

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

Avaliação da Atividade Amebicida do Óleo Essencial de *Pterocaulon
polystachyum* Frente à *Acantamoeba polyphaga*

Dissertação de Mestrado

Ismael Pretto Sauter

Porto Alegre, 2011.

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

Avaliação da Atividade Amebicida do Óleo Essencial de *Pterocaulon
polystachyum* Frente à *Acantamoeba polyphaga*

Ismael Pretto Sauter
Biomédico – UFCSPA

Dissertação de Mestrado apresentada como um dos
pré-requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Orientador(a): Marilise Brittes Rott
Co-Orientador(a): Gilsane Lino von Poser

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil
Março de 2011.

CIP - Catalogação na Publicação

Pretto Sauter, Ismael

Avaliação da Atividade Amebicida do Óleo Essencial de *Pterocaulon polystachyum* Frente à *Acanthamoeba polyphaga* / Ismael Pretto Sauter. -- 2011.
80 f.

Orientadora: Marilise Brittes Rott.

Coorientadora: Gilsane Lino von Poser.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. *Acanthamoeba*. 2. *Ceratite Acanthamebiana*. 3. *Pterocaulon polystachyum*. I. Brittes Rott, Marilise, orient. II. Lino von Poser, Gilsane, coorient. III. Título.

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

ISMAEL PRETTO SAUTER
BIOMEDICINA
UFCSPA

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde


Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil


Aprovada em: 28 / 03 / 2011
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 23/ 05/ 2011
Por:


MARILISE BRITTES ROTT
Orientadora ICBS-UFRGS


JOSE CARLOS GERMANI
Coordenador do PPGMAA


LISIANNE BRITTES BENITEZ
UNISC


AMAURI BRAGA SIMONETTI
ICBS/UFRGS


MÁRCIA BOHRER MENTZ
VET/UFRGS


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Às Professoras Marilise Brittes Rott e Gilsane Lino Von Poser, pela orientação, dedicação, apoio, estímulo e amizade durante a realização deste trabalho.

À minha família, por todo apoio e compreensão, especialmente nos momentos que precisei me manter afastado de casa.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia e Farmacognosia, por todo o apoio e amizade no período do Mestrado.

Aos amigos Lua, Ana Maris, Mari Aline, Carolina, Daiane e Roberta, por todas as vezes que me escutaram, me aconselharam e permitiram que eu encontrasse o caminho certo dentro do laboratório, estando sempre presentes nos bons e maus momentos.

Agradeço aos colegas Maicon, Satie, Paula, Gabi, Simone, Flávia, Jaque e Dami, pela ajuda e amizade.

Aos colaboradores neste trabalho, o aluno Samuel Paulo Cibulski e o Prof. Paulo Michel Roehe, bem como a Profa. Miriam Apel. Sem a colaboração destes, o trabalho não teria o mesmo valor.

A todos os meus colegas de Mestrado, que me ensinaram e me escutaram tanto pelos corredores.

A todos os funcionários do ICBS e da Faculdade de Farmácia.

Aos técnicos e professores do Laboratório de Parasitologia, pelos longos cafezinhos!

Aos meus amigos Marcela e Bruno, que mesmo não participando das atividades laboratoriais, me deram suporte e equilíbrio durante o Mestrado. Sem eles eu não teria chegado até o final.

Aos meus irmãos de coração Amanda, Ana, Carlos, Natália, Fernanda e Letícia, por toda a força e incentivo.

AValiação DA ATIVIDADE AMEBICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *PTEROCAULON POLYSTACHYUM* FRENTE À *ACANTHAMOEBA* *POLYPHAGA*¹

Autor: Ismael Pretto Sauter
Orientador(a): Marilise Brittes Rott
Co-Orientador(a): Gilsane Lino von Poser

RESUMO

Espécies de *Acanthamoeba* pertencem ao grupo das amebas de vida livre e constituem um agente etiológico da ceratite amebiana, doença que pode causar inflamação ocular grave e até mesmo cegueira. Plantas do gênero *Pterocaulon* (Asteraceae) são utilizadas na medicina popular como agente anti-séptico e antifúngico. Neste trabalho, foi investigada a composição química do óleo essencial de *P. polystachyum* e avaliada a sua atividade amebicida contra *A. polyphaga*. As folhas da planta fresca foram submetidas à hidrodestilação, fornecendo um rendimento de 0,15% (w/v) de óleo essencial. O óleo foi analisado por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG/MS), sendo o acetato de E-sesquilavandulil o principal componente, representando 43,8% da amostra. Para avaliar a atividade amebicida do óleo, foram testadas as concentrações de 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 mg/mL contra trofozoítos de duas cepas ATCC de *A. polyphaga* (uma de origem clínica e outra ambiental). O óleo essencial nas concentrações de 10 e 20 mg/mL foi letal para 100% dos trofozoítos das duas cepas tanto em 24 quanto em 48 horas. O mesmo resultado foi mostrado na concentração de 5 mg/mL de óleo essencial contra os trofozoítos da cepa de origem ambiental de *A. polyphaga*. O óleo essencial não induziu o encistamento de *Acanthamoeba*. O efeito citotóxico do óleo essencial também foi avaliado em células de mamíferos, sendo determinado pelo ensaio de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Os resultados da atividade amebicida encontrada no óleo estão em conformidade com relato anterior em que os compostos lipofílicos obtidos desta planta foram ativos contra trofozoítos de *A. castellanii*. A utilização do óleo como componente de soluções de limpeza de lentes de contato e de superfícies, não deve ser descartada, entretanto maiores estudos com seus componentes majoritários precisam ser feitos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (80 p.) – Março de 2011.

AMEBICIDAL ACTIVITY EVALUATION OF *PTEROCAULON POLYSTACHYUM* ESSENCIAL OIL AGAINST *ACANTHAMOEBA POLYPHAGA*¹

Author: Ismael Pretto Sauter
Supervisor: Marilise Brittes Rott
Co-Supervisor: Gilsane Lino von Poser

ABSTRACT

Acanthamoeba species are free-living amoebae that constitute an etiological agent of *Acanthamoeba keratitis*, an illness that may cause severe ocular inflammation and induce blindness. Plants of the genus *Pterocaulon* (Asteraceae) are used in folk medicine as antiseptic and antifungal agent. In this work, the activity of *P. polystachyum* essential oil against *A. polyphaga* was assessed. The leaves of the fresh plant submitted to hydrodistillation yielded 0.15% (w/v) of essential oil that was analyzed by GC/MS being *E*-sesquilandulyl acetate the major component, representing 43.8% of the oil. For assessment of the amoebicidal activity concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mg/mL were tested against two *A. polyphaga* ATCC strains (environmental and clinical strains). The essential oil at the concentrations of 10 and 20 mg/mL was lethal to 100% of the trophozoites of both strains in 24h and 48h. The same effect was observed when the essential oil at the concentration of 5 mg/mL was assayed against the environmental strain of *A. polyphaga* trophozoites. Essential oil cytotoxic effect in mammalian cells was determined by MTT assay. The amoebicidal effect (activity) obtained in this work is in accordance with previous report in which the lipophilic compounds from this plant were active against *A. castellanii*. Essential oil utilization as a component of contact lenses cleaning and surface disinfectant solutions should not be discarded, however further studies with its major component should be performed.

¹Master Dissertation in Agriculture and Environmental Microbiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (80 p.) – March, 2011.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1. Gênero <i>Acanthamoeba</i>	3
2.2. Ceratite Amebiana.....	6
2.2.1. Diagnóstico da Ceratite Amebiana.....	9
2.2.2. Tratamento da Ceratite Amebiana.....	10
2.3 Gênero <i>Pterocaulon</i>	11
2.3.1 Composição química das espécies de <i>Pterocaulon</i>	12
2.3.2 <i>Pterocaulon polystachyum</i>	13
2.4. Óleo Essencial.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Local de Desenvolvimento do Trabalho.....	17
3.2 . Material Vegetal.....	17
3.3. Isolamento do Óleo Essencial.....	18
3.4. Análise do Óleo Essencial por Cromatografia a Gás e Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas.....	18
3.5. Culturas Axênicas de <i>Acanthamoeba</i>	19
3.6. Avaliação da Atividade Amebicida.....	19
3.7. Ensaio de Citotoxicidade Celular.....	20
3.8. Análise Estatística.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Rendimento e Composição do Óleo Essencial de <i>P. polystachyum</i> ..	22
4.2. Atividade Amebicida do Óleo Essencial de <i>P. polystachyum</i>	24
4.3. Ação Citotóxica do Óleo Essencial de <i>P. polystachyum</i> sobre células de mamíferos.....	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
6. BIBLIOGRAFIA.....	36
ANEXOS.....	42
ANEXO A. Meio Proteose Peptona - Extrato de Levedo - Glicose (PYG).	42

ANEXO B. Artigo Científico submetido à revista <i>Parasitology Research</i> em Março de 2011. O artigo já se encontra nas normas da revista.....	43
ANEXO C. Artigo publicado na revista <i>Parasitology Research</i> , durante o período de Mestrado.....	55
ANEXO D. Artigo a ser submetido à revista <i>Current microbiology</i> . O artigo já se encontra nas normas da revista e compõe demais atividades desenvolvidas durante o período de Mestrado.....	56

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Genótipos de <i>Acanthamoeba</i> e suas associações com doenças humanas (ceratites e encefalites).....	5
Tabela 2	Espécies de <i>Pterocaulon</i> citadas para a região sul do Brasil, segundo os autores e anos de publicação.....	12
Tabela 3	Composição do óleo essencial de <i>P. polystachyum</i> analisado por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS). (IR* - índice de retenção na coluna DB-5; ni - não identificado).....	23

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1	Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i>	4
Figura 2	Cisto de <i>Acanthamoeba</i>	5
Figura 3	Ceratite Amebiana. Imagem superior: Limbite na fase inicial da ceratite amebiana. Imagem inferior: infiltrado neutrofílico em formato de anel e esclerite grave em caso avançado da doença (DART <i>et al.</i> , 2009).....	7
Figura 4	Fatores de risco que contribuem para a ceratite amebiana.....	8
Figura 5	Conhecida popularmente como “Quitoco”, <i>Pterocaulon polystachyum</i> é encontrado em boa parte do estado do Rio Grande do Sul e demais estados da região Sul do Brasil.....	14
Figura 6	Análise cromatográfica do óleo essencial de <i>P. polystachyum</i> realizada por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS). Os picos são relativos à cada composto identificado, estando numerados e identificados na Tabela 3.....	23
Figura 7	Atividade amebicida do óleo essencial de <i>P. polystachyum</i> frente à <i>A. polyphaga</i> (AP2 - ATCC 30461) - ($p < 0,05$ vs controle).....	25
Figura 8	Regressão linear das concentrações de óleo essencial de <i>P. polystachyum</i> frente à porcentagem de mortalidade dos trofozoítos de <i>A. polyphaga</i> (AP2 - ATCC 30461).....	27

Figura 9	Atividade amebicida do óleo essencial de <i>P. polystachyum</i> frente à <i>A. polyphaga</i> (AP4 - ATCC 30872) - ($p < 0,05$ vs controle).....	28
Figura 10	Regressão linear das concentrações de óleo essencial de <i>P. polystachyum</i> frente à porcentagem de mortalidade dos trofozoítos de <i>A. polyphaga</i> (AP4 – ATCC 30872).....	29
Figura 11	Atividade amebicida do metronidazol frente à <i>A. polyphaga</i> (AP2 - ATCC 30461), apresentado como porcentagem em relação ao controle - ($p < 0,05$ vs controle).....	30
Figura 12	Atividade amebicida do metronidazol frente à <i>A. polyphaga</i> (AP2 - ATCC 30461) - ($p < 0,05$ vs controle negativo).....	31
Figura 13	Ensaio de viabilidade celular (MTT). Ação do óleo sobre célula da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano), apresentada como porcentagem de viabilidade celular comparada com o controle - ($p < 0,05$ vs controle).....	34

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise da Variância

AP2 – *Acanthamoeba polyphaga* 2

AP4 – *Acanthamoeba polyphaga* 4

ATCC – *American Type Culture Collection*

AVL – Amebas de Vida Livre

CDC – Center for Disease Control and Prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

E-MEM - Eagle's minimal essential medium

FBS – Fetal Bovine Serum (Soro Fetal Bovino)

GC – Cromatografia à Gás

GC/MS – Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas

IC50 – Concentração Inibitória 50%

Ig – Imunoglobulina

m – Metro

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

°C – Graus Celsius

PBS – Phosphate buffered saline (Tampão Fosfato Salino)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PHMB – Biguanida Poliexametileno

rpm – Rotações Por Minuto

rRNA – Ácido Ribonucléico Ribossomal

w/v – Peso/Volume

μL – Micrograma

μm – Micrômetro

1. INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) constituem um grupo de protozoários amplamente disperso na natureza. Algumas espécies podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos e de animais domésticos. Atualmente, as espécies de interesse clínico são *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e espécies do gênero *Acanthamoeba*.

Acanthamoeba pode ocorrer sob as formas trofozoítica (metabolicamente ativa) e cística durante seu ciclo de vida. Esses protozoários estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados no solo, na água e no ar. Algumas espécies de *Acanthamoeba* são patógenos oportunistas que podem causar Encefalite Amebiana Granulomatosa e Ceratite Crônica Amebiana, mas também podem estar associadas com lesões cutâneas e sinusite em pacientes imunocomprometidos.

A ceratite amebiana é uma inflamação crônica da córnea ocasionada pela infecção por *Acanthamoeba*. Seu tratamento é longo e complexo uma vez que os medicamentos utilizados não possuem uma ótima eficiência e há resistência ao tratamento pela forma cística deste organismo. A ceratite atinge principalmente usuários de lentes de contato, que nos últimos anos têm

ganhado mais adeptos em todo o mundo. Assim, a pesquisa de novos fármacos é de fundamental importância para obtenção de terapias mais dinâmicas e que facilitem o tratamento. Atualmente, o tratamento dura meses e muitos pacientes cessam a utilização dos medicamentos nos primeiros sinais de melhora. Porém, as recidivas decorrentes do desencistamento de *Acanthamoeba* resistentes ao tratamento são comuns.

Diversos antimicrobianos podem ser usados contra a *Acanthamoeba*. Contudo, a combinação de agentes farmacológicos é geralmente recomendada para eliminar não somente os trofozoítos, mas também os cistos mais resistentes. O estudo de plantas com atividade antimicrobiana e antiparasitária é importante para o desenvolvimento de novos fármacos. Já foi reportado que espécies de *Pterocaulon*, plantas nativas do Rio Grande do Sul, são utilizadas no tratamento de doenças de pele em animais, popularmente diagnosticadas como micoses, tendo estudos comprovado atividades antifúngica e antiparasitária de extratos de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum*.

Alguns estudos já relataram que extratos de *P. polystachyum* apresentam atividade contra *Acanthamoeba*, porém nenhum deles evidenciou a atividade do óleo essencial desta planta. Com isso, o objetivo deste trabalho foi de determinar a atividade amebicida do óleo essencial de *P. polystachyum*, definindo também sua composição e verificando sua possível ação citotóxica sobre células de mamíferos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Gênero *Acanthamoeba*

Acanthamoeba é um gênero de protozoários que pertencem ao filo Sarcomastigophora e sub-filo Sarcodina e que compõe junto com *Naegleria fowleri* e *Balamuthia mandrillaris* as Amebas de Vida Livre (AVL) (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). A forma é variável e possuem um núcleo bem definido e nucléolo grande, além de diversos vacúolos citoplasmáticos que fagocitam bactérias, algas, leveduras e pequenas partículas orgânicas para manutenção da vida celular. Além dos vacúolos citoplasmáticos, apresentam também o vacúolo contrátil envolvido no controle osmótico celular. Esse organismo possui microprojeções (acantopódios), que são responsáveis principalmente pela adesão a superfícies biológicas ou inertes, movimento celular e captura de presas (KHAN, 2006).

Seu ciclo de vida apresenta dois estágios: trofozoítico e cístico. O trofozoíto (Figura 1), a forma celular metabolicamente ativa, possui normalmente um tamanho entre 12 e 35 μm de diâmetro, podendo variar entre

isolados pertencentes a diferentes espécies/genótipos. Sua forma de divisão celular é assexuada e se dá por fissão binária (KHAN, 2006).

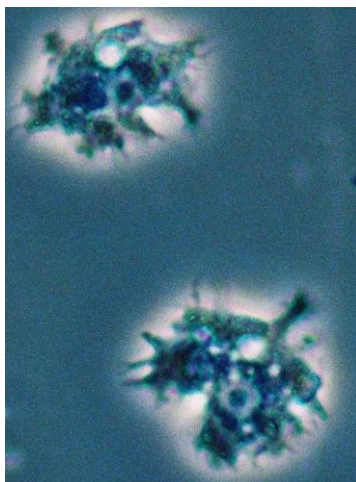


Figura 1 – Trofozoíto de *Acanthamoeba*

Fonte: Karin Caumo

O cisto (Figura 2) possui tamanho de 9 a 12 μm e é uma estrutura de resistência formada quando o trofozoíto se encontra em situações de adversidade, como deficiência nutricional do meio, dessecação, alterações no pH e alterações de temperatura (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). Os cistos são compostos por celulose e proteínas, possuindo duas paredes: o endocisto e o ectocisto. Existe ainda uma região dita opérculo, que é o ponto por onde a ameba sai ao desencistar. Enquanto o ectocisto é mais esférico, o endocisto apresenta diversas formas poligonais, característica de determinados genótipos (ALVES, 2001; KHAN, 2006).

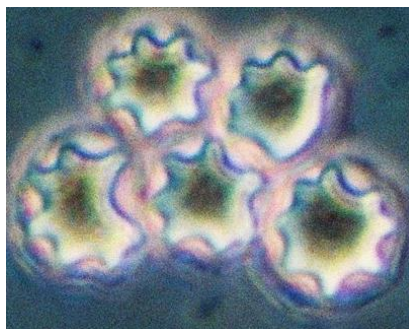


Figura 2 – Cisto de *Acanthamoeba*

Fonte: Karin Caumo

A taxonomia molecular descreve pelo menos 16 genótipos diferentes dentro do gênero *Acanthamoeba*, sendo eles nomeados T1, T2, T2a até T15, baseado no sequenciamento do gene de rRNA (STOTHARD et al., 1998; MAGHSOOD et al., 2005; CORSARO & VENDITTI, 2010). Os genótipos T2a, T3, T4, T6 e T11 têm sido isolados clinicamente como agentes causadores da ceratite amebiana, sendo o genótipo T4 o principal causador desta patologia (Tabela 1) (BOOTON et al., 2005).

Tabela 1 - Genótipos de *Acanthamoeba* e suas associações com doenças humanas (ceratites e encefalites)

Genótipo	Doença
T1	Encefalites
T2a	Ceratites
T2b	NA
T3	Ceratites
T4	Ceratites e Encefalites
T5	NA
T6	Ceratites
T7	NA
T8	NA
T9	NA
T10	Encefalites
T11	Ceratites
T12	Encefalites
T13	NA
T14	NA
T15	NA

NA – ainda não associado à doenças.

Fonte: KHAN, 2006.

Acanthamoeba tem a habilidade de sobreviver em diversos ambientes e tem sido isolada de amostras de água da rede pública, piscinas, lagos, rios, mares, caixas d'água, reservatórios, aparelhos de ar-condicionado, esgotos, sedimentos, solo, praias, vegetais, instrumentos cirúrgicos, lentes de contatos e seus estojos e recentemente em amostras de ar atmosférico, o que mostra sua ubiquidade (KHAN, 2006). Sua interação com o meio em que se encontra é bastante importante, já que podem carregar no seu interior bactérias de interesse clínico como *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella* spp., estando também associadas a fungos, vírus e outros protozoários (ALVES, 2001; AKSOZEK et al., 2002; KHAN, 2006).

Estes protozoários não necessitam de um hospedeiro para completar o seu ciclo de vida, dessa forma, as infecções causadas por eles são consideradas acidentais ou oportunistas (BOOTON et al., 2005), tornando-se agente causador de graves doenças, como a Ceratite Crônica Amebiana e a Encefalite Amebiana Granulomatosa (JONES et al., 1975).

2.2. Ceratite Amebiana

A ceratite por *Acanthamoeba* é definida como uma inflamação crônica da córnea, caracterizada pela formação de um anel neutrofílico no olho e que pode causar cegueira em casos não tratados. A doença desenvolve-se em pessoas imunocompetentes que tem a córnea exposta ao protozoário através de lentes de contato, de água ou solução das lentes de contato contaminadas (ALVES, 2001; OBEID et al., 2003).

Quando em contato com a córnea com algum processo traumático, os trofozoítos aderem e penetram no epitélio. Esta aderência é mediada por uma proteína da membrana do trofozoíto, que se liga à manose de glicoproteínas do epitélio. Estudos sugerem que enzimas como neuraminidase, elastase e várias proteases produzidas pelo protozoário determinam a infecção por *Acanthamoeba*. Após a penetração, o quadro clínico segue com ulcerações, infiltrado neutrofílico em forma de anel e inflamações (Figura 3) (ALVES, 2001). Substâncias como Imunoglobulina A e proteases, presentes no fluido lacrimal, garantem a proteção a indivíduos saudáveis, uma vez que impedem a aderência de *Acanthamoeba*, processo chave na patogenicidade da ceratite (SARAVANAN et al., 2008).

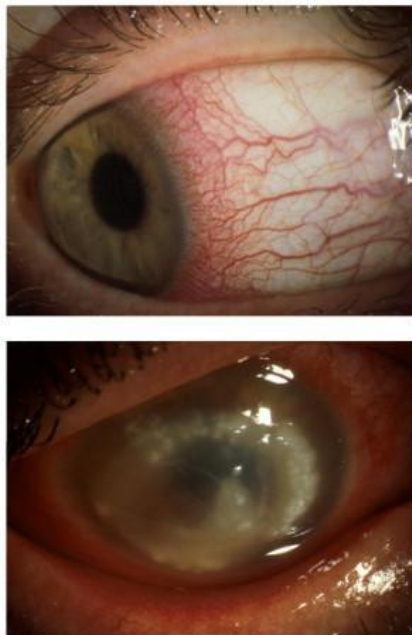


Figura 3 – Ceratite Amebiana. Imagem superior: Limbite na fase inicial da ceratite amebiana. Imagem inferior: infiltrado neutrofílico em formato de anel e esclerite grave em caso avançado da doença (DART et al., 2009).

A ceratite pode ser causada por várias espécies do gênero *Acanthamoeba*, entre elas *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. quina*, e *A. lugdunensis* (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). No mundo desenvolvido, 85% dos casos de ceratite amebiana são diagnosticados em usuários de lentes de contato, levando este a ser o principal fator de risco (SARAVANAN et al., 2008). A figura 4 apresenta os fatores de risco que contribuem para a ceratite por *Acanthamoeba*.

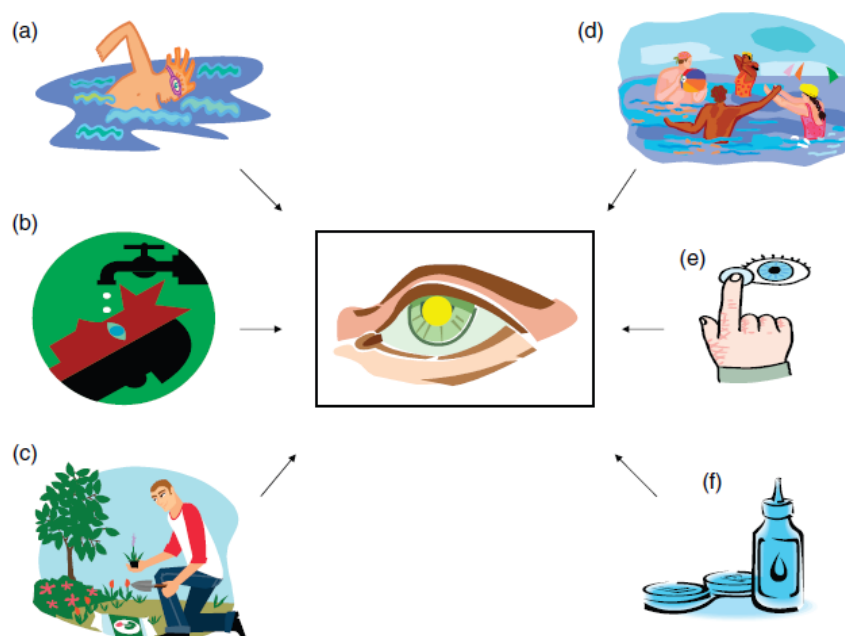


Figura 4 – Fatores de risco que contribuem para a ceratite amebiana

Fonte: KHAN, 2006.

A higienização das lentes de contato é um processo importante para garantir que o protozoário não se instale nas lentes. Diversos sacarídeos incluindo manose, glicose, sacarose, galactose, frutose, N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-glicosamina, ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico) e proteínas, glicoproteínas, lipídeos, mucinas, polissacarídeos, cálcio, ferro, magnésio, sódio, lactoferrina, lisosima e moléculas de imunoglobulinas (Ig) podem ser

encontrados na superfície das lentes de contato depois de seu uso. Estas moléculas podem atuar como receptores para trofozoítos de *Acanthamoeba* e/ou aumentar a habilidade de ligação do parasita às lentes de contato (KHAN, 2006).

A formação de biofilmes nas lentes de contato aumenta a afinidade de *Acanthamoeba* pelas lentes. Estudos mostraram que *Acanthamoeba* adere muito mais às lentes cobertas com biofilme do que quando comparadas às lentes sem biofilme (SIMMONS et al., 1998; TOMLINSON et al., 2000; BEATTIE et al., 2003). Além disso, os biofilmes aumentam a persistência dos trofozoítos nas lentes quando estas se encontram nos estojos de limpeza, provendo nutrientes para o protozoário.

O número de casos diagnosticados de ceratite amebiana provocada por *Acanthamoeba* aumentou muito durante os últimos vinte anos, sendo só nos Estados Unidos mais de 3.000 casos estimados (QVARNSTROM et al., 2006). Uma investigação de 22 centros de oftalmologia nos Estados Unidos, em fevereiro de 2007, conduzida pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) revelou um aumento nacional do número de casos de ceratite por *Acanthamoeba* entre 2004 e 2006. Este aumento foi associado ao uso da solução para lentes de contato “*Advanced Medical Optics Complete Moisture Plus*” contaminada (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008).

2.2.1. Diagnóstico da Ceratite Amebiana

O diagnóstico de ceratite causada por *Acanthamoeba* inclui tanto o diagnóstico clínico da síndrome como o diagnóstico laboratorial, demonstrando a presença das amebas (MARTINEZ & VISVESVARA, 1991). As evidências

confirmatórias iniciam pelo isolamento do microorganismo a partir tanto de lentes de contato do usuário quanto de biópsia da córnea. Diversos métodos são utilizados para identificação, sendo a microscopia óptica (EPSTEIN et al., 1986), a microscopia confocal (WINCHESTER et al., 1995) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (KHAN et al., 2001) os métodos mais comumente utilizados. Este último apresenta alta eficiência e rapidez na detecção, podendo detectar até mesmo pouca quantidade de células (pelo menos cinco trofozoítos).

2.2.2. Tratamento da Ceratite Amebiana

Diversos antimicrobianos são utilizados contra *Acanthamoeba* (AURAN et al., 1987). Entretanto, devido à formação de cistos, o microorganismo torna-se resistente ao tratamento, sendo a combinação de agentes antimicrobianos, geralmente recomendada. Anti-sépticos catiônicos como digluconato de clorexidina e biguanida políexametileno (PHMB), inibidores das funções de membrana, são efetivos contra trofozoítos e parcialmente frente aos cistos, sendo seu uso útil no tratamento da ceratite (AURAN et al., 1987; OBEID et al., 2003).

Fármacos que inibam a síntese de DNA como hexamidina, pentamidina ou o isotionato de propamidina (Brolene[®]), também são utilizados. A síntese protéica também pode ser inibida utilizando aminoglicosídeos como neomicina e paramomicina. Alguns antifúngicos como miconazol, fluconazol, cetoconazol e itraconazol e os poliênicos como a anfotericina B são capazes de desestabilizar a parede celular, sendo utilizados em conjunto com os aminoglicosídeos. O tratamento da ceratite deve ser mantido por 6 a 12 meses

podendo necessitar de mais tempo em alguns casos, prevenindo assim recidivas (AURAN et al., 1987; CHOMICZ et al., 2005).

Algumas vezes o tratamento farmacológico não responde adequadamente, necessitando de intervenções cirúrgicas como a ceratoplastia, debridamento e até mesmo transplante de córnea. Nos casos de transplante, é indispensável erradicar a doença antes, uma vez que cistos de ameba podem permanecer no estroma córneo causando a recorrência da doença (FICKER et al., 1993).

2.3 Gênero *Pterocaulon*

Compreendendo cerca de 1.500 gêneros, a família Asteraceae possui cerca de 23.000 espécies separadas nas três subfamílias: Barnadesioideae, Cichorioideae e Asteroideae. No Brasil esta família está representada por aproximadamente 196 gêneros e 1.900 espécies (BARROSO, 1991; JOLY, 1991). Dentre as subfamílias, a mais numerosa é Asteroideae, na qual as espécies estão distribuídas em 10 tribos, 57 subtribos e 1.135 gêneros, sendo pertencente a esta subfamília a tribo Plucheeae (BREMER, 1994).

A tribo Plucheeae inclui 28 gêneros e em torno de 220 espécies, frequentemente encontradas nas Américas do Sul e Central, como também na África, Ásia e Austrália. A esta tribo pertence o gênero *Pterocaulon*, formado por cerca de 18 espécies (CABRERA & RAGONESE, 1978; BREMER, 1994). No Brasil são encontradas 11 espécies, das quais 10 ocorrem no Rio Grande do Sul (Tabela 2) (LIMA, 2006).

Tabela 2: Espécies de *Pterocaulon* citadas para a região sul do Brasil, segundo os autores e anos de publicação.

	Malme, 1931	Rambo, 1952	Cabrera, 1974	Cabrera & Ragonese, 1978	Seeliger, 1992	Cabrera e Freire, 1998
<i>P. alopecuroides</i>	-	PR, RS, SC	Sul	PR, RS, SC	-	Sul
<i>P. angustifolium</i>	RS	PR, RS, SC	Sul	RS	-	Sul
<i>P. balansae</i>	RS	PR, RS, SC	Sul	PR, RS, SC	-	Sul
<i>P. cordobense</i>	RS	Limite norte do RS	-	RS	-	Sul
<i>P. lorentzii</i>	RS	Limite norte do RS	Sul	PR, RS, SC	RS	Sul
<i>P. polypterum</i>	RS	Limite norte do RS	-	RS, SC	-	-
<i>P. polystachyum</i>	RS	PR, RS, SC	Sul	RS, SC	-	Sul
<i>P. purpurascens</i>	-	Limite norte do RS	-	-	RS	-
<i>P. rugosum</i>	-	PR, RS, SC	Sul	PR, SC	-	Sul
<i>P. virgatum</i>	-	PR, RS, SC	-	RS, SC	-	Sul

As espécies do gênero *Pterocaulon* possuem invólucro longo, formado por poucas séries de brácteas linear-lanceoladas, sendo as exteriores gradualmente menores, caducas com as flores. Suas flores são dimorfas: as marginais pluriseriadas, femininas, com corolas filiformes truncadas ou com 2-3 dentes no ápice e as centrais são hermafroditas ou masculinas por esterilidade do gineceu, com corola tubulosa estreita, pentadenteada no limbo. As folhas são alternadas, inteiras ou dentadas (CABRERA, 1974).

2.3.1 Composição química das espécies de *Pterocaulon*

Em espécies do gênero *Pterocaulon*, encontram-se ácidos fenólicos, tais como ácido caféico, ácido isoclorogênico e ácido 3,4-dicafeoilquínico

(DEBENEDETTI et al., 1998) e compostos como monoterpenos, sesquiterpenos, flavonóides e poliacetilenos (VILEGAS et al., 1995). Outros compostos encontrados são as cumarinas (todas 6,7 dioxigenadas), que estão presentes em grande quantidade e são consideradas como produtos naturais característicos do gênero (VERA et al., 2001).

O estudo de MAGALHÃES et al., (1989) isolou e identificou oito poliacetilenos nas espécies de *P. alopecuroides*, *P. balansae*, *P. lanatum* e *P. rugosum*. Estudos realizados por DEBENEDETTI et al., 1994, levaram ao isolamento de 5-(3-metil-2- buteniloxi)-6,7-metilenodioxycumarina e 5-metoxi-6,7-metilenodioxi-cumarina, de *Pterocaulon balansae*. Em um trabalho mais recente realizado com esta espécie de *Pterocaulon* relatou-se o isolamento da cumarina sabandinol e de dois esteróides (estigmasterol e 3-O-acetiltaraxasterol) e dois flavonóides (quercetina e taxifolina 7-O-prenilada) (HEEMANN, 2006).

2.3.2 *Pterocaulon polystachyum*

Possuindo tamanho de 50 a 100 cm de altura, *P. polystachyum* é uma erva perene lenhosa, com raiz pivotante, curta e grossa da qual partem delgadas raízes secundárias. O caule da planta é simples, sendo densamente ramificado no ápice e folhoso até a inflorescência. As folhas muito próximas umas das outras, diminuem de tamanho gradativamente em direção ao ápice. As folhas basais são oval-lanceoladas, concolores, com face adaxial e abaxial glandulosas, serradas na margem e com ápice agudo. Já as folhas apicais são iguais as basais diferindo no tamanho (Figura 5). As flores são estaminadas, no disco, tubulosas, esbranquiçadas, com tricomas glandulares nos lacínios,

pápus cerdoso-barbelado, uniseriado, ovário aparentemente estéril. Já as cipselas são elipsóides, pentacostadas e pubescentes-glandulosas (LIMA, 2006).



Figura 5 – Conhecida popularmente como “Quitoco”, *Pterocaulon polystachyum* é encontrado em boa parte do estado do Rio Grande do Sul e demais estados da região Sul do Brasil.

A espécie *P. polystachyum* distribui-se no Paraguai, Uruguai, nordeste da Argentina, e no sul do Brasil, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo conhecida popularmente como “Quitoco” (CABRERA & RAGONESE, 1978). Esta planta tem sido descrita em diversos estudos como um potente inseticida, antiviral, antifúngico e antiparasitário.

Um estudo publicado por um grupo argentino relatou a ação de *P. polystachyum* como inseticida, apresentando atividade contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de arbovírus, responsável pela febre amarela e pela dengue hemorrágica (CICCIA et al., 2000). Os extratos metanólicos brutos e frações hexano, diclorometano e metanol de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* se mostraram potentes contra uma série de fungos

patogênicos, como *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas e dermatológicas em humanos, e altamente resistentes aos tratamentos convencionais, e dermatófitos causadores de micoses cutâneas como de “pé de atleta” e de onicomicoses (STEIN et al., 2005).

Devido ao conteúdo de óleos voláteis encontrados nos tricomas glandulares presentes nas partes aéreas de *P. polystachyum*, a planta possui odor forte e característico, o que leva a ser usado como repelente de moscas e pulgas (CABRERA & RAGONESE, 1978). VENDRUSCOLO et al. (2005) ainda classificaram *P. polystachyum* como espécie útil em afecções do sistema digestório.

Em recente estudo, RÓDIO et al. (2008) mostraram que os extratos de *P. polystachyum* apresentam atividade amebicida importante contra os trofozoítos de *A. castellanii*, sendo a melhor atividade observada na fração hexano, prevenindo o encistamento. Os autores discutem que a atividade amebicida encontrada na fração hexano pode ser devida às cumarinas encontradas na planta, já que estes compostos são majoritários em *P. polystachyum*.

2.4 Óleo Essencial

Plantas e seus componentes tem sido utilizados à séculos contra enfermidades, desde dor de cabeça até tratamento de parasitoses. Diversos estudos sobre os efeitos das plantas nas infecções parasitárias têm sido desenvolvidos, tendo estes utilizado compostos obtidos por extração aquosa ou alcoólica. O óleo essencial encontrado nas plantas pode ser extraído e

purificado, podendo ser utilizado no tratamento ou prevenção de doenças parasitárias.

O óleo das plantas pode ser extraído de frutos, folhas, caule ou raízes através da prensagem ou por destilação em água quente ou ainda com solventes orgânicos, e seus componentes podem ser caracterizados por Cromatografia a gás (CG) e mais raramente por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Líquida-Gasosa. Propriedades como a baixa densidade (em torno de 0,94 g/m) e rápida difusão através das membranas celulares podem aumentar a capacidade de entrada dos componentes ativos do óleo dentro de parasitas intracelulares (ANTHONY et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que o óleo essencial de diversas plantas possui atividade contra diferentes parasitas. Dentre estes, são reportados estudos mostrando a atividade do óleo essencial destas plantas contra *Trichomonas vaginalis*, *Giardia duodenalis*, *Hexamita inflata* (MOON et al., 2006) e *Schistosoma mansoni* (PARREIRA et al., 2010). Outros protozoários também foram suscetíveis a este grupo de componentes naturais como *Leishmania amazonensis* (MONZOTE, 2007), *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* (ESCOBAR et al., 2010).

Embora haja alguns estudos mostrando a atividade de componentes naturais contra *Acanthamoeba*, não há nenhum estudo mostrando a atividade de óleo essencial contra este protozoário. Da mesma forma, os estudos com *Pterocaulon* têm crescido nos últimos anos, porém nenhum deles testou a atividade antiparasitária do óleo essencial desta planta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de Desenvolvimento do Trabalho

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

3.2 Material Vegetal

As partes aéreas frescas de *Pterocaulon polystachyum* foram coletadas no município de Butiá, Rio Grande do Sul, Brasil, em Dezembro de 2009, com o auxílio do botânico Prof. Dr. Nelson Matzembaker (Programa de Pós-graduação em Botânica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul). O material testemunho está depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN): *P. polystachyum* D.C. (136584).

3.3 Extração do Óleo Essencial

O óleo essencial foi obtido a partir das partes aéreas da planta submetidas à hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger por 4 horas. O óleo essencial foi coletado, seco com sulfato de sódio e estocado em frascos âmbar a 4° C, para posterior análise.

3.4 Análise do Óleo Essencial por Cromatografia a Gás e Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas

O óleo foi analisado por Cromatografia à Gás (GC) e Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (GC/MS), utilizando cromatógrafo (Shimadzu GC-17A) equipado com uma coluna capilar de sílica (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, revestida com DB-5). A temperatura foi programada de 60 a 300 °C em 3 °C/min. A temperatura do injetor e do detector foram definidas em 220 °C e 250 °C, respectivamente. O aparelho GC foi equipado com um detector de ionização de chama, enquanto a análise GC/MS, tendo um sistema MS quádruplo (QP 5000), foi operado em 70 eV e faixa de massa de 40-400amu. A composição relativa do óleo foi obtida a partir da integração eletrônica, sem levar em conta fatores relativos à resposta. A identificação dos compostos foi baseada em uma comparação dos índices de retenção (determinado em relação ao tempo de retenção de *n*-alcanos homólogos em série) e espectros de massas com os de amostras autênticas, dados da biblioteca Nist GS-MS e com a literatura (ADAMS, 2007).

3.5 Culturas Axênicas de *Acanthamoeba*

A cepa patogênica de *A. polyphaga* (ATCC 30461) e a cepa ambiental não patogênica de *A. polyphaga* (ATCC 30872) foram cedidas pelo Dr. Naveed Khan, sendo mantidas em meio PYG (2% de proteose peptona, 0,2% de extrato de levedo e 1,8% de glicose) a temperatura constante de 30 °C. Para os experimentos, 1 mL de cada cultura foi centrifugado por 5 min a 2.000 rpm, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado duas vezes com tampão fosfato salino tamponado (PBS). O precipitado de amebas foi diluído em meio PYG para obter a concentração final de $1,6 \times 10^4$ trofozoítos/mL.

3.6 Avaliação da Atividade Amebicida

O óleo essencial foi solubilizado com 1% de Tween 20 e água para obtenção de uma solução com concentração de 40 mg/mL. Foram testadas as concentrações finais de 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 mg/mL.

Para realização dos ensaios de atividade amebicida, 100 µL das culturas de *Acanthamoeba* (na concentração de $1,6 \times 10^4$ trofozoítos/mL) e 100 µL de cada solução teste foram inoculadas em cada poço de uma placa de 96 poços. A placa foi selada com parafilme e incubada a 30 °C, sendo monitorada em microscópio invertido. Após 24 e 48 horas, os trofozoítos viáveis foram contados utilizando uma câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal, verificando assim como os cistos. A viabilidade foi verificada utilizando azul de tripan. Como controle negativo foi utilizado água estéril contendo 1% de Tween 20 e como controle positivo foi utilizado metronidazol na concentração de 32 µg/mL (ONDARZA et al., 2006), testado contra a cepa de origem clínica. Os experimentos foram realizados em triplicatas com ao menos duas repetições.

3.7 Ensaio de Citotoxicidade Celular

Para determinação da viabilidade celular, utilizou-se o ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), o qual se baseia na conversão do sal de tetrazólio (MTT) amarelo em um derivado de formazan púrpura na mitocôndria das células viáveis (MOSMANN, 1983). Resumidamente, células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano, ATCC CCL-81) foram cultivadas em meio Eagle's - meio essencial mínimo (E-MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (E-MEM/FBS; (GIBCO) e antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL). Uma suspensão de $4,0 \times 10^4$ células por poço foi distribuída em microplaca de 96 poços e mantida a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. Quando o tapete celular apresentava mais de 80% de confluência, o meio foi trocado e as células tratadas com o óleo essencial de *Pterocaulon polystachyun* nas concentrações 10, 5 e 2,5 mg/mL, dissolvidos em 1% de DMSO. As placas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera úmida, a 5% de CO₂, e após 24 h, 40 µL de uma solução a 2 mg/mL de MTT (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), foram adicionados a cada poço e incubadas por mais 3 horas. Cem microlitros de DMSO foram adicionados a cada poço para interromper a reação e solubilizar os cristais de formazan, e incubado novamente por 10 minutos. A quantidade de MTT-formazan formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis, que foi determinada a 550 nm em um leitor de ELISA (Anthos 2020). Foram testados três poços por concentração, em três experimentos independentes, e os resultados estão expressos como o percentual de células viáveis em relação ao controle, células não tratadas.

3.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como porcentagem de mortalidade e/ou viabilidade. As diferenças entre as médias foram determinadas pela análise da variância (ANOVA) com comparação de médias, seguido do teste de Tukey. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento e Composição do Óleo Essencial de *P. polystachyum*

O rendimento do óleo essencial, baseado no seu peso fresco (w/v), foi de 0,15%. A composição do óleo extraído de *P. polystachyum*, junto com o índice de retenção e porcentagem dos componentes identificados foi encontrado utilizando GC-MS (Figura 6) e estão sumarizados na Tabela 3. O composto acetato de *E*-sesquilavandulil foi o principal componente do óleo, representando 43.8%. Este sesquiterpeno não é comumente encontrado em óleos essenciais, mas já foi identificado no óleo essencial obtido das partes aéreas de *Pluchea quitoc* (syn. *Pluchea sagittalis*), uma planta nativa do sul do Brasil. A partir do óleo essencial de *Pluchea*, 42 componentes foram identificados sendo o acetato de sesquilavandulil, o sesquilavandulol e α -gurjuneno os principais componentes (SIMIONATTO et al., 2007). É interessante comentar que tanto *Pterocaulon* quanto *Pluchea* são gêneros que estão relacionados, pertencendo à mesma tribo - Plucheeae (BREMER, 1994).

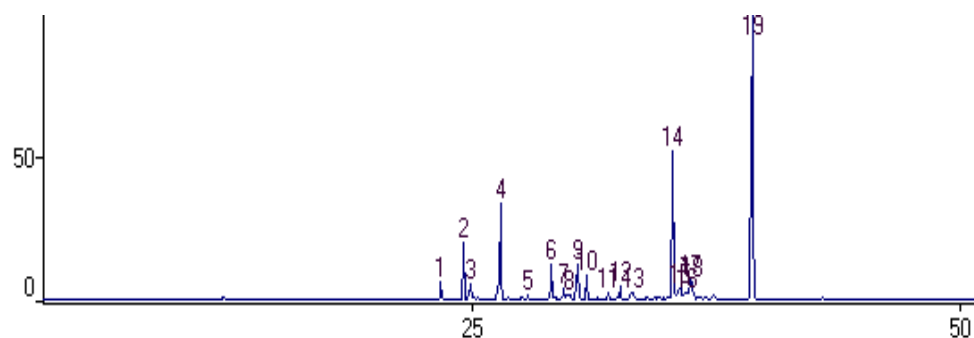


Figura 6 – Análise cromatográfica do óleo essencial de *P. polystachyum* realizada por Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS). Os picos são relativos à cada composto identificado, estando numerados e identificados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Composição do óleo essencial de *P. polystachyum* analisado por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC-MS). (IR* - índice de retenção na coluna DB-5; ni - não identificado).

Nº do Pico	IR*	Componentes	%
1	1348	α -cubebeno	1,67
2	1378	α -copaeno	5,40
3	1388	β -bouboneno	1,39
4	1401	β - cariofileno	10,01
5	1435	α -humuleno	0,46
6	1463	germacreno D	3,37
7	1478	Biciclogermacreno	1,23
8	1483	α -muuroleno	0,46
9	1495	Ni	3,96
10	1506	δ -cadineno	2,22
11	1537	Elemol	0,53
12	1554	E-nerolidol	1,37
13	1572	óxido de cariofileno	0,38
14	1627	E-sesquilavandulol	17,34
15	1636	tau-cadinol	1,67
16	1645	α -eudesmol	0,55
17	1650	α -cadinol	2,71
18	1652	Ni	1,52
19	1736	Acetato de E-sesquilavandulil	43,77

A utilização de plantas ou de seus extratos no tratamento de doenças das mais variadas é prática frequente na história da humanidade (JONES, 1996). Apesar do gênero *Pterocaulon* já ter mostrado atividade contra diferentes fungos, bactérias e protozoários (ALARCÓN, 2008; RÓDIO et al., 2008; DABOIT et al., 2010), até então seu óleo essencial nunca havia sido testado.

4.2. Atividade Amebicida do Óleo Essencial de *P. polystachyum*

A atividade amebicida do óleo essencial de *P. polystachyum* foi testada contra trofozoítos de *A. polyphaga*, sendo escolhidas duas cepas padrão, uma de procedência clínica (isolada de lesão de ceratite amebiana – AP2) e outra ambiental (AP4). As cepas, provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC), foram cedidas pelo Dr. Naveed Khan, da *School of Biological and Chemical Sciences*, Birkbeck College, Universidade de Londres.

Através dos ensaios realizados no estudo, foi possível determinar a atividade amebicida do óleo essencial de *P. polystachyum*. Os ensaios realizados em placas de cultura celular puderam ser acompanhados por meio de microscópio óptico invertido, durante o período decorrente entre o início do experimento e a realização das contagens celulares em câmara de Fuchs-Rosenthal, sendo a viabilidade celular dos trofozoítos verificada através da coloração com azul de tripan, onde os trofozoítos inviáveis apresentam-se corados.

Tomando como base os tempos utilizados para os ensaios de atividade amebicida do estudo desenvolvido por RÓDIO et al. (2008) e utilizando concentrações de óleo verificadas em ensaios prévios (dados não

mostrados), neste trabalho investigou-se a atividade amebicida do óleo essencial de *P. polystachyum* durante 24 e 48 horas para as concentrações finais de 20, 10, 5, 2,5 e 1,25 mg/mL.

Os ensaios realizados com a cepa de *A. polyphaga* de procedência clínica (ATCC 30461) mostraram que o óleo essencial de *P. polystachyum* apresentou atividade em todas as concentrações testadas. Nos ensaios de 24 horas, o óleo inviabilizou todos os trofozoítos, provocando a lise total nas concentrações de 20 e 10 mg/mL (Figura 7). Na concentração de 5 mg/mL houve morte de 81,1% dos trofozoítos, enquanto as concentrações de 2,5 e 1,25 mg/mL foram capazes de inviabilizar 71,6 e 60% dos trofozoítos, respectivamente. Os resultados foram baseados na comparação com o grupo controle, que recebeu apenas água com 1% do agente tensoativo (Tween 20), sendo estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

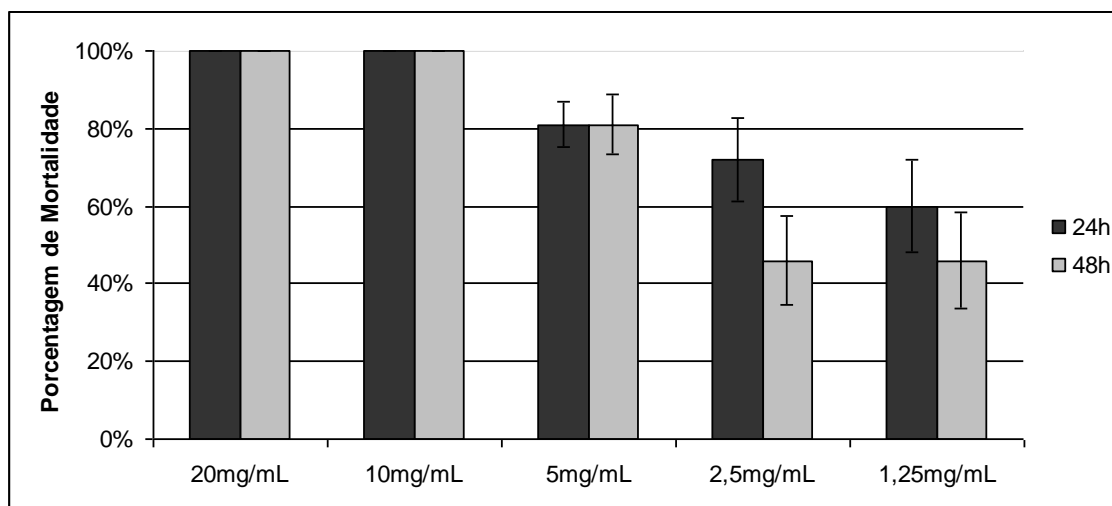


Figura 7 - Atividade amebicida do óleo essencial de *P. polystachyum* frente à *A. polyphaga* (AP2 - ATCC 30461). As colunas representam as médias da atividade de cada concentração de óleo testada, em relação ao controle ($p < 0,05$ vs controle).

Através dos resultados obtidos nos ensaios foi possível perceber que a atividade do óleo se altera com o tempo. Testes foram realizados para

determinar a atividade amebicida do óleo em 48 horas, apresentando morte de todos os trofozoítos nas concentrações mais elevadas (20 e 10 mg/mL) da mesma forma que ocorreu com os ensaios de 24 horas. Nas concentrações de 5, 2,5 e 1,25 mg/mL o óleo foi capaz de matar 80,7, 46,3 e 46% dos trofozoítos, respectivamente (versus controle) (Figura 7).

O efeito diminuído do óleo observado nas concentrações 1,25 e 2,5 mg/mL após 48 horas deve-se, provavelmente, à retomada do crescimento (divisão celular) dos trofozoítos viáveis. Acredita-se que após 24 horas, os trofozoítos mais resistentes retomem o crescimento. Outra possível causa para a resposta ter sido menor seria a diminuição da concentração do óleo por evaporação, uma vez que é volátil, ou por alteração na sua composição, resultante de degradação de compostos por ação do tempo ou da temperatura.

Através do cálculo da regressão linear foi possível verificar que a atividade do óleo essencial de *P. polystachyum* sobre *A. polyphaga* foi dose-dependente (Figura 8), inferindo que a atividade foi diretamente proporcional ao aumento da dose. O óleo essencial, em todas as concentrações utilizadas, foi capaz de prevenir o encistamento dos trofozoítos, uma vez que não houve a formação de cistos nos ensaios. Esta propriedade do óleo é muito importante, já que a habilidade dos trofozoítos passarem para a forma cística durante o tratamento da ceratite amebiana é a principal causa de reinfecções (SCHUSTER & VISVESVARA 2004).

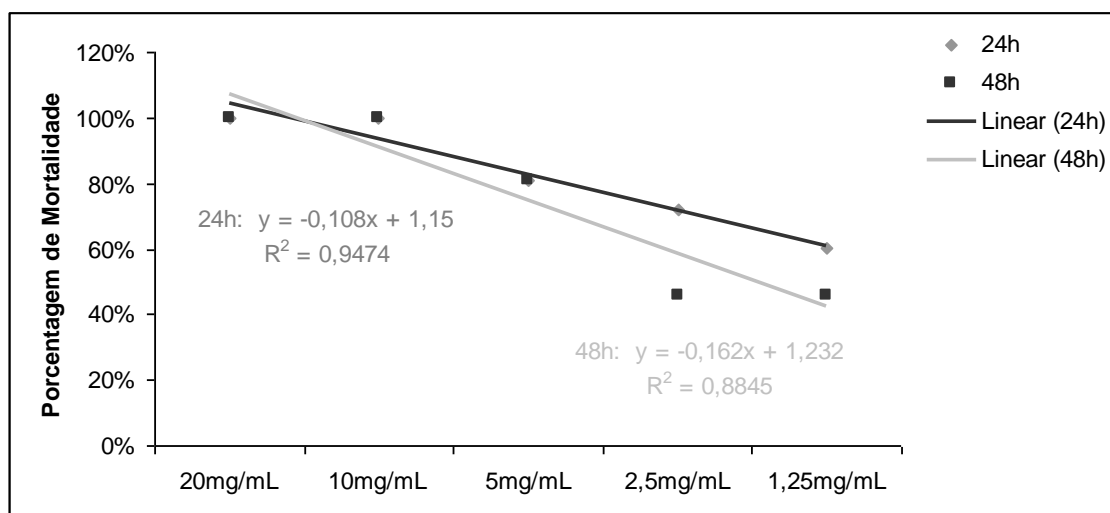


Figura 8 – Regressão linear das concentrações de óleo essencial de *P. polystachyum* frente à porcentagem de mortalidade dos trofozoítos de *A. polyphaga* (AP2 - ATCC 30461).

A atividade do óleo essencial de *P. polystachyum* também foi testada contra uma cepa ambiental de *A. polyphaga* (ATCC 30872). As cepas isoladas de diferentes locais, mesmo sendo da mesma espécie, podem se comportar de forma diferente quando expostas a condições idênticas de estresse. As condições utilizadas no ensaio com a cepa AP2 (ATCC 30461) de origem clínica foram repetidas com a cepa AP4 (ATCC 30872) de origem ambiental, podendo-se assim comparar a resistência das cepas ao óleo. Desta forma, foi encontrada 100% de mortalidade tanto para as concentrações 20 e 10 mg/mL quanto para a concentração 5 mg/mL (Figura 9). Esta resposta foi obtida em 24 e 48 horas de tratamento.

A atividade do óleo contra a cepa ambiental AP4 de *A. polyphaga* foi maior quando comparada à cepa clínica AP2, uma vez que uma concentração menor (5 mg/mL) foi capaz de matar 100% dos trofozoítos. Contudo, as concentrações de 2,5 e 1,25 mg/mL de óleo essencial, mostraram uma atividade menor sobre esta cepa. Em 24 horas e na concentração de 2,5 mg/mL, o óleo foi capaz de inviabilizar 51% das amebas quando comparado ao

controle. A mesma concentração garantiu 47% de mortalidade nos ensaios realizados em 48 horas. Já a concentração de 1,25 mg/mL inviabilizou 44 e 35% das amebas em 24 e 48 horas, respectivamente.

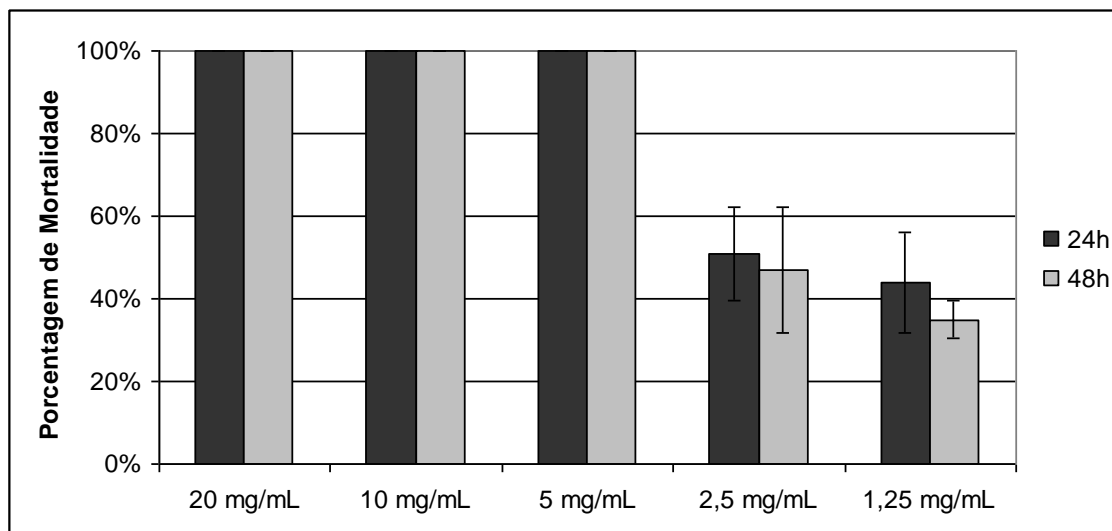


Figura 9 - Atividade amebicida do óleo essencial de *P. polystachyum* frente à *A. polyphaga* (AP4 - ATCC 30872). As colunas representam as médias da atividade de cada concentração de óleo testada, em relação ao controle ($p < 0,05$ vs controle).

Não houve encistamento nos ensaios com *A. polyphaga* (AP4 - ATCC 30872), o que reforça a hipótese de que o óleo essencial de *P. polystachyum* é capaz de prevenir o encistamento. O cálculo de regressão linear no ensaio para a cepa AP4 (ATCC 30872) mostrou que a dose-dependência da atividade do óleo é menor do que quando comparada à cepa AP2 (ATCC 30461) (Figura 10). Isso pode ser percebido pela proximidade que os valores de R^2 no ensaio com a cepa AP2 (ATCC 30461) apresentam, estando mais próximos de 1.

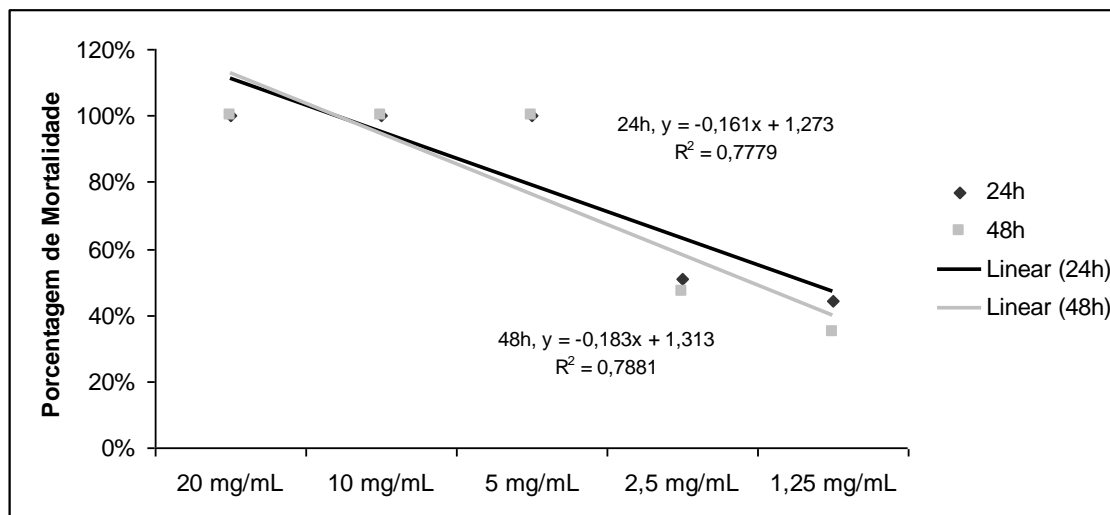


Figura 10 – Regressão linear das concentrações de óleo essencial de *P. polystachyum* frente à porcentagem de mortalidade dos trofozoítos de *A. polyphaga* (AP4 - ATCC 30872).

A atividade amebicida do óleo essencial de *P. polystachyum* foi diferente para as duas cepas. A cepa de origem clínica testada apresentou-se mais resistente ao efeito amebicida do óleo, uma vez que a concentração necessária para inviabilizar 100% das amebas foi maior – 10 mg/mL (Figura 7 e 9). Possivelmente isto ocorra devido à cepa de origem clínica, isolada de uma lesão de ceratite, apresentar mecanismos de defesa, ainda não definidos, que garantam sua resistência ao óleo. Acredita-se desta forma, que a mesma espécie de *Acanthamoeba* pode ser mais ou menos patogênica, sendo sua patogenicidade relacionada, dentre outros aspectos, com mecanismos que garantam sua resistência a diferentes condições adversas do meio.

A atividade amebicida encontrada no óleo essencial de *P. polystachyum* pode estar ocorrendo pela ação de componentes específicos dentro do óleo ou mesmo pela ação sinérgica de diversas moléculas. Para estabelecer a comparação entre a atividade do óleo e a ação de fármacos que são geralmente utilizados no tratamento de ceratite amebiana, foi realizado o mesmo ensaio de atividade amebicida com a cepa clínica utilizando-se

metronidazol, sendo este o controle positivo. Metronidazol é um antimicrobiano utilizado contra protozoários e bactérias, capaz de inibir a síntese de DNA (ONDARZA et al., 2006). Segundo ONDARZA et al. (2006), a concentração de metronidazol de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ é capaz de inviabilizar 85% de amebas em ensaios *in vitro*. O presente estudo mostrou que isso de fato ocorre, uma vez que este resultado foi reproduzido (85% de mortalidade – Figura 11).

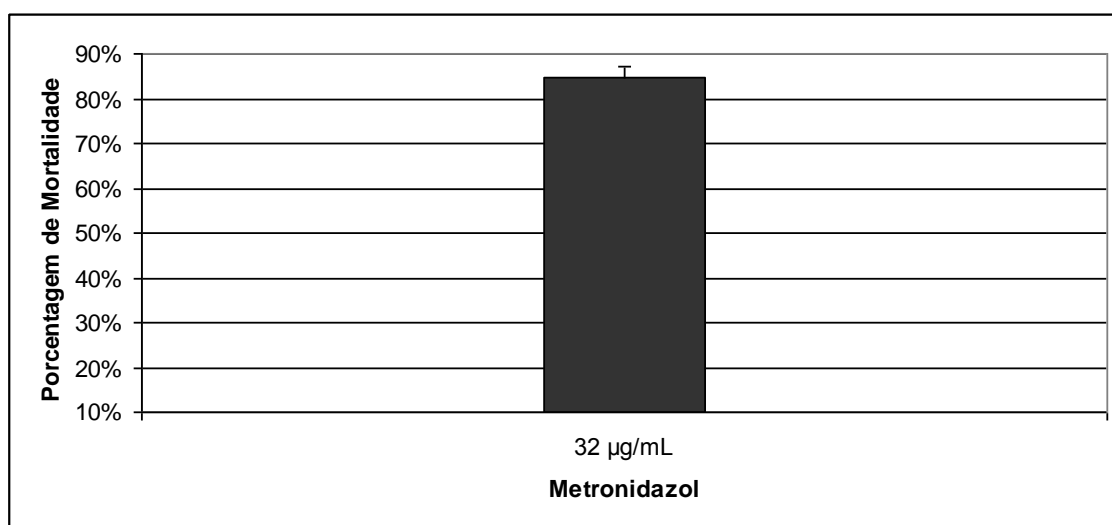


Figura 11 - Atividade amebicida do metronidazol frente à *A. polyphaga* (AP2 - ATCC 30461). A coluna apresenta a média da atividade em relação ao controle ($p < 0,05$ vs controle).

Como esperado, o metronidazol foi capaz de inviabilizar os trofozoítos. No entanto, o óleo foi capaz de prevenir o encistamento de *Acanthamoeba* nos ensaios, diferentemente do tratamento com metronidazol, onde verificou-se a presença de cistos nas contagens feitas em câmara de Fuchs-Rosenthal, tendo 1562,5 cistos/mL ($\pm 395,28$) (Figura 12).

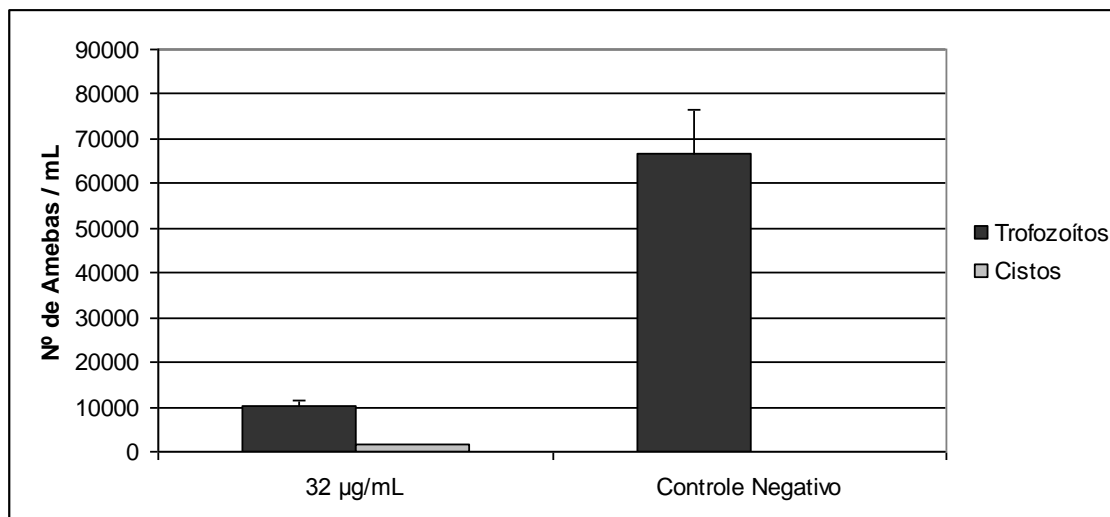


Figura 12 - Atividade amebicida do metronidazol frente à *A. polyphaga* (AP2 - ATCC 30461). As colunas representam a média de trofozoítos ou cistos por mL ($p < 0,05$ vs controle negativo).

A partir da comparação dos resultados encontrados com o metronidazol, foi possível observar que o óleo nas suas concentrações mais altas (20 e 10 mg/mL) foi mais ativo contra a *Acanthamoeba*. Contudo, a concentração utilizada de metronidazol foi menor do que a concentração do óleo, o que poderia dificultar a utilização do óleo no tratamento clínico de pacientes com ceratite. O isolamento de compostos ativos dentro do óleo, capazes de inviabilizar os trofozoítos de *Acanthamoeba*, poderia permitir sua utilização no tratamento, se estes mantivessem a atividade do óleo total quando utilizados em baixas concentrações. Contudo, sabe-se que muitos dos compostos ativos dentro de óleos e extratos de plantas agem de forma sinérgica e que a atividade biológica de um único composto isolado pode ser reduzida (MULYANINGIH et al., 2010).

A análise do óleo essencial de *P. polystachyum* revelou que o sesquiterpeno acetato de *E*-sesquilavandulil foi o principal componente do óleo, o que permite sugerir que este composto poderia ser responsável pela ação amebicida. O estudo de MARTÍN-NAVARRO (2010) mostrou que o α -

ciperotundona, um sesquiterpeno natural isolado da casca da raiz de *Maytenus retusa*, foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *Acanthamoeba* em concentrações relativamente baixas. Contudo, a identificação do alvo molecular deste sesquiterpeno e seu efeito sobre o protozoário ainda precisam ser elucidados.

Os dados do presente estudo corroboram com o estudo de RÓDIO et al. (2008), onde a fração hexano do extrato de *P. polystachyum* mostrou atividade amebicida contra trofozoítos de *A. castellanii*. Contudo, a atividade amebicida do óleo essencial desta planta nunca havia sido estudada até então.

MOON et al.(2006) demonstrou em ensaios *in vitro* que baixas concentrações de óleos de Lavandula podem eliminar completamente *Trichomonas vaginalis*, *Giardia duodenalis* e *Hexamita inflata*. O óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) mostrou atividade contra a forma promastigota de *Leishmania donovani* e demonstrou alta atividade em ensaios schistosomicidas, uma vez que os vermes adultos de *Schistosoma mansoni* foram mortos depois da incubação com o óleo. Porém, o óleo essencial de *B. dracunculifolia* não teve atividade antimicrobiana nem anti-plasmodium (PARREIRA et al., 2010).

Outros protozoários também foram suscetíveis a óleos essenciais. MONZOTE (2007) mostrou a atividade antiparasitária do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, que quando utilizado com pentamidina, potencializa o efeito do fármaco através de uma ação sinérgica, inviabilizando a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*. Em outro estudo, a composição química e a atividade biológica de 19 óleos essenciais de *Lippia* sp. e sete dos seus componentes majoritários foram testados contra as formas

livre e intracelular de *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi*. O óleo essencial de *Lippia alba* exibiu elevada atividade (IC_{50} de 5,5 $\mu\text{g/mL}$ e 12,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) contra as formas epimastigota e amastigota intracelular de *T. cruzi*, enquanto o óleo essencial de *Lippia origanoides* foi ativo contra a forma promastigota de *L. chagasi* (IC_{50} de 4,4 $\mu\text{g/mL}$), não se mostrando tóxico a células de mamífero (ESCOBAR et al., 2010).

4.3. Ação Citotóxica do Óleo Essencial de *P. polystachyum* sobre células de mamíferos

A utilização de compostos naturais na terapêutica de doenças necessita de um estudo prévio completo de sua ação, incluindo a avaliação de possíveis danos que estes compostos possam causar ao ser humano. Para isto, foi verificada a citotoxicidade do óleo essencial de *P. polystachyum* através do ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983), que possibilitou verificar se o óleo provoca dano às células de mamíferos, e assim inferir se é capaz de danificar as células do epitélio córneo. Para o ensaio foram utilizadas células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano), sendo escolhidas três concentrações do óleo para serem testadas, a concentração de 10 mg/mL responsável por matar 100% das amebas em todos os tempos testados e outras duas concentrações com atividade menor (5 e 2,5 mg/mL). Os resultados mostram que o óleo diminui a viabilidade das células de mamíferos para 14% com 10 mg/mL de óleo e para 13% com 5 e 2,5 mg/mL (Figura 13).

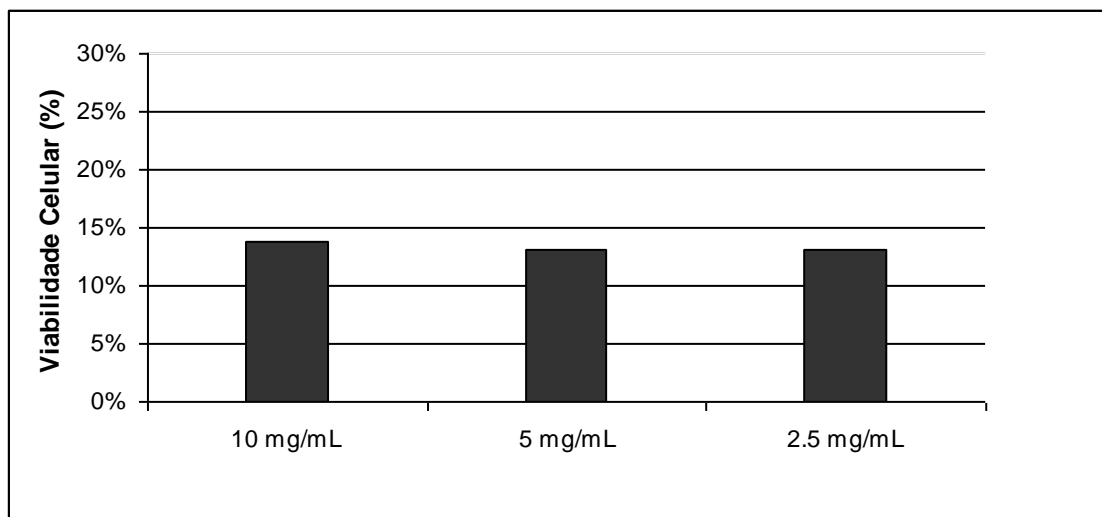


Figura 13 – Ensaio de viabilidade celular (MTT). Ação do óleo sobre células da linhagem VERO (rim de macaco verde Africano), apresentada como porcentagem de viabilidade celular. As colunas representam a média de células viáveis em relação ao controle - ($p < 0,05$ vs controle).

A citotoxicidade do óleo essencial revela que sua utilização sobre a córnea é inviável. Contudo, a utilização do óleo para desinfecção de superfícies e como componente de solução de limpeza de lentes de contato poderia ser uma alternativa para aumentar a eficiência destas soluções. A ceratite está intimamente relacionada ao uso de lentes de contato, sendo a higienização das lentes um processo de extrema importância para prevenir contaminação tanto por *Acanthamoeba* quanto por outros microrganismos (KHAN, 2006).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de *P. polystachyum* mostrou uma importante atividade amebicida contra os trofozoítos de *A. polyphaga*. Esta atividade pode estar associada aos terpenos encontrados no óleo.

Nas condições utilizadas neste trabalho, a atividade citotóxica do óleo essencial de *P. polystachyum* não possibilita a sua utilização em células de mamíferos, não podendo ser utilizado no tratamento da ceratite amebiana.

Mais estudos são necessários para identificar os compostos ativos do óleo essencial de *P. polystachyum*, bem como identificar os alvos moleculares destes produtos na *Acanthamoeba* e assim estabelecer seu possível uso terapêutico. Também são necessários mais estudos utilizando cistos de *Acanthamoeba*, para assim determinar se o óleo é capaz de inviabilizar também estas estruturas de resistência.

6. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, R.P.; Identification of essential oil components by gas chromatograph/quadrupole mass spectroscopy. **Allured Publishing**, Carol Stream, 2007

AKSOZEK, A.; MCCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J. Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, p. 621–623, 2002

ALARCÓN R.; FLORES R.C.; OCAMPOS, S.; LUCATTI, A.; GALLEGUILLO, L.F.; TONN, C.; SOSA, V.; Flavonoids from *Pterocaulon alopecuroides* with antibacterial activity. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, p.1463-1467, 2008

ALVES, J. M. P. Caracterização e Filogenia Moleculares de *Acanthamoeba*. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H.; Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, Oxford, v.21, p. 462-468, 2005

AURAN, J. D.; STAR, M. B.; JAKOBIEC, F. A.; *Acanthamoeba* keratitis. A review of the literature. **Córnea**, New York, v. 6, p. 2-26, 1987

BARROSO, G. M.; **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, v. 3, Viçosa: Imprensa Universitária, 1991

BEATTIE, T.K.; TOMLINSON, A.; MC FADYEN, A.K.; SEAL D.V.; GRIMASON, A.M.; Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection? **Ophthalmology**, v.110, p.765–771, 2003

BOOTON, G. C.; VISVESVARA, G. S.; BYRES, T. J.; KELLY, D. J.; FUERST, P. A.; Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with Nonkeratitis Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, New York, v. 43, p. 1689–1693, 2005

BREMER, K.; **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Portland: Timber Press Inc., 1994

CABRERA, A.L.; **In Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Compositae. pt. 6. (A Burkart, org.). INTA, Buenos Aires, p. 106-554, 1973

CABRERA, A. L.; FREIRE S. **Flora Del Paraguay**. Compositae. V. Genebra, n. 27, p. 58-84, 1998

CABRERA, A. L.; RAGONESE, A. M.; **Revisión del Género Pterocaulon (Compositae)**. Revista del Instituto de Botânica Darwinion. 21, n. 2-4, 1978

CHOMICZ, L.; ZEBROWSKA, J.; PIEKARCZYK, J.; STAROOECIAK, B.; MYJAK, P.; WALSKI, M.; KAZIMIERCZUK, Z. In vitro studies on susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to selected chemical agents. **Acta Parasitologica**, Warsaw, v. 50, p. 25–31, 2005

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 72, p. 185-189, 2000

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

DABOIT, T.C.; STOPIGLIA, C.D.; VON POSER, G.L.; SCROFERNEKER, M.L.; Antifungal activity of *Pterocaulon alopecuroides* (Asteraceae) against chromoblastomycosis agents. **Mycoses**, Berlin, v. 53, p. 246-250, 2010

DART, J.K.; SAW, V.P.; KILVINGTON, S.; *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 148, p. 487-499, 2009

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D.; KIMPE, N.; BOEYKENS, M.; Two 6,7-dioxygenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**, New York, v. 48, p. 707-710, 1998

DEBENEDETTI, S. L.; PALACIOS P. S.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D.; 5-(3-methylenedioxy)coumarin, a 5,6,7-trioxygenated coumarin from *Pterocaulon virgatum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 57, p. 1539-1542, 1994

DRAULANS, E.; MAUDGAL, P.C.; *Acanthamoeba* keratitis. **Bulletin de la Société Belge d'Ophtalmologie**, Leuven, v. 243:115-121, 1992

EPSTEIN, R. J.; WILSON, L. A.; VISVESVARA, G. S.; PLOURDE, E. G. Jr.; Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. **Archive of Ophthalmology**, Chicago, v.104, p.1318–1321, 1986

ESCOBAR P, LEAL SM, HERRERA LV, MARTINEZ JR, STASHENKO E.; Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Riode Janeiro, v. 105, p. 184-190, 2010

FICKER L. A.; KIRKNESS, C.; WRIGHT, P.; Prognosis for keratoplasty in *Acanthamoeba* keratitis. **Ophthalmology**, Rochester, v. 100, p. 105-110, 1993

HEEMANN, A. C. W.; MIGUEL, O. G.; DALLARMI, M. Estudo fitoquímico da espécie *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, p. 585-588, 2006

JOLY, A. B.; **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**, v. 10, Editora São Paulo: Nacional, 1991

JONES, B. R.; VISVESVARA, G. S.; ROBINSON, N. M.; *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. **Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom**, London, v. 95, p. 221–232, 1975

JONES, F.A.; Herbs – useful plants. Their role in history and today. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 8, p.1227–1231, 1996

KHAN, N. A.; *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Review**, Amsterdam, v. 30, p. 564-595, 2006

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A.; *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**, New York, v. 43, p. 204–208, 2001

LIMA, L. F. P.; Gênero *Pterocaulon* Eil. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul: Aspectos taxonômicos, palinológicos e fitoquímicos. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006

MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; VILARDES, N. J.; LEITÃO FILHO, H. F.; Polyacetylenes from *Pterocaulon* species. **Phytochemistry**, New York, v. 28, p. 2497-2499, 1989

MAGHSOOD, A.H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, N.A.; *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 54, p. 755-759, 2005

MALME, G. O. Am. Die Compositae der zweitem Regnellschen Reise. **Arkiv for Botanik**. Bd: 24 A, n. 6, p. 1-61, 1931

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G.; *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clinical Microbiology Reviews - American Society for Microbiology**, Washington, v. 16, p. 273–307, 2003

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S.; Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. **Clinical Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 11, p. 861–872, 1991

MARTÍN-NAVARRO, C.M.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; LORENZO-MORALES, J.; ORAMAS-ROYO, S.; HERNÁNDEZ-MOLINA, R.; ESTÉVEZ-BRAUN A.; RAVELO, A.G.; VALLADARES, B.; PIÑERO, J.E.; *Acanthamoeba castellanii* Neff: In vitro activity against the trophozoite stage of a natural sesquiterpene and a synthetic cobalt(II)-lapachol complex. **Experimental Parasitology**, New York, v. 126, p.106-108, 2010

MONZOTE, L.; MONTALVO, A.M.; SCULL, R.; MIRANDA, M.; ABREU, J.; Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 49, p. 257-260, 2007

MOON, T.; WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.; Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 99, p. 722-728, 2006

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.1665, p. 55-63, 1983

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M.; Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, New York, v. 17, p. 1061-1066, 2010

OBEID, W. N.; ARAÚJO, R.; VIEIRA, L. A.; MACHADO, M. A. C.; Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* - Relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 66, p. 876-880, 2003

ONDARZA RN, ITURBE A, HERNÁNDEZ E.; In vitro antiproliferative effects of neuroleptics, antimycotics and antibiotics on the human pathogens *Acanthamoeba polyphaga* and *Naegleria fowleri*. **Archives of Medical Research**, New York, v.37, p. 723-729, 2006

PARREIRA, N.A.; MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S.C.; DE SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.; NANAYAKKARA, N.P.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A.A.; Antiprotozoal,

Schistosomicidal, and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & biodiversity**, Zürich, v. 7, p. 993-1001, 2010

QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G.S.; SRIRAM, R.; DA SILVA, A.J.; Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 44, p. 3589-3595, 2006

RAMBO, B. A.; Análise Geográfica das Compostas Sul-Brasileiras. **Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues**, v. 4, n. 4, p. 87-160, 1952.

RÓDIO, C.; VIANNA, D. R.; KOWALSKI, K. P.; PANATIERI, L. F.; VON POSER, G.; ROTT, M. B.; In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitological Research**, Berlin, v.104, p. 191–194, 2008.

SARAVANAN, C.; CAO, Z.; KUMAR, J.; QIU, J.; PLAUNT, A. G.; NEWBURG, D. S.; PANJWAI, N.; Milk Components Inhibit *Acanthamoeba*-Induced Cytopathic Effect. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v.49, n 3, p.1010 –1015, 2008.

SCHUSTER, F. L; VISVESVARA, G. S.; Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, p. 1001–1027, 2004

SEELIGER, U.; Coastal foredunes of southern Brazil: physiography, habitats, and vegetation. In: Seelinger, U. **Coastal plant communities of Latin America**. San Diego: Academic Press, p. 367-381, 1992

SIMIONATTO, E.; STÜKER, C.Z.; PORTO, C.; DALCOL, I.I.; DA SILVA, U.F.; MOREL, A.F.; SIMIONATTO, E.L.; JÚNIOR, A.W.; Essential oil of *Pluchea quitoc* Dc. (Asteraceae). **The Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 19, 494-497, 2007

SIMMONS, P.A.; TOMLINSON, A.; SEAL, D.V.; The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. **Optometry & Vision Science**, Baltimore, v. 75, p. 860–866, 1998

STEIN, A. C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 99, p. 211-214, 2005

STOTHARD, D. R.; SCHROEDRE-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J.; The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 45, p. 45–54, 1998

TOMLINSON, A.; SIMMONS, P.A.; SEAL, D.V.; MC FADYEN, A.K.; Salicylate inhibition of *Acanthamoeba* attachment to contact lenses: a model to reduce risk of infection. **Ophthalmology**, Rochester, v. 107: 12–117, 2000

VENDRUSCOLO, G. S.; SOARES, E. L. C.; EISINGER, S. M.; ZACHIA, R. A. Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine – RS, no período de Outubro de 1999 a Junho de 2001 – II – etnotaxonomia: critérios taxonômicos e classificação folk. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v. 7, p. 44-72, 2005

VERA, N.; BARDÓN, A.; CATALAN, C. A. N.; GENDRIS, T. E.; HERZ, W. New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. **Planta Medica**, New York, v. 67, p. 674-677, 2001

VILEGAS, W.; BORALLE, N.; CABRERA, A.; BERNARDI, A. C.; POZETTI, G. L.; ARANTES S. F.; Coumarins and a flavonoid from *Pterocaulon alopecuroides*. **Phytochemistry**, New York, v. 38, p. 1017-1019, 1995

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L.; Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, New York, v. 30, p. 151-158, 2008

WINCHESTER, K.; MATHERS, W. D.; SUTPHIN, J. E.; DALEY, T. E.; Diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in vivo with confocal microscopy. **Córnea**, New York, v.14, p.10–17, 1995

ANEXOS**ANEXO A. Meio Proteose Peptona - Extrato de Levedo - Glicose**

(PYG)

7,5g de Proteose Peptona

0,75g de Extrato de levedo

0,98g de Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

0,059g de Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

1g de Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,02g de Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]

0,034g de Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

0,355g de Hidrogenofosfato dissódico anidro

15g de Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121 °C por 15 min).

ANEXO B. Artigo Científico submetido à revista **Parasitology Research** em Março de 2011. O artigo já se encontra nas normas da revista.

Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum*
(Asteraceae) essential oil

Ismael Pretto Sauter¹, Jaqueline Campiol dos Santos², Miriam A. Apel², Samuel Paulo Cibulski³, Paulo Michel Roehe³, Gilsane Lino von Poser², Marilise Brittes Rott^{1,4}

- (1) Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
- (2) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
- (3) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
- (4) Departamento de Microbiologia, Setor de Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Ismael Pretto Sauter: isauter2000@hotmail.com

+55 (51) 3308-3584

Abstract

Acanthamoeba species are free-living amoebae that constitute an etiological factor of *Acanthamoeba* keratitis, an illness that may cause severe ocular inflammation and blindness. Plants of the genus *Pterocaulon* (Asteraceae) are used in folk medicine as antiseptic and antifungal agent. In this work, we investigated *P. polystachyum* essential oil and assessed its amoebicidal activity against *A. polyphaga*. The leaves of the fresh plant submitted to hydrodistillation yielded 0.15% (w/v) of essential oil that was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) being *E*-sesquilandulyl acetate the major component, representing 43.8% of the oil. For the assessment of the amoebicidal activity concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mg/mL were tested. The essential oil at the

concentrations of 10 and 20 mg/mL was lethal to 100% of the *A. polyphaga* trophozoites in 24 h and 48 h. Essential oil cytotoxic effect in mammalian cells was determined by MTT assay. Amoebicidal activity results are in accordance with previous work in which the lipophilic compounds from this plant were active against *A. castellanii*. Further studies with the major component of the essential oil will be carried out.

Keywords: *Acanthamoeba*, essential oil, Keratitis, *Pterocaulon polystachyum*, Brasil.

1. Introduction

Acanthamoeba is a free-living protozoan widely distributed in the environment, occurring in vegetative trophozoite and resistance cyst stages during its life cycle. *Acanthamoeba* can cause two well-recognized diseases: *Acanthamoeba* keratitis and *Acanthamoeba* granulomatous encephalitis. *Acanthamoeba* keratitis has been recognized as a significant ocular microbial infection, being an acute inflammation of the cornea that can result in blindness when not properly treated in the initial stage (Schuster and Visvesvara 2004; Khan 2006). The incidence of the illness has enhanced due to the increasing number of contact-lens wearers. Contact lenses exposed to contaminated water and inappropriately cleaned are among the main risk factors of the infection. If there is a trauma or hypoxia in the corneal epithelium the invasion of the parasite into the stroma is facilitated, and it adheres to the host tissue initiating a cytopathic effect (Clarke and Niederkorn 2006; Kliescikova *et al.* 2011).

Early diagnosis followed by adequate treatment is indispensable to patients presenting *Acanthamoeba* keratitis. The infection is difficult to cure because the treatment must be maintained during a long period. The recommended treatment includes a biguanide (polyhexamethylene biguanide or chlorhexidine digluconate) together with a diamidine (propamidine isethionate or hexamidine) (Khan 2006). Inadequate treatment can cause reinfection once the trophozoite can encyst under adverse conditions, which makes recommended the correct utilization of the drugs during the whole treatment. Therefore, more effective drugs against *Acanthamoeba* must be developed and medicinal plants can be useful in this search.

Pterocaulon (Asteraceae) has been used in traditional medicine as antiseptic, antifungal and antiparasitic agent (Avancini 2002). A study of Stein and colleagues (2005) and Daboit et al. (2010) showed that *P. alopecuroides*, *P. balansae* and *P. polystachyum* extracts were active against a range of pathogenic fungi. The hexane extract of the latter plant showed amoebicidal activity against a pathogenic strain of *Acanthamoeba* (Ródio et al. 2008). So, the aim of present study is to analyze the essential oil obtained from the aerial parts of *P. polystachyum*, to evaluate its *in vitro* amoebicidal activity against *Acanthamoeba polyphaga* and essential oil cytotoxic effect in mammalian cells.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The aerial parts of *P. polystachyum* were collected in the city of Butiá, Rio Grande do Sul, Brazil, in December, 2009. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Department of Botany of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN 136584).

2.2. Essential oil

The essential oil was obtained from the fresh aerial parts of the plants by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus for 4 h. The essential oil was collected, dried over sodium sulfate, and stored in amber-colored vials at 4 °C until analysis.

2.3. GC and GC-MS Analysis

The oil was analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), using a chromatograph (Shimadzu GC-17A) equipped with a fused silica capillary column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm, coated with DB-5). The temperature was programmed from 60 to 300 °C at 3 °C/min. Injector and detector temperatures were set at 220 °C and 250 °C, respectively. The GC apparatus was equipped with a flame ionization detector, while the GC/MS analysis, had a quadrupole MS system (QP 5000), operating at 70 eV and mass range 40–400 amu. The relative composition of the oil was obtained from electronic integration, without taking into account relative response factors. The identification of compounds was based on a comparison of retention indices (determined relatively to the retention times of *n*-alkanes homologous series) and mass spectra with those of authentic samples, data from Nist GS-MS library and with the literature (Adams 2007).

2.4. Ameba cultures

The pathogenic strain of *A. polyphaga* (ATCC 30461) was obtained from the American Type Culture Collection. The axenic cultures were kept in PYG medium (2% proteose peptone, 0.2% yeast extract, and 1.8% glucose) at a constant temperature of 30 °C. For the experiment, 1 mL of the culture was centrifuged for 5 min at 2,000 rpm, the supernatant discarded, and the precipitate washed twice with phosphate-buffered saline buffer (PBS). The precipitate of amebae was diluted in PYG medium to obtain a final concentration of 1.6×10^4 trophozoites per milliliter.

2.5. Assessment of amoebicidal activity

The essential oil was solubilized with 1% Tween and water to concentration of 40 mg/mL and was tested at final concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mg/mL. For the assessment of amoebicidal activity, 100 μ L of culture of *A. polyphaga* and 100 μ L of each test solution were inoculated into each well of a 96-well plate. The plate was sealed and incubated at 30 °C, monitored by means of an inverted microscope and counted in a Fuchs-Rosenthal counting chamber after 24 and 48 hours. Viability was assessed using methylene blue. The controls used were sterile water and sterile water containing 1% Tween 20. The experiments were performed in triplicate and repeated in three different days.

2.6. Cytotoxicity assay

Essential oil cytotoxic effect was evaluated by MTT assay (Mosmann 1983). Briefly, Vero cells (African Green Monkey Kidney, ATCC CCL-81) were cultured in Eagle's minimal essential medium (E-MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (E-MEM/FBS; (GIBCO) and antibiotics (penicillin 100 UI/mL; streptomycin 100 μ g/mL). Cells were seeded at a concentration of 4.0×10^4 cells per well on 96-well microplates and maintained at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. After 24 hours, the medium was removed and 100 μ L of E-MEM/FBS with essential oil at different concentrations (10, 5 and 2.5 mg/mL) were added to each wells in triplicate. The plates were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After 48 h, 50 μ L of 3-(4,5-dimethyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) solution (2 mg/mL) were added to each well and incubated for a further 4 h. The plates were centrifuged ($1400 \times g$ for 5min) and the untransformed MTT was removed. Ethanol (100 μ L) was added to each well for solubilizing formazan crystals and the optical density (OD)

measured in an ELISA reader (Anthos 2020) at 550 nm with a 620 nm reference filter. The amount of formazan produced was directly proportional to the number of living cells in culture. Results were expressed as the percentual OD of viable cells in comparison to the OD of untreated control cells.

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as percentage and analyzed by analysis of variance and comparison of averages with the Tukey's test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

The essential oil yield, based on fresh weight (w/v), was 0.15%. Seventeen volatile compounds, representing 94.5% of the total oil, were identified and the chemical composition is presented in Table 1 and summarized in Figure 1. *E*-sesquilandulyl acetate was the major component, representing 43.8% of the oil, followed by *E*-sesquilandulyl (17.3%) and β -caryophyllene (10.0%). The main compound is not commonly found in essential oils but it was identified in the essential oil obtained from aerial parts of *Pluchea quitoc* (syn. *Pluchea sagittalis*), a native plant of Southern Brazil. From *P. quitoc* essential oil, forty-two compounds were identified being sesquilandulyl acetate, sesquilandulol and α -gurjunene the main components (Simionatto et al. 2007). It is interesting to comment that both *Pterocaulon* and *Pluchea* are closely related genera, belonging to the same tribe – Plucheeae (Bremer 1994).

Plants and their extracts have been used for many centuries as treatments for ailments from headaches to parasite infections (Jones 1996). Plants of the genus *Pterocaulon* have shown activities against different fungi, bacteria and protozoa (Alarcón 2008; Ródio et al. 2008; Daboit 2009). However, the essential oil never has been investigated neither for the chemical composition nor the biological activities. Here, amebicidal activity of *P. polystachyum* essential oil was tested against *A. polyphaga* trophozoites. The essential oil showed activity in all tested concentrations. When tested the amoebicidal activity in 24 h, the essential oil killed all trophozoites in the concentrations of 10 and 20 mg/mL (Fig. 2). With 1.25, 2.5 and 5 mg/mL the oil was able to kill 60, 71.6 and 81.1% of the trophozoites, respectively (vs control).

Laboratory tests were also carried out to determine the essential oil amebicidal activity from *P. polystachyum* in 48 h (Fig. 2). The results were similar to those obtained in 24 h. All trophozoites were killed with the concentrations of 10 and 20 mg/mL, while with 1.25, 2.5 and 5 mg/mL the oil killed 46, 46.3 and 80.7% of the trophozoites, respectively (vs control). Diminished effect observed in the concentrations of 1.25 and 2.5 mg/mL at the 48 h was probably due to grow's retake of trophozoites. Essential oil was active in a dose-dependent manner assessed by linear regression (Fig. 3), showing that the activity was directly proportional to the increase of the dose. The essential oil, at all concentrations used, was able to prevent the encystment of the trophozoites, once that there was not cyst formation. This essential oil property is very important because the ability of trophozoites to turn in cyst form during the therapy is the major problem for reinfection (Schuster and Visvesvara 2004).

The amebicidal activity found in the *P. polystachyum* essential oil could be occurring by the action of specific compounds within the oil or the synergistic action of several molecules. A study of Martín-Navarro (2010) showed that the α -cyperotundone, a natural sesquiterpene isolated from the root bark of *Maytenus retusa*, was able to inhibit the *in vitro* growth of the amoebae at relatively low concentrations. However, the identification of the molecular targets of this sesquiterpene and its effects on *Acanthamoeba* has yet to be discovered.

Our data corroborate the study of Ródio et al. (2008), where the hexane extract of *P. polystachyum* showed antiamebic activity against *A. castellanii* trophozoites. However, amoebicidal activity of the essential oil was not previously investigated. Nevertheless other protozoa parasites were susceptible to this group of natural compound. Essential oil antiparasite activity was demonstrated for Monzote (2007), which showed that the *Chenopodium ambrosioides* essential oil has a synergic activity after incubation in conjunction with pentamidine against promastigotes of *Leishmania amazonensis*. In other study, the chemical composition and biological activities of 19 *Lippia* essential oils and seven of their major components were tested against free and intracellular forms of *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi* parasites. The essential oil of *Lippia alba* exhibited the highest activity against *T. cruzi* epimastigotes and intracellular amastigotes, while *Lippia organoides* essential oil was active against *L. chagasi* promastigotes and exhibited no toxicity in mammalian cells (Escobar et al. 2010).

Studies have shown that many plants present activity against different parasites being this effect related to some components of the essential oil. A study demonstrated that low concentrations of two *Lavandula* essential oil can completely eliminate *Trichomonas vaginalis*, *Giardia duodenalis* and *Hexamita inflata* in vitro (Moon et al. 2006). *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil showed activity against promastigote forms of *Leishmania donovani*. Its essential oil displayed high activity in the schistosomicidal assay, since all pairs of *Schistosoma mansoni* adult worms were dead after incubation with the essential oil. *B. dracunculifolia* essential oil was neither cytotoxic against Vero cells, nor active in the antimicrobial and antiplasmodial assays (Parreira et al. 2010).

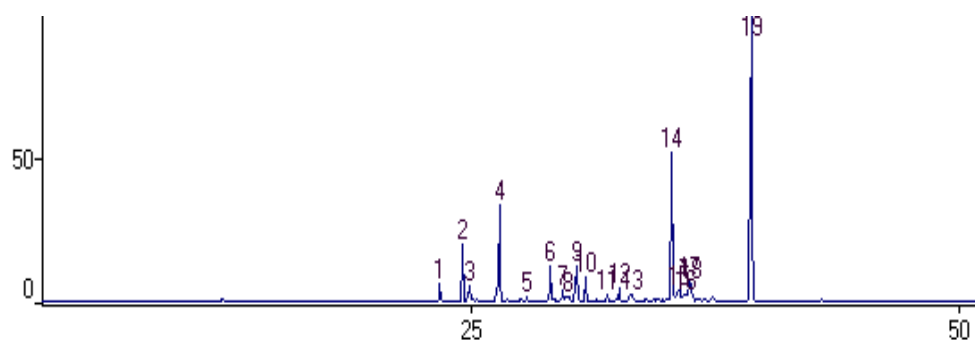
In order to apply *P. polystachyum* essential oil as a topical agent, the oil must not induce the cytotoxic effects on human cornea. Therefore we examined the essential oil cytotoxic effect on a mammalian cell lineage. *P. polystachyum* essential oil showed toxic effect against Vero cells (Fig. 4). The doses were selected from the amoebicidal activity test and had a cytotoxic activity of ca. 13% (vs control). These results preclude the direct use of oil on mammalian cells, but do not rule out their use. The doses used in tests were high and cytotoxic to Vero cells, but its activity against the trophozoites would allow the oil to be incorporated into contact lenses cleaning solutions. Importantly, the oil not only destroyed the trophozoites, but also prevented cysts formation. Thus, the use of essential oil of *P. polystachyum* in contact lenses cleaning solutions would be a great alternative.

In conclusion, *P. polystachyum* essential oil showed important amebicidal activity against trophozoites of *A. polyphaga*. However, further studies are necessary to evaluate the possible active compound from *P. polystachyum* essential oil, as well as identify the molecular targets of these products and thus determine its possible therapeutic use.

Table 1 Percentage composition of *P. polystachyum* essential oil.

Component	RI*	%
α -Cubebene	1348	1.7
α -Copaene	1378	5.4
β -Bourbonene	1388	1.4
β -Caryophyllene	1401	10.0
α -Humulene	1435	0.5
Germacrene D	1463	3.4
Bicyclogermacrene	1478	1.2
α -Muurolene	1483	0.5
δ -Cadinene	1506	2.2
Elemol	1537	0.5
E-nerolidol	1554	1.4
Caryophyllene oxide	1572	0.4
E-sesquilavandulyl	1627	17.3
<i>Tau</i> -cadinol	1636	1.7
α -Eudesmol	1645	0.6
α -Cadinol	1650	2.7
<i>E</i> -sesquilavandulyl acetate	1736	43.8

*RI: retention indices on DB-5 column.

**Fig. 1** Chromatogram of the essential oil from *P. polystachyum* by GC-MS.

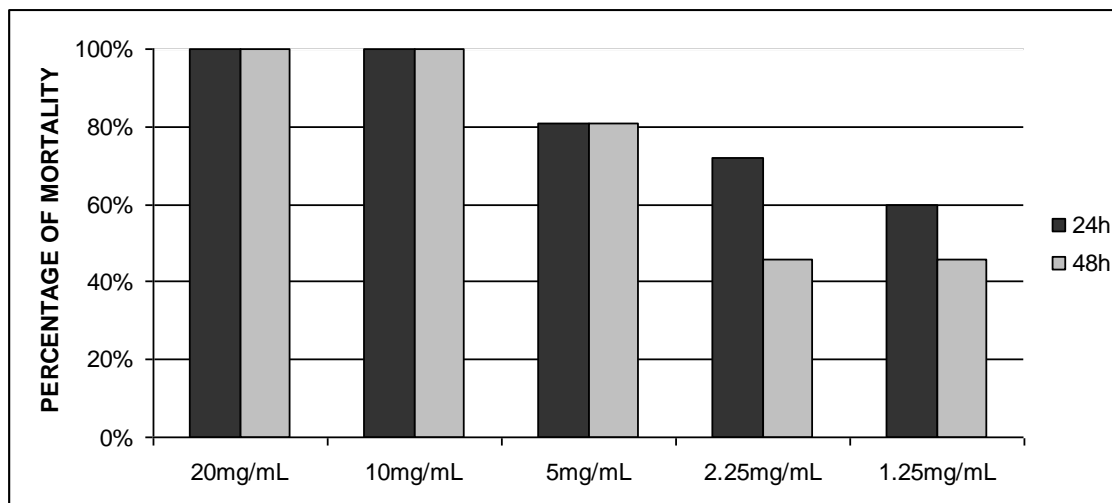


Fig. 2 Amoebicidal activity of essential oil of *P. polystachyum* presented as percentage of mortality of *A. polyphaga* trophozoites ($p < 0.05$ vs control).

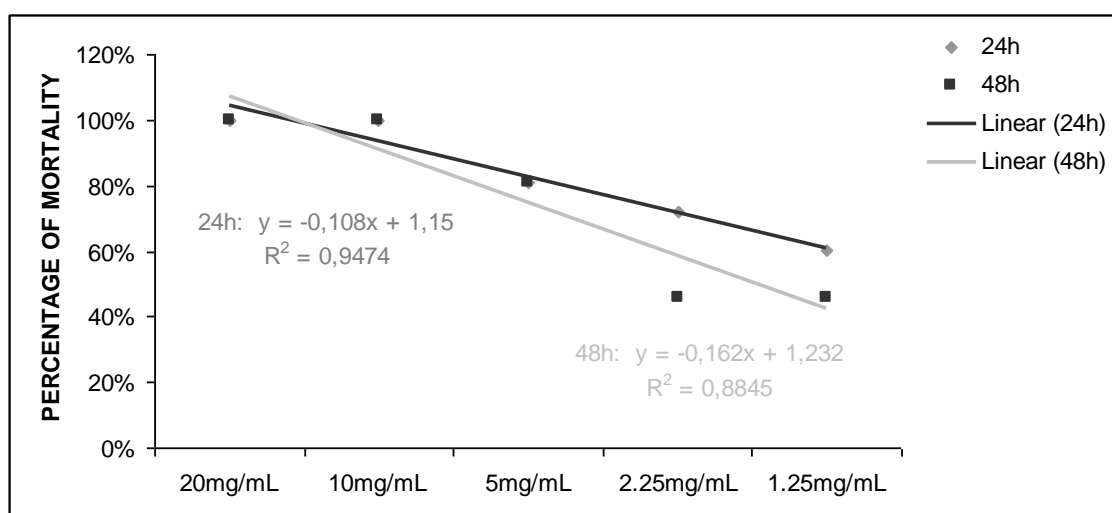


Fig. 3 Linear regression from the concentrations of *P. polystachyum* essential oil front of the percentage mortality of *A. polyphaga* trofozoites.

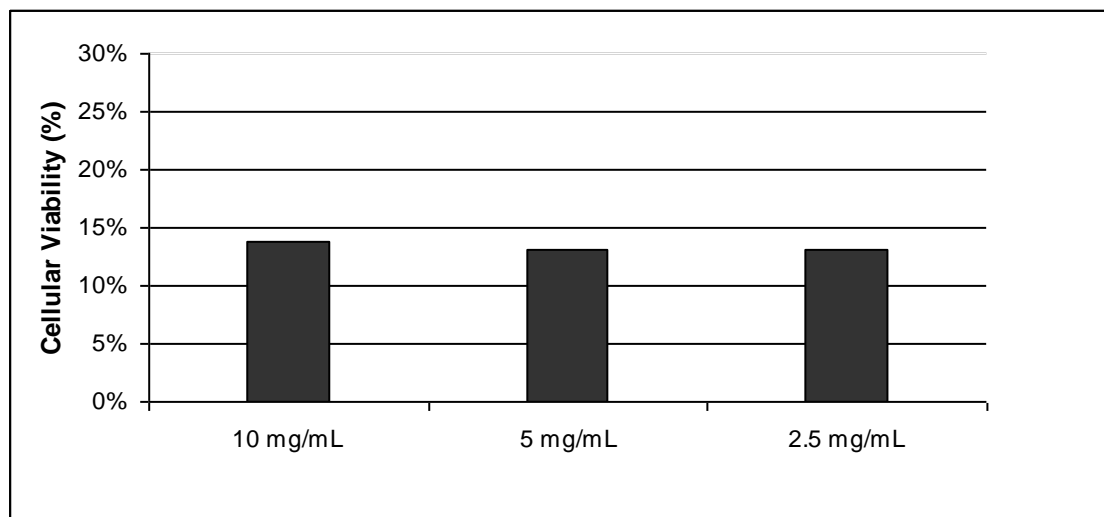


Fig. 4 Cellular viability of Vero cells front different concentrations of *P. polystachyum* essential oil. ($p < 0.05$ vs control).

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES and CNPq for financial support and Dr. Naveed Khan for providing *A. polyphaga* strain.

References

Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatograph/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing, Carol Stream.

Alarcón R, Flores RC, Ocampos S, Lucatti A, Galleguillo LF, Tonn C, Sosa V. (2008) Flavonoids from *Pterocaulon alopecuroides* with antibacterial activity. Planta Med 74:1463-1467

Avancini CAM (2002) Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Bremer K (1994) Asteraceae: Cladistics and Classification. Portland: Timber Press. p752

Clarke DW, Niederkorn JY (2006) The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes Infect* 8:1400-1405

Daboit TC, Stopiglia CD, von Poser GL, Scroferneker ML (2010) Antifungal activity of *Pterocaulon alopecuroides* (Asteraceae) against chromoblastomycosis agents. *Mycoses* 53:246-250

Escobar P, Leal SM, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E (2010) Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105:184-190

Jones, F.A. (1996) Herbs – useful plants. Their role in history and today. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 8:1227–123

Kliescikova J, Kulda J, Nohynkova E (2011) Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in acanthamoebae. *Experim Parasitol.* 127:326–328.

Khan NA (2006) Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30:564–595

Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Lorenzo-Morales J, Oramas-Royo S, Hernández-Molina R, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Valladares B, Piñero JE (2010) *Acanthamoeba castellanii* Neff: In vitro activity against the trophozoite stage of a natural sesquiterpene and a synthetic cobalt(II)-lapachol complex. *Exp Parasitol* 126:106-108

Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J (2007) Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 49:257-260

Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HM (2006) Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol Res* 99:722-728

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65:55-63

Parreira NA, Magalhães LG, Morais DR, Caixeta SC, de Sousa JP, Bastos JK, Cunha WR, Silva ML, Nanayakkara NP, Rodrigues V, da Silva Filho AA (2010) Antiprotozoal, Schistosomicidal, and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem Biodivers* 7:993-1001

Ródio C, Vianna DR, Kowalski KP, Panatieri LF, Von Poser G, Rott MB (2008) In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res*. 104:191–194

Schuster FL, Visvesvara GS (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34:1001-1027

Simionatto, E., Stüker, C.Z., Porto, C., Dalcol, I.I., Da Silva, U.F., Morel, A.F., Simionatto, E.L., Júnior, A.W (2007) Essential oil of *Pluchea quitoc* Dc. (Asteraceae). *J. Essent Oil Res* 19:494-497

Stein AC, Sortino A, Avancini C, Zacchino S, Poser GL (2005) Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 99:211–214

ANEXO C. Artigo publicado na revista **Parasitology Research**, durante o período de Mestrado.

Parasitol Res (2010) 107:195–198
DOI 10.1007/s00436-010-1843-9

SHORT COMMUNICATION

Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Acanthamoeba polyphaga* (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae)

Marilise Rott · Karin Caumo · Ismael Sauter ·
Janina Eckert · Luana da Rosa · Onilda da Silva

Received: 23 December 2009 / Accepted: 11 March 2010 / Published online: 9 April 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract To date there is no report on mosquitoes infected with free-living amoebae. For this reason, the aim of this study was to verify if *Aedes aegypti* could be susceptible to *Acanthamoeba polyphaga* under laboratory conditions, so trophozoites were offered as a unique food resource for larvae of first instar. The results show that those amoebae are able to infect and colonize the mosquito gut and could be re-isolated of all stages of the mosquito (larvae, pupae, and adults).

Introduction

Free-living amoebae (FLA) belong to the genus *Acanthamoeba*, are found worldwide, and inhabit a great variety of natural environments. These amoebae also are able to live endo-zoically in diverse hosts, and for this reason, they are designated as amphizotic microorganisms (Visvesvara et al. 2007). They have been isolated from the soil, salt and freshwater, humans, and several domestic and wild animals (Marciano-Cabral et al. 2000; Pens et al. 2008; Caumo et al. 2009; Carlesso et al. 2009). The genus *Acanthamoeba* is the most common among the FLA (Page 1988); however, only some species are pathogenic to humans, with the potential to cause granulomatous amoebic encephalitis, cutaneous lesions, and sinusitis in immunocompromised

patients and amoebic keratitis in immunocompetents associated especially with contact lense wearers (Khan 2006).

Acanthamoeba have adapted to resist these diverse conditions by switching their phenotype. Under harsh environmental conditions such as lack of nutrients, high temperatures, and high osmolarity, this protozoan change into a resistant cyst form. Under favorable conditions, those cysts change into vegetative and infective trophozoite forms, completing life cycle.

It is known that some species of protozoan infect mosquitoes, causing a diversity of diseases. For instance, some species of *Ascogregarina* are known to parasite *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Huang et al. 2006; Roychoudhury and Kobayashi 2006; Roychoudhury et al. 2007; Dos Passos and Tadei 2008; Albicocco and Vezzani 2009).

A. aegypti is found throughout the world in tropical and subtropical regions, mainly in urban and suburban areas. This mosquito is the principal vector of dengue and dengue hemorrhagic fever. Since there is no vaccine for these arboviral diseases, mosquito control is the only method available (WHO 1997). Currently, three different methods can be used to control *A. aegypti*: the elimination of larval habitats (flower pots, rain gutters, abandoned tires, water storage tanks), chemical control, and biological control. Studies (Polson et al. 2002; Rodríguez et al. 2003) have shown that repeated pesticide applications produce a negative impact on the environment as well as the development of resistance in larvae and adults. Biological control could be an alternative approach to avoid these effects. Some predators such as fish (Martinez-Ibara et al., 2002), copepods (Cyclopoidae) (Marten et al. 1994; Schreiber et al. 1996), and notonectids (Chesson 1984)

M. Rott (✉) · K. Caumo · I. Sauter · J. Eckert · L. da Rosa ·
O. da Silva
Microbiologia Imunologia e Parasitologia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
e-mail: marilise.rott@ufrgs.br

ANEXO D. Artigo a ser submetido à revista **Current microbiology**. O artigo já se encontra nas normas da revista e compõe demais atividades desenvolvidas durante o período de Mestrado.

Active Metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* on agro-industrial residues

Fernanda Cortez Lopes¹, Deise Michele Tichota¹, Ismael Pretto Sauter², Stela Maris Meister Meira¹, Jéferson Segalin³, Marilise Brittes Rott², Alessandro de Oliveira Rios¹, Adriano Brandelli^{1*}

¹ Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre Brazil.

² Laboratório de Parasitologia, Instituto de Ciência Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre Brazil.

³ UNIPROTE-MS, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre Brazil.

* Corresponding author: fax: +5551 3308 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

Abstract

Microbial extracts continue to be a productive source of new molecules of biotechnology importance. The fungi of the genus *Penicillium* are known to be producer of biologically active secondary metabolites. In this work, *Penicillium chrysogenum* produced active metabolites growing on the agro-industrial residues grape waste and cheese whey, agro-industrial residues. The 7-days cultures showed biological activities against bacterial, fungi and amoeba strains of food, medical and agronomical importance. The cheese whey supernatant inhibited the growth of the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*, the fungus *Fusarium oxysporum* and the amoebae *Acanthamoeba polyphaga*. Due to the greater antimicrobial activity of the crude extract of cheese whey a footprinting profile was carried out using the technique ESI-MS and ESI-MSMS techniques. The presence of penicillin G, which is a traditional metabolite produced by this species was confirmed, and other metabolites that have antimicrobial activity like penicillin V and rugulosin can be also suggested. In addition, there was no production of roquefortine C, a mycotoxin related to this fungus. *P. chrysogenum* was able to produce a wide variety of antimicrobial compounds on agro-industrial residues, which makes the process ecological-friendly.

Keywords: *Penicillium chrysogenum*, agro-industrial residues, secondary metabolites, ESI-MS

Introduction

Infectious diseases are caused by bacteria, viruses, parasites and fungi and are the major cause of death and morbidity. Resistance to antibiotics has led to the emergence of new and the reemergence of old infectious diseases. The continued development and spread of antimicrobial resistant creates an urgent need for the development of new antimicrobials and the appropriate use of currently available agents^{1,2}. Food-borne illnesses resulting from the consumption of foods contaminated with microorganisms have been of great concern for public health. The consumption of food that has been formulated with chemical preservatives has also increased consumer concern and created a demand for more natural and minimally processed food^{3,4}. In addition, infectious diseases have led to important economic losses worldwide in agriculture. To face these problems, producers have become increasingly dependent on agro-chemicals. However, intensive use of these compounds in conventional crop management has led to the emergence of frequent problem of resistance microbial pathogens and has also caused serious problems affecting not only human health but also the quality of the environment⁵.

The success of filamentous fungi for the industrial production of biotechnological products is largely due to the metabolic versatility of this group of microorganisms. Industry exploits their biosynthetic capabilities to produce pharmaceuticals and other products through fermentation^{6,7}. A large number of fungal extracts and/or extracellular products have been found to have antimicrobial activity, mainly related to species of the genera *Penicillium*. Since the discovery of penicillin, the micromycetes have been famous as producers of secondary metabolites with biological activity, including antibacterial, antifungal, immunosuppressants, cholesterol-lowering agents and also potent mycotoxins^{8,9}. *Penicillium chrysogenum*, which is one of the

most widespread fungal species, is known to produce a great variety of natural products. The fungus has the ability to synthesize penicillin and related β -lactam antibiotics in addition to several other secondary metabolites^{10,11}.

Within medicine and biotechnology there is a continuing need to find new pharmaceuticals, and hence for the development of rapid and efficient methods for the screening of large numbers of microbial cultures for the production of biologically active metabolites⁶. One of the fastest and most effective profiling methods employs mass spectrometry—fungal extracts are injected directly into a mass spectrometer applying the electrospray ionization technique¹². Mass spectrometry (MS) has become the method of choice in structural characterization of small molecules and proteins not only measures the molecular mass of compound, but also provides structural information by fragmentation studies via tandem MS/MS¹³. The mass profile can be produced within a few minutes of analysis time and can be used to reject or strengthen a hypothesis whether a specific metabolite is present in the sample or not¹⁴.

Agro-industrial residues can be used as a natural bioresource for the production of bioactive compounds, because they are inexpensive, abundant and their use will provide us with environmental and economic benefits^{15,16}. Hence, the objective of this work is the production of bioactive metabolites against bacteria, fungi and amoeba by the filamentous fungi *Penicillium chrysogenum* using agro-industrial residues as the sole source of nutrients.

Materials and Methods

Microorganism

The fungus *Penicillium chrysogenum* belongs to the collection of Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology (Porto Alegre, Brazil). This isolate was

previously identified by sequencing the ITS region of 18 DNAr and part of the β -tubulin gene. The fungus was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) slants with mineral oil at 4 °C and subcultured periodically.

Culture media and growth conditions

The conidia suspensions were realized according to ¹⁷. The conidia concentration was 10^6 conidia/mL. The fungus was cultivated in two media, in erlenmeyers of 250 mL containing 50 mL of medium, cheese whey and grape waste, both in the concentration of 10g/L. The conditions were 7 days, at 30 °C, 120 rpm. At the end of the cultivation, the samples were filtered through Whatman filter n° 1 filter. The supernatants were lyophilized and then resuspended in distilled water to obtain a 100 mg/mL concentration. Samples were sterilized through 0.22 μ m porosity filters previous analyses of biological activities. These samples were used to determine the antibacterial, antifungal and amebicidal activities.

Antibacterial activity

The antibacterial activity of the lyophilized supernatants was determined using the agar diffusion method according to ¹⁸ with adaptations. The bacteria tested were *Salmonella Typhimurium* ATCC 14078, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 9801 and *Pseudomonas aeruginosa* (environmental isolate).

Bacterial suspensions were prepared with sterile saline (8.5 g/L NaCl), being standardized in spectrophotometer at 600 nm, to obtain a concentration of 10^8 CUF/mL. These bacteria were inoculated on TSA (Tryptic Soy Agar) plates with a *swab* submerged in the suspensions. An aliquot of 15 μ L supernatant was applied on the

plates, which were incubated for 24 hours at 30 °C. The antibacterial activity was determined by the presence of inhibition haloes. The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) determination was realized preparing the dilutions of 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 and 1/64 of the supernatants and an aliquot of each dilution was applied on the plates.

Antifungal Activity

To determine the antifungal activity were used the filamentous fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (environmental isolate), *Aspergillus fumigatus* (environmental isolate), *Aspergillus flavus* (food isolate), *Penicillium expansum* (food isolate) and the yeast *Candida tropicalis* (clinical isolate). The fungi were cultivated on Potato Dextrose Ágar (PDA) for 5 days at 30 °C. The conidia suspension of the filamentous fungi was prepared as previously mentioned. After the conidia suspension was prepared it was added to a PDA at 50 °C in an enough volume to provide a final concentration of 10^6 conidia/mL. The medium was poured in plates and after the solidification 15 µL of the lyophilized supernatants were added. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and subsequently observed for inhibitory activity against the fungal indicator (adapted from ¹⁹). To the yeast and to the MIC determination, the protocols used are equally to the antibacterial activity cited before.

It was determined the effect of the supernatants on the spore germination according to ²⁰. 10^6 spores were suspended in 15 µL of the supernatants, incubated for 2 hours at 28 °C and then inoculated onto the PDA- containing Petri dishes. The plates were incubated for 48 hours at 30 °C. The effect of the supernatants was assessed by visual comparison of the mycelial development with the control.

Amebicidal Activity

The amebicidal activity was determined according to ²¹. Concentrations of 50, 25, 10, 5, 2.5 and 1 mg/mL of the supernatants were tested against a strain of *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461 (8×10^3 trophozoites/mL). For the assessment of amebicidal activity, 100 μ L of culture of *A. polyphaga* and 100 μ L of each test solution were inoculated into each well of a 96-well plate. The plate was sealed and incubated at 30 °C, monitored by means of an inverted microscope, and counted in a Fuchs-Rosenthal counting chamber after 24, 48 and 72 h. The controls used were sterile water and culture media. The experiments were performed in triplicate on three different days.

Extraction of metabolites

The extraction conditions were realized according to ²² with modifications. The lyophilized supernatants were extracted twice in 3 mL acetonitrile and 2 mL 1% formic acid in ethyl acetate and ultrasonicated for 10 min. The solvents were eliminated under a liophilization process. The residue was resuspended in 1% acid formic aqueous solution and passed through a 0.2 μ L disposable filter to TOF-MS analysis.

TOF-MS conditions

A Waters Q-TOF micro was used to realize the mass profile of the cheese whey extract. The instrument is equipped with a nano-electrospray ionization (nano-ESI) source and the used conditions are given in Table 1. Data were analyzed with the Waters MassLynx software. MS spectra were processed using background subtract followed by smoothing the spectrum with Savitzky-Golay smoothing, and measuring the peak top with a centroid top of 80%. The conditions were according to ²².

Table 1: LC/TOF-MS operation conditions in ESI₊ ion mode

Parameter	
Capillary Voltage (V)	3300
Tof flight tube (V)	5630
MS Cone Voltage (V)	50
MS/MS Cone Voltage (V)	35
Collision Gas	Argon
Collision Energy (V)	6
Source Temperature (°C)	100
Reflectron (V)	1780

The standard Penicillin G with purity $\geq 98.0\%$ (Sigma) was used to confirm the presence of this metabolite in the extract. The fragmentation was realized with the collision energy of 25 V.

Results and Discussion

Determination of biological activities

The lyophilized samples were assayed against gram positive and gram negative bacteria and the inhibition occurred predominantly on gram positive bacteria, *B. cereus* and *S. aureus* (Table 2). Due to the fact that *P. chrysogenum* is able to produce penicillins, which belong to the β -lactam class of antibiotics and are active mainly against gram positive bacteria, it is possible that the inhibition could be caused by the presence of penicillins in the supernatant and it should be better investigated. However, it is important highlights the inhibition of the gram negative bacteria *P. aeruginosa*. As gram negative bacteria are naturally resistant to penicillins, therefore it can be suggested

the presence of another metabolite with antibacterial activity. Gram-negative microorganisms are typically more resistant to antimicrobials than gram-positive, and this has long been explained by the presence of the outer-membrane permeability barrier, which limits access of the antimicrobial agents to their targets in the bacterial cell²³.

S. aureus is a versatile organism with several virulent characteristics and resistance mechanisms at its disposal. It is also a significant cause of a wide range of infectious diseases in humans²⁴. As well, *P. aeruginosa* that is a pathogen associated with a broad spectrum of infections in humans according to²⁵. Infections caused by these bacteria may be associated with significant morbidity and mortality and therapeutic options are becoming increasingly limited with the continued emergence and spread of antimicrobial multiresistant strains. For this reason there is a need to develop alternative fighting methods to antibioticotherapy²⁶.

B. cereus has been implicated in many foodborne outbreaks involving several products such as rice, pasta, meat, vegetables and dairy products. Several *B. cereus* strains have been identified as the causative agent of two different types of food poisoning: the emetic type and the diarrheal type, and both can occasionally be fatal²⁷. The application of these supernatants in food, besides promoting the inhibition of pathogens as *Bacillus cereus*, could be used also as natural colourants, because these supernatants are coloured, in shades of yellow (unpublished results). However, it is clear that are necessary, firstly, studies of characterization of these pigments, mainly studies on the toxicity of these compounds to be used as food colourant.

Table 2: Growth inhibition caused by supernatants of *Penicillium chrysogenum* on different culture media

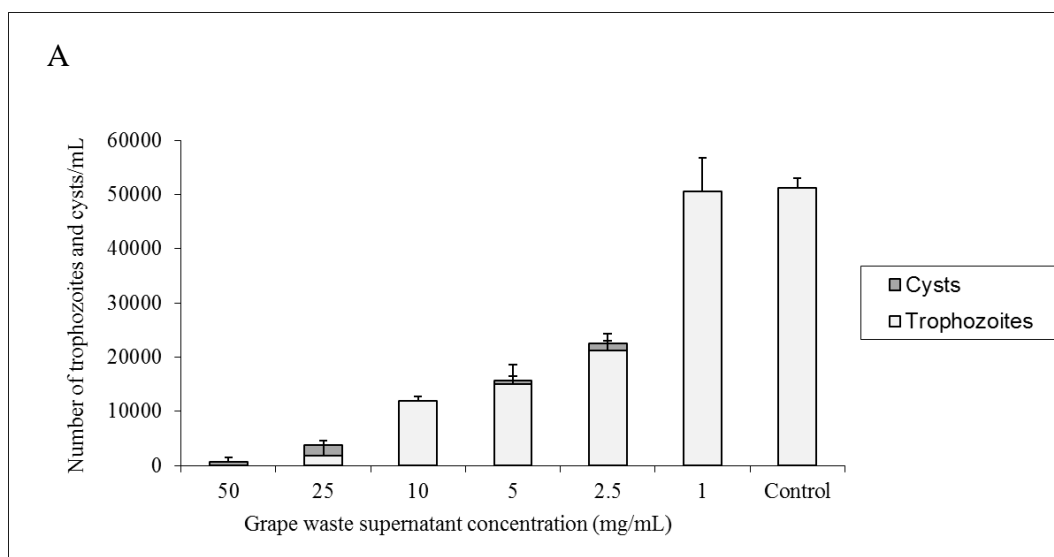
Culture Medium	Grape waste	Cheese whey
Microorganisms		
Gram positive Bacteria		
<i>Bacillus cereus</i>	++ (25)	++ (12.5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++ (25)	++ (50)
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
Gram negative Bacteria		
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+ (50)
<i>Salmonella Enteritides</i>	-	-
Yeast		
<i>Candida tropicalis</i>	-	-
Filamentous fungi		
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	+ (50)
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-

-: No inhibition; +: inhibition halo until 8mm; ++: inhibition halo between 9 and 15mm; +++: inhibition halo larger than 15mm (according to²⁸). The values are the MIC of each supernatant tested, being all in mg/mL.

The phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* was inhibited by the cheese whey supernatant. Some strains of this fungus are responsible for severe vascular wilt or root rot diseases in many plants²⁹. *Fusarium* wilt caused by the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is one of the most devastating diseases of tomato³⁰. Synthetic chemical fungicides have long been used to reduce the incidence of plant diseases. However, the disadvantages of the chemical fungicides are being costly,

causing environmental pollution, and inducing pathogen resistance³¹. Novel natural antifungal compounds are necessary to be discovered, being the filamentous fungi valuable sources of small-size antifungal peptides. According to³² *Penicillium chrysogenum* produces an antifungal peptide, named PAF. In addition, other secondary metabolites could be produced with antifungal activity. There was no inhibition of the sporulation by the supernatants.

Another, biological activity was determined. The supernatants were tested against a strain of *Acanthamoeba polyphaga* (Fig. 1). *Acanthamoeba* causes human infections: granulomatous amebic encephalitis, a chronic fatal brain infection that occurs mostly in immunodeficient individuals; amebic keratitis, a sight-threatening corneal infection related to contact lens misuse and cutaneous, nasopharyngeal and systemic infections³³.



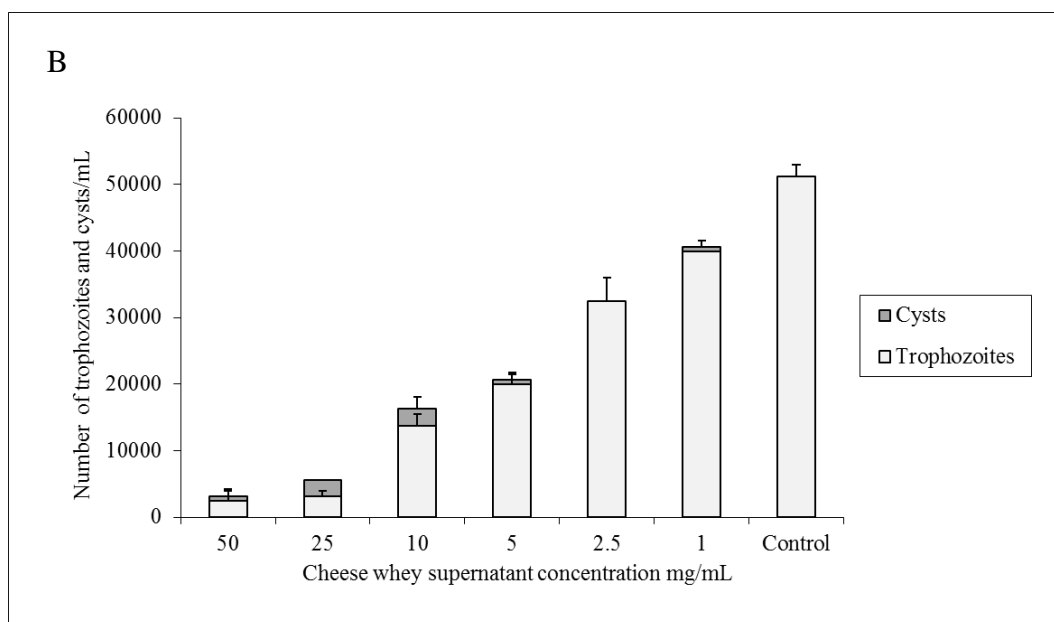


Fig. 1: Susceptibility of *A. polyphaga* a) grape waste supernatant and b) cheese whey supernatant. These graphs show 72 hours of treatment and the control was without supernatant addition. The cysts are showed in the dark bars and the trophozoites in the grey bars.

Both supernatants showed amebicidal activity, being more efficient in 72 h of culture of treatment and at higher concentrations, when the cysts formation occurred. All concentrations of the cheese whey supernatant showed decrease of trophozoites in 72 h. In the same time of treatment, the grape waste supernatant showed absence of trophozoites in the concentration of 50 mg/mL, while in the cheese whey presence of 2% of trophozoites in the control group. According to ³⁴ trophozoites encyst in double cellulose walls under adverse environmental conditions such as starvation, desiccation, extreme temperatures, and exposure to antimicrobial agents.

Most works of the literature report the amoebicidal activity of plant extracts as *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa*³⁵, *Allium scrodoprosum* subsp. *rotundum*³⁶, *Allium sativum*³⁷ and *Solidago virgaurea*, *Solidago graminifolia*, *Rubus chamaemorus*

and *Pueraria lobata*³⁸. In literature are few reports of fungal metabolites with amoebicidal activity, according to³⁴ his group has provided the first evidence that the metabolic product obtained from *Fusarium* sp Tlau3, an endophytic fungus isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl., a Thai medicinal plant, can effectively kill *Acanthamoeba* trophozoites in vitro.

Footprinting of metabolites and Penicillin G identification

It was realized a mass profile of the cheese whey supernatant to investigate the metabolites produced by this fungus. The footprinting of the most abundant metabolites was shown in fig. 2. First, a screening for metabolites commonly produced by this fungus was realized including roquefortine C, chrysogine³⁹, penicillin, PR toxin, secalonic acids⁴⁰, cyclopiazonic acid⁴¹, meleagrins, xanthocillins, sorbicillins, questiomycin, chrysogenin, negapillin, notatin, PAF and fungisporin⁴². According to⁴³ there are reports of the production of ochratoxin A, penicillic acid and patulin by some strains of *Penicillium chrysogenum*. Then, it was realized also the search for another metabolites produced using mass databases as found in^{44,45}.

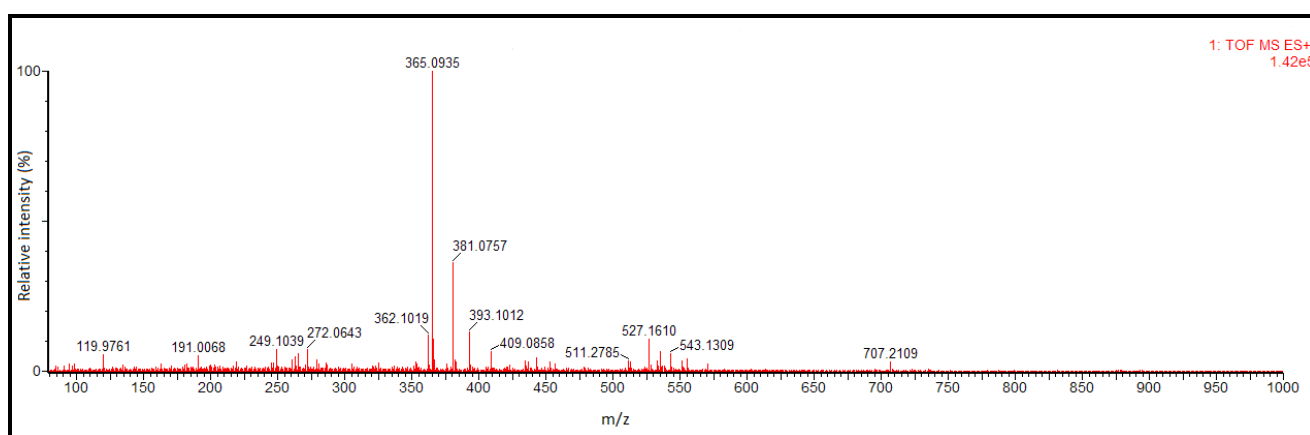


Fig. 2: ESI Q-TOF MS fingerprinting of produced metabolites by *Penicillium chrysogenum* on cheese whey. The spectrum shows the more abundant metabolites using an energy collision of 6V.

The protonated masses were compared with the literature data for protonated masses and are displayed in table 3. The biological activities of these metabolites are also listed in this table.

Table 3: Protonated masses found in the cheese whey extract and compared with masses of the literature

Sample m/z	Literature m/z	Compounds	Biological Activity	Reference
325.13	325.12	Formyl-xanthocilin X	Antiviral	Smedsgaard et al, 2004 ³⁹
335.12	335.11	Penicillin G	Antibiotic	Smedsgaard et al, 2004 ³⁹
337.17	337.16	Cyclopiazonic acid	Mycotoxin	Smedsgaard et al, 2004 ³⁹
351.18	351.20	Penicillin V	Antibiotic	Smedsgaard et al, 2004 ³⁹
543.13	543.13	Rugulosin	Antibiotic	Brunati et al., 2009 ⁴⁶

Masses of some mycotoxins as roquefortine C, secalonic acid, ochratoxin A, citrinin, PR toxin and patulin were not found in this extract. The presence of the mycotoxin ciclopiazonic acid was evidenced in the extract. Cyclopiazonic acid is a mycotoxin that has been isolated from numerous species of *Aspergillus* and *Penicillium*⁴⁷. The toxin has been found as a natural contaminant of corn and peanuts as well as of cheese colonized with *P. camemberti* or other *Penicillium* species. This fact explains the presence of this mycotoxins on cheese whey. Despite the production of mycotoxins, ⁴⁰ reported that *P. chrysogenum* does not appear to be a serious source of mycotoxins. In addition, there is a possibility to control the production of mycotoxins, trying to decrease or not producing them.

Rugulosin was first reported by the *Penicillium rugulosum*, has been reported as toxic to *Drosophila melanogaster* and to ovarian cells of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. It has been reported by many authors as an antibiotic to both Gram-positive and negative bacteria and is moderately antifungal⁴⁸. ⁴⁶reported the production of rugulosin by *P. chrysogenum* IWW 1053 and cited that there was no cytotoxicity in extracts containing rugulosin.

Penicillium chrysogenum has the ability to produce Penicillin G (PenG) and V, being both found in the extract. Previously, we investigated the presence of PenG in the grape waste and cheese whey supernatants. PenG was produced in both media as demonstrated using the HPLC technique (data not shown, ver anexo 1). The extract was initially submitted to aqueous two-phase extraction using PEG and ammonium sulphate solutions and after the HPLC analysis was realized with the PEG phase. There was production of PenG on grape waste and cheese whey, 1.6 mg and 0.5 mg in a 50 mL culture, respectively. The presence of PenG on cheese whey extract was also evidenced through the analysis of ESI-MS and ESI-MS/MS (Fig. 3). The presence of the mass of 335.1179 in the crude extract (c) and the same pattern of fragmentation of the penicillin standard (d) confirm the identity of this metabolite.

There are few studies about Xanthocillins. Xanthocillin X dimethylether and mono-methylether, which showed antiviral activity against Newcastle disease virus, vaccinia and herpes simplex viruses, are produced by *Aspergillus* sp and *Penicillium notatum* (synonymized as *Penicillium chrysogenum*). There are reports of the antibacterial activity also⁴⁹.

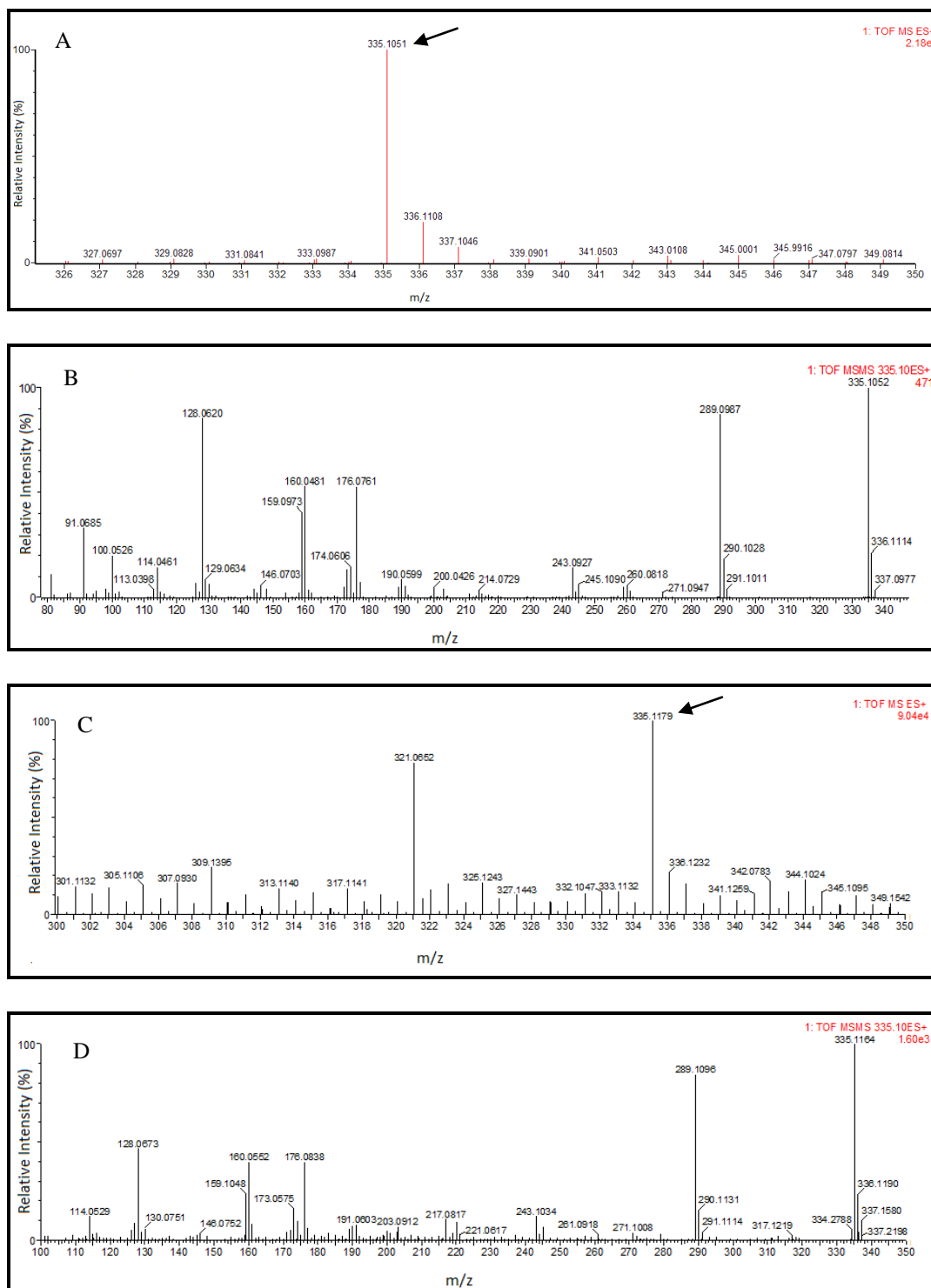


Fig 3: Spectra in a) TOF MS of penicillin standard; b) TOF MSMS of penicillin standard; c) TOF MS *Penicillium chrysogenum* on cheese whey extract showing the presence of penicillin with the mass 335.1179 and d) pattern of fragmentation using TOF MSMS of the penicillin found in the sample. The collision energy used was 6V and 25 V for TOF MS and TOF MSMS, respectively.

The fungus produces a number of unidentified secondary metabolites. None of the ions can be explained as protonated ions or sodium adducts from known metabolites or background ions. Background ions and ions from primary metabolites can be found in all extracts. These ions might represent metabolites produced by the organisms and can be used in the search of new metabolites in combinations with other analytical methods such as HPLC or ESMS/MS¹⁴.

This fungus produced active metabolites with antibacterial, antifungal and amoebicidal activities. Besides, some metabolites with antinseticidal and antifungal activities were also detected, showing that despite of the the long time of study of *Penicillium chrysogenum*, there are potential metabolites to be studied to be used as drugs or prototypes. According to⁵⁰ unexpected functions of known secondary metabolites are being unraveled and they have interesting applications in many lifethreatening diseases such as prion diseases, Alzheimer's disease, cancer (hepatoma, breast, hematopoietic, colorectal, gastric, pancreatic, leukemia, renal cell and other carcinomas, and fibrosarcoma), pulmonary disease, cardiovascular disease, parasitic diseases and viral diseases such as AIDS.

Conclusions

Then, this fungus is able to produce active metabolites in agro-industrial residues. *P. chrysogenum* produced PenG in cheap media as grape waste and cheese whey and other metabolites with other interesting activities that could be used as future successful compounds in medical and food industries and possible application in agriculture. More studies are necessary, as HPLC to separate the active compounds and to study separately each one.

References

- [1] Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 2008; 15: 639–652.
- [2] Song J. Introduction: the goals of antimicrobial therapy, *Int J infect Dis*. 2003; 7: 51-54.
- [3] Serra AT, Matias AA, Nunes AVM, Leitão MC, Brito D, Bronze R, Silva S, Pires A, Crespo MT, San Romão MV, Duarte CM. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol*. 2008; 9: 311–319.
- [4] Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol*. 2001: 71 1–20.
- [5] Pérez-García A, Romero D, Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms:biotechnological applications of Bacilli in agriculture, *Curr. Opin. Biotechnol*. 2011; 22:1–7.
- [6] Goodacre R, Trew S, Wrigley-Jones C, Saunders G, Neal MJ, Porter N, Kell DB. Rapid and quantitative analysis of metabolites in fermentor broths using pyrolysis mass spectrometry with supervised learning: application to the screening of *Penicillium chrysogenum* fermentations for the overproduction of penicillins, *Analytica Chimica Acta*. 1995; 313: 25-43.
- [7] El-Enshasy HA. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. In: Yang, ST (Editor). *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier, 2007:225-261.
- [8] Petit P, Lucas EMF, Abreu LM, Pfenning LH, Takahashi JA. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil, *Electron. J. Biotechnol*. 2009; 4:1-9.

- [9] Rancic A, Sokovic M, Karioti A, Vukojevic J, Skaltsa H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity, *Environ Toxicol Pharmacol*. 2006; 22:80–84.
- [10] Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF. Proteome Analysis of the Penicillin Producer *Penicillium chrysogenum*, *Mol. Cell. Proteomics* 9.6, DOI 10.1074/mcp.M900327-MCP200, 2010.
- [11] Bringmann G, Lang G, Gulder TAM, Tsuruta H, Mühlbacher J, Maksimenka K, Steffens S, Schaumann K, Stöhr R, Wiese J, Imhoff JF, Perovic-Ottstadt S, Boreiko O, Müller WEG. The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain, *Tetrahedron*. 2005; 61: 7252–7265.
- [12] Mapari SAS, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2005; 16:231-238.
- [13] Chen G, Pramanik BN, Liu YH, Mirza U. Applications of LC/MS in structure identifications of small molecules and proteins in drug discovery, *J. Mass spectrom*. 2007; 42:270-287.
- [14] Smedsgaard J, Frisvad JC. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomic and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts, *J. Microbiol.Meth*. 1996; 25: 5-17.
- [15] Nigam PS. Production of bioactive secondary metabolites. In: Poonam Singh nee' Nigam, Ashok Pandey (Ed), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Springer Science+ Business Media, 2009.
- [16] Nigam PS, Gupta N, Anthwal A. Pre-treatment of Agro-Industrial Residues, *In: Poonam Singh nee' Nigam, Ashok Pandey (Ed), Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Springer Science+ Business Media, 2009.

- [17] Dedavid e Silva LA, Lopes FC, Silveira ST, Brandelli A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009; 152:295-305.
- [18] Motta AS, Brandelli A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*, *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92:63-71.
- [19] Rouse S, Harnett D, Vaughan A, van Sinderen D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104: 915–923.
- [20] Becker-Ritt AB, Martinelli AHS, Mitidieri S, Feder V, Wassermann GE, Santi L, Vainstein MV, Oliveira JTA, Fiuza LM, Pasquali G, Carlini CR. Antifungal activity of plant and bacterial ureases, *Toxicon.* 2007; 50: 971–983.
- [21] Ródio C, Vianna DR, Kowalski KP, Panatieri LF, von Poser G, Rott MB. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (*Asteraceae*) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*, *Parasitol Res.* 2008; 104:191–194.
- [22] Senyuva HZ, Gilbert J, Öztürkoglu S. Rapid analysis of fungal cultures and dried figs for secondary metabolites by LC/TOF-MS, *Analytica chimica Acta.* 2008; 617:97-106.
- [23] Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.* 2001; 4:500–508.
- [24] Kanafani ZA, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges, from an Old Pathogen, *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24:182-93.
- [25] Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary, *J. Hosp. Infect.* 2009; 73:338-344.
- [26] Szpakowska M, Lasocki K, Grzybowski J, Graczyk A. A photodynamic activity of the haematoporphyrin derivative with rutin and arginine substituents (HpD-Rut2-Arg2)

against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Pharmacol. Res.* 2001; 44, doi:10.1006/phrs.2001.0855.

[27] Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Aznar R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples, *Int. J. Food Microbiol.* 2009; 135:15–21.

[28] Kim C, Jung H, Kim YO, Shin CS. Antimicrobial activities of amino acid derivatives of monascus pigments, *FEMS Microbiol Lett.* 2006: 117-124.

[29] Edel V, Steinberg C, Gautheron N, Recorbet G, Alabouvette C. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001; 36: 61-71.

[30] Mandal S, Mallick N, Mitra A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato, *Plant Physiol. Biochem.* 2009; 47: 642–649.

[31] Wang SL, Yen YH, Tsiao WJ, Chang WT, Wang CL. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source, *Enzyme Microbial Technol.* 2002; 31:337–344.

[32] Skouri-Gargouri H, Ali BM, Gargouri A. Molecular cloning, structural analysis and modelling of the AcAFP antifungal peptide from *Aspergillus clavatus*, *Peptides.* 2009; 30:1798–1804.

[33] Benitez LB, Caumo K, Brandelli A, Rott MB. Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*, *Parasitol. Res.* 2010, DOI 10.1007/s00436-010-2114-5.

[34] Boonman N, Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Chusattayanond AD. Acanthamoebicidal activity of *Fusarium* sp. Tlau 3, and endophytic fungus from *Thunbergia laurifolia* Lindl, *Parasitol. Res.* 2008; 103:1083-1090.

- [35] Goze I, Alim A, Dag S, Tepe B, Polat ZA. In vitro amoebicidal activity of *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa* on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells, *J Ocul Pharmacol Ther.* 2009, DOI: 10.1089/jop.2008.0132.
- [36] Polat ZA, Vural A, Tepe B, Cetin A. In vitro amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells, *Parasitol Res.* 2007; 101:397–402.
- [37] Polat ZA, Vural A, Ozan F, Tepe B, Özcelik S, Cetin A. In Vitro Evaluation of the Amoebicidal Activity of Garlic (*Allium sativum*) Extract on *Acanthamoeba castellanii* and its Cytotoxic Potential on Corneal Cells, *J Ocul Pharmacol Ther.* 2008; 24:8-14.
- [38] Derda M, Hadas E, Thiem B. Plant extracts as natural amoebicidal agents, *Parasitol Res.* 2009; 104:705–708.
- [39] Smedsgaard J, Hansen ME, Frisvad JC. Classification of Terverticillate *Penicillia* by Electrospray Mass Spectrometric Profiling, *Studies in mycology.* 2004; 49: 243-251.
- [40] Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage.* London New York: Springer Science + Business Media; 2009. p. 313-14.
- [41] Rundberget T, Skaar I, Flaoyen A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes, *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 90: 181– 188.
- [42] Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*, *Studies in mycology.* 2004; 49:201-241.
- [43] Barkai-Golan R. *Penicillium* Mycotoxins, *In: Mycotoxins in Fruits and Vegetables,* Rivka Barkai-Golan and Nachman Paster (Ed), Elsevier, 2008.
- [44] Nielsen KF, Smedsgaard J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid

chromatography–UV–mass spectrometry methodology, *J. Chromatogr. A.* 2003, 1002: 111–136.

[45] Vishwanath V, Sulyok M, Labuda R, Bicker W, Krska R. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.* 2009; 395:1355–1372.

[46] Brunati M, Rojas JL, Sponga F, Ciciliato I, Losi D, Göttlich E, Hoog S, Genilloud O, Marinelli F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes, *Marine Genomics.* 2009; 2: 43–50.

[47] Monaci L, Arestaa A, Palmisanoa F, Viscontib A, Zambonina CG. Amino-bonded silica as stationary phase for liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in fungal extracts, *J. Chromatogr. A.* 2002; 955:79–86.

[48] Sumarah MW, Adams GW, Berghout J, Slack GJ, Wilson AM, Miller JD. Spread and persistence of a rugulosin-producing endophyte in *Picea glauca* seedlings, *Mycol. Res.* 2008; 112: 731 – 736.

[49] Tatsuta K, Yamaguchi T. The first stereoselective total synthesis of antiviral antibiotic, xanthocillin X dimethylether and its stereoisomer, *Tetrahedron Lett.* 2005; 46:5017–5020.

[50] Vaishnav P, Demain AL. Unexpected applications of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 2010; 29: 223–229.

Supplementary Material

Expanded spectra of cheese whey ESI MS showing all the masses obtained in this study.

