sequenciamento do gene que codifica a subunidade menor (SSU) do rRNA, a taxonomia molecular descreve 19 genótipos diferentes (T1, T2a, T2b até o T19) para *Acanthamoeba* (STOTHARD et al., 1998; NUPRASERT et al., 2010; QVARNSTROM et al., 2013; MAGNET et al., 2014). Dentre esses isolados, os pertencentes ao genótipo T4 são os principais causadores da Ceratite Amebiana (MAGHSOOD et al., 2005; CORSARO e VENDITTI, 2010). Quanto à classificação morfológica, Pussard e Pons (1977) propuseram a subdivisão do gênero *Acanthamoeba* em três grandes grupos distintos (I, II e III) com base em alguns critérios morfológicos, considerando o tamanho e a forma dos cistos.

### **2.1.1 Ceratite amebiana**

A ceratite amebiana é uma doença crônica e dolorosa na córnea que ameaça a visão podendo acometer tanto indivíduos imunocomprometidos quanto saudáveis (SHARMA et al., 1990). Ela está associada principalmente a usuários de lentes de contatos devido a diversos fatores como: o uso prolongado de lentes de contato, bem como a utilização de soluções de limpeza caseiras (MARCILIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; BOOTON et al., 2005). Outro problema tem sido atribuído à utilização de soluções multiuso na higienização de lentes de contato que possuem em sua composição propilenoglicol, um composto comum destas soluções que induz o encistamento de *Acanthamoeba* (KLIIESKIKOVA et al., 2011). Esses fatores contribuem para a proliferação de microrganismos nos estojos e a formação de biofilmes nas superfícies.

A presença de biofilmes em estojos e lentes de contato favorece a contaminação por *Acanthamoeba*, uma vez que cistos e trofozoítos são capazes de



se aderirem às lentes com mais facilidade na presença de biofilmes, devido à existência de nutrientes (JOSLIN et al., 2007). Trabalhos mostram que a presença de açúcares como glicose, frutose e galactose, além de lipídios e proteínas nas lentes de contato favorecem a adesão de *Acanthamoeba* (BEATTIE et al., 2003).

As infecções por *Acanthamoeba* se dão através do contato do trofozoíto com a córnea previamente lesada. Nesse momento, ocorre a superexpressão de proteínas glicosiladas com manose na córnea. O estabelecimento da infecção ocorre por meio da ligação de uma proteína ligante à manose (MBP), presente na superfície do trofozoíto, promovendo a aderência e a sua penetração no epitélio córneo. Esse contato induz à produção de diversas proteases (serino-protease, cisteíno-protease, elastase e metaloproteases) pelo trofozoíto, que são responsáveis pelas lesões características da doença (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; HUSTON, 2004).

A infecção caracteriza-se por ulcerações, presença de um anel neutrofílico e inflamações. Dor intensa não compatível com o tamanho da lesão, vermelhidão, irritação, lacrimejamento, edema na pálpebra, fotofobia e perda gradual da visão são os principais sintomas clínicos (VIVESVARA e STHER-GREEN, 1990; RUTHES, 2004).

A ceratite por *Acanthamoeba* é, muitas vezes, difícil de ser diagnosticada, pois na maioria dos casos é confundida com infecções fúngicas e bacterianas. Entretanto, os sinais clínicos associados ao isolamento do microrganismo em meios de cultivo a partir do raspado ou biópsia da córnea podem ser utilizados para sua identificação (KILVINGTON et al., 1990). Em alguns casos a infecção persiste, mesmo após a realização da ceratoplastia, sendo necessária a remoção do globo ocular (SIDDIKI e KHAN, 2012). Entre os métodos mais utilizados para a identificação e confirmação da infecção por *Acanthamoeba* estão o cultivo em meios específicos, exames histopatológicos, microscopia óptica (EPSTEIN et al., 1986), microscopia confocal (WINCHESTER et al., 1995) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), este último o mais sensível e eficaz (SCHROEDER et al., 2001; KHAN et al., 2001). Ensaios de imunofluorescência e PCR multiplex e em tempo real, também tem sido utilizados. A vantagem da PCR multiplex é a detecção simultânea de mais de um genótipo na mesma amostra (SIDDIQUI e KHAN, 2012).

Com o aumento do número de casos de indivíduos diagnosticados com ceratite por *Acanthamoeba* nos Estados Unidos, entre os anos de 2003 e 2007, muitos foram associados à utilização da solução de limpeza e conservação de lentes

de contato AMO Complete Moisture Plus® (AMO, Santa Ana, California, EUA) (VERANI et al., 2009). Embora estas soluções estejam de acordo com os critérios exigidos pelo FDA (Food and Drug Administration, Estados Unidos), estas normas preconizam testes de eficiência contra fungos, sendo ainda mais eficazes contra bactérias, todavia, não exigem testes padrões para espécies de *Acanthamoeba* (PATEL e HAMMERSMITH, 2008). Foi realizado um levantamento no início de 2007 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em 22 centros oftalmológicos dos Estados Unidos, para avaliar um possível aumento do número de casos de infecções com ceratite amebiana no país. De acordo com os dados recebidos de 13 centros pôde-se confirmar esse aumento desde o ano de 2004. Resultados preliminares desta investigação atribuem essa alta incidência da ceratite amebiana em usuários de lente de contato que usaram soluções multiuso Advanced Medical Optics (Santa Ana, Califórnia) Complete® MoisturePlus™ (AMOCMP). (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009).

### **2.1.2 Tratamento da Ceratite Amebiana**

A necessidade de um diagnóstico precoce é fundamental para se estabelecer um tratamento mais eficaz. Contudo, uma das dificuldades enfrentadas no tratamento da ceratite amebiana é a inexistência de um medicamento eficaz contra todos isolados de *Acanthamoeba* (SIDDIQUI e KHAN, 2012). Assim, o combate à infecção depende da associação de diversos medicamentos. Como por exemplo, a utilização da combinação de anti-sépticos catiônicos (biguanida de polihexametileno) que atuam na membrana celular e das diamidinas aromáticas (isotionato de propamidina de hexamidina e pentamidina), que inibem a síntese do DNA (KHUNKITTI et al., 1997; HARGRAVE et al., 1999). Aminoglicosídeos como neomicina e paromomicina atuam inibindo a síntese protéica, a anfotericina B, também utilizada, desestabiliza as paredes celulares (GAUTON, 1998). Outro medicamento usado com sucesso é a clorexidina sozinha, ou associada com isotionato de propamidina (KOSRIRUKVONGS et al., 1999). Porém, alguns antibióticos utilizados no tratamento, tais como biguanidas e diamidinas, que agem como amebicida e amebostático, são frequentemente irritantes e tóxicos para os seres humanos (KITAGAWA et al., 2003). Metronidazol também tem sido utilizado (CERVANTES, 1972). A presença de bactérias junto à infecção requer o uso de antibióticos como neomicina e cloranfenicol (SIDDIQUI e KHAN, 2012).

Uma das dificuldades enfrentadas para o sucesso da terapia da ceratite amebiana é atribuída à resistência da forma cística de *Acanthamoeba* às concentrações de diversos antimicrobianos que são alcançáveis e toleráveis na superfície ocular. Isso prolonga o tratamento, uma vez que, a formação do cisto no globo ocular promove uma inflamação crônica e recorrente (KILVINGTON et al., 1990).

### **2.1.3 Encefalite Amebiana Granulomatosa**

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma infecção crônica do sistema nervoso central, que acomete especialmente indivíduos imunodeprimidos. É considerada uma doença grave e fatal causada por várias espécies do gênero *Acanthamoeba* atuando como patógenos oportunistas (KHAN, 2006; MARTINEZ e VIVESVARA, 1997). Com isso, o risco de adquirir essa infecção aumenta em pacientes com alguma enfermidade como doenças hematológicas e hepáticas, insuficiência renal, diabetes, pneumonite, AIDS, cirrose hepática ou ainda transplantados (SIDDIQUI e KHAN, 2012; VIVESVARA, 1991). O uso prolongado de medicamentos imunossupressores necessários nessas terapias causa o rompimento da barreira imunológica, favorecendo, assim, o estabelecimento de infecções secundárias como a EAG (KHAN, 2003).

Trabalhos mostram que o acesso de *Acanthamoeba* ao SNC envolve vários caminhos. Invadindo a mucosa nasal e migrando ao longo das fibras nervosas até o bulbo olfativo ou atingindo os pulmões por via nasal, onde caem na corrente sanguínea e provocam disseminação hematogênica. Em seguida, ultrapassam a barreira hemato-encefálica, entram no sistema nervoso central e promovem a doença (MARTINEZ e VIVESVARA, 1997). A doença se agrava lentamente e seu período de incubação pode variar de semana a meses, podendo apresentar, com o tempo, quadro clínico subagudo ou crônico (WALOCHNIK et al., 2002).

Após a infecção, os sintomas clínicos da doença são semelhantes aos de patologias ocasionadas por outros microrganismos, tais como, virais, meningite bacteriana e tuberculose. Caracterizam-se por manifestações como, dor de cabeça, febre, cefaleia, hemiparesia, alterações comportamentais, rigidez no pescoço, náuseas, vômitos, paralisia de nervos cranianos, aumento da pressão intracraniana, convulsões, ocasionando a morte do paciente (MARTINEZ e VIVESVARA, 1991; MARTINEZ e VIVESVARA, 1997). A sua patologia envolve a formação de

granulomas, durante o processo de infecção, compostos por amebas, macrófagos, micróglia, células polimorfonucleares, células T e células B (KHAN, 2008). A visualização de um edema grave, lesões multifocais e necrose hemorrágica no tecido cerebral são geralmente observadas após a necropsia, isso decorrente do desenvolvimento fulminante da doença (KHAN, 2003; SCHUSTER e VIVESVARA, 2004). Ainda não se tem conhecimento se tais lesões são devidas à presença dos trofozoítos no local ou ao processo inflamatório. Embora as lesões se encontrem restritas ao lobo parietal e temporal, em indivíduos muito imunocomprometidos, elas podem ser disseminadas, acometendo o gânglio basal, mesencéfalo e tronco cerebral (SIDDIQUI et al., 2011).

Devido à dificuldade na realização do diagnóstico, a grande maioria dos casos só é diagnosticada *post mortem*. A constatação de altos níveis de anticorpos específicos para *Acanthamoeba* no soro de pacientes através da imunofluorescência indireta pode ajudar na confirmação da infecção (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Métodos como tomografia computadorizada, ressonância magnética e análise do líquido cefalorraquidiano também são utilizados para o diagnóstico, pois colaboram para encontrar e reconhecer as lesões (MARTINEZ e VIVESVARA, 1997).

#### **2.1.4 Tratamento da Encefalite Amebiana Granulomatosa**

A falta de tratamento específico para EAG, leva ao óbito a maioria dos indivíduos acometidos. A dificuldade em estabelecer um tratamento eficaz envolve diversos fatores, tais como: a falta de sintomas evidentes, a resistência de *Acanthamoeba* frente à maioria dos antimicrobianos e a dificuldade destes em ultrapassar a barreira hemato-encefálica para atuar no SNC (KOTTING et al., 1992). A utilização de cetoconazol, fluconazol, sulfadiazina, isetionato de pentamidina, anfotericina B, azitromicina, itraconazol, ou rifampicina, tem sido recomendada (LALITHA et al., 1985). Entretanto, o uso destes medicamentos promove a manifestação de efeitos colaterais e o desenvolvimento de deficiências, como a perda de audição e visão (KOTTING et al., 1992). Estudos experimentais estão sendo realizados com miltefosine, fenotiazinas (tioridazina e trifluoperazine) e mostraram-se promissores no tratamento da Encefalite Amebiana Granulomatosa (DIAZ, 2010; KOTTING et al., 1992).

## 2.2 Própolis

A própolis (Figura 2) é uma mistura complexa heterogênea, formada por material resinoso e balsâmico com aroma forte e característico, coletada pelas abelhas *Apis mellifera* de diversas partes da planta, tais como ramos, flores, pólen, brotos florais e exudatos (LUSTOSA et al., 2008; PEREIRA et al., 2002). Os metabólitos secundários das plantas são misturados com pólen, cera e secreções salivares das abelhas (BURDOCK, 1998).

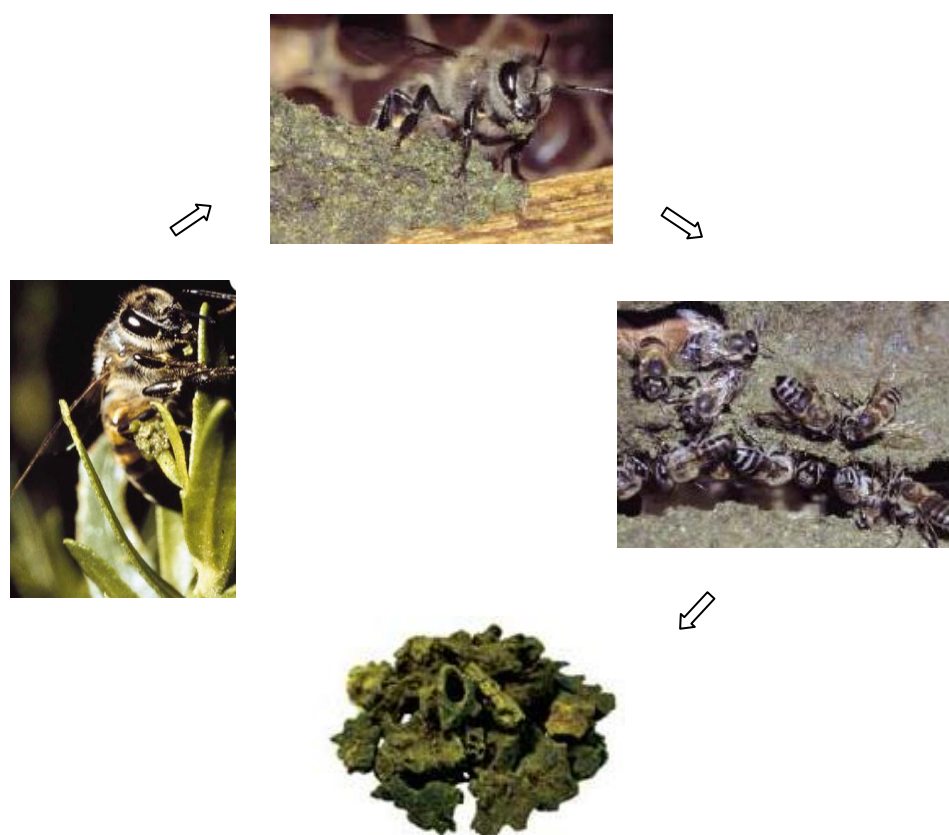


Figura 2: Coleta e elaboração da própolis pelas abelhas *Apis mellifera*. Fonte: Adaptado de KUMAZAW et al., 2003.

A palavra própolis de origem grega significa “pró” em defesa “polis” cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade (PEREIRA et al., 2002). As abelhas utilizam a própolis para vedar orifícios e proteger sua colmeia de insetos e microrganismos indesejáveis (BOGDANOV, 2012). A própolis na colmeia possui ação contra vários microrganismos mantendo o ambiente estéril e a temperatura constante além de possuir propriedades de embalsamamento, evitando a entrada de insetos invasores na colméia (MARCUCCI et al., 1996). Tal atividade já era conhecida e utilizada pelo ser humano desde os tempos remotos. No Egito antigo

era conhecida como “cera negra” e utilizada para embalsamar os mortos, devido sua atividade antiputrefativa (PEREIRA et al., 2002). Seu emprego já foi registrado pelos gregos, romanos, assírios, incas e egípcios (LUTOSA et al., 2008; BARBOSA et al., 2009). Os gregos Galeno, Aristóteles, Plínio, Dioscórides e bem como médicos romanos utilizavam suas propriedades medicinais, tais como cicatrizante e antisséptica, no tratamento de feridas e desinfecção bucal.

A sua composição química varia de acordo com sua origem botânica, região geográfica, época da coleta, bem como as espécies das abelhas (BANKOVA et al., 2000). Geralmente, é composta por 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de restos orgânicos (MARCUCCI et al., 1996; SCAZZOCCHIO et al., 2006). Sua coloração pode variar do marrom escuro passando para uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo da sua idade e sua procedência botânica (MARCCUCI et al., 1996).

### **2.2.1 Própolis Verde**

A própolis verde é encontrada na região sudeste do Brasil e sua origem botânica é a planta *Baccharis dracunculifolia*, da família Asteraceae popularmente conhecida como “alecrim do campo” ou “vassoura”. Os estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Espírito Santo e Rio de Janeiro são os principais produtores da própolis verde no Brasil, mostrando a importância desse produto na economia do país (NASCIMENTO et al., 2008). De acordo com Park (2004), com base na composição físico-química e suas propriedades biológicas, a própolis brasileira foi classificada em 12 grupos, sendo a própolis verde a mais pesquisada e comercializada. Entretanto, um trabalho realizado por Silva et al., (2007), mostra a existência de um novo tipo de própolis chamada de própolis vermelha brasileira, encontrada na cidade de Maceió (Nordeste do Brasil).

### **2.2.2 Composição da Própolis Verde**

A própolis possui uma composição variável dependente de vários fatores, tais como o período de sua colheita e as características fitogeográficas de onde se encontra a colméia (MARCUCCI et al., 1996; SCAZZOCCHIO et al., 2006). Devido à presença de diversas substâncias na própolis e principalmente, à variação da polaridade destas, diversos solventes são utilizados para a extração de seus compostos químicos. Com isso, uma variedade de extratos de própolis vem sendo

preparados com diferentes solventes como: etanol (BURDOCK, 1998; PARK et al., 1998), etanol + água (hidro-alcoólico) (PARK et al., 1998), álcool etílico (KONISHI et al., 2004), metanol (FUNARI e FERRO, 2006; WOISKY e SALATINO, 1998) e água entre outros. Embora entre esses o etanol seja o mais utilizado, extratos aquosos de própolis tem sido relatado no uso farmacêutico (NAGAI et al., 2003).

Algumas características da própolis, tal como a sua consistência, podem variar de acordo com a temperatura. Em períodos frios sua textura se torna dura e quebradiça, alterando para brando e pegajoso em temperaturas quentes. A sua consistência mais rígida indica uma quantidade maior de resinas e quando maleável uma percentagem elevada de ceras. Entre estas, a resina é muito requerida nas amostras de própolis devido às atividades biológicas atribuídas a essa substância (FUNARI e FERRO, 2006).

Diversas substâncias químicas pertencentes às classes álcoois, aldeídos, ésteres alifáticos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, aminoácidos, ésteres, hidrocarbonetos, flavonoides, éter, ácidos graxos, cetonas, terpenoides, esteroides e açúcares estão presentes na própolis (MARCUCCI et al., 1995). Uma análise da composição química das propriedades da própolis brasileira foi realizada por Bankova et al. (1998) durante as quatro estações do ano, através de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM). Como resultado, os autores encontraram compostos parecidos nas diferentes épocas coletadas e o principal constituinte entre os compostos fenólicos foi o ácido cinâmico. Hata et al., (2012) realizaram a avaliação da composição do extrato etanólico de própolis verde brasileira através de HPLC. Entre os compostos encontrados como o ácido p-cumárico, drupanina, bazarina e artepilina C, este último estava presente em 90% da fração pungente do extrato.

Moura e colaboradores (2011) analisaram a composição química de um extrato aquoso de própolis verde de uma amostra provinda de Minas Gerais através de HPLC/ESI/MS. Os principais constituintes do extrato foram ácidos cafeoilquínicos e derivados do ácido cinâmico, como artepilina C e dupranina. Derivados de ácido cafeoilquínicos como o ácido clorogênico, o ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico e ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, bem como os derivados de ácido cinâmico, principalmente o ácido p-cumárico, bazarina, drupanina e artepilina C são os principais constituintes dos extratos aquosos da própolis verde brasileira (NAKAJIMA et al., 2007). Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a estes compostos, tais como

antimicrobianas, antioxidantes (PAULINO et al., 2008), anti-tumorais (ORSOLIC e BASIC, 2005) e indutoras de apoptose (MATSUNO et al., 1996). De acordo com Bankova e colaboradores (1995), a própolis brasileira possui uma baixa concentração de flavonoides e ésteres de ácidos fenólicos e altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas e terpenoides.

Segundo Park e colaboradores (1997), a própolis produzida pelas abelhas *Apis mellifera* das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil apresentou os flavonóides quercetina, canfenol, apegenina e sacuranetina. Estes compostos químicos foram encontrados em concentrações distintas devido, provavelmente, à grande diversidade ecológica. Uma análise da própolis nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná, mostrou que a própolis do Paraná provém da *Baccharis caprariaefolia* (alecrim pluma) e foi observada a presença do artepilina C. Nos demais estados também foi encontrada a presença do artepilina C, entretanto a origem botânica da própolis mostrou ser a *Baccharis dracunculifolia* (MENEZES, 2005).

Muitos trabalhos realizados no Brasil mostram que esta ampla variabilidade na composição da própolis é devida à grande biodiversidade do país e à habilidade bioquímica das abelhas em alterar a composição nativa da própolis ou ainda adicionar compostos próprios (PEREIRA et al., 2002).

### **2.2.3 Atividades Biológicas de Extratos de Própolis**

Diversos estudos relatam as importantes atividades da própolis, tais como atividade antiinflamatória, antioxidante, antitumoral (PARK et al., 2002), antiparasitária (STARZYK et al., 1976), antibacteriana, antifúngica e antiviral (KOSALEC et al., 2005). Com isso, tem aumentado a elaboração de diversos extratos de própolis a fim de avaliar suas atividades antimicrobianas, principalmente sobre microrganismos potencialmente patogênicos (MONZOTE et al., 2012; BANSKOTA et al., 2001).

De acordo com Ota e colegas (2001), extratos etanólicos de amostras de própolis do estado de São Paulo foram testadas sobre 80 cepas de *Candida*, dentre elas, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. albicans* e *C. guilliermondii*. O extrato apresentou atividade antifúngica contra todas as cepas, entretanto *C. albicans* mostrou maior sensibilidade em relação às demais.

Santos e colaboradores (2002) testaram diversas frações do extrato de



própolis brasileiro contra bactérias anaeróbicas orais e obtiveram resultados positivos. Todas as frações testadas apresentaram atividade antibacteriana contra *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*, mostrando a importância da continuação nos estudos de extratos de própolis como um fármaco alternativo contra microrganismos.

Extratos de própolis foram avaliados quanto a sua atividade antibacteriana sobre *Streptococcus pyogenes* e mostraram excelente atividade contra esses microrganismos na concentração de 234 µg/mL (BOSIO et al., 2000).

Amostras de própolis das regiões de Bragança, Coimbra e Beja em Portugal foram testadas sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras. Todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana. Entre os microrganismos, a *C. albicans* apresentou maior resistência ao extrato e o efeito sobre as bactérias foi mais eficaz na gram-positiva *S. aureus*, que apresentou maior sensibilidade. A gram-negativa *E. coli* mostrou menor sensibilidade aos extratos, isso provavelmente devido à presença de uma membrana externa nas gram-negativas que é ausente nas gram-positivas (SILVA et al., 2012).

Trabalhos realizados por Najmadeen e Kakamand (2009), mostraram que os extratos etanólicos de própolis podem apresentar diferentes atividades contra as bactérias gram-positivas. Naquele trabalho, cepas de *S. epidermidis* foram menos suscetíveis que *S. aureus*. Isso mostra que o extrato atua de maneira diferente entre microrganismos do mesmo gênero. A atividade antiviral de um extrato aquoso de própolis já foi observada contra herpes simplex (HSV) utilizando um modelo animal bloqueando o desenvolvimento da infecção (HULEIHEL e ISANU 2002).

A atividade antiparasitária de extratos etanólico e hidroalcoólico brutos de própolis verde brasileira foi demonstrada sobre *Leishmania donovani* e *Plasmodium falciparum* (SILVA FILHO et al., 2009). Falcão e colaboradores (2014) testaram amostras de própolis de diversas regiões contra alguns protozoários patogênicos. Todas as amostras apresentaram atividade contra *P. falciparum*, *L. infantum*, *T. cruzi*, *T. brucei*, entretanto a melhor atividade antiprotozoária foi observada sobre *T. brucei*.

## 2.3 Objetivo Geral

Com base no que foi anteriormente descrito, o objetivo da presente dissertação foi avaliar a atividade amebicida do extrato aquoso bruto de própolis verde sobre *Acanthamoeba castellanii*.

### 2.3.1 objetivos específicos:

Verificar a atividade amebicida do extrato aquoso de própolis verde sobre trofozoítos e cistos de *A. castellanii*

Avaliar a capacidade do extrato em inibir a adesão dos trofozoítos de *A. castellanii* nas células da córnea.

Avaliar a o efeito citotóxico do extrato sobre células de epitélio da córnea humana (HCE) e sobre células VERO (células epiteliais de rim de macaco verde Africano).

Comparar o efeito tóxico do extrato sobre ambas as linhagens celulares a fim de estabelecer um modelo celular para a realização de ensaios citotóxicos com base na sensibilidade celular.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Local de desenvolvimento do trabalho**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde e no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **3.2 Amostras de Própolis**

As amostras de própolis foram adquiridas da empresa Natucentro Indústria e Apiários Centro Oeste Ltda. (Mamboi – MG), lote 41/11 em Novembro de 2011. Visualmente, a própolis verde possui coloração esverdeada com aroma forte característico.

#### **3.2.1 Preparo do Extrato Aquoso Bruto de Própolis Verde (EAPV)**

A preparação do extrato foi realizada conforme Moura e seus colaboradores (2011), com modificações. Resumidamente, a própolis verde brasileira foi triturada e 200 g foram adicionadas a 500 mL de água destilada estéril e deixada em repouso no escuro por 24 horas. Decorrido esse tempo a própolis foi aquecida a 70°C em banho-maria com agitação constante por 2 horas. Após, o extrato foi filtrado em papel filtro, congelado a -80°C e liofilizado. Foi obtido 20g de extrato seco que foi solubilizado em PBS (1x) estéril para a obtenção de uma solução mãe na concentração de 100 mg/mL e filtrada em membrana de 0,22 µm (Sartorius).

### **3.3 Cultivo Monoxênico de *Acanthamoeba***

Foi realizado o cultivo das amebas em meio monoxênico para a obtenção de testes confirmatórios. Resumidamente, o meio ágar-não nutriente (Ágar Page) 1,5% foi vertido em placas de Petri estéreis e recoberto com uma suspensão de *Escherichia coli*, mortas pelo calor (56°C-2h) (DE CARLI, 2001) Após a exposição dos trofozoítos e cistos às soluções testes, 10 µL de cada tratamento com as diferentes concentrações do extrato foram inoculados nas placas de Petri. Estas foram seladas com Parafilm®, incubadas a 30°C por 7 dias e monitoradas no microscópio (SCHUSTER, 2002).

### 3.3.1 Cultivo Axênico de *Acanthamoeba*

A cepa *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492) pertencente ao genótipo T4 foi utilizada para todos os experimentos. As amebas foram cultivadas em meio PYG (2% proteose peptona, 0,2% extrato de levedo e 1,8% glicose) e incubadas à temperatura constante de 30°C. Para a realização dos experimentos, 1 mL do cultivo foi centrifugado por 5 min a 211 x *g* (centrífuga Jouan B4i), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com tampão fosfato salino tamponado (PBS) e, em seguida, diluído em meio PYG para obter a concentração final de  $3 \times 10^4$  organismos/mL (SAUTER et al., 2011).

### 3.3.2 Produção dos cistos

Para a produção de cistos, 1 mL do cultivo de amebas foi tomado e lavado duas vezes em PBS centrifugado por 5 min a 211 x *g*. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspendido em 5 mL de meio TRIS (95mM NaCl, 5mM KCl, 8mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM NaHCO<sub>3</sub> e 20mM Tris-HCl, pH 9.0) e mantido a 30°C por 7 dias (KOEHSLER et al., 2008).

### 3.3.3 Avaliação da Atividade Amebicida

Para avaliar a atividade amebicida do extrato aquoso de própolis verde sobre os trofozoítos foi realizada uma diluição seriada e as concentrações finais testadas foram: 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL. Para a realização dos ensaios de atividade amebicida, 100 µL das culturas de *A. castellanii* suspensas em PYG ( $3 \times 10^4$  células/mL) e 100 µL de cada solução teste foram adicionadas em cada poço de uma placa de 96 poços e a placa foi selada com Parafilm®. A placa foi incubada na estufa a 30°C e monitorada ao microscópio invertido durante todo o experimento. Após 24, 48 e 72 horas, os trofozoítos foram contados utilizando uma câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal. A viabilidade foi observada utilizando o corante vital azul de tripano. O controle negativo foi composto por 100 µL de amebas em PYG e 100µL de PBS. Para o controle positivo foi utilizado 100 µL de amebas em PYG e 100 µL de clorexidina a 0,02%. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas com três repetições (VUNDA et al., 2012).

Foi avaliada a atividade amebicida do extrato sobre cistos de *A. castellanii* testando três concentrações finais de 30, 20 e 10 mg/mL. Os tratamentos foram compostos por 100 µL de cistos ( $3 \times 10^4$  células/mL) suspensos em PBS (1x) e 100 µL

de cada solução teste em placa de 96 poços. Para o controle negativo foi utilizado PBS (1x) e para o controle positivo foi utilizado 100 µL de clorexidina a 0,02% sobre 100 µL de cistos suspensos em PBS (1x). A placa foi selada com Parafilm® e incubada na estufa a 30°C durante 24 e 48 horas, sendo monitorada no microscópio invertido. A viabilidade celular foi verificada através do corante vital azul de tripano após decorrido cada tempo e a contagem foi realizada utilizando a câmara de Fuchs-Rosenthal.

### **3.3.4 Análise morfológica**

Foi realizada a análise morfológica de trofozoítos e cistos após a exposição às soluções testes do extrato de própolis. Ao realizar a verificação da viabilidade celular e a contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal a morfologia foi sendo observada utilizando o microscópio ótico. Os aspectos morfológicos dos trofozoítos e cistos foram comparados com o controle negativo a fim de averiguar os possíveis danos causados pelo extrato aquoso de própolis verde em ambas as estruturas.

### **3.4 Cultivo de células HCE e VERO**

As células epiteliais da córnea humana (HCE - *Human Corneal Epithelial*) foram obtidas no Banco de células Riken Bio Resource Center, Japão. As células HCE foram cultivadas em meio DMEM/F12 (GIBCO) (suplementado com de soro fetal bovino (15%), insulina (5 µg/mL), fator de crescimento epidérmico humano (10 ng/mL) e DMSO (0,5%)), enquanto as células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano, ATCC CCL-81) foram cultivadas em meio Eagle's – meio essencial mínimo (E-MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (E-MEM/FBS (GIBCO), mas ambas suplementadas com antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL). Nestas condições as células HCE e VERO exibiram suas características específicas. Para a realização dos experimentos as linhagens celulares foram mantidas em garrafas de cultivo e incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, até a realização dos ensaios (ARAKI-SASAKI et al., 1995; MOSMANN, 1983).

#### **3.4.1 Ensaio de Citotoxicidade Celular**

Utilizou-se o ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) para a determinação da viabilidade celular. Este ensaio

colorimétrico se baseia na conversão do sal de tetrazólio (MTT) amarelo (solúvel em água) em cristais de formazan púrpura (insolúveis em água) na mitocôndria das células viáveis (MOSMANN, 1983). Resumidamente, foram adicionados 200µL de uma suspensão de células HCE ( $4 \times 10^5$ /mL) e células VERO ( $4 \times 10^5$ /mL) em placa de 96 poços e incubada a 37°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Quando observado a formação de uma monocamada de 100%, o meio foi trocado e as células HCE foram tratadas com as soluções do extrato aquoso bruto de própolis verde nas concentrações 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL e as células VERO com as concentrações 10, 5, e 2,5 mg/mL, dissolvidos em PBS. A placa foi incubada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e após 24 h, 40 µL de uma solução a 5 mg/mL de MTT (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por mais 3 horas. Os sobrenadantes foram removidos, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para interromper a reação e solubilizar os cristais de formazan, e a placa foi incubada novamente por 10 minutos. A densidade óptica foi medida em leitor de ELISA (Benchmark BioRad) a 570 nm, com filtro de 620 nm como referência. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os ensaios foram realizados em triplicatas e repetidos três vezes, e os resultados foram expressos como o percentual de células viáveis em relação ao controle negativo (células não tratadas).

### 3.4.2 Ensaio de Adesão

Para os ensaios de adesão, as células HCE foram cultivadas em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$ /500 µL/poço) por 24 horas para a formação de monocamada. Após 24 horas, *Acanthamoeba castellanii* ( $6 \times 10^4$ /500 µL/poço) foram tratadas com as concentrações 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL do extrato de própolis (dissolvido em PBS) e incubadas a 30°C por 45 min. Para o controle negativo, 500 µL de suspensão de amebas em PBS (1:10 v/v), foram adicionadas à monocamada de células HCE. Após a incubação com o extrato, as amebas juntamente com os extratos e o controle foram transferidas para as monocamadas de HCE e incubadas a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> durante 1 hora. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi removido para a contagem do número de amebas não aderidas, utilizando a câmara de Fuchs-Rosenthal. A porcentagem de células aderidas foi calculada da seguinte maneira: Total de amebas suspensas no sobrenadante dos tratamentos / número total de amebas adicionadas x 100 = % de amebas suspensas em relação ao

controle negativo. A porcentagem das células aderidas foi calculada como segue:  $100 - \% \text{ de amebas suspensas}$ . (modificado a partir de SHOAI B et al., 2013).

### **3.5 Análise estatística**

Para detectar diferenças entre os tratamentos aplicou-se a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey. O programa utilizado foi o BioEstat 5.0. O nível de significância adotado para os testes foi definido como  $p < 0, 5$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade amebicida do Extrato Aquoso Bruto de Própolis Verde (EAPV) sobre trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*.

Conforme os resultados obtidos as doses 20 e 10 mg/mL inativaram 100% dos trofozoítos em 24 horas (Figura 3). Nas concentrações 5, 2,5 e 1,25 mg/mL o extrato inviabilizou 89,6, 58 e 34,7% dos trofozoítos respectivamente. Estes resultados diferiram significativamente do controle que recebeu apenas PBS ( $p < 0,05$ ). Porém, as doses menores 0,625 e 0,312 mg/mL inviabilizaram apenas 8,8 e 7,9%, respectivamente, não sendo estatisticamente significativas quando comparadas com o controle negativo. Resultados semelhantes foram obtidos por Topalkara e colaboradores (2007), que avaliaram a atividade de um extrato etanólico de uma amostra de própolis da Turquia, contra trofozoítos de *A. castellanii*, a qual apresentou ótima atividade amebicida na dose 8 mg/mL. Isso mostra que concentrações mais altas são necessárias para a inativação desses microrganismos.

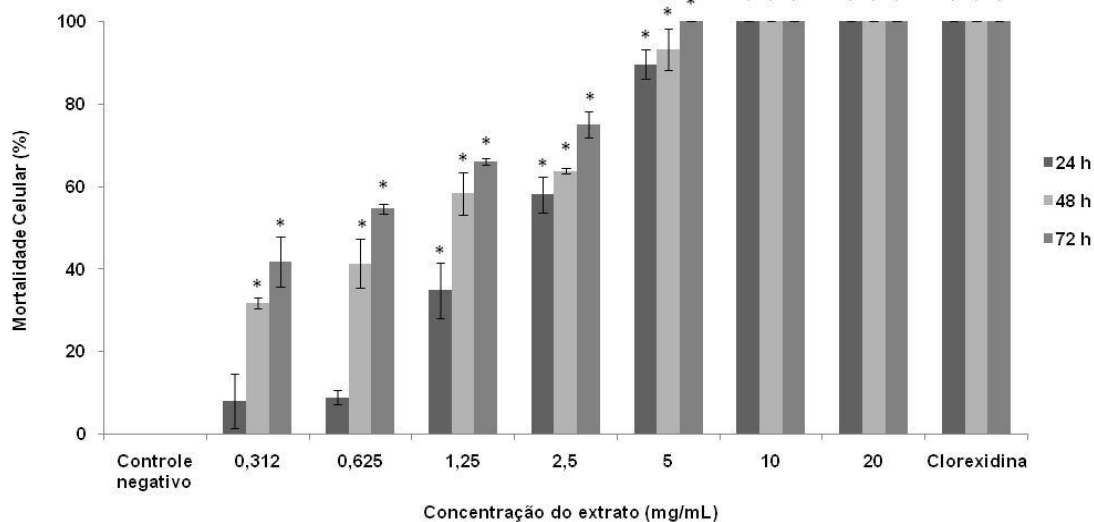


Figura 3: Atividade amebicida do extrato aquoso bruto de própolis verde frente aos trofozoítos de *A. castellanii* (ATCC 50492). As colunas representam as médias da atividade de diferentes concentrações (0,312 a 20 mg/mL) em diferentes tempos (24, 48 e 72 h). Os resultados expressam a mortalidade relativa ao controle negativo de três experimentos independentes realizados em triplicata ( $n=3$ ). \* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

De acordo com a Figura 3, o extrato apresentou atividade amebicida em todas as concentrações nos períodos de tempo do experimento. Nos ensaios de 48



horas as concentrações 20 e 10 mg/mL, comportaram-se iguais às do ensaio de 24 horas, inativando 100% dos trofozoítos. As doses 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL do extrato foram capazes de inativar 93,3, 63,7, 58,3, 41,3 e 31,8% dos trofozoítos, respectivamente, comparados com o controle. Todas as concentrações testadas mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs controle negativo. Ao analisar os resultados dos ensaios de 72 horas pôde-se verificar um efeito contínuo da ação do extrato, principalmente na concentração 5 mg/mL que inativou 100% dos trofozoítos (Figura 3). Neste tempo as concentrações 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL o extrato foi capaz de inativar 75, 66, 54,5 e 41,7% dos trofozoítos, respectivamente, deferindo significativamente do controle negativo ( $p < 0,05$ ). Não foi observada a formação de cisto durante todo o experimento. Entre os tratamentos 24 e 48 horas as concentrações 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL obtiveram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), sendo mais eficazes em 48 horas. Entretanto, a dose 5 mg/mL manteve a mesma atividade até o final das 72 horas. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os ensaios de 48 e 72 horas.

Pôde-se observar que a atividade amebicida do extrato foi dose dependente, ou seja, a inativação dos trofozoítos foi diretamente proporcional ao aumento da dose. A formação de cisto não foi encontrada no decorrer dos tratamentos, porém o extrato induzia o arredondamento e a alteração da morfologia celular. Estudos *in vitro* em tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* mostraram que extrato etanólico (70%) de própolis verde age no complexo de golgi e nas mitocôndrias das formas epimastigotas e na membrana plasmática das formas tripomastigotas do protozoário, causando a perda da sua integridade e interferindo na viabilidade do parasito (SALOMÃO et al., 2011).

Os resultados de mortalidade foram comparados com os do controle positivo utilizando uma solução de clorexidina com a concentração final de 0,02%. Pode-se verificar que as doses letais do extrato de própolis (20 e 10 mg/mL) são superiores à dose utilizada no controle positivo e no tratamento da ceratite amebiana. Com isso, a necessidade de altas doses do extrato aquoso de própolis poderia dificultar a sua utilização no tratamento de pacientes com ceratite. O mecanismo de ação da clorexidina é bem conhecido, ela penetra no cisto por meio do ostíolo e liga-se à bicamada lipídica do trofozoíto internalizado. Resultando no dano da membrana celular, na perda de cálcio e eletrólitos do citoplasma, causando lise celular e morte (SEAL et al., 2003). No entanto, se o produto químico em

pesquisa agir sobre a membrana citoplasmática da ameba, não deve causar efeitos nocivos sobre as células do epitélio ocular. Com isso, a avaliação dos mecanismos de ação do extrato bruto ou o isolamento de algum composto químico ativo poderia potencializar a atividade amebicida e otimizar a sua utilização como tratamento alternativo nos casos de ceratite por *Acanthamoeba*. Entretanto, é sabido que muitos compostos ativos de plantas atuam de maneira sinérgica e o uso de um único composto poderia apresentar uma atividade biológica reduzida (MULYANINGIH et al., 2010).

Embora o número de infecções causadas por amebas seja baixo em comparação com outras parasitoses causadas por protozoários (tripanossomíase, toxoplasmose, malária, entre outras). A dificuldade de diagnosticá-los e o desafio de encontrar tratamentos antimicrobianos eficazes, em particular, as encefalites têm sido motivo de preocupação para profissionais da área clínica, laboratorial e parasitologistas (SCHUSTER e VIVESVARA, 2004).

O extrato aquoso de própolis bruto, em estudo, mostrou atividade amebicida em 24 horas a partir da concentração 1,25 mg/mL e em todas as concentrações em 48 e 72 horas. Tal atividade pode estar associada a algumas interações de compostos fitoquímicos com a parede celular de *Acanthamoeba* ou à penetração do composto nos canais de membrana do parasito (MALATYALI et al., 2012).

Silva Filho e colegas (2009), avaliaram a atividade antiparasitária de extratos etanólico e hidroalcoólico bruto de própolis verde brasileira e alguns dos seus compostos isoladamente sobre *Leishmania donovani* e *Plasmodium falciparum*. Ambos os extratos mostraram eficácia na inativação destes protozoários. O extrato etanólico bruto de própolis verde apresentou  $CI_{50}$  de 45  $\mu\text{g/mL}$  enquanto o extrato hidroalcoólico apresentou  $CI_{50}$  de 49  $\mu\text{g/mL}$ . Entre alguns compostos testados isoladamente o ácido ursólico apresentou  $CI_{50}$  de 3,7  $\mu\text{g/mL}$  em *L. donovani* e 1  $\mu\text{g/mL}$  para *P. falciparum*. Devido ao fato de que à atividade antiparasitária dos compostos avaliados isoladamente apresentaram uma  $CI_{50}$  inferior aos extratos brutos, acredita-se que exista um importante sinergismo, na própolis, responsável por muitas atividades biológicas.

Trabalhos realizados por Wojtyczka e colaboradores (2013), avaliaram a capacidade do extrato etanólico de própolis, provindo do sudeste da Polônia, em inibir a formação de biofilmes de 10 isolados *S. epidermidis*. A inibição foi verificada

nas doses 0,2 mg/mL após 12 horas de incubação e 0,39 mg/mL após 24 horas. Com isso, os autores observaram que a atividade do extrato diminui com o passar do tempo. Uma vez que em 24 horas foi necessária uma concentração mais alta para inativar essas bactérias.

#### 4.2 Análise morfológica dos trofozoítos de *A. castellanii* após o tratamento com as soluções testes do EAPV.

O extrato testado provocou alteração na morfologia celular, o seu arredondamento, bem como o rompimento da membrana plasmática, como observado nas concentrações 5, 10 e 20 mg/mL. Alguns trofozoítos mostravam-se sem material citoplasmático, devido provavelmente, à perda da integridade da membrana celular, impossibilitando a coloração com o corante azul de tripano nas concentrações 10 e 20 mg/mL (Figura 4). Nas menores concentrações, eram vistos alguns trofozoítos com a morfologia celular alterada e outros viáveis sem nenhuma alteração morfológica, o que favoreceu a contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal. Foi observado que, à medida que se diminuía a concentração do extrato, mais trofozoítos inalterados eram encontrados. Entretanto, foi necessária a realização de ensaios confirmatórios através do cultivo monoxênico em placas de ágar não nutriente (ANN) a 1,5%. Após sete dias de incubação pôde-se observar o crescimento dos trofozoítos que foram tratados com as concentrações 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL (Figura 5). Nas concentrações 20 e 10 mg/mL não foi verificado crescimento.

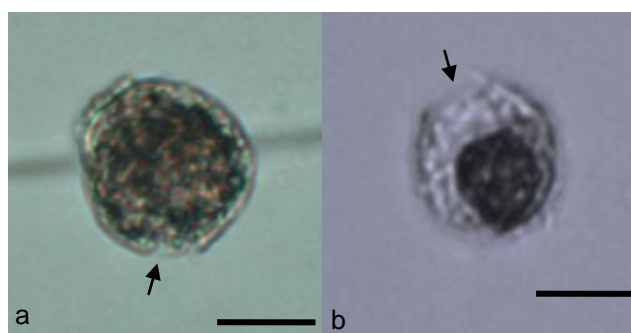


Figura 4: Trofozoíto de *A. castellanii* após 24 horas de exposição às concentrações do extrato de própolis. a. 10 mg/mL. b. 20 mg/mL. As setas mostram o rompimento da membrana plasmática do trofozoíto. Barra = 10  $\mu$ m.

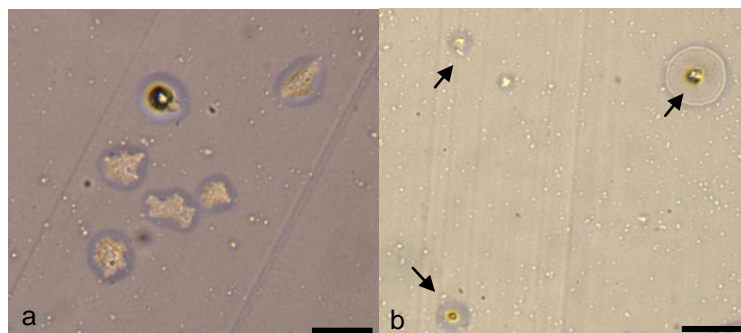


Figura 5: Trofozoítos de *A. castellanii* cultivados em meio ágar Page por 7 dias após tratamento com o extrato de própolis. a. Crescimento dos trofozoítos e posterior formação de cistos que foram expostos às concentrações 5, 2,5, 1,25, 0,625 0,312 mg/mL. b. Trofozoíto e cistos que não se desenvolveram em meio ágar Page após tratamento com as concentrações 20 e 10 mg/mL. Barra = 10 µm.

Na Figura 6 verifica-se que a morfologia do trofozoíto após a exposição à dose 5 mg/mL durante 72 horas apresentou características semelhantes às dos trofozoítos que foram expostos por 24 horas à concentração de 10 mg/mL. Embora esse fato possa confirmar a inativação das células, foram realizados testes em placas de ANN 1,5%, como descrito anteriormente.

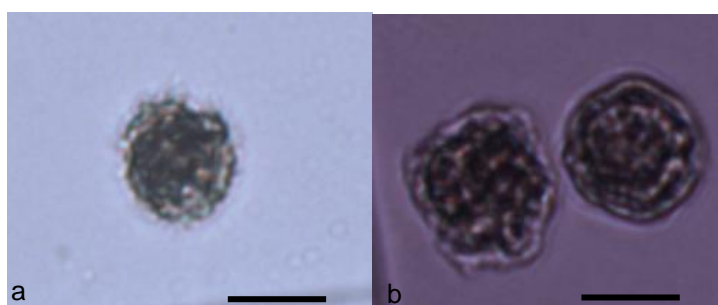


Figura 6: Trofozoíto de *A. castellanii* após 24 horas e 72 horas de exposição às concentrações do extrato de própolis. a. 10 mg/mL. b. 5 mg/mL. Barra = 10 µm.

#### 4.3 Atividade amebicida do Extrato Aquoso Bruto de Própolis Verde sobre cistos de *Acanthamoeba castellanii*.

Devido à dificuldade do tratamento das patologias causadas por espécies de *Acanthamoeba*, por conta da resistência do cisto e a ubiquidade desses microrganismos, diversos extratos naturais têm sido testados a fim de estabelecer um tratamento eficaz e alternativo contra esse protozoário. De acordo com a Figura 7, o extrato apresentou efeito cisticida apenas na concentração de 40 mg/mL, inativando 100% dos cistos após 24 horas de exposição. Nos ensaios de 24h apenas a dose 10 mg/mL não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), inviabilizando 11,3% dos cistos enquanto a dose 20

mg/mL foi um pouco mais eficaz inativando 33%. Entretanto após 48 horas de exposição dos cistos ao extrato a atividade amebicida foi significativa em todas as concentrações ( $p < 0,05$ ).

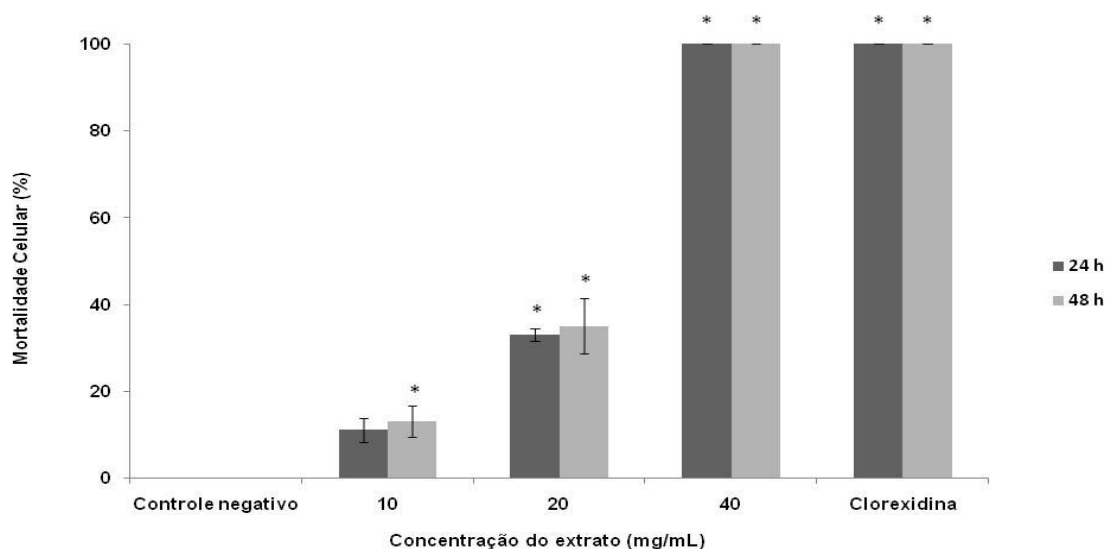


Figura 7: Atividade amebicida do EAPV frente cistos de *A. castellanii* (ATCC 50492). As colunas representam as médias da atividade de cada concentração do extrato testada, em relação ao controle negativo. \* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Contudo, a dose 40 mg/mL foi a única que mostrou efeito letal sobre os cistos durante todos os tempos testados. Extrato etanólico de própolis proveniente da Turquia foi testado sobre cistos de *Acanthamoeba castellanii* e a concentração 15,62 mg/mL mostrou efeito cisticida após 48 horas de incubação (TOPALKARA et al., 2007). Este resultado corrobora com o obtido nesse trabalho, que mostra que doses mais elevadas são necessárias para inativar os cistos de *A. castellanii*. Isso devido à presença de uma dupla camada no cisto composta de proteínas e celulose, que lhe confere resistência à maioria dos antimicrobianos.

Embora a concentração letal tenha sido alta (40mg/mL), diversos extratos naturais testados sobre cistos de *Acanthamoeba* spp. mostram atividade próxima a essa concentração. Porém, esta dose provavelmente inviabilizaria o uso tópico do extrato, uma vez que acarretaria em danos consideráveis no epitélio córneo.

#### 4.4 Análise morfológica dos cistos de *A. castellanii* após o tratamento com as soluções testes do EAPV.

Conforme mostra a Figura 8, o extrato provocou diversas alterações na

morfologia dos cistos em todas as concentrações testadas. Na concentração 10 mg/mL alguns apresentaram-se viáveis e com vacúolos, sugerindo que os cistos podem estar iniciando o processo de desencistamento (Figura 8a). Outros mostraram-se com a coloração diferenciada, igual à encontrada nos trofozoítos (Figura 8b). Essas características foram visualizadas em ambos os tempos avaliados 24 e 48 horas. Acredita-se que o extrato penetre no cisto amebiano por meio do ostíolo presente em sua superfície inativando e alterando algumas estruturas intracelulares.

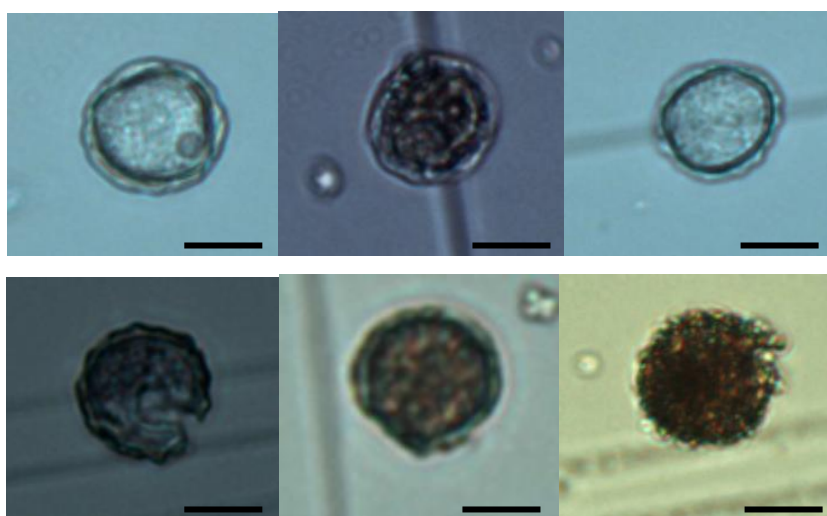


Figura 8: Cistos de *A. castellanii* após 24 e 48 horas de exposição às concentrações do EAPV. a. cisto viável após exposição à dose 10 mg/mL (24 h). b. cisto inviável após exposição à dose 10 mg/mL (48 h). c. cisto viável após exposição à dose 20 mg/mL (24 h). d. cisto inviável após a exposição à dose 20 mg/mL (48 h). e.f. cistos inviáveis após exposição à dose 40 mg/mL (24 h e 48 h), respectivamente. Barra = 10  $\mu$ m.

Embora a concentração 20 mg/mL tenha apresentado atividade amebicida mais eficaz contra os cistos do que a de 10 mg/mL, também foram encontrados cistos viáveis e inviáveis nesses tratamentos (Figura 8c e 8d). Contudo na concentração de 40 mg/mL não foram encontrado cistos viáveis, apenas cistos com a morfologia e coloração diferenciada (Figura 8e e 8f). Devido a essas alterações morfológicas e à penetração do extrato nos cistos, supõe-se que isso tenha impossibilitado a internalização do corante vital azul de tripan, dificultando a confirmação dos cistos inviáveis. Devido a isso foram realizados testes confirmatórios através de cultivos monoxênicos (incubação a 30°C por 7 dias). Decorrido esse tempo as placas foram observadas utilizando o microscópio invertido e foram encontrados trofozoítos vivos nas placas das concentrações 10 e 20 mg/ml,

devido ao desencistamento, confirmando a viabilidade dos cistos nessas doses. Entretanto na concentração de 40 mg/mL os cistos não desencistaram e conseqüentemente, nenhum trofozoíto foi encontrado, comprovando a inviabilidade dos cistos nessa dose. Foram realizados ensaios prévios com as concentrações 2,5 e 5 mg/mL, mas devido ao desencistamento logo após 24 horas de incubação, essas doses não foram selecionadas para os experimentos com os cistos, apenas com os trofozoítos.

#### 4.5 Ensaio de Adesão

Visto que o processo de adesão de diversos microrganismos às superfícies celulares representa um passo inicial para estabelecer uma infecção, a capacidade do EAPV em inibir a adesão de *Acanthamoeba* em células HCE (*Human Corneal Epithelial*) foi avaliada neste estudo. De acordo com a figura 10, os resultados mostraram que 95,93% das amebas do controle aderiram-se às células HCE, comparando com os tratamentos após 1 hora de incubação a 37°C ( $p < 0,05$ ). Mostrando assim, que os extratos inibiram significativamente a adesão de *Acanthamoeba* às células. Pôde-se observar que a inibição desta ligação foi dependente da concentração do extrato, em que nas doses mais altas 20, 10 e 5 mg/mL apenas, 7,25, 20,15 e 31,15% das amebas, respectivamente, se mantiveram aderidas às células. Entretanto, nas concentrações 2,5, 1,25 e 0,625 as amebas apresentaram adesão de 74,84, 84,84 e 89,84%, respectivamente, nas células HCE. Mostrando menor atividade das pequenas doses sobre as amebas e conseqüentemente não impedindo a adesão destas sobre as células HCE.

Estudos avaliando a capacidade de adesão de células bacterianas em células bucais mostraram que quando as bactérias foram expostas a um extrato hidro-alcoólico de própolis, a adesão de *Haemophilus influenzae* diminuiu significativamente (DRAGO et al., 2007). O mecanismo de ação pelo qual a própolis afeta a aderência de bactérias e protozoários às superfícies celulares, não são bem conhecidos (SCAZZOCCHIO et al., 2006). Acredita-se que a própolis possa agir na membrana citoplasmática e interferir na emissão dos pseudópodes deste protozoário, os quais são utilizados para locomoção e aderência.

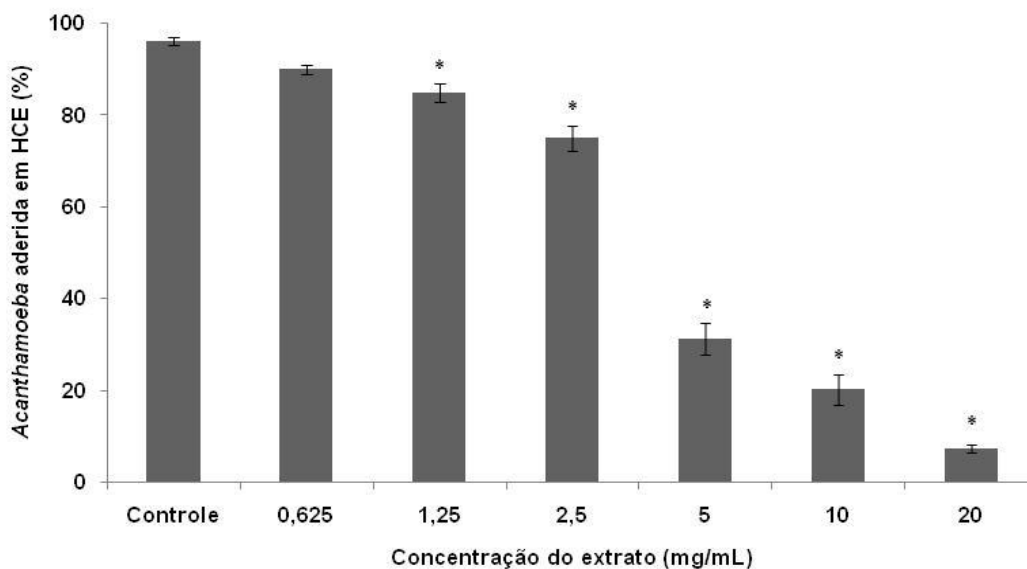


Figura 9: Avaliação da atividade inibitória do EAPV na adesão de *A. castellanii* às células HCE, apresentada como porcentagem de células aderidas. As colunas representam a média dos trofozoítos aderidos em relação ao controle – \* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Alsam e colaboradores (2003), realizaram ensaios de adesão com diferentes isolados de *Acanthamoeba* na presença e ausência de diversos açúcares  $\alpha$ -manose, xilose, frutose e galactose. Como resultado os tratamentos contendo os açúcares, especialmente com a  $\alpha$ -manose, mostraram menor aderência dos isolados às células endoteliais microvasculares. Mostraram também diferenças na adesão entre os isolados, sugerindo diferenças conformacionais das proteínas de ligação à manose. Contudo, outra possibilidade de mecanismo de ação do extrato pode estar associada à inibição ou competição com os receptores de membrana de *Acanthamoeba*, tal como de uma proteína ligante à manose (MBP), impossibilitado a sua aderência às células da córnea na presença do extrato. Neste trabalho foi mostrada a capacidade do EAPV em inibir a aderência de uma cepa de *A. castellanii*, de origem clínica pertencente ao genótipo T4 que possui relevância por ser o genótipo mais relacionado às patologias que afetam principalmente as células do Sistema Nervoso Central e células do epitélio da córnea. Isto ressalta a importância de estudos mais aprofundados sobre substâncias que promovam maiores perspectivas na elaboração de fármacos naturais.

#### 4.6 Ensaio citotóxico sobre as células HCE

A elaboração de um produto, como um antimicrobiano, para utilização *in*



*in vivo* envolve a avaliação de vários fatores e entre eles está o seu potencial citotóxico em culturas celulares. Soluções multiuso são elaboradas para a desinfecção de lentes de contato, com o objetivo de impedir a proliferação de microrganismos e assim evitar uma possível infecção ocular. Estudos realizados recentemente mostraram que algumas formulações dessas soluções agredem as células da córnea *in vivo*, causando manchas, necrose e apoptose celular, indicando citotoxicidade (CHUANG et al., 2008; GORBET et al., 2011; CHOY et al., 2009). A composição dessas soluções envolve um conjunto de agentes antimicrobianos como o timerosal, clorexidina e cloreto de benzalcônio e ainda polihexametileno biguanida (PHMB) que atua como conservante (CHOY et al., 2012).

Células da córnea foram expostas a soluções multiuso contendo clorexidina e estas mostraram efeito tóxico, inviabilizando 50% das células após 10 minutos de incubação. Foram observados através de citometria de fluxo, danos na membrana e necrose celular precoce e tardia,. Sugerindo que essa toxicidade elevada seja devido à presença da clorexidina nas soluções (CHOY et al., 2013). Entretanto o tratamento da ceratite por *Acanthamoeba* contempla a presença desse antimicrobiano, mesmo sendo tóxico para o epitélio da córnea. Com isso, a avaliação da atividade citotóxica para a elaboração de novos fármacos alternativos no tratamento de infecções por *Acanthamoeba* faz-se necessária.

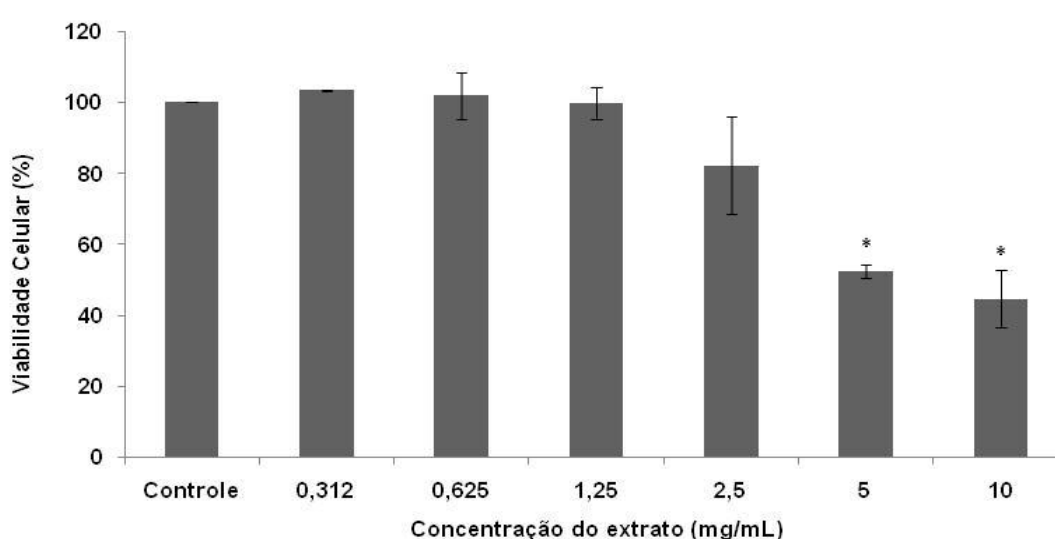


Figura 10: Ensaio de viabilidade celular (MTT). Avaliação do EAPV sobre células HCE, apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle – \* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Dessa forma, com o objetivo de avaliar a toxicidade do extrato em estudo e a fim de analisar a sua possível utilização na medicina alternativa, foi realizado o ensaio citotóxico sobre células HCE. Conforme mostra a Figura 10 o extrato de própolis apresentou efeito tóxico nas concentrações 5 e 10 mg/mL que matou 47,6 e 55,4% das células, respectivamente. Entretanto, as doses menores 0.312, 0.625 e 1.25 mg/mL não diferiram do controle o que não resultou em efeito tóxico sobre às células. A dose 2.5 mg/mL manteve viável 82,28% e embora tenha causado algum dano celular, este não diferiu significativamente do controle ( $p < 0,05$ ).

Topalkara et al (2007), avaliaram o efeito tóxico do extrato etanólico de própolis coletada da Turquia sobre o epitélio córneo de camundongos. Concentrações acima de 7,81mg/mL causaram danos às células e atividade amebicida da própolis foi equivalente à da clorexidina. No entanto, Martin e colaboradores (2013) avaliaram a atividade de extrato aquoso de uma amostra de própolis brasileira sobre células da córnea, previamente ferida, e o mesmo não apresentou efeito tóxico na concentração de 10 mg/mL. Os autores verificaram ainda o seu efeito de cicatrização sobre feridas e concluíram que o extrato acelerou o processo de cicatrização e reduziu a resposta inflamatória. Os efeitos apresentados pelo extrato são semelhantes aos resultados de outros autores, confirmando que a própolis verde brasileira apresenta a capacidade de reduzir a necrose e apoptose de células ganglionares da retina (KESHAVARZ et al., 2009). Conforme Natarajan e colaboradores (1996), extratos de própolis são ricos em terpenóides, derivados de ácido cumárico, cafeoilquínicos e cinâmico, que proporcionam tais atividades. Acredita-se que à presença desses diversos compostos químicos nos extratos de própolis verde agem de maneira sinérgica beneficiando o crescimento das células quando presentes em menor quantidade. Outros autores complementam que extratos aquosos de própolis possuem propriedades antioxidantes e ações inibitórias sobre certas enzimas, superiores às encontradas no extrato etanólico (MATSUI et al., 2004). Tais resultados contribuem com diversas pesquisas que atribuem às possíveis diferenças encontradas à utilização de métodos de extração, solventes e amostras de própolis distintas.

Embora o extrato em estudo nesse trabalho tenha demonstrado efeito tóxico nas doses de 5 e 10 mg/mL, as concentrações menores mostraram-se promissoras para a elaboração de um fármaco alternativo.

Desta forma, a avaliação do efeito tóxico do EAPV sobre as células HCE

revela que sua utilização sobre o epitélio córneo seria viável apenas nas concentrações 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL. Embora a dose 2,5 mg/mL não tenha mostrado diferença significativa quando comparada ao controle, mais estudos são necessários para averiguar a sua possível utilização tópica sobre as células da córnea.

#### **4.7 Ensaio citotóxico sobre as células VERO**

A utilização de culturas celulares para a avaliação de compostos naturais exerce papel fundamental na seleção produtos menos nocivos aos humanos. Linhagens de células VERO (rim de macaco verde Africano) têm sido utilizadas como modelo de culturas celulares na avaliação do efeito citotóxico de diversos extratos naturais e foram escolhidas para esse experimento. Com isso, a citotoxicidade do extrato aquoso de própolis verde foi avaliada através do ensaio MTT (MOSMANN, 1983), que possibilitou verificar se o extrato provoca dano às células de mamíferos. Foram escolhidas três concentrações do extrato para serem testadas, a concentração 10 mg/mL que foi capaz de inativar 100% dos trofozoítos em 24 horas e duas concentrações menores (5 e 2,5 mg/mL). De acordo com a Figura 11 pôde-se verificar que o EAPV diminui a viabilidade celular em 42,4% na concentração 10 mg/mL, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ). As doses de 5 e 2,5 mg/mL não causaram danos às células. A concentração de 2,5 mg/mL, além de não causar danos às células de mamíferos, beneficiou o seu desenvolvimento

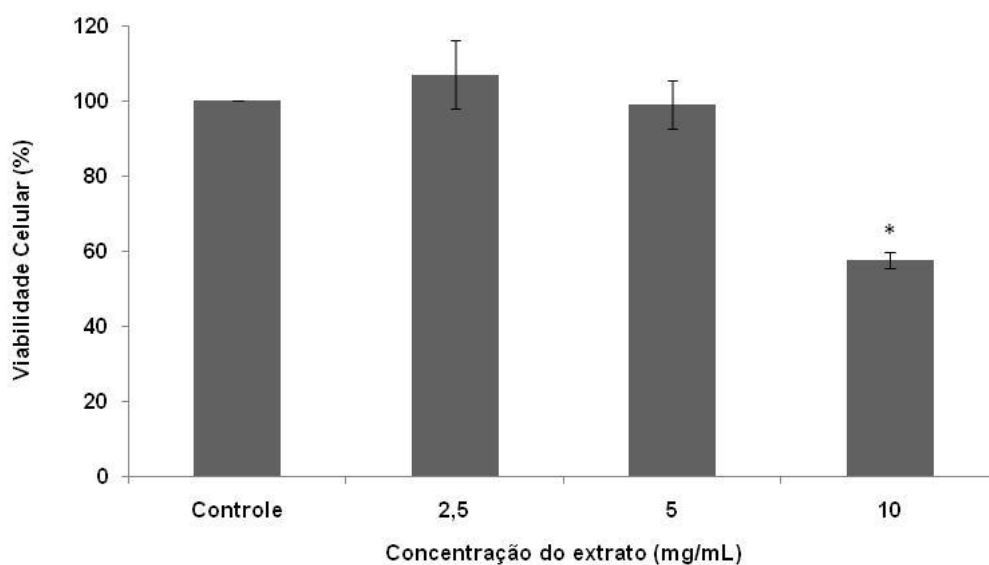


Figura 11: Ensaio de viabilidade celular (MTT). Avaliação do EAPV sobre células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano), apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle – \* diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

O ensaio citotóxico do extrato também foi realizado sobre células do epitélio da córnea como visto no item anterior e mostrou resultados semelhantes aos obtidos com as células VERO. Em concentração menores o extrato beneficiou ambas linhagens celulares. Entretanto, nas células VERO o efeito tóxico foi observado em concentrações mais altas do que com as células HCE. Dessa forma, supõe-se que as células VERO são menos sensíveis aos efeitos tóxicos do extrato.

## 5 CONCLUSÕES

O extrato aquoso de própolis verde apresentou atividade amebicida contra os trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba castellanii*, inviabilizando-os e provocando alterações morfológicas nessas estruturas. A menor dose capaz de causar 100% da mortalidade dos trofozoítos foi a 10 mg/mL e nos cistos a 40 mg/mL em todos os tempos avaliados. Entretanto, a concentração de 5 mg/mL foi capaz de inviabilizar 100% dos trofozoítos após 72 horas de exposição ao extrato. Essa atividade pode estar associada ao sinergismo de diversos compostos químicos presentes na própolis.

Por meio dos ensaios de adesão verificou-se que o EAPV foi capaz de diminuir a ligação de *Acanthamoeba* às células da córnea humana (HCE) onde as concentrações mais eficazes foram as de 20, 10 e 5 mg/mL.

Através da realização de ensaios de citotoxicidade sobre células HCE e linhagens de células VERO, pôde-se observar que o extrato não mostrou efeito tóxico significativo sobre essas células HCE nas concentrações 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL e nas células VERO nas concentrações 5 e 2,5 mg/mL. Efeitos distintos visualizados sobre ambas células revelaram que as células VERO apresentaram menor sensibilidade ao extrato, sendo portanto, menos apropriadas para a avaliação da atividade citotóxica de extratos de utilização tópica ocular.

Embora o extrato aquoso de própolis verde mostra-se promissor para ser utilizado na medicina alternativa nas concentrações 2,5, 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL, estas não inativaram 100% dos trofozoítos de *A. castellanii*. Contudo mais estudos devem ser realizados a fim de identificar os compostos ativos deste extrato, bem como revelar os alvos moleculares dessas substâncias em *Acanthamoeba* a fim de tentar aumentar a atividade do extrato sobre esses microrganismos. Este foi o primeiro estudo relatando efeitos antiparasitário de extrato aquoso de própolis verde contra o gênero *Acanthamoeba*.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALSAM, Selwa et al. *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, n. 6, p. 235-241, 2003.
- ARAKI-SASAKI, Kaoru et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 36, n. 3, p. 614-621, 1995.
- BANKOVA, Vassaya. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences**, v. 50, n. 3, p. 167-172, 1995.
- BANKOVA, Vassaya. et al. Seasonal variations in essential oil from Brazilian propolis. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 6, p. 693-696, 1998.
- BANKOVA, Vassya S. et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-16, 2000.
- BANSKOTA, Arjun H.; TEZUKA, Yasuhiro; KADOTA, Shigetoshi. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.
- BARBOSA, Maria Helena et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318-22, 2009.
- BEATTIE, Tara K. et al. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: A new risk factor for infection?. **Ophthalmology**, v. 110, n. 4, p. 765-771, 2003.
- BOGDANOV, Stefan. Propolis: Composition, health, medicine: A review. **Bee Product Science**, [www. bee-hexagon. net](http://www.bee-hexagon.net), v. 4, 2011.
- BOOTON, Gregory C. et al. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1689-1693, 2005.
- BOSIO, K. et al. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 174-177, 2000.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.
- CARLESSO, Ana Maris et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Current Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 185-190, 2010.
- CAUMO, Karin; ROTT, Marilise B. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 117, n. 3, p. 233-235, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Acanthamoeba* keratitis multiple states, 2005-2007. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 56, n. 21, p. 532, 2007.

CERVANTES, F. L. Tratamiento médico de la amibiasis. **Archivos de Investigación Médica (Méx.)**, v. 3, p. 415-426, 1972.

CHOY, Camus Kar Man et al. Do multipurpose solutions damage porcine corneal epithelial cells?. **Optometry & Vision Science**, v. 86, n. 5, p. E447-E453, 2009.

CHOY, Camus Kar Man; CHO, Pauline; BOOST, Maureen V. Cytotoxicity of rigid gas-permeable lens care solutions. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 96, n. 5, p. 467-471, 2013.

CHOY, Camus K. M.; CHO, Pauline; BOOST, Maureen V. Cytotoxicity and effects on metabolism of contact lens care solutions on human corneal epithelium cells. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 95, n. 2, p. 198-206, 2012.

CHUANG, Eliseu Y. et al. Effects of contact lens multipurpose solutions on human corneal epithelial survival and barrier function. **Eye & Contact Lens**, v. 34, n. 5, p. 281-286, 2008.

CORSARO, Daniele; VENDITTI, Danielle. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 233-238, 2010.

DE CARLI, Geraldo Attilio. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. Atheneu, São Paulo, Ed. Ilus, p. 810, 2001.

DIAZ, J. H. The public health threat from *Balamuthia mandrillaris* in the southern United States. **The Journal of the Louisiana State Medical Society: official organ of the Louisiana State Medical Society**, v. 163, n. 4, p. 197-204, 2010.

DRAGO, L. et al. In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1914-1921, 2007.

EPSTEIN, Randy J. et al. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba keratitis* from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. **Archives of Ophthalmology**, v. 104, n. 9, p. 1318-1321, 1986.

FALCÃO, Soraia I. et al. In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal, Antibacterial and Antifungal Activity. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 3, p. 437-443, 2014.

FUNARI, Cristiano S.; FERRO, Vicente O. ANÁLISE DE PRÓPOLIS<sup>1</sup>. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

- GAUTOM, R. K.; FRITSCH, T.R.; LINDQUIST, T. D. *Acanthamoeba keratitis*. In: Tasman W, Jaeger EA (eds) **Duane's ophthalmology: CD-ROM edition**, vol 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, ch 80, 1998.
- GORBET, M. B. et al. Effect of contact lens material on cytotoxicity potential of multipurpose solutions using human corneal epithelial cells. **Molecular Vision**, v. 17, p. 3458, 2011.
- GREUB, Gilbert; RAOULT, Didier. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 413-433, 2004.
- HARGRAVE, Sylvia. L.; MCCULLEY, James. P.; HUSSEINI, Ziad. Results of a trial of combined propamidine isethionate and neomycin therapy for *Acanthamoeba keratitis*. **Ophthalmology**, v. 106, n. 5, p. 952-957, 1999.
- HATA, Taketoshi et al. Artepillin C, a major ingredient of Brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 channels. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e48072, 2012.
- HULEIHEL, Mahmoud; ISANU, Vladimir. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **The Israel Medical Association Journal: IMAJ**, v. 4, n. 11 Suppl, p. 923-927, 2002.
- HUSTON, Christopher. D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 23-26, 2004.
- JOSLIN, Charlotte. E. et al. The Association of Contact Lens Solution Use and *Acanthamoeba Keratitis*. **American Journal of Ophthalmology**, v. 144, n. 2, p. 169-180, 2007.
- KESHAVARZ, Maryam et al. Inhibition of corneal neovascularization with propolis extract. **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 1, p. 59-61, 2009.
- KHAN, Naveed. A.; JARROLL, Edward. L.; PAGET, Timothy. A. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 204-208, 2001.
- KHAN, Naveed. A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 34, n. 6, p. 277-285, 2003.
- KHAN, Naveed. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 564-595, 2006.
- KHAN, Naveed. A. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 1051-1057, 2008.
- KHUNKITTI, W. et al. Aspects of the mechanisms of action of biguanides on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 107-114, 1997.
- KILVINGTON, S. et al. Laboratory investigation of *Acanthamoeba keratitis*. **Journal**



of **Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2722-2725, 1990.

KINDE, Hailu et al. Infections caused by pathogenic free-living amebas (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 3, p. 317-322, 2007.

KITAGAWA, Kazuko. et al. A novel combination treatment of chlorhexidine gluconate, natamycin (pimaricin) and debridement for a *Acanthamoeba* keratitis. **Japanese Journal of Ophthalmology**, v. 47, n. 6, p. 616-617, 2003.

KLIESCIKOVA, Jarmila.; KULDA, Jaroslav.; NOHYNKOVA, Eva. Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in *Acanthamoebae*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 326-328, 2011.

KÖHSLER, Martina et al. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1069-1072, 2008.

KONISHI, SUSSUMU et al. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem Doce**, v. 75, p. 22-25, 2004.

KOSALEC, Ivan et al. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. **Acta pharmaceutica**, v. 55, n. 4, p. 423-430, 2005.

KOSRIRUKVONGS, Panida.; WANACHIWANAWIN, Darawan.; VISVESVARA, Govinda. S. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with chlorhexidine. **Ophthalmology**, v. 106, n. 4, p. 798-802, 1999.

KÖTTING, Jochem et al. Alkylphosphocholines: influence of structural variation on biodistribution at antineoplastically active concentrations. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 105-112, 1992.

KUMAZAWA, Shigenori et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

LALITHA, M. K. et al. Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 666-667, 1985.

LUSTOSA, Sarah R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 3, p. 447-54, 2008.

MAGHSOOD, Amir. H. et al. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 755-759, 2005.

MAGLIANO, Ana et al. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 3, p. 231-235, 2009.

MAGNET, A. et al. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. **Parasitology Research**, p. 1-6, 2014.

MALATYALI, Erdogan et al. In vitro amoebicidal activity of four *Peucedanum* species on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 167-174, 2012.

MARCIANO-CABRAL, Francine.; CABRAL, Guy. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 273-307, 2003.

MARCUCCI, Maria Cristina et al. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, Maria Cristina et al. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quim Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-535, 1996.

MARTIN, Luiz Fernando et al. Topical Brazilian propolis improves corneal wound healing and inflammation in rats following alkali burns. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 337, 2013.

MARTINEZ, Augusto. J.; VISVESVARA, Govinda. S. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 11, n. 4, p. 861-872, 1991.

MARTINEZ, Augusto. J.; VISVESVARA, Govinda. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**, v. 7, n. 1, p. 583-598, 1997.

MATSUI, Toshiro et al. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3, 4, 5-tri-O-caffeoylquinic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1797-1803, 2004.

MATSUNO, T. et al. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Research**, v. 17, n. 5A, p. 3565-3568, 1996.

MAZUR, T.; HADAŚ, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)**, v. 46, n. 2, p. 106-108, 1995.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MONZOTE, Lianet et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 978-984, 2012.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MOURA, Sandra Aparecida Lima de et al. Aqueous extract of Brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

MULYANINGSIH, S. et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1061-1066, 2010.

NAGAI, Takeshi et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2003.

NAJMADEEN, HASTYAR H.; KAKAMAND, F. A Kh. Antimicrobial activity of propolis collected in different regions of Sulaimani province-Kurdistan region/Iraq. **Journal of Duhok University**, v. 12, n. 1, p. 233-239, 2009.

NAKAJIMA, Yoshimi et al. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects *via* antioxidant actions. **Life Sciences**, v. 80, n. 4, p. 370-377, 2007.

NASCIMENTO, Evandro A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 379-386, 2008.

NATARAJAN, K. et al. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 17, p. 9090-9095, 1996.

NUPRASERT, Warisa et al. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4636-4640, 2010.

ORSOLIC, Nada; BASIC, Ivan. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 37-45, 2005.

OTA, Claudia et al. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, v. 44, n. 9-10, p. 375-378, 2001.

PAGE, Frederick. C. **A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with instructions for culture**. Ambleside, Cumbria: Freshwater Biological Association, 1988.

PARK, Yong K. et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Tecnol**, v. 40, n. 1, p. 97-106, 1997.

PARK, Yong Kun et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PARK, Yong K.; ALENCAR, Severino M.; AGUIAR, Claudio L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Yong K. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PATEL, Avni.; HAMMERSMITH, Kristin. Contact lens-related microbial keratitis: recent outbreaks. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 19, n. 4, p. 302-306, 2008.

PAULINO, Niraldo et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1, p. 296-301, 2008.

PENS, Claiton José et al. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology Research**, v. 103, n. 6, p. 1241-1245, 2008.

PEREIRA, Alberto Santos; SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias Silva; NETO, Francisco Radler Aquino. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, Dijon, v. 13, p. 557-598, 1977.

QVARNSTROM, Yvonne.; NERAD, Thomas. A.; VISVESVARA, G. S. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 626-633, 2013.

RUTHES, Ana. C. C. Conjuntivite presumível por *Acanthamoeba*. **Arq Bras Oftalmol**, v. 67, n. 6, p. 897-900, 2004.

SALOMAO, Kelly et al. Brazilian green propolis: effects in vitro and in vivo on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

SANTOS, F. A. et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 1-7, 2002.

SAUTER, Ismael Pretto et al. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 5, p. 1367-1371, 2011.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327-333, 2006.

SCHROEDER, Jill. M. et al. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and

sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1903-1911, 2001.

SCHUSTER, Frederick L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342-354, 2002.

SCHUSTER, Frederick. L.; VISVESVARA, Govinda. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 9, p. 1001-1027, 2004.

SEAL, D. V. et al. *Acanthamoeba keratitis*. **British journal of ophthalmology**, v. 87, n. 4, p. 516-517, 2003.

SHARMA, S.; SRINIVASAN, M.; GEORGE, C. Diagnosis of *acanthamoeba keratitis*- A report of four cases and review of literature. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 38, n. 2, p. 50, 1990.

SHOAIB, Hafiz Muhammad et al. Evaluation of inhibitory potential of some selective methanolic plants extracts on biological characteristics of *Acanthamoeba castellanii* using human corneal epithelial cells in vitro. **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1179-1188, 2013.

SIDDIQUI, Ruqaiyyah et al. Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 5, p. 185-189, 2011.

SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasit Vectors**, v. 5, n. 6, 2012.

SILVA, Bruno B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2007.

SILVA FILHO, et al. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 478-482, 2009.

SILVA, João Carlos et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1790-1795, 2012.

SINCLAIR, James. L.; MCCLELLAN, J. Forbes.; COLEMAN, David. C. Nitrogen mineralization by *Acanthamoeba polyphaga* in grazed *Pseudomonas paucimobilis* populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 667-671, 1981.

STARZYK, J. et al. Biological properties and clinical application of propolis. II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. **Arzneimittel-Forschung**, v. 27, n. 6, p. 1198-1199, 1976.

- STOTHARD, Diane. R. et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 45-54, 1998.
- TOPALKARA, Aysen et al. In vitro amoebicidal activity of propolis on *Acanthamoeba castellanii*. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 40-45, 2007.
- TURNER, Neil. A.; BIAGINI, Giancarlo. A.; LLOYD, David. Anaerobiosis-induced differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, n. 1, p. 149-153, 2006.
- VERANI, Jennifer R. et al. National outbreak of *Acanthamoeba keratitis* associated with use of a contact lens solution, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 8, p. 1236, 2009.
- VISVESVARA, Govinda. S.; STEHR-GREEN, Jeanette. K. Epidemiology of Free-Living Ameba Infections1. **The Journal of Protozoology**, v. 37, n. 4, p. 25s-33s, 1990.
- VISVESVARA, Govinda. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Review of Infectious Diseases**, v. 13, n. Supplement 5, p. S369-S372, 1991.
- VISVESVARA, Govinda. S.; SCHUSTER, Frederick. L. Opportunistic free-living amoebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, n. 20, p. 151-158, 2008.
- VUNDA, Sita Luvangadio Lukoki et al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. **Parasitology Research**, v. 111, n. 3, p. 961-966, 2012.
- WALOCHNIK, Julia. et al. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 695-701, 2002.
- WINCHESTER, Karen. et al. Diagnosis of *Acanthamoeba keratitis* in vivo with confocal microscopy. **Cornea**, v. 14, n. 1, p. 10-17, 1995.
- WINCK, Mari Aline Toderó; CAUMO, Karin; ROTT, Marilise Brittes. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. **Current Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 464-469, 2011.
- WOISKY, Ricardo G.; SALATINO, Antonio. ANALYSIS OF PROPOLIS: SOME PARAMETERS AND PROCEDURES FOR CHEMICAL QUALITYCONTROL. **Journal of apicultural research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.
- WOJTYCZKA, Robert D. et al. In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of Polish propolis against biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strains. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013

## ANEXOS

### ANEXO A: Preparo de meios de cultivo e soluções utilizadas

#### Meio Protease Peptona – Extrato de Levedo – Glicose (PYG)

- 7,5g de proteose peptona
- 0,75g de extrato de levedo
- 0,98g de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 0,059g de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 1g de citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 0,02g de sulfato ferroso amoniacal [ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ]
- 0,034g de diidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 0,355g de hidrogenofosfato dissódico anidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- 15g de glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )
- Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do  $\text{CaCl}_2$  que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em  $6,5 \pm 0,2$  e a solução esterilizada por autoclavagem (121 °C por 15 min).

#### Solução Salina de Page

- 120 mg de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ )
- 4 mg de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 142 mg hidrogenofosfato dissódico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 136 mg de diidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 4 mg de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do  $\text{CaCl}_2$  que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em  $6,5 \pm 0,2$  e a solução esterilizada por autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$  por 15 min).

### **Ágar não-nutriente (ANN)**

- 100 mL de solução salina de Page (1X)
- 1,5g de ágar

Preparo: O ágar foi dissolvido em 100 mL da solução salina e aquecido até a sua completa dissolução. Logo, foi esterilizado por autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$  por 15 min). A distribuição do ANN foi realizado em placas de Petri estéreis.

### **Tampão fosfato salino (PBS) 10 X concentrado**

- 85,0g de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ )
- 15,5g de fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 2,3g de dihidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- Água deionizada q.s.p. 1000ml

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos juntos. O pH foi ajustado em  $7,2 \pm 0,2$  e a solução esterilizada por autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$  por 15 min).

Para o preparo da solução tampão fosfato de sódio 1x, 1 parte da solução de PBS 10x foi diluída em 9 partes de água destilada deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$  por 15 min).