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 qunto na biblioteca digital de dissertações e teses da USP (BDTD).

São Paulo

2016

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 multirresistêntes (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 multiresistants bacterias, 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 bactérias, fungi, virus and algae. This study evaluated *in vitro* activity from cationic lipds formulations against multiresistant bacterias (MRs), fungi and e microalgae from human and veterinary. The Biocidal activity from bromide dioctadecildimetilammonium biceles (DBB) was evaluated against gram-negative bactérias 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 wuth and without antifungal drugs (ex., miconazole, terbinafine e amphotericin B), was also evaluated by synergistic activity. Cationic nanodispertions of DBB has shown bactericidal, fungicidal and algicidal activity, even for MRs patogens, thus , the association with the others antimicrobials resulted in a synergistic activity wich could foment the production of the formulations with a potential application in human and veterinary medicine.

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

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 homen 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 publica 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, imunosupressão, 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 (Schlefman, 1999; Gupta, Paquet, Simpson, 2013). Desta maneira, antifúngicos de uso tópico são alternativas para diminuírem 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)

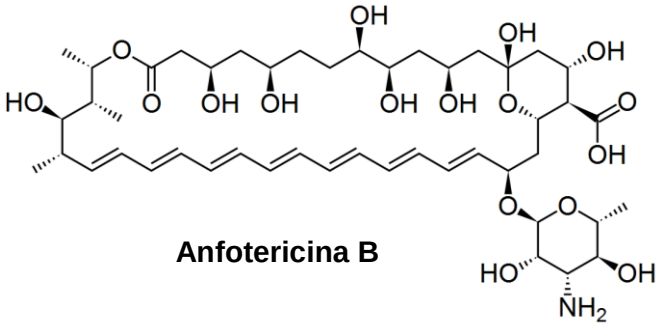
1.2.1 Drogas antifúngicas: anfotericina B, miconazol e terbinafina

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).

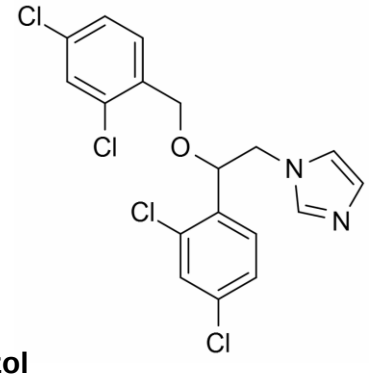
Algumas espécies de *Candida* apresentam resistência ao fármaco, o que tem sido associada com a ausência de ergosterol e produção de enzimas capazes de degradar a droga (Young, Hull, Heitman, 2003; Pianscatelli,, Hamdan, 1994)

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

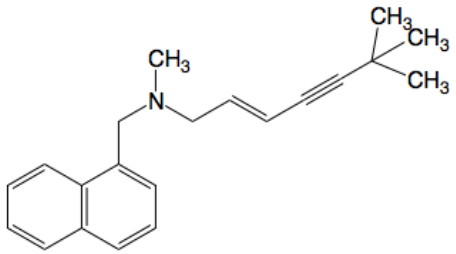
sido recorrentemente utilizada pelas pelas indústrias em suas formas comerciais, como Ambisome, Albecet e Amphocil. Ambisome consiste em uma formulação com lipossomos unilamelares compostos de HSPC (fosfatidilcolina hidrogenada de soja), DSPG (diéster fosfatidilgricerol) e colesterol (Bekersky et al., 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).



Anfotericina B



Miconazol



Terbinafina

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 14α 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 ($C_{18}H_{14}N_{20}C_{14}$) 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: *zopffi, moriformes,*

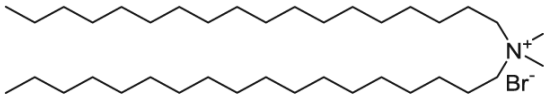
wickerhamii, e stagnora. (Pore et al ,1983, 1985), atualmente uma espécie derivada de *P. zopffi, P. blaschkheae* (Roesler, et al. 2006) Dessas, *wickerhamii* e *zopffi* são associadas a infecções mamárias em vacas, sendo a última mais comumente encontrada como agente infeccioso. Em humanos, a *P. wickerhamii* infecta áreas cutâneas ocasionando feridas, articulações, ou ainda sistemas. (Thiele, Bergmann 2002; Lass-Flörl, Mayr, 2007). São classificados três tipo de *P. zopffi* 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, Mellemberger, 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 zopffi* 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 Lípides catiônicos e bicelas

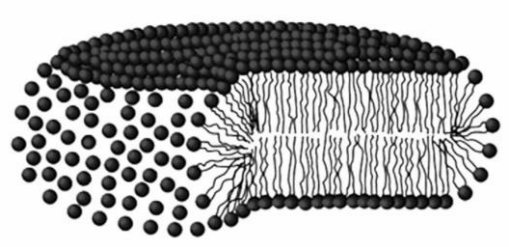
Lípides catiônicos sintéticos são compostos versáteis com propriedades antimicrobianas e que podem ser utilizados para carregar drogas, antígenos e DNA (Carmona-Ribeiro, Vieira, Lincopan, 2006; Lincopan et al., 2009; Rezaee et al., 2016; Ghanbari, Hosseinkhani, 2013). Dentre eles, o brometo de dioctadecildimetilamônio (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-ión 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).

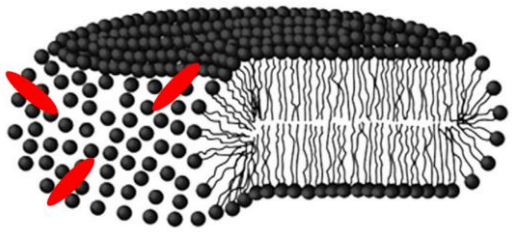
O grupamento amônio quartenário possui efeito antimicrobiano amplamente conhecido, e são exemplos desse grupo os polieletrólitos, brometo de cetiltrimetilamônio, DBB e cloreto de dioctadecildimetilamônio (DDC). A resposta biocida atrelada a amônios quartenários anfifílicos se dá pela reversão de carga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



Brometo de dioctadecildimetilamônio (DDAB)



Brometo de dioctadecildimetilamônio Bicela (DBB)



Brometo de dioctadecildimetilamônio bicela (DBB/Droga)

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*.

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, 11ª 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 Ocáriz 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 submited 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. Introdution to antifungical 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-ß-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, Donovick 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. Antimicr. Agents. 2004; 23:105-12.

Kiffer C, Hsiunq 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 zopffi* 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, Maccullock 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.

Martelozo IC, Guilhermetti E, Svidizinki TIE. Ocorrêcnia de onicomicose em Maringá, estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci I Iealth Sci* 27:177-182

Milobratović D, Janković S, Vukičević J, Marinković J, Janković J, Railić 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, Haustein 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, Malaekeh-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 ofprint] 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 an 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 desinfection, 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 Streptomycete. II The isolation and properties of the crystalline amphotericins.Antibiot. Annu. 1956; 1956 :587-91.

Walsh TR; Weeks J; Livermoore, 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 lusitaniae. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47:2717-24.