



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

Barbara Czerniak Rodrigues

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO
VORICONAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO OCULAR DA CERATITE
AMEBIANA**

Florianópolis

2020

Barbara Czerniak Rodrigues

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO
VORICONAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO OCULAR DA CERATITE
AMEBIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de
Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Karin Silva Caumo

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiola Branco Filippin Monteiro

Florianópolis
2020

Ficha de identificação de obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da Universidade Federal de Santa Catarina

Rodrigues, Barbara Czerniak
DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO
VORICONAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO OCULAR DA CERATITE
AMEBIANA / Barbara Czerniak Rodrigues ; orientadora, Karin
Silva Caumo, coorientador, Fabiola Branco Filippin
Monteiro, 2020.
73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Acanthamoeba spp. . 3. Voriconazol. 4.
Nanoemulsão Lipídica. I. Silva Caumo, Karin . II. Branco
Filippin Monteiro, Fabiola. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.
Título.

Barbara Czerniak Rodrigues

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO
VORICONAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO OCULAR DA CERATITE
AMEBIANA**

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

Profª. Evelyn Winter, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Ana Carolina Rabelo de Moraes, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Profª. Elenara Lemos-Senna, Dra.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profª. Dra. Karin Silva Caumo (UFSC – Orientadora)

Profª. Drª. Fabiola Branco Filippin Monteiro (UFSC – Coorientadora)

Florianópolis, 2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar o dom de aprender, e me mostrar que sempre tenho uma outra opção, abençoando a minha caminhada, me protegendo e guiando nos momentos de fragilidade.

À minha mãe e avós maternos, que sempre fazem o possível e o impossível para me ver realizando os meus sonhos. São vocês que me dão asas para voar e conquistar os meus objetivos.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Karin Silva Caumo, que me acolheu depois de três anos longe da universidade e dividiu seu conhecimento comigo. Agradeço pela sua confiança durante esses dois anos.

À minha coorientadora Prof^ª. Dr^ª Fabiola Branco Filippin Monteiro, que também me acolheu como parte do seu grupo. Muito obrigada pela parceria.

À Prof^ª. Dr^ª. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, que abriu as portas do seu laboratório e tornou possível a realização de muitos experimentos deste trabalho.

Ao Prof^º. Dr^º. Marcos José Machado e a Prof^ª Dr^ª Ana Carolina Rabello De Moraes, que me auxiliaram em todo o processo de análise estatística.

A todos os colegas que fizeram parte do LAPEO durante esses dois anos, em especial as mestrandas Carolina de Jesus de Camargo e Jaqueline da Silveira, e à doutoranda Maria Luiza Büchele, que me estenderam as mãos nos momentos de necessidade. Muito obrigada meninas, vocês foram incríveis.

Ao meu noivo, Rafael Massabki França, que mesmo longe se fez presente em todos os momentos e sempre segurou minha mão.

Aos colegas dos laboratórios parceiros, LAITA e GEIMM, em especial a Carolina Dumke de Siqueira, Adny Henrique Silva, Alex Evangelista do Amaral, Rafael Filipe Battisti Cavichion e a Gionvana Carolina Bazzo pelas contribuições e esforços para que este trabalho fosse possível.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, que aceitaram fazer parte de todo esse processo tão importante pra mim

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

À FAPESC pela bolsa de mestrado e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que mesmo indiretamente fizeram desta caminhada mais leve e cheia de luz.

RESUMO

A ceratite amebiana (CA) é uma inflamação da córnea, frequentemente associada a usuários de lentes de contato, causada por espécies de *Acanthamoeba*. Dentre as características da CA, destacam-se o infiltrado neutrofilico e a dor desproporcional ao tamanho da lesão. Devido às dificuldades de eliminação das formas do protozoário no tecido corneano, tratamento prolongado, recidivas e gravidade da infecção, que podem evoluir para a cronicidade e perda da visão, torna-se necessário o estabelecimento de tratamentos eficazes para a CA. O antifúngico voriconazol, capaz de bloquear a síntese do ergosterol, apresenta-se ativo contra cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. No entanto, não existem colírios disponíveis para comercialização devido à baixa estabilidade do voriconazol. O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma nanoemulsão lipídica contendo voriconazol para aplicação tópica ocular no tratamento da CA. O método de emulsificação espontânea foi empregado para a obtenção da nanoemulsão composta de triglicerídeos de cadeia média e L-fosfatidilcolina, com incorporação de voriconazol. A caracterização físico-química da nanoemulsão e estudo da estabilidade ao longo de 90 dias foram determinados pelo tamanho das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, viscosidade e percentual de eficiência de encapsulação do fármaco. Foram realizados testes para avaliar a atividade amebicida, citotoxicidade e irritação ocular do voriconazol livre (VL) e da nanoemulsão contendo o voriconazol (NLV). Os resultados obtidos nos testes de caracterização e estabilidade apresentaram tamanho médio das partículas de $163,9 \pm 6,7$ nm, índice de polidispersão $0,109 \pm 0,010$ e valor de potencial zeta de $-6,50 \pm 0,06$, enquanto os valores de pH foram de $6,90 \pm 0,06$ e mantiveram-se estáveis no período analisado. A nanoemulsão apresentou comportamento newtoniano e o percentual de eficiência de encapsulação foi considerado altamente satisfatório ($>90\%$). Os resultados de atividade amebicida indicaram que as formulações de VL e NLV apresentaram-se ativas contra *Acanthamoeba* spp., sem apresentar quaisquer sinais de citotoxicidade e irritação ocular frente a células de córnea de coelho. A NLV apresentou estabilidade biológica ao longo de 90 dias, demonstrando-se um bom veículo para incorporação do fármaco e uma possível formulação para administração tópica ocular do voriconazol para o tratamento da ceratite amebiana.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; voriconazol; nanoemulsão.

DEVELOPMENT OF LIPID NANOEMULSION CONTAINING VORICONAZOLE FOR TOPICAL OCULAR TREATMENT OF AMOEBIC KERATITIS

Amoebic keratitis (AK) is an inflammation of the cornea, usually associated with contact lens wearers, caused by species of *Acanthamoeba*. Among the characteristics of AK, neutrophilic infiltrate and pain disproportionate to the size of the lesion stand out. Due to the difficulties in eliminating the forms of the corneal tissue parasite, along with prolonged treatment, relapses and severity of the infection, which can progress to chronicity and loss of vision, it is necessary to establish effective treatments for AK. The antifungal voriconazole, capable of blocking the synthesis of ergosterol, is active against cysts and trophozoites of *Acanthamoeba* spp. However, there are no eye drops available for commercialization due to the low stability of voriconazole. The aim of the present study was to develop a lipid nanoemulsion containing voriconazole for topical ocular application in the treatment of AK. The spontaneous emulsification method was used to obtain the nanoemulsion composed of medium-chain triglycerides and L-phosphatidylcholine, with the incorporation of voriconazole. The physical-chemical characterization of the nanoemulsion and stability study over 90 days were determined by particle size, polydispersity index, zeta potential, pH, viscosity and percentage of drug encapsulation efficiency. Tests were performed to evaluate the amoebicidal activity, cytotoxicity and eye irritation of free voriconazole (FV) and the nanoemulsion containing voriconazole (NLV). The results obtained in the characterization and stability tests showed mean particle size of 163.9 ± 6.7 nm, polydispersion index 0.109 ± 0.01 and zeta potential value of -6.5 ± 0.06 , while the values pH values were 6.9 ± 0.06 and remained stable in the analyzed period. The nanoemulsion showed Newtonian behavior, and the percentage of encapsulation efficiency was considered highly satisfactory ($> 90\%$). The results of amoebicidal activity indicated that the VL and NLV formulations were active against *Acanthamoeba* spp. without showing any signs of cytotoxicity and eye irritation against rabbit corneal cells. NLV showed biological stability over 90 days, proving to be a good vehicle for incorporating the drug and a possible formulation for topical ocular administration of voriconazole for the treatment of amoebic keratitis.

Keywords: *Acanthamoeba*; voriconazole; nanoemulsion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.	18
Figura 2 – Caso de ceratite amebiana.....	20
Figura 3 – Patogênese de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	23
Figura 4 – Representação esquemática das camadas da córnea	25
Figura 5 – Esquema de estrutura de nanoemulsão	27
Figura 6 – Estrutura química do fluconazol e voriconazol.....	28
Figura 7 – Estrutura química dos componentes empregados no desenvolvimento da nanoemulsão	33
Figura 8 – Viscosidade da nanoemulsão em diferentes temperaturas em função da taxa de cisalhamento	45
Figura 9 – Cromatogramas obtidos dos ensaios das nanoemulsões contendo voriconazol	46
Figura 10 – Curvas de crescimento	47
Figura 11 – Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp. após tratamento com voriconazol	48
Figura 12 – Atividade amebicida do voriconazol frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp. em 24 horas de incubação	49
Figura 13 – Atividade amebicida do voriconazol frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp. em 48 horas de incubação	50
Figura 14 – Avaliação da estabilidade da atividade biológica de voriconazol livre frente à trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> T4	51
Figura 15 – Avaliação da atividade cisticida do voriconazol frente a <i>Acanthamoeba</i> spp.....	52
Figura 16 – Viabilidade das células SIRC pelo método STE nº491.	53
Figura 17 – Viabilidade celular da SIRC após tratamento com voriconazol.....	54
Figura 18 – Trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após tratamento com a nanoemulsão lipídica contendo voriconazol.....	55
Figura 19 – Avaliação da atividade amebicida da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> após 48 e 72 horas de tratamento.....	56
Figura 20 – Avaliação da atividade cisticida do voriconazol frente <i>A. castellanii</i>	57
Figura 21 – Viabilidade celular da SIRC frente à nanoemulsão lipídica	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da nanoemulsão	32
Tabela 2 – Tabela de classificação de substâncias testes pelo método STE (OECD, 2019) ...	39
Tabela 3 – Características físico-químicas das nanoemulsões lipídicas sem e com voriconazol	43
Tabela 4 – Determinação do pH das formulações de nanoemulsão lipídica sem e com voriconazol a 4 °C durante 90 dias de armazenamento	44
Tabela 5 – Área do pico e tempo de retenção das nanoemulsões contendo voriconazol	46
Tabela 6 – Taxa média de crescimento de culturas de <i>Acanthamoeba</i> spp. com inóculo de 1×10^5 trofozoítos/mL.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AM T4	Isolado clínico regional
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA	Ceratite amebiana
CI50	Concentração inibitória média
CLX	Digluconato de clorexidina
cP	Centipoise
DAD	Detector de diodos
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
EAG	Encefalite amebiana granulomatosa
EE%	Eficiência de encapsulação
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
LAPEO	Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas
LC	Lentes de contato
M	Molar
mPa	Milipascal
MTT	<i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
mV	Milivolt
NEM	<i>Neff's encystment medium</i>
NLB	Nanoemulsão lipídica branca
NLV	Nanoemulsão lipídica contendo voriconazol
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PdI	Índice de polidispersão
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHMB	Polihexametileno biguanida
PLM	Proteína de ligação aos receptores de manose

PYG	Meio proteose peptona, extrato de levedura e glicose
SBF	Soro fetal bovino
SE1	Solução estoque 1
SIRC	<i>Statens Seruminstitut Rabbit Cornea</i>
STE	<i>Short time exposure in vitro test method</i>
T.A.	Temperatura ambiente
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
UHPLC	<i>Ultra-high performance liquid chromatography</i>
UN GHS	<i>United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
VL	Voriconazol livre

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 O GÊNERO <i>Acanthamoeba</i>	17
2.1.1 Aspectos morfológicos e ciclo de vida	17
2.1.2 Ceratites infecciosas	18
2.1.2.1 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	19
2.1.2.2 Cascata patogênica da ceratite amebiana.....	21
2.1.2.3 Tratamentos para ceratite amebiana	23
2.2 A CÓRNEA E ADMINISTRAÇÃO TÓPICO OCULAR DE FÁRMACOS.....	24
2.2.1 Nanoemulsões para administração ocular de fármacos.....	25
2.3 VORICONAZOL.....	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 PREPARAÇÃO DO VORICONAZOL	32
4.2 PREPARO DA NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO O VORICONAZOL	32
4.2.1 Determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersão (Pdi) e potencial zeta.....	33
4.2.2 Estudo de estabilidade da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol	34
4.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação do voriconazol.....	34
4.3 CULTURA E OBTENÇÃO DE PROTOZOÁRIOS	35
4.3.1 Curva de crescimento de trofozoítos	35
4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA E CITOTOXICIDADE DO VORICONAZOL LIVRE E NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO VORICONAZOL	36
4.4.1 Avaliação da atividade amebicida de voriconazol livre frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	36
4.4.2 Avaliação da atividade amebicida frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> durante 30 dias de armazenamento do voriconazol livre	36
4.4.3 Avaliação da atividade cisticida de voriconazol livre.....	37
4.4.4 Teste de curta exposição de tempo <i>in vitro</i> adaptado - <i>Short time exposure (STE) in vitro test method</i> (OECD 491)	37
4.4.5 Avaliação da citotoxicidade do voriconazol livre frente a células SIRC	39

4.4.6 Avaliação da atividade amebicida do voriconazol encapsulado a nanoemulsão lipídica frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> durante noventa dias de armazenamento.....	40
4.4.7 Avaliação da atividade amebicida do voriconazol encapsulado a nanoemulsão lipídica frente a cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	40
4.4.8 Avaliação da citotoxicidade da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol frente às células de córnea de coelho - SIRC	41
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO LIPÍDICA	42
5.1.1 Eficiência de encapsulação do voriconazol.....	45
5.2 DETERMINAÇÃO DE PERÍODO EXPERIMENTAL DE <i>Acanthamoeba</i> spp.	46
5.2.1 Avaliação da atividade amebicida do voriconazol frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	48
5.2.2 Avaliação da atividade amebicida do voriconazol livre frente a trofozoítos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ao longo de trinta dias de armazenamento	50
5.2.3 Atividade amebicida do voriconazol livre frente aos cistos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	52
5.3 AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO OCULAR CAUSADA PELO CONTATO DO VORICONAZOL COM AS CÉLULAS SIRC PELO MÉTODO SHORT TIME EXPOSURE (STE) IN VITRO TEST METHOD (OECD 491)	52
5.3.1 Avaliação da citotoxicidade de voriconazol frente a células SIRC	53
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA DA NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO VORICONAZOL FRENTE A TROFOZOÍTOS DE <i>Acanthamoeba castellanii</i>	54
5.4.1 Avaliação da atividade cisticida da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol frente a cistos de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	57
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS SIRC FRENTE À NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO VORICONAZOL	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES.....	64
8 REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* são consideradas organismos anifzóicos e algumas espécies são associadas a casos de infecções em humanos (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). A ceratite amebiana (CA) consiste em uma inflamação crônica e grave da córnea, com destruição do tecido corneano e consequentemente a perda da visão (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; CALIXTO et al., 2015; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016). A maioria dos casos são associados a usuários de lente de contato pelo uso inadequado e má higiene das lentes e estojos de lentes de contato, porém casos acidentais de lesão de córnea também já foram relatados (OMANÑA-MOLINA et al., 2016; BUCHELE ET AL., 2018). Sintomas como vermelhidão, lacrimejamento, opacidade, dor desproporcional ao tamanho da lesão, sensibilidade à luz e edema das pálpebras são comuns em pacientes portadores da infecção (LORENZO-MORALES et al., 2013).

Derivados azólicos são amplamente utilizados por via tópico ocular para tratar ceratites infecciosas (HERALGI et al., 2016; NEOH et al., 2016). Estudos utilizando agentes azólicos demonstram que o fármaco voriconazol consegue atingir concentrações necessárias para o tratamento da ceratite amebiana, e que o mesmo apresenta maior atividade amebicida entre outros agentes da mesma classe (NAKAMINAMI, 2017). Assim como outros antifúngicos triazólicos, o voriconazol atua na inibição da desmetilação da 14-alfa-lanosterol, mecanismo de atividade específico para as células do microrganismo causador da infecção e não seletivo para células de mamíferos, prejudicando a síntese de ergosterol, o que leva a anormalidades na parede celular dos fungos e de protozoários como *Acanthamoeba* spp. (GREER, 2003).

Atualmente, as seguintes formas farmacêuticas do voriconazol encontram-se disponíveis: comprimido, suspensão oral e pó liofilizado para injeção – utilizados principalmente para o tratamento de infecções invasivas pelos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Scedosporium* e *Fusarium* (AL-BADRIYEH et al., 2009; HERALGI et al., 2016). Diante da falta de disponibilidade de formulações tópico ocular de voriconazol para o tratamento de infecções oculares, preparações com solução lacrimal, utilizando pó liofilizado para injeção e diluído em água para injeção ou solução lacrimal são utilizadas em ambulatórios de oftalmologia, pois apresentam-se efetivas para o tratamento de ceratites infecciosas por fungos e *Acanthamoeba* spp., apesar da baixa estabilidade e penetração intraocular quando em

suspensão, resultando na necessidade de administração de dosagens elevadas, provocando em muitos casos toxicidade (SMITH; KORN, 1968; HERALGI et al., 2016). A administração por via tópica ocular apresenta desvantagens, principalmente em casos de macromoléculas como compostos azólicos, pelo rápido clearance lacrimal, baixo tempo de residência na superfície ocular e conseqüentemente pela baixa biodisponibilidade do fármaco no interior do tecido (AMMAR et al., 2009; RUPONEN; URTTI, 2015).

Considerando a relevância e o aumento da ocorrência de casos de ceratite amebiana que passou de 0,13 casos por milhão (1994-1999) para 2,7 casos por milhão (2013-2018) (NIELSEN; IVARSEN; HJORTDAL, 2019), e ainda a falta de terapias específicas, que atuem contra as duas formas do parasito, não induzam ao encistamento, e com baixa toxicidade corneana, estudos de novas terapias para o tratamento desta infecção corneana e o desenvolvimento de formulações inovadoras contendo voriconazol tornam-se promissores (NAKAMINAMI et al., 2017). Com o avanço da nanotecnologia surge a possibilidade de incorporação de fármacos em sistemas de liberação em escala nanométrica, aumentando sua biodisponibilidade, protegendo da degradação em meio biológico e diminuindo a frequência de instilação (CHAUHAN; ROAD, 2018; VERMELHO et al., 2018).

Neste contexto, as nanoemulsões proporcionam uma estratégia conveniente para a liberação de fármacos na região anterior ocular, compostas por óleo, surfactante, co-surfactante e fase aquosa, com características isotrópicas e tamanho de partículas variando entre 20-200 nm (AZEEM et al., 2009; CHAUHAN; ROAD, 2018). A presença de surfactantes e cosurfactantes diminuem a tensão superficial entre os lipídios presentes na nanoemulsão e na membrana celular, removendo camadas de muco e rompendo complexo juncionais estreitos presentes na córnea, levando ao aumento da permeabilidade do fármaco (AMMAR et al., 2009; CHAUHAN; ROAD, 2018). Logo, uma nanoemulsão lipídica capaz de incorporar o voriconazol, consiste em uma estratégia inovadora e promissora para a terapia da ceratite amebiana, pois poderá combinar efeitos antiamebianos, baixa toxicidade ao tecido corneano e manutenção da concentração e da ação do fármaco no tecido da córnea, a fim de obter sucesso na resposta terapêutica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O GÊNERO *Acanthamoeba*

O gênero *Acanthamoeba* foi descrito por Volkonsky em 1931 (VIVESVARA, 2013) e descrito pela primeira vez como um patógeno ocular em 1970. Patogênico e oportunista, este protozoário de vida livre é considerado um ser anfizóico devido a sua capacidade de viver tanto na forma livre como na forma parasitária. Espécies de *Acanthamoeba* estão amplamente distribuídas no meio ambiente, já foram isoladas do ar, solo, poeira, água, lagos, piscinas, banheiras, hidromassagens, aparelhos de ar condicionado, lentes de contato, entre outros (VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; MAYCOCK, JAYASWAL, 2016).

Algumas espécies de *Acanthamoeba* estão associadas a doenças humanas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, causando encefalite amebiana granulomatosa (EAG), lesões cutâneas, infecções renais, pulmonares e da nasofaringe. Já em indivíduos imunocompetentes, *Acanthamoeba* spp. podem causar ceratite amebiana, que tem como consequência a destruição do tecido corneano pelo processo inflamatório intenso e cronicidade da infecção (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; CALIXTO et al., 2015).

2.1.1 Aspectos morfológicos e ciclo de vida

Acanthamoeba spp. apresentam um ciclo de vida, no qual pode ser encontrada sob duas formas: a forma trofozoítica metabolicamente ativa, com capacidade de reprodução, alimentação e invasão de células hospedeiras, e a forma de cisto, conhecida por ser altamente resistente, capaz de suportar condições adversas extremas (VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

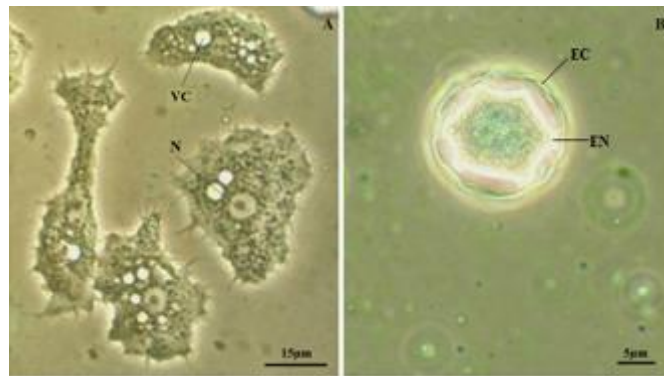
Os trofozoítos (Figura 1A) medem cerca de 20-40 μm de tamanho. Reproduzem-se através de fissão binária, são uninucleados e em sua superfície possuem acantopódios, que são pseudópodes finos semelhantes a agulhas, exclusivos do gênero e muito importantes para a alimentação e movimentação do protozoário (VIVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; CAUMO et al., 2009; LORENZO-MORALES et al., 2013).

O encistamento ocorre quando o trofozoíto encontra-se frente a condições adversas, como alterações de pH, temperaturas extremas, falta de nutrientes, exposição a desinfetantes, agentes quimioterápicos em baixa concentração ou inefetivos, e radiação UV (DART; SAW; KILVINGTON, 2009). Os cistos (Figura 1B) podem ser menores que os trofozoítos,

chegando a medir de 15-20 μm de tamanho, e possuem ostíolos que são responsáveis pelo monitoramento das condições do ambiente, utilizados para o desencistamento quando o cisto encontra-se em condições favoráveis (AKSOZEK et al., 2002; LLOYD, 2014).

Os cistos possuem dupla parede celular, que lhes confere a alta resistência a fármacos - formada por uma lâmina granular, o endocisto - composto principalmente por polissacarídeos, como a celulose e galactose, e como característica podem possuir formatos variados, como, estrelado, oval, poligonal e esférico - e uma lâmina fibrosa e rugosa, o ectocisto, composto principalmente por proteínas, polissacarídeos e lipídios (LORENZO-MORALES et al., 2010; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

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



(A) Trofozoíto

(B) Cisto

N: núcleo; VC: vacúolo contrátil; EC: ectocisto; EN: endocisto. Microscópio de contraste de fase (1000X).
 Fonte: Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO/UFSC).

A parede celular do cisto é composta por 33% de proteínas, 35% de carboidratos/polissacarídeos – a celulose em sua grande maioria - cerca de 6% de lipídios e 20% de material não identificado (KHAN, 2006; SIDDIQUI; KHAN, 2012). A estrutura lipídica da parede dos cistos e a membrana dos trofozoítos apresenta ergosterol e 7-dehidrostigmasterol, que representam cerca de 15% dos lipídios totais presentes no protozoário. O ergosterol é considerado o principal lipídio de membrana de *Acanthamoeba* spp., sendo assim, um potencial alvo de investigação farmacológica (SMITH; KORN, 1968; MARTÍN-NAVARRO et al., 2012; LLOYD, 2014; THOMSON et al., 2017).

2.1.2 Ceratites infecciosas

A ceratite é a principal causa global de cegueira monocular, afetando especialmente populações marginalizadas, sendo responsável por pelo menos 10% dos casos de perda de visão em países em desenvolvimento (WHITCHER; SRINIVASAN; UPADHYAY, 2001; PASCOLINI; MARIOTTI, 2012; AUSTIN; LIETMAN; ROSE-NUSSBAUMER, 2018). Nota-se que em países desenvolvidos, a principal causa de ceratite infecciosa está relacionada ao uso de lentes de contato (THYLEFORS, 1992; GUPTA et al., 2013).

Os casos de ceratites já são considerados um problema de saúde pública por ser a segunda maior causa de cegueira do mundo, perdendo apenas para a catarata (DUARTE, 2016). Esses casos representam uma das maiores indicações para transplante de córnea de emergência, devido à rápida progressão da doença (SOBRAL, 2013).

As ceratites infecciosas têm como agentes causadores bactérias, fungos, vírus e protozoários, e ocorrem por meio da invasão e proliferação de microrganismo no tecido corneano, o que leva à reação inflamatória e destruição do tecido (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; DUARTE, 2016). O grande desafio associado aos quadros de infecções corneanas estão relacionadas à dificuldade de diagnóstico e seguimento de tratamento adequado (SOBRAL, 2013).

Os principais sintomas dessa doença são a dor ocular de diferentes intensidades decorrente da córnea ser ricamente innervada, e a diminuição da acuidade visual, que está relacionada ao local da lesão na córnea. Existem também outros sintomas inespecíficos presentes em outras condições oculares, como lacrimejamento, fotofobia e hiperemia ocular (DUARTE, 2016).

O diagnóstico diferencial tanto clínico como laboratorial das ceratites infecciosas são essenciais para o prognóstico positivo, pois depende da terapêutica específica de acordo com o tipo de agente causador. A base do diagnóstico laboratorial continua sendo ainda hoje a coloração de Gram e cultura de materiais provenientes da córnea (KIM et al., 2008; AUSTIN; LIETMAN; ROSE-NUSSBAUMER, 2018). A microscopia confocal *in vivo* e tomografia óptica tiveram sua popularidade aumentada nos últimos anos devido a alta sensibilidade e rapidez diagnóstica (MARTONE et al., 2010; NIELSEN et al., 2013).

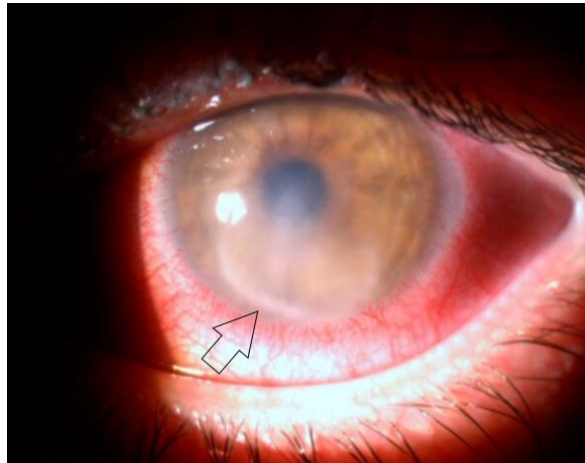
2.1.2.1 Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

A ceratite amebiana (CA) apesar de ser uma doença rara, é considerada uma infecção ocular grave da córnea, com risco de perda de visão, causada por diversas espécies do gênero

Acanthamoeba (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). Acomete indivíduos imunocompetentes com lesão prévia na córnea e pode ser caracterizada pela perda gradual da visão, já que a mesma é uma doença progressiva. Os sintomas estão relacionados à invasão e degradação da córnea, gerando fotofobia, lacrimejamento, opacidade, vermelhidão e edema das pálpebras. A dor presente nos casos de CA é muito intensa, desproporcional ao tamanho da lesão e ao quadro clínico que é provocado pela ceratoneurite radial, em que ocorre o contato das amebas com os nervos do estroma corneano (DART et al., 2009; LORENZO-MORALES et al., 2013).

Diferente de outras infecções oculares, a ceratite amebiana não costuma progredir para além do tecido corneano, ou seja, são raros os casos de infecções intraoculares ou endoftalmite. Essa característica está relacionada à cascata de patogênese de *Acanthamoeba* spp., que em casos mais avançados pode ocasionar o aparecimento de um infiltrado no estroma em forma de anel (Figura 2). A adesão dos trofozoítos ao epitélio da córnea ocorre a partir de microtraumas, seguido da adesão de trofozoítos e destruição do tecido corneano, resultando na penetração da membrana de Bowman, promovendo a degradação do tecido estromal (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; NUNES, 2014).

Figura 2 – Caso de ceratite amebiana.



Infiltrado neutrofilico indicado pela seta. Diagnóstico realizado por meio de cultivo e isolamento de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp., a partir de raspado da córnea pelo Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Fonte: LAPEO/UFSC.

Atualmente, ainda existe dificuldade no diagnóstico clínico e laboratorial de CA, principalmente pela falta de especialização dos laboratórios e desconhecimento do agente

etiológico (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). O diagnóstico inicial baseia-se nos sintomas, histórico e no exame biomicroscópico. Porém, os sinais clínicos não são específicos para a ceratite amebiana, o que dificulta a identificação da doença, que geralmente é confundida por ceratite causada por herpes ou fungos. Quando diagnosticada tardiamente, ocorrem complicações que podem acarretar na necessidade de transplante de córnea e eventualment na perda total da capacidade de acuidade visual (CLAERHOUT, 2004; LORENZO-MORALES et al., 2013).

O principal fator de risco identificado para ceratite amebiana é o uso de lentes de contato (LC) somado à falta de higiene pessoal do usuário, a limpeza e armazenamento inadequado das lentes e estojos, o desgaste das lentes por desrespeito ao tempo de uso, formação de biofilme e exposição à água contaminada (BRASILEIRA; LENTES; SOBLEC, 2000; BHARATHI, 2002). Cerca de 10-15% dos casos de CA estão relacionados a traumatismos oculares, acompanhados de exposição à água ou solo contaminado, associado principalmente a pós-cirurgia ocular ou a trabalhadores rurais (CARVALHO et al, 2009; PACELLA et al., 2013).

Mesmo com o aumento do número de usuários de lente, os casos de CA ainda são considerados raros em países desenvolvidos se comparados com o número de casos de ceratites bacterianas e fúngicas. Estima-se que cerca de 1,36 casos de ceratite amebiana ocorra a cada 1 milhão de usuários de lentes de contato nos Estados Unidos, país em que cerca de 40 milhões de habitantes faz uso de lentes de contato, contra 17 à 21 casos por milhão de usuários de LC no Reino Unido (SEAL, 2003; COPE et al., 2017). Já na França, estima-se 1 caso a cada 30.000 usuários de lentes de contato, com perspectivas de aumento a cada ano (TRABELSI et al., 2012).

A qualidade da informação sobre a distribuição da doença no Brasil ainda é baixa por não haver notificação obrigatória, no entanto, um centro de estudos oftalmológicos no estado de São Paulo realizou uma pesquisa retrospectiva com informações de 20 anos, em que foram feitas 581 culturas diagnósticas de ceratite, sendo que 185 diagnósticos foram confirmados para CA. O estudo constatou um aumento significativo no número de casos da doença a partir de 1996, e que cerca de 85% dos casos positivos para CA ocorreram em pacientes que faziam uso de lentes de contato (CARVALHO et al, 2009).

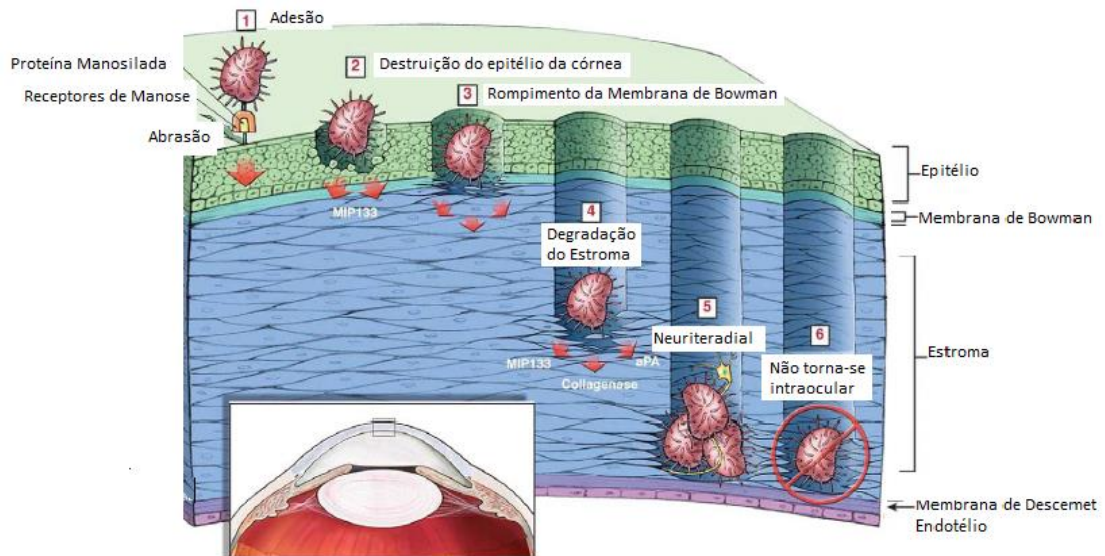
2.1.2.2 Cascata patogênica da ceratite amebiana

A compreensão do mecanismo patogênico da *Acanthamoeba* spp. é importante para o entendimento de como o protozoário consegue aderir às células do hospedeiro e causar o processo infeccioso (WINCK; CAUMO; ROTT, 2011; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016). Inicialmente, a cascata de patogênese da CA ocorre quando os trofozoítos ligam-se ao tecido corneano por meio da proteína de ligação aos receptores de manose (PLM) (GARATE et al., 2004; ALKHARASHI et al., 2016).

Após a adesão do trofozoíto à córnea, ocorre a destruição do tecido corneano através da produção de serino- (MIP-133), cisteíno- e metalo- proteases, além de outras proteínas facilitadoras, que permitem que os trofozoítos invadam as membranas intermediárias do estroma corneano, mediando a resposta inflamatória (Figura 3) (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; ALIZADEH et al., 2005; OMAÑA-MOLINA et al., 2016). A serino- protease MIP-133 é responsável por promover a apoptose dos ceratócitos, ou seja, é a proteína facilitadora mais importante no processo de invasão tecidual (NEELAM; NIEDERKORN, 2017).

O próximo passo é a dissolução do estroma colagenoso, por meio da produção de múltiplas proteases com propriedades colagenolíticas (HURT; NIEDERKORN; ALIZADEH, 2003; HUSTON, 2004; NEELAM; NIEDERKORN, 2017), que levam ao efeito citopático por meio do aumento da concentração de cálcio, ocasionando mudanças na morfologia e estrutura do citoesqueleto celular, gerando aumento da permeabilidade da membrana celular, degradação da matriz extracelular e a morte da célula (KHAN, 2006; CASTRILLÓN; OROZCO, 2013).

Figura 3 – Patogênese de *Acanthamoeba* spp.



Representação da cascata patogênica da ceratite amebiana. Adesão dos trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. à superfície do tecido corneano tecidual através da expressão de receptores de Manose e a produção de enzimas hidrolíticas que degradam a matriz extracelular, seguindo do agrupamento dos trofozoítos em torno dos nervos corneanos, gerando a ceratoneurite e dor intensa, seguido de morte celular. Fonte: Adaptado de CLARKE e NIERDERKORN (2006).

2.1.2.3 Tratamentos para ceratite amebiana

O objetivo da terapia medicamentosa para a CA é a total erradicação dos cistos e trofozoítos viáveis e a rápida resolução da resposta inflamatória. Como os tratamentos ainda são inespecíficos, na maioria das vezes a combinação de fármacos antimicrobianos é realizada (LORENZO-MORALES et al., 2010; ALKHARASHI et al., 2016). O desafio do tratamento da ceratite amebiana consiste em fármacos que atuem contra trofozoítos, não induzam o encistamento e atuem contra os cistos, porém a maioria dos fármacos utilizados possuem boa ação sobre os trofozoítos, mas são pouco efetivos contra os cistos, o que gera recidiva da infecção (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016).

Embora os antimicrobianos utilizados tenham pouca ação contra os cistos, as diamidinas e biguanidas são atualmente os anti-amebianos cisticidas mais eficazes. Entre os fármacos mais utilizados encontram-se as biguanidinas, como o polihexametileno biguanida (PHMB) e o digluconato de clorexidina (CLX), as diamidinas hexamidina (Desomedine[®]) e o isetionato de propamidina (Brolene[®]) (DART et al., 2009; TRABELSI et al., 2012). Outros

fármacos também utilizados para o tratamento da ceratite amebiana incluem alguns antibióticos (ex. aminoglicosídeos, neomicina) e antifúngicos (ex. azoles, itraconazol, voriconazol) (SUN et al., 2006; THEBPATIPHAT et al., 2007).

O tratamento tópico-ocular da CA, independente do fármaco escolhido, é considerado difícil, pois os medicamentos devem ser administrados de hora em hora e por muitos dias. Ao longo do tempo, a frequência da administração dos fármacos vai diminuindo, porém o tempo de tratamento pode durar meses até um ano (LORENZO-MORALES et al., 2010; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; NAKAMINAMI et al., 2017).

Quando ocorre diagnóstico errado ou o tratamento de CA é indicado tardiamente, nem sempre os resultados esperados são adequados, o que leva a necessidade de tratamentos cirúrgicos, como o transplante de córnea. Em casos graves, o paciente desenvolve ulceração da córnea, enucleação e consequente perda da visão (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; SAEED et al., 2009; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

2.2 A CÓRNEA E ADMINISTRAÇÃO TÓPICO OCULAR DE FÁRMACOS

A administração tópico ocular de fármacos é considerada a via ideal de administração para tratamento de doenças oculares relacionadas ao segmento anterior do olho. No entanto, a aplicação de formulações convencionais está associada a uma série de desafios devido às barreiras físico-químicas, metabólicas e biológicas do olho (YELLEPEDDI; PALAKURTHI, 2015; DUXFIELD et al., 2016).

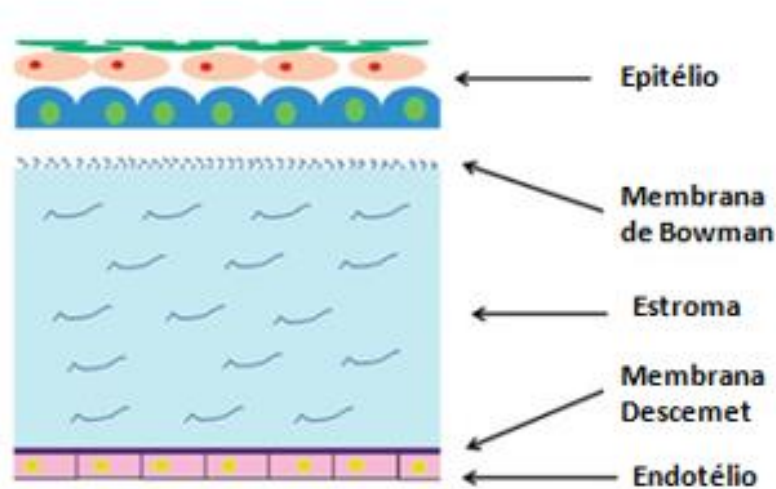
As barreiras físico-químicas correspondem às propriedades do fármaco, como lipofilicidade, solubilidade e tamanho de partícula (RUPONEN; URTTI, 2015). As barreiras metabólicas estão relacionadas à ação da enzima citocromo P450 no tecido ocular (NAKANO et al., 2014). Já, as barreiras biológicas incluem a córnea, a absorção sistêmica do saco conjuntival e a barreira hemato-ocular (URTTI, 2006).

A córnea é a camada mais externa do olho que cobre a pupila, a íris e a câmara anterior, a qual juntamente com o cristalino, é responsável pela focalização da visão através da refração da luz, atuando como uma lente fixa (LUDWIG, 2005; DUXFIELD et al., 2016). A córnea possui como característica ser transparente por não conter vasos sanguíneos, no entanto, é densamente inervada por nervos sensoriais. A distribuição de nutrientes e oxigênio na córnea é feita por meio do humor aquoso e do fluido lacrimal (WILLOUGHBY et al., 2010).

O tecido corneano é composto por cinco camadas (Figura 4): o epitélio corneano, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio corneano (LUDWIG, 2005). A soma dessas cinco camadas representa uma barreira de 500 a 700 μm de espessura, efetiva tanto contra a entrada de microrganismos, quanto contra a absorção de fármacos (WILLOUGHBY et al., 2010).

A camada epitelial é composta por cinco camadas de células com junções bem estreitas, que promovem estabilidade e uma certa impermeabilidade do epitélio. A membrana de Bowman é composta por fibras de colágeno dispostas irregularmente e protege o estroma onde encontram-se os ceratinócitos. A membrana Descemet é composta por duas camadas e é secretada pelo epitélio subjacente. Já o endotélio é formado por uma camada única de células cubóides com baixo potencial de regeneração (MAURICE, 1969; BOURNE; CAMPBELL, 1982; WILLOUGHBY et al., 2010).

Figura 4 – Representação esquemática das camadas da córnea.



Fonte: Adaptado de DUXFIELD et al. (2016).

2.2.1 Nanoemulsões para administração ocular de fármacos

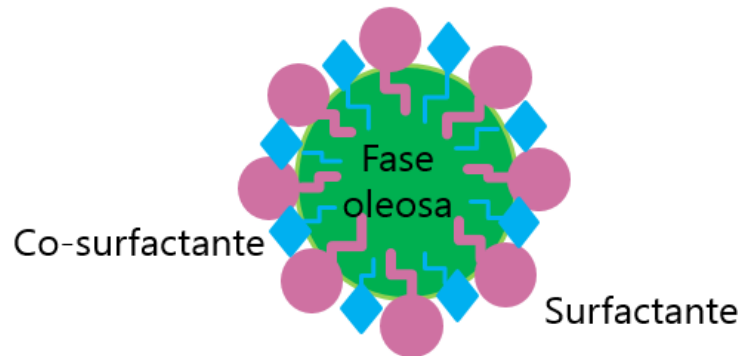
Formulações para uso tópico-ocular representam cerca de 90% das formulações farmacêuticas utilizadas para tratamentos oculares, apesar de ser considerado um dos sítios de administração mais desafiador (CHAUHAN; ROAD, 2018; DUBALD et al., 2018). Devido à

estrutura ocular, a drenagem lacrimal e outras barreiras protetivas dos olhos, ocorre baixa absorção dos fármacos, que limita-se a menos de 5% da dose administrada. Portanto, são necessárias diversas instilações ao longo do dia para manter as concentrações adequadas dos fármacos, dificultando o tratamento e podendo levar a lesão do tecido ocular, além de outros efeitos adversos (YELLEPEDDI; PALAKURTHI, 2015; AKHTER et al., 2016; AL KHATEB et al., 2016).

Para superar esses desafios, outros veículos oftálmicos vêm sendo estudados, como suspensões, pomadas, géis aquosos, lipossomas, nanopartículas, microemulsões e nanoemulsões. Alguns desses sistemas trouxeram melhorias em relação aos sistemas antigos de distribuição de fármacos, porém, nem sempre são bem aceitos pelos pacientes por provocarem visão turva e sensação de desconforto (AMMAR et al., 2009; DUBALD et al., 2018). Para uma administração eficaz de medicamento via ocular, é necessário uma formulação que permita a manutenção da concentração e da ação do fármaco no tecido da córnea, a fim de que o sucesso na resposta terapêutica seja alcançado (CHAURASIA et al., 2015; REIMONDEZ-TROITIÑO et al., 2015). Por esses motivos, os principais focos de pesquisa têm sido o prolongamento do tempo de permanência ocular dos medicamentos e a melhora da permeabilidade tecidual corneana (AGRAWAL; DAS; JAIN, 2012).

Os sistemas emulsionados vêm recebendo maior atenção nos últimos anos, pois possuem diversas vantagens se comparadas com outros veículos oftalmológicos (AKHTER et al., 2016; MOGHIMIPOUR; SALIMI; YOUSEFVAN, 2017). As nanoemulsões são descritas como dispersões finas de óleo/água ou água/óleo, estabilizadas por moléculas de surfactantes com gotículas na faixa de 20-200 nm (Figura 5). Possuem grande área de superfície, baixa tensão superficial e interfacial, que lhes conferem o aumento da permeabilidade do fármaco levando ao aumento da biodisponibilidade do mesmo. A presença de surfactantes e co-surfactantes facilitam a permeabilidade da membrana tecidual, levando novamente ao aumento da absorção do fármaco, ou seja, as nanoemulsões agem como facilitadores da penetração do fármaco ao tecido corneano (AMMAR et al., 2009; CHAUHAN; ROAD, 2018).

Figura 5 – Esquema de estrutura de nanoemulsão.



Fonte: Própria autora.

Do ponto de vista de produção, a nanoemulsão é considerada uma formulação simples e de baixo custo e ainda pode ser utilizadas para distribuir fármacos poucos solúveis ou insolúveis em água, uma vez que estes fármacos poderão ser solubilizados na sua fase oleosa (Figura 5). Além dessas vantagens, as nanoemulsões ainda conseguem proporcionar um sistema de liberação controlado e promovem penetração profunda dos fármacos no tecido da córnea (BENITA et al., 2012; DAULL; LALLEMAND; GARRIGUE, 2013; AKHTER et al., 2016). Com a melhora da retenção e penetração do fármaco no tecido corneano, consequentemente é necessário um regime de dosagens menor, o que proporciona a melhora na gestão da doença ocular e na adesão do paciente ao tratamento, além de diminuir efeitos de toxicidade no tecido (AGARWAL; RUPENTHAL, 2016; KALAM, 2016).

A descoberta das nanoemulsões promoveu o desenvolvimento de vários medicamentos na área de oftalmologia. Em 2002, houve a primeira aprovação do FDA (*Food and Drugs Administration*) de uma ciclosporina incorporada a uma nanoemulsão oftálmica com nome comercial Restasis[®] (Allergan INC., Irvine, CA, EUA), utilizada para síndrome do olho seco. Em 2008, ocorreu a segunda aprovação de uma nanoemulsão semelhante, o Durezol[®] (Alcon Laboratories, Fort Worth, TC, EUA), utilizado para tratar doenças oculares inflamatórias. Em seguida, outros dois produtos começaram a ser comercializados: o Lipimix[®] (Tubilux pharma, Itália) e o Soothe XP Emollient[®] (Bausch e Lomb, Roscherster, NY, EUA), utilizados para a restauração da camada lipídica do fluído lacrimal (CHAURASIA et al., 2015).

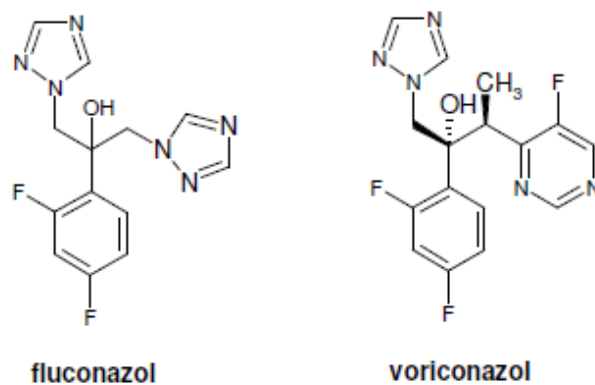
Vale ressaltar que nanoemulsões óleo/água são mais interessantes para administração ocular de fármacos do que nanoemulsões água/óleo, porque as gotículas das nanoemulsões óleo/água logo são retidas por uma fase aquosa biológica, facilitando a entrega do fármaco ao

tecido (AMMAR et al., 2009). Diante de todas as vantagens descritas, formulações de nanoemulsões para o tratamento tópico ocular da ceratite por *Acanthamoeba* spp. são interessantes de serem estudadas.

2.3 VORICONAZOL

O voriconazol é um antifúngico triazólico derivado do fluconazol, cuja estrutura química difere da estrutura do fármaco de origem. A diferença consiste na substituição do heterociclo triazólico por uma fluoroprimidina e pela presença de uma metila a mais (SHAH et al., 2003; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Assim como outros fármacos triazólicos, o mecanismo de ação do voriconazol baseia-se na inibição da enzima envolvida na síntese do ergosterol, a citocromo P450 demetilase, levando ao acúmulo de 14-metilsteróis, interrompendo o empacotamento das cadeias de fosfolípidios, alterando a permeabilidade da membrana celular e o crescimento fúngico (GREER, 2003; LAU, 2008; HERALGI et al., 2016).

Figura 6 - Estrutura química do fluconazole e voriconazol.



Fonte: Adaptado de Adams (2007).

Os fármacos triazólicos fazem parte da classe farmacológica dos azóis, descobertos na década de 1990 por um grupo de cientistas que observou atividade antifúngica em um composto imidazólico. Essa classe farmacológica acabou dividida em 2 subgrupos: os imidazólicos – fármacos que possuem alta toxicidade e por isso de menor utilização – cetoconazol, clotrimazol, miconazol e os triazólicos (Figura 6) – fármacos com amplo

espectro de ação, com melhor perfil de segurança e consequentemente mais utilizados – fluconazol, voriconazol e itraconazol (ARNOLD et al., 2010; VASCONCELOS; MENEZES; CUNHA, 2011; CASTRO et al., 2016).

A descoberta da classe dos azóis mudou a abordagem do tratamento das infecções fúngicas, no entanto, ainda não havia um agente químico ideal. O fluconazol apresentou mais limites do que o esperado quanto ao espectro de ação e induzia rapidamente o desenvolvimento de resistência ao fármaco. Em 2002, o voriconazol foi aprovado pelo FDA como agente promissor para tratamento de infecções fúngicas resistentes, dando origem a segunda geração dos agentes triazólicos (GREER, 2003; JOHNSON; KAUFFMAN, 2003).

O voriconazol está disponível sob três formas farmacêuticas: as formas para administração por via oral - comprimidos revestidos e o pó para suspensão oral - e a para via intravenosa – pó liofilizado para injeção. Possui ação contra *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Scedosporium apiospermum*, *Fusarium* spp. e *Cryptococcus* spp. Os principais efeitos adversos são relacionados a distúrbios visuais transitórios, aumento da atividade das enzimas hepáticas e *rash* cutâneo (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; ADAMS, 2007; HERALGI et al., 2016).

O voriconazol é considerado apropriado para o uso oftalmológico, devido a respectiva elevada lipossolubilidade, apesar de um estudo prospectivo demonstrar que o fármaco sistêmico pode chegar a elevadas concentrações no humor aquoso, conseguindo exercer sua função nos casos de infecções oculares. Porém o uso sistêmico induz de efeitos indesejados (HARIPRASAD et al., 2004). Outro estudo, utilizando “colírio de voriconazol” 1%, demonstrou como a instilação ocular é bem tolerada e capaz de atingir concentrações suficientes para tratar agentes infecciosos causadores de ceratite, concluindo ser uma forma de terapia muito mais acessível e com menor risco potencial de causar efeitos adversos (LAU, 2008).

Em muitos ambulatórios oftalmológicos, o voriconazol é utilizado diluído em água para injeção ou solução lacrimal para o tratamento de ceratite em pacientes. No entanto, um frasco de voriconazol liofilizado contém 10 mg/mL do fármaco e 160 mg/mL de hidroxipropil betaciclodextrina, excipiente utilizado em complexos hidrofóbicos para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade do fármaco que, por sua vez, possui citotoxicidade dose dependente comprovada em epitélio de células de córnea humana (JANAGAM; WU; LOWE, 2017; SOBOLEWSKA et al., 2015).

Um dos grandes desafios do desenvolvimento e comercialização de um colírio de voriconazol é a baixa estabilidade do fármaco. Alguns estudos sugerem que apesar de não

ocorrer modificações físico-químicas, a atividade do fármaco pode ser comprometida, perdendo a eficácia, mesmo quando mantido em baixas temperaturas. Pois, mesmo em baixas temperaturas após três semanas de armazenamento, o fármaco já demonstra menor atividade *in vitro* (CURTI et al., 2017; TEJERA, 2005). Outros testes feitos com o congelamento do fármaco a - 20 °C, sugerem boa atividade por 90 dias e quando armazenado a 5 °C, o voriconazol apresentou estabilidade de 14 dias (GARZAS et al., 2005; BARDIN et al., 2011; AMÓROS-REBOREDO et al., 2015).

Resultados promissores foram observados quanto à utilização tópica ocular de voriconazol no tratamento de ceratite amebiana, porém não há consenso entre os vários protocolos médicos sobre qual seria a dosagem de uso apropriada para a terapêutica (MARTÍN-NAVARRO et al., 2012; MARTÍN-NAVARRO et al., 2015). A baixa estabilidade das formulações e a baixa absorção intraocular do fármaco não facilitam a comercialização de colírios de voriconazol.

A problemática do voriconazol em relação à baixa estabilidade e baixa absorção ocular poderia ser resolvida com uma nanoemulsão associada ao voriconazol, pois haverá a combinação de efeitos amebicidas, sem indução ao encistamento, com baixa citotoxicidade, permitindo a manutenção da concentração e ação do fármaco no tecido corneano, com sucesso na resposta terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade amebicida de uma nanoemulsão lipídica contendo voriconazol, visando a administração tópica ocular para o tratamento da ceratite amebiana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar uma nanoemulsão lipídica contendo voriconazol quanto às propriedades físico-químicas;
- Avaliar a estabilidade físico-química da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol;
- Avaliar a atividade amebicida do voriconazol livre frente aos trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp.;
- Verificar o efeito irritativo e citotóxico do voriconazol livre frente a células de epitélio de córnea de coelho;
- Analisar a atividade amebicida da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol frente a cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.;
- Verificar o efeito citotóxico da nanoemulsão contendo o voriconazol frente a células de epitélio de córnea de coelho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DO VORICONAZOL

O voriconazol ($\geq 98\%$, HPLC, Sigma-Aldrich, Alemanha) foi reconstituído em dimetilsulfóxido (DMSO - P.A Neon, Brasil) em concentração final de 2,0 mg/mL, denominada solução estoque 1 (SE1). A SE1 foi armazenada em alíquotas de 100 μ L a - 80 °C, de acordo com instruções descritas pelo fabricante. Amostras foram armazenadas a 4 °C, ao abrigo de luz, para realização de testes de estabilidade.

4.2 PREPARO DA NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO O VORICONAZOL

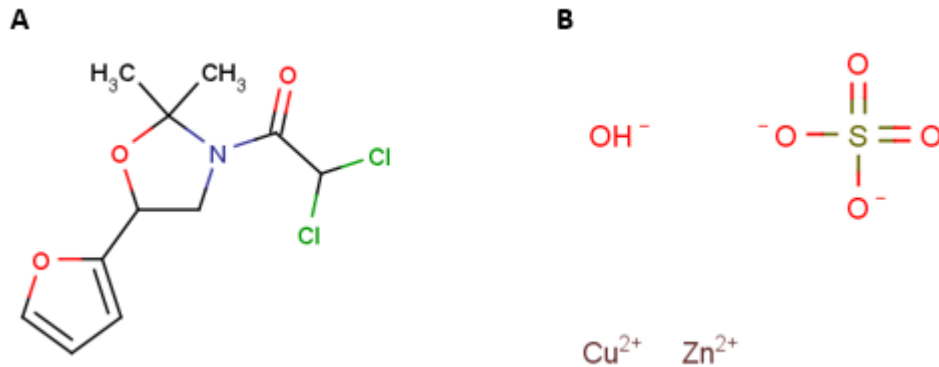
A nanoemulsão lipídica final branca (NLB) foi preparada pelo método de emulsificação espontânea, utilizando uma sonda sonicadora do tipo Vibra cell – *ultrasonic processor* (Sonics & Materials, Inc, EUA), conforme descrito por Filippin e Souza (2008) com modificações. A composição da nanoemulsão lipídica foi de 70% de triglicerídeos de cadeia média (Miglyol 812N[®], Alemanha) – fase oleosa, 30% de lecitina de ovo (Sigma-Aldrich, Alemanha) – agente emulsificante. Para a incorporação do voriconazol (NLV), a dissolução foi realizada em clorofórmio-metanol (2:1, v / v) com 1 mg do fármaco, obtendo-se uma NLV final com concentração de 0,25 mg/mL de voriconazol. A Tabela 1 mostra a composição da nanoemulsão lipídica final branca (NLB) e a Figura 7 mostra a estrutura química dos componentes da NLB.

Tabela 1 - Composição da nanoemulsão.

COMPOSTO	PROPORÇÃO (p/v)
Tiglicerídeos de cadeia média	70%
Lecitina de ovo	30%

Fonte: Própria autora.

Figura 7 - Estrutura química dos componentes empregados no desenvolvimento da nanoemulsão.



Estrutura química do triglicerídeo de cadeia média (Miglyol 812N®) (A) e estrutura química da lecitina de ovo (B). Fonte: Adaptado de GUIDECHEM (2020).

A mistura foi seca em capela de exaustão para remover totalmente o solvente orgânico. Posteriormente, adicionou-se 4 mL de PBS e a mistura foi emulsionada com sonda sonicadora por 30 minutos. As dispersões finais (NLB e NLV) foram obtidas após 24 horas de descanso em temperatura de 4 °C, ao abrigo de luz, para precipitação do titânio liberado pela sonda sonicadora. As dispersões finais de NLB e NLV foram mantidas à temperatura de 4 °C, ao abrigo de luz.

4.2.1 Determinação do tamanho das partículas, índice de polidispersão (Pdi) e potencial zeta

A caracterização da NLB e NLV foi realizada pela determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão (Pdi) e a carga de superfície (potencial zeta), por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS - *Dynamic Light Scattering*), utilizando o equipamento Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Todas as medidas foram realizadas a partir das amostras diluídas em proporção 1:10 em PBS – para tamanho das partículas e Pdi – e também em soro fisiológico – para potencial zeta, sempre em

triplicata com três leituras, a temperatura de 25 °C com feixe de laser HeNe (633 nm), em ângulo de detecção de 173° em cubeta ZEN0040.

Após a obtenção dos dados a partir do decaimento da taxa de correlação de fótons, a análise foi feita utilizando método cumulante para informar os diâmetros hidrodinâmicos (Z-average) - quando em valores inferiores a 200 nm impedem a flocculação da formulação, protegendo inclusive de degradação natural o princípio ativo incorporado a nanoemulsão (ALSHAHIRANI, 2019) - e o PDI das moléculas - quanto mais próximos de zero demonstram maior uniformidade do sistema nanoemulsionado (SOUZA et al., 2012). O potencial zeta foi medido através de microeletroforese Doppler a laser, em que a carga das partículas foram determinadas a partir da mobilidade iônica, no qual valores a cima de 25 mV e a baixo de -25 mV indicam estabilidade ao sistema.

4.2.2 Estudo de estabilidade da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol

Os sistemas nanoemulsionados finais NLB e NLV foram armazenadas a 4 °C e submetidas a um estudo de estabilidade físico-química por 90 dias, período baseado no teste de prateleira determinado pela ANVISA (2004). Para tanto, após 24 horas do preparo dos lipossomas, avaliou-se tamanho médio das partículas, PDI, potencial zeta, valor de pH em períodos de tempo pré-determinados, sendo estes: 1, 2, 6, 16, 22, 30, 38, 45, 60, 75 e 90 dias. As análises físico-químicas foram realizadas conforme descrito no item 5.2.1 utilizando equipamento Zetasizer Nano Zs.

O pH das formulações, com diluição das amostras 1:100 em PBS, foi determinado através da leitura da tensão gerada pelo eletrodo quando em contato com a formulação, utilizando o pHmetro de bancada pHB-500 (Ionlab, Brasil). A viscosidade da amostra NLV foi determinada a 4 °C e 37 °C utilizando o viscosímetro Brookfield (DV-II+Pro Brookfield., EUA), com spindle SC4-18. Com exceção da determinação da viscosidade, todas as medidas foram realizadas a partir das amostras em triplicata com três leituras.

4.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação do voriconazol

O encapsulamento do voriconazol com a NLB foi avaliado utilizando o equipamento de UHPLC Jasco X-LC TM (Reino Unido), equipado com uma bomba de alta pressão X-LC TM3185-PU, injetor automático X-LC TM3159AS, forno para coluna X-LC 3067-C0, com

um detector de diodos (DAD) modelo X-LC TM3110-MD. A coluna analítica utilizada foi uma Agilent ZORBAX Eclipse plus TM, C18 (4,6 mm x 150 mm, 5,0 µm), Agilent Technologies®. A fase móvel foi constituída de Acetonitrila/Metanol/0,05 M de acetato de amônio em água (20/40/40), em fluxo 0,5 mL/m e o comprimento de onda (λ) escolhido foi de 256 nm (CURTI et al., 2017; TANG, 2013). Uma curva de calibração de voriconazol puro diluído em fase móvel orgânica foi estabelecida, contendo cinco pontos de concentrações diferentes. Para análise da nanoemulsão contendo o voriconazol (0,25 mg/mL), a mesma foi digerida em fase móvel do solventes orgânicos (1:1 v/v). Todas as leituras foram feitas em triplicata. Após análise dos dados, a eficiência de encapsulação (EE%) para a nanoemulsão contendo voriconazol foi determinada através da massa real encontrada de voriconazol nas leituras do UHPLC e da massa teórica de voriconazol presente na Equação 1 (KHARE et al., 2016).

Equação 1 - Eficiência de encapsulação:

$$EE (\%) = \frac{(\text{massa real de voriconazol})}{(\text{massa teórica de voriconazol})} \times 100$$

Fonte: KHARE et al., 2016.

4.3 CULTURA E OBTENÇÃO DE PROTOZOÁRIOS

Neste estudo foram utilizadas as cepas de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010), *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) e o isolado clínico regional AM T4 caracterizado no LAPEO - Laboratório de Estudo de Protozoários Emergentes e Oportunistas (BUCHELE et al., 2018). As acantamebas foram cultivadas axenicamente em meio proteose peptona, extrato de levedura e glicose (PYG) em temperatura de 30 °C (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004).

4.3.1 Curva de crescimento de trofozoítos

Os trofozoítos em fase exponencial de crescimento das duas cepas de *A. castellanii* incluídos no estudo e o isolado clínico regional foram contados em hemocítômetro. A concentração celular foi ajustada de modo a obter 1×10^5 trofozoítos/mL em PYG. As acantamebas foram incubadas a 30 °C de 1 a 8 dias, com três repetições para cada amostra. A cada 24 horas realizou-se a contagem dos trofozoítos em hemocitômetro utilizando o corante de viabilidade Azul de Tripán 0,4%, sendo expressa em número de trofozoítos/mL de meio de

cultivo. Após a análise destes dados, foi avaliada a taxa de velocidade média de crescimento dos trofozoítos, que pode ser calculada a partir da Equação 2.

Equação 2 – Taxa de velocidade de crescimento

$$\text{Taxa de velocidade de crescimento} = \frac{(\log NF - \log N0)}{0,301 \times T}$$

NF refere-se ao número máximo de trofozoítos, N0 é o número de trofozoítos do inóculo inicial e T significa o tempo em que foi atingida a densidade máxima. Fonte: FINCO (2012).

Os dados gerados permitiram obter o perfil de crescimento das cepas e isolado incluídos no estudo.

4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA E CITOTOXICIDADE DO VORICONAZOL LIVRE E NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO VORICONAZOL

4.4.1 Avaliação da atividade amebicida de voriconazol livre frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

As concentrações de 0,25 µg/mL, 0,50 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 12,5 µg/mL de voriconazol foram testadas frente a 8×10^4 trofozoítos/mL das cepas de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010), *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) e o isolado clínico AM T4 para avaliação da atividade amebicida. Os testes foram realizados em placas de 96 poços, no período de 24 e 48 horas de incubação a 30 °C, com observação da cinética de crescimento em 6, 12, 24 e 48 horas de incubação. Como controle negativo foi utilizada solução de DMSO 0,125% em PYG. A viabilidade dos trofozoítos foi determinada por contagem em hemocitômetro, utilizando o corante de viabilidade Azul de Tripán (0,4%). Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. Os resultados obtidos no teste de avaliação de atividade amebicida foram expressos como porcentagem de trofozoítos viáveis.

4.4.2 Avaliação da atividade amebicida frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* durante 30 dias de armazenamento do voriconazol livre

As concentrações de 0,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 12,5 µg/mL de voriconazol livre foram testadas frente a 8×10^4 trofozoítos/mL das cepas de *A. castellanii* T4

(ATCC 50492) para avaliação da atividade amebicida. Os testes foram realizados em placas de 96 poços, no período de 48 e 72 horas de incubação a 30 °C, com observação da cinética de atuação do fármaco em 24, 48 e 72 horas de incubação. Como controle negativo foi utilizada solução de DMSO 0,125% em PYG. A viabilidade dos trofozoítos foi determinada por contagem em hemocítômetro, utilizando o corante de viabilidade Azul de Tripan (0,4%). Os experimentos foram realizados em triplicatas e tempos independentes, já que havia a necessidade de observar se a atividade amebicida mantinha-se em um período de 30 dias. Os testes foram iniciados após 7, 15 e 30 dias após o preparo da SE1 que ficou armazenado a 4°C, ao abrigo de luz. Os resultados obtidos no teste de avaliação de atividade amebicida foram expressos como porcentagem de trofozoítos viáveis.

4.4.3 Avaliação da atividade cisticida de voriconazol livre

Para a obtenção de cistos, 5×10^5 trofozoítos/mL do isolado clínico AM T4 foram incubados em meio de encistamento Tris-HCl. Após a obtenção de cistos, retirou-se o meio de encistamento e uma solução de SDS 0,5% foi adicionada por 5 minutos para a lise de pré-cistos e trofozoítos ainda presentes. Os cistos foram suspensos em PBS e inoculados em placas de 96 poços, com cerca de 8×10^4 cistos/mL, juntamente com os seguintes tratamentos em triplicata técnica e biológica: controle negativo (PBS contendo 0,125% de DMSO), controles positivos (clorexidina 0,02% e colírio de polihexametileno biguanida 0,02%) e quatro concentrações de voriconazol (0,50 µg/mL, 2,50 µg/mL, 5,0 µg/mL e 12,5 µg/mL) para avaliação da atividade cisticida do fármaco. As placas foram incubadas por 24 horas a 30 °C. A viabilidade dos cistos foi determinada por contagem em hemocítômetro utilizando o corante de viabilidade azul de tripan.

4.4.4 Teste de curta exposição de tempo *in vitro* adaptado - *Short time exposure (STE) in vitro test method (OECD 491)*

Para verificação da irritação ocular, foi escolhido o método *Short time exposure (STE) in vitro test method (OECD 491, 2018)*, utilizando células SIRC (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*) (ATCC® – CCL 60) cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Sigma-Aldrich, Alemanha), suplementado em 10% com soro fetal bovino (SBF) em garrafas de cultura e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com 30×10^6 células/poço e incubadas durante quatro dias. Após o período de incubação, o meio foi retirado e em seguida foram adicionados os seguintes tratamentos: DMEM como controle negativo, DMSO 0,125% e soro fisiológico para controle de viabilidade; SLS 0,01% diluído em soro fisiológico, clorexidina 0,02% e PHMB 0,02% como controles positivos, e as cinco concentrações de voriconazol (0,25 µg/mL, 0,50 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,50 µg/mL, 5,0 µg/mL, 12,5 µg/mL) para verificação da taxa de irritação ocular *in vitro* do fármaco. Todos os tratamentos ficaram em contato com as células por 5 minutos e retirados, seguidos da adição de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – Sigma-Aldrich, Alemanha) 0,5 mg/mL, com incubação em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 2 horas. Após esse último período de incubação, o MTT foi retirado e adicionou-se DMSO para a solubilização do produto de redução do MTT ser revelado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ELX-800 (BIOTEK®, EUA) em comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade das células foi calculada utilizando a seguinte Equação 3.

Equação 3 – Viabilidade celular

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{(DO_{540}\ substância\ teste) - (DO_{540}\ branco)}{(DO_{540}\ controle) - (DO_{540}\ branco)} \times 100$$

DO₅₄₀ é a densidade óptica obtida em leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Fonte (OECD, 2018).

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a Tabela 2 de classificação de substâncias irritativas ou causadoras de danos teciduais graves da OECD.

Tabela 2 - Tabela de classificação de substâncias testes pelo método STE (OECD, 2018).

Viabilidade celular		Classificação UN GHS	Aplicabilidade
à 5 %	à 0,05 %		
>70 %	>70 %	Sem categoria	Substâncias e misturas, com exceção de: i) Substâncias altamente voláteis com pressão de vapor acima 6KPa and ii) produtos químicos sólidos (substâncias e misturas), exceto surfactantes e misturas compostas apenas de surfactantes
≤70 %	>70 %	Sem previsão	Não aplicável
≤70 %	≤70 %	Categoria I	Substâncias e misturas

Na Tabela 2 5 % e 0,05 % correspondem as concentrações testes das substâncias analisadas pelo método STE. Os valores >70 % e ≤70 % correspondem a viabilidade celular, que ao ser determinada classifica a substância na UN GHS. Fonte: Adaptado de OECD, 2018.

4.4.5 Avaliação da citotoxicidade do voriconazol livre frente a células SIRC

Para avaliação da citotoxicidade do voriconazol, a linhagem celular de córnea de coelho SIRC (ATCC® – CCL 60) foram inoculadas cerca 5×10^5 células/poço em placas de 96 cavidades. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de voriconazol (0,25 µg/mL, 0,50 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,50 µg/mL, 5,0 µg/mL, 12,5 µg/mL), e também com os controles: DMSO 0,125% em DMEM como controle negativo, clorexidina 0,02% diluído em DMEM e colírio de polihexamedina 0,02% como controles positivos. Depois de 24 horas em contato com o tratamento, para mimetizar o tratamento contínuo, retirou-se totalmente o volume dos tratamentos dos poços e 150 µL de MTT 0,5 mg/mL foi adicionado, seguido de 2 horas de incubação em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e adição de DMSO, para posterior leitura realizada em espectrofotômetro ELX-800 (BIOTEK®, EUA) em comprimento de onda de 540 nm.

4.4.6 Avaliação da atividade amebicida do voriconazol encapsulado a nanoemulsão lipídica frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* durante noventa dias de armazenamento

Inicialmente, as concentrações de 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25,0 µg/mL e 50 µg/mL de voriconazol encapsulado foram testadas frente a 8×10^4 trofozoítos/mL das cepas de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) para avaliação da atividade amebicida, mantendo-se em teste posteriormente apenas a concentração de 12,5 µg/mL. Os testes foram realizados em placas de 96 poços, no período de 48 e 72 horas de incubação a 30 °C, com observação da cinética de atuação do fármaco em 24, 48 e 72 horas de incubação. Como controle negativo foi utilizada solução de nanoemulsão branca 4% em PYG. A viabilidade dos trofozoítos foi determinada por contagem em hemocitômetro, utilizando o corante de viabilidade Azul de Tripán (0,4%). Os experimentos foram realizados em triplicatas técnica e biológica e tempos independentes, já que havia a necessidade de observar se a atividade amebicida mantinha-se em um período de 90 dias, tempo baseado no teste de prateleira determinado pela ANVISA (2004). Os testes foram iniciados 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após o preparo das nanoemulsões. Os resultados obtidos no teste de avaliação de atividade amebicida foram expressos como porcentagem de trofozoítos viáveis.

4.4.7 Avaliação da atividade amebicida do voriconazol encapsulado a nanoemulsão lipídica frente a cistos de *Acanthamoeba castellanii*

Para a obtenção de cistos, 5×10^5 trofozoítos/mL do isolado de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) foram incubados em meio de encistamento NEM. Após 96 horas de incubação houve a obtenção de cistos, no entanto, ainda haviam trofozoítos e pré-cistos, e por esse motivo adicionou-se sarcosyl 150 mg/mL, um agente lisante que ficou em contato com a cultura durante 10 minutos. Após a lavagem da cultura com PBS para retirada do meio de encistamento e do agente lisante, os cistos foram suspensos em PBS e inoculados em placas de 96 poços, com cerca de 8×10^4 cistos/mL, juntamente com os seguintes tratamentos em triplicata: controle negativo NLB, a CI50 de voriconazol livre encontrado nos testes de padronização e 3 concentrações de NLV (12,5 µg/mL, 25,0 µg/mL e 50 µg/mL) para avaliação da atividade cisticida da formulação. As placas foram incubadas por 48 e 72 horas a 30 °C. A viabilidade dos cistos foi determinada por contagem em hemocitômetro utilizando o

corante de viabilidade Azul de Tripán. Os resultados obtidos no teste de avaliação de atividade amebicida foram expressos como porcentagem de trofozoítos viáveis.

4.4.8 Avaliação da citotoxicidade da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol frente às células de córnea de coelho - SIRC

Para avaliação da citotoxicidade do Voriconazol encapsulado, a linhagem celular de córnea de coelho SIRC (ATCC® – CCL 60) foram inoculadas cerca 5×10^5 células/poço em placas de 96 cavidades. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com as duas diferentes concentrações da formulação (30 $\mu\text{g/mL}$ e 60 $\mu\text{g/mL}$), e também com os controles: DMEM como controle negativo, nanoemulsão branca 24% em DMEM para controle de viabilidade, clorexidina (0,3 $\mu\text{g/mL}$ e 0,6 $\mu\text{g/mL}$) diluído em DMEM como controle positivo. Depois de 24 horas em contato com o tratamento, foi retirado totalmente o volume dos tratamentos dos poços e adicionado 150 μL de MTT 0,5 mg/mL para posterior leitura realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram apresentados com médias e erro padrão da média, desvio da média e foram analisados através do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Conover por do programa MedCalc. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO LIPÍDICA

A preparação da nanoemulsão lipídica para encapsular o voriconazol baseou-se em estudos iniciais das composições lipídicas/tensoativos mais comumente utilizados para encapsular fármacos com lipofilicidade intermediária como o voriconazol (FILIPPIN; SOUZA, 2008; JANAGAM; WU; LOWE, 2017). Assim, a nanoemulsão de triglicerídeos de cadeia média/lecitina de ovo foram preparadas para incorporar o voriconazol na concentração de 0,25 mg/mL. A nanoemulsão lipídica apresentou aspecto final branco leitosa, sem agregados, separação de fases ou precipitação visível.

Os parâmetros físico-químicos das formulações resultantes foram analisados e são apresentados na Tabela 3. O tamanho médio observado para a NLB foi 155,4 a 180,6 nm e de 151,8 a 161,0 nm para a NLV, armazenadas ao abrigo de luz, a temperatura de 4 °C durante 90 dias. A incorporação do voriconazol diminuiu a variação do tamanho médio das partículas e as formulações mantiveram seus tamanhos de partículas inferiores a 200 nm por 90 dias.

Os valores de Pdi encontrados foram de 0,087 a 0,122 para a NLB e de 0,096 a 0,119 para a NLV, indicando boa homogeneidade entre o tamanho das partículas já que os valores se aproximam de 0 (Tabela 3). O potencial zeta apresentou valores negativos em 90 dias de -5,2 a -8,0 para a NLB e -6,7 a -12,4 para a NLV.

Tabela 3 - Características físico-químicas das nanoemulsões lipídicas sem e com voriconazol.

Formulação	Dias	Tamanho Médio de Partícula (nm) ± DP	PDI ± DP	Potencial Zeta (mV) ± DP
Nanoemulsão branca	1	155,4 ± 3,4	0,109 ± 0,056	- 7,3 ± 6,6
	2	164,0 ± 9,6	0,108 ± 0,042	- 7,6 ± 4,8
	6	165,6 ± 9,4	0,118 ± 0,037	- 6,1 ± 0,9
	16	157,9 ± 4,9	0,088 ± 0,058	- 5,2 ± 1,1
	22	166,2 ± 10,8	0,104 ± 0,047	- 6,5 ± 1,0
	30	159,1 ± 4,5	0,087 ± 0,005	-6,7 ± 1,4
	38	159,0 ± 5,6	0,114 ± 0,047	- 5,8 ± 0,5
	45	180,6 ± 2,6	0,119 ± 0,045	- 8,0 ± 2,8
	60	163,5 ± 7,5	0,119 ± 0,041	- 6,0 ± 2,4
	75	166,2 ± 10,5	0,114 ± 0,083	- 5,8 ± 0,0
	90	165,6 ± 6,9	0,122 ± 0,020	- 6,6 ± 3,3
Nanoemulsão contendo voriconazol	1	159,3 ± 0,4	0,109 ± 0,024	- 8,0 ± 4,3
	2	155,9 ± 5,1	0,119 ± 0,029	- 6,7 ± 2,3
	6	158,4 ± 3,8	0,112 ± 0,002	- 10,4 ± 3,1
	16	151,8 ± 8,5	0,106 ± 0,005	- 7,1 ± 3,1
	22	158,5 ± 1,2	0,099 ± 0,023	- 9,0 ± 1,0
	30	160,4 ± 1,6	0,102 ± 0,012	- 9,7 ± 4,2
	38	157,5 ± 2,6	0,102 ± 0,005	- 10,3 ± 3,2
	45	152,4 ± 9,2	0,103 ± 0,018	- 10,5 ± 2,6
	60	161,0 ± 7,7	0,108 ± 0,015	- 12,4 ± 1,7
	75	153,8 ± 3,9	0,100 ± 0,053	-11,8 ± 0,8
90	156,3 ± 0,0	0,108 ± 0,008	- 12,2 ± 3,5	

Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP), N=3. Pdi – índice de polidispersão Fonte: Própria autora.

Ao longo de 90 dias de armazenamento das formulações NLB e NLV, observou-se que os valores de pH das mesmas permaneceram entre 6,8 a 7,0 para ambas as formulações (Tabela 4).

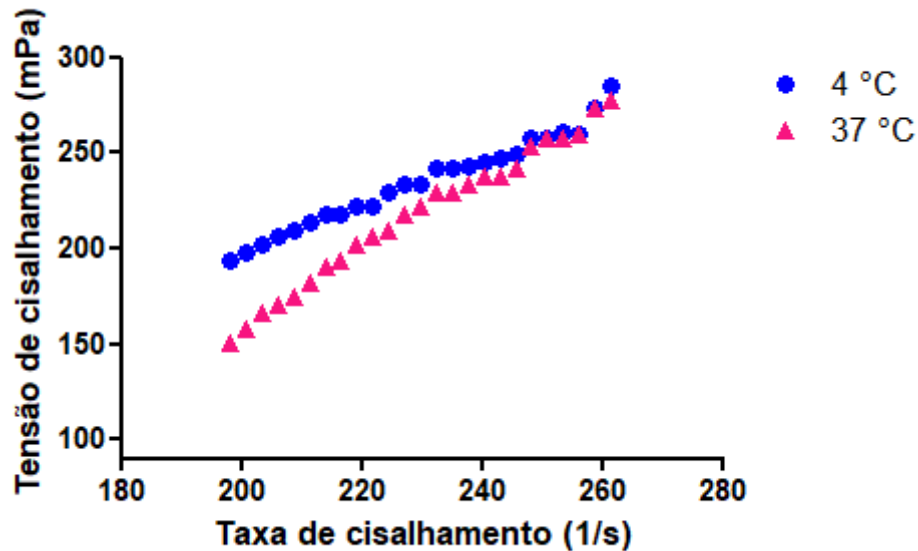
Tabela 4 – Determinação do pH das formulações de nanoemulsão lipídica sem e com voriconazol a 4°C durante 90 dias de armazenamento.

Dias	Nanoemulsão branca (pH)	Nanoemulsão com voriconazol (pH)
1	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,0
6	7,0 ± 0,0	7,0 ± 0,1
16	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,0
22	7,0 ± 0,1	6,9 ± 0,1
30	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,0
38	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,0
45	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,2
60	7,0 ± 0,2	6,9 ± 0,2
75	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,0
90	6,8 ± 0,0	7,0 ± 0,0

Resultados expressos em média ± desvio padrão, N=3. Fonte: Própria autora.

Sabe-se que a viscosidade é uma propriedade física caracterizada pela resistência de um fluido, ao seu próprio escoamento (JÚNIOR et al., 2003; BORRIN, 2015). As nanoemulsões preparadas neste trabalho demonstraram-se fluídas, em que a NLV apresentou valores de 1,02 cP a temperatura de 4 °C (temperatura de armazenamento) e de 0,96 cP a 37 °C (temperatura do corpo humano). A Figura 8 mostra que, em ambas as temperaturas, a NLV apresenta um comportamento newtoniano, ou seja, a viscosidade não sofre variações significativas quando se aplicam diferentes tensões de cisalhamento.

Figura 8 – Viscosidade da nanoemulsão em diferentes temperaturas em função da taxa de cisalhamento.

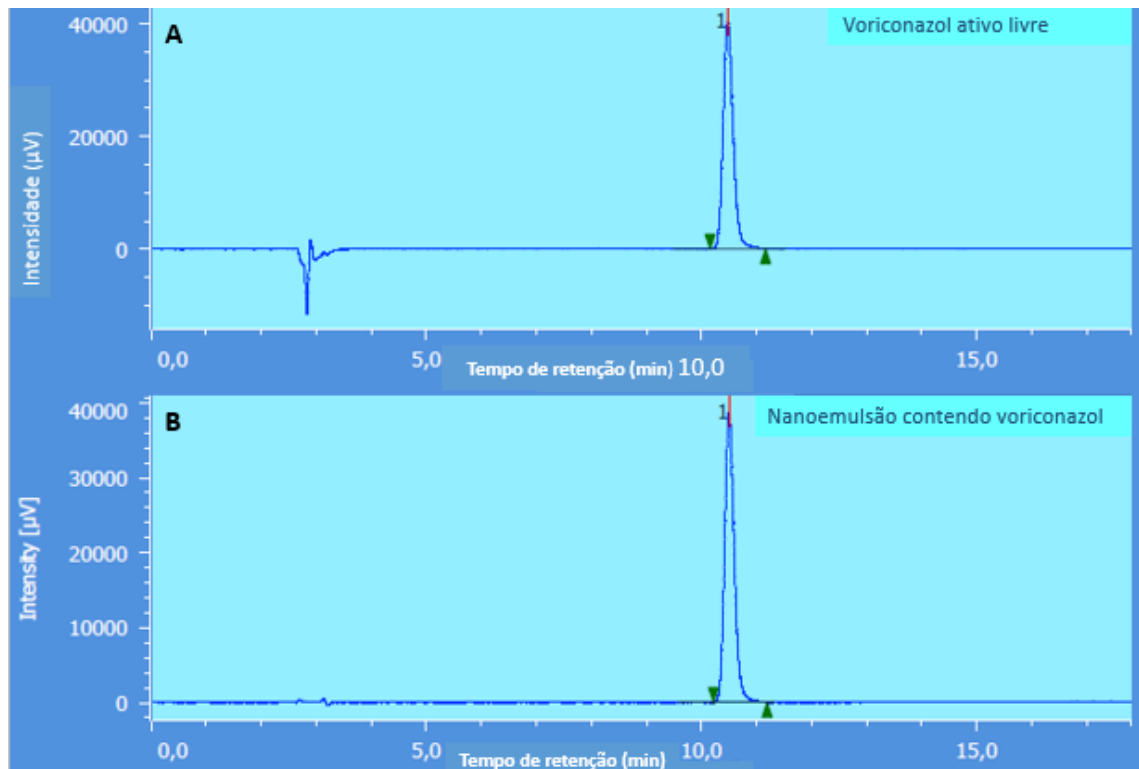


Fonte: Própria autora.

5.1.1 Eficiência de encapsulação do voriconazol

A Figura 9 mostra um cromatograma típico do voriconazol, bem como o espectro de UV do fármaco. Os dados encontrados através dos cromatogramas (Tabela 5), como área do pico e tempo de retenção, foram utilizados para calcular a massa real do fármaco incorporado na formulação (KHARE et al., 2016), na qual o tempo de retenção caracteriza a liberação do voriconazol em tempo médio já descrito na literatura (TANG 2013, CURTI et al., 2017). O percentual correspondente a eficiência de encapsulação do voriconazol foi de $91,50 \pm 0,03\%$, obtida através da Equação 1.

Figura 9 – Cromatogramas obtidos dos ensaios das nanoemulsões contendo voriconazol.



Os picos referem-se ao fármaco voriconazol em comprimento de onda de 256 nm A) voriconazol livre (ativo de referência) e B) NLV. Fonte: Própria autoria.

Tabela 5 – Área do pico e tempo de retenção das nanoemulsões contendo voriconazol

	Concentração	Área do pico ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Tempo de retenção (min)
Nanoemulsão contendo voriconazol	0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	467379	10,500
	0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	467409	10,503
	0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	467090	10,500

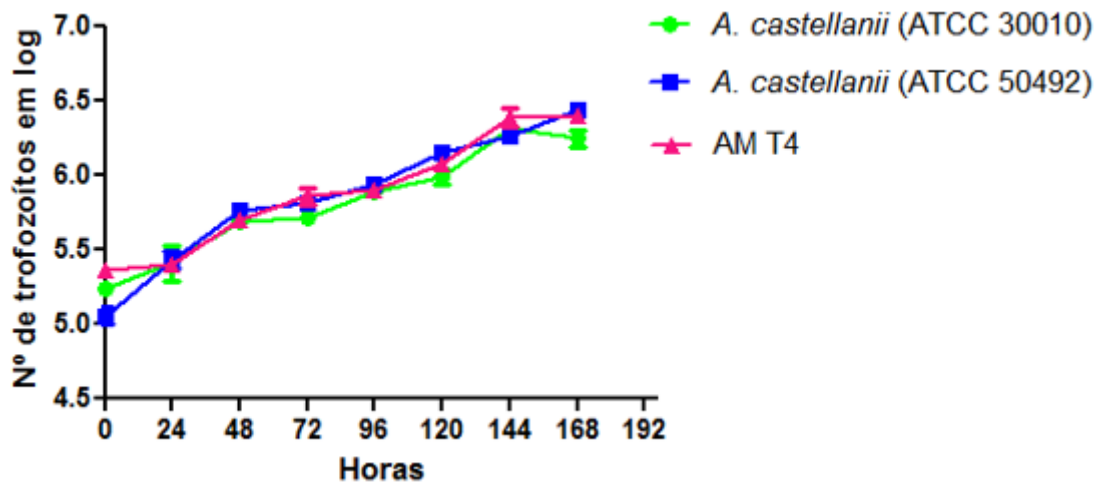
Fonte: Própria autoria.

5.2 DETERMINAÇÃO DE PERÍODO EXPERIMENTAL DE *Acanthamoeba* spp.

As curvas de crescimento geradas para as cepas de *A. castellanii* Neff (ATCC30010), *A. castellanii* T4 (ATCC50492) e o isolado clínico AM T4 caracterizado no LAPEO,

mostraram-se próximas a um platô após 144 horas de incubação (Figura 10), com exceção da cepa *A. castellanii* T4 (ATCC50492) que continuou demonstrando crescimento. Assim os experimentos realizados com as cepas ocorreram sempre após 72 horas de incubação. A taxa de velocidade média de crescimento foi calculada para cada cepa utilizada e está representada na Tabela 6.

Figura 10 – Curvas de crescimento.



Fonte: Própria autora.

Tabela 6- Taxa média de crescimento de culturas de *Acanthamoeba* spp. com inóculo de 1×10^5 trofozoítos/mL.

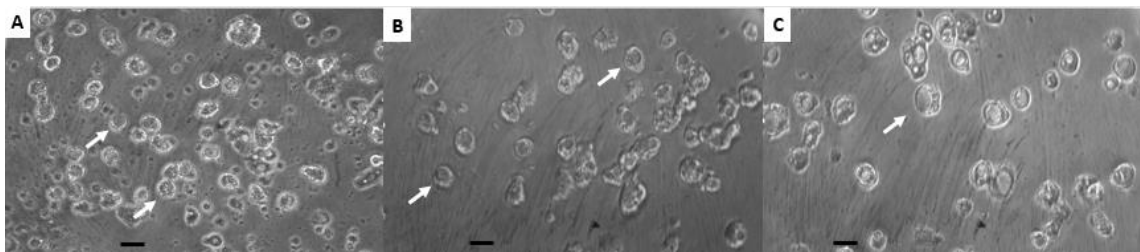
Cepas <i>Acanthamoeba</i> spp.	Taxa de crescimento (gerações/h)
Neff (ATCC30010)	0,026
T4 (ATCC50492)	0,025
Isolado clínico AM T4	0,027

Fonte: Própria autora.

5.2.1 Avaliação da atividade amebicida do voriconazol frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

O estudo da viabilidade de trofozoítos de duas cepas de *A. castellanii* e um isolado clínico regional foi realizado para avaliar o perfil das acantamoebas frente a diferentes concentrações de voriconazol. Em um primeiro momento, realizou-se a observação dos trofozoítos tratados no período de 6, 12, 24 e 48 h. No período de 6 e 12 horas, observou-se que ocorreu o arredondamento de vários trofozoítos, alguns apresentavam-se vacuolizados e granulosos. O período de 24 e 48 horas foi selecionado para contagem de células viáveis, pois observou-se alteração de membrana, presença de debris celulares e lise celular (Figura 11).

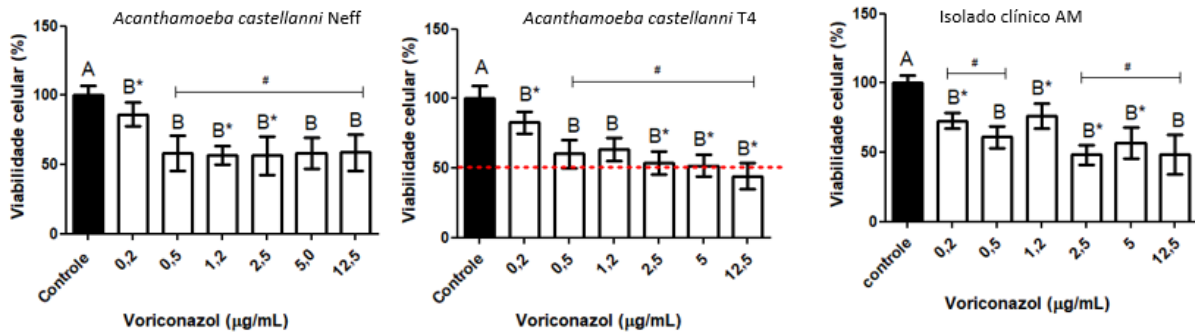
Figura 11 – Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. após tratamento com voriconazol.



Atividade amebicida de voriconazol 0,25 µg/mL, após 24 de tratamento. A) *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC30010), B) *A. castellanii* T4 (ATCC50492) e C) isolado clínico AM T4. A seta representa trofozoitos arredondados, vacuolizados e granulosos. Imagens com aumento de 400x. Barra = 15 µm. Fonte: Própria autora.

A Figura 12 demonstra a porcentagem de viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) e o isolado clínico regional AM T4 frente à faixa de concentração de 0,25 a 12,5 µg/mL de voriconazol no período de exposição de 24 horas. Os resultados demonstram diminuição da viabilidade dos trofozoítos após o tratamento em relação ao controle negativo (DMSO 0,125%), nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL 5,0 µg/mL e 12,5 µg/mL de voriconazol nas cepas *A. castellanii* Neff (ATCC30010) e *A. castellanii* T4 (ATCC 50492). No isolado clínico AM, observou-se diminuição da viabilidade celular significativa nas concentrações de 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 12,5 µg/mL. Além de trofozoítos inviáveis e debris celulares, foram observados trofozoítos arredondados e hipervacuolisados no período analisado, e não observou-se a formação de cistos.

Figura 12 - Atividade amebicida do voriconazol frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. em 24 horas de incubação

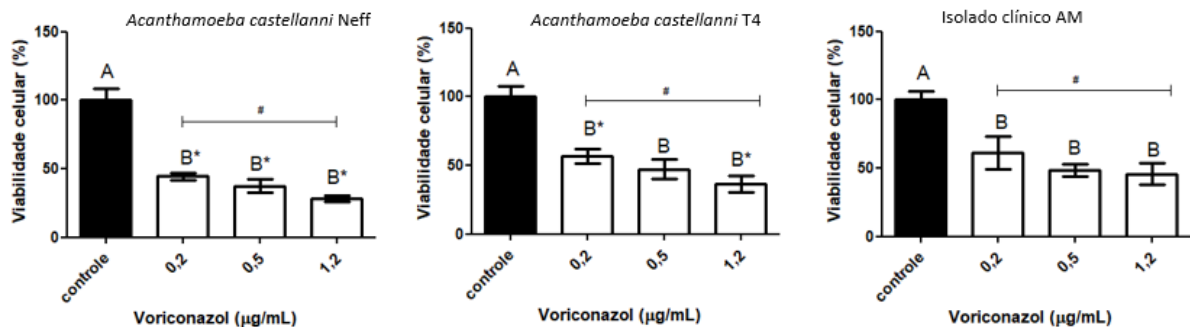


Ensaio de viabilidade das cepas de trofozoítos *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) e o isolado clínico regional AM T4 após incubação de 24 horas com voriconazol. Os resultados correspondem a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. #Valor de $P < 0,05$ comparado com o controle negativo (A) - DMSO 0,125% e B* concentrações testes de voriconazol com $P > 0,05$ comparadas entre si (pós-teste de Kruskal-Wallis). O tracejado indica a CI_{50} calculada através de regressão linear. Fonte: Própria autora.

Os valores de CI_{50} encontrados para *A. castellanii* T4 (ATCC50492) foi de 4,72 $\mu\text{g/mL}$. Para a cepa *A. castellanii* Neff (ATCC30010) e o isolado clínico AM T4 não foi possível calcular a CI_{50} no período de 24 horas de exposição ao fármaco.

A partir dos dados obtidos de 24 horas de incubação, três concentrações foram selecionadas para avaliação da viabilidade em 48 horas. A Figura 13 demonstra a porcentagem de viabilidade de trofozoítos frente às concentrações de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,50 $\mu\text{g/mL}$ e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ no período de exposição de 48 horas. As cepas de *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) mostraram viabilidade média de $44,4 \pm 2,6\%$, $37,6 \pm 4,7\%$ e $28,4 \pm 2,3\%$. Já o perfil de viabilidade média de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) foi de $56,8 \pm 5,7\%$, $47,1 \pm 5,3\%$ e $36,8 \pm 5,7\%$. No isolado clínico regional AM T4, os valores de viabilidade média foram de $61,2 \pm 9,3\%$, $48,6 \pm 8,1\%$ e $45,7 \pm 8,0\%$. Os resultados demonstram menor viabilidade média dos trofozoítos após o período de incubação em relação ao controle negativo entre todas as concentrações das cepas e isolado. Novamente, foram observados trofozoítos arredondados e hipervacuolisados no período analisado, sem a formação de cistos.

Figura 13 - Atividade amebicida do voriconazol frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. em 48 horas de incubação.



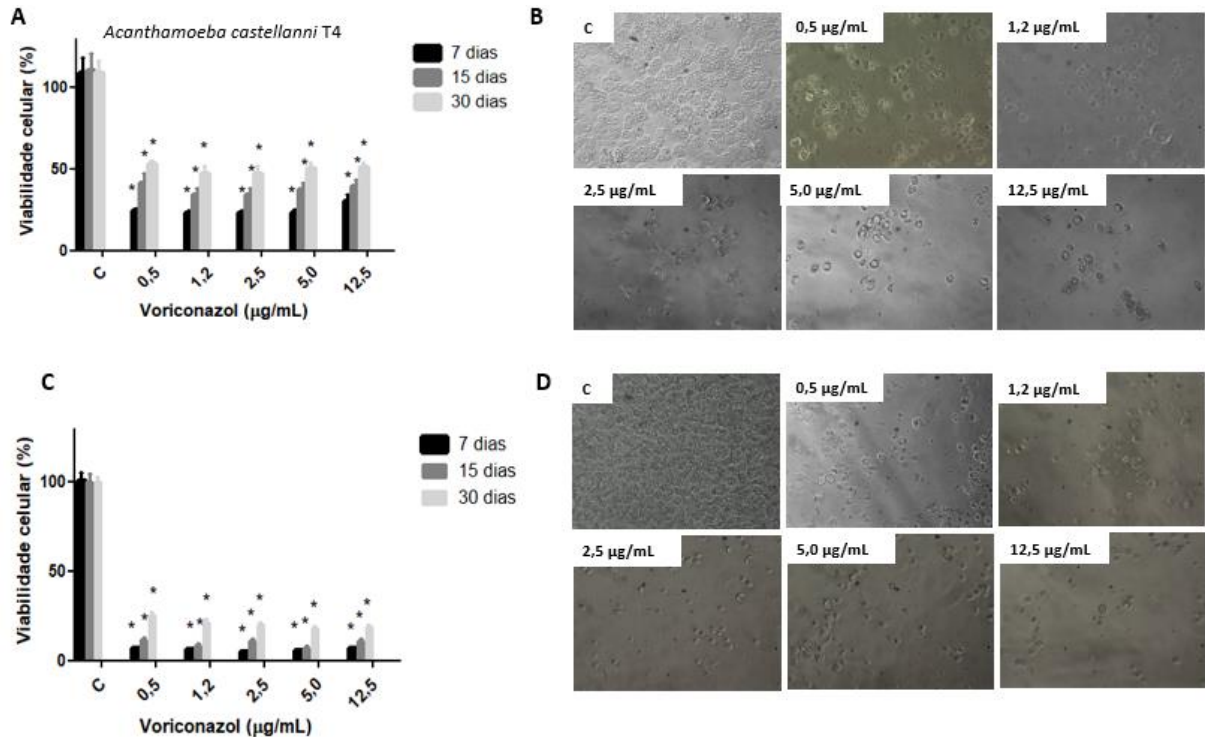
Ensaios de viabilidade das cepas de trofozoítos *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) e o isolado clínico regional AM T4, após incubação de 48 horas com voriconazol. Os resultados correspondem a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. #Valor de $P < 0,05$ comparado com o controle negativo (A) - DMSO 0,125% e B* concentrações testes de voriconazol com $P > 0,05$ comparadas entre si (pós-teste de Kruskal-Wallis). Fonte: Própria autora.

5.2.2 Avaliação da atividade amebicida do voriconazol livre frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* ao longo de trinta dias de armazenamento

Este estudo da viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) foi realizado com o objetivo de avaliar se o perfil de atividade do voriconazol livre mantido a 4°C, ao abrigo da luz, permaneceria estável ao longo de trinta dias de armazenamento.

A Figura 14A demonstra a porcentagem de viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) após a 48 horas de exposição a 0,5, 1,25, 2,5, 5,0 e 12,5 µg/mL de voriconazol em diferentes tempos de armazenamento (7, 15 e 30 dias). Os resultados demonstram diminuição significativa da viabilidade dos trofozoítos após o tratamento em relação ao controle negativo (DMSO 0,125%) em todos os tempos de armazenamento. Em sete dias, os valores de viabilidade variaram entre $22,5 \pm 4,5$ e $29,8 \pm 2,8\%$, em quinze dias a viabilidade foi de $33,7 \pm 4,5$ a $40 \pm 4,5\%$, e em trinta dias o valores ficaram entre $46,8 \pm 2,8$ e $52,4 \pm 4,3\%$. Nas microfotografias, observa-se a diminuição da densidade dos trofozoítos, debris celulares, trofozoítos arredondados e hipervacuolisados, sem formação de cistos (Figura 14B).

Figura 14 – Avaliação da estabilidade da atividade biológica de voriconazol livre frente à trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* T4.



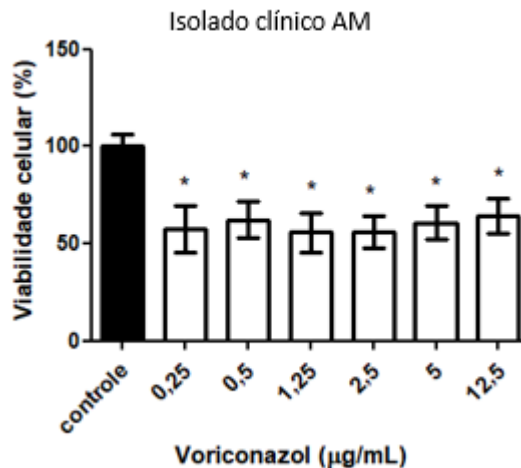
Ensaio de viabilidade da cepa de trofozoítos *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) após incubação de 48 horas (A e B) e 72 horas (C e D) com voriconazol livre armazenado por 7, 15 e 30 dias. As micrografias (B e D) demonstram a diminuição da viabilidade frente a diferentes concentrações de voriconazol. Os resultados correspondem a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. *Valor de $P < 0,05$ comparado com o controle negativo (pós-teste de Kruskal-Wallis). Imagens com aumento de 200x. Fonte: Própria autora.

A Figura 14C demonstra a porcentagem de viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) frente às mesmas concentração e condições de armazenamento de voriconazol, no entanto, os experimentos foram realizados com 72 horas de incubação. Os resultados demonstram menor viabilidade dos trofozoítos após o período de incubação em relação ao controle negativo entre todos os tempos, e o comportamento da perda da atividade do voriconazol manteve-se o mesmo, em que obteve-se valores de viabilidade variando entre $4,2 \pm 1,7$ e $6,5 \pm 1,2\%$ em sete dias após o preparo da formulação, $6,8 \pm 1,5$ a $11,2 \pm 1,3\%$ em quinze dias após o preparo da NLV e de $17,8 \pm 1,6$ a $25,0 \pm 2,2\%$ após trinta dias.

5.2.3 Atividade amebicida do voriconazol livre frente aos cistos de *Acanthamoeba* spp.

A atividade cisticida de voriconazol livre foi avaliada frente a cistos do isolado clínico AM T4 nas concentrações de 0,25 - 12,5 µg/mL no período de 24 horas. A Figura 15 demonstra a porcentagem de viabilidade de cistos em comparação ao controle negativo (DMSO 0,125%). As viabilidades médias obtidas demonstram a atuação do voriconazol frente aos cistos do isolado clínico regional AM em relação ao controle negativo em todas as concentrações testes com valores de $57,3 \pm 11,3$, $62,2 \pm 9,4$, $55,6 \pm 10,1$, $55,8 \pm 8,2$, $60,7 \pm 8,8$ e $64,3 \pm 9,2\%$ respectivamente, demonstrando um platô na atividade do fármaco em relação aos cistos ($p \leq 0,05$).

Figura 15 – Avaliação da atividade cisticida do voriconazol frente a *Acanthamoeba* spp.



Ensaio de viabilidade de cistos do isolado clínico regional AM T4 de *Acanthamoeba* spp., após 24 h de incubação com voriconazol livre. Os resultados correspondem à média ± erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. *Valor de $P < 0,05$ comparados com o controle negativo - DMSO 0,125% (teste de Kruskal-Wallis). Fonte: Própria autora.

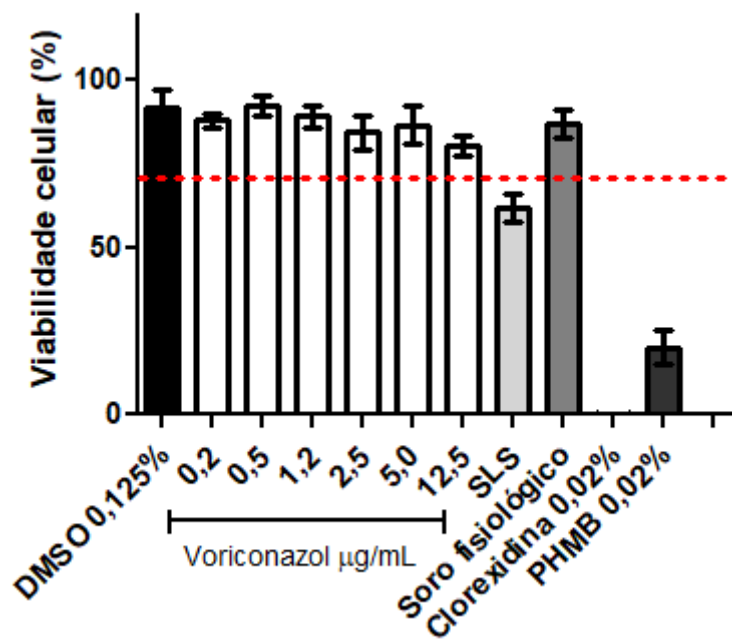
5.3 AVALIAÇÃO DA IRRITAÇÃO OCULAR CAUSADA PELO CONTATO DO VORICONAZOL COM AS CÉLULAS SIRC PELO MÉTODO *SHORT TIME EXPOSURE (STE) IN VITRO TEST METHOD* (OECD 491)

O objetivo deste teste foi observar se o voriconazol nas concentrações testes induziria a algum dano ou irritação ocular definidos pelo UN GHS (*United Nations Globally*

Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals). O teste foi adaptado devido à dificuldade de solubilidade do voriconazol.

Os resultados demonstrados na Figura 16 mostram que a exposição ao voriconazol gerou viabilidade celular superior a 70%, mesmo havendo diminuição significativa de viabilidade em três concentrações de voriconazol – 0,025, 5,0 e 12,5 µg/mL – em relação ao controle negativo, o que de acordo com a Tabela 2, faz com que o voriconazol permaneça fora de alguma categoria de classe irritativa ou causador de danos teciduais graves.

Figura 16 – Viabilidade das células SIRC pelo método STE n°491.



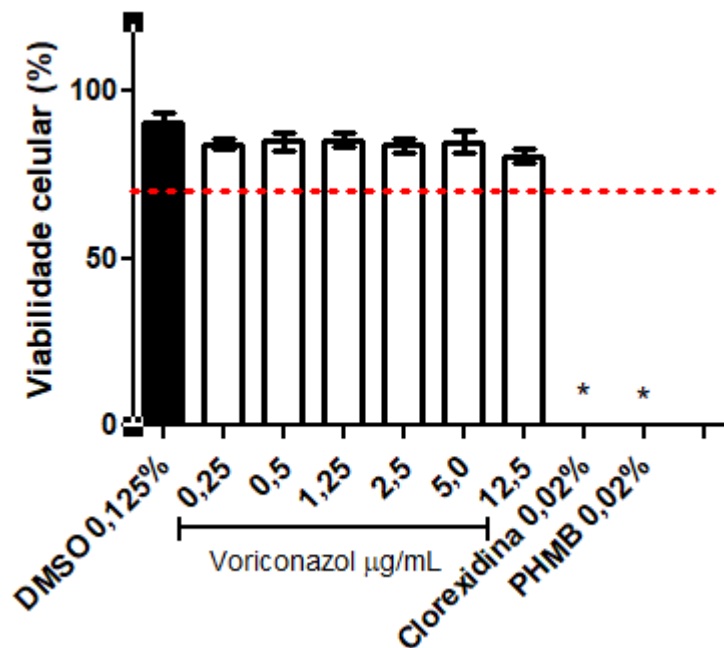
Ensaio de irritação ocular causada pelo contato do voriconazol com células SIRC (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*) (ATCC® – CCL 60) em curta exposição de tempo. Os resultados correspondem a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. O tracejado indica viabilidade de 70% das células SIRC. *Valor de $P < 0,05$, comparados com o DMSO 0,125%.

5.3.1 Avaliação da citotoxicidade de voriconazol frente a células SIRC

A citotoxicidade do voriconazol foi avaliada frente à linhagem SIRC após 24 horas de exposição na faixa de concentração de 0,25 a 12,5 µg/mL (Figura 17). Observou-se viabilidade celular acima de 74% (Figura 17). Nas menores concentrações de voriconazol testadas - 0,25, 0,50, 1,25 µg/mL - a viabilidade média (%) encontrada foi de $85,35 \pm 3,07$, $85,15 \pm 2,70$ e $89,27 \pm 2,44$ respectivamente. Em 2,5 µg/mL, obteve-se viabilidade média (%) de $81,65 \pm 2,86$. Já nas maiores concentrações – 5,0 e 12,5 µg/mL – a viabilidade média (%) foi de $79,71 \pm 5,03$ e $74,33 \pm 1,41$, respectivamente. O controle negativo de DMSO 0,125%

demonstrou-se pouco tóxico às células SIRC, com viabilidade (%) de $90,69 \pm 0,60$. Já as biguanidas utilizadas como controle positivos, Clorexidina 0,02% e PHMB 0,02%, promoveram 100% de morte celular.

Figura 17 – Viabilidade celular da SIRC após tratamento com voriconazol.



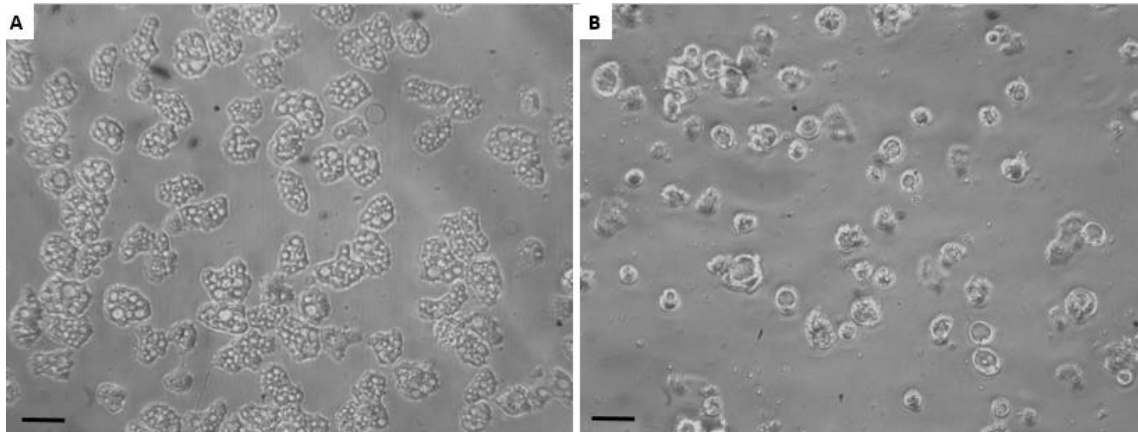
Ensaio de citotoxicidade com células SIRC (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*) (ATCC® – CCL 60) em exposição ao voriconazol por 24 horas, seguido da adição de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 0,5 mg/mL. Os resultados correspondem a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes em triplicata. *Valor de $P < 0,05$, comparados com o controle negativo - DMSO 0,125% (pós-teste de Kruskal-Wallis). A linha tracejada indica viabilidade de 70%. Fonte: Própria autora.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMEBIANA DA NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO VORICONAZOL FRENTE A TROFOZOÍTOS DE *Acanthamoeba castellanii*

Neste estudo da viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), o objetivo foi avaliar o perfil das acantamebas frente a NLV na concentração de 12,5 µg/mL e também observar se a nanoemulsão manteria a atividade antiamebiana do voriconazol estável ao longo de 90 dias de armazenamento a 4 °C, ao abrigo da luz. Primeiramente fez-se a observação dos trofozoítos tratados em 24 e 48 horas, em que observou-se que ocorreu o arredondamento de vários trofozoítos, alguns apresentavam-se vacuolizados e granuloso (Figura 18), porém alterações nas membrana, presença de debris celulares e lise celular foram

observadas apenas a partir do período de 48 horas. O período de 48 horas para contagem de células viáveis foi assim selecionado.

Figura 18 – Trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após tratamento com a nanoemulsão lipídica contendo voriconazol.

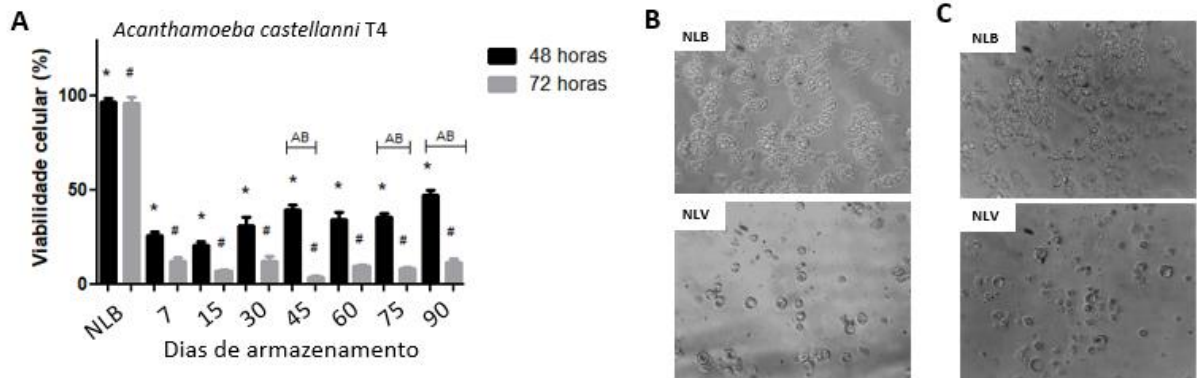


Trofozoítos da cepa de *Acanthamoeba castellanii* T4 após 24 horas de tratamento com A) nanoemulsão lipídica branca observa-se trofozoítos com morfologia normal, com presença de acantopódios, vacuolizações e nucléolo evidente; B) nanoemulsão lipídica contendo voriconazol (12,5 µg/mL), observa-se, arredondamento de vários trofozoítos, alguns apresentam-se vacuolizados e granulosos. Imagens com aumento de 200x. Barra = 30 µm.

Fonte: Própria autora.

A Figura 19A demonstra a porcentagem de viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) em 48 horas de exposição a 12,5 µg/mL de voriconazol encapsulado com diferentes tempos de armazenamento (sete dias – $26 \pm 1,7\%$ de viabilidade, quinze dias – $20,9 \pm 1,4\%$ de viabilidade, trinta dias – $30,7 \pm 4,5\%$ de viabilidade, quarenta e cinco dias – $39,5 \pm 2,4\%$ de viabilidade, sessenta dias – $33,9 \pm 4,1\%$ de viabilidade, setenta e cinco dias – $37,7 \pm 2,0\%$ de viabilidade e noventa dias – $47,1 \pm 2,9\%$ de viabilidade). Os resultados demonstram diminuição significativa da viabilidade dos trofozoítos após o tratamento em relação ao controle negativo (NLB) em todos os tempos de armazenamento. Não houve diferença de viabilidade significativa entre a nanoemulsão de 7 dias com relação as demais, constatando-se a estabilidade do fármaco encapsulado. Em se tratando de 48 horas de incubação, além de trofozoítos inviáveis e debris celulares, foram observados trofozoítos arredondados e hipervacuolisados no período analisado, e não foram observados cistos (Figura 19B).

Figura 19 – Avaliação da atividade amebicida da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol frente a trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* após 48 e 72 horas de tratamento.



A) Ensaios de viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) após 48 e 72 horas de incubação com NLV na concentração de 12,5 µg/mL em diferentes tempos de armazenamento, com relação a NLB - controle negativo nanoemulsão lipídica branca. B e C correspondem a 48 e 72 horas de incubação, respectivamente. No qual, as imagens demonstram trofozoítos normais quando expostos a NLB e após exposição a NLV, os trofozoítos apresentaram-se arredondados, com vacualizações, granulos e diminuição da densidade de trofozoítos. Os resultados correspondem a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. * e # valor de $P < 0,05$ comparado com o seu respectivo controle negativo (pós-teste de Kruskal-Wallis). AB indicam valor de $P < 0,05$ quando comparados entre si. Imagens com aumento de 200x. Fonte: Própria autora

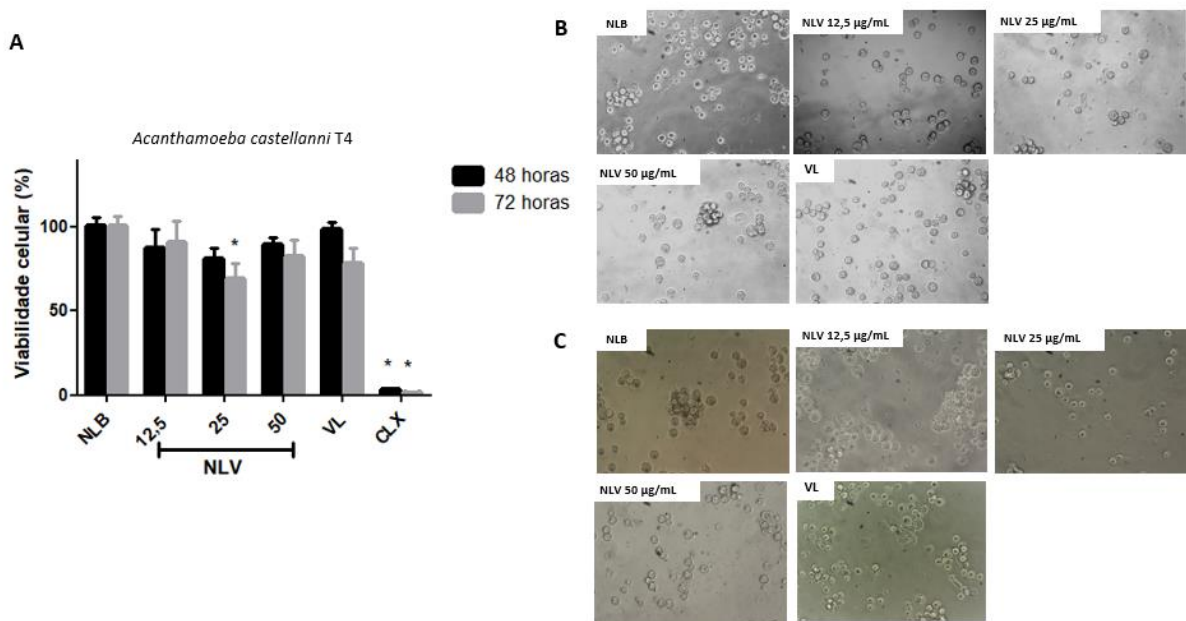
A partir da análise dos dados obtidos após 48 horas de incubação, constatou-se a necessidade de analisar a atividade antiamebiana das formulações por 72 horas, a fim de observar se a atividade foi tempo dependente de acordo com o perfil de liberação da nanoemulsão estudada e a atividade do fármaco. A Figura 19A demonstra a porcentagem de viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) frente à concentração de 12,5 µg/mL de NLV no período de exposição de 72 horas com diferentes tempos de armazenamento (sete dias - $12,6 \pm 2,2\%$ de viabilidade, quinze dias - $7 \pm 0,6\%$ de viabilidade, trinta dias - $12 \pm 2,8\%$ de viabilidade, quarenta e cinco dias - $3,5 \pm 0,9\%$ de viabilidade, sessenta dias - $9,4 \pm 0,8\%$ de viabilidade, setenta e cinco dias - $8,2 \pm 0,8\%$ de viabilidade e noventa dias - $11,7 \pm 1,9\%$ de viabilidade). Os resultados demonstraram menor viabilidade dos trofozoítos após o período de incubação em relação ao controle negativo entre todos os tempos, ou seja, houve diminuição significativa da viabilidade tanto na formulação preparada a sete dias quanto na formulação preparada a noventa dias em relação a NLB. Não houve diferença significativa da viabilidade dos trofozoítos quando comparando os diferentes tempos de armazenamento em relação a nanoemulsão de sete dias de armazenamento, o que

demonstra estabilidade da atividade biológica do voriconazol. No entanto, quando comparados os resultados com as viabilidades obtidas em 48 horas, nota-se diferença significativa entre os períodos de incubação de 45, 75 e 90 dias. Na Figura 19C novamente observa-se trofozoítos arredondados e hipervacuolisados, sem a formação de cistos.

5.4.1 Avaliação da atividade cisticida da nanoemulsão lipídica contendo voriconazol frente a cistos de *Acanthamoeba castellanii*

A atividade cisticida da NLV foi avaliada frente a cistos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) nas concentrações testes de 12,5, 25,0 e 50 $\mu\text{g/mL}$ por 48 e 72 horas. A Figura 20 demonstra a porcentagem de viabilidade de cistos em comparação ao controle negativo (NLB). As viabilidades médias obtidas em 48 horas foram de $86,8 \pm 11,4$, $80,6 \pm 6,3$ e $88,4 \pm 5,2\%$ para 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em 72 horas de incubação a viabilidade foi de $89,8 \pm 19,1$, $80,6 \pm 9,4$ e $88,4 \pm 10,2\%$, para as concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em 72 horas houve diferença significativa da viabilidade apenas na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle NLB.

Figura 20 – Avaliação da atividade cisticida do voriconazol frente a *A. castellanii*.



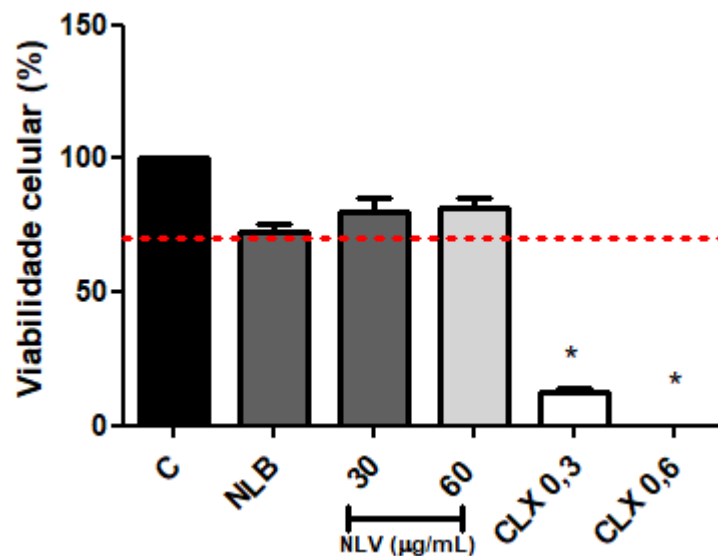
A) Ensaios de avaliação da atividade cisticida de NLV frente a *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), após incubação por 48 e 72 horas. NLB refere-se ao controle negativo e VL ao voriconazol livre na concentração de 4,719 $\mu\text{g/mL}$.

B) Representa o ensaio cisticida de 48 horas e C) refere-se ao ensaio cisticida de 72 horas. Os resultados correspondem a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. *Valor de $P < 0,05$ comparados com o NB (pós-teste de Kruskal-Wallis). Fonte: Própria autora.

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS SIRC FRENTE À NANOEMULSÃO LIPÍDICA CONTENDO VORICONAZOL

Já conhecendo o perfil de baixa toxicidade do voriconazol livre a partir dos resultados obtidos neste trabalho, a citotoxicidade da NLV foi avaliada em concentrações presentes em 1 gota de tratamento, considerando que haja absorção de 10% da formulação aplicada (60 $\mu\text{g/mL}$), ou 5% do volume total da gota aplicada (30 $\mu\text{g/mL}$). Com os controles positivos foi tomado o mesmo cuidado em relações às concentrações testadas, levando-se em consideração a indicação médica da clorexidina – 10% igual a 0,6 $\mu\text{g/mL}$ e 5% igual a 0,3 $\mu\text{g/mL}$. Não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade celular do controle negativo em relação a NLB $68,9 \pm 6,6\%$, e as duas concentrações de NLV– $73,7 \pm 10\%$ e $72,2 \pm 9,4\%$ (Figura 21). No entanto, como já evidenciado, a clorexidina apresentou alto grau de toxicidade frente às células SIRC (Figura 16 e 17).

Figura 21 – Viabilidade celular da SIRC frente à nanoemulsão lipídica.



Ensaio de citotoxicidade com células SIRC (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*) (ATCC® – CCL 60) em exposição a nanoemulsão lipídica contendo voriconazol por 24 horas de incubação seguido da adição de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 0,5 mg/mL. C - corresponde ao controle negativo - DMEM; NLB – nanoemulsão lipídica branca; NLV – nanoemulsão lipídica contendo voriconazol; CLX – clorexidina. Os resultados correspondem a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. *Valor de $P < 0,05$, comparados com o controle negativo (teste de Kruskal-Wallis). A linha tracejada indica viabilidade de 70%. Fonte: Própria autora.

6 DISCUSSÃO

Devido a falta de terapias específicas para o tratamento de ceratite amebiana, associada à alta resistência da forma de vida cística de *Acanthamoeba* spp., estudos de reposicionamento de fármacos ganharam importância nos últimos anos, como o antifúngico triazólico voriconazol, que apresenta atividade antiamebiana, atuando na síntese do ergosterol, ocasionando a má formação da parede celular de *Acanthamoeba* spp. (GREER, 2003; NAKAMINAMI, 2017).

Apesar do voriconazol apresentar amplo espectro de atividade para vários agentes causadores de infecções oculares, não existe nenhuma formulação tópica ocular comercial disponível no mercado, pois este fármaco apresenta baixa estabilidade quando em suspensão (HERALGI et al., 2016). Mesmo sem um consenso da melhor condição de armazenamento e estabilidade do voriconazol, preparações utilizando pó liofilizado para injeção, diluído em água para injeção ou solução lacrimal, apresenta-se como uma prática muito utilizada em ambulatórios oftalmológicos (SEFH, 2017)

Considerando a necessidade de novas terapias para o tratamento da ceratite amebiana, desenvolveu-se neste trabalho uma nanoemulsão rica em lipídios (NLB) de acordo com a característica de hidrofobicidade intermediária do voriconazol (Item 2.3). A incorporação do voriconazol em nanoemulsão lipídica pode ser uma boa estratégia para o uso do voriconazol no tratamento tópico ocular da ceratite amebiana, pois mostra-se adequada para aplicação tópica, pela alta área superficial, como também poderá permitir um sistema de liberação controlado, facilitar a absorção através da membrana celular, além de proteger a molécula da degradação natural quando em suspensão e no meio biológico como demonstrado para o fármaco diclofenaco (CHAUHAN; ROAD, 2018).

Os sistemas nanoemulsionados possuem alta estabilidade termodinâmica, favorecendo a taxa de absorção dos fármacos, proporcionando aumento da solubilidade, com consequente diminuição da toxicidade e irritabilidade (VERMELHO et al., 2018). O tamanho reduzido das gotículas (<20 a 200 nm) impede a floculação e mantém o sistema disperso, além disso, é uma ferramenta eficiente para aumentar a biodisponibilidade e oportunamente proteger contra hidrólise e reduzir a degradação do ativo associado à formulação, consequentemente, aumentando a respectiva potência antimicrobiana e reduzindo a resistência aos medicamentos (ALSHAHRANI, 2019).

Para verificar a homogeneidade das partículas, o Pdi foi acompanhado ao longo de 90 dias. A homogeneidade das partículas das nanoemulsões demonstrou-se bastante uniforme

com valores próximo de zero e mesmo ao longo de 90 dias de armazenamento, com o longo tempo de preparação, não surgiram novas populações de partículas nas formulações NLB e NLV (SOUZA et al., 2012).

Outra propriedade das partículas importante de se analisar é o potencial zeta, já que este reflete a composição das cargas presentes na interface da formulação. De acordo com a literatura valores a cima de 25 mV e abaixo de -25 mV conferem estabilidade ao sistema, enquanto valores próximo de zero indicam que as forças de atração e repulsão excedem, conferindo baixa estabilidade física (LI et al., 2018).

O pH ideal de uma formulação oftalmológica fica em torno de 7,4, mimetizando o pH das lágrimas. No entanto, soluções que contenham pH entre 5,5 a 11,4 são consideradas não causadoras de lesões aos olhos (TEJERA et al., 2005; DUBALD et al., 2018). Os valores de pH analisados durante o período de 90 dias, mativeram-se estáveis, e dentro da faixa preconizada para soluções oftálmicas.

A viscosidade, propriedade física caracterizada pela resistência de um fluido ao seu próprio escoamento, pode ter comportamentos diferentes em um fluido nos olhos, já que o piscar envolve altas taxas de cisalhamento (TIFFANY, 1991; BORRIN, 2015). Neste trabalho, a viscosidade da nanoemulsão lipídica na sua temperatura de acondicionamento de 4 °C foi de 1,02 cP e na temperatura do corpo humano de 37 °C de 0,96 Cp. A NLV foi uma formulação bastante solúvel, em ambas as temperaturas, com comportamento newtoniano, não sofrendo variações significativas quando aplicadas diferentes tensões de cisalhamento (Figura 8).

O percentual correspondente à eficiência de encapsulação do voriconazol foi considerado satisfatório - $91,5 \pm 0,1\%$, conceituando o método de emulsificação através da sonda sonicadora eficaz, principalmente pela capacidade do método em formar partículas de tamanhos reduzidos, se comparado a outras técnicas (KHARE et al., 2016).

Após o desenvolvimento da nanoemulsão, o presente trabalho investigou a atividade amebicida do fármaco voriconazol com $\geq 98\%$ de pureza. Durante a padronização, foram realizados testes que mostraram evidente atividade amebicida frente a trofozoítos de *Acanthamoeba spp.*. Já em 48 horas de incubação nota-se uma maior atuação do fármaco frente às três cepas do protozoário (Figura 13).

A atividade amebicida *in vitro* do VL foi tempo dependente, pois observou-se que a viabilidade amebiana variou entre 24 e 48 horas de incubação, ocorrendo diminuição da viabilidade quanto maior o tempo de incubação. Isto demonstrou-se de acordo com o mecanismo de ação do fármaco, por inibição da via de síntese do ergosterol também relatado

em alguns estudos. Um estudo de Cabello-Vilches et al. (2014) avaliou a atividade amebicida do voriconazol em comparação com a clorexidina (antisséptico padrão ouro da família das biguanidas). Em 96 horas de tratamento, a CI50 encontrada para o voriconazol para as cepas de *Acanthamoeba* spp. genótipo T4 foram de $2,72 \pm 0,14$, $1,29 \pm 0,03$, $0,89 \pm 0,11$ e $\leq 0,74$ $\mu\text{g/mL}$, concentrações inferiores as CI50 encontradas para a clorexidina. Portanto, neste estudo o voriconazol foi selecionado como primeira linha de tratamento frente às cepas utilizadas. Outro estudo fez a comparação da atividade amebicida entre alguns agentes triazólicos e traz resultados positivos a respeito do voriconazol, em que após 48 horas de incubação das cepas de *Acanthamoeba polyphaga* e *Acanthamoeba castellanii*, foi encontrado o valor de concentração mínima inibitória (CIM) de 1 a 2 mg/L, confirmando a efetiva inibição da ploriferação dos trofozoítos (LAMB et al., 2015).

Outros testes de atividade com o fármaco VL foram realizados com o objetivo de analisar se a solução armazenada ao longo de 30 dias (7, 15 e 30 dias) em temperatura de $\pm 4^\circ\text{C}$, ao abrigo da luz, manteve seu perfil de atividade constante, como demonstrado por meio do percentual de viabilidade na Figuras 14A e C. O VL permaneceu ativo ao longo de 30 dias de armazenamento, porém observou-se aumento da viabilidade dos trofozoítos quanto maior o tempo de armazenamento do voriconazol a 4°C , ao abrigo da luz. Houve perda da estabilidade ao longo do período analisado, demonstrado através do aumento da viabilidade dos trofozoítos, porém faz-se necessário estudos ampliando a faixa de tempo de avaliação da estabilidade biológica do VL frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

Alguns estudos com voriconazol demonstram dados sobre sua estabilidade (TEJERA, 2005; BARDIN et al., 2011; AMÓROS-REBOREDO et al., 2015; CURTI et al., 2017). A pesquisa de Tejera et al. (2005) demonstrou que voriconazol solubilizado em água para injeção/NaCl 0,9%/solução estéril para irrigação e armazenado a $22-24^\circ\text{C}$ e $2-8^\circ\text{C}$ de temperaturas, apresentou estabilidade das características físico-químicas entre as temperaturas avaliadas das formulações durante 30 dias de armazenamento. No entanto, as soluções tiveram perda de atividade biológica após três semanas de preparação. Um outro estudo de Amoros-Reboreo et al. (2005), relatou que mesmo após 90 dias da solução de voriconazol 1% acondicionada a -20°C , a solução manteve sua atividade biológica.

Testes de avaliação da atividade antiamebiana utilizando cistos de *Acanthamoeba* spp. do isolado clínico regional AM T4 foram realizados no presente estudo e, apesar de pouco tempo de incubação e das baixas concentrações testadas, observou-se redução significativa do número de cistos, porém com atividade cística do voriconazol limitada (Figura 15). O resultado observado deve-se a baixa atividade metabólica do cisto, que encontra-se em estado

de latência, pois o voriconazol não apresenta ação direta sobre as membranas e parede celular do protozoário, mas atua na inibição da síntese do ergosterol na fase ativa de formação de membranas do trofozoíto e parede do cisto (THOMSON et al., 2017).

A indução da morte celular programada em parasitos é uma alternativa explorável para encontrar moléculas que induzam a apoptose ao invés da necrose, uma vez que células necróticas aumentam a resposta inflamatória no tecido corneano do hospedeiro. O estudo de Martín-Navarro et al. (2015) teve como objetivo avaliar em qual via de indução de morte celular o voriconazol se enquadrava frente a *A. castellanii*, e puderam concluir que o voriconazol promove a morte celular das acantamoebas por mecanismos não necróticos, tornando-o um fármaco promissor no combate da ceratite amebiana.

Estudos já relatados na literatura avaliaram a atividade amebicida do voriconazol - pó liofilizado para injeção, reconstituído – uso tópico ocular, demonstrando que a terapia é bem tolerada e capaz de tratar agentes infecciosos causadores de ceratite com baixo risco potencial de efeitos adversos (HERALGI et al., 2016; LAU, 2008).

Avaliamos a citotoxicidade do VL pelo teste de corrosão e irritação ocular (STE N°491) de curta exposição de tempo, com contato de apenas cinco minutos das células de córnea com o tratamento. O método simula o tempo de exposição real no processo de aplicação, avaliando assim a presença de possível dano ocular (OECD, 2018). Neste caso, os valores de viabilidade apresentados pelas células SIRC foram superiores a 70% que, de acordo com a Tabela 2, o voriconazol permanece sem categoria, diferente da realidade apresentada pelas biguanidas utilizadas no teste (Figura 16). No teste de citotoxicidade, apesar da exposição de 24h ao tratamento, o resultado demonstrou viabilidade celular superior a 70%, confirmando a baixa toxicidade do fármaco ao tecido corneano, trazendo maior segurança para seguir com novos testes.

Para os ensaios de atividade antiamebiana com a NLV, durante a padronização, observou-se que os testes de viabilidade não poderiam ser realizados em 24 horas de tratamento, já que a nanoemulsão possui liberação controlada do fármaco, e teve como resultado apenas o arredondamento de vários trofozoítos, sendo que alguns apresentavam-se vacuolizados e granuloso (Figura 18). Como o objetivo deste experimento também foi avaliar a estabilidade biológica do voriconazol ao longo de 90 dias de armazenamento, observou-se a capacidade amebicida da formulação na concentração testada (Figura 19A), sem induzir ao encistamento, que apesar de não demonstrar linearidade, propõem uma tendência de estabilidade em relação a sua atividade biológica. Se comparados os resultados obtidos com o voriconazol livre na concentração de 12,5 µg/mL em sete, quinze e trinta dias

de armazenamento, com a mesma concentração da NLV também em sete, quinze e trinta dias de preparo, observa-se melhor atividade do fármaco encapsulado na NLV.

Nos testes de atividade frente aos cistos de *A. castellanii* T4 (ATCC50492), observou-se baixa atividade cisticida da NLV. Os resultados com VL mostraram que o fármaco possui atividade, porém quando incorporado a nanoemulsão lipídica, que apresenta perfil de liberação controlada, novos testes com maior tempo de incubação e ampliação da faixa de concentração são indicados, já que o voriconazol atua na fase ativa da formação das membranas celulares, sem proporcionar ação direta sobre estas e sobre as paredes do protozoário (THOMSON et al., 2017). No entanto, a combinação de fármacos apresenta-se como alternativa para a obtenção de efetiva atividade cisticida, como por exemplo, a combinação do voriconazol (adjuvante) a propamidina ou a CLX, em concentrações menores (TALBOTT et al., 2019).

Nos testes de citotoxicidade da NLV, avaliou-se se a nanoemulsão traria algum tipo de prejuízo para o tecido corneano. Através da Figura 21, observa-se que o fármaco encapsulado não causou diminuição significativa da viabilidade das células SIRC. No entanto, se comparado ao teste com VL, que não houve diminuição da viabilidade superior a 70% tanto em NLB, quanto em NLV. Esse comportamento se dá pela presença dos componentes da formulação. O estudo de Busmann et al. (2020) descreve o agente surfactante como responsável por situação semelhante, em que as partículas com maior presença do agente levam a menor viabilidade celular, o que sugere que as partículas de NLV possuem menor concentração de surfactante por conta da presença do fármaco, diferentemente da formulação de NLB que possui maior concentração de surfactante, com conseqüentemente menor viabilidade.

O voriconazol associado a nanoemulsão lipídica inibiu significativamente a viabilidade de trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC50492) sem levar a formação de cistos, além de manter a baixa toxicidade frente a células de córnea. Sendo assim, a formulação tem potencial para ser utilizada para o tratamento da ceratite amebiana. Devido à obtenção de uma formulação estável, que além de apresentar a vantagem de proporcionar um sistema de liberação controlado, também é um excelente veículo para fármacos pouco solúveis ou insolúveis em meio aquoso, servindo como protótipo para aplicação de outros fármacos tópicos oculares.

7 CONCLUSÕES

- A nanoemulsão lipídica contendo o voriconazol foi estável macroscopicamente, monodispersa, apresentando características físico-químicas estáveis ao longo de 90 dias e adequadas para aplicação tópica ocular;
- O voriconazol livre apresentou atividade antiamebiana frente a trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp.;
- O voriconazol livre apresentou atividade antiamebiana ao longo de trinta dias de armazenamento, porém com diminuição de estabilidade da atividade biológica em quinze e trinta dias, comparada a sete dias de armazenamento;
- O voriconazol livre não apresentou potencial irritativo/corrosivo ou citotóxico frente às células de córnea de coelho;
- O sistema nanoemulsionado manteve a ação amebicida do voriconazol estável ao longo de noventa dias de armazenamento e a atividade amebicida foi dependente do tempo de incubação;
- A nanoemulsão lipídica contendo voriconazol apresentou baixo potencial citotóxico frente às células de córnea de coelho.
- A nanoemulsão contendo voriconazol demonstrou ser um sistema de liberação controlado apropriado para fármacos pouco solúveis ou insolúveis em meio aquoso, tornando-se um protótipo para aplicação de fármacos tópica ocular. E ainda, permaneceu estável ao longo de noventa dias, combinando efeitos amebicida, sem indução do encistamento e baixa citotoxicidade, demonstrando potencial para o tratamento da ceratite amebiana.

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, Andréa Inês Horn. Análise químico-farmacêutica e estudo de estabilidade do voriconazol. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, [s. l.], p. 212, 2007.

AGARWAL, Priyanka; RUPENTHAL, Ilva D. Modern approaches to the ocular delivery of cyclosporine A. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 977–988, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.002>>

AGRAWAL, Ashish Kumar; DAS, Manasmita; JAIN, Sanyog. In situ gel systems as 'smart' carriers for sustained ocular drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 383–402, 2012.

AKHTER, Sohail et al. Improving the topical ocular pharmacokinetics of an immunosuppressant agent with mucoadhesive nanoemulsions: Formulation development, in-vitro and in-vivo studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 148, p. 19–29, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.048>>

AKSOZEK, A. et al. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* Cysts to Physical, Chemical, and Radiological Conditions. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 621–623, 2002.

AL-BADRIYEH, Daoud et al. Prospective open-label study of the administration of two-percent voriconazole eye drops. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 53, n. 7, p. 3153–3155, 2009.

AL KHATEB, Kosai et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 502, n. 1–2, p. 70–79, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.027>>

ALIZADEH, Hassan et al. Role of contact lens wear, bacterial flora, and mannose-induced pathogenic protease in the pathogenesis of amoebic keratitis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 1061–1068, 2005.

ALKHARASHI, Majed; et al. Medical interventions for *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology**, [s. l.], p. 30, 2016.

ALSHAHRANI, Saad M. Preparation, Characterization and in vivo Anti-inflammatory Studies of Ostrich Oil Based Nanoemulsion. **Journal of Oleo Science**, [s. l.], v. 208, n. 3, p. 203–208, 2019.

AMMAR, Hussein O. et al. Nanoemulsion as a Potential Ophthalmic Delivery System for Dorzolamide Hydrochloride. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 808–819, 2009.

AMÓROS-REBOREDO, Patricia et al. Stability of frozen 1% voriconazole ophthalmic solution. **American Society of Health-System Pharmacist**, [s. l.], v. 72, p. 479–482, 2015.

ARNOLD, T. M. et al. Traditional and Emerging Antifungal Therapies. **Proceedings of the American Thoracic Society**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 222–228, 2010.

ANVISA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, 2004.

AUSTIN, Ariana; LIETMAN, Tom; ROSE-NUSSBAUMER, Jennifer. Update on the Management of Infectious Keratitis. **Ophthalmology**, [s. l.], v. 124, n. 11, p. 1678–1689, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5710829/pdf/nihms907759.pdf>>

AZEEM, Adnan et al. Nanocarrier for the Transdermal Delivery of an Antiparkinsonian Drug. **Proceedings of the American Thoracic Society**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1093–1103, 2009.

BARDIN, C. et al. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: A european consensus conference. **European Journal of Hospital Pharmacy**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 278–285, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2011.07.002>>

BENITA, Simon et al. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. **Journal of Drug Delivery**, [s. l.], v. 2012, p. 1–16, 2012.

BERGOLD, A.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: A review. **Visão Acadêmica**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 159–172, 2004.

BHARATHI, M. J; et al. Aetiological diagnosis of microbial keratitis in South India - A study of 1618 cases. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], n. 1, p. 14–15, 2002.

BORRIN, Thais Ribeiro. Nanoemulsões produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para encapsulação de curcumina : parâmetros de produção , estabilidade físico-química e incorporação em sorvete. **Universidade de São Paulo**, [s. l.], p. 114, 2015.

BOURN, William M; JOHNSON, Douglas H;; CAMPBELL, R. Jean. The Ultrastructure of Descemet ' s Membrane. **Arch Ophthalmol**, [s. l.], v. 100, p. 1952–1955, 1982.

BRASILEIRA, Sociedade; LENTES, D. E. Córnea E.; SOBLEC, D. E. Contato. **Úlcera de córnea bacteriana**. [s. l.], v. 63, n. 1, p. 495–498, 2000.

BUCHELE, M.L.C., Wopereis, D.B., Casara, F. et al. Contact lens-related polymicrobial keratitis: *Acanthamoeba* spp. genotype T4 and *Candida albicans*. **Parasitol Res** **117**, 3431–3436 (2018). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00436-018-6037-x>>

BUCHELE, Maria Luiza Carneiro. Sistema de Geleificação in situ Termorreversível de Superagregados de Anfotericina B para o Tratamento da Ceratite Amebiana. **Universidade Federal de Santa Catarina**, [s. l.], p. 122, 2017.

BUSMANN, Eike Folker et al. Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, [s. l.], p. 213–224, 2020.

CALIXTO, P. H. M. et al. Aspectos Biológicos das Principais Amebas de Vida-Livre de Importância Médica. **Biota Amazônia**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 124–129, 2015.

CARVALHO, F. R. S. et al. Twenty years of *Acanthamoeba* Keratitis. **Clinical Science**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 516–519, 2009.

CASTRILLÓN, Juan C.; OROZCO, Lina P. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. **Sociedad Chilena de Infectología**, [s. l.], p. 147–155, 2013.

CASTRO, Issis Maria Nogueira de; et al. Activity comparison of imidazole and triazole antifungals against *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 216–22, 2016.

CAUMO, K. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [s. l.], v. 103, n. 6, p. 477–485, 2009. Disponível em:
<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/136485909X451825>>

CHAUHAN, Shivali; BATRA, Sunil. Development and In Vitro Characterisation of Nanoemulsion Embedded Thermosensitive In-Situ Ocular Gel of Diclofenac Sodium for Sustained Delivery. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 2301–2314, 2018.

CHAURASIA, Shyam S. et al. Nanomedicine approaches for corneal diseases. **Journal of Functional Biomaterials**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 277–298, 2015.

CLAERHOUT, Ilse et al. Delay in diagnosis and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, [s. l.], v. 242, n. 8, p. 648–653, 2004.

CLARKE, Daniel W.; NIEDERKORN, Jerry Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 175–180, 2006.

COPE, Jennifer R; et al. *Acanthamoeba* Keratitis among Rigid Gas Permeable Contact Lens Wearers, United States, 2005-2011. **Ophthalmology**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 965–982, 2017.

CURTI, C. et al. Stability studies of five anti-infectious eye drops under exhaustive storage conditions. **Pharmazie**, [s. l.], v. 72, p. 741–746, 2017.

DART, John K. G.; SAW, Valerie P. J.; KILVINGTON, Simon. *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. **American Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 148, n. 4, p. 487- 499.e2, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajo.2009.06.009>>

DAULL, Philippe; LALLEMAND, Frédéric; GARRIGUE, Jean-sébastien. Benefits of cetalkonium chloride cationic oil-in-water nanoemulsions for topical ophthalmic drug delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], p. 531–541, 2013.

DUARTE, Maria Cecília Barros. Ceratites Infeciosas: Fatores Associados à Positividade das Culturas. **Universidade Federal do Paraná**, [s. l.], p. 73, 2016..

DUBALD, Marion et al. Ophthalmic drug delivery systems for antibiotherapy- A review. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2018.

DUXFIELD, Linda et al. Ocular delivery systems for topical application of anti-infective agents. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 1–11, 2016.

FILIPPIN, Fabíola Branco; SOUZA, Liliete Canes. Amphotericin B associated with triglyceride-rich nanoemulsion: stability studies and in vitro antifungal activity. **Química Nova**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 591–594, 2008.

FINCO, Alessandra Becker. Avaliação Fisiológica, Morfológica e Caracterização Imunoquímica de *Acanthamoeba* por Anticorpos Policlonais e Monoclonais. **Universidade Federal do Paraná**, [s. l.], 2012.

GARATE, Marco et al. Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 28, p. 29849–29856, 2004.

GARZAS, Martín De Almagro et al. Estabilidad y actividad in vitro de voriconazol en colirio a una concentración de 3 µg/mL. **Farmacia Hospitalaria**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 331–334, 2005.

GREER, Nickie D. Voriconazole: the newest triazole antifungal agent. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 241–8, 2003.

Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278744>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1201014>

GUPTA, Noopur; et al. Burden of Corneal Blindness in India. **Indian Journal of Community Medicine**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 198, 2013.

HARIPRASAD, Seenu M. et al. Determination of Vitreous, Aqueous and Plasma Concentration of Orally Administered Voriconazol in Humans. **Archives of Ophthalmology**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 42–47, 2004.

HERALGI, Mallikarjun M; et al. An Update on Voriconazole in Ophthalmology. **Delta Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 139–150, 2016.

HURT, Michael; NIEDERKORN, Jerry; ALIZADEH, Hassan. Effects of mannose on *Acanthamoeba castellanii* proliferation and cytolytic ability to corneal epithelial cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 3424–3431, 2003.

HUSTON, Christopher D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 23–26, 2004.

JANAGAM, Dileep R.; WU, Linfeng; LOWE, Tao L. Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 122, p. 31–64, 2017. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.04.001>>

- JOHNSON, Leonard B.; KAUFFMAN, Carol A. Voriconazole: A New Triazole Antifungal. **Reviews of Anti-Infective Agents**, [s. l.], v. 34, n. table 2, p. 10–14, 2003.
- JÚNIOR, Armando da S. C. et al. Microemulsions as drug delivery systems for topical ocular administration. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [s. l.], p. 385–391, 2003.
- KALAM, Mohd Abul. Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for topical ocular delivery of dexamethasone. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 89, p. 127–136, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.070>>
- KHAN, Naveed Ahmed. Acanthamoeba: Biology and increasing importance in human health. **Federation of European Microbiological Societies Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006.
- KHARE, Anubha et al. Design and Evaluation of Voriconazole Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Ophthalmic Application. **Journal of Drug Delivery**, [s. l.], v. 2016, 2016.
- KIM, Elma et al. Prospective Comparison of Microbial Culture and Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Corneal Ulcer. **American Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 146, n. 5, 2008.
- KUMAR, Rakesh; SINHA, V. R. Preparation and optimization of voriconazole microemulsion for ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 117, p. 82–88, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.007>>
- LAMB, David C. et al. Azole antifungal agents to treat the human pathogens *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* through inhibition of sterol 14 α -demethylase (CYP51). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 8, p. 4707–4713, 2015.
- LAU, David. Penetration of Voriconazole, 1%, Eyedrops Into Human Aqueous Humor. **Archives of Ophthalmology**, [s. l.], v. 126, n. 3, p. 343, 2008.
- LI, Jinan; et al. Preparation optimization and storage stability of nanoemulsion-based lutein delivery systems. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–39, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02652048.2018.1559245>>
- LLOYD, David. Experimental Parasitology Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 145, p. S20–S27, 2014.
- LORENZO-MORALES, Jacob; KHAN, Naveed A.; WALOCHNIK, Julia. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, [s. l.], v. 22, p. 10, 2015. Disponível em: <<http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2015010>>
- LORENZO-MORALES, Jacob et al. *Acanthamoeba* keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013.

- LORENZO-MORALES, Jacob et al. Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 54, n. 12, p. 5151–5155, 2010.
- LUDWIG, Annick. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 1666–1691, 2005.
- MARCIANO-CABRAL, Francine; CABRAL, Guy. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 273–307, 2003.
- MARTÍN-NAVARRO, Carmen M. et al. Statins and voriconazole induce programmed cell death in *Acanthamoeba castellanii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 2817–2824, 2015.
- MARTÍN-NAVARRO, Carmen María; et al. Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase and Application of Statins as a Novel Effective Therapeutic Approach against *Acanthamoeba* Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 375–381, 2012.
- MARTONE, Gianluca et al. In Vivo Confocal Microscopy and Anterior Segment Optical Coherence Tomography in a Case of Alternaria Keratitis. **Cornea**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 449–453, 2010.
- MAURICE, D. M. The Transparency of the Corneal Stroma. **Vision Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 107–108, 1969.
- MAYCOCK, Nicholas J. R.; JAYASWAL, Rakesh. Update on *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 713–720, 2016. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-201605000-00027>>
- MOGHIMIPOUR, Eskandar; SALIMI, Anayatollah; YOUSEFVAN, Tavakkol. Preparation and evaluation of celecoxib nanoemulsion for ocular drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], n. September, 2017.
- NAKAMINAMI, Hidemasa et al. Evaluation of In Vitro Antiamoebic Activity of Antimicrobial Agents Against Clinical *Acanthamoeba* Isolates. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 629–634, 2017.
- NAKANO, Mariko et al. Ocular cytochrome P450s and transporters: roles in disease and endobiotic and xenobiotic disposition. **Drugs Metabolism Reviews**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 247–260, 2014.
- NEELAM, Sudha; NIEDERKORN, Jerry Y. Pathobiology and immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis: Insights from animal models. **Yale Journal of Biology and Medicine**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 261–268, 2017.
- NEOH, Chin Fen et al. Open-Label Study of Absorption and Clearance of 1% Voriconazole Eye Drops. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 6896–6898, 2016.

NIELSEN, Stine Elkjær; IVARSEN, Anders; HJORTDAL, Jesper. Increasing incidence of *Acanthamoeba* keratitis in a large tertiary ophthalmology department from year 1994 to 2018. **Acta Ophthalmologica**, [s. l.], p. 1–4, 2019.

NIELSEN, E; et al. Fungal Keratitis - Improving Diagnostics by Confocal Microscopy. **Case Reports in Ophthalmology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 303–310, 2013.

NUNES, Thais Esther Teixeira. Interação entre *Acanthamoeba castellanii* e *Fusarium solani*: um possível problema no contexto da ceratite. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, [s. l.], p. 74, 2014.

OECD (2018), Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4, OECD Publishing, Paris. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1787/9789264242432-en>>

OMAHÑA-MOLINA, Maritza et al. *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 873–878, 2016.

PACELLA, Elena et al. Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical Ophthalmology**, [s. l.], v. 2013, n. 7, p. 991–994, 2013.

PASCOLINI, Donatella; MARIOTTI, Silvio Paolo. Global estimates of visual impairment: 2010. **British Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. 614–618, 2012.

REIMONDEZ-TROITIÑO, S. et al. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 95, p. 279–293, 2015.

RUPONEN, Marika; URTTI, Arto. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 96, p. 442–446, 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.032>>

SAEED, Ayman et al. Risk factors, microbiological findings, and clinical outcomes in cases of microbial keratitis admitted to a tertiary referral center in Ireland. **Cornea**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 285–292, 2009.

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

SEAL, DV. *Acanthamoeba* keratitis update F incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. **Nature Scientific Reports**, [s. l.], n. February, p. 893–905, 2003.

SEFH. Voriconazol 10mg/mL colírio 5 mL. **Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria**, [s. l.], p. 5–8, 2017.

SHAH, Kekul B. et al. Activity of voriconazole against corneal isolates of *Scedosporium apiospermum*. **Cornea**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 33–36, 2003.

SIDDIQUI, Ruqaiyyah; KHAN, Naveed Ahmed. Biology and pathogenesis of. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 6, 2012. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/6>>

SMITH, Frank R.; *Acanthamoeba* KORN, Edward D. 7-Dehydrostigmasterol and ergosterol: the major sterols of an amoeba. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 9, p. 405–408, 1968.

SOBOLEWSKA, Bianka et al. Cytotoxic Effect of Voriconazole on Human Corneal Epithelial Cells. **Ophthalmic Research**, [s. l.], p. 41–47, 2015.

SOBRAL, Régia Maria Gondim Ramos. Análise do perfil microbiológico das úlceras de córnea: estudo retrospectivo de 20 anos no hospital das clínicas da faculdade de medicina de ribeirão preto. **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2013.

SOUZA, Patrícia Moraes Sinohara et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 132–137, 2012.

SUN, Xuguang; et al. *Acanthamoeba* keratitis Clinical Characteristics and Management. **Israel Medical Association Journal**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 182–185, 2006.

TALBOTT, Maya et al. Synergy Testing of Antiamoebic Agents for *Acanthamoeba*: Antagonistic Effect of Voriconazole. **Basic Investigation**, [s. l.], v. 00, n. 00, p. 1–5, 2019.

TANG, Peter H. Quantification of Antifungal Drug Voriconazole in Serum and Plasma by HPLC-UV. **Journal of Drug Metabolism and Toxicology**, [s. l.], v. 4, n. 2, 2013.

TEJERA, B. Isla et al. Estabilidad y actividad in vitro de voriconazol en colirio a una concentración de 3 μ g / mL. **Farmacia Hospitalaria**, [s. l.], v. 29, p. 331–334, 2005.

THEBPATIPHAT, Nuthida et al. *Acanthamoeba* keratitis: A parasite on the rise. **Clinical Science**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 701–706, 2007.

THOMSON, Scott et al. Characterisation of sterol biosynthesis and validation of 14 α -demethylase as a drug target in *Acanthamoeba*. **Nature Scientific Reports**, [s. l.], n. June, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07495-z>>

THYLEFORS, B. Epidemiological patterns of ocular trauma. **Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 95–98, 1992.

TIFFANY, John M. The viscosity of human tears. **International ophthalmology**, [s. l.], p. 371–376, 1991.

TRABELSI, H. et al. Pathogenic free-living amoebae : Epidemiology and clinical review: revue e Les amibes libres pathoge. **Pathologie Biologie**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 399–405, 2012.

URTTI, Arto. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 58, n. 11, p. 1131–1135, 2006.

VASCONCELOS, Antônio Alexandre De; MENEZES, Everardo Albuquerque; CUNHA, F. A. Chromogenic Medium for Direct Susceptibility Testing of *Candida* spp. Isolated from Urine. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 125–130, 2011.

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

VISVESVARA, Govinda S. Infections with free-living amoebae. **Neuroparasitology and Tropical Neurology**, [s. l.], v. 114, n. c, p. 153–168, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00010-8>>

VISVESVARA, Govinda S.; MOURA, Hercules; SCHUSTER, Frederick L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **Federation of European Microbiological Societies**, [s. l.], v. 50, p. 1–26, 2007.

WHITCHER, John P.; SRINIVASAN, M.; UPADHYAY, Madan P. Corneal blindness: A global perspective. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 214–221, 2001.

WILLOUGHBY, Colin E. et al. Anatomy and physiology of the human eye: Effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function - a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, [s. l.], v. 38, n. SUPPL. 1, p. 2–11, 2010.

WINCK, Mari Aline Todero; CAUMO, Karin; ROTT, Marilise Brittes. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 464–469, 2011.

YELLEPEDDI, Venkata Kashyap; PALAKURTHI, Srinath. Recent Advances in Topical Ocular Drug Delivery. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 67–82, 2015.