ENYD CRYSTINA R. O. BENTIVOGLIO

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE FORMULAÇÕES DE LÍPIDES
CATIÔNICOS CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES,
FUNGOS E MICROALGAS DE INTERESSE MÉDICO HUMANO E
VETERINÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2016

ENYD CRYSTINA R. O. BENTIVOGLIO

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE FORMULAÇÕES DE LÍPIDES
CATIÔNICOS CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES,
FUNGOS E MICROALGAS DE INTERESSE MÉDICO HUMANO E
VETERINÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan
Huenuman

Versão Corrigida. A versão orinal eletrônica, encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de dissertações e teses da USP (BDTD).

São Paulo

2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bentivoglio, Enyd Crystina Rodrigues de Oliveira.

Atividade in vitro de formulações de lípidos catiônicos contra bactérias multirresistentes, fungos e microalgas de interesse médico humano e veterinário / Enyd Crystina Rodrigues de Oliveira Bentivoglio. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Nilton Erbert Lincopan Huenuman.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Alternativas terapêuticas com lípidos catiônicos.

Versão do título para o inglês: In vitro activity of cationic lipids formulations against multiresistant bacteria, fungi and microalgae from human and veterinary interest.

1. Candida albicans 2. Prototheca zopfii 3. Bactérias multirresistentes
4. 5. I. Huenuman, Nilton Erbert Lincopan II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0105/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Enyd Crystina Rodrigues de Oliveira Bentivoglio.

Título da Dissertação: Atividade in vitro de formulações de lípidos catiônicos contra
bactérias multirresistentes, fungos e microalgas de interesse
médico humano e veterinário.

Orientador(a): Nilton Erbert Lincopan Huenuman.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **640/14** referente ao projeto intitulado: *“Desenvolvimento e avaliação de formulações antifúngicas para o tratamento de micoses superficiais e onicomicoses”* sob a responsabilidade de **Enyd Crystina Rodrigues de Oliveira Bentivoglio**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DEDICO

A todos que me querem bem....

*Pela energia transmitida, pelas palavras de apoio, por cada pensamento em meu bem estar, pelas dicas,
pelo amor e pela força*

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial ao meu avô Albino, mesmo já não estando mais entre nós, por ter me dado amor durante minha vida inteira.

Aos meus cães Loba, Polar e Snow, por sempre me deixarem alegre quando eu estivesse para baixo.

Ao prof. Dr. Milton Lincopan e todos os integrantes do laboratório 240, em especial a Juan Aliaga e Jacinta pelas conversas, ajudas, dicas, sorrisos e amizade.

A prof. Dr. Kelly Ishida por ter me orientado enquanto as dúvidas mais profundas sobre fungos.

Ao prof. Dr. Fábio Poghiani e seu laboratório por ter entrado nessa empreitada!

Ao minhas amigas-irmãs de uma vida toda, Andréa Maya Oda Johnson e Caroline Castro Leite (e respectivas famílias), e ao meu namorado lindo Pablo Dámian Cordenons (e Família Feledi-Cordenons), que sempre me ajudaram e estiveram ao meu lado mesmo em momentos muito difíceis. É por vocês que sigo e ainda acredito na humanidade, *MUCHO OBRIGADA!*

Aos meus amigos que deixaram sempre a vida mais leve e me fizeram/ fazem conseguir olhar de uma forma diferente para os problemas mundanos, os: Leonardo Araújo, Daiana Damasceno, Caio Rangel, Jennifer Salguero, Camilla Sanches, Tiago Calixto, Luís Henrique Martins, Danni Santos e Martin Esquetino.

A Universidade de São Paulo, a CNPQ pelo financiamento, a Pós-Graduação, especialmente Sisele pela paciência e ajuda em todos os momentos, e a Teresa da Biblioteca, sempre salvando vidas!

A todos os que foram meus educadores ao longo de minha jornada e a todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas.

Finalmente, a todas as pessoas que sempre confiaram em mim, e me deram seu apoio em todo momento. Sem vocês, isto não seria possível.

Na vida não há o que temer, há o que compreender

Marie Curie

RESUMO

Bentivoglio ECRO. Atividade *in vitro* de formulações de lípides catiônicos contra bactérias multirresistentes, fungos e microalgas de interesse médico humano e veterinário. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Infecções microbianas podem ser causadas por bactérias, fungos, vírus e algas. O presente estudo avaliou a atividade *in vitro* de formulações de lípides catiônicos contra bactérias multirresistentes (MRs), fungos e microalgas de interesse médico humano e veterinário. A atividade biocida de bicelas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DBB) foi avaliada contra bactérias gram-negativas produtoras de β -lactamases de amplo espectro e carbapenemases mundialmente disseminadas. Para fungos (*Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*) e microalgas (*Prototheca zopfii*), a atividade biocida de DBB, sem e com a associação a drogas antifúngicas (ex., miconazol, terbinafina e anfotericina B), foi avaliada determinando-se adicionalmente a atividade sinérgica. Nanodispersões catiônicas de DBB exibiram atividade bactericida, fungicida e algicida, mesmo para patógenos MRs, sendo que a sua associação com outros antimicrobianos resultou em uma atividade sinérgica que poderia favorecer a produção de formulações com potencial para aplicação clínica humana e veterinária.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Trichophyton rubrum*. *Prototheca zopfii*. Bactérias multirresistentes. DBB. Terbinafina. Anfotericina B.

RESUMO

Bentivoglio ECRO. In vitro activity of cationic lipids formulations against multiresistant bacteria, fungi and microalgae from human and veterinary medical interest. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Microbial infections can be caused by bacteria, fungi, virus and algae. This study evaluated *in vitro* activity from cationic lipids formulations against multiresistant bacteria (MRs), fungi and microalgae from human and veterinary medical interest. The Biocidal activity from bromide dioctadecildimethylammonium biceles (DBB) was evaluated against gram-negative bacteria β -lactamases producers and carbapenemases from broad spectrum with wide spread dissemination. For fungi (*Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*) and microalgae (*Prototheca zopfii*), the biocidal activity from DBB with and without antifungal drugs (ex., miconazole, terbinafine e amphotericin B), was also evaluated by synergistic activity. Cationic nanodispersions of DBB has shown bactericidal, fungicidal and algicidal activity, even for MRs pathogens, thus, the association with the others antimicrobials resulted in a synergistic activity which could foment the production of the formulations with a potential application in human and veterinary medicine.

Keywords: *Candida albicans*. *Trichophyton rubrum*. *Prototheca zopfii*. Multiresistant Bacteria. DBB. Terbinafine. Amphotericin B.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Bactérias multirresistentes (MRs)	13
1.2 Antifúngicos e micoses superficiais	15
1.2.1 Drogas antifúngicas: anfotericina B, miconazol e terbinafina	16
1.3 Microalgas e infecções emergentes.....	18.
1.4 Lípides catiônicos e bicelas	19
2 OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Linhagens bacterianas, fungos e microalgas.....	22
3.2 Preparação de bicelas catiônicas de brometo de dioctadecildimetil amônio (DBB).....	22
3.3 Preparação de drogas antifúngicas.....	23
3.4 CBM – Concentração biocida mínima	23
3.5 Teste de sinergismo pelo método de microdiluição em caldo (“Checkerboard”)	24
3.6 Caracterização físico-química por “Light Scattering” e Potencial Zeta	25
3.7 Microscopia de Transmissão Eletrônica (MTE)	26
3.8 Espectroscopia de absorção óptica de UV visível para drogas	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Concentrações microbidas mínimas de DDB	27
4.1.1 Concentração bactericida mínima (CBM) de DBB.....	27

4.1.2 Concentração fungicida mínima (CFM) de DBB, drogas antifúngicas e suas combinações	23
4.1.3 Concentração algicida mínima (CAM) de DBB, terbinafina, anfotericina B e as suas combinações.....	26
4.2 Light scattering e Zeta Potencial	35
4.3 Microscopia de Transmissão Eletrônica	36
4.4 Determinação de espectro de absorção UV-visível da anfotericina B incorporada em bicelas catiônicas de DDA	38
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 Introdução

Os microorganismos convivem com o ser humano desde a origem da vida, colonizando diversos ambientes, tendo importante participação em processos biotecnológicos e de produção de alimentícia. Em contra partida, também tem sido partícipes de grandes catástrofes epidemiológicas de saúde pública mundial. (Gales et al., 2003; Gold et al., 1956)

Infecções microbianas reconhecem agentes etiológicos como bactérias, fungos, vírus, e algas. Muitos destes microorganismos têm estabelecido uma relação simbiótica com seus hospedeiros, sejam humanos ou outros animais, porém, situações de desequilíbrio fisiológico têm favorecido o estabelecimento de processos infecciosos de origem endógena. Da mesma forma, populações microbianas colonizam diferentes ecossistemas em que dividem com o homem e outros animais, podendo-se levar ao estabelecimento de infecções de origem exógena que tendem a disseminar dentro de uma população. (Dismukes, 2000; Gold et al., 1956; Klastersky, J, 2004)

Inicialmente, muitos dos processos infecciosos que atingiam aos seres humanos resultavam de agentes etiológicos desconhecidos, culminando ao estabelecimento de grandes epidemias e pandemias com altos índices de morbimortalidade. Com o início da Microbiologia como uma ciência, os avanços científicos da época levaram ao estabelecimento de técnicas que permitiram a identificação dos primeiros agentes infecciosos. Como consequência, os primeiros compostos antimicrobianos foram desenvolvidos, produzindo-se uma revolução na medicina. Entretanto, o uso exacerbado de tais compostos levou à emergência de microorganismos resistentes, os quais de forma rápida adaptaram-se para compartilhar e mobilizar os determinantes genéticos de resistência através de processos de transferência horizontal de genes conhecidos como conjugação e transformação. Este evento genético tem contribuído para o fenômeno da resistência adquirida, que na atualidade define um perfil de microorganismo multirresistente (Gales et al, 2003a; Theuretzbacher, 2012). Versáteis mecanismos de resistência aos antimicrobianos começaram a serem identificados mundialmente entre os diferentes microorganismos. Por outro lado, tolerâncias a agentes antimicrobianos puderam ser observadas desde o primeiro momento de utilização de uma droga (Davies, Davies, 2010).

Além da utilização em tratamentos terapêuticos na medicina humana, antimicrobianos são altamente utilizados na medicina animal; no tratamento profilático, como por exemplo, na agricultura, e animais de produção, entre outros. Consequentemente, atividades antropogênicas como descartes de resíduos industriais, desinfetantes e agentes antimicrobianos, acabam por contaminar o meio-ambiente (rios, solos, oceanos, etc) proporcionando grandes reservas ambientais de resistência. Um ambiente rico em diversidade microbiológica, como o esgoto, também pode favorecer a seleção de organismos resistentes (Davies, Davies, 2010; Fontes et al., 2011; Moura et al., 2010).

Ainda, uma problemática adicional relacionada a doenças infecciosas é a emergência de novos agentes etiológicos, os quais tem se estabelecido gradualmente de forma oportunista. De fato, muitos destes novos agentes têm sido identificados pela primeira vez em hospedeiros imunocomprometidos, por patologias de base ou processos invasivos (ex., transplantes, diálises) ou quimioterapias. (Davies, Davies, 2010)

1.1 Bactérias multirresistentes (MRs)

Bactérias MRs são classificadas como aquelas que expressam, pelo menos, resistência a três classes diferentes de antibióticos (Magiorakos et al., 2012).

Para conferir resistência bacteriana, adaptações moleculares foram desenvolvidas, como aquisição de DNA exógeno, através de plasmídeos, transposons ou ainda por captação direta e incorporação por recombinação homóloga, obtendo genes que codificam novas vias metabólicas, através da transferência gênica horizontal. Mutantes espontâneos de resistência existem desde um primeiro momento e podem espalhar em uma população bacteriana, tendo a possibilidade de selecionar clones endêmicos que podem originar surtos de infecção, muitas vezes adquirindo um caráter pandêmico (Frost et al., 2005; Moura et al., 2010).

Dentre as diferentes classes de antibióticos comercialmente disponíveis, os β -lactâmicos tem sido utilizados continuamente, tanto na prática médica (humana/veterinária) como no agronegócio, contribuindo para o aparecimento da resistência, onde o principal mecanismos em

bactérias gram-negativas está associado com a expressão de enzimas β -lactamases, muitas das quais são codificadas por genes adquiridos e mobilizados por plasmídeos (Al-Bayssari et al., 2015).

Atualmente, a disseminação de beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) e carbapenemases são um problema de saúde pública mundial. Enquanto dentre as ESBL as principais variantes endêmicas no Brasil são as CTX-M, nas carbapenemases há uma grande variedade de enzimas subdivididas bioquimicamente como serino-enzimas e metalo-beta-lactamase. Curiosamente, cada gênero tem adquirido preferencialmente um tipo de enzima. Por exemplo, *Klebsiella pneumoniae* expressa preferencialmente KPC, *Pseudomonas aeruginosa*, SPM; *Acinetobacter baumannii*, OXA; e *Escherichia coli*, CTX-M-15 (Potron, Poirel, Nordmann, 2015; Tängdén, Giske, 2015).

As principais espécies Gram-negativas que geralmente são associadas a infecções hospitalares são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter* spp (Gales et al., 2012; Girão et al., 2008; Kiffer et al., 2005; Lincopan et al., 2005, 2006; Pavez, Mamizuka, Lincopan, 2009; Rossi, 2011; Sader et al., 2001; Theuretzbacher, 2012). Devido à resistência aos carbapenêmicos e a dificuldade no desenvolvimento de novas drogas (Tillotson, 2008) a alternativa de alcançar efeitos sinérgicos entre as classes de antibióticos se fez necessária.

Carbapenêmicos são geralmente utilizados em tratamentos de pacientes com infecções hospitalares graves por serem antibióticos de amplo espectro de atividade, e por sua boa permeabilidade através da membrana externa bacteriana e estabilidade frente a muitas β -lactamases (Franco et al., 2010; Fritsche et al., 2005; Gales et al., 2003).

1.2 Antifúngicos e micoses superficiais

Micoses podem ser definidas pelo estabelecimento de infecções nas quais os fungos ultrapassam barreiras de resistência do corpo. Geralmente são oportunistas, uma vez que atingem preferencialmente pacientes com distúrbios e condições favoráveis, como por exemplo, pessoas

com imunodeficiências consequentes de processos fisiológicos, patologias de base, procedimentos invasivos e tratamentos com altas taxas de reações adversas como no caso da quimioterapia (Garcia-Cuesta, Sarrion-Pérez, Bagán, 2014; Pana, Farmaki, Roilides, 2014).

Antifúngicos podem ser agentes fungicidas ou fungistáticos, para os quais existe uma pequena quantidade de compostos comercialmente disponíveis, além de nem sempre possuírem toxicidade seletiva e acabando por ocasionar danos nas células do hospedeiro. Assim como para bactérias, o fenômeno da resistência também tem surgindo para os antifúngicos. De fato, algumas espécies de leveduras do gênero *Candida*, vêm desenvolvendo resistência a azóis como o fluconazol (Gonçalves et al., 2016). Igualmente, muitas das infecções superficiais, como as onicomicoses, resultam em falhas terapêuticas (Ameen et al., 2014; Gupta, Paquet, Simpson, 2015). Especificamente para onicomicoses, fatores como idade, diabetes mellitus, doenças vasculares, imunossupressão, psoríase e práticas de esporte, favorecem seu estabelecimento no hospedeiro suscetível (Milobratovic et al., 2013). Tais infecções podem ser classificadas em 5 grupos como: distal, superficial, proximal, candidal, e total. O caso mais comum é a distal (90% dos casos) seguida pela superficial (10% dos casos) (Schelfman, 1999)

Existem diversos tipos de tratamento para onicomicoses, como por exemplo a remoção física ou química, terapias com fármacos de uso oral, tópico ou também terapia fotodinâmica. Dentro destas variedades, é necessário saber qual o tipo de fungo causador da infecção, os riscos e os benefícios, para melhor direcionar o tratamento (Gupta, Paquet, Simpson, 2013). Para a escolha do antifúngico leva-se em consideração diferentes variáveis, tais como a espécie de fungo, idade, saúde do paciente, genética, quantidade de unhas afetadas e gravidade de lesões (Iorizzo, Piraccini, Tosti, 2010).

Alguns tratamentos com fármacos de indicação oral como griseofulvina, ketoconazol já não são mais utilizados. Fluconazol, itraconazol e terbinafina, são eficazes, porém trazem efeitos colaterais indesejáveis quando circulam pelo sangue. Uma vez que não são liberados diretamente no local, sua administração deve ser realizada por um período longo, seu efeito é limitado e frequentemente é associado à hepatotoxicidade (Schelfman, 1999; Gupta, Paquet, Simpson, 2013). Desta maneira, antifúngicos de uso tópico são alternativas para diminuir efeitos colaterais, sendo de entrega direta ao local infectado, favorecendo o seu uso durante terapias prolongadas, (Monti et al., 2011; Iorizzo, Piraccini, Tosti, 2010)

Representantes de fármacos de uso tópico, como por exemplo, a almorofina e o ciclopirox, não são tão eficazes em monoterapias por encontrarem barreiras para atravessar a unha e atingir a matriz da infecção (Gupta, Paquet, Simpson, 2015). Outros como clotrimazol e miconazol são de primeira escolha na terapia tópica (Dupont, 2006). Atualmente há formulações em esmaltes (que utilizam tioconazol, terbinafina, ciclopirox e amorolfina) que proporcionam melhorias quando são utilizados em conjunto com a terapia sistêmica (Shemer, 2012)

1.2.1 Drogas antifúngicas: anfotericina B, miconazol e terbinafina

Descoberta em 1953, e aprovada para utilização pela FDA (Food and Drug administration) em 1965, a anfotericina B continua sendo o principal antifúngico utilizado para infecções sistêmicas, embora seja altamente tóxica (Dismukes, 2000; Gold et al., 1956; Klastersky, J, 2004; Vandeputte, Wachtel, Stiller, 1956). Trata-se de um fármaco poliênico, anfipático, produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. A molécula possui uma estrutura macrocíclica, com 37 carbonos fechados por lactonização (Ganis et al., 1971; Asher, Schurartzman, 1977) (Figura 1). A sua atividade pode ser fungistática ou fungicida, dependendo do microorganismo em questão, e da concentração de pico sérico. Anfotericina B liga-se ao ergosterol onde altera a permeabilidade celular do fungo, induzindo a formação de poros nas membranas lipídicas, levando ao escape de íons potássio e metabólitos, e posteriormente a morte celular. É associada a efeitos colaterais, principalmente nefrotoxicidade, por possuir afinidade ao colesterol e outros componentes da célula mamífera (Brajtburg, Bolard, 1996). Devido a sua alta hidrofobicidade, a droga não solubiliza em meio aquoso (Hillery, 1997), se tornando então, pouco solúvel na grande maioria dos solventes, solubilizando somente em DMSO, vesículas de lectina, e esteróis de membranas naturais (Asher, Schurartzman, 1977).

Algumas espécies de *Candida* apresentam resistência ao fármaco, o que tem sido associada com a ausência de ergosterol e produção de enzimas capazes de degradar a droga (Young, Hull, Heitman, 2003; Pianscatelli, Hamdan, 1994)

A propriedade anfipática de anfotericina B permite a sua incorporação em lipossomos e formulações lipídicas, que diminuem a sua toxicidade (Larabi et al., 2004). Tal estratégia tem sido recorrentemente utilizada pelas indústrias em suas formas comerciais, como

Ambisome, Albecet e Amphocil. Ambisome consiste em uma formulação com lipossomos unilamelares compostos de HSPC (fosfatidilcolina hidrogenada de soja), DSPG (diéster fosfatidilglicerol) e colesterol (Bekersky et al., 1999). Albecet é um complexo de lipídeos com tamanho relativamente grande, aprovada em 1995 pela (FDA) Food and Drug Administration. Amphocil é formulado com sulfato de colesterila sódica formando um complexo estável com anfotericina B, em dispersão coloidal, que não permite que anfotericina B se ligue a células mamíferas, reduzindo a sua toxicidade (Bekersky et al, 1999; Hillery, 1997).

Figura 1 - Estruturas químicas dos antifúngicos, anfotericina B, miconazol e terbinafina, utilizados no presente estudo.

Miconazol foi o primeiro azól a ser introduzido em terapias fúngicas sistêmicas e, posteriormente, seu uso foi restrito para terapia tópica. A droga age inibindo a síntese do ergosterol da parede fúngica, e em altas concentrações pode também alterar a síntese de ácidos graxos, modificando funções de alguns grupamentos enzimáticos levando ao acúmulo de 14 α metil esteróis, o que ocasiona o rompimento do agrupamento das cadeias acil dos fosfolipídios. Seu uso é indicado no tratamento de candidiases, dermatofitoses e onicomicoses. Sua estrutura química (C₁₈H₁₄N₂O₂) deriva do imidazol (Figura 1), apresentando solubilidade na presença de solventes orgânicos, como por exemplo, metanol, porém é pouco solúvel em água e clorofórmio (Asher, Schurartzman, 1977). A terbinafina é uma alilamina sintética, amplamente utilizada no tratamento de onicomicoses, efetiva contra uma diversidade de fungos, como por exemplo, *Aspergillus spp.*, *Candida parapsilosis* e *Histoplasma capsulatum*, uma vez que inibe a esqualeno epoxidase na biossíntese do ergosterol, tendo efeito fungicida; porém, contra *C. albicans* possui ação fungistática. Estruturalmente, a droga é altamente lipofílica (Figura 1), o que contribui com a sua ação queratinofílica, sendo bastante eficaz contra dermatófitos. (Bennet, 2006). A droga foi primeiramente aprovada na Europa para uso em 1991, e nos EUA em 1996. (Balfour, Faulds, 1992; Bennet, 2006)

Em formulações de uso tópico, a retenção da droga no local de infecção se dá por um período curto, encontrando barreiras (como por exemplo *stratum corneum*) para acessar os sítios de infecções, afetando a efetividade da droga. (Gupta, Paquet, Simpson, 2015)

1.3 Microalgas e infecções emergentes

Agentes microbianos infecciosos de importância médica/veterinária podem englobar também microalgas, como por exemplo, a *Prototheca*. Trata-se de uma alga aclorofilada (o que pode vir a ser a razão de sua patogenicidade), dividida em quatro espécies: *zopffii*, *moriformes*, *wickerhamii*, e *stagnora*. (Pore et al, 1983, 1985), atualmente uma espécie derivada de *P. zopffii*, *P. blaschkheae* (Roesler, et al. 2006). Dessas, *wickerhamii* e *zopffii* são associadas a infecções mamárias em vacas, sendo a última mais comumente encontrada como agente infeccioso. Em

humanos, a *P. wickerhamii* infecta áreas cutâneas ocasionando feridas, articulações, ou ainda sistemas. (Thiele, Bergmann 2002; Lass-Flörl, Mayr, 2007). São classificados três tipos de *P. zopffii* onde o tipo II predomina em casos de mastite. (Jánosi et al, 2001a) Por possuir a parede celular mais espessa, a alga resiste a processos de pasteurização de leite, a digestões e aos principais antimicrobianos comercializados, levando assim, a distúrbios gastrointestinais em humanos que consomem o leite contaminado e a destruição das glândulas mamárias da vaca, a deixando para descarte ou reprodução (Costa, Ribeiro, 1999; Jánosi et al., 2001a; Kirk, Mellenberger, 2002). Agentes poliênicos, como Anfotericina B e Nistatina, apresentam resultados favoráveis contra a infecção *in vitro*, porém *in vivo* a susceptibilidade é baixa. Infecções por *Prototheca zopffii* geram um grande impacto na produção leiteira, tornando-se assim, alvo de muita preocupação. (Gomes et al., 1999; Jánosi et al., 2001a; Kirk, Mellenberger, 2002; Bexiga, Cavaco, L Vilela, 2003)

1.4 Lípidos catiônicos e bicelas

Lípidos catiônicos sintéticos são compostos versáteis com propriedades antimicrobianas e que podem ser utilizados para carregar drogas, antígenos e DNA (Carmona-Ribeiro, Vieira, Lincopan, 2006; Lincopan et al., 2009; Rezaee et al., 2016; Ghanbari, Hosseinkhani, 2013). Dentre eles, o brometo de dioctadecildimetilamônio (DBB) se caracteriza por ser um amônio quaternário que possui uma região altamente hidrofóbica permitindo-lhe interagir com diversos compostos. Como lipídio catiônico, possui duas longas cadeias hidrocarbonadas, altamente hidrofóbicas (C18) e uma cabeça polar catiônica hidrofílica com um contra-íon monovalente (Br⁻) (Figura 2). Sua conformação permite a formação de vesículas em solução aquosa, que quando sonicadas com sonda (Tip) transformam-se em fragmentos de bicamadas denominadas bicelas (Dürr, Gildenberg, Ramamoorthy, 2012) (Figura 2). Esses fragmentos de bicamada oferecem bordas hidrofóbicas que facilitam a solubilização de fármacos e substâncias lipofílicas (Lincopan, 2004). Por outro lado, a superfície catiônica das bicelas pode interagir eletrostaticamente com superfícies de carga oposta (Figura2).

O grupamento amônio quartenário possui efeito antimicrobiano amplamente conhecido, e são exemplos desse grupo os polieletrólitos, brometo de cetiltrimetilamônio, DBB e cloreto de dioctadecildimetilamônio (DDC). A resposta biocida atrelada a amônios quartenários anfifílicos se dá pela reversão de carga celular, de negativa para positiva, por serem compostos catiônicos. Já para a célula de mamíferos, sua toxicidade é mais baixa. (Russel, Hugo, Ayliffe, 1999, Campanhã, Mamizuka, Carmona-Ribeiro, 1999)

Brometo de dioctadecildimetilamônio (DDAB)

Brometo de dioctadecildimetilamônio Bicela (DBB)

Figura 2 - Estrutura do lípide catiônico brometo de dioctadecilamônio (DDA). Vesículas sonicadas de DDA formadas em solução aquosa dão origem a nanofragmentos de bicamada conhecidos como bicelas. A incorporação de drogas hidrofóbicas pelas bicelas pode acontecer nas bordas dos nanofragmentos de bicamada.

Como citado anteriormente, existe uma falta de compostos antimicrobianos de amplo espectro que atinjam diferentes tipos de procariotos e eucariotos patogênicos (fungos, parasitas e microalgas), sejam multirresistentes, oportunistas e/ou emergentes. Por um lado, bactérias clinicamente importantes tem adquirido resistência para grande parte dos compostos. Por outro, antifúngicos, antialagae e antiparasitários, além da quantidade reduzida de compostos comercialmente disponíveis, apresentam diversos problemas que afetam a efetividade dos esquemas terapêuticos, como por exemplo, a difícil solubilização, toxicidade, pobre absorção e resistência apresentada por algumas espécies. Estes fatos fazem com que a busca por novas formulações seja digna de ser investigada. Assim, bicelas de lípides sintéticos podem ser versáteis e veículos menos onerosos de apresentação e solubilização de drogas hidrofóbicas, apresentando atividade antimicrobiana adicional. Embora, tanto a atividade antimicrobiana como o efeito sinérgico e capacidade de solubilizar drogas, das bicelas de DDA (DBB) tenham sido previamente demonstradas, o presente estudo foi conduzido para contribuir com informação adicional, estudando especificamente a atividade de DBB contra bactérias multirresistentes expressando beta-lactamases de amplo espectro e carbapenemases mundialmente endêmicas. Sua atividade foi também avaliada pela primeira vez contra microalgas do gênero *Prototheca*, visando “a priori” uma aplicação em medicina veterinária e, adicionalmente o efeito sinérgico associado à incorporação de anfotericina, miconazol e terbinafina foi explorada contra *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Prototheca zopfii*.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* de formulações de lípides catiônicos (baseadas no uso de bicelas com e sem associação de drogas) contra bactérias multiresistentes de interesse médico humano e veterinário, agentes de micoses superficiais e microalgas causadoras de mastite bovina.

2.1 Avaliar a atividade *in vitro* de bicelas de lípides catiônicos contra bactérias multirresistentes, fungos e microalgas.

2.2 Avaliar o efeito sinérgico de combinações de antifúngicos com bicelas de lípides catiônicos contra fungos leveduriformes.

2.3 Caracterizar a incorporação de drogas antifúngicas por espalhamento de luz dinâmico e carga superficial.

2.4 Avaliar mudanças de carga superficial em bactérias multirresistentes induzidas pelo tratamento com DBB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas, fungos e microalgas

Linhagens de bactérias Gram-negativas foram selecionadas a partir de uma coleção de enterobactérias e não-fermentadoras com perfil de multirresistência associada com a produção de beta-lactamases de amplo espectro e/ou carbapenemases. Algumas linhagens utilizadas no presente estudo foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ana C Gales (UNIFESP), Prof. Dr. Jorge Sampaio (FCF-USP) e Doroti Garcia de Oliveira (IAL-SP).

As linhagens leveduriformes do gênero *Candida*, como *C. albicans* sc5314, *C. parapsilosis* 22019 e *C. albicans* 14053 foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Kelly Ishida (ICB-USP), e finalmente as linhagens *C. abicans* 10231, *C. abicans* 90028 e *C. abicans* MLR62 foram cedidas pela Profa. Dr. Martha Ribeiro (IPEN-USP). A linhagem de *Trichophyton rubrum* foi obtida na micoteca do Prof. Dr. Carlos Taborda (ICB-USP). Todas as linhagens de *Prototheca zopffii* envolvidas nesta pesquisa foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Márcio García (UNESP-Botucatu).

3.2 Preparação de bicelas catiônicas de brometo de dioctadecildimetil amônio (DBB)

Bicelas de DDA foram preparadas em solução aquosa de tampão IGP (Isotonic Glucose Phosphate). Um litro deste tampão foi preparado através de uma mistura de fosfato de potássio monobásico 1 M (KH₂PO₄) e fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 1 M suplementado com

51,66 g de glicose (Lincopan, Carmona-Ribeiro, 2006). A concentração final do lípide catiônico em tampão IGP foi 2 mM (1,24 mg/mL). Vesículas do lípide catiônico brometo de dioctadecildimetil amônio (Sigma-Aldrich), formadas em solução aquosa, foram submetidas a sonicação com macrotip (25% de amplitude, 25 minutos, temperatura ambiente) para formação de nanofragmentos de bicamada coloidalmente estáveis. Após a sonicação, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos, sendo posteriormente filtrada em tubo Falcon 50 mL, utilizando-se um filtro Millipore de 0,45 µm de diâmetro (Lincopan, Carmona-Ribeiro, 2006).

3.3 Preparação de drogas antifúngicas

Miconazol (Sigma-Aldrich) foi solubilizado em etanol 37% na concentração final de 1 mg mL⁻¹ e armazenado a -20 °C. Anfotericina B, foi solubilizada em solução 1:1 de metanol/DMSO e posteriormente armazenada a -20 °C com ausência de luz. A terbinafina foi solubilizada em DMSO na concentração final de 1600 µg/mL. Para a incorporação de terbinafina em DBB, foi adicionado 1 mg de terbinafina em 20 ml de uma solução de DBB 10 mg/ml, sendo sonicada por 10 segundos. Já, para incorporação de Anfotericina B em nanopartículas de DBB, 1 mg de Anfotericina B foi incorporada em uma solução de 10 mg/mL de DBB, sendo sonicada por 10 segundos.

3.4 CBM – Concentração biocida mínima

Para a determinação da concentração bactericida (CBM), fungicida (CFM) e algicida (CAM), para os agentes antimicrobianos, inicialmente foi utilizado o método de microdiluição em caldo, seguindo as normas padronizadas do CLSI (2009), com posterior determinação da viabilidade microbiana por subcultivo em placas de ágar Mueller-Hinton ou Sabouraud. Na etapa de microdiluição foram incorporadas modificações relacionadas ao uso de meio de baixa força iônica (tampão IGP) considerando a natureza catiônica das bicelas de DDA. As linhagens bacterianas foram repicadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas por 24 hs em estufa a 37 °C. Colônias isoladas foram selecionadas e semeadas em 3 mL de caldo Mueller-Hinton e incubadas

a 37 °C, por 24 hs sob agitação constante em *shaker* rotativo a 150 rpm. Para o teste de microdiluição, inocularam-se colônias em caldo Mueller-Hinton para alcançar a turbidez padrão de 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL), e posteriormente os inóculos foram centrifugados e lavados com IGP. Cada inóculo bacteriano foi diluído em uma proporção de 1:10. Diluições seriadas dos antimicrobianos foram previamente realizadas em IGP e distribuídas em um volume de 100 µL das respectivas concentrações em microplaca de 96 poços, acrescentando-se ao final, 5 µL do inóculo bacteriano previamente preparado. Os critérios de interpretação foram baseados no documento CLSI (2011).

As colônias fúngicas foram inoculadas em meio líquido Sabouraud para crescimento, ao passo que para as colônias de *Prototheca zopfii*, utilizou-se a adição de 25% de tween ao IGP. Posteriormente foram lavadas duas vezes com tampão IGP (Isotonic Glucose Phosphate, 1mM de Tampão Fosfato de Potássio, pH 7.0 suplementado com 287 mM de glicose). A turbidez foi ajustada até alcançar o valor padrão 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Diluições seriadas das combinações antifúngicas foram realizadas em IGP ao invés do RPMI preconizado e plaqueado 100 µL de cada concentração em poços de placa de ELISA estéril. Foram adicionado 100 µL do inóculo diluído 1:50 e 1:20. Os critérios de interpretação foram baseados no documento CLSI (2013). Para linhagens bacterianas, mudaram-se as diluições de acordo com documento CLSI (2011). Foram ajustadas na escala McFarland e posteriormente diluídas em uma proporção de 1:10, de onde foram retirados 5 microlitros para inoculação nas respectivas variedades de concentrações de antimicrobianos.

A atividade biocida dos compostos foi determinada pela inoculação de 10 µl (de cada poço) de cada suspensão microbiana mantida em contato com os diferentes compostos, após 24 hs de interação, sobre placas contendo ágar Mueller-Hinton (Bactérias) ou Sabouraud (Algas e Fungos). As placas foram incubadas então por 24 hs a 37 °C e a concentração biocida mínima (CBM, CFM, CAM) foi interpretada pela ausência de crescimento microbiano na menor concentração dos compostos em contato com os agentes microbianos.

3.5 Teste de sinergismo pelo método de microdiluição em caldo (“Checkerboard”)

Para realizar a combinação dos compostos antifúngicos foi utilizado o método de microdiluição seguindo as normas padronizadas do CLSI (2009), porém ao invés da utilização de RPMI tamponado com MOPS ou caldo Muller-Hinton, foi realizado em tampão IGP. Todos os testes foram executados sempre em duplicata. As colônias (algas e fungos) foram inoculadas em meio líquido Sabouraud (quando bactérias – Muller-Hinton) para crescimento, posteriormente lavadas duas vezes com tampão IGP. A turbidez foi ajustada até alcançar o valor padrão 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). As diluições seriadas dos antifúngicos e de DBB também foram realizadas em tampão IGP, quando para algas, 25% de tween foi adicionado ao tampão. Em seguida a suspensão foi pipetada em cada poço de microplaca de 96 poços estéril, acrescentando-se a mesma concentração do segundo antifúngico. As microplacas com as diferentes combinações de antifúngicos, nas diferentes concentrações, permaneceram então incubados por 48 hs. A interpretação do sinergismo entre os antifúngicos foi medida pelo índice de Concentração Fungicida Fracional (FFC), onde é feito o cálculo da somatória dos índices de FFC A e B (Σ FFC) (Hall *et al.*, 1983), onde: $FFC (A \text{ ou } B) = CFM \text{ do } A \text{ (ou } B) \text{ em combinação} / FFC \text{ do } A \text{ (ou } B) \text{ sozinho}$, sendo que, $\Sigma FFC \leq 0,5$ = efeito sinérgico; ΣFFC entre $> 0,5 - \leq 0,75$ = efeito parcialmente sinérgico; $\Sigma FFC \geq 4,0$ = antagonismo e; ΣFFC entre $0,75 - 4,0$ = indiferente.

3.6 Caracterização físico-química por “Light Scattering” e Potencial Zeta

Os ensaios de “Light Scattering” (DLS ou Espalhamento de Luz Dinâmico) e Potencial Zeta foram realizados com o objetivo de inferir sobre a interação entre compostos apresentando atividade sinérgica, *in vitro*, assim como, para caracterizar interações antimicrobianas. A técnica “Light Scattering” permite determinar a distribuição de tamanhos das partículas em dispersão. O Potencial Zeta fornece dados sobre a carga superficial (em mV) destas partículas, permitindo inferir sua interação molecular por forças de interação mediada por atração eletrostática e/ou hidrofobicidade (Weiser, Merrifield, 1950). Todas as análises foram realizadas usando o equipamento ZetaPlus-Zeta Potential Analyzer. Todos os compostos foram preparados em água deionizada qualidade Milli-Q e/ou em IGP. Foram realizados ensaios de espalhamento de luz dinâmico para a determinação do tamanho das partículas, e suas respectivas cargas superficiais foram obtidas utilizando o sistema ZetaPals-Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments

Corporation, Holtsville, NY), que contém um laser de 570 nm e espalhamento de luz dinâmica a 90 °. O antimicrobiano e as linhagens bacterianas foram preparadas em tampão IGP em diferentes concentrações. Para as linhagens *P. aeruginosa* 48-1997A (SPM-1) e *Enterobacter hormaechei* (E0083033-1) NDM-1 a turbidez padrão de escala 0,5 de MacFarlan foi alcançada e posteriormente ambas linhagens foram diluídas 1:10 no mesmo tampão citado, todas com volume final de 2 mL. As combinações avaliadas tiveram como base uma concentração bacteriana fixa para uma concentração de DBB ($\mu\text{g/mL}$) correspondente a CBM, CBMx2 e CBM/2. As leituras foram realizadas após uma hora de interação DBB-bactéria a 37 °C.

3.7 Microscopia de Transmissão Eletrônica (MTE)

A caracterização microscópica de *P. aeruginosa* 48-1997A (SPM-1) com e sem tratamento (DBB) foi realizada através de microscopia de transmissão eletrônica. Uma suspensão bacteriana em crescimento exponencial foi centrifugada a 5.000 rpm x 5 min em centrifuga refrigerada. A suspensão foi fixada a 1×10^8 ufc/mL e uma alíquota foi tratada com DBB 4 $\mu\text{g/mL}$ (1 h, 37 °C, em IGP) e uma outra alíquota se manteve sem tratamento (controle). Ambas suspensões foram lavadas por centrifugação, duas vezes, em acetato de amônio 0.1 M, pH 7.0 (Sigma), e os sedimentos foram depositados em grades de cobre revestidas de filme de carbono, coradas com 2% de fosfotungstato de potássio, pH 7.2 (Sigma), e posteriormente examinadas no Microscópio Eletrônico EM1011 (JEOL USA) em 60kV.

3.8 Espectroscopia de absorção óptica de UV visível para drogas

Moléculas caracterizam-se por possuir níveis moleculares quantizados, permitindo que a radiação seja detectada através da absorção da diferença entre os dois níveis de energia, ou seja, quando a molécula volta do seu estado excitado para o seu estado fundamental. A região que abrange UV visível é de até 180nm de comprimento de onda. O espectro de absorção da substância que foi avaliada é maior devido a sua capacidade de absorver mais comprimentos de

ondas em relação a um cromóforo por exemplo. Devido a essa alta capacidade, a espectroscopia foi realizada com λ até 450 nm. (Ohlweiler, 1981)

Para determinar o espectro óptico de Anfotericina B. e verificar se a mesma estava estável após incorporação em DBB, foi utilizado o espectrofotômetro DU800 Beckman Coulter.

4 RESULTADOS

4.1 Concentrações microbidas mínimas de DBB

4.1.1 Concentração bactericida mínima (CBM) de DBB

Foi determinada a CBM do DBB contra uma coleção de bactérias MRs produtoras de carbapenemases mundialmente disseminadas: *Acinetobacter baumannii* (OXA-23, OXA 58, OXA-72, OXA-143, SIM-1), *Escherichia coli* (CMY-2, KPC-2 e CTX-M-15), *Enterobacter cloacae* (VIM-2), *Klebsiella pneumoniae* (IMP-1, KPC-2, OXA48), *Pseudomonas aeruginosa* (GES-5, GIM-1, KPC-2 e SPM-1), *Providencia rettgeri* (KPC-2), *Proteus mirabilis* (KPC-2). Nas tabelas 1-3, são apresentadas as MBCs para as linhagens bacterianas estudadas. Para bactérias não fermentadoras como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* expressando oxacilinases ou carbapenemases, a CBM do DBB variou de 4-16 e 4-64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 1-2). Para enterobactérias expressando metalo-beta-lactamases, serino-carbapenemases, e ESBLs houve variação na CBM de DBB de 2-64 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3).

Tabela 1 - CBM de DBB para linhagens de *A. baumannii* produtoras de oxacilinases e metalo-beta-lactamases

Cepas	Carbapenemase	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (LDC)	OXA-23	4
<i>Acinetobacter baumannii</i> (FCF/1)	OXA-58	4

<i>Acinetobacter baumannii</i> (FCF/4347)	OXA-72	16
<i>Acinetobacter baumannii</i> (FCF/804)	OXA-143	16
<i>Acinetobacter baumannii</i> (controle)	SIM-1	4
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (H2)	KPC-2	4

Tabela 2 - CBM de DBB para linhagens de *P. aeruginosa* produtoras de serino-carbapenemases e metalo-beta-lactamases.

Cepas	β -lactamase (tipo)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (control)	GIM-1(Metalo-beta-lactamase)	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CIB/10; CIB/22; CIB/28; CIB/30; CIB/36; CIB/316; IIER/316; IIER/327)	SPM-1 (Metalo-beta-lactamase)	4-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GES-5 (Carbapenemase)	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC-2 (Carbapenemase)	64

Tabela 3 - CBM de DBB para linhagens de *enterobactérias* produtoras de carbapenemases e beta-lactamases de amplo espectro e *E. coli* ATCC 25922

Cepas	β -lactamase (tipo)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	4
<i>Escherichia coli</i> (EC-4)	CMY-2 (AmpC)	2

<i>Escherichia coli</i> (ICB-2)	KPC-2 (Carbapenemase)	4
<i>Escherichia coli</i> 005	CTX-M-15 (ESBL)	16
<i>Enterobacter aerogenes</i> (control)	VIM-1 (Metallo-beta-lactamase)	8
<i>Enterobacter hormaechei</i> (E0083033-1)	NDM-1 (Meta-beta-lactamase)	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPBR-1)	IMP-1 (Meta-beta-lactamase)	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (BA1705)	KPC-2 (Carbapenemase)	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48 (Carbapenemase)	64
<i>Providencia rettgeri</i> 190056	KPC-2 (Carbapenemase)	8
<i>Proteus mirabilis</i> 62	KPC-2 (Carbapenemase)	32
<i>Serratia marcescens</i> 170	KPC-2 (Carbapenemase)	64

Miconazol, terbinafina e anfotericina B foram avaliados separadamente e em combinação com nanopartículas de DBB contra linhagens de fungos. As CFMs de DBB, terbinafina e miconazol foram determinadas utilizando-se 7 cepas de fungos leveduriformes. As linhagens de fungos leveduriformes utilizadas nos testes foram: *Candida albicans* SC5314; *Candida albicans* 14053; *Candida albicans* 10231; *Candida albicans* MLR62; *Candida albicans* 90028 e *Candida parapsilosis* 22019; *Candida albicans* IAL2151 (floconazol-resistente). Foi utilizado *Trichophyton rubrum* como representante dos fungos filamentosos para avaliação da atividade do DBB e miconazol separadamente. A combinação DBB/terbinafina foi avaliada contra três espécies de *Candida*.

Para *C. albicans* sc5314 terbinafina teve uma atividade fungicida na concentração de 32 µg/ml, ao passo que em combinação com DBB tornou-se fungicida em 2 µg/ml. DBB independentemente demonstrou ação fungicida em 16 µg/ml, ao passo que em combinação essa concentração foi reduzida para 4 µg/ml (Tabela 4).

Tabela 4 - CFM de DBB e terbinafina para linhagens de *Candida albicans* e determinação da atividade sinérgica de suas combinações*

* Índice de Concentração Fungicida Fracional (FFC) e somatória dos índices de FFC A e B (Σ FFC) (Hall et al., 1983). FFC (A ou B) = CFM do A (ou B) em combinação / FFC do A (ou B) sozinho, sendo que, Σ FFC $\leq 0,5$ = efeito sinérgico; Σ FFC entre $> 0,5 - \leq 0,75$ = efeito parcialmente sinérgico; Σ FFC $\geq 4,0$ = antagonismo e; Σ FFC entre $0,75 - 4,0$ = indiferente.

Cepas	Combinação (A x B)					
	Terbinafina x DBB [μ g/mL]					
	CFM A (*)	CFM B (*)	FFC A	FFC B	Σ FFC (FFC A + FFC B)	Interpretação
<i>C. albicans</i> sc5314	32 (2)	16 (4)	0,06	0,25	0,31	Sinérgico
<i>C. albicans</i> 10231	64 (1)	16 (16)	0,01	1	1,01	Indiferente
<i>C. albicans</i> IAL2151	32(2)	16 (8)	0,0625	0,5	0,562	Parcialmente Sinérgico
<i>C. albicans</i> MLR62	64 (64)	4(2)	1	0,5	1,5	Indiferente
<i>C. albicans</i> 90028	64 (16)	32(32)	0,25	1	1,25	Indiferente

Quando testada contra *C. albicans* 10231, a atividade da terbinafina em combinação com DBB foi ainda mais reduzida (1 μ g/ml) para atingir um efeito fungicida, em comparação a terbinafina sozinha, a qual apresentou atividade fungicida na concentração de 64 μ g/mL. Para esta linhagem, a CFM de DBB se manteve com o mesmo valor de 16 μ g/ml, tanto em combinação, assim como quando não associado a terbinafina. Já para a linhagem de *C. albicans* IAL2151 (fluconazol resistente), houve uma redução de 4x da CFM da terbinafina (de 32 para 8 μ g/ml) quando associada a DBB, e de 1x para DBB (16 para 8 μ g/ml) (Tabela 4).

Adicionalmente, para avaliar o efeito sinérgico foram realizadas combinações de DBB com miconazol e posteriormente testadas em 6 linhagens leveduriformes. Tal combinação se mostrou sinérgica para todas as linhagens em questão. As linhagens utilizadas foram: *Candida albicans* SC5314; *Candida albicans* 14053; *Candida albicans* 10231; *Candida albicans* MLR62; *Candida albicans* 90028 e *Candida parapsilosis* 22019 e *Candida albicans* IAL2151 (fluconazol-resistente). Os valores obtidos separadamente, conjuntamente, bem como os valores das concentrações fungicidas fracionais (FFC) e seus respectivos somatórios (Σ FFC) são apresentados na Tabela 5. Com relação a isto, a combinação DBB/miconazol teve uma atividade sinérgica e parcialmente sinérgica.

Tabela 5 - CFM do miconazol e efeito sinérgico da associação DBB/miconazol

Cepas	Combinação (A x B) ^a					
	Miconazol x DBB (µg/mL)					Interpretação ^c
	CFM A (*)	CFM B (*)	FFC A	FFC B	ΣFFC (FFC A + FFC B)	
<i>C. albicans</i> sc5314	16 (4)	8 (2)	0,25	0,25	0,50	Sinergismo
<i>C. albicans</i> 14053	8 (2)	64 (32)	0,25	0,5	0,75	Parcialmente sinérgico
<i>C. albicans</i> 10231	16 (8)	16 (2)	0,5	0,125	0,625	Parcialmente sinérgico
<i>C. albicans</i> MLR62	8 (2)	4 (0,5)	0,25	0,25	0,50	Sinergismo
<i>C. albicans</i> 90028	16 (2)	2 (0,25)	0,125	0,125	0,25	Sinergismo
<i>C. albicans</i> IAL2151	16 (1)	128 (8)	0,0625	0,0625	0,125	Sinergismo
<i>C. parapsilosis</i> 22019	16 (8)	32 (0,5)	0,5	0,015	0,515	Parcialmente sinérgico
<i>T. rubrum</i>	1	2	NR	NR	NR	NR

^a FFC (A ou B) = CFM do A (ou B) em combinação / FFC do A (ou B) sozinho, sendo que, $\Sigma FFC \leq 0,5$ = efeito sinérgico; ΣFFC entre $> 0,5 - \leq 0,75$ = efeito parcialmente sinérgico; $\Sigma FFC \geq 4,0$ = antagonismo e; ΣFFC entre $0,75 - 4,0$ = indiferente. * Concentração fungicida mínima de miconazol em combinação com DBB.

Para avaliar a atividade fungicida mínima da anfotericina B foram testadas duas formulações baseadas na solubilização direta da anfotericina B nas bicelas de DDA (AnB/DBB) ou utilizando a mistura convencional dos solventes DMSO:metanol (1:1). Ambas formulações apresentaram atividade fungicida. Em quanto que a CFM de AnB/DBB vario entre 0,02-6,25

$\mu\text{g/mL}$, a CFM da anfotericina B solubilizada em solvente orgânico vario entre 0,25-4 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6).

Tabela 6 - CFM da anfotericina B solubilizada em DBB*

Cepa	CFM de Anfotericina B em DBB ($\mu\text{g/mL}$)	CFM de Anfotericina B em DMSO:Metanol (1:1) ($\mu\text{g/mL}$) ^b
<i>Candida albicans</i> IAL2151 ^a	0,78	4
<i>Candida albicans</i> MLR62	6,25	-
<i>Candida albicans</i> 10231	0,09	0,25
<i>Candida albicans</i> 90028	6,25	4
<i>Candida albicans</i> sc5314	0,1	-
<i>Candida parapsilosis</i> 22019	0,02	4

* Anfotericina B foi solubilizada diretamente nas bicelas de DDA sem uso de solvente orgânico na proporção de 1:400 (Anfotericina B:DDA).

^a Fluconazol resistente.

^b Valores de CFM foram obtidas de prévios estudos (Lincopan et al., 2006; Tabbene et al., 2015).

4.1.3 Concentração algicida mínima (CAM) de DBB, terbinafina, anfotericina B e as suas combinações.

Inicialmente, foi testada a atividade algicida de DBB e anfotericina B, separadamente para 10 linhagens da microalga *Prototheca zopfii*. Os resultados são apresentados na tabela 7. Anfotericina B foi incorporada diretamente em DBB (proporção de 1:400) ou solubilizada em DMSO:metanol (1:1). A CAM de AnB/DBB variou de 0,024 – 0,1 µg/ml, enquanto que a CAM de AnB/DMSO:metanol foi maior variando entre 4 – 8 µg/ml (Tabela 7).

Tabela 7 - Atividade algicida (CAM) de Anfotericina B, DBB e AnB/DBB

Cepa	CAM (µg/mL)		
	DBB	AnB (DMSO:metanol, 1:1)	AnB/DBB
<i>Prototheca zopfii</i> 2	8	4	0,04
<i>Prototheca zopfii</i> 6	16	8	0,1
<i>Prototheca zopfii</i> 8	16	8	0,04
<i>Prototheca zopfii</i> 11	16	8	0,04
<i>Prototheca zopfii</i> 12	16	8	0,024
<i>Prototheca zopfii</i> 15	16	4	0,1
<i>Prototheca zopfii</i> 38	16	4	0,04
<i>Prototheca zopfii</i> 54	16	8	0,04

Posteriormente, foram aleatoriamente escolhidas duas cepas de *P. zopfii* para a avaliação de um possível efeito sinérgico entre DBB e anfotericina B. Foi observado um efeito parcialmente sinérgico e indiferente para as cepas *P. zopfii* 40 e 4, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação do efeito sinérgico de Anfotericina B e DBB contra microalgas do gênero *Prototheca*^a

Cepas	Combinação (A x B)					
	Anfotericina B x DBB (µg/mL)					
	CAM A (*)	CAM B (*)	FAC A	FAC B	ΣFAC (FAC A + FAC B)	Interpretação
<i>Prototheca zopfii</i> 4	4(4)	16(0,5)	1	0,03	1,03	Indiferente
<i>Prototheca zopfii</i> 40	2 (0,25)	16(8)	0,125	0,5	0,625	Parcialmente sinérgico

^a FAC (A ou B) = CAM do A (ou B) em combinação / FAC do A (ou B) sozinho, sendo que, $\Sigma\text{FAC} \leq 0,5$ = efeito sinérgico; ΣFAC entre $> 0,5 - \leq 0,75$ = efeito parcialmente sinérgico; $\Sigma\text{FAC} \geq 4,0$ = antagonismo e; ΣFAC entre $0,75 - 4,0$ = indiferente. * Concentração algicida mínima de anfotericina B em combinação com DBB.

4.2 Light scattering e Zeta Potencial

A Tabela 9 apresenta os resultados referentes aos diâmetros médios e carga superficial de DBB, bactérias e as suas combinações. Fica evidente que nanofragmentos catiônicos de DBB interagem com a superfície bacteriana carregada negativamente produzindo a cationização da bactéria com subsequente perda da viabilidade, a que nos ensaios de espalhamento de luz dinâmico foi observada como diminuição do tamanho bacteriano, muito provavelmente consequência da destruição e fragmentação das células.

Tabela 9 - Diâmetro médio e potencial zeta das cepas bacterianas, DBB e a sua combinação

Combinação		Diâmetro médio	Potencial zeta
Cepa (carbapenemase)	DBB ($\mu\text{g/mL}$)	$\pm$ DS (nm)	$\pm$ DS (mV)
-	1240	$159,8 \pm 6,5$	$36,38 \pm 1,23$
<i>Enterococcus hormaechei</i> (NDM-1)	-	$788,2 \pm 23,8$	$-23,72 \pm 2,33$
<i>Enterococcus hormaechei</i> (NDM-1)	32	$334,8 \pm 7,8$	$11,32 \pm 0,73$
<i>Enterococcus hormaechei</i> (NDM-1)	16	$389,1 \pm 19,1$	$0,16 \pm 2,5$
<i>Enterococcus hormaechei</i> (NDM-1)	8	$541,3 \pm 10,8$	$-13,54 \pm 4,89$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SPM-1)	-	$742,2 \pm 7,6$	$-20,99 \pm 1,98$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SPM-1)	32	$271,5 \pm 7$	$4,89 \pm 0,98$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SPM-1)	16	$360,6 \pm 9,3$	$0,38 \pm 0,38$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (SPM-1)	8	$458,7 \pm 10,5$	$-3,98 \pm 0,79$

4.3 Microscopia de Transmissão Eletrônica

Para avaliar o dano na parede induzido por DBB, a cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A (SPM-1) foi tratada com uma concentração sub-inibitória de DBB. Após 1h de interação DBB-bactéria (temperatura ambiente), a cepa foi fixada e submetida a MTE. A figura 3, apresenta fotografias da cepa sem tratamento e com tratamento onde é possível visualizar a destruição bacteriana (Figura 3C) associada com um provável desarranjo da parede (Figura 3D).

Figura 3 - Microscopia de transmissão eletrônica de amostras contendo: A e B, células de *P. aeruginosa* cepa 48-1997A (SPM-1) sem tratamento; C e D, células de *P. aeruginosa* cepa 48-1997A (SPM-1) tratadas com 4 µg/mL de DBB (1h, 37°C). Em C, a flecha demonstra destruição bacteriana e em D a flecha indica um possível dano na parede.

4.4 Determinação de espectro de absorção UV-visível da anfotericina B incorporada em bicelas catiônicas de DDA

A solubilização da anfotericina B em diferentes solventes foi monitorada por espectro de absorção UV-visível. Todos os espectros foram realizados em temperatura ambiente após 1 hora de interação. Para uma análise comparativa, a figura 4 apresenta os espectros de absorção de anfotericina B solubilizada em água, solvente orgânico e desoxicolato de sódio. Como observado, em DMSO:metanol, a anfotericina B apresenta um espectro compatível com a solubilização total e presença de monômeros. Já em água a droga apresenta um estado de agregação com um máximo de absorção próximo aos 340 nm.

Interessantemente, a incorporação direta da anfotericina B em DBB resultou na solubilização total da droga. Na ausência de solvente orgânico a incorporação máxima da droga foi atingida na proporção de 1:400 (AnB:DBB).

Figura 4 - Espectro de absorção UV-visível de anfotericina B solubilizada em: a) água milli-q e DMSO:metanol (1:1), e b) desoxicolato de sódio (AnB/DOC, Fungizon) ou DBB (AnB/DBB) (Lincopan et al., 2006).

A figura 5 (A-C), apresenta espectros de absorção UV-visível de anfotericina B solubilizada em DBB, após 1 h de interação (Figura 5A) e 3 semanas de armazenamento em temperatura de refrigeração (Figura 5B) ou temperatura ambiente (Figura 5C).

Figura 5 - A - Espectro de absorção UV-visível de anfotericina B incorporada em DBB (AmB/DBB) após 1h de interação. B – Espectro UV-visível de AmB/DBB mantida a 4°C, após três semanas de interação. C – Espectro de absorção UV-visível de AmB/DBB mantida em temperatura ambiente, após três semanas de interação. Os espectros de absorção correspondem a 1, 2, 3 e 4 µg/mL de anfotericina B.

As figuras 5B e 5C demonstram que a solução coloidal se tornou estável, mesmo após três semanas de monitoramento, porém, na temperatura ambiente se observa um *shift* no comprimento de onda 376 nm, assim como, uma queda da absorção máxima, muito provavelmente decorrente de uma perda sutil e gradual da estabilidade da droga.

5 DISCUSSÃO

A disseminação mundial de bactérias resistentes a aos antibióticos de uso clínico vem sendo reportada mundialmente cada vez com mais frequência, muito provavelmente como consequência direta da utilização massiva de antibióticos na clínica como atividades de agronegócio (Karam et al., 2016; Rhouma et al., 2016; Silva, Lincopan, 2012). De fato, novos e abrangentes mecanismos de resistência tem sido identificados (Monnet et al., 2016; Liu et al., 2016).

Por outro lado, para infecções fúngicas, as micoses superficiais tem apresentado dificuldade para tratamento, devido a característica da infecção (ex., cronicidade), toxicidade dos agentes antifúngicos e falta de drogas efetivas (Gupta, Paquet, Simpson, 2013). Microalgas vêm se tornando preocupação médica/veterinária devido a infecções intra-mamárias em vacas leiteiras e consequentemente infecções intestinais e meningite em humanos (Jánosi et al., 2001a; Kirk, Mellenberger, 2002). Com relação a este agente, não há no mercado tratamento efetivo que não seja o abatimento da vaca ou afastamento de funções leiteiras, o que termina por ocasionar custos onerosos aos fabricantes. (Ribeiro, 1998., Costa et al., 2004).

Especificamente com relação a infecções bacterianas, o Brasil tem sido atingido por um aumento no número de infecções por bactérias MRs, muitas das quais expressam diferentes tipos de beta-lactamases (Fontes et al, 2011; Gales et al 2003; Silva, Lincopan, 2012). Consequentemente, muitas das bactérias gram-negativas presentes nos hospitais brasileiros adquiriram um caráter endêmico, associado com falha terapêutica, surtos, e elevados índices de mortalidade (Rossi, 2011).

A presente pesquisa foi realizada com o objetivo de estender a aplicação de bicelas catiônicas de lípides sintéticos para um potencial uso clínico contra bactérias MRs, fungos e microalgas. Embora a atividade antibacteriana de bicelas de lípide catiônico tenha sido previamente reportada, não existem trabalhos demonstrando sua atividade contra bactérias expressando mecanismos de resistência clinicamente importantes e que outorgam o fenótipo MR (Melo, Mamizuka, Carmona-Ribeiro, 2010). Por outro lado, a atividade antifúngica só tem sido avaliada contra leveduras, tendo um reporte de atividade sinérgica, restrito contra *Candida* spp., quando combinado com algumas drogas antifúngicas (Lincopan et al., 2006). Infecções ocasionadas por microalgas não possuem terapias efetivas que não causem efeitos colaterais severos, como danos teciduais intramamários, devido à alta toxicidade de drogas, além de ser infecções de difícil tratamento no geral por conta de lesões piogranulomatosas (Cheville, McDonald, Richard, 1984). Assim, o presente estudo reporta a atividade bactericida, fungicida e algicida de bicelas catiônica de DDA (DBB), combinado ao efeito sinérgico de drogas antifúngicas, ou mesmo à atividade de drogas hidrofóbicas quando solubilizadas diretamente nos nanofragmentos de DBB.

Os resultados contra bactérias MRs, expressando mecanismos de resistência endêmicos em hospitais (como as carbapenemases NDM-1, KPC-2, OXA-23 e SPM-1) é promissor, uma vez que a preparação de uma formulação menos onerosa e estável permite uma aplicação na prática clínica, tendo “a priori”, um uso tópico. Como observado, tanto nos valores de CBM como nos experimentos de análise de tamanho e carga superficial, nanopartículas catiônicas de DBB exibem atividade bactericida contra bactérias MRs, mediada pela ruptura da carga superficial bacteriana com redução de tamanho, consequência direta da atividade bactericida e destruição da parede.

DDA possui uma cabeça polar catiônica que interage com a superfície aniônica de bactérias, fungos e microalgas, o que resulta na cationização das células, desregulando a carga

superficial do microrganismo, provocando a morte do mesmo (Vieira, Carmona-Ribeiro, 2006). A cationização da superfície bacteriana resulta em destruição. Considerando a natureza lipídica dos nanofragmentos de DBB, além de alterar a carga superficial, as bicelas do lipídeo catiônico podem intercalar-se na membrana externa produzindo a sua desorganização (Vieira, Carmona-Ribeiro, 2006).

Com relação às infecções fúngicas, uma das infecções mais frequentes dentre as onicopatias, são as onicomioses, onde cerca de 30% das infecções fúngicas superficiais são representadas (Gupta et al. 2007; Kaur, Kashyap, Bhalla 2008a;). Tais infecções afetam diretamente a qualidade de vida do paciente (Arrese, Valverde, Pierard, 2005)

As lesões podem variar em termos de localização, porém a onicomiose é predominantemente associada à unhas dos pés (Martelozo et al. 2005; Mügge, Hausteiner, Nenoff P, 2006), o que pode ser dependente da umidade produzida pelo uso de sapatos fechados e de material sintético, e maior ocorrência de traumas facilitando a penetração de fungos nas unhas (Martelozo et al. 2005). Em relação as unhas das mãos, estas crescem mais rápido permitindo assim a eliminação dos fungos mais facilmente, dificultando o desenvolvimento destes microorganismos (Mügge et al. 2006).

Leveduras do gênero *Candida* são frequentemente causadoras de onicomioses em algumas regiões do Brasil como em Pernambuco (Lima et al. 2008a), Goiás (Souza et al. 2009) e São Paulo (Godoy-Martinez et al. 2009). Embora *C. albicans* seja a principal espécie responsável por onicomiose (Gupta et al. 2007; Kaur et al. 2008b;), *C. parapsilosis* apresenta similaridade de comportamento, sendo responsável pela maioria das infecções ungueais (Mügge et al. 2006)

Dermatófitos antropofílicos, como *T. rubrum* tem sido comumente encontrados como segunda etiologia mais comum em onicomioses (Martelozo et al. 2005; Mügge et al. 2006), devido ao processo de urbanização, facilitando a disseminação do organismo. *T. rubrum* é um fungo bem adaptado ao tecido queratinizado humano e animal, e causa um processo inflamatório crônico e a sua transmissão pode ser zoonótica (Costa et al, 2012., Gupta et al., 2007). Para a cepa de *T. rubrum* DBB exibiu atividade fungicida equivalente à CFM do miconazol.

Estudos relatam baixas resistências para as espécies de *Candida* frente a antifúngicos (Calvo et al. 2003) porém a resistência a azóis já tem sido observada, como por exemplo

voriconazol e fluconazol (Sabatelli et al. 2006, Lincopan, 2006). Swinne e colaboradores (2005) reportaram resistência a anfotericina B em isolados de *Candida parapsilosis*.

Outro fator que tem contribuído para ao fracasso terapêutico de algumas infecções fúngicas tem sido a resistência de barreiras físicas, encontradas pelos fármacos, para atingir o alvo da infecção, levando a falhas terapêuticas, tratamentos longos e recidivas (Gupta, Paket, Simpson 2013).

Como demonstrado no presente estudo, DBB exibiu atividade fungicida adicional contra fungos filamentosos e leveduriformes. Ensaios de *checkerboard*, realizados para as linhagens de fungos leveduriformes confirmaram um efeito sinérgico e parcialmente sinérgico de DBB em combinação com miconazol, uma vez que, quando utilizado em combinação, os valores da CFM foram reduzidos. Já para terbinafina associada a DBB, o efeito combinado foi em sua maioria indiferente, observando-se efeito parcialmente sinérgico para a linhagem *C. albicans* IAL2151 de e sinérgico para *C. albicans* sc5324.

Quando anfotericina foi solubilizada em DBB (Amb/DBB) na proporção 1:400, a sua atividade contra linhagens de *Candida spp* foi mais efetiva, *in vitro*, quando comparado á anfotericina solubilizada em DMSO:metanol (1:1).

Como inovação, o resultado promissor foi à atividade algicida exibida por DBB, a qual até então não tinha sido explorada. O prejuízo da produção e qualidade do leite provindo de animais infectados por *Prototheca zopfii*, assim como, a sua elevada resistência antimicrobiana, potencial zoonótico, e produção de lesões nos tecidos mamários (graves e irreversíveis) que podem culminar no afastamento do animal para fins reprodutivos (ou até mesmo em descarte) são exemplos de problemas decorrentes de mastites ocasionadas por este agente etiológico que atingem a economia da pecuária leiteira (Costa et al., 1999; János et al., 2001a; Kirk, Mellenberger, 2002). Infecções por *P. zopfii* alteram as características macroscópicas do leite e desencadeiam manifestações clínicas localizadas (ex., glândula mamária) e/ou sistêmicas nos animais infectados (Melville 1995). Adicionalmente, quando ingerida em alimentos contaminados, *P. zopfii* pode causar distúrbios gastrointestinais, sendo eliminada nas fezes, aumentando a chance de disseminação em meio ambiente. Esta microalga pode também ocasionar bursites, feridas na derme e meningite (Pore et al., 1983).

Por serem microorganismos ambientais, a predominância de *Prototheca* spp em casos de mastites vem aumentando, tornando-se uma das causas mais preocupantes deste tipo de infecção, no Brasil (Ribeiro et al., 1999). Para outros animais de produção, como caprinos, ovinos e equinos, *Prototheca* spp. parece não apresentar importância epidemiológica e patogenicidade, assumindo um destaque principal em bovinos (Siqueira et al., 2008).

Em relação ao tratamento da prototecose, antifúngicos como cetoconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B são comumente utilizados, sendo anfotericina B relacionada a melhores resultados. O controle em rebanhos é difícil de ser mantido, por conta da ação limitada de drogas, inexistência de terapias efetivas e sua característica biológica, que apresenta apenas 4% de ergosterol em sua membrana, resistindo até mesmo à pasteurização (Min et al., 2012).

Todas as linhagens utilizadas na presente pesquisa foram isolados de animais com mastite clínica, confirmando estudos prévios que descrevem que a maior ocorrência da enfermidade em bovinos é ocasionada por *P. zopfii* (Melville, 1995; Gomes et al., 1999; Costa et al., 2000b).

A busca por terapias efetivas contra a prototecose tem culminado em diversas pesquisas “*in vitro*” para determinar o perfil de sensibilidade das linhagens a antimicrobianos. No entanto, os resultados *in vitro* são muitas vezes controversos aos *in vivo*, onde diversos grupos de antibióticos, quimioterápicos, antifúngicos, desinfetantes, anti-sépticos entre outros grupamentos químicos, demonstram-se pouco efetivos e ineficazes, não promovendo a resolução do processo infeccioso cura clínica. Muitas vezes linhagens de *Prototheca* isoladas de mastite bovina ou leite tem apresentado sensibilidade à estreptomicina, neomicina, tetraciclina ou gentamicina (Bodennhoff, Madsen, 1978). Já para antifúngicos previamente testados, como por exemplo, nistatina, a concentração algicida mínima “*in vitro*” para isolados de *P. zopfii* tem sido reportada como 50µg/mL (Camargo, 1978).

Diferentes autores alertam para a multirresistencia de linhagens de *P. zopfii* isoladas de mastite bovina em testes de sensibilidade microbiana. Sua resistência a grande maioria de antimicrobianos, se baseia na estrutura rígida de sua parede celular e à indução de reação do tipo piogranulomatosa (Cheville et al., 1984). Somando-se a isso, esta microalga é definida estruturalmente como um microorganismo eucariótico que apresenta apenas 4% de ergosterol em sua membrana (Atkinson et al. 1972; Cheville et al., 1984)

Devido a constantes falhas terapêuticas utilizando antimicrobianos convencionais existentes no mercado, diversos anti-sépticos têm sido testados alternativamente “*in vitro*” ou “*in*

vivo” para o tratamento da prototecose mamária (Langoni et al., 1995). Assim, a atividade apresentada por DBB e a anfotericina B solubilizada em DBB (AnB/DBB) contra *P. zopfii* reflete a atividade algicida de um produto de baixo custo, o qual pode ser uma opção interessante para testes clínicos.

DBB é caracterizado por positivar superfícies negativas, e exibiu uma atividade bastante interessante, ao passo que as concentrações algicida mínimas foram relativamente baixas, equiparando-se muitas vezes com as de anfotericina B, droga poliênica de escolha clínica utilizada atualmente contra mastite bovina (Lass-Flörl, Mayr, 2007). Quando utilizada a anfotericina B incorporada diretamente em DBB (AmB/DBB) para sua solubilização, as concentrações algicidas mínimas exibiram valores altamente reduzidos quando comparado a concentrações de AmB/DMSO:metanol. Finalmente, foi observada uma atividade parcialmente sinérgica e indiferente quando anfotericina B foi combinada (não solubilizada) com DBB, contra duas espécies de *P. zopfii*, respectivamente. Assim, além de solubilizar anfotericina B, DBB poderia apresentar uma atividade algicida intrínseca.

O monitoramento da estabilidade estrutural da anfotericina B solubilizada em DBB por espectro de absorção UV-visível demonstrou que a droga permanece coloidalmente estável durante pelo menos três semanas em temperatura de 4°C, ao passo que em temperatura ambiente, após o mesmo período de tempo monitorado, um *shift* do pico máximo de absorção começa a ser observado, sugerindo uma maior estabilidade da formulação quando mantida em geladeira.

Aditivamente, a versatilidade estrutural de nanopartículas de DBB permite a sua associação com drogas que podem chegar a potencializar a atividades de antimicrobianos. O uso de DBB associado com drogas antifúngicas pode chegar a constituir uma nova formulação para o tratamento de micoses superficiais e prototecose.

Em resumo, bicelas de lípide sintético catiônico de brometo de dioctadecildimetilamônio (DBB) possuem potencial para aplicação clínica como antimicrobiano de amplo espectro de atividade, sendo a sua atividade não só restrita para bactérias. Ademais, a versatilidade estrutural de nanopartículas de DBB permite a sua associação com drogas que podem chegar a potencializar a atividades de antimicrobianos. Especificamente, o uso de DBB associado com drogas antifúngicas pode chegar a constituir uma nova formulação para o tratamento de micoses superficiais e prototecoses.

6 Conclusão

Bicelas de lípides catiônicos de dioctadecildimetilamônio (DBB) são nanoestruturas versáteis, com atividade antimicrobiana de amplo espectro intrínseca, que podem suplementarmente carregar drogas antifúngicas.

1. A atividade antibacteriana de DBB foi confirmada, porém, neste estudo descrevemos pela primeira vez a sua atividade contra bactérias Gram-negativas multirresistentes, produtoras de beta-lactamase de amplo espectro e carbapenemases endêmicas em centros médicos.
2. Como reportado, a atividade antibacteriana foi associada a mudança da carga superficial bacteriana (cationização) induzida por bicelas de DDA (DBB).
3. A atividade de DBB contra espécies de *Candida* foi confirmada e adicionalmente, este estudo reporta a atividade de DBB contra *Trichophyton rubrum*.
4. Bicelas de DDA apresentam atividade algicida promissora contra *Prototheca zopfii*.
5. O efeito sinérgico de DBB e miconazol contra espécies de *Candida* foi confirmado, enquanto que o efeito de DBB combinado com terbinafina foi, em sua maioria, indiferente.
6. DBB solubilizou anfotericina B na proporção 1:400, sendo que para espécies de *Candida* apresentou uma atividade fungicida (CFM) mais eficiente que anfotericina B solubilizada em DMSO:metanol.
7. A atividade algicida de anfotericina B solubilizada em DBB (AnB/DBB) foi superior que anfotericina B solubilizada em DMSO:metanol.
8. Anfotericina B solubilizada em DBB (AnB/DBB) apresentou estabilidade estrutural durante no mínimo 3 semanas de armazenamento em geladeira.

Referências*

- Al-Bayssari C, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. Detection of expanded-spectrum β lactamases in Gram-negative bacteria in the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015 Jul 10;1-20. [Epub ahead of print]
- Ameen M, Lear JT, Madan V, Mohd Mustapa MF, Richardson M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. *Br J Dermatol*. 2014 Nov;171(5):937-58. doi: 10.1111/bjd.13358.
- Arrese JE, Valverde JC, Pierard GE. Revisiting the epidemiology of onychomycoses. *Rev Iberoam Micol*. 2005 Sep;22(3):163-6.
- Asher IM, Schurartzman G. Amphotericin B. *Anal. Profiles Drug Subst.*, 1977; 6:1-42.
- Balfour JÁ, Faulds D. Terbinafine A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Superficial Mycoses *Drugs* February 1992; 43(2): 259–84
- Bekersky I, Fielding RM, Buell D, Lawrence I. Lipid-based amphotericin B. formulations: from animals to man. *Pharm Sci Technol Today*, 1999; 2(6):230-6
- Bennet JE. Antimicrobial Agents: Antifungal Agents, Chapter 48. In: Goodman & Gilman (ed.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11^a ed. Digital Edition Set ISBN: 0-07-146804-8, 2006
- Bexiga R, Cavaco L, Vilela CL. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Lisboa, 2003; 98(545): 33-7
- Bodenhoff J, Madsen PS. Bovine protothecosis. A brief report of ten cases. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1978 Feb;86(1):51-2.
- Brajtburg J, Elberg S, Kobayashi GS, Bolard J. Amphotericin B incorporated into egg lecithin-bile salt mixed micelles: molecular and cellular aspects relevant to therapeutic efficacy in experimental mycoses. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1994; 38(2):300-6.
- Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin microbiol*. 1996; Ver(9):512.
- Calvo MC, Gil J, Ramírez de Ocariz I, Benito R, Rezusta A. In vitro activity of fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida* spp. *Rev Esp Quimioter*. 2003 Jun;16(2):227-32.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet] Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>

Campanhã MTN, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Interactions between cationic liposomes and bactéria: the physical-chemistry of the bactericidal action. *J lipid Res.* 1999; 40:1495-1500.

Camargo ZP. Algas do gênero *Prototheca*: Características microbiológicas e imunológicas. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 1978.

Carmona-Ribeiro AM, Vieira DB, Lincopan, N. Cationic Surfactants and Lipids as Anti-infective Agents (Review). *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 2006:33-54.

Carney C, Tosti A, Daniel R, Scher R, Rich P, DeCoster J, Elewski B. A new classification system for grading the severity of onychomycosis: Onychomycosis Severity Index. *Arch Dermatol.* 2011 Nov;147(11):1277-82.

Cheville NF, McDonald J, Richard JL. Ultrastructure of *Prototheca zopfii* in bovine granulomatous mastitis. *Vet pathol*, 1984; 21:341-348

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, approved standard, M27-A3, 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 33. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, approved standard, M38-A2, 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard - Ninth edition. CLSI document M02–A10. Wayne, PA: 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved standard - Twenty-First informational Supplement; CLSI document M100-S21. Wayne, PA:2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard - Ninth edition. CLSI document M27–A3. Wayne, PA: 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard - Ninth edition. CLSI document M38-A. Wayne, PA: 2009.

- Costa, EO, Ribeiro, AR, Watanabe ET, Garino JrF, Silva JAB, Junqueira L. Controle de surto de mastite por *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. *Napgama*, São Paulo, 1999;2(6):12-6.
- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):417-33.
- Dismukes WE. Introduction to antifungal drugs. *Clin. Infect. Dis*. 2000; 30: 653-7.
- Dupont B. Use of topical antifungal agents. *Therapie*. 2006 May-Jun;61(3):251-4. Review.
- Dürr UH, Gildenberg M, Ramamoorthy A. The magic of bicelles lights up membrane protein structure. *Chem Rev*. 2012 Nov 14;112(11):6054-74. doi: 10.1021/cr300061w. Epub 2012 Aug 24.
- Fontes LC, Neves P, Oliveira S, Silva KC, Sato MIZ, Lincopan N. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* co-producing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmrD-1 in an urban river. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011; 55(6):3063-4.
- Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(9):825-9.
- Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*. 2005;41 Suppl 4:S276-8.
- Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(9):722-32.
- Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader H. S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2003a;52:699-702.
- Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(4):354-60.
- Ganis P, Auitabile G, Mechlinki W, Schaffner CP. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodo-acetyl derivative. *J. Amer. Chem. Soc*. 1971; 93:4560-4.
- Garcia-Cuesta C, Sarrion-Pérez MG, Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014 Dec 1;6(5):e576-82. doi: 10.4317/jced.51798. eCollection 2014 Dec. PubMed PMID: 25674329; PubMed Central PMCID: PMC4312689.

Ghanbari Safari M, Hosseinkhani S. Lipid composition of cationic nanoliposomes implicate on transfection efficiency. *J Liposome Res.* 2013 Sep;23(3):174-86. doi:10.3109/08982104.2013.779703. Epub 2013 Apr 17. PubMed PMID: 23

Girão E, Levin AS, Basso M, Gobara S, Gomes L B, Medeiros EA, Barone AA, Costa S. F. Trends and outcome of 1121 nosocomial bloodstream infections in intensive care units in a Brazilian hospital, 1999-2003. *Int J Infect Dis.* 2008;12:145- 6.

Gold N, Stout HA, Pagano JF, Donovan R. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vivo studies. *Antibiot. Annu.* 1956; 1956:579-86.

Gomes MJP, Driemeier D, Ferreiro L, Corbellini LG, Cruz C. Mastite bovina: isolamento de *Prototheca* spp. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado. Anais Gramado: SOVERGS, 1997; 25:151.

Gonçalves SS, Souza AC, Chowdhary A, Meis JF, Colombo AL. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses.* 2016 Jan 26. doi: 10.1111/myc.12469.

Gondal JA, Swartz RP, Rahman A. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated amphotericin-B in the treatment of systemic candidiasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33:1544-8.

Gupta AK, Paquet M, Simpson FC. Therapies for the treatment of onychomycosis. *Clin Dermatol.* 2013 Sep-Oct;31(5):544-54.

Gupta AK, Simpson FC. New pharmacotherapy for the treatment of onychomycosis: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2015 Feb;16(2):227-36. doi: 10.1517/14656566.2015.993380. Epub 2014 Dec 19. Review. PubMed PMID: 25522979.

Gupta M, Sharma NL, Kanga AK, Mahajan VK, Tegta GR. Onychomycosis: Clinico-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2007 Nov-Dec;73(6):389-92.

Hall MJ, Middleton R.F, Westmacott D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *J Antimicrob Chemother.* 1983;11(5):427-33.

Iorizzo M, Piraccini BM, Tosti A. Today's treatments options for onychomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2010 Nov;8(11):875-9.

Hillery, AM. Supramolecular lipid drug delivery systems: from laboratory to clinic. A review of recently introduced commercial liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B. *Adv Drug Del Rev.* 1997; 24:345-63.

- Jánosi S, Rátz F, Szigeti G, Kulcsár M, Kerényi J, Laukó T, Katona F, Huszenicza G. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. The Veterinary Quarterly, The Hague. 2001a; 23(2):58-61.
- Jánosi S, Szigeti G, Rátz F, Laukó T, Kerényi J, Tenk M, Katona F, Huszenicza A, Kulcsár M, Huszenicza G. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. The Veterinary Quarterly, The Hague. 2001b; 23(2):80-3.
- Karam G, Chastre J, Wilcox MH, Vincent JL. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. Crit Care. 2016 Jun 22;20(1):136. doi:10.1186/s13054-016-13207.
- Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. Indian J Med Microbiol. 2008 Apr-Jun;26(2):108-16.
- Klastersky, J. Empirical Antifungal Therapy. Int. J. Antimicrob. Agents. 2004; 23:105-12.
- Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakaqami, Tuner P, Mendes C. MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. Braz J Infect Dis. 2005;9(3):216-24.
- Kirk J, Mellenberger R. Mastitis control program for *Prototheca* mastitis in dairy cows. [on line]. Disponível em: Acesso em: 19 mar. 2002.
- Langoni H, Domingues PF, Funari SRC, Dias HLT. *Prototheca zopfii* como agente de mastite bovina: clinica e terapêutica. Arq Bras Med Vet Zootec 1995; 47:727-732
- Larabi M, Gulik A, Dedieu JP, Legrand P, Barratt G, Cheron M. New lipid formulation of amphotericin B: spectral and microscopic analysis. Biochim Biophys Acta. 2004 Aug 30;1664(2):172-81.
- Lass-Flörl C, Mayr A. 2007. Human protothecosis. Clin. Microbiol. Rev. 20(2):230-242.
- Lima KM, Rego, RSM, 2008. Espécies Fúngicas Responsáveis por Onicomicoses em Recife, Pernambuco. Rev Bras Anal Clin 40:107-110
- Lincopan N, Macculloch JA, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. J Med Microbiol. 2005;43(1):516-9.
- Lincopan N. Atividade biológica de uma nova formulação de anfotericina b solubilizada em nanofragmentos catiônicos de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio. Tese (Doutorado em Análises Clínicas). São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2004.

Lincopan N, Espíndola NM, Vaz AJ, da Costa MH, Faquim-Mauro E, Carmona-Ribeiro AM. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: Preparation, characterization and activity in vivo. *Vaccine*. 2009 Sep 25;27(42):5760-71.

Lincopan N, Borelli P, Fock R, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM Toxicity of an effective amphotericin B formulation at high cationic lipid to drug molar ratio. *Exp Toxicol Pathol*. 2006; 58(2-3):175-83.

Lincopan N, Carmona-Ribeiro AM. Lipid-covered drug particles: combined action of dioctadecyldimethylammonium bromide and amphotericin B or miconazole. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jul;58(1):66-75.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):161-8.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.

Ma Y1, Chen X1, Guan S. Terbinafine: novel formulations that potentiate antifungal activities. *Drugs Today (Barc)*. 2015 Mar;51(3):197-208. doi: 0.1358/dot.2015.51.3.2295906.

Melville PA. Correlação de morfotipos de *Prototheca zopfii* com perfis de susceptibilidade “in vitro” aos antibióticos quimioterápicos e estudo da ultraestrutura após exposição aos antimicrobianos. Tese. São Paulo: Universidade de São Paulo 2000.

Melo LD, Mamizuka EM, Carmona-Ribeiro AM. Langmuir. Antimicrobial particles from cationic lipid and polyelectrolytes. 2010 Jul 20;26(14):12300-6.

Marteloza IC, Guilhermetti E, Svidizinski TIE. Ocorrência de onicomicose em Maringá, estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci I Health Sci* 27:177-182

Milobratović D, Janković S, Vukičević J, Marinković J, Janković J, Raić Z. Quality of life in patients with toenail onychomycosis. *Mycoses*. 2013 Sep;56(5):543-51.

Min Z, Moser SA, Pappas PG. *Prototheca wickerhamii* algaemia presenting as cholestatic hepatitis in a patient with systemic lupus erythematosus: A case report and literature review. *Med Mycol Case Rep*. 2012;2:19–22.

Monnet DL, Safrany N, Heine N, Price C. Comment on: A systematic review of the public's knowledge and beliefs about antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2016 May 26. pii: dkw141. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27231275.

Monti D, Saccomani L, Chetoni P, Burgalassi S, Tampucci S, Mailland F. Validation of bovine hoof slices as a model for infected human toenails: in vitro ciclopirox transungual permeation. *Br J Dermatol.* 2011 Jul;165(1):99-105.

Moura JP, Gir E. Conhecimento dos profissionais de enfermagem referente à resistência bacteriana a múltiplas drogas. *Acta Paul Enferm.* 2007;20(3):351-6.

Moura A, Henriques I, Smalla K, Correia A. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol.* 2010;161:58–66.

Mügge C, Hausteil UF, Nenoff P. Causative agents of onychomycosis-a retrospective study. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006 Mar;4(3):218-28.

Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009;364(1527):2275-89.

Ohlweiler. O.A., Fundamentos da análise instrumental. Rio de Janeiro. Livros técnicos e científicos 1981.

Pana ZD, Farmaki E, Roilides E. Host genetics and opportunistic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Dec;20(12):1254-64. doi:10.1111/1469-0691.12800.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2702.

Piancastelli S, Hamdan, JS. Effect of amphotericin B on the lipids of different strains of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 1994; 128:85-9.

Piraccini BM, Rech G, Tosti A. Photodynamic therapy of onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol.* 2008 Nov;59(5 Suppl):S75-6.

Pore R.S, Barnett EA, Barnes JrWC, Walker JD. *Prototheca* ecology. *Mycopathologia*, 1983; 81:49-62.

Pore RS, *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia*, 1985;.90:129-39.

Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Jun;45(6):568-585.

Rezaee M, Oskuee RK, Nassirli H, Malaekheh-Nikouei B. Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. *J Control Release*. 2016 Jun 14. pii: S0168-3659(16)30391-1. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.023. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID:27317365.

Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents*. 2016 May 6. pii:S0924-8579(16)30075-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 27234675.

Roesler U, Moller A, Hensel A, Baumann D, Truyen U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and a description of a novel species *Blaschkeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol Microbiol* 2006; 56:1-7.

Ribeiro MG. Desinfecção e desinfetantes no pré e pós ordenha. In: Encontro de pesquisadores em Mastite. 1999, 3:63-9.

Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis*. 2011 May;52(9):1138-43

Russel AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Blackwell science: Oxford,1999.

Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jun;50(6):2009-15.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz. J. Infect. Dis*. 20015;(4):200-14.

Schlefman BS. Onychomycosis: a compendium of facts and a clinical experience. *J Foot Ankle Surg*. 1999 Jul-Aug;38(4):290-302. Review.

Shemer A. Update: medical treatment of onychomycosis. *Dermatol Ther*. 2012 Nov-Dec;25(6):582-93.

Silva KC, Lincopan N. Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. 2012; 48:91-9.

Siqueira AK, Ribeiro MG, Salerno T. Prototecose em animais de companhia e aspectos da doença no homem. *Ciênci. Rural*. 2008; 38.

Souza LK, Fernandes OF, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, Silva MR. Epidemiological and mycological data of onychomycosis in Goiania, Brazil. *Mycoses*. 2010

Swinne D, Watelle M, Nolard N. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates. *Jan*;53(1):68-71. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01663.x. Epub 2009 Jan 21. *Rev Iberoam Micol*. 2005 Mar;22(1):24-8.

Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med*. 2015 May;277(5):501-12. doi: 10.1111/joim.12342. Epub 2015 Jan 27.

Theuretzbacher U. Accelerating resistance, inadequate antibacterial drug pipelines and international responses. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(4):295-9.

Thiele D, Bergmann A. Mini-review: Protothecosis in human medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2002; 204:297-302

Tillotson GS. Where does novel antibiotics ReD stand among other pharmaceutical products: an industrial perspective? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008;6(5):551-2.

Vandeputte J, Wachtel JL, Stiller ET. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a Streptomyces. II The isolation and properties of the crystalline amphotericins. *Antibiot. Annu*. 1956; 1956 :587-91.

Walsh TR; Weeks J; Livermore, DM, Toleman M A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet. Infect. Dis*. 2011; 11(5):355-62.

Weiser HB, Merrifield P. The concept of critical zeta potential for hydrophobic sols. I. *J Phys Colloid Chem*. 1950 Oct;54(7):990-8.

Young LY, Hull CM, Heitman J. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003; 47:2717-24.