BIBLIOTECA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

19.077

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Interações entre vesículas catiônicas e superfícies biológicas:
lipossomos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)
como agentes antimicrobianos**

**Myriam Therezinha Neves Campanhã
TESE DE DOUTORADO**

**Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Maria Carmona-Ribeiro
Co-orientadora:
Prof^a. Dr^a. Elsa Masae Mamizuka**

**São Paulo
27/Jun/2000**

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002933

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C186i Campanhã, Myriam Therezinha Neves
Interações entre vesículas catiónicas e superfícies biológicas :
lipossomos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) como
agentes antimicrobianos / Myriam Therezinha Neves Campanhã
-- São Paulo, 2000.
140p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São
Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Carmona-Ribeiro, Ana Maria
Co-orientador: Mamizuka, Elsa Masae

I. Biofísica 2. Microrganismos : Bioquímica 3. Lipossomos :
Bioquímica I. T. II. Carmona-Ribeiro, Ana Maria, orientador
III. Mamizuka, Elsa Masae, co-orientador.

574.191 CDD

**"Interações entre Vesículas Catiônicas e Superfícies
Biológicas: Lipossomos de Brometo de
Dioctadecildimetilamônio (DODAB) como Agentes
Antimicrobianos".**

MYRIAM THEREZINHA NEVES CAMPANHÃ

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS - ÁREA: BIOQUÍMICA.

Aprovado por:

Profa. Dra. ANA MARIA CARMONA RIBEIRO
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. SHIRLEY SCHREIER
IQ - USP

Prof. Dr. OMAR ABDEL MONEIN ABOU EL SEOUD
IQ - USP

Profa. Dra. ARLETE EMILY CURY
FCF - USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF - USP

SÃO PAULO
27 DE JUNHO DE 2000.

Aos meus filhos Rodrigo e Diogo,
À vó Tecla e tia Vanda,
Aos meus pais, Maurício e Isolde,
À minha irmã Mercedes,
Ao meu marido Eduardo,

Que de alguma forma me
ajudaram a fazer esta tese,
Agradeço e dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro, pela objetividade e orientação competente durante todo o desenvolvimento desta tese.

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, pelo convite, pela co-orientação em microbiologia, e disponibilidade do laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, no qual foi realizada a primeira parte deste trabalho.

À Profa. Dra. Arlete Emily Cury, pela presteza sempre que solicitada, e valiosas sugestões em micologia, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Frank Herbert Quina, pelo uso do espectrofluorímetro do seu laboratório.

À Profa. Dra. Adelaide Faljoni-Alário, pelo uso da centrífuga do seu laboratório.

À Lyzethe Mayra dos Santos Martins, pela utilização dos seus dados de espectros ópticos da anfotericina B e miconazol, nesta tese.

À Irene Satiko Kikuchi, pela amizade, ajuda, pelo incentivo durante todo o decorrer desta tese, e pelo apoio sempre dado naquelas horas difíceis.

À Renata Rapuano, Edla Moraes de Abreu Pereira, Sônia Regina da Silva Mendes, pela amizade e ajuda durante o decorrer destes anos.

Ao Luiz Carlos Salay, pelo incentivo e conselhos sobre a nossa pós-graduação.

Aos estagiários do laboratório de Biocolóides: Denise, Allan, Fernando, Renata Cristina, pelo agradável convívio proporcionado.

À Benedita de Oliveira, pela limpeza do material e simpatia durante estes anos.

À Doris Dias Araújo pela simpatia e auxílio quando solicitado.

Ao Paulo Firmino Moreira Jr. e à Chang Yhwa, pela ajuda e convívio durante estes anos.

À Solange Elizabete de Oliveira Souza, pela boa vontade e ajuda, sempre que solicitada.

À Adriana e Luzia, técnicas do laboratório da Central Analítica do Instituto de Química da USP, pela presteza na realização de parte das análises da anfotericina B e miconazol.

Ao Rinaldo Ferreira Gandra, pela figura da parede celular de fungos.

Aos bibliotecários da biblioteca do Conjunto das Químicas: Adriana, Ângelo, Leila, pelo auxílio nas referências bibliográficas, sempre que solicitado.

Ao meu marido, Carlos Eduardo Campanhã, um agradecimento especial, pela ajuda na correção e diagramação da tese.

Ao Prof. Dr. Etelvino Henriques Bechara, pelo incentivo, apoio e conselhos durante todos estes anos.

Ao Instituto de Química da USP, pela pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida e auxílio financeiro, para a realização desta tese.

RESUMO

Lipossomos são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais membranas lipídicas envolvendo um compartimento aquoso, e podem ser constituídos de moléculas naturais ou sintéticas, como o brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), um composto de amônio quaternário.

Este trabalho mostra:

- 1) susceptibilidade de quatro espécies bacterianas à ação bactericida de DODAB;
- 2) verificação da ação antifúngica de DODAB;
- 3) solubilização de duas drogas antifúngicas (anfotericina B e miconazol) nos lipossomos de DODAB;
- 4) verificação da eficiência das drogas incorporadas aos lipossomos, como agentes antifúngicos.

A susceptibilidade das espécies ao DODAB foi avaliada através de curvas de viabilidade celular para $2, 5 \times 10^7$ UFC/mL. A bactéria mais resistente foi *Escherichia coli*, seguida de *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, e *S. aureus*. Foi demonstrada uma correlação entre a troca de carga de superfície das bactérias e a morte celular.

A ação antifúngica do DODAB foi avaliada para *Candida albicans* através de curvas de viabilidade celular. DODAB é fungistático (1 mM), e bactericida (10-50 μ M).

Formulações lipossomais de DODAB com anfotericina B ou miconazol mostraram ação fungicida equivalente àquela das drogas sozinhas, em seus melhores solventes. A fase lipossomal de DODAB compete com a membrana da célula fúngica pela anfotericina B, conforme verificado pelo efeito de concentração de DODAB.

A 1 mM de DODAB, a fase lipossomal ganha a competição na solubilização da droga para as membranas das células fúngicas e a droga não é entregue para as células. Contudo, a 0,1 mM de DODAB, as membranas ganham a competição e a droga é entregue.

ABSTRACT

Liposomes are microscopic vesicles composed by one or more lipid membranes surrounding an aqueous compartment. Some synthetic amphiphilic molecules, such as dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB), a quaternary ammonium compound also assemble as vesicles.

This work is divided in four parts:

- 1) susceptibility of four bacterial species to the bactericidal DODAB action;
- 2) characterization of DODAB's antifungal action;
- 3) solubilization of two hydrophobic antifungal drugs (amphotericin B and miconazole) in DODAB liposomes;
- 4) determination of efficiency for the liposomal drugs.

The susceptibility of four species of bacteria was determined from cell viability in the presence of DODAB at 2.5×10^7 CFU/mL. The less susceptible specie is *Escherichia coli*, followed by *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. There is a relationship between cell surface charge and viability. Negatively charged cells remain alive whereas positively charged cells die.

The antifungal action of DODAB towards *Candida albicans* was evaluated from the determination of cell viability as a function of DODAB concentration. DODAB is fungistatic at 1 mM concentration, and bactericidal at tenths of micromolar (10-50 μ M).

Liposomal amphotericin B or miconazole present fungicidal action similar to that of the drugs when solubilized in their best solvents. DODAB at 1 mM competes with the fungal cell membrane for amphotericin B solubilization.

At 1 mM of DODAB, the liposomal phase wins the competition for drug solubilization and the drug is not delivered to the cell. However, at 0.1 mM of DODAB, the cell membrane wins and the drug is delivered.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Lipossomos	1
1.2. Vesículas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)	11
1.3. Depuração dos lipossomos	13
1.4. Avanços da pesquisa aplicada envolvendo lipossomos	15
1.5. Microrganismos como modelos de superfícies biológicas	20
1.5.1. Parede celular das bactérias Gram-negativas	23
1.5.1.1. Proteínas de membrana externa de bactérias Gram-negativas	25
1.5.2. Parede celular das bactérias Gram-positivas	27
1.5.3. Parede celular dos fungos	29
1.6. Agentes antimicrobianos	31
1.6.1. Compostos de amônio quaternário	32
1.6.2. Agentes antibacterianos	33
1.6.3. Agentes antifúngicos	34
1.6.3.1. Anfotericina B	35
1.6.3.1.1. Efeito da anfotericina B sobre membranas	37
1.6.3.1.2. Teoria da formação de poros aquosos	38
1.6.3.1.3. Anfotericina B lipossomal	39
1.6.3.2. Miconazol	41
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Preparação de lipossomos catiônicos	44
3.1.1. Vesículas pequenas preparadas por sonicação (sonicadas)	44
3.1.2. Vesículas grandes preparadas por injeção clorofórmica (injetadas)	44
3.1.3. Vesículas grandes preparadas por aquecimento (aquecidas)	44
3.1.4. Microtitulação e determinação da concentração de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)	45
3.2. Padronização do cultivo de <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , e <i>S. aureus</i>	45
3.2.1. Preparação da escala de MacFarland	45
3.2.2. Cultivo bacteriano	47
3.2.3. Contagem de células viáveis pelo método de diluição em tubos e plaqueamento	49
3.3. Estudo comparativo de dois métodos para a determinação de viabilidade celular	49
3.3.1. Kit de viabilidade celular BacLight™ (L-7007), Molecular Probes, Inc.	49
3.3.1.1. Cultivo da suspensão bacteriana	49
3.3.1.2. Preparação da curva padrão	50
3.3.1.3. Determinação de viabilidade celular na presença de três concentrações diferentes de DODAB, usando o kit	52
3.3.1.4. Reação do kit de viabilidade BacLight (L-7007)	52
3.3.1.5. Espectroscopia de fluorescência	53
3.3.2. Contagem de células viáveis pelo método de diluição em tubos e plaqueamento	53
3.3.2.1. Preparação da suspensão bacteriana	53
3.3.2.2. Determinação de viabilidade celular em presença de vesículas pequenas de DODAB, para três concentrações de vesículas	55

3.3.3. Comparação do kit de viabilidade celular BacLight L-7007 com o método de plaqueamento, usando vesículas grandes e pequenas de DODAB	56
3.3.3.1. Preparação da curva padrão com as suspensões bacterianas	57
3.3.3.2. Interação vesícula / bactéria	57
3.3.3.3. Reação do kit de viabilidade celular BacLight L-7007	58
3.3.3.4. Espectroscopia de fluorescência	58
3.3.4. Determinação da fase de crescimento da <i>E. coli</i>	58
3.4. Determinação do efeito do DODAB sobre a viabilidade celular para as quatro espécies bacterianas	59
3.4.1. Cultivo e preparação das bactérias	59
3.4.2. Interação das vesículas sonicadas de DODAB com bactérias	59
3.4.2.1. Curvas de viabilidade celular em função da concentração de DODAB	59
3.4.2.2. Curvas de viabilidade celular em função do tempo de interação	60
3.5. Determinação da mobilidade eletroforética para duas espécies bacterianas: <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>, em presença de lipossomos de DODAB	60
3.5.1. Cultivo e preparação das bactérias	60
3.5.2. Preparação dos lipossomos de DODAB	60
3.5.3. Interação das vesículas sonicadas de DODAB com as duas bactérias: <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	61
3.5.4. Determinação da mobilidade eletroforética das bactérias em função da concentração de DODAB	61
3.6. Determinação de viabilidade celular de <i>E. coli</i> em presença de lipossomos de DODAB	62
3.6.1. Cultivo e preparação das suspensões de <i>E. coli</i>	62
3.6.2. Efeito da concentração bacteriana sobre a viabilidade de <i>E. coli</i> em presença de vesículas pequenas de DODAB (5 µM), para um tempo de interação de 1h	62
3.6.3. Determinação de floculação bacteriana induzida pelas vesículas e sua relação com a viabilidade celular	63
3.6.4. Determinação do efeito do tamanho de vesículas de DODAB sobre a viabilidade celular...	64
3.6.5. Determinação de cinéticas de floculação bacteriana induzidas por vesículas grandes e pequenas de DODAB	64
3.6.6. Cálculo das constantes de afinidade (K) de DODAC ou DODAB pela superfície celular	64
3.6.6.1. Modelo de Langmuir, constantes de afinidade e adsorção máxima	65
3.6.6.1.1. Para vesículas grandes de DODAC	66
3.6.6.1.2. Para vesículas pequenas de DODAB	67
3.6.7. Determinação de viabilidade celular da <i>E. coli</i> em função da concentração de vesículas grandes de DODAB, preparadas por injeção clorofórmica	69
3.7. Determinação da curva de crescimento da <i>E. coli</i>	69
3.8. Determinação das curvas de crescimento da <i>C. albicans</i>	70
3.8.1. Dosagem de fosfato	70
3.8.2. Determinação da turbidez	72
3.8.3. Método do plaqueamento	72
3.9. Determinação do efeito de vesículas de DODAB sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i>	72
3.9.1. Cultivo da levedura	72
3.9.2. Viabilidade celular em função da concentração de DODAB	73
3.9.3. Viabilidade celular em função do tempo de interação vesícula/fungo	73
3.9.4. Viabilidade celular em função do tamanho das vesículas	74

3.9.5. Mobilidade eletroforética das células em função da concentração de DODAB, para duas densidades numéricas de células	74
3.10. Solubilização e incorporação de drogas antifúngicas nos lipossomos de DODAB	75
3.10.1. Espectros UV-visível da anfotericina B em DMSO:metanol ou em água	75
3.10.2. Determinação dos espectros UV-visível da anfotericina B e miconazol incorporados nos lipossomos catiônicos	75
3.11. Verificação das propriedades físicas das drogas antifúngicas	76
3.11.1. Determinação da pureza da anfotericina B e miconazol	76
3.11.2. Espectros de anfotericina B em metanol	76
3.12. Viabilidade celular da <i>C. albicans</i> em presença de drogas antifúngicas lipossomais	80
3.12.1. Cultivo da <i>C. albicans</i>	80
3.12.2. Determinação do efeito da concentração de anfotericina B lipossomal sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i>	80
3.12.3. Determinação do efeito da concentração de miconazol lipossomal sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i>	81
3.12.4. Determinação do efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i> para concentrações fixas de DODAB e anfotericina B	82
3.12.5. Determinação do efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i> , para concentrações fixas de DODAB e Miconazol	83
3.13. Lista de equipamentos, reagentes e microrganismos.....	84
4. RESULTADOS	85
4.1. Susceptibilidades de diferentes espécies bacterianas às vesículas catiônicas de DODAB	85
4.2. Efeito da carga de superfície da bactéria sobre a viabilidade celular	88
4.3. Ausência de efeito da floculação sobre a viabilidade celular	91
4.3.1. Cinéticas de floculação bacteriana para vesículas grandes e vesículas pequenas de DODAB, interagindo com <i>E. coli</i>	92
4.4. Efeito do tamanho das vesículas sobre a viabilidade celular de <i>E. coli</i>.....	94
4.5. Verificação da fase de crescimento da <i>E. coli</i>	95
4.6. Curva de crescimento da <i>E. coli</i>	96
4.7. Curvas de crescimento da <i>C. albicans</i>	96
4.8. Crescimento da <i>C. albicans</i> por três métodos diferentes	96
4.9. Susceptibilidade da <i>C. albicans</i> às vesículas de DODAB	101
4.9.1. Efeito da concentração de DODAB sobre a viabilidade da <i>C. albicans</i> a duas concentrações de células e 1h de interação	101
4.9.2. Efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i> a 1×10^6 UFC/mL, e duas concentrações de DODAB	101
4.9.3. Efeito do tamanho das vesículas de DODAB sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i>	103
4.10. Efeito dos lipossomos de DODAB sobre a carga da superfície celular e sobre a viabilidade das células da <i>C. albicans</i>	104
4.11. Solubilização e incorporação de duas drogas antifúngicas nos lipossomos de DODAB	106
4.12. Curvas de viabilidade celular da <i>C. albicans</i> para formulações lipossomais de drogas antifúngicas	112
4.12.1. Efeito da anfotericina B lipossomal sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i>	112

4.12.2. Efeito do miconazol lipossomal sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i>	112
4.12.3. Efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i> para concentrações fixas de DODAB e anfotericina B	114
4.12.4. Efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da <i>C. albicans</i> para concentrações fixas de DODAB e miconazol	116
5. DISCUSSÃO	117
6. CONCLUSÕES	126
7. PERSPECTIVAS	127
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE ABREVIATURAS

AB: Anfotericina B
ATCC: American Type Culture Collection
DMSO: Dimetilsulfóxido
DOC: Desoxicolato de sódio
DODAB: Brometo de dioctadecildimetilamônio
DODAC: Cloreto de dioctadecildimetilamônio
DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina
LPS: Lipopolissacarídeo
LUV: Vesículas unilamelares grandes
M: Miconazol
ME: Mobilidade eletroforética
MIC: Concentração inibitória mínima
PC: Fosfatidilcolina
PEG: Polietilenoglicol
SRE: Sistema retículo endotelial
SUV: Vesículas unilamelares pequenas
Tc: Temperatura de transição de fase
TSB: Tryptone Soya Broth
UV: Ultra-violeta

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lipossomos

A. D. Bangham e colaboradores, em 1965, demonstraram pela primeira vez que a difusão de cátions e ânions monovalentes em cristais líquidos de lecitina é notavelmente semelhante à difusão destes íons através de membranas biológicas (Bangham, A.D., et al., 1965). A habilidade dos lipossomos (como estes cristais líquidos foram chamados posteriormente), de incorporar solutos para os quais são seletivamente permeáveis, fez do sistema um ótimo modelo para membranas celulares, iniciando uma proliferação de estudos sobre biofísica de membrana celular, estrutura e função. Esta incorporação de solutos também formou a base para o conceito de lipossomo carreador de drogas, proposto e demonstrado na década de 1970 (Bonventre, P.F., e Gregoriadis, G., 1978). Desde a descrição inicial por Bangham, vários tipos de lipossomos foram caracterizados (Bangham, A.D., 1983).

Lipossomos são vesículas microscópicas, constituídas de múltiplas bicamadas lipídicas concêntricas formadas quando uma solução aquosa é adicionada a um filme lipídico seco (Lopez-Berestein, G., 1987).

Lipossomos são simplesmente vesículas nas quais um volume aquoso é inteiramente englobado por uma membrana composta de moléculas lipídicas (normalmente fosfolipídios naturais biodegradáveis e não tóxicos como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol) que são formadas espontaneamente quando estes lipídios são dispersos em meio aquoso. O tamanho de lipossomos ou vesículas pode variar de dezenas de nanômetros a dezenas de microns de diâmetro (New, R.R.C., 1994).

A importância dos lipossomos como sistemas de modelo de membrana é derivada do fato que os lipossomos podem ser preparados com constituintes naturais, de modo que os lipídios formem uma estrutura de bicamada que é, a princípio, idêntica à porção lipídica das membranas celulares (Huang, C.-H., 1969). A semelhança entre lipossomos e membranas naturais pode ser aumentada pela modificação química do lipídio e pode ser explorada no direcionamento de drogas ou imunomodulação, ambos “in vivo” e “in vitro”, onde a habilidade para imitar o comportamento de membranas naturais e para serem degradados pela mesma via, faz dos lipossomos um veículo seguro e eficaz para aplicações médicas (Lopez-Berestein, G., 1987; Gregoriadis, G., 1995).

Alternativamente, lipossomos podem ser compostos de componentes inteiramente artificiais, escolhidos para a melhoria de suas propriedades químicas (New, R.R.C., 1994). Moléculas surfactantes, tais como o cloreto de dioctadecildimetilamônio, contendo duas cadeias hidrocarbônicas, também podem, sob certas circunstâncias, formar vesículas com bicamadas (Kunitake, T., et al., 1977).

A ocorrência de fosfolipídios como componentes essenciais de membranas (figura 1.1) é atribuída à habilidade destes formarem espontaneamente bicamadas, quando dispersados em água. Esta propriedade de auto-organização como bicamada, em solução aquosa, é consequência da estrutura anfifílica dos fosfolipídios (Cevc, G., e Marsh, D., 1987).

Os fosfolipídios são lipídios que contêm fosfato em sua molécula, além de ácidos graxos e um álcool. São derivados do glicerol (fosfoglicerolipídios) ou da esfingosina (fosfoesfingolipídios) que contêm fosfato na sua estrutura.

Figura 1.1 - Esquema ilustrativo de uma membrana plasmática. A bicamada fosfolipídica, a estrutura básica de todas as membranas celulares, consiste de duas camadas de moléculas de fosfolipídios, onde as cadeias de ácidos graxos formam o interior hidrofóbico da bicamada, e as cabeças polares, a parte exterior hidrofílica. (Figura extraída do livro Darnell, J., et al., p. 596, 1995).

Os fosfolipídios mais abundantes das membranas celulares de mamíferos são as fosfatidilcolinas (PC), também chamadas de lecitinas, moléculas anfipáticas na qual uma ponte de glicerol liga um par de cadeias acil hidrocarbônicas hidrofóbicas com um grupo polar hidrofílico, fosfocolina. Moléculas de PC não são solúveis em água e em meio aquoso alinham-se em bicamadas planas, para minimizar as interações desfavoráveis entre a fase aquosa e as longas cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos. Tais interações são eliminadas quando as bicamadas dobram-se (sobre si mesmas), para formar vesículas fechadas. As moléculas de PC contrastam com outras moléculas anfipáticas (detergentes, lisolecitina) que formam, preferencialmente, estruturas micelares. Isto ocorre devido a um balanço hidrofóbico/hidrofílico adequado e por causa da dupla cadeia de ácidos

graxos que dá à molécula uma forma tubular mais adequada para a agregação laminar plana, quando comparada com detergentes de cabeça polar e cadeia simples, para os quais a forma cônica ajusta-se muito bem em uma estrutura micelar esférica (Israelachvili, J.N., 1992).

Fatores químicos e físicos como: componentes estruturais; transição de fase; inclinação das cadeias; conformação; empacotamento dos lipídios; permeabilidade da membrana; tamanho; número de vesículas, influenciam no comportamento e utilização dos lipossomos.

Um entendimento da transição de fase e fluidez das membranas fosfolipídicas é importante na preparação e exploração dos lipossomos, desde que a fase de uma membrana lipossômica determina propriedades como permeabilidade, fusão, agregação, ligação com proteína; fatores que podem afetar a estabilidade dos lipossomos e o comportamento deles em sistemas biológicos (Cevc, G., e Marsh, D., 1987; New, R.R.C., 1994; Beaulac, C., et al., 1998).

A diferentes temperaturas, membranas de lecitina podem existir em diferentes fases e, transições de uma fase para outra podem ser detectadas por técnicas físicas, como a calorimetria (Földner, H.H., 1981), quando a temperatura é aumentada. As membranas passam de uma fase sólida ou gel ordenada, para uma fase líquida-cristalina quando alcançam temperaturas elevadas, onde a liberdade de movimento de moléculas individuais é mais alta (figura 1.2).

A influência do comprimento da cadeia hidrocarbônica e insaturação (como também o grupo cabeça), sobre o valor da temperatura de transição (T_c) para membranas

Figura 1.2 - Estrutura de uma bicamada lipídica. Em (a), acima da temperatura de transição de fase, as moléculas lipídicas e cadeias apolares estão altamente móveis no plano da bicamada. Esta fase é chamada de líquida-cristalina. Em (b), abaixo da temperatura de transição de fase, as moléculas lipídicas formam uma disposição muito mais ordenada, chamada de fase gel. (Figura de Robertson, R. N. Extraída do livro Voet, D., Voet, J.G., Biochemistry, p. 288, 1995).

compostas de diferentes fosfolipídios é considerável. Em geral, aumentando-se o comprimento da cadeia, ou aumentando-se a saturação das cadeias, aumenta-se a temperatura de transição (Litzinger, D.C., e Huang, L., 1992; New, R.R.C., 1994).

A fluidez e carga das membranas lipossomais podem ser alteradas para objetivos específicos, como no caso de reconhecimento dos macrófagos, nos quais lipossomos carregados negativamente e com maior fluidez nas membranas são preferencialmente fagocitados. Normalmente, a incorporação de esteróides na membrana aumenta a rigidez e estabilidade biológica dos lipossomos (Lopez-Berestein, 1987; Bossche, H.V., 1990).

As membranas dos lipossomos são semipermeáveis e a difusão de moléculas e íons através das membranas varia consideravelmente. Para moléculas com alta solubilidade em meio orgânico e aquoso, uma membrana fosfolipídica constitui uma barreira muito tênue; por outro lado, solutos polares tais como glicose e compostos de peso molecular mais altos, passam através da membrana lentamente. Moléculas menores com carga neutra (como água e uréia) podem difundir-se rapidamente, enquanto íons carregados diferem muito em seu comportamento. Prótons e íons hidroxila atravessam a membrana rapidamente. Íons sódio e potássio atravessam vagarosamente, não somente em relação aos prótons mas também em relação aos ânions como cloreto e nitrito. A permeabilidade para cálcio e outros íons multivalentes é menor do que para íons monovalentes como sódio, tanto quanto maior o seu número de carga e diâmetro da camada de solvatação (Bangham, A.D., et al., 1967; New, R.R.C., 1994).

A permeabilidade da membrana aos prótons aumenta na temperatura de transição de fase (T_c) e assim permanece se a temperatura for aumentada, contrastando com os íons sódio e outros solutos onde a permeabilidade acima e abaixo da temperatura de transição de fase é mais baixa do que na temperatura T_c . Assim prótons e moléculas de água, para os quais o transporte é consideravelmente mais rápido do que para íons sódio, possuem rotas extras através da membrana que são qualitativamente diferentes, possivelmente na forma de canais aquosos (New, R.R.C., 1994). Isto refere-se a lipossomos nos quais o compartimento interno e externo estão em equilíbrio.

Como as membranas são semipermeáveis, uma diferença na concentração de soluto de um lado e do outro da membrana pode gerar uma pressão osmótica, que leva ao acúmulo de moléculas de água de um só lado. No caso de uma alta concentração de soluto incorporado dentro do lipossomo em tampão de baixa concentração, os lipossomos incharão, o volume de água aumentará e a área da membrana será consideravelmente aumentada. Em consequência, o espaçamento entre as moléculas de fosfolipídios adjacentes serão proporcionalmente aumentados. Nessas condições, pode ocorrer um acelerado vazamento através da membrana, para solutos de peso molecular equivalentes (ou menores) que a glicose. O vazamento de sacarose não é afetado. Em alguns casos, contudo, a pressão gerada pode ser suficiente para romper completamente a membrana,

levando à perda total do conteúdo do lipossomo para a fase aquosa (Bangham, A.D., et al., 1967; New, R.R.C., 1994).

Os lipossomos podem interagir com células de diversos modos: transferência intermembranas, liberação por contato, adsorção, fusão, fagocitose/endocitose.

A transferência intermembranas de componentes lipídicos pode ocorrer pela aproximação de duas bicamadas fosfolipídicas, sem a necessidade de rompimento do lipossomo ou integridade da membrana, com uma retenção completa do conteúdo do compartimento aquoso dos lipossomos (figura 1.3 a). Interações semelhantes podem ocorrer entre lipossomos e lipoproteínas (particularmente lipoproteínas de alta densidade) e, sob certas circunstâncias, levar à destruição dos lipossomos. O grau de destruição dos lipossomos depende da relação de lipoproteínas e lipossomos e o sistema é saturável a altas concentrações de lipossomos. Como o colesterol transfere-se rapidamente entre bicamadas, a incorporação de colesterol nas membranas dos lipossomos tem sido usada como método de suplementar ou esgotar membranas celulares com colesterol "in vitro", para inibir a desintegração dos lipossomos (New, R.R.C., et al., 1994).

A liberação por contato do conteúdo aquoso do lipossomo ocorre através de um mecanismo no qual o contato com as células provoca um aumento da permeabilidade

Figura 1.3 - Interações de lipossomos com células. O desenho ilustra dois modos nos quais os conteúdos lipossomais podem ser incorporados dentro de células, sem a necessidade de internamento do lipossomo. (a) transferência intermembranas. Materiais lipofílicos situados na membrana do lipossomo podem inserir em outras membranas com a qual aquele lipossomo entra em contato, desde que a distância entre as duas membranas seja pequena o suficiente para que os materiais sejam transferidos completamente no contato com o volume de fase aquosa, durante o processo de transferência. (b) liberação por contato. Isto pode ocorrer com as membranas da célula e do lipossomo, por serem colocadas juntas; perturbações como resultado daquele contato aumentam a permeabilidade da membrana do lipossomo (e talvez da membrana celular também) para moléculas do soluto incorporadas no compartimento aquoso do lipossomo. Isto traz certo vazamento de soluto do lipossomo diretamente para a célula. (Figura extraída do livro New, R.R.C., *Liposomes-a practical approach*, p. 222, 1994).

da membrana do lipossomo (figura 1.3 b). Isto leva à liberação de solutos solúveis em água em alta concentração na vizinhança da membrana celular, através da qual estes solutos, sob certas circunstâncias, podem passar (New, R.R.C., et al., 1994).

A adsorção de lipossomos na superfície da célula pode frequentemente ocorrer com pequeno ou nenhum internamento de componentes aquosos ou lipídicos, como

resultado de forças de atração físicas, ou como resultado de ligações por receptores específicos com ligantes nas membranas das vesículas (figura 1.4 a). A adsorção física de lipossomos pode ocorrer através da ligação a uma proteína específica da superfície celular. A adsorção é maior abaixo ou na temperatura de transição de fase das membranas dos lipossomos (lipídios na fase gel), provavelmente porque os sítios de ligação envolvidos são defeitos na membrana, que são mais estáveis a temperaturas mais baixas. A adsorção é um pré-requisito essencial para a ingestão dos lipossomos pelas células (New, R.R.C., et al., 1994).

Figura 1.4 - Ligação do lipossomo à célula. Nem todos os lipossomos que se associam com células são subsequentemente capturados por ela. Em alguns casos, os lipossomos podem permanecer passivamente adsorvidos sobre a superfície indefinidamente (a) com completa retenção dos conteúdos aquosos e lipídicos dentro do lipossomo, separado da célula. Em outros casos, após o estágio de adsorção inicial, a fusão pode acontecer (b) com a incorporação dos lipídios lipossomais dentro da membrana da célula, e introdução do conteúdo aquoso no citoplasma. (Figura extraída do livro New, R.R.C., *Liposomes-a practical approach*, p. 223, 1994).

A aproximação entre lipossomos e membranas celulares pode levar à fusão, resultando na completa mistura dos lipídios lipossomais com os da membrana plasmática das células, com a liberação dos conteúdos lipossomais dentro do citoplasma (figura 1.4 b). No caso de vesícula multilamelar, esta ação envolveria a introdução da membrana interna da lamela do lipossomo intacta no citoplasma, podendo ocorrer novas interações entre os lipossomos e organelas intracelulares. O processo de fusão “in vivo” parece ocupar o segundo lugar em relação a fagocitose pois, na maioria das vezes, os lipossomos são eliminados mais rapidamente da corrente sangüínea pelas células fagocitárias. Os ambientes mais favoráveis para processos de fusão seriam aqueles com baixo envolvimento do sistema retículo endotelial (SRE) (New, R.R.C., et al., 1994).

Estudos recentes foram realizados para o entendimento dos mecanismos de fusão de membranas, utilizando lipossomos como modelos de membranas (Pécheur, E.I.,

et al., 1999; Martin, I., et al., 1999; Pécheur, E.-I., et al., 1999). O fenômeno de fusão de membranas envolvido em processos intracelulares como endocitose e exocitose, em processos intercelulares como interação célula-célula, em processos de infecção por envelopados virais, é de significativa importância para a vida da célula. Principalmente, o mecanismo de infecção por vírus envolve uma etapa distinta de fusão de membrana. Estes estudos demonstraram que a fusão induzida por peptídeos é regulada pela composição lipídica da membrana (Pécheur, E.-I., et al., 1999).

Células com atividade fagocitária incorporam lipossomos dentro de endossomos, vacúolos intracelulares formados pela invaginação da membrana plasmática, seguido da ação da bomba de prótons ligada a membrana, em pH de 5,0 - 5,5. Estes endossomos então fundem com os lisossomos para formar lisossomos secundários onde a digestão celular ocorre próximo de pH 4,5. As enzimas lisossomais quebram os lipossomos; os fosfolipídios são hidrolisados a ácidos graxos, os quais podem então ser reciclados, e reincorporados dentro do fosfolipídio do hospedeiro. Durante o processo de quebra dos lipossomos nos lisossomos, os conteúdos do compartimento aquoso serão liberados, e poderão permanecer nos lisossomos até a exocitose (particularmente se estiverem altamente carregados a baixo pH), ou então, vazarão dos lisossomos e ganharão acesso ao resto da célula.

Os lipossomos administrados "in vivo" estão sujeitos a interações adicionais que podem determinar a taxa de depuração e o órgão que irá tomá-los. Essas interações são controladas por fatores como tamanho e composição da membrana. Em circunstâncias normais, quando lipossomos de lecitina/colesterol são injetados na corrente sanguínea, são tomados por células do SRE do fígado e baço (New, R.R.C., et al., 1994; Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1995).

Além dos constituintes químicos das membranas que determinam propriedades tais como fluidez, densidade de carga, e permeabilidade, os lipossomos podem ser caracterizados pelo seu tamanho e forma (Janknegt, R., et al., 1992). Os lipossomos podem apresentar-se como uma simples membrana de bicamada, ou como múltiplas membranas lamelares concêntricas.

Vesículas unilamelares: são lipossomos com uma simples bicamada envolvendo uma fase aquosa (figuras 1.5 e 1.7).

Vesículas unilamelares pequenas: são lipossomos de menor tamanho possível para as vesículas fosfolipídicas (tamanho mínimo: 20-25 nm). O limite mínimo varia de acordo com a força iônica do meio aquoso e a composição lipídica da membrana. Como (de acordo com sua definição) estes lipossomos estão fechados no menor limite de tamanho, eles terão uma população relativamente homogênea em termos de tamanho (Woodle, M.C., e Papahadjopoulos, D., 1997).

Vesículas unilamelares grandes: lipossomos unilamelares com diâmetros de 100 nm ou mais, são geralmente referidos como vesículas unilamelares grandes, ou vesí-

culas unilamelares de tamanho intermediário (New, R.R.C., 1994). Nos casos em que as vesículas unilamelares tenham diâmetro muito grande (como 10 μm), podem ser chamadas de vesículas unilamelares gigantes (Woodle, M.C., e Papahadjopoulos, D., 1997).

As vesículas multilamelares possuem um grande compartimento lipídico que engloba as múltiplas camadas lipídicas e compartimentos aquosos (que consistem em espaços entre as camadas).

Figura 1.5 - Micrografia eletrônica de um lipossomo unilamelar. A parede, como o diagrama indica, consiste de uma bicamada. (Foto de Stoekenius, W., extraída do livro Voet, D., Voet, J.G., Biochemistry, p. 286, 1995).

Vesículas multilamelares: geralmente consistem de uma população de vesículas em uma ampla faixa de tamanho (100 – 1000 nm), com cada vesícula consistindo de cinco ou mais lamelas concêntricas (figura 1.6). Vesículas compostas de poucas lamelas concêntricas são as vezes chamadas de lipossomos oligolamelares (New, R.R.C., 1994).

Vesículas multilamelares com um grande compartimento lipídico oferecem a vantagem de incorporação de drogas hidrofóbicas; vesículas unilamelares grandes produzidas pelo método de evaporação reversa são escolhidas para a incorporação de drogas hidrofílicas (Lopez-Berestein, G., 1987).

Existem diversos meios de se produzir vesículas e as propriedades físicas e funcionais das mesmas variam com o método de preparação (Woodle, M.C., e Papahadjopoulos, D., 1997).

Os procedimentos para a preparação de lipossomos podem ser generalizados e divididos em três estágios: primeiro, a preparação da fase aquosa e lipídica; segundo, o

Figura 1.6 - Seção de uma micrografia eletrônica de um lipossomo multilamelar, corado negativamente, mostrando as bicamadas lipídicas alternando com compartimentos aquosos. Três destas bicamadas estão aumentadas esquematicamente para ilustrar a sua organização em bicamada, na qual as cabeças polares dos fosfolipídios são hidrofílicas e as cadeias acila formam as regiões hidrofóbicas. Os círculos amarelos representam drogas incorporadas nos compartimentos aquosos. Estruturas ovais verdes representam colesterol e, as azuis, drogas ou proteínas (Figura extraída de Gregoriadis, G., 1995).

processamento primário envolvendo a hidratação do lipídio (hidratação de lipídios: formação de lipossomos); e terceiro, o processamento secundário, essencial em alguns casos, e opcional em outros (trocas de tamanho após a formação de lipossomos). A etapa de processamento secundário pode ser usada separadamente ou, em alguns casos, combinada (Woodle, M.C., e Papahadjopoulos, D., 1997).

Na preparação da fase aquosa é onde o tampão aquoso, droga, quelato, osmolaridade, força iônica, pH, e concentração do material a ser encapsulado têm de ser

ajustados, em relação ao meio no qual os lipossomos serão suspensos após a formação. Para a maioria dos métodos de preparação usando detergente, o detergente é adicionado à fase aquosa.

Na preparação da mistura molecular de lipídios, o material lipídico é dissolvido em um solvente orgânico adequado ou mistura, que pode ser miscível ou não com a fase aquosa, dependendo do método que será usado. Em muitos métodos, uma mistura lipídica seca é produzida pela remoção do solvente (Woodle, M.C., e Papahadjopoulos, D., 1997).

Diversos métodos de preparação de lipossomos são encontrados na literatura (New, R.R.C., et al., 1994; Wacker, M., e Schubert, R., 1998), entre os quais:

Figura 1.7 - Desenho de vesícula (lipossomo unilamelar). (Figura extraída do livro Voet, D., Voet, J.G., Biochemistry, p. 307, 1995).

Métodos de dispersão mecânica: com agitação manual, sem agitação, congelamento e secagem, hidratação de lipídios por meios físicos, microemulsificação, sonicação, extrusão por membranas, desidratação - reidratação (Beaulac, C., et al., 1998), dispersão por sonicação com congelamento e descongelamento, aplicação de alta pressão hidráulica usando prensa "French press" (Barenholz, Y., et al., 1979), fusão induzida por cálcio;

Dispersão em solventes: injeção de etanol (Batzri, S., e Korn, E.D., 1973), injeção de éter (Deamer, D., e Bangham, A.D., 1976; Pourkavoos, N., 1992), água em fase orgânica (formação de gotinhas de água em óleo, dupla emulsão, lipossomos multivesiculares, evaporação de fase reversa, vesículas plurilamelares estáveis (Vitas, A.I., et al., 1996);

Solubilização usando detergentes: (sais biliares, diálise de alquil glicosídeos, partículas de vírus solubilizadas em Triton X-100).

Para sistemas artificiais, dispersos em solução aquosa, métodos de sonicação em banho (Kunitake, et al., 1977); sonicação com um tip (Mortara, et al., 1978; Carmona-

Ribeiro, A.M., et al., 1991); vaporização de solução clorofórmica do lipídio em água (Carmona-Ribeiro, A.M., e Chaimovich, H., 1983) foram descritos. O primeiro resulta em vesículas multilamelares; o segundo em vesículas unilamelares e/ou fragmentos de bicamada; o terceiro em vesículas unilamelares grandes.

1.2. Vesículas de dioctadecildimetilamônio (DODAB)

Os anfífilos sintéticos brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) ou cloreto (DODAC) são compostos de amônio quaternário (figura 1.8) que formam bicamadas fechadas e estáveis (vesículas), em solução aquosa (Carmona-Ribeiro, A.M. e Chaimovich, H., 1983; Carmona-Ribeiro, A.M., et al., 1985; Carmona-Ribeiro, A.M., 1992; Carmona-Ribeiro, A.M., 1993). Estas vesículas podem ser vistas como “policátions” altamente carregados.

Figura 1.8 - Estrutura química do DODAC e DODAB.

Lipossomos catiônicos sintéticos compostos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) podem ter múltiplos usos (Carmona-Ribeiro, A.M., 2000). Partículas de sílica ou microesferas de poliestireno podem ser funcionalizadas pela cobertura com bicamadas de DODAB (Carmona-Ribeiro, A.M., e Midmore, B.R., 1992; Lessa, M.M., e Carmona-Ribeiro, A.M., 1996; Rapuano, R., e Carmona-Ribeiro, A.M., 1997) ou monocamadas de fosfolipídios (Carmona-Ribeiro, A.M., e Herrington, T.M., 1993). A adesão de vesículas ou deposição de bicamadas de fosfolipídios ou DODAB, sobre superfícies de óxido de silício foi avaliada através da determinação de ângulos de contato, e pode ser uma ferramenta importante para pesquisas de desenvolvimento de biossensores e de kits imunológicos (Salay, L.C., e Carmona-Ribeiro, A.M., 1998; Salay, L.C., e Carmona-Ribeiro, A.M., 1999). Os efeitos de contra-íons sobre a transição de fase, estrutura de bicamada, e tamanho de vesículas foram demonstrados para sais de DODA (Nascimento, D.B., et al., 1998).

Biomoléculas carregadas negativamente como proteínas e nucleotídeos podem ser carregadas pelos lipossomos de DODAB. Drogas ou biomoléculas podem ser solubilizadas ou incorporadas nas bicamadas catiônicas. Uma proteína antigênica de *Mycobacterium leprae* de 18 kDa foi incorporada em lipossomos catiônicos de DODAB gerando ação imunoadjuvante (Tsuruta, L.R., et al., 1997). A inserção do nucleotídeo 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato nas bicamadas catiônicas foi demonstrada (Kikuchi, I.S., et al., 1999). Características físico-químicas da interação de vesículas catiônicas grandes de DODAB com o nucleotídeo foram determinadas, e a relação molar DODAB/nucleotídeo na adsorção máxima mostrou ser de 2:1. Interações entre DNA de vários bacteriófagos com lipossomos sintéticos de DODAB mostraram que o primeiro passo da interação é dado por interações eletrostáticas entre o DNA e a bicamada. A atração hidrofóbica entre as bases nitrogenadas do DNA e as cadeias hidrocarbônicas das bicamadas dos lipossomos, exercem um papel importante nas propriedades físico-químicas do complexo (Kikuchi, I.S., e Carmona-Ribeiro, A.M., 2000). Nucleotídeos ou DNA podem ser fisicamente adsorvidos por lipossomos catiônicos para serem transferidos a células de mamíferos em terapia genética (Legendre, J.-Y., e Szoka Jr., F.C., 1992; Rädler, J.O., et al., 1997).

Os lipossomos de DODAB são bactericidas (Tápias, G.N., et al., 1994; Sicchierolli, S.M., et al., 1995; Martins, L.M.S., et al., 1997; Campanhã, M.T.N., et al., 1999), em concentrações que praticamente não afetam células de mamíferos em cultura (Carmona-Ribeiro, A.M., et al., 1997). Quando vesículas catiônicas de DODAB interagem com a superfície irregular carregada negativamente de *Escherichia coli*, DODAB induz floculação das bactérias para densidades numéricas altas (a partir de 10^7 células por mL) e mata *E. coli* em concentrações de décimos de micromolar (Tápias, G.N., et al., 1994; Sicchierolli, S.M., et al., 1995).

Os principais aspectos físico-químicos da interação entre vesículas catiônicas de DODAB e *E. coli* já foram descritos (Tápias, G.N., et al., 1994). Isotermas de adsorção obtidas foram de alta afinidade (adsorção não reversível). Cálculos para a adesão de uma paliçada de vesículas íntegras sobre as bactérias resultaram em valores consistentes com a adesão experimental limite. Observou-se ainda, uma agregação bacteriana induzida pelas vesículas catiônicas tanto por turbidimetria quanto por microscopia óptica (Tápias, G.N., et al., 1994; Sicchierolli, S. M., et al., 1995). A ação floculante das vesículas de DODAB foi quantificada, observando-se floculação rápida (com meia vida de minutos) a partir de 10^7 bactérias por mL (Sicchierolli, S.M., et al., 1995). A morte celular mostrou-se dissociada do fenômeno de agregação, ocorrendo também para células não agregadas (Sicchierolli, S.M., et al., 1995).

O fato das vesículas no estado gel rígido não se desintegrarem na adsorção à superfície celular bacteriana, é de considerável significância para entrega por endocitose, de vesículas contendo drogas dentro do compartimento aquoso.

A ação bactericida do DODAB foi demonstrada estender-se a outras espécies bacterianas de importância clínica como *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além da *E. coli* (Martins, L.M.S., et al., 1997). A susceptibilidade das quatro espécies bacterianas ao DODAB foi demonstrada e comparada, através de curvas de viabilidade celular (Campanhã, M.T.N., et al., 1999). Foi estabelecida a relação da troca de carga da superfície celular com a viabilidade celular de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa, demonstrando que, quando a superfície das bactérias encontrava-se positiva, as bactérias apresentavam viabilidade em torno de 0%.

A ação antimicrobiana das vesículas de DODAB foi estendida aos fungos. A ação antifúngica do DODAB foi estudada para *Candida albicans*, através de curvas de viabilidade celular (Campanhã, M.T.N., et al., 2000). DODAB mostrou ser fungistático para a concentração de 1 mM, comprovando sua toxicidade diferencial. A solubilização de duas drogas antifúngicas hidrofóbicas, anfotericina B e miconazol em vesículas pequenas de DODAB, mostrou a possibilidade de utilizar o DODAB como carreador destas drogas (Campanhã, M.T.N., et al., 2000). As formulações lipossomais mostraram ação fungicida para as duas drogas, para concentrações de drogas consideradas baixas e tempo de interação de 24 h (Campanhã, M.T.N., et al., 2000; Campanhã, M.T.N., et al., 2000).

1.3. Depuração dos lipossomos

Uma eficiente entrega de drogas usando lipossomos é dependente de um ou mais dos seguintes fatores: retenção quantitativa das drogas pelo carreador na rota de destino; controle sobre a taxa de depuração das vesículas do sistema circulatório (ou outro compartimento do corpo quando a droga é administrada localmente), e acesso preferencial (ou ao menos suficiente) rápido ao alvo. Todos os três critérios mostram ser intimamente conectados com a composição, estrutura e função do ambiente biológico (Gregoriadis, G., 1995). Como exemplo, lipoproteínas de alta densidade (HDLs) no plasma, removem moléculas de fosfolipídios rapidamente das bicamadas das vesículas, levando à desintegração destas e prematura perda da droga (Vitas, A.I., et al., 1996).

Após a administração "in vivo" por via intravenosa, lipossomos convencionais são retirados por células do SRE, sendo potencialmente úteis como carreadores de antibióticos para tratamentos de infecções que envolvem o SRE (Woodle, M.C., e Lasic, D.D., 1992; Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1998). Alternativamente, o tamanho das vesículas e composição fosfolipídica podem ser controlados para trocar a biodistribuição lipossômica e o tempo de circulação (Van Etten, E.W.M., et al., 1995).

As taxas de depuração dos lipossomos são dependentes da dose, e também

variam de acordo com as características das vesículas, como tamanho e carga de superfície. A taxa de depuração dos lipossomos grandes em injeção intravenosa é mais rápida do que a dos lipossomos pequenos, independente da carga de superfície, que também acelera a depuração da vesícula (figura 1.9).

Quando o objetivo for alcançar as células do SRE (como no caso de infecções por microrganismos intracelulares) o critério para o sucesso da entrega da droga é que os lipossomos retenham quantitativamente a carga enquanto eles estiverem circulando. A desestabilização das bicamadas provocada pelas HDLs, tem sido resolvida pela manipulação da composição da bicamada, como por exemplo, pela adição de excesso de colesterol e/ou usando fosfolipídios com uma alta temperatura de transição de fase gel - líquida-cristalina (Gregoriadis, G., 1995).

Figura 1.9 - O esquema representa a endocitose de lipossomo unilamelar contendo droga. A vesícula contendo droga (*) reconhece a célula alvo através de um ligante como opsonina (>-), e o contato com a célula leva à endocitose (-). O endossomo contendo o lipossomo pode fundir com um lisossomo. Dentro do fagolisossomo, fosfolipases lisossomais (•) degradam o lipossomo e liberam a droga, que pode então agir dentro da organela ou difundir para dentro de outras regiões da célula. Alternativamente, mas provavelmente em menor extensão, "in vivo", o lipossomo funde com a membrana celular (->) e introduz seu conteúdo aquoso solúvel no citoplasma, ficando disponível para o restante da célula. Substâncias hidrofóbicas (■) carregadas pela bicamada do lipossomo são transferidas diretamente para a membrana celular. Drogas associadas a lipossomos que são circundadas por lamelas, não estão normalmente disponíveis para o ambiente (e). Abreviaturas: N, núcleo; AG, aparelho de Golgi; REL e RER, retículo endoplasmático liso e rugoso; M, mitocôndria; L, lisossomo; C, célula. (Figura de Gregoriadis, G., 1995).

O prolongamento do tempo de circulação dos lipossomos pequenos (com diâmetro de 100 nm ou menos) no sangue, parece estar diretamente relacionado a sua retenção no sistema circulatório, isto é, quanto mais estável o lipossomo (em termos de retenção de soluto), maior sua meia-vida. Isto acontece quando a desestabilização da superfície das vesículas promovida pelas HDLs diminui, com a redução na adsorção de opsoninas e conseqüente diminuição no reconhecimento e tomada pelas células do SRE. Para prolongar a circulação de lipossomos pequenos, a estratégia de tornar a superfície dos lipossomos altamente hidrofílica, por ligação covalente de polímeros de polioxietileno, tem sido recentemente utilizada. Os polímeros provavelmente repelem opsoninas, permitindo que os lipossomos circulem no sangue por mais tempo, de uma maneira aparentemente independente da dose (Gregoriadis, G., 1995).

A formulação recente de lipossomo contendo derivado de fosfolipídio coberto com polietilenoglicol (PEG), chamado de lipossomo estericamente estabilizado ou "stealth" lipossomo, pode evitar a rápida internalização pelos macrófagos e aumentar o tempo de circulação no sangue (Woodle, M.C., e Lasic, D.D., 1992; van Etten, E.W.M., et al., 1995). A estabilidade estérica refere-se à estabilização estérica da partícula coloidal inorgânica, com redução nas interações da partícula que levam à agregação e fusão. Tal como uma barreira estérica, não apenas reduz as interações partícula-partícula mas, também, a adsorção de várias macromoléculas sobre a superfície da partícula, perda de componentes para outras partículas, ou interações com células, fornecendo uma maior estabilidade aos lipossomos, especialmente em ambientes biológicos (Woodle, M.C., e Lasic, D.D., 1992). Com estes lipossomos, não são necessárias altas doses de lipídios para obter prolongada circulação no sangue (Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1998; Storm, G., et al., 1998). Com estes lipossomos espera-se melhorar a chance de contato com outras células intravasculares ou extravasculares em áreas de inflamação ou tumores, onde os vasos possibilitam extravasamento, como resultado de um grande número de frestas e junções inter-endoteliais (Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1998; Storm, G., et al., 1998).

1.4. Avanços da pesquisa aplicada envolvendo lipossomos

Lipossomos são muito conhecidos como carreadores de agentes antimicrobianos e anticancerígenos (Lopez-Berestein, G., 1987; Papahadjopoulos, D., et al., 1991). Lipossomos reduzem a toxicidade de drogas no órgão alvo pela modificação na distribuição da droga e aumentam a ação terapêutica de vários antimoniais (New, R.R.C., et al., 1978; New, R.R.C., et al., 1981), imunomoduladores (Lopez-Berestein, G., et al., 1987), agentes antifúngicos (Lopez-Berestein, G., et al., 1984; Lopez-Berestein, G., et al., 1985), e antibióticos (Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1986; Bonventre, P.F., e Gregoriadis, G.,

1978; Schiffelers, R.M., et al., 1999). O encapsulamento com lipossomos resulta em substancial concentração local de antimicrobianos (Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1993; Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1995). Proteção lipossomal de antibióticos contra degradações enzimáticas também foram demonstradas (Pourkavoos, N., 1992).

O uso do carreamento de antibióticos por lipossomos tem sido extensivamente estudado, principalmente para aumentar a eficácia, na tentativa de diminuir a toxicidade. Os aminoglicosídeos amicacina, netilmicina e tobramicina, incorporados em lipossomos aniônicos e catiônicos preparados por sonicação, foram utilizados para avaliar a influência das cargas lipídicas sobre a eficiência de encapsulamento dos lipossomos e aumento da atividade bactericida, para casos de resistência bacteriana em infecções pulmonares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Omri, A., et al., 1995). Lipossomos carregados positivamente mostraram-se mais eficientes na incorporação de antibióticos comparados aos lipossomos carregados negativamente, possibilitando o estudo para tratamento de infecções por *Pseudomonas* (Omri, A., et al., 1995).

Apesar de controvérsias sobre as formas e valor da antibióticoterapia para pacientes portadores de fibrose cística, é reconhecido que ela auxilia na redução dos sintomas de exacerbações pulmonares agudas, reduz a mortalidade, e melhora a qualidade de vida dos pacientes (Beaulac, C., et al., 1996). A terapia usual para pacientes com fibrose cística colonizados por *P. aeruginosa*, envolve o uso de um aminoglicosídeo e/ou um β -lactâmico. Estes antibacterianos requerem uma freqüente administração parenteral de altas doses, para alcançar concentrações com eficiência terapêutica no soro. Nefrotoxicidade e ototoxicidade estão relacionadas com as concentrações de tobramicina no soro. Formulações lipossomais rígidas e fluidas com tobramicina encapsulada foram comparadas com a droga livre, quando administradas em ratos com infecção pulmonar crônica (Beaulac, C., et al., 1996). A formulação lipossomal fluida apresentou uma maior eficiência bactericida, mostrando a influência da composição lipídica das formulações lipossomais sobre a eficiência de drogas encapsuladas. O alto nível de eficiência bactericida observado com lipossomos fluidos (relações molares de 10:1 e 15:1) de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), pareceu dependente do nível de fluidez, talvez pelo auxílio na passagem do antibiótico através da membrana externa da bactéria (Beaulac, C., et al., 1996).

A estabilidade de lipossomos contendo tobramicina foi avaliada a 4°C, à temperatura ambiente, e a 37°C, e mostrou-se que os lipossomos a 37°C ainda retêm a mesma quantidade da droga (até 16 h) como a 4°C e à temperatura ambiente (Beaulac, C., et al., 1998). A alta atividade bactericida da tobramicina incorporada em lipossomos compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) para cinco espécies bacterianas, em concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (MIC), sugeriu uma interação direta dos lipossomos com as bactérias, tal como fusão (Beaulac, C., et al., 1998).

A localização da infecção é importante na escolha do tipo de lipossomo a ser usado como carreador de antibiótico. A administração intravenosa de lipossomos convencionais mostra alta afinidade pelas células do sistema retículo endotelial, e os faz apropriados para direcionamento específico de antimicrobianos para microrganismos residentes em células do SRE (Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1995).

Modelos de infecções com protozoários, vírus e bactérias, nos quais os agentes antimicrobianos incorporados em lipossomos tiveram sucesso, foram infecções em células do SRE, causadas por patógenos intracelulares obrigatórios ou facultativos. Como a maior parte dos antibióticos é relativamente ineficiente para infecções intracelulares em geral, estudos iniciais com lipossomos demonstraram um aumento no índice terapêutico dos antibióticos, após a incorporação em lipossomos. Porém, a aplicação de lipossomos clássicos para entrega de antibióticos em infecções extracelulares, em tecidos sem o envolvimento do sistema fagocitário (SRE) é limitada. O uso de lipossomos como carreadores universais de drogas, requer uma baixa tomada dos lipossomos por células do SRE, permitindo que os lipossomos circulem por tempo suficiente para alcançar os tecidos ou células infectados (Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1995).

A cobertura da superfície de lipossomos com PEG é uma estratégia que fornece uma barreira estérica contra a opsonização, reduzindo a interação com células do SRE e, conseqüentemente, prolongando o tempo de interação (Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., et al., 1995).

Lipossomos estericamente estabilizados com PEG foram utilizados para avaliar os efeitos de densidade de superfície de PEG, tamanho de partícula, fluidez da bicamada e carga de superfície de lipossomos estericamente estabilizados, sobre a cinética de circulação e localização dos lipossomos em tecido de pulmão de rato infectado com *Klebsiella pneumoniae* (Schiffelers, R.M., et al., 1999). A localização seletiva dos lipossomos com PEG no tecido infectado é provavelmente o resultado de um efeito na mudança da permeabilidade microvascular, como ocorre nos tumores e tecidos inflamados. O grau de localização dos lipossomos no sítio infectado é provavelmente independente das características físico-químicas destes lipossomos com PEG, mas uma melhora na localização seletiva de lipossomos pode ser alcançada, desde que, certos critérios com respeito à densidade do PEG, tamanho e inclusão de fosfolípidios carregados sejam encontrados (Schiffelers, R.M., et al., 1999).

A atenuação da característica de cardiotoxicidade “dose-dependente” foi a principal atração pelo uso da formulação lipossomal da doxorrubicina. Pesquisas iniciais com a formulação lipossomal de doxorrubicina revelaram que os lipossomos desviam a droga de sítios com endotélio contínuo como o músculo cardíaco para órgãos ricos em células fagocitárias pertencentes ao SRE, como fígado e baço (Storm, G., et al., 1998). Apesar da vantagem da reduzida cardiotoxicidade, a tomada pelo sistema fagocitário é desvantajosa pela redução da disponibilidade da droga ao tumor, o que tornou a formulação

lipossomal clássica menos atrativa (Storm, G., et al., 1998).

A introdução de lipossomos estericamente estabilizados de longa circulação, com a superfície coberta com PEG, tem expandido o potencial de drogas em tumores. Significativa atividade antitumoral foi obtida com a formulação industrial de doxorubicina em lipossomos de longa circulação cobertos com PEG, DOXIL (Papahadjopoulos, D., et al., 1991; Storm, G., et al., 1998). Foi observado um acúmulo de droga no tecido tumoral, combinado com uma atividade antitumoral superior e um decréscimo de toxicidade quando comparada à droga livre, quando estes lipossomos são usados para o transporte de doxorubicina, em vários modelos de tumor em animais (Papahadjopoulos, D., et al., 1991; Storm, G., et al., 1998; Working, P.K., et al., 1999). O acúmulo de lipossomos em tumores envolve extravasamento, presumivelmente devido ao aumento de permeabilidade do endotélio capilar (Papahadjopoulos, D., et al., 1991).

A importância da retenção de drogas em lipossomos, permitindo que sejam entregues nos sítios desejados sem que haja vazamento da droga antes de atingir o local de infecção, tem sido objeto de estudos (Webb, M.S., et al., 1995; Pourkavoos, N., 1992).

Lipossomos catiônicos, usados inicialmente para melhorar a transfecção de células com DNA de plasmídeo e RNA, vem sendo utilizados como um sistema de entrega de oligonucleotídeos. São poderosas ferramentas terapêuticas contra doenças virais e câncer (Stein, C.A., e Cheng, Y.-C., 1993). Os oligonucleotídeos antisense e antígenos são moléculas negativamente carregadas e relativamente grandes que não têm acesso fácil aos seus sítios de ação no citoplasma e núcleo. Os oligonucleotídeos não ficam encapsulados nos lipossomos; os lipossomos ligam-se a estes compostos aniônicos eletrostaticamente. Complexos de oligonucleotídeos com lipossomos catiônicos mostraram grande efeito do meio sobre o tamanho e morfologia destes complexos, quando submetidos em meio de cultura de células e tampão (Jääskeläinen, I., et al., 1998).

Pensou-se que a entrega celular de oligonucleotídeos e DNA de plasmídeo, por lipossomos catiônicos, pudesse ocorrer através da fusão dos lipídios catiônicos com membranas celulares carregadas negativamente, capacitando o aumento da entrega citoplasmática; contudo, trabalhos mais recentes mostraram que endocitose e desestabilização da membrana endossomal é o principal mecanismo de entrega dos lipossomos (Friend, D.S., et al., 1996). Este pode ser também o processo na entrega de oligonucleotídeos (Jääskeläinen, I., et al., 1998).

Apesar da melhora na entrega dos oligonucleotídeos pelos lipossomos catiônicos, tais formulações requerem um excesso de lipídio catiônico sobre o oligonucleotídeo, aumentando o risco de toxicidade associado a altas doses de lipídio, co-administrado com doses terapêuticas de oligonucleotídeo. Além disso, partículas positivamente carregadas tendem a interações inespecíficas com proteínas plasmáticas e superfícies celulares carregadas negativamente. Isto pode levar à desestabilização, dissociação, e depuração rápida dos complexos lipossomo - oligonucleotídeo pelo sistema fagocitário mononuclear,

antes de alcançar o tecido desejado. Lipossomos formulados com lipídios catiônicos e o fosfolipídio dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) incorporados com DNA, seja através de um oligonucleotídeo antisense ou um plasmídeo vetor, mostraram-se inapropriados para a transfecção de ácidos nucleicos em macrófagos “in vitro” (Filion, M.C., e Philips, N.C., 1998). Estes lipossomos apresentaram alta toxicidade aos macrófagos, e devem ser utilizados com precauções “in vivo”.

Para controlar os efeitos adversos encontrados em formulações lipossomais convencionais de lipídios catiônicos na entrega de DNA, a utilização de PEG nas formulações tem mostrado bons resultados, para a aplicação “in vivo”. Modificação da superfície do lipossomo com polietilenoglicol foi utilizada para a melhoria no carreamento de oligonucleotídeo, estabilidade dos complexos resultantes, e especificidade de entrega celular por lipossomos catiônicos. Os complexos apresentaram estruturas vesiculares intactas semelhantes aos lipossomos originais e o seu tamanho (100 - 130 nm) não foi alterado após várias semanas de estocagem. Após a exposição ao plasma humano, os lipossomos modificados com PEG retiveram cerca de 60% da ligação original com o oligonucleotídeo (Meyer, O., et al., 1998).

Lipossomos catiônicos modificados com PEG permitem altos carreamentos de oligonucleotídeos sem perda de estabilidade estrutural (Hong, K., et al., 1997). Os complexos são estáveis contra agregação e retêm o oligonucleotídeo no plasma sangüíneo, como também a habilidade para aumentar a entrega celular de oligonucleotídeo na presença de soro. A presença de PEG também limita o potencial zeta negativo observado sobre a superfície dos complexos. Portanto, estes lipossomos catiônicos modificados com PEG podem ser muito úteis em terapia gênica, no desenvolvimento de um carreador eficiente para entrega de oligonucleotídeos “in vivo” (Meyer, O., et al., 1998; Sternberg, B., et al., 1998).

Um novo conceito de vacinas utilizando lipossomos tem sido desenvolvido, com a injeção direta de DNA de plasmídeo codificando o antígeno que, seguido da tomada pelas células, vai para o núcleo onde transfecta as células. Produzido o antígeno, reconhecido como estranho pelo hospedeiro, é então sujeito às vias semelhantes às aquelas para antígenos de vírus internalizados, levando a uma proteção humoral e imunidade mediada pela célula (Gregoriadis, G., et al., 1998).

Vacinas de DNA incorporadas em lipossomos catiônicos para o antígeno da hepatite B levam a uma melhor resposta da imunidade humoral e celular (Gregoriadis, G., et al., 1997).

Vantagens na utilização de vacinas de DNA são a transferência de gene “in vivo” na ausência de um vetor infeccioso, indução de ambas, imunidade humoral e celular, persistência de expressão de antígeno por longo tempo e a possibilidade de construção de vetores codificando vários antígenos, que possam ser entregues com uma simples dose, o que lhes dá um grande potencial de uso (Gregoriadis, G., et al., 1998).

1.5. Microrganismos como modelos de superfícies biológicas

Interações entre bicamadas lipídicas e membranas biológicas são dirigidas por várias forças como van der Waals (atração), eletrostática (dupla-camada), solvatação (forças de hidratação), forças hidrofóbicas e forças estéricas operando simultaneamente, como também, tipos de interações mais específicas (interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações receptor-ligante, adesão, fusão) (Israelachvili, J.N., 1992).

A bactéria pode ser considerada como um colóide por causa do seu tamanho (na faixa de 1-2 μm x 1-4 μm) (Trabulsi, L.R., et al., 1999). A adesão passiva, portanto, pode ser determinada por fatores coloidais. Sob o aspecto físico-químico da adesão microbiana, na fase inicial, as propriedades de superfície da adesão microbiana da bactéria e substrato (potencial zeta (ζ) e hidrofobicidade) juntos com a composição do meio líquido, têm sido reconhecidos como fatores determinantes de adesão (Doyle, R.J., e Rosenberg, M., 1990; Woodle, M.C., et al., 1992; Skvaria, J., 1993; Geertsema-Doornbusch, G.I., et al., 1993; Meinders, J.M., et al., 1995).

A superfície das células da maior parte dos microrganismos são aniônicas devido à prevalência de fosfato carregado negativamente, carboxilato, e grupos sulfato na parede celular (polímeros aniônicos como ácidos teicóicos em bactérias Gram-positivas e lipopolissacarídeos e proteínas em bactérias Gram-negativas), e macromoléculas capsulares (polissacarídeos). Componentes de superfície que contribuem para a hidrofobicidade das células incluem proteínas da camada S ou de superfície, polímeros anfipáticos ou lipídios. Apêndices da superfície da célula (especialmente fímbrias) e possivelmente glicocálices fibrilares (cápsulas) são considerados como provas potenciais de ligação de algumas células bacterianas a superfícies (Doyle, R.J., e Rosenberg, M., 1990; Skvaria, J., 1993).

Vários passos podem ser distinguidos na ligação de células microbianas a uma superfície: a aproximação das células a uma superfície através de vários mecanismos de transporte de massa como convecção, sedimentação, eletroforese e difusão (fatores físicos de adesão); retenção (adesão inicial) das células pela superfície, devido a interações físico-químicas com a superfície (fatores físico-químicos ou coloidais de adesão); colonização da superfície pelas células em consequência da excreção extracelular de polímeros (ou outras respostas fisiológicas das células) que forcem a adesão (fatores biológicos de adesão) (Skvaria, J., 1993). Desde que é a superfície celular microbiana que fortemente determina o processo de adesão, é necessário descrever a organização típica da parede celular. Geralmente, um envelope celular completo possui um número de funções (conferindo força, manutenção da forma, peneiramento molecular, etc.) que pode ser fornecida por uma simples unidade estrutural (bactéria Gram-positiva) ou por várias camadas com funções especializadas (bactéria Gram-negativa) (Skvaria, J., 1993).

Escherichia coli e *Salmonella Typhimurium*, são bactérias pertencentes à família

Enterobacteriaceae, constituída de bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos, com muitas propriedades em comum (Falkow, S., e Mekalanos, J., 1990). Embora as enterobactérias possam ser encontradas em uma diversidade de lugares, a maioria habita os intestinos do homem e dos animais, seja como membros da flora normal ou como agentes de infecção.

E. coli compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos O, K, e H. A *E. coli* pode causar infecções intestinais, infecções urinárias, septicemias, meningites, e outros tipos de infecção. Com relação às infecções intestinais, pelo menos seis categorias de *E. coli* são conhecidas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (Murray, P.R., et al., 1995; Trabulsi, L.R., et al., 1999). As EPEC são os agentes mais freqüentes de diarreia infantil no Brasil, predominando, sobretudo, antes do primeiro ano de vida (Trabulsi, L.R., et al., 1999). Os mecanismos de patogenicidade destes colibacilos envolvem aderência à mucosa intestinal. As EPEC aderem formando microcolônias localizadas em certas áreas das células (adesão localizada). A estrutura responsável pela aderência localizada é codificada por plasmídios. O plasmídio das EPEC, EPEC adherence factor (EAF) é encontrado regularmente nas amostras de todos os sorotipos de EPEC. A principal adesina das EPEC, responsável pela adesão localizada (AL) é a fímbria “bundle forming pilus” (BFP) (Trabulsi, L.R., et al., 1999).

A classificação e a nomenclatura das salmonelas sofreram várias modificações nos últimos anos (Trabulsi, L.R., et al., 1999). Na rotina, utiliza-se um esquema de identificação denominado esquema de Kauffmann & White, que divide o gênero em tipos sorológicos (sorotipos ou sorovares), tendo por base a composição antigênica das salmonelas com relação aos seus antígenos O (somático), Vi (capsular), e H (flagelar) (Murray, P.R., et al., 1995; Trabulsi, L.R., et al., 1999). A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro. A *S. Typhi* é o agente da febre tifóide. As salmonelas paratíficas (A, B, C) causam uma infecção bastante semelhante à febre tifóide. De modo geral, os demais sorotipos de *Salmonella* causam, no adulto normal, apenas uma enterocolite que evolui sem complicações e desaparece dentro de uma semana, ou menos. Como estas salmonelas são geralmente veiculadas por alimentos, a infecção é também denominada toxinfecção de origem alimentar. Porém, se o hospedeiro for uma criança no primeiro ano de vida ou recém-nascido, ou é portador de certos tipos de patologias, a infecção causada por estas salmonelas pode evoluir de maneira diferente e ser bastante grave. Nas crianças, as salmonelas freqüentemente invadem a circulação provocando infecção em outros órgãos. Como exemplo, em São Paulo, a *S. Typhimurium* é uma causa muito comum de meningite em crianças (Trabulsi, L.R., et al., 1999). A aderência de *S. Typhimurium* em cultura de células

causa uma alteração na superfície da célula hospedeira, caracterizada por alongamento e dilatação da membrana celular. Este processo é denominado de “ruffling”, pois a membrana da célula hospedeira passa a apresentar um aspecto ondulado. Esta alteração é temporária e, após a internalização da bactéria, a superfície da célula epitelial recupera sua aparência normal. Um aspecto importante da virulência das salmonelas é a capacidade destas bactérias de resistirem à ação do sistema complemento, devido ao comprimento das cadeias laterais do antígeno O do seu lipolissacarídeo (LPS) impedir o complexo “membrane attack complex” (MAC), formado pelas proteínas do complemento, de agir com a membrana externa da salmonela; e a resistência ao soro, devido à produção de uma proteína de membrana externa que interfere com a formação do MAC (Trabulsi, L.R., et al., 1999).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo que não é subdividido em biotipos ou sorotipos. Sua principal característica é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina. A *P. aeruginosa* é tipicamente oportunista, e pode causar várias doenças. Infecções localizadas, em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras, podem resultar em bacteremias severas (Murray, P.R., et al., 1995). Infecções urinárias associadas ao uso de cateteres, são freqüentes. Os portadores de fibrose cística são, em sua maioria, colonizados pela *P. aeruginosa*, embora raramente apresentem bacteremia (Murray, P.R., et al., 1995; Trabulsi, L.R., et al., 1999). Em alguns destes pacientes, a bactéria provoca pneumonia mortal. Pneumonias graves podem ocorrer também em pacientes que usam respiradores contaminados. A *P. aeruginosa* pode causar ceratites em consequência de cirurgias oculares. Embora raramente, pode causar meningite e endocardites. A aderência da bactéria é mediada por fímbrias ou talvez pelo glicocálice da bactéria. A *P. aeruginosa* produz uma série de substâncias que poderiam participar da patogênese da infecção, como hemolisina, leucocidina, fosfolipase C, proteases, polissacarídeo capsular, porém a toxina A é a mais tóxica, bloqueando a síntese proteica. É resistente ao poder bactericida do soro, mas é bastante sensível à fagocitose quando em presença de opsoninas (Trabulsi, L.R., et al., 1999).

O *Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo que se divide em vários planos, e tende a formar cachos semelhantes aos de uva (arranjo característico) (Murray, P.R., et al., 1995). No estudo de surtos epidêmicos de infecção hospitalar ou de intoxicação alimentar, pode ser necessário subdividir a espécie a fim de identificar o foco de infecção, ou outro elo da cadeia epidemiológica. Com o propósito de evidenciar diferenças ou similaridades entre amostras, vários métodos de tipagem foram desenvolvidos, como biotipagem, sorotipagem (baseada no antígeno polissacarídico capsular), fagotipagem e a resistotipagem (baseada no perfil de susceptibilidade a antimicrobianos). O método mais eficiente é a fagotipagem, que consiste na pesquisa da sensibilidade das amostras envolvidas, a uma série de bacteriófagos líticos (Trabulsi, L.R., et al., 1999). O *S. aureus*

é o agente mais comum de infecções piogênicas, que podem localizar-se na pele ou em regiões mais profundas. Pode também causar vários tipos de intoxicações, seja na vigência de um processo infeccioso ou não. Sendo o *S. aureus* um microrganismo extracelular típico, tem sua virulência dependente, primariamente, de sua capacidade em escapar da fagocitose. O *S. aureus* apresenta alguns componentes de superfície e produz várias substâncias extracelulares, que contribuem para a sua virulência, como cápsula, peptidoglicano, ácidos teicóicos, proteína A, adesina, enzimas e toxinas extracelulares, hemolisinas, leucocidina (Trabulsi, L.R., et al., 1999).

1.5.1. Parede celular das bactérias Gram-negativas

O envelope celular das bactérias Gram-negativas é composto por uma parede (constituída de membrana externa, peptidoglicano e espaço periplasmático) e membrana citoplasmática. A superfície irregular deve-se à presença de apêndices filamentosos proteicos, pili, que funcionam como estruturas de aderência às células de mamíferos e a outras superfícies (Stryer, L., 1995).

A parede celular das bactérias Gram-negativas tem uma composição química mais complexa que a das Gram-positivas, conferindo àquelas bactérias propriedades bioquímicas, fisiológicas e genéticas peculiares (figura 1.10).

Figura 1.10 - Esquema ilustrativo de envelope celular de bactéria Gram-negativa.

A membrana externa contém fosfolipídios, proteínas e lipopolissacarídeos (LPS), sendo esses últimos responsáveis pela carga negativa da superfície bacteriana, devido à presença de grupos fosfato ligados aos açúcares (Stryer, L., 1995). O polissacarídeo do LPS consiste de duas porções: o core, a parte mais interna, e o polissacarídeo O. O polissacarídeo O tem propriedades antigênicas importantes e, por isso, é também designado como antígeno O. O core do LPS tem composição única dentro de um grupo, como um gênero, por exemplo. O polissacarídeo O apresenta composição variável de espécie para espécie e também dentro de uma mesma espécie. Suas cadeias são imunogênicas, e os anticorpos específicos formados contra elas podem ser utilizados como ferramentas para a identificação das bactérias (Schlegel, H.G., 1993). A estrutura do polissacarídeo O pode tornar a superfície da célula escorregadia, impedindo ou dificultando a fagocitose da bactéria por macrófagos. A porção lipídica do LPS é formada pelo lipídio A, que apresenta um dissacarídeo composto por *N*-acetilglicosamina-fosfato em substituição ao glicerol. A este dissacarídeo estão ligados, por ligações éster, aminoácidos ou ácidos graxos (como o capríco, mirístico, láurico, palmítico e esteárico) (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998; Trabulsi, L.R., et al., 1999).

Algumas bactérias Gram-negativas apresentam toxinas solúveis, geralmente proteínas. Todas, porém, apresentam uma endotoxina constituída pela porção lipídica do LPS, liberada em grandes quantidades quando a célula é lisada. A intensa ação tóxica é atribuída a sua capacidade de induzir a produção e liberação de citocinas, produzidas por macrófagos (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998). O caráter hidrofóbico dos fosfolipídios e do LPS torna a membrana externa impermeável a várias substâncias (Wiese, A., et al., 1996). As bactérias ficam protegidas de vários antibióticos como eritromicina e actinomicina, de metais pesados e certos corantes; ficam também protegidas dos sais biliares. Aparentemente, o fator mais restritivo à entrada de compostos são os ácidos graxos do LPS (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998; Trabulsi, L.R., et al., 1999).

A membrana externa apresenta proteínas designadas porinas, que permitem a passagem de moléculas hidrofílicas. Tais proteínas são integrais e triméricas, com suas subunidades organizando um poro central. De modo geral, o tamanho do poro seleciona a molécula que pode passar. A entrada de íons depende de sua carga e a da superfície externa do poro: quando as cargas são opostas, a interação e permeação são possíveis. Há porinas específicas para o transporte de nucleosídeos, compostos aniônicos e de macromoléculas, como oligossacarídeos e peptídios; a maioria destas proteínas, no entanto, parece ser bastante inespecífica. A membrana externa não é permeável a enzimas; as enzimas bacterianas ficam confinadas no espaço periplasmático (Trabulsi, L.R., et al., 1999).

A camada de peptidoglicano desempenha as mesmas funções que nas bactérias Gram-positivas, no entanto, é menos espessa e não tem contato direto com o meio ambiente. Na maioria das bactérias Gram-negativas, representadas por *E. coli*, a camada

de peptidoglicano difere um pouco da encontrada em bactérias Gram-positivas: como não existem peptídios interligantes, a rede é formada por tetrapeptídios situados em planos paralelos ao do polissacarídeo, de modo a poderem ligar-se uns aos outros. O peptidoglicano das bactérias Gram-negativas está firmemente ancorado à camada mais externa da parede através de pequenas lipoproteínas, que podem representar um suporte para a membrana externa (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998).

O espaço periplasmático dá acesso a proteínas da face interna da membrana externa, e da face externa da membrana citoplasmática, e contém um número considerável de enzimas (Schlegel, H.G., 1993). O periplasma e o citoplasma tendem a ser isosmóticos; a regulação da pressão osmótica é obtida por uma molécula chamada oligossacarídeo derivado de membrana, ou MDO. O espaço periplasmático contendo concentrações variadas de MDO constitui uma zona de tampão osmótico que atenua grandes diferenças de pressão osmótica entre o meio ambiente e o citoplasma (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998).

Na última década, novas classes de antibióticos peptídicos endógenos de origem animal têm sido estudados, como alternativa para o tratamento de infecções. Esses peptídeos possuem a característica comum de apresentarem carga positiva devido a presença de múltiplos resíduos de arginina (Arg) e lisina (Lys), e formação de estruturas anfipáticas. O mecanismo de ação destes peptídios é o aumento da permeabilidade das membranas bacterianas. Peptídios (magainina) isolados da pele de *Xenopus laevis*, mostraram atividade contra vários microrganismos como bactérias, fungos e protozoários, e mesmo para células cancerígenas (Matsuzaki, K., et al., 1997). Estudos com bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Proteus vulgaris*) mostraram a permeabilização da membrana pelo peptídio, com conseqüente morte celular, indicando a importância das interações eletrostáticas (Matsuzaki, K., et al., 1997). Os autores também mostraram que o tratamento das células de *E. coli* com magainina induziu um efluxo de íons K^+ intracelular e morte celular.

1.5.1.1. Proteínas de membrana externa de bactérias Gram-negativas

A membrana externa contém uma variedade de proteínas, que parecem transmitir para ela muitas de suas funções (DiRienzo, J.M., et al., 1978).

A membrana externa de bactéria Gram-negativa serve como uma peneira molecular, resistindo à entrada de compostos nocivos, enquanto ao mesmo tempo permitindo a tomada de nutrientes essenciais (Arora, A., et al., 2000). Proteínas de membrana externa estão entre as primeiras proteínas integrais de membrana para as quais estruturas cristalinas foram estabelecidas por difração de raio-X (Weiss, M.S., et al., 1991).

Em contraste com a maioria das proteínas da membrana interna, que são empacotadas do tipo helicoidal, a estrutura comum principal das proteínas da membrana

externa é a β - barril, isto é, uma β -folha antiparalela que fecha sobre si mesma. Porinas com 16 (OmpF, OmpC, PhoE (fosfoforina)), 18 (LamB), ou 22 (FhuA, FepA) β - fitas antiparalelas foram descritas (DiRienzo, J.M., et al., 1978; Nikaido, H., 1994). As paredes externas destas estruturas são geralmente hidrofóbicas (para adaptar-se à bicamada lipídica), e elas possuem poros centrais de tamanhos variáveis cheios de água, através dos quais os substratos são tomados. Enquanto as porinas são normalmente triméricas, os transportadores ferro-sideróforos FhuA e FepA, são monoméricos. A especificidade de substrato destas proteínas aparece de resíduos específicos no poro, segmentos peptídicos especiais, ou domínios de proteína inteira. Quando incorporadas em membranas (black lipid membranes), as porinas exibem atividades de canal simples que dependem fortemente da porina em particular, do potencial transmembrana aplicado, e o tipo e concentração de eletrólito no ambiente (Arora, A., et al., 2000).

As porinas clássicas são trímeros estáveis com permeabilidade muito alta. A maioria das porinas pertence a classe não específica das chamadas porinas de “difusão geral” que têm um limite de exclusão típico de 600 Da, com extremos de 5000 Da (Welte, W., et al., 1995; Nikaido, H., 1994). Cada célula bacteriana parece ter destas porinas em grande número na membrana externa (Welte, W., et al., 1995). A estrutura primária das porinas varia entre as bactérias Gram-negativas, mas β -fitas anfífilas (7 a 14 resíduos cada) no barril da porina são estruturalmente conservadas (Singh, S.P., et al., 1995). Geralmente, as porinas contêm cinco ou mais epítomos de superfície, com 6 a 25 resíduos de comprimento, que são parcialmente cobertos pelo core do LPS e completamente bloqueados pelos açúcares O-antigênicos. Estas proteínas contêm epítomos enterrados conservados, que estão localizados nas β fitas transmembranosas (Singh, S.P., et al., 1995).

Porinas específicas possuem um sítio de ligação que é moderadamente específico para uma certa classe de substâncias, e são normalmente expressadas sob certas condições limitadas de crescimento, a um pequeno número de cópias. Porinas específicas para monossacarídeos e dissacarídeos (LamB, ScrY), nucleosídeos (TsX) e ânions (proteína P de *P. aeruginosa*), são exemplos. Estas porinas apresentam um canal simples menor de condutividade do que as porinas de difusão geral (Welte, W., et al., 1995). Canais de porina também apresentam preferência de carga; OmpF e OmpC preferem moléculas neutras e cátions do que ânions, enquanto PhoE tem preferência para ânions. Ainda, todas as três porinas de *E. coli* tendem a excluir solutos lipofílicos (Nikaido, H., 1994).

As porinas monoméricas permitem uma difusão lenta e aparentemente não específica de pequenos solutos. A porina OprF de *P. aeruginosa* é um exemplo de modelo de porina monomérica. Os canais desta proteína permitem a difusão de solutos maiores do que os excluídos pelas porinas de *E. coli*, pois o diâmetro destes poros é em torno de 20 Å, porém a taxa de difusão de solutos através de uma unidade destas porinas é cerca de duas vezes mais lenta do que em porina OmpF de *E. coli* (Nikaido, H., 1994).

A resistência da *P. aeruginosa* a antibióticos é atribuída à baixa permeabilidade da membrana externa, devido à predominância de porinas com canais de tamanho pequeno na membrana (Ishii, J., e Nakae, T., 1996). O efeito de antibióticos como fluoroquinolonas e carbapenemas mostrou uma interação destes antibióticos com o canal da proteína D2 porina, provocando o fechamento destes canais, para concentração dos antibióticos em torno de 1 mM (Ishii, J., e Nakae, T, 1996).

OmpA é outra proteína importante de membrana externa de *E. coli* (Rodionova, N.A., et al., 1995). Embora a massa de OmpA seja semelhante à massa de muitas outras porinas, OmpA consiste de dois domínios separados. O domínio N-terminal está integrado dentro da membrana na forma de um pequeno β -barril de somente oito β -fitas antiparalelas. O domínio globular C-terminal de aproximadamente 150 resíduos estende-se dentro do periplasma (Arora, A., et al., 2000). Diferente das porinas, é mais provável que OmpA exista como um monômero na membrana externa. A estrutura cristalina do domínio N-terminal de OmpA já foi determinada por difração de raio-X e, comparada com porinas maiores, o barril desta miniporina é muito estreito, na maioria com resíduos hidrofílicos e poucas cavidades aquosas empacotadas no lúmen do barril (Arora, A., et al., 2000). Fornecer estabilidade estrutural para a célula parece ser uma das principais funções da OmpA. OmpA também media a conjugação bacteriana e funciona como receptor para vários bacteriófagos (Rodionova, N.A., et al., 1995; Arora, A., et al., 2000).

1.5.2. Parede celular das bactérias Gram-positivas

Nas bactérias Gram-positivas, o componente responsável pela rigidez do envelope celular, que suporta a pressão interna da célula, é uma camada espessa de peptidoglicanos (20 - 50 nm) ligados cruzadamente (figura 1.11). Outras macromoléculas tais como polissacarídeos, ácidos teicóicos, e proteínas covalentemente ligadas ao peptidoglicano, penetram neste complexo (Skvaria, J., 1993).

O peptidoglicano é constituído por um esqueleto polissacarídico, cuja rigidez é favorecida pela presença de tetrapeptídios, peptídios interligantes e ácidos teicóicos. O esqueleto polissacarídico é formado por cadeias paralelas de resíduos de *N*-acetilglicosamina (NAG) e seu lactil-éter, o *N*-acetilmuramato (NAM), dispostos alternadamente e conectados por ligações glicosídicas. Às moléculas de NAM estão ligados tetrapeptídios formados por aminoácidos D e L alternados. Os tetrapeptídios situam-se perpendicularmente ao plano ocupado pela cadeia polissacarídica, e são interligados pelos peptídios ligantes, que, portanto, estão em posição perpendicular aos tetrapeptídios e paralela ao esqueleto polissacarídico. O peptídio interligante conecta dois tetrapeptídios por fazer duas ligações peptídicas, cada qual com um tetrapeptídio:

uma delas é feita com o grupo ϵ -amino da lisina e a outra, com a carboxila terminal do outro tetrapeptídeo, que, por sua vez, está ligado a uma cadeia polissacarídica vizinha. A estrutura do peptidoglicano pode variar muito e as maiores diferenças incidem nos peptídios interligantes, quanto à sua composição e número (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998).

Figura 1.11 - Esquema ilustrativo de envelope celular de bactéria Gram-positiva.

A parede de bactérias Gram-positivas apresenta também uma grande quantidade de ácidos teicóicos, que pode chegar a 50% da sua massa seca (Trabulsi, L.R., et al., 1999). O termo ácido teicóico inclui todos os polímeros formados por resíduos de glicerol ou ribitol unidos por ligações fosfodiéster, sejam eles encontrados na cápsula, na parede ou na membrana citoplasmática da célula. Todavia, os ácidos teicóicos têm sido divididos em dois tipos: ácidos teicóicos de parede ligados ao peptidoglicano e ácidos lipoteicóicos que, apesar de serem encontrados ao longo da parede, encontram-se intimamente ligados à fração lipídica da membrana plasmática (Trabulsi, L.R., et al., 1999). Suas propriedades incluem facilitar a ligação e a regulação da entrada e saída de cátions na célula, graças ao grupo fosfato, que confere uma carga negativa à molécula que se encontra voltada para o lado externo da célula; regular a atividade de autolisinas durante o processo de divisão celular; constituir sítios receptores de bacteriófagos; servir de sítio de ligação com o epitélio do hospedeiro em algumas bactérias patogênicas; constituir importantes antígenos celulares tornando possível a identificação sorológica de muitas bactérias Gram-positivas (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998; Trabulsi, L.R., et al., 1999).

1.5.3. Parede celular dos fungos

A parede celular dos fungos é a parte mais externa do envelope celular e confere forma à célula; a diversidade de formas celulares e estruturas encontradas nos ciclos de vida de muitos fungos é uma reflexão da versatilidade da parede.

Em comum com bactérias Gram-positivas e plantas, a parede celular dos fungos é composta basicamente de polissacarídios, que podem encontrar-se como homo ou heteropolímeros (figura 1.12). Em alguns fungos, proteínas são também componentes significantes da célula e freqüentemente estão associadas com um ou mais dos constituintes polissacarídicos. Lipídios e melaninas encontram-se em quantidades menores na parede de muitos fungos, mas isso não diminui a sua importância, como exemplo da melanina, que confere resistência ao ataque e lise por enzimas e irradiações (Peberdy, J.F., 1990). Os principais lipídios apolares são os triacilgliceróis e os esteróis, e os polares são os diacilglicerofosfolinas e diacilglicerolaminas (Trabulsi, L.R., et al., 1999).

Os polissacarídios da parede podem ser divididos em dois grupos, baseados em suas funções e forma física. Os polissacarídios que compõem o esqueleto da parede são homopolímeros altamente cristalinos insolúveis em água, e incluem quitina e glicanas com ligações β . Os polissacarídios da matriz são amorfos, ou levemente cristalinos e, na maioria das vezes, solúveis em água. Alguns são homopolímeros, mas há também heteropolímeros e freqüentemente complexos de polissacarídios.

O componente esquelético de todas as leveduras consiste de β -(1-3)-D-glicanas, com intervalos de ligações β -(1-6) formando pontos de ramificações. O grau de ramificação é importante para a determinação do estado cristalino e da solubilidade das β -(1-3)-D-glicanas. Com exceção dos Oomicetos (que possuem celulose na parede), todos os fungos filamentosos possuem quitina juntamente com β -(1-3)-glicanas, como componentes do esqueleto da parede (Peberdy, J.F., 1990).

Nas leveduras, o componente da matriz é um complexo de manoproteína. As manoproteínas de leveduras são divididas em classes distintas, que diferem em tamanho e característica de ligação. Moléculas maiores, que podem ter um peso molecular maior do que 150 kDa, tem uma ramificação polissacarídica no meio, com mais de 150 unidades manosil. A cadeia principal da molécula é composta de ligações α -(1-6) das quais emergem cadeias curtas com misturas de ligações α -(1-2) e ligações α -(1-3). Ligação com o componente proteico ocorre através de ligações N-glicosídicas, envolvendo diacetilquitobiose, da região interna do core do polímero. Outro grupo de manoproteínas são moléculas menores; algumas são compostas de manosídios curtos ligados α -(1-2)/ α -(1-3) e anexados a proteína por ligações O-glicosídicas. Parece que manoproteínas pequenas de *C. albicans* mostram reação cruzada antigênica, sugerindo um grau de conservação do componente proteico (Peberdy, J.F., 1990; Rose, A.H., e Harrison, J.S., 1991).

Glicoproteínas são também encontradas nas paredes de fungos filamentosos, e são mais heterogêneas do que aquelas encontradas nas leveduras, em relação ao componente polissacarídico e ligação proteína - carboidrato. O polissacarídico pode ser um homopolímero ou heteropolímero com ligações *N*-glicosídicas e *O*-glicosídicas. α -(1-3)-D-glicana é o principal polímero da matriz na maioria dos fungos. A α -glicana é normalmente encontrada na superfície externa da parede como fibrilas irregulares compactas.

Figura 1.12 - Esquema ilustrativo de parede celular de fungos (Figura cedida por Rinaldo Ferreira Gandra, ICB, USP).

A organização dos polímeros na parede celular é em forma de camadas. Normalmente, o componente esquelético está localizado no lado interno da parede e se encontra imerso em material amorfo da matriz. A superfície interna da parede é portanto caracterizada pela sua aparência fibrilar. A superfície externa que é normalmente totalmente constituída de material amorfo é geralmente lisa ou em leve forma de rede. Esta é a forma típica de algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras, mas outros fungos possuem a parede mais complexa (Peberdy, J.F., 1990).

A parede celular de *C. albicans* parece conter no mínimo cinco camadas distintas (começando da membrana plasmática para fora): manoproteína, β -glicana/quitina,

β -glicana, manoproteína, e uma camada fibrilar (Rinaldi, M.G., 1993). Na *C. albicans*, há uma camada externa meio indistinta contendo a camada fibrilar, que é considerada importante para a virulência por afetar a aderência e fagocitose. Os principais elementos estruturais da parede são as β -glicanas, ligadas covalentemente à quitina, levando à estrutura secundária da parede. O principal componente antigênico é a manoproteína (Rose, A.H., e Harrison, J.S., 1991; Rinaldi, M.G., 1993).

Apesar dos avanços no tratamento de infecções por patógenos oportunistas, as micoses permanecem como importantes causas de morbidade e mortalidade entre pacientes imunocomprometidos.

Na última década, a incidência de infecções por fungos aumentou dramaticamente. Isto é devido, em parte, pela expansão da população de pacientes imunocomprometidos (terapia citotóxica, terapia com esteróides, AIDS, pacientes transplantados e leucêmicos) e avanços técnicos que facilitam a invasão fúngica (Ben-Josef, A.M., et al., 1997; White, T.C., et al., 1998). O aumento da frequência, severidade e número de espécies fúngicas identificadas como patógenos, tem levado a uma necessidade crítica para novas e seguras drogas antifúngicas (Ben-Josef, A.M., et al., 1997).

Em poucos anos, *Candida* sp. têm se tornado patógenos oportunistas em pacientes comprometidos (Siau, H., e Kerridge, D., 1998). A espécie clínica predominante isolada, *Candida albicans*, é a quinta causa mais comum de infecção nosocomial sistêmica (Siau, H., e Kerridge, D., 1998). A resistência a drogas antifúngicas está se tornando um grande problema para pacientes infectados com HIV, nos quais a resistência a droga na candidíase orofaríngea é o principal (Rinaldi, M.G., 1993).

1.6. Agentes antimicrobianos

Biocida é um termo geral que descreve um agente químico, normalmente de amplo espectro, que inativa microrganismos. Como os biocidas abrangem uma atividade antimicrobiana, termos mais específicos são usados como “stático” referindo-se a agentes que inibem o crescimento (bacteriostático, fungistático, esporostático), e “cida”, referindo-se a agentes que matam o microrganismo (bactericida, fungicida, esporocida). Antibióticos são substâncias produzidas naturalmente ou compostos orgânicos sintéticos que inibem ou destroem seletivamente bactérias ou outros microrganismos, geralmente a baixas concentrações. Anti-sépticos são biocidas ou produtos que destroem ou inibem o crescimento de microrganismos em tecidos vivos, e desinfetantes são produtos ou biocidas usados para superfícies ou objetos inanimados (McDonnell, G., e Russell, A.D., 1999).

A ação antimicrobiana dos anti-sépticos e desinfetantes pode ser colocada como uma interação com a superfície da célula (ou entidade), seguida da penetração

dentro da mesma e ação no sítio alvo (McDonnell, G., e Russell, A.D., 1999). A natureza e composição da superfície varia de acordo com o tipo de célula ou entidade, mas pode também ser alterada como resultado das trocas no ambiente. A interação com a superfície celular pode produzir um efeito significativo sobre a viabilidade, mas a maior parte dos agentes antimicrobianos parece agir intracelularmente (McDonnell, G., e Russell, A.D., 1999).

Exemplos de agentes antimicrobianos utilizados como anti-sépticos ou desinfetantes são os álcoois, aldeídos (glutaraldeído, formaldeído), anilidas, biguanidas (clorexidina, alexidina, biguanidas poliméricas), diamidinas, agentes liberadores de halogênio (agentes liberadores de cloretos, iodetos e iodóforos), compostos contendo prata (nitrato de prata, sulfadiazina de prata), peróxido de hidrogênio, fenóis, bisfenóis (triclosan, hexaclorofeno), halofenóis, compostos de amônio quaternário (Murray, P.R., et al., 1995; McDonnell, G., e Russell, A.D., 1999).

1.6.1. Compostos de amônio quaternário

Os compostos de amônio quaternário são agentes ativos de membrana, ou seja, os sítios de ação predominantes são a membrana citoplasmática nas bactérias ou membrana plasmática nas leveduras.

Agentes ativos de superfície ou surfactantes possuem duas regiões em sua estrutura molecular: um grupo hidrofóbico (apolar) e um grupo hidrofílico (polar). Dependendo da carga ou ausência de ionização do grupo hidrofílico, os surfactantes são classificados em compostos catiônicos, aniônicos, não iônicos, e anfotéricos (anfotéricos). Destes, os agentes catiônicos como os compostos de amônio quaternário, são os mais úteis anti-sépticos e desinfetantes, e são conhecidos também como tensoativos catiônicos (Murray, P.R., et al., 1995; McDonnell, G., e Russell, A.D., 1999; Trabulsi, L.R., et al., 1999).

Uma sequência de eventos foi proposta para microrganismos expostos a agentes tensoativos : a) adsorção e penetração do agente dentro da parede celular; b) reação com a membrana citoplasmática (lipídio ou proteína) seguido da desorganização da membrana; c) extravasamento de material de baixo peso molecular ; d) degradação de proteínas e ácidos nucleicos; e) lise da parede causada por enzimas autolíticas. Há assim uma perda de organização estrutural e integridade da membrana citoplasmática na bactéria, juntamente com outros efeitos prejudiciais para a célula bacteriana (McDonnell, G., e Russell, A.D., 1999).

1.6.2. Agentes antibacterianos

A grande vantagem dos antibióticos (substâncias total ou parcialmente produzidas por organismos vivos), e dos quimioterápicos (sintetizados em laboratórios) sobre os agentes químicos é a toxicidade seletiva que os primeiros apresentam. É esta a propriedade que permite sua administração sistêmica no tratamento das infecções. Os antibióticos antibacterianos geralmente atuam em vias biossintéticas, inibindo-as e tornando, assim, o microrganismo inviável e sem condições de multiplicar-se (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998).

Os antibióticos antibacterianos, de acordo com o mecanismo de ação, podem ser divididos em: inibidores da síntese de peptidoglicano (cicloserina, bacitracina, β -lactâmicos, penicilina); inibidores que atuam na membrana citoplasmática (polimixinas; ionóforos, como gramicidina A e valinomicina; cerulenina); inibidores da síntese de ácidos nucleicos, divididos em inibidores da síntese de nucleotídeos (sulfonamidas) e inibidores da polimerização de nucleotídeos (mitomicina C, rifamicinas, rifampicina); inibidores da síntese proteica, divididos em inibição por ligação aos ribossomos [estreptomicina, aminoglicosídeos (canamicina, neomicina, gentamicina), eritromicina], e inibição da formação da ligação peptídica (cloranfenicol) (Murray, P.R., et al., 1995; Lorian, V., 1996; Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998).

A composição química da membrana externa de bactérias Gram-negativas impõe grandes dificuldades à penetração dos antimicrobianos. O mecanismo de penetração celular da estreptomicina oferece um exemplo de como estas dificuldades podem ser contornadas: utilizando o canal de porinas, a estreptomicina atinge o alvo, provoca a síntese de proteínas alteradas que, incorporadas à membrana, afetam sua permeabilidade, permitindo, num segundo momento, a entrada descontrolada da droga na célula (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998).

A membrana celular bacteriana representa para os agentes antimicrobianos o mesmo tipo de barreira que seleciona a entrada de nutrientes na célula. Os antimicrobianos, portanto, raramente penetram por difusão passiva, tendo que usar a difusão facilitada e o transporte ativo para atingir o interior da célula. A *E. coli* apresenta na membrana citoplasmática várias permeases para transporte de peptídios pequenos, constituídos por seis ou sete aminoácidos. A extremidade aminoterminal da permease é essencial para o transporte: diferentes peptídios podem ligar-se à permease pelo seu grupo carboxila terminal. A inespecificidade desta ligação permite que agentes antimicrobianos de natureza proteica possam usá-la para penetrar na célula. Outras permeases também transportam agentes antimicrobianos estruturalmente semelhantes aos nutrientes (Barbosa, H.R., e Torres, B.B., 1998).

1.6.3. Agentes antifúngicos

Entre os principais agentes antifúngicos estão os poliênicos (anfotericina B, nistatina, pimaricina), os imidazóis (clotrimazol, econazol, cetoconazol, miconazol), os triazóis (fluconazol, itraconazol), os tiocarbamatos (tolaftato), 5-fluorocitosina (5-FC), e griseofulvina. Estes antimicrobianos variam consideravelmente em sua potência, margem de segurança e efeito sobre diferentes fungos. Dependendo do modo de ação podem ser fungicidas ou fungistáticos, e podem agir especificamente contra um fungo em particular ou exibir um amplo espectro de atividade. Além do mecanismo de ação, a resistência, a interação sinérgica entre o hospedeiro e a droga, as propriedades imunomoduladoras, a biodisponibilidade, e a farmacocinética, devem ser consideradas (McGinnis, M.R., e Rinaldi, M.G., 1996).

As drogas mais comumente usadas para infecções fúngicas sistêmicas e locais são anfotericina B e agentes azóis (Ben-Josef, A.M., et al., 1997). A anfotericina B é ainda a droga de escolha em muitas micoses sistêmicas, devido ao seu amplo espectro e atividade fungicida, contudo, ela é nefrotóxica e é administrada intravenosamente (Ben-Josef, A.M., et al., 1997). A introdução de antifúngicos como fluconazol (Louie, A., et al., 1998) e itraconazol, de amplo espectro de atividade e com menor toxicidade, tem fornecido aos clínicos alternativas orais à anfotericina B, marcando um significativo avanço na terapia antifúngica (Ernst, M.E., et al., 1996). Porém, o recente aumento da resistência entre espécies, bem como a natureza fungistática dos azóis, tem estimulado a procura por novos agentes fungicidas (Ernst, M.E., et al., 1996).

Outros agentes antifúngicos também têm sido utilizados para os tratamentos de micoses. 5 - Fluorocitosina age como um antimetabólito competitivo para uracila na síntese de RNA de levedura e também inibe a timidilato sintetase. Outro antifúngico sintético é o tolnaftato, que interfere na função da esqualeno epoxidase na biossíntese do ergosterol e é especialmente efetivo contra dermatófitos. Griseofulvina, haloprogina, e rifampina, quando usados com outros antifúngicos, também são antimicrobianos valiosos no tratamento de algumas micoses. A cilofungina, um polipeptídeo semi-sintético, tem atividade antifúngica para várias espécies de *Candida*, inclusive *C. albicans*, como também para vários fungos filamentosos. Este antifúngico é um inibidor não competitivo da atividade da β -1,3-glicana sintase, que está envolvida na biossíntese das glicanas da parede celular. Outras drogas antifúngicas que são inibidores não competitivos das β -1,3-glicana sintases incluem equinocandina B, pneumocandina B, e aculeacina A (Murray, P.R., et al., 1995; McGinnis, M.R., e Rinaldi, M.G., 1996).

Combinações de drogas antifúngicas têm sido utilizadas, mas muitos resultados relatados são conflitantes. O efeito da combinação de anfotericina B e 5-fluorocitosina sobre o crescimento de fungos tem sido mostrado ser sinérgico e antagônico; combina-

ções de anfotericina B e derivados azóis são por sua vez relatados como sinérgicos, aditivos e antagônicos; e combinações de 5-fluorocitosina e derivados azóis como sinérgicos. Muitos estudos foram conduzidos usando diferentes metodologias sob diferentes condições de análises e critérios experimentais, e portanto, sem base comum para comparação (Siau, H., e Kerridge, D., 1998).

1.6.3.1. Anfotericina B

A anfotericina B é um antifúngico macrolídeo poliênico isolado de *Streptomyces nodosus* (M 4575), um actinomiceto de solo (Gold, W., et al., 1956; Rinnert, H., et al., 1977; Asher, I.M., et al., 1977). É caracterizada por sete duplas ligações conjugadas, um éster interno, um grupo carboxila livre e uma cadeia lateral glicosídica com um grupamento amino primário (figura 1.13). A anfotericina B tem sido usada na terapia de infecções fúngicas há mais de 30 anos, e ainda permanece como a droga de escolha para infecções fúngicas sistêmicas sérias, apesar do desenvolvimento de novas drogas antifúngicas e da sua toxicidade (Fromtling, R.A., 1995; Brajtburg, J., et al., 1996).

Figura 1.13 - Estrutura da anfotericina B.

Sabe-se que este macrolídeo poliênico interage com membranas biológicas contendo esteróis e promove alterações seletivas de permeabilidade de membrana, levando à morte da célula (Bolard, J., et al., 1980). A anfotericina B liga-se ao ergosterol, o principal esterol da membrana citoplasmática fúngica. Acredita-se que moléculas de anfotericina B inserem-se na membrana citoplasmática e formam poros, que provocam instabilidade osmótica, perda de integridade da membrana, e rompimento metabólico (Liao, R.S., et al., 1999). O modo de ação é fungicida, uma significativa vantagem na terapia antifúngica. Como a anfotericina se liga a outros esteróis, incluindo o colesterol, composto comum nas células de mamíferos, este colesterol ligado leva à efeitos clínicos adversos (Rho, J.P., e Cupo, J.H., 1995).

A atividade fungicida da anfotericina B é concentração dependente, e devido a sua toxicidade relacionada à dose, a dosagem por via intravenosa máxima tolerada é de 0,7 a 1,0 mg/kg/dia, que pode ser insuficiente para a eficiência clínica (Janknegt, R., et al., 1992). A anfotericina B portanto, não é a droga ideal, sendo altamente lipofílica e praticamente insolúvel em água. A formulação licenciada para uso clínico, Fungizon, é uma mistura de anfotericina B com um detergente, desoxicolato de sódio, em um tampão fosfato. Nestas condições, a anfotericina B forma uma dispersão coloidal, adequada para a administração intravenosa (Hamilton-Miller, J.M.T., 1973; Brajtburg, J., e Bolard, J., 1996).

Doses terapêuticas de Fungizon freqüentemente provocam efeitos colaterais como febre, calafrios, náusea, vômito, anemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, e tromboflebite no local da infusão associada com lesão tecidual local, requerendo monitoramento durante a terapia e limitando a utilização deste agente fungicida. A mais séria reação adversa com a anfotericina B é a sua nefrotoxicidade (Hamilton-Miller, J.M.T., 1973; Fromtling, R.A., 1995; Rho, J.P., e Cupo, J.H., 1995; Working, P.K., 1999).

Propriedades ópticas características dos antibióticos poliênicos devido a presença de um sistema de duplas ligações conjugadas nestas moléculas, induz ao estudo das suas interações com lipídios através de métodos de espectroscopia, como dicróismo circular (Bolard, J., et al., 1980; Brajtburg, J., et al., 1984; Milhaud, J., et al., 1996), espectrofotometria UV-visível (Souza, L.C., et al., 1993), e espectroscopia de fluorescência (Romanini, D., et al., 1998). Estudos de ressonância paramagnética eletrônica também foram descritos (Aracava, Y., et al., 1981).

A anfotericina B apresenta mudança espectral dependendo do meio na qual está dispersa. A anfotericina B exibe uma forte absorbância entre 300 nm e 450 nm, que é fortemente influenciada pelas mudanças conformacionais induzidas pela sua auto-associação em água ou pela associação com outros compostos (Espuelas, M.S., et al., 1998). A estrutura dos agregados de anfotericina B é muito complexa e depende de parâmetros como seu pKa, ionização, e método de dispersão da solução orgânica estoque de anfotericina B na fase aquosa (Espuelas, M.S., et al., 1998). Geralmente, a solução aquosa apresenta uma absorção máxima a 328 nm e picos de absorção menos intensos, do que os obtidos com solventes polares orgânicos ou com a adição de detergentes como Triton X-100 na fase aquosa (Rinnert, H., et al., 1977).

A anfotericina B sofre auto-oxidação e radicais livres são formados durante o processo; a auto-oxidação pode estar envolvida no mecanismo de inativação do antibiótico (Lamy-Freund, M.T., et al., 1985.)

1.6.3.1.1. Efeito da anfotericina B sobre as membranas

O interesse no mecanismo de ação da anfotericina B em membranas é objeto de estudo, desde a década de 1970 até hoje. Os danos causados pela anfotericina B às células são originados da sua ligação aos esteróis incorporados nas membranas celulares: ergosterol no caso de células fúngicas e colesterol em células de mamíferos. Uma maior avidez na ligação de anfotericina B com o ergosterol em relação ao colesterol, e à membranas contendo ergosterol do que a membranas que contêm colesterol foi demonstrada por espectrofotometria (Brajtburg, J., et al., 1990). Isto foi observado também usando a técnica de monocamada para estudo de comportamento de superfície, de sistemas de anfotericina B e vários esteróis (Seoane, R., et al., 1998).

A membrana celular é considerada o sítio de ação da anfotericina B sobre as células. Para o entendimento da interação da anfotericina B com a membrana, é preciso esclarecer a natureza do Fungizon quando adicionado a uma fase aquosa (Brajtburg, J., e Bolard, J., 1996). Em água, a anfotericina B parcialmente dissocia do desoxicolato e a anfotericina B livre forma uma mistura de monômeros solúveis em água e oligômeros com agregados insolúveis, de vários estados de agregação (Brajtburg, J., e Bolard, J., 1996). Uma mistura semelhante é encontrada também quando a anfotericina B é dissolvida em solvente orgânico, como dimetilsulfóxido ou dimetilformamida. As proporções destas diferentes espécies químicas e o estado de agregação delas depende de muitos fatores, incluindo o método de mistura, a temperatura de mistura e, principalmente, a concentração de anfotericina B. As várias espécies químicas podem interagir com esteróis da membrana de diferentes modos, para provocar mudanças na permeabilidade da membrana. As mudanças na membrana levam então a uma disfunção celular e, eventualmente, à destruição das células e morte (Bolard, J., et al., 1980; Bolard, J., et al., 1991; Brajtburg, J., e Bolard, J., 1996).

Alguns estudos sobre a permeabilidade de membranas são descritos a seguir. Antibióticos poliênicos causaram mudanças de permeabilidade em membranas de células de *Acholeplasma laidlawii* e lipossomos na presença de vários esteróis (Kruijff, B. de, et al., 1974). Um modelo de poro produzido pela interação de anfotericina B com colesterol foi proposto (Kruijff, B. de, e Demel, R.A., 1974). O complexo anfotericina B-colesterol foi visualizado como um arranjo circular de 8 moléculas de anfotericina B interdigitadas por 8 moléculas de colesterol, com o lado externo hidrofóbico e o interno hidrofílico, devido a presença dos grupos hidroxila das moléculas de anfotericina B. Dois destes complexos geram um poro que atravessa a membrana. O canal hidrofílico do poro tem um diâmetro de 8 Å (Kruijff, B. de, e Demel, R.A., 1974; Chen, W.C., e Bittman, R., 1977).

Interações de anfotericina B com lipoproteínas e proteínas plasmáticas mostraram que a interação de anfotericina B com lipoproteínas estabiliza a atividade antifúngica

da anfotericina B. Estas interações com lipoproteínas e com concentrações mais altas de outras proteínas plasmáticas podem inibir os efeitos de anfotericina B sobre as células sangüíneas que contém colesterol em suas membranas, mas não o efeito sobre *C. albicans*, contendo ergosterol (Brajtburg, J., et al., 1984). A idéia é que os efeitos terapêuticos e tóxicos da anfotericina B em situações clínicas, são o contingente de interações competitivas entre membranas celulares do hospedeiro contendo esterol, microrganismo e componentes do sangue, tais como lipoproteínas e proteínas (Brajtburg, J., et al., 1984).

Em trabalho publicado com dois modelos de membrana (biológica e sintética) foi mostrado que os canais que aparecem em membranas com colesterol, também aparecem em membrana sem colesterol. Foi então proposto que o papel dos esteróis está relacionado aos efeitos que eles exercem sobre a estrutura da membrana, o que não implica em um envolvimento direto na formação de canal (Cotero, B.V., et al., 1998).

1.6.3.1.2. Teoria da formação de poros aquosos

O modelo clássico de poro da ação de anfotericina B postula que um simples tipo de canal permeável a cátions e ânions monovalentes é responsável pela ação fungicida e leishmanicida, como também pelos seus efeitos colaterais (Cohen, B.E., 1998). Assim, a perda de seletividade da membrana a cátions, causada por poros aquosos de anfotericina B tem sido proposta como causa primária de morte da célula fúngica. Segundo esta hipótese, a morte da célula fúngica resulta de acidificação intracelular associada com extravasamento de K^+ (Kruijff, B. de, et al., 1974; Kruijff, B. de, e Demel, R.A., 1974; Andreoli, T.E., 1984). Contudo, este mecanismo de ação de anfotericina B tem sido questionado com base em que baixas concentrações de anfotericina B causam extravasamento de K^+ de células sensíveis, dissociado dos efeitos letais produzidos por maiores concentrações de anfotericina B (Cohen, B.E., 1998).

De acordo com Cohen, a formação de poros aquosos por anfotericina B em lipossomos contendo esterol é sempre precedida pela formação de canais não aquosos. Com anfotericina B em baixas concentrações ou na ausência de esteróis, canais não aquosos de anfotericina B não desenvolvem-se para formar poros aquosos, e nem a perda de K^+ que eles produzem é letal para as células. Somente quando uma concentração “crítica” de anfotericina B é alcançada na membrana, que canais não aquosos interagem com ergosterol ou colesterol para formar poros aquosos trans-membrana (Cohen, B.E., 1992).

O diâmetro do poro dos canais formados por anfotericina B é crítico para a toxicidade ou letalidade da anfotericina B, porque canais não aquosos são somente permeáveis a uréia e cátions monovalentes, enquanto poros aquosos de anfotericina B são

permeáveis a cátions monovalentes e ânions (incluindo H^+ e OH^-), e cátions divalentes como Ca^{2+} (Cohen, B.E., 1998).

Células fúngicas são protegidas de lise osmótica pela presença da parede celular, mas um aumento da permeabilidade de H^+/OH^- através de poros aquosos de anfotericina B leva a uma elevação de pH intracelular que então resulta em danos na membrana (Cohen, B.E., 1998). Em células de mamíferos, canais não aquosos parecem ser responsáveis por alguns dos efeitos colaterais tóxicos, mas reversíveis, produzidos pela anfotericina B. Contudo, efeitos mais agudos e prejudiciais tais como os exercidos pela anfotericina B em células tubulares renais, podem ser causados por aumento de permeabilidade de sal, Ca^{2+} e/ou H^+ através de poros aquosos (Cohen, B.E., 1998).

Este mecanismo sequencial para a formação de poros aquosos de anfotericina B foi descrito em lipossomos, e fornece um argumento para a compreensão do efeito da composição fosfolipídica e do tipo de esterol, na interação da anfotericina B com membranas naturais e bicamadas artificiais (Cohen, B.E., 1992).

1.6.3.1.3. Anfotericina B lipossomal

A associação de anfotericina B com vesículas não requer a presença de esteróis. A velocidade inicial da tomada de anfotericina B por vesículas depende da competição entre lipídio - lipídio e interações anfotericina - lipídio (Chen, W.C., e Bittman, R., 1977).

O encapsulamento de anfotericina B dentro de lipossomos parece reduzir os efeitos tóxicos e melhorar a eficácia clínica, permitindo que dosagens maiores possam ser dadas (Janknegt, R., et al., 1992). O encapsulamento de anfotericina B em lipossomos resulta em um decréscimo da toxicidade e melhora no índice terapêutico da droga, no tratamento e profilaxia de candidíase sistêmica em camundongos (Lopez-Berestein, G., et al., 1984). O encapsulamento de anfotericina B em lipossomos (L-Amb), reduz os efeitos imunossupressivos exercidos pela droga livre, e é menos tóxico a macrófagos e linfócitos T, os principais componentes imunes responsáveis pela resistência do hospedeiro ao fungo e outros patógenos (Mehta, R.T., et al., 1985). Apesar da formulação lipossomal contendo anfotericina B ser, na maioria das vezes, administrada por via parenteral, lipossomos foram também testados por via subcutânea, como forma de melhorar a entrega da droga aos linfonodos (Oussoren, C., e Storm., G., 1998).

A incorporação de anfotericina B em lipossomos ou formulações lipídicas foi a estratégia para reduzir a nefrotoxicidade da droga e melhorar a entrega desta aos sítios de ação (Rho, J.P., e Cupo, J.H., 1995). Formulações lipossomais e lipídicas diferem primariamente na maneira como a anfotericina B é incorporada (figura 1.14) (Janknegt, R., et al., 1992).

Lopez-Berestein e colaboradores publicaram o uso de lipossomos (L-AmpB) para entrega de anfotericina B. Este produto lipossomal é formado pela incorporação de anfotericina B em vesículas multilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina e dimiristoilfosfatidilglicerol com relação molar de 7:3. Um segundo produto lipossomal, "Ambisome", disponível comercialmente, incorpora anfotericina B em vesículas unilamelares pequenas, consistindo de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol, distearoilfosfatidilglicerol, e anfotericina B na relação molar de 2:1:0,8:0,4. Este produto contém 10 mol % de anfotericina B (Rho, J.P., e Cupo, J.H., 1995). A anfotericina B também pode ser eficientemente incorporada em lipídios sem estruturas vesiculares, e através disso fornecer uma formulação com propriedades semelhantes aos produtos lipossomais. Das várias formulações lipídicas testadas, estão incluídas formulações baseadas em complexos anfotericina B - lipídios (Fromtling, R.A., 1995; Brajtburg, J., e Bolard, J., 1996), e dispersão coloidal de anfotericina B e sulfato de colesterol (ABCD, Amphocil™) (Working, P.K., 1999).

Figura 1.14 - Representação esquemática de diferentes formulações lipídicas de anfotericina B. a) Fungizon (micelas de desoxicolato-anfotericina B); b) ABCD ou "Amphocil" (micelas de colesterol sulfato-anfotericina B); c) AmBisome (SUV contendo anfotericina B); d) LUV contendo anfotericina B; e) L-AmpB (vesículas multilamelares contendo anfotericina B); f) ABLC, formulação na forma de fita (DMPC-DMPG-anfotericina B, 4,6:2:3,3). Símbolos: (—), molécula de anfotericina B; (O) membranas de várias composições lipídicas. (Figura extraída do trabalho Brajtburg, J., Bolard, J., 1996).

“ABLC” é uma formulação não lipossomal que complexa anfotericina B com fitas lipídicas na mesma relação molar de 7:3 de dimiristoilfosfatidilcolina e dimiristoilfosfatidilglicerol que a anfotericina B lipossomal descrita por Lopez-Berestein e colaboradores, porém contém uma mais alta concentração de anfotericina B a 33 mol %. Porque o tamanho das vesículas restringe os lipossomos quanto à quantidade de anfotericina B que pode ser incorporada, formulações não lipossomais tais como ABLC podem conter uma maior concentração de anfotericina B (Rho, J.P., e Cupo, J.H., 1995).

“ABCD”, dispersão coloidal de anfotericina B, é um complexo de anfotericina B e colesteril sulfato de sódio (1:1), de partículas uniformes dispostas na forma de discos de 120-140 nm (Herbrecht, R., et al., 1999; Dupont, B., 1999; Amantea, M.A., et al., 1999). O complexo ABCD é estável na circulação após a infusão e é rapidamente removido do sangue por elementos do SRE. Dentro do SRE, ABCD é rapidamente metabolizada e a anfotericina B livre ou ligada à proteína é então novamente liberada na circulação. A anfotericina B livre ou ligada a proteína é responsável pela atividade antifúngica da ABCD. Resultados com reduzida nefrotoxicidade em comparação a convencional formulação de anfotericina B em desoxicolato de sódio, resulta de picos mais baixos de anfotericina B no soro, concentração renal mais baixa de anfotericina B, e menor proporção de anfotericina B ligada a β -lipoproteínas. ABCD é concentrada predominantemente no fígado; concentrações nos rins, baço, cérebro e pulmões são mais baixas e com uma relação de oito vezes na redução da toxicidade, quando comparada à formulação convencional com desoxicolato (Herbrecht, R., et al., 1999; Dupont, B., 1999).

1.6.3.2. Miconazol

O miconazol (figura 1.15) é um derivado imidazólico, pertencente a um grande grupo de compostos sintéticos, e foi o primeiro composto azol introduzido para a terapia de infecções fúngicas sistêmicas (Bodey, G.P., 1992). Os compostos azóis incluem os imidazóis (cetoconazol e miconazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol); são inibidores da biossíntese de ergosterol, e esta inibição resulta da interferência com a remoção do grupo 14 α -metil do lanosterol, um precursor do ergosterol (White, T.C., et al., 1998). Miconazol exerce inibição da citocromo P-450, que é componente do sistema enzimático requerido para iniciar a oxidação do grupo 14 α -metil do lanosterol em leveduras. Isto resulta em um decréscimo de ergosterol e em aumento de intermediários C-14 metilados, como o lanosterol, que é incapaz de suportar o crescimento de levedura se o ergosterol estiver ausente (McGinnis, M.R., e Rinaldi, M.G., 1996). Citocromo oxidase, NADH, citocromo c redutase e adenosina trifosfatase são afetadas pelo miconazol a concentrações de 10^{-6} M e 10^{-5} M (Borgers, M., e Bossche, H.V., 1982).

Os imidazóis induzem danos à membrana, com perda de cátions, proteínas, aminoácidos, nucleotídeos intracelulares e mudanças no metabolismo da glicose. Siste-

mas de modelos de membrana contendo ácidos graxos livres, são muito susceptíveis aos imidazóis (Kuroda, S., et al., 1978; Sud, I.J., et al., 1979; Yamaguchi, H., e Iwata, K., 1979). Fungos e bactérias Gram-positivas são susceptíveis aos imidazóis porque são ricos em ácidos graxos livres, enquanto células de mamíferos e bactérias Gram-negativas são resistentes a eles porque contêm níveis mais baixos de ácidos graxos livres (Medoff, G., et al., 1983).

Figura 1.15 - Estrutura do miconazol.

O miconazol causa dano direto à membrana em altas concentrações, e parece que causa maior rigidez à membrana e células, que reproduzem-se mais vagarosamente. Em altas concentrações, o miconazol também interfere com os triglicerídios e síntese de ácidos graxos, em adição aos seus efeitos sobre a biossíntese do ergosterol (Borgers, M., e Bossche, H.V., 1982). Relacionando esta interferência com a biossíntese do ergosterol, azóis como itraconazol, cetoconazol e miconazol causam disfunção de membrana, alterações em enzimas ligadas à membrana, mitocôndria e síntese de quitina (McGinnis, M.R., e Rinaldi, M.G., 1996).

2. OBJETIVOS

Considerando o potencial dos lipossomos como carreadores de drogas e do DODAB como possível agente antimicrobiano a ser estabelecido, nossos objetivos foram:

- 1) Avaliar o efeito bactericida do DODAB através de determinações de viabilidade celular, fixando a concentração celular de quatro espécies bacterianas de importância clínica, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, de forma a comparar as susceptibilidades relativas de diferentes espécies ao agente antimicrobiano;
- 2) Avaliar a existência de uma correlação entre densidade de carga da célula e viabilidade celular;
- 3) Avaliar se o tamanho dos lipossomos exerce influência no efeito antimicrobiano;
- 4) Avaliar uma possível extensão do efeito antimicrobiano do DODAB sobre a *C. albicans*;
- 5) Determinar o potencial dos lipossomos de DODAB como solubilizantes da anfotericina B e miconazol;
- 6) Caracterizar a viabilidade celular da *C. albicans* em presença de anfotericina B e miconazol lipossomais;
- 7) Descrever uma eventual ação sinérgica entre lipossomo antimicrobiano e droga antifúngica solubilizada pelo mesmo, para as duas drogas: anfotericina B e miconazol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação de lipossomos catiônicos

3.1.1. Vesículas pequenas preparadas por sonicação (sonicadas)

O brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB/SIGMA – St. Louis, MO/USA) foi pesado para preparar a concentração desejada em água Milli-Q ou solução de D-glicose 0,264 M. Vesículas pequenas foram preparadas por sonicação, a temperaturas entre 60 - 80 °C, usando-se a sonda de um “cell disrupter virsonic – Model 150” , operado a 90 W nominais, durante 10 min. A dispersão foi depois centrifugada durante 1 h a 15 °C, a 10.000 rpm (12100 g), para precipitar o titânio e eventuais vesículas multilamelares formadas (Fendler, J.H., 1980; Mortara, R.A., et al., 1978). O sobrenadante corresponde à preparação referida como vesículas sonicadas de DODAB, com diâmetro médio de 86 nm (Carmona-Ribeiro, A.M., e Midmore, B.R., 1992).

3.1.2. Vesículas grandes preparadas por injeção clorofórmica (injetadas)

Vesículas grandes com diâmetro médio de 345 nm foram preparadas por injeção clorofórmica de DODAB em água (Nascimento, D.B., et al., 1998). O DODAB foi pesado para uma concentração 10 vezes maior que aquela desejada, e diluído em 1 mL de clorofórmio, que foi injetado a uma velocidade aproximada de 0,2 mL / min em 10 mL de uma solução aquosa termostatzada a $70 \pm 0,5$ °C, e borbilhada com nitrogênio para facilitar a vaporização do clorofórmio. Esperou-se todo o clorofórmio evaporar e a dispersão foi então retirada da coluna com uma pipeta. A dispersão assim obtida corresponde às vesículas unilamelares grandes de DODAB. Seguiu-se com a microtitulação do DODAB.

3.1.3. Vesículas grandes preparadas por aquecimento (aquecidas)

O DODAB foi pesado para obter-se dada concentração final, após a adição de água Milli-Q. A seguir, o tubo contendo a mistura foi colocado em banho-maria (56 °C, por 30 min) para a obtenção de uma dispersão final turva, de vesículas grandes de diâmetro

médio de 400 nm (Tsuruta, L.R., et al., 1997). Após a dispersão do DODAB foi feita a microtitulação, como descrito no ítem 3.1.4., a seguir.

3.1.4. Microtitulação e determinação da concentração de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)

Foram separadas 3 amostras com 0,5 mL de DODAB. A seguir, foram adicionadas algumas gotas de etanol absoluto com o auxílio de uma pipeta Pasteur para a solubilização das vesículas, até retirar toda a turvação. Também com pipeta Pasteur foram colocadas 3-4 gotas do indicador 1,5 difenil carbazona. A coloração ficou alaranjada. Se a amostra ainda apresentasse alguma turvação, era gotejado mais etanol para a quebra total das vesículas. A titulação foi realizada com uma solução de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 10 mM, titulando o DODAB gota a gota até o ponto de viragem, de coloração lilás. Este método determina a concentração do contra-íon (Schales, O. e Schales, S.S., 1941). Foi calculada a média dos três valores obtidos e aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Conc}_{\text{DODAB}} = \frac{2 \times C_{\text{Hg}(\text{NO}_3)_2} \times V_{\text{Hg}(\text{NO}_3)_2}}{V_{\text{DODAB}}}$$

onde,

C = concentração (M)

V = volume (L)

3.2. Padronização do cultivo de *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, e *S. aureus*

3.2.1. Preparação da escala de MacFarland

A escala de MacFarland, utilizada em microbiologia, foi obtida através de uma curva onde a leitura da turbidez é relacionada com a densidade bacteriana, e expressa em milhões de bactérias por mililitro de suspensão. Esta escala serve como referência da concentração de células de uma suspensão bacteriana. A escala de MacFarland foi preparada conforme a tabela 3.1 (Murray, P.R., et al., 1995) e o gráfico é apresentado na figura 3.1. Uma comparação do número de células da escala de MacFarland e o obtido com o plaqueamento, para quatro espécies bacterianas, é mostrado na tabela 3.2. A escala foi utilizada também como referência da densidade numérica de células, nas preparações dos inóculos dos microrganismos.

Tubo	Escala	Volume (mL) BaCl ₂ a 1%	Volume (mL) H ₂ SO ₄ a 1%	Correspondência aproximada em densidade de bactérias (milhões/mL)
1	0,5	0,05	9,95	150
2	1	0,1	9,90	300
3	1,5	0,15	9,85	450
4	2	0,20	9,80	600
5	2,5	0,25	9,75	750
6	3	0,30	9,70	900
7	3,5	0,35	9,65	1050
8	4	0,40	9,60	1200
9	4,5	0,45	9,55	1350
10	5	0,50	9,50	1500
11	5,5	0,55	9,45	1650
12	6	0,6	9,40	1800

Tabela 3.1 - A tabela apresenta o modo de preparação da escala de MacFarland.

Figura 3.1 - Escala de MacFarland, correlacionando a turbidez com a densidade bacteriana. O gráfico apresenta leituras de absorbância em 600 nm, em função da densidade numérica bacteriana (milhões/mL), para tempos de 5 min, 1,5 h, 2 h, e 24 h, após a preparação da curva.

3.2.2. Cultivo bacteriano

A padronização descrita aqui foi utilizada para a determinação da concentração de células viáveis, das quatro espécies bacterianas. Dessa forma, foi possível relacionar a leitura de turbidez com a contagem de viáveis obtida pelo método de diluição em tubos, seguido do plaqueamento.

As bactérias *E. coli* O111H⁻ obtida do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (procedente anteriormente de coleção de culturas da UNIFESP, São Paulo), *S. Typhimurium* American Type Culture Collection (ATCC) / (Rockville, M.D./USA) 14028, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923 foram reativadas em 3 mL de caldo Tryptone Soya Broth (TSB) / OXOID (UNIPATH LTD., Basingstoke, Hampshire, England) por 2 a 5 h a 37°C. A seguir, semeadas cada qual em meio adequado para cultivo, em placas com ágar MacConkey (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*) e ágar sangue (*S. aureus*). Foram então incubadas a 37°C durante 24 h. Depois, novamente semeadas em caldo TSB, com incubação a 37°C por 2 a 5 h. Cada espécie foi semeada em placa contendo ágar Mueller-Hinton e incubada a 37°C por 24 h. Foram retiradas duas colônias das placas de ágar Mueller-Hinton e semeadas em 3 mL de caldo TSB. Os tubos foram colocados num shaker a 150 rotações por minuto (rpm) com uma temperatura de 37°C, durante 2 h.

Após isso, foi feita a leitura da turbidez contra o meio de cultura (branco) em comprimento de onda de 600 nm, usando um espectrofotômetro Spectronic 20. Este foi considerado o inóculo de partida. A seguir, os 3 mL foram colocados em um balão com 27 mL de caldo TSB e este foi incubado por 3 h em shaker a 150 rpm, 37°C. As amostras (25 mL), foram centrifugadas em centrífuga SORVALL durante 15 min a 10.000 rpm (12100 g) e o sobrenadante foi desprezado. Depois, foram centrifugadas mais duas vezes a 8.000 rpm (7710 g) por 10 min para lavagem com água estéril e o sedimento foi suspenso com 25 mL de água Milli-Q estéril. Foi separado um volume para a leitura da turbidez. Foram feitas as leituras da absorbância das suspensões em espectrofotômetro Hitachi U-2000 e ajustadas por meio de diluições, para 0,1 de absorbância, nos comprimentos de onda de 400, 600, e 670 nm. Após o ajuste, procedeu-se ao plaqueamento das suspensões, ou seja, semeadura em placas, utilizando o método de diluição em tubos. As suspensões bacterianas foram semeadas em quadruplicata em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C, por 24h. A leitura das placas foi feita através da contagem das colônias em um contador de colônias manual modelo C-600 (Phoenix/Piracicaba, São Paulo) e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro de suspensão (UFC/mL).

Os resultados das contagens das colônias por plaqueamento, obtidos a partir do ajuste da turbidez das suspensões das quatro espécies após o cultivo, foram comparados aos valores da escala de MacFarland e são mostrados na tabela 3.2

BACTÉRIA	Turbidez da Cultura (600 nm)	TURBIDEZ AJUSTADA			Contagem aproximada MacFarland	UFC/0,1 mL	Média do plaqueamento (n = 3 - 5) em UFC/mL	Turbidez para 2,5 x 10 ⁷ UFC/mL		
		400 nm	600 nm	670 nm				400 nm	600 nm	670 nm
<i>E. coli</i>	1,371	0,204	0,102	0,082	1 X 10 ⁸	15±3	1,5 X 10 ⁷	0,318	0,156	0,126
	1,092	0,227	0,109	0,089	1 X 10 ⁸	19±2	1,9 X 10 ⁷			
<i>S. Typhimurium</i>	1,064	0,195	0,090	0,076	0,9 X 10 ⁸	39±7	3,9 X 10 ⁷	0,126	0,058	0,048
	1,123	0,237	0,108	0,089	1 X 10 ⁸	47±9	4,7 X 10 ⁷			
<i>P. aeruginosa</i>	1,006	0,235	0,102	0,084	1 X 10 ⁸	25±4	2,5 X 10 ⁷	0,230	0,100	0,084
	1,000	0,225	0,098	0,083	1 X 10 ⁸	34±1	3,4 X 10 ⁷			
<i>S. aureus</i>	0,789	0,205	0,100	0,084	1 X 10 ⁸	33±4	3,3 X 10 ⁷	0,189	0,094	0,079
	0,448	0,195	0,100	0,084	1 X 10 ⁸	20±3	2,0 X 10 ⁷			

Tabela 3.2 - A tabela apresenta a relação da turbidez com concentração bacteriana. Após o cultivo, foi feita a leitura da turbidez a 600 nm (coluna 2) e através de diluições, ajustada a absorbância para aproximadamente 0,100 a 600 nm, com a leitura correspondente em 400 nm e 670 nm (coluna 3). A contagem das células viáveis foi relacionada com a escala de MacFarland (coluna 4), utilizando os resultados obtidos com o método do plaqueamento (contagem das placas, coluna 5 e final da contagem, em UFC/mL, coluna 6) para a obtenção de valores de turbidez correspondentes à concentração de células viáveis de 2,5 x 10⁷ UFC/mL (coluna 7).

3.2.3. Contagem de células viáveis pelo método de diluição em tubos e plaqueamento

Este foi o método utilizado para a determinação da concentração de células viáveis. Após a interação das bactérias com as vesículas catiônicas, foram feitas diluições seriadas da amostra até a concentração aproximada de 10^3 células/mL. Então, 0,1 mL (aproximadamente 100 células) foi espalhado em uma placa de ágar Müeller-Hinton e esta incubada a 37 °C por 24h. O crescimento bacteriano foi observado pelo aparecimento de colônias, que foram contadas com o auxílio de um contador manual modelo C-600 (Phoenix/Piracicaba, São Paulo) e o resultado da contagem foi aquele multiplicado pelo fator de diluição, aplicado à cada amostra, para a obtenção da contagem final. Esta foi expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro de suspensão bacteriana (UFC/mL), que correspondeu à densidade numérica de células viáveis na suspensão.

3.3. Estudo comparativo de dois métodos para a determinação de viabilidade celular

3.3.1. KIT de viabilidade celular BacLight™ (L-7007), Molecular Probes, Inc., Eugene, OR/USA

3.3.1.1. Cultivo da suspensão bacteriana

E. coli O111H⁻ obtida do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (procedente anteriormente de coleção de culturas da UNIFESP, São Paulo), foi reativada em 3 mL de caldo Tryptone Soya Broth (TSB) / OXOID (UNIPATH LTD., Basingstoke, Hampshire, England) durante 2 h, depois semeada em uma placa contendo ágar Müeller-Hinton, e incubada a 37 °C durante 24 h. Uma alçada desta cultura foi semeada em 3 mL de caldo TSB e incubada a 37 °C por 2 h. Depois, estes 3 mL foram colocados em 27 mL de caldo TSB. O caldo foi deixado incubando em um shaker por 5 h, 37 °C, 150 rpm. Após este período, 25 mL desta suspensão foi centrifugada em uma centrífuga SORVALL a 10.000 rpm (12100 g), durante 15 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso e homogeneizado em 2 mL de água Milli-Q estéril. Este volume foi dividido, sendo colocado 1 mL em tubo de centrífuga contendo 20 mL de água Milli-Q estéril e, o outro 1 mL, em tubo contendo 20 mL de álcool isopropílico a 70%. Os dois tubos foram deixados a temperatura ambiente durante 1 h, homogeneizando-os a cada 15 min. A seguir, as amostras

foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 min e os sedimentos suspensos como anteriormente. Procedeu-se a outra centrifugação de 15 min a 10.000 rpm (12100 g) e os sedimentos dos dois tubos foram suspensos em 10 mL de água estéril. Foram feitas leituras de turbidez e determinadas as absorbâncias das duas suspensões em comprimento de onda de 670 nm. As suspensões foram ajustadas através de diluições para 0,06 de absorbância, considerando que uma absorbância de 0,03 corresponde a 1×10^8 bactérias / mL (segundo padronização do kit da Molecular Probes, Inc., Eugene, OR/ USA).

3.3.1.2. Preparação da curva padrão

As duas suspensões bacterianas obtidas no item 3.3.1.1. foram misturadas, usando sete proporções diferentes de cada uma, em tubos de Eppendorf, de acordo com a tabela 3.3. A figura 3.2 mostra os espectros de fluorescência obtidos com as misturas realizadas com as suspensões de *E. coli* vivas e mortas.

Tubos	Proporção de células vivas:mortas	Volume (mL) suspensão de células vivas	Volume (mL) suspensão de células mortas
1	0:100	0	1,0
2	10:90	0,1	0,9
3	30:70	0,3	0,7
4	50:50	0,5	0,5
5	70:30	0,7	0,3
6	90:10	0,9	0,1
7	100:0	1,0	0
8	Branco	-	1,0 mL de água

Tabela 3.3 - Volumes das suspensões bacterianas usadas para obter a curva padrão.

Os resultados obtidos com a curva padrão após a leitura em espectrofluorímetro são apresentados na tabela 3.4. e a figura 3.3 traz a curva padrão obtida. Ambas são mostradas na página seguinte.

Figura 3.2 - Espectros de fluorescência de misturas padrão contendo células vivas e mortas de *E. coli*. O espectro no gráfico relaciona quantidades crescentes de células viáveis (em %), com o espectro de emissão das amostras na faixa de comprimento de onda de 490 - 700 nm.

Blank	CP1	CP2	CP3	CP4
EM1	Fcell1	Fcell1	Fcell1	Fcell1
2.45E+02	4.96E+02	2.84E+03	5.04E+03	3.77E+03
EM2	Fcell2	Fcell2	Fcell2	Fcell2
9.59E+02	1.18E+03	1.26E+03	1.41E+03	1.26E+03
	Razão	Razão	Razão	Razão
	1.15235968	8.67326635	10.71413	11.7417066
Blank EM1 e EM2 = fluorescência integrada do branco, entre 510 - 540 nm e 620 - 650 nm;				
CP = Curva padrão				
Fcell1 e Fcell2 = fluorescência integrada de cada amostra, entre 510 - 540 nm e 620 - 650 nm.				

Tabela 3.4 - Mostra os dados obtidos da leitura da curva padrão em espectrofluorímetro Hitachi F-4500 e o valor da razão da integração da área entre os comprimentos de onda de 510-540 nm e 620-650 nm.

Figura 3.3 - Curva padrão do kit de viabilidade. A figura representa os valores da razão, após a integração da área do espectro de cada amostra da curva padrão, em comprimentos de onda de 510 - 540 nm e 620 - 650 nm, em função das células viáveis (%). Os cálculos estão na tabela 3.4

3.3.1.3. Determinação de viabilidade celular na presença de três concentrações diferentes de DODAB, usando o kit

Em tubos de Eppendorf foram adicionados 0,5 mL da suspensão de *E. coli* contendo 2×10^8 bactérias/mL e 0,5 mL de DODAB, para três concentrações de DODAB: 2×10^{-6} M, 2×10^{-5} M, 2×10^{-4} M. A interação bactéria/DODAB foi de 30 min, seguido da adição da mistura dos reagentes A e B, que compõem o corante do kit de viabilidade. Foram usados 4 tubos para cada concentração de DODAB, para obtenção da média e cálculo do desvio padrão. Para cada concentração de DODAB foi feito um tubo para o branco, onde foram adicionados 0,5 mL de água Milli-Q e 0,5 mL de DODAB (controles).

3.3.1.4. Reação do kit de viabilidade BacLight (L-7007)

Para todas as amostras da curva padrão e das suspensões bacterianas com DODAB, foram adicionados 3 μ L de uma mistura de marcadores fluorescentes, reagentes A e B do kit de viabilidade BacLight, (Molecular Probes, Eugene, OR/USA), que são corantes de ácidos nucleicos que distinguem bactérias vivas com membrana plasmática intacta (coloração verde) de bactérias mortas com membrana plasmática comprometida (coloração vermelha). A seguir, as amostras foram deixadas no escuro, à temperatura ambiente, por 15 min. Depois, efetuadas as leituras com um espectrofluorímetro Hitachi F - 4500.

3.3.1.5. Espectroscopia de fluorescência

Com o espectrofluorímetro Hitachi F - 4500 foi medido o espectro de emissão de fluorescência de cada amostra (excitação a 470 nm e emissão de 490 a 700 nm), sendo denominados “Fcell” as amostras que continham as suspensões bacterianas e “Fblank” aquelas onde havia somente água com os marcadores de fluorescência.

O cálculo da razão (R) da intensidade integrada de cada espectro entre 510-540 nm (EM1, verde) e entre 620-650 nm (EM2, vermelha) foi feito para cada amostra, seguindo a fórmula abaixo:

$$R_{\text{(verde/vermelho)}} = \frac{F_{\text{cell, EM1}} - F_{\text{blank, EM1}}}{F_{\text{cell, EM2}} - F_{\text{blank, EM2}}}$$

onde,

F_{cell, EM1} = Intensidade de fluorescência integrada de cada suspensão entre 510-540 nm

F_{cell, EM2} = Intensidade de fluorescência integrada de cada suspensão entre 620-650 nm

F_{blank, EM1} = Intensidade de fluorescência integrada da mistura dos marcadores em água, na ausência de células, entre 510-540 nm

F_{blank, EM2} = Intensidade de fluorescência integrada da mistura dos marcadores em água, na ausência de células, entre 620-650 nm

A partir da curva padrão, que relacionou as diversas proporções de células vivas e mortas a valores de R (razão)(valor de R versus % de células vivas), obteve-se a % de células vivas para cada uma das amostras que interagiram com DODAB (tabela 3.5). A figura 3.4 mostra os espectros de emissão de fluorescência para diferentes concentrações de DODAB (10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M, em duplicata), interagindo durante 30 min com 1 x 10⁸ células/mL de *E. coli*. Os brancos (triplicata) correspondem a dispersões de DODAB em ausência de bactérias.

3.3.2. Contagem de células viáveis pelo método de diluição em tubos e plaqueamento

3.3.2.1. Preparação da suspensão bacteriana

E. coli O111H⁻ foi cultivada e lavada como está descrito no item 3.3.1.1. A absorbância da suspensão bacteriana foi ajustada através de diluições para 0,06, em comprimento de onda de 670 nm, equivalente a 2 x 10⁸ bactérias/mL. Após a interação das vesículas com a bactéria, seguiu-se de diluições seriadas em tubos contendo 1 mL de

Blank/DODAB	DODAB 10 ⁻⁶ M	DODAB 10 ⁻⁶ M	DODAB 10 ⁻⁶ M
EM1	Fcell1	Fcell1	Fcell1
2.78E+02	3.26E+03	2.72E+03	2.22E+03
EM2	Fcell2	Fcell2	Fcell2
8.78E+02	1.57E+03	1.52E+03	1.49E+03
	Razão	Razão	Razão
	4.28999107	3.80621129	3.16635724

Blank/DODAB	DODAB 10 ⁻⁵ M	DODAB 10 ⁻⁵ M	DODAB 10 ⁻⁵ M
EM1	Fcell1	Fcell1	Fcell1
2.37E+02	6.32E+02	6.81E+02	9.21E+02
EM2	Fcell2	Fcell2	Fcell2
8.04E+02	1.30E+03	1.32E+03	1.50E+03
	Razão	Razão	Razão
	0.79180723	0.8539531	0.9

Blank/DODAB	DODAB 10 ⁻⁴ M	DODAB 10 ⁻⁴ M	DODAB 10 ⁻⁴ M
EM1	Fcell1	Fcell1	Fcell1
2.29E+02	3.91E+02	4.43E+02	4.25E+02
EM2	Fcell2	Fcell2	Fcell2
7.05E+02	9.76E+02	1.03E+03	9.67E+02
	Razão	Razão	Razão
	0.59731983	0.66695104	0.74939035

Tabela 3.5 - Cálculo da razão da integração da área entre os comprimentos de onda de 510 - 540 nm e 620 - 650 nm, para 3 concentrações de DODAB.

Figura 3.4 - Espectros de fluorescência de misturas vesícula / bactéria, para três concentrações de DODAB. A partir destes espectros foram calculadas as razões das integrações das áreas de cada amostra com DODAB (duplicata), entre os comprimentos de onda de 510 - 540 nm e, entre 620 - 650 nm, mostrados na tabela 3.5.

água Milli-Q estéril, para a obtenção final de aproximadamente 10^3 UFC/mL. 0,1 mL do tubo final foi espalhado em placa de ágar Müeller-Hinton, seguido de incubação a 37°C , por 24h. O crescimento bacteriano foi medido através do aparecimento de colônias, que foram contadas com o auxílio de um contador manual modelo C-600 (Phoenix/Piracicaba, São Paulo) e este número, multiplicado pelo fator de diluição. O número resultante é expresso como unidade formadora de colônia por mililitro de suspensão bacteriana (UFC/mL), e fornece o número de células viáveis da suspensão.

3.3.2.2. Determinação de viabilidade celular em presença de vesículas pequenas de DODAB, para três concentrações de vesículas

Em tubos estéreis foram colocados 1 mL da suspensão de *E. coli* 2×10^8 bactérias/mL e 1mL de DODAB, para três concentrações de DODAB: 2×10^{-6} M, 2×10^{-5} M e 2×10^{-4} M. Após 30 min de interação vesícula/bactéria procedeu-se com diluições sucessivas até 10^{-5} , para cada concentração de DODAB. Então, foi colocado 0,1 mL da última

diluição de cada tubo em placa contendo agar Müller-Hinton e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski. Foram semeadas 3 placas para cada tubo, depois incubadas a 37 °C durante 24 h, seguido da contagem bacteriana das placas.

A comparação entre os dois métodos foi realizada utilizando a mesma bactéria, na mesma densidade numérica e condições experimentais. Os resultados de viabilidade celular (% de viáveis) do kit foram mais baixos do que aqueles obtidos com o método de diluição e plaqueamento. Na tabela 3.6 podemos verificar que tanto para o kit como para o método do plaqueamento, DODAB em concentração de 10^{-4} M reduz a viabilidade de *E. coli* a zero (10^8 bactérias/mL após 30 min de interação). Para DODAB 10^{-5} M e 10^{-6} M, os resultados do plaqueamento foram de mais ou menos 24% e 35%, e para o kit, de 0% e 24%, respectivamente.

C_{DODAB} (M)	Método do plaqueamento		Kit BackLight L-7007	
	(%)Viáveis	Média $\pm \delta$	(%)Viáveis	Média $\pm \delta$
10^{-6}	31	35 ± 4	29	24 ± 4
	34		25	
	39		19	
10^{-5}	20	24 ± 6	0	0 ± 0
	32		0	
	19		0	
10^{-4}	0	0 ± 0	0	0 ± 0
	0		0	
	0		0	

Tabela 3.6 - Comparação da viabilidade de *E. coli* (1×10^8 células/mL) em presença de vesículas catiônicas de DODAB (sonicadas), por dois métodos diferentes (plaqueamento e kit de viabilidade BacLight).

3.3.3. Comparação do kit de viabilidade celular BacLight L-7007 com o método de plaqueamento, usando vesículas grandes e pequenas de DODAB

Dois outros experimentos com o kit BacLight L-7007 LIVE/DEAD foram realizados, para novamente comparar com o método da semeadura em placas (plaqueamento).

Foi usada uma densidade numérica bacteriana final de 1×10^8 UFC/mL, ajusta-

da conforme indicado pelo kit e conforme a nossa padronização, com DODAB na concentração final de 3×10^{-5} M, necessário para a neutralização de 50% das células bacterianas (Sicchierolli, S.M., et al., 1995). Foram testadas vesículas pequenas (sonicadas) e grandes (injetadas) de DODAB, no experimento. As concentrações bacterianas ajustadas para 1×10^8 UFC/mL foram plaqueadas, e serviram como controle do experimento.

3.3.3.1. Preparação da curva padrão com as suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas preparadas de acordo com o item 3.3.1.1. foram misturadas, usando cinco proporções diferentes de células vivas e mortas em tubos de Eppendorf, de acordo com a tabela 3.7 a seguir.

Tubos	Proporção de células vivas:mortas	Volume (mL) suspensão de células vivas	Volume (mL) suspensão de células mortas
1	0:100	0	1,0
2	10:90	0,1	0,9
3	50:50	0,5	0,5
4	90:10	0,9	0,1
5	100:0	1,0	0
6	Branco	-	1,0 mL de água

Tabela 3.7 - Volume das suspensões bacterianas usadas para obter a curva padrão.

3.3.3.2. Interação vesícula / bactéria

Foi adicionado 0,5 mL da suspensão de *E. coli* contendo 2×10^8 bactérias/mL em cubeta de 1 cm e 0,5 mL de DODAB na concentração de 6×10^{-5} M. A interação bactéria/DODAB foi realizada durante 1 h, seguindo da adição da mistura dos reagentes A e B que compõem o corante do kit de viabilidade. A reação foi feita em triplicata, para obtenção da média e cálculo do desvio padrão. Também, para as interações bactéria/DODAB, foram preparados tubos que serviram como brancos, onde foram adicionados 0,5 mL de água Milli-Q e 0,5 mL de DODAB (controles).

3.3.3.3. Reação do kit de viabilidade celular BacLight L - 7007

Para todas as amostras da curva padrão e das suspensões bacterianas com DODAB foram adicionados 3 μ L de uma mistura de marcadores fluorescentes, reagentes A e B do kit de viabilidade BacLight. A seguir, as amostras foram deixadas no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 min. Após este período, seguiu-se com as leituras em um espectrofluorímetro Hitachi F - 4500.

3.3.3.4. Espectroscopia de fluorescência

O procedimento foi o mesmo do item 3.3.1.5. Os resultados obtidos com o kit não foram os esperados. Com vesículas pequenas de DODAB (sonicadas), todas as células estavam mortas. Com vesículas grandes de DODAB, preparadas por injeção clorofórmica, obtivemos o resultado de 15% de células viáveis, muito abaixo dos 50% esperados. Isso poderia ser explicado caso tivéssemos um número menor de células do que o estimado (o que foi comprovado através do plaqueamento da suspensão bacteriana usada como controle do experimento, cujo resultado foi $0,77 \times 10^7$ UFC/mL.) Portanto, a concentração de DODAB necessária para reduzir a viabilidade celular a zero, para esta densidade bacteriana é bem menor.

Assim sendo, não foi possível tirar conclusões em relação a comparação dos métodos, por problemas de adequação do kit.

3.3.4. Determinação da fase de crescimento da *E. coli*

Considerando a disparidade entre as densidades numéricas bacterianas obtidas pelo cultivo de 5 h e à reportada pelo kit BacLight, para bactéria em fase de crescimento exponencial, foi feito um teste de crescimento em função do tempo de cultivo.

De acordo com o protocolo do kit, um ajuste de 0,03 de absorbância em comprimento de onda de 670 nm, consiste em 1×10^8 UFC/mL. Conforme a nossa padronização, para estes valores de absorbância e comprimento de onda, é esperado o valor de $0,6 \times 10^7$ UFC/mL.

Para o teste, foram utilizados dois ajustes de absorbância: 0,03 e 0,126, em comprimento de onda de 670 nm; este último, porque foi usado em nossos experimentos para a obtenção de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. O cultivo para *E. coli* foi realizado conforme nossa padronização, usando tempos de 3 h 30 min, 4 h e 5 h.

3.4. Determinação do efeito do DODAB sobre a viabilidade celular, para as quatro espécies bacterianas

3.4.1. Cultivo e preparação das bactérias

A partir dos resultados do plaqueamento em função do ajuste da turbidez (tabela 3.2), foram calculados os valores de absorbância equivalentes a uma densidade numérica final bacteriana de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. Em todos os experimentos realizados (curvas de viabilidade celular e mobilidade eletroforética) as suspensões foram ajustadas pela turbidez e comprovados os valores com o plaqueamento, que foram os controles dos experimentos.

Para os experimentos, as bactérias foram reativadas, cultivadas e lavadas conforme descrito no item 3.2.2. Foi utilizada água Milli-Q estéril, ou solução de D-glicose 0,264 M estéril para manter as células em ambiente isotônico, na lavagem e na preparação da suspensão final bacteriana. Após este procedimento, as suspensões bacterianas foram ajustadas de acordo com a tabela 3.2, para uma concentração final de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL, para a interação com DODAB. Sempre foi feita uma amostra controle (bactéria sem DODAB), em todos os nossos experimentos.

3.4.2. Interação das vesículas sonicadas de DODAB com bactérias

3.4.2.1. Curvas de viabilidade celular em função da concentração de DODAB

Em 10 tubos de ensaio estéreis foram colocados 0,9 mL de uma suspensão bacteriana contendo $2,78 \times 10^7$ UFC/mL e, em 9 deles, 0,1 mL das dispersões de DODAB com concentrações de 0,001mM, 0,005 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM. No outro tubo foi colocado 0,1 mL de água Milli-Q estéril e foi usado como controle do experimento.

O tempo de interação foi de 1h para cada tubo. Após isso, foram feitas diluições de 1/2, seguidas de diluições seriadas de 10^{-2} e 10^{-4} em tubos contendo 10 mL de água Milli-Q estéril. Foi tomado 0,1 mL da última diluição para a semeadura em placa com ágar Müeller-Hinton e espalhado com alça de Drigalski. As placas foram semeadas em triplicata e colocadas em estufa a 37°C, incubadas por 24h, fazendo depois as leituras das colônias (contagem).

3.4.2.2. Curvas de viabilidade celular em função do tempo de interação

Em 12 tubos de ensaio foram colocados 0,9 mL da suspensão bacteriana, ajustada para uma concentração final no tubo de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL e, em 11 deles 0,1 mL da dispersão de 0,05mM de DODAB. No outro tubo foi colocado 0,1 mL de água Milli-Q estéril com a bactéria e usado como controle no experimento. A adição do DODAB em cada tubo foi de acordo com a seguinte variação de tempo: 0 h, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h e 24 h. Após este procedimento, seguiu-se à diluições de 10^{-2} e 10^{-4} em tubos com 10 mL de água Milli-Q estéril, depois outra diluição de 1/2 e, finalmente, 0,1 mL do último tubo foi semeado em placa de ágar Müller-Hinton, e espalhado com alça de Drigalski.

3.5. Determinação da mobilidade eletroforética para duas espécies bacterianas: *E. coli* e *S. aureus*, em presença de lipossomos de DODAB

3.5.1. Cultivo e preparação das bactérias

E. coli e *S. aureus* foram cultivadas como descrito no item 3.2.2. Apenas foi usada uma solução de D-glicose 0,264 M estéril no lugar da água Milli-Q estéril. Após a lavagem, as bactérias foram ajustadas para uma concentração de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL (tabela 3.2) quando no tubo com DODAB (1/10), também em D-glicose 0,264 M.

3.5.2. Preparação dos lipossomos de DODAB

O DODAB 10 mM foi preparado conforme o item 3.1.1. e diluído de acordo com as concentrações desejadas, em D-glicose 0,264 M. A D-glicose foi filtrada em filtro Millipore estéril de 0,22 μ m, para ser usada. Foram utilizadas as mesmas concentrações de DODAB da curva de viabilidade celular : 0,001mM, 0,005mM, 0,01mM, 0,05mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM e 10mM.

3.5.3. Interação das vesículas sonicadas de DODAB com as duas bactérias: *E. coli* e *S. aureus*

Para cada bactéria, em 10 tubos estéreis foram colocados 6,3 mL da suspensão bacteriana ajustada, para 0,7 mL das concentrações de DODAB. O tempo de interação foi de 1 h, com intervalos entre as adições de DODAB, para que a leitura de cada tubo fosse realizada após 1 h de interação.

3.5.4. Determinação da mobilidade eletroforética das bactérias, em função da concentração de DODAB

Um aparelho Mark II / Rank Brothers (Cambridge, England), para microeletroforese de partículas com configuração para cela chata foi utilizado, para determinação da mobilidade eletroforética das células.

Foi registrado o tempo que uma bactéria leva para atravessar uma distância conhecida, em um campo, à temperatura média de 25°C. A amostra foi colocada na célula de eletroforese, os eletrodos de platina foram conectados e aplicou-se uma diferença de potencial de ± 60 V. Para cada célula, a velocidade eletroforética foi medida nos dois sentidos, tanto para + 60 V, quanto para – 60 V. A média das velocidades eletroforéticas foi calculada para pelo menos 10 bactérias para cada amostra e, depois, aplicada na fórmula a seguir.

$$ME = l.d/(\Delta V.t)$$

onde,

l = distância intereletrodos (6,606 cm)

d = distância percorrida pela partícula monitorada (60 μ m)

t = tempo gasto pela partícula para percorrer " d "

ΔV = ± 60 V

3.6. Determinação de viabilidade celular de *E. coli* em presença de lipossomos de DODAB

3.6.1. Cultivo e preparação das suspensões de *E. coli*

E. coli O111H⁻ foi reativada em 3mL de caldo TSB / OXOID, por 2 a 5 h a 37 °C. A seguir, semeada em placa com ágar Mac Conkey e incubada a 37 °C durante 24 h. Depois, novamente semeada em caldo TSB, com incubação a 37 °C por 2 a 5 h. A bactéria foi semeada em placa contendo ágar Müeller-Hinton e incubada a 37 °C por 24 h. Foram retiradas duas colônias da placa de ágar Müeller-Hinton e semeadas em 3mL de caldo TSB. O tubo foi colocado num shaker a 150 rpm com uma temperatura de 37 °C, durante 2 h. Após isso, foi feita a leitura da turbidez contra o meio de cultura (branco) em comprimento de onda de 600 nm, usando um espectrofotômetro Spectronic 20. Este foi considerado o inóculo de partida. A seguir, os 3 mL foram colocados em um balão com 27 mL de caldo TSB e este foi incubado por mais 3 h no shaker a 150 rpm, 37 °C. A amostra (25 mL), foi centrifugada em centrífuga SORVALL durante 15 min a 10.000 rpm (12100 g) e o sobrenadante foi desprezado. Foram feitas mais duas centrifugações a 8.000 rpm (7710 g) por 10 min, para lavagem com água estéril e, depois, o sedimento foi suspenso com 20 mL de água Milli-Q estéril. Foi separado um volume para a leitura da turbidez. A leitura de turbidez da suspensão foi realizada em espectrofotômetro Hitachi U - 2000 e ajustada para a absorbância desejada, em comprimento de onda de 400 nm, 600nm e 670 nm. O ajuste da densidade numérica de células pela absorbância foi sempre realizado de acordo com a tabela de padronização das quatro espécies bacterianas (tabela 3.2).

3.6.2. Efeito da concentração bacteriana sobre a viabilidade de *E. coli* em presença de vesículas pequenas de DODAB (5 µM), para um tempo de interação de 1 h

Neste experimento foram utilizadas suspensões de *E. coli* O111H⁻ ajustadas pela turbidez, para as seguintes densidades numéricas finais de células: 4×10^8 UFC/mL, 1×10^8 UFC/mL e $2,0 \times 10^7$ UFC/mL.

Vesículas pequenas de DODAB preparadas por sonicação, na concentração de 50 µM, foram usadas para a interação de 1 h com a bactéria. Em tubos de ensaio estéreis foram colocados 0,9 mL de suspensão da bactéria e 0,1 mL de DODAB. Após a interação vesícula/bactéria, seguida de diluição seriada, 0,1 mL de cada mistura foi espalhada em placa de ágar Müeller-Hinton e incubada a 37 °C por 24 h, para a contagem das

células viáveis. Todas as suspensões bacterianas utilizadas no experimento foram também diluídas e semeadas em ágar Müller-Hinton antes da interação com o DODAB, como controle da densidade numérica de células.

3.6.3. Determinação de floculação bacteriana induzida pelas vesículas e sua relação com a viabilidade celular

O teste foi feito para verificar se estava sendo subestimada a morte das bactérias devido à floculação. A concentração de DODAB necessária para neutralizar e flocular a suspensão de *E. coli*, ou seja, a concentração necessária para a obtenção de mobilidade eletroforética da bactéria igual a zero, foi obtida a partir dos dados já publicados pelo grupo (Sicchierolli, S.M., et al., 1995). A meia-vida de floculação ($t_{1/2}$), foi obtida a partir da equação abaixo (Overbeek, J.Th.G., 1977):

$$t_{1/2} = \frac{2 \times 10^{11} \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}}{n}$$

onde n = densidade numérica de bactérias em cm^{-3}

O cálculo foi feito para *E. coli* com 4×10^8 UFC/mL e 4×10^7 UFC/mL. Foram então utilizadas dispersões de DODAB de $6,5 \times 10^{-5}$ M e 1×10^{-5} M, para tempos de interação de 30 min e 90 min; os cálculos para obtenção do $t_{1/2}$ estão colocados a seguir. Neste experimento, foram utilizadas suspensões em duplicata para as concentrações bacterianas, tendo sido usadas água Milli-Q e D-glicose 0,264 M estéreis para suspender a bactéria, e controlar qualquer efeito osmótico que pudesse gerar perda de viabilidade das células. Não foi observado qualquer efeito osmótico, devido à suspensão das bactérias em água.

Cálculo para obtenção do $t_{1/2}$ (tempo necessário para o número de bactérias por mL alcançar a metade do seu valor inicial).

$$\frac{2 \times 10^{11} \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}}{4 \times 10^8 \text{ cm}^{-3}} = 0,5 \times 10^3 \cdot \text{s} = 8,33 \text{ min}$$

$$\frac{2 \times 10^{11} \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}}{4 \times 10^7 \text{ cm}^{-3}} = 0,5 \times 10^4 \cdot \text{s} = 83,33 \text{ min}$$

Assim, a equação prevê meia-vida da ordem de minutos no primeiro caso e, de horas, no segundo caso.

3.6.4. Determinação do efeito do tamanho de vesículas de DODAB sobre a viabilidade celular

O experimento 3.6.3. foi repetido, utilizando vesículas grandes de DODAB, preparadas por injeção clorofórmica (DODAB injetado), e preparadas por aquecimento (DODAB aquecido). O experimento foi realizado utilizando o mesmo cálculo do teste descrito no item 3.6.3. (Sicchierolli, S.M., et al., 1995).

Suspensões de *E. coli* com 4×10^8 UFC/mL e 4×10^7 UFC/mL foram colocadas para interagir com vesículas grandes de DODAB injetado e aquecido, em concentrações de $6,5 \times 10^{-5}$ M e $1,0 \times 10^{-5}$ M, para tempos de interação de 30 min e 90 min. Foram colocados 0,9 mL da suspensão bacteriana e 0,1 mL de DODAB em cada tubo e, após a interação, as misturas foram diluídas e plaqueadas, para a contagem das células viáveis.

3.6.5. Determinação de cinéticas de floculação bacteriana induzidas por vesículas grandes e pequenas de DODAB

Curvas de floculação bacteriana foram realizadas para as vesículas de DODAB injetadas e aquecidas (grandes), e sonicadas (pequenas), quando em contato com a *E. coli*. As concentrações finais de DODAB na cubeta foram aquelas necessárias para a neutralização, segundo cálculo (Sicchierolli, S.M., et al., 1995), de suspensões de *E. coli* contendo 4×10^7 UFC/mL e 4×10^8 UFC/mL. A turbidez a 400 nm em função do tempo foi registrada continuamente em espectrofotômetro Hitachi U-2000. Foram colocadas em cubeta de 1 cm, a suspensão de bactéria (0,9 mL) seguida da dispersão de DODAB (0,1 mL) para a concentração desejada (1×10^{-5} M e $6,5 \times 10^{-5}$ M), contra um branco de bactéria em água ou em D-glicose 0,264 M, à temperatura ambiente.

A agregação bacteriana após a interação com o DODAB foi observada também por microscopia ótica a fresco, dos agregados formados, para confirmar a floculação obtida pelos registros de turbidez.

3.6.6. Cálculo das constantes de afinidade (K) de DODAC ou DODAB, pela superfície celular

Para explicar a maior ação bactericida das vesículas grandes em comparação com as pequenas, foi feito um cálculo teórico das constantes de afinidade, para as vesí-

culas. Para tanto, foram utilizadas isotermas de adsorção de trabalho já publicado pelo grupo (Tápias, G.N., et al., 1994) e calculadas as constantes de afinidade para os dois tipos de vesículas, usando o modelo de Langmuir (Hiemenz, P.C., 1986).

3.6.6.1. Modelo de Langmuir, constantes de afinidade e adsorção máxima

Langmuir deduziu uma expressão para uma isoterma de adsorção, considerando que a superfície sólida é limpa, uniforme, e não porosa; a adsorção ocorre por um processo físico, onde não haja interação entre as espécies adsorvidas.

Em sua forma linearizada, a equação de Langmuir (Jackson, S., et al., 1986) é:

$$c/(x/m) = c/(x/m)_{\text{máx}} + 1/[K(x/m)_{\text{máx}}]$$

Onde:

x/m é o número de moles de adsorbato (anfifílico) adsorvidos por m^2 de adsorvente (bactéria);

c é a concentração do anfifílico livre;

K a constante de adsorção.

A constante de adsorção K é também chamada de constante de afinidade e mede a afinidade do adsorbato pela superfície. A adsorção limite é dada por $(x/m)_{\text{máx}}$. Pelo gráfico $c/(x/m)$ contra c , se uma linha reta é obtida, então a adsorção segue o modelo de Langmuir e o coeficiente angular da linha reta é dado por $1/(x/m)_{\text{máx}}$ e o intercepto é dado por $1/[K(x/m)_{\text{máx}}]$.

As isotermas de adsorção podem ser divididas em 5 tipos característicos; subdivididos em outros 5 subtipos para os quais pode-se dar uma interpretação razoavelmente genérica (Giles, C.H., et al., 1960). Isotermas de alta afinidade também podem ser langmuirianas, possuindo um perfil inicial praticamente vertical.

Os resultados que relatam a quantidade de material adsorvido na concentração de equilíbrio da solução, descrevem o que é conhecido como uma isoterma de adsorção. A determinação experimental da isoterma de adsorção geralmente envolve a mistura, sob agitação, de uma massa conhecida de material adsorvente com uma solução de adsorbato de concentração conhecida, à temperatura constante. A concentração do adsorbato no sobrenadante é, então, determinada por um método físico ou químico.

Neste capítulo, relatamos experimentos de adsorção de vesículas de DODAB em bactérias. Estas vesículas contêm um compartimento aquoso interno limitado por uma membrana semipermeável, que se encontra no rígido estado gel à temperatura ambiente (Carmona-Ribeiro, A.M., et al., 1992).

3.6.6.1.1. Para vesículas grandes de DODAC

Número de moléculas de DODAC adsorvidas / bactéria	c (M)	(x/m) (m ⁻²)	c/(x/m) (Mm ⁻²)
14,5 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁻⁵ M	5,41 x 10 ⁻⁵	0,37
15,0 x 10 ⁷	4,0 x 10 ⁻⁵ M	5,59 x 10 ⁻⁵	0,72
15,2 x 10 ⁷	6,0 x 10 ⁻⁵ M	5,67 x 10 ⁻⁵	1,06
15,5 x 10 ⁷	8,0 x 10 ⁻⁵ M	5,76 x 10 ⁻⁵	1,39
15,7 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁻⁴ M	5,83 x 10 ⁻⁵	1,71
15,8 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁻⁴ M	5,88 x 10 ⁻⁵	2,04
c = concentração de anfifílico livre no sobrenadante (M) (x/m) = número de moles de DODAC adsorvido por m ² de bactéria			

Tabela 3.8 - Mostra os valores para obtenção da constante de afinidade das vesículas grandes de DODAC.

Cálculo de K :

considerando a equação

$$y = A + Bx$$

$$c/(x/m) = c/(x/m)_{\text{máx}} + 1/[K (x/m)_{\text{máx}}]$$

Portanto, para $y = c/(x/m)$ e $x = c$, teremos o coeficiente angular da reta dado por:

$$B = 1/(x/m)_{\text{máx}}$$

$$(x/m)_{\text{máx}} = 1/B$$

$$(x/m)_{\text{máx}} = 6 \times 10^{-5} \text{ mol/m}^2$$

e o intercepto da reta dado por:

$$A = 1/K(x/m)_{\text{máx}}$$

$$K = 1/A(x/m)_{\text{máx}}$$

$$K = 35,71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

3.6.6.1.2. Para vesículas pequenas de DODAB

Número de moléculas de DODAB adsorvidas / bactéria	c (M)	(x/m) (m ⁻²)	c/(x/m) (Mm ⁻²)
6,00 x 10 ⁷	5,0 x 10 ⁻⁵ M	2,23 x 10 ⁻⁵	2,24
6,96 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁻⁴ M	2,59 x 10 ⁻⁵	3,86
7,62 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁻⁴ M	2,84 x 10 ⁻⁵	5,29
8,00 x 10 ⁷	2,0 x 10 ⁻⁴ M	2,98 x 10 ⁻⁵	6,71
8,28 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁻⁴ M	3,08 x 10 ⁻⁵	8,11
8,44 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁻⁴ M	3,14 x 10 ⁻⁵	9,54
c = concentração de anfílico livre no sobrenadante (M) (x/m) = número de moles de DODAB adsorvido por m ² de bactéria			

Tabela 3.9 - Mostra os valores para obtenção da constante de afinidade das vesículas pequenas de DODAB.

Cálculo de K :

considerando a equação

$$y = A + Bx$$

$$c/(x/m) = c/(x/m)_{\text{máx}} + 1/[K(x/m)_{\text{máx}}]$$

Portanto, para $y = c/(x/m)$ e $x = c$, teremos o coeficiente angular da reta dado por:

$$B = 1/(x/m)_{\text{máx}}$$

$$(x/m)_{\text{máx}} = 1/B$$

$$(x/m)_{\text{máx}} = 3,45 \times 10^{-5} \text{ mol/m}^2$$

e o intercepto da reta dado por:

$$A = 1/K(x/m)_{\text{máx}}$$

$$K = 1/A(x/m)_{\text{máx}}$$

$$K = 3,26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

Figura 3.2 - Gráfico com os valores usados para o cálculo de afinidade das vesículas de DODAC (grandes), linearizado a partir do gráfico da isoterma de adsorção (Tápias, G.N., et al., 1994).

Figura 3.3 - Gráfico com os valores usados para o cálculo de afinidade do DODAB (vesículas pequenas), linearizado a partir do gráfico da isoterma de adsorção (Tápias, G.N., et al., 1994).

3.6.7. Determinação de viabilidade celular da *E. coli* em função da concentração de vesículas grandes de DODAB, preparadas por injeção clorofórmica

Foi realizada uma curva de viabilidade celular para vesículas grandes de DODAB, preparadas por injeção clorofórmica, nas concentrações já utilizadas para as vesículas pequenas de DODAB: 0,001 mM, 0,005 mM, 0,01mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 5 mM e 10 mM. Estas concentrações foram diluídas em 1/10 quando no tubo em contato com a bactéria, tendo sido colocado 0,1 mL de DODAB e 0,9 mL de suspensão bacteriana, para cada concentração de DODAB. A suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração final no tubo de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL. O tempo de contato DODAB/*E. coli* foi de 1 h. A contagem das células viáveis foi obtida pelo método de diluição em tubos, seguida do plaqueamento.

3.7. Determinação da curva de crescimento da *E. coli*

A curva de crescimento da *E. coli* foi realizada para determinar a fase exponencial (fase log) do cultivo.

E. coli O111H⁻ foi reativada em 3 mL de caldo TSB e incubada a 37°C por 2 -5 h. Foi então semeada em ágar Müeller-Hinton. Inóculos da bactéria, equivalentes a 0,5 na escala de MacFarland, foram preparados em tubos contendo 10 mL de caldo TSB, através da leitura da turbidez em espectrofotômetro Hitachi U-2000, em comprimento de onda de 625 nm. A seguir, colocados em shaker a 37°C e 150 rpm, e deixados por tempos de 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 12 h, e 24 h. Cada inóculo foi centrifugado a 10.000 rpm (12100 g) por 15 min em centrífuga SORVALL, lavado duas vezes a 10.000 rpm e suspenso em 10 mL de D-glicose 0,264 M estéril. A turbidez das suspensões foi lida em comprimentos de onda de 400 nm, 600 nm, 625 nm e 670 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-2000. A seguir, as amostras foram diluídas pelo método de diluição em tubos e semeadas em placas com ágar Müeller-Hinton, por meio de espalhamento com alça. Após a incubação a 37°C por 24 h, realizou-se a contagem das colônias, com o uso de contador manual (modelo Phoenix 600). Os resultados das contagens foram colocados em gráfico, em função do tempo de cultivo.

3.8. Determinação das curvas de crescimento da *C. albicans*

A curva de crescimento da *C. albicans* foi realizada para obter-se o tempo necessário ao crescimento exponencial (fase log da levedura), e determinar as condições do nosso trabalho. Foram feitas duas curvas.

C. albicans ATCC 90028 foi isolada em ágar Sabouraud dextrose 4%. Inóculos da levedura, equivalentes a 0,5 na escala de MacFarland, foram preparados em tubos contendo 5 mL de caldo Sabouraud 2%, através da leitura da turbidez em espectrofotômetro Spectronic 20, em comprimento de onda de 625 nm. A seguir, colocados em shaker a 30°C e 160 rpm, e deixados por tempos de 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 15 h, 18 h, 21 h, 24 h. Após, foram centrifugados a 10.000 rpm (12100 g) por 15 min em centrífuga SORVALL, lavados duas vezes a 10.000 rpm e suspensos em 5 mL de D-glicose 0,264 M estéril. A leitura da turbidez das suspensões em comprimentos de onda de 400 nm, 600 nm, 625 nm e 670 nm, foi em espectrofotômetro Hitachi U-2000. A seguir, as amostras foram diluídas pelo método de diluição em tubos e semeadas em placas com ágar Sabouraud 2%, por meio de espalhamento com alça. Após 24 - 48 h, realizou-se a contagem das colônias, com o uso de contador manual (modelo Phoenix). As contagens foram colocadas em gráfico, em função do tempo de cultivo, para cada uma das duas suspensões.

3.8.1. Dosagem de fosfato

O cultivo da *C. albicans* também foi monitorado através de determinação de fosfato associado às células (Rouser, G., et al., 1970).

Suspensões das duas curvas de crescimento da *C. albicans* foram separadas em tubos de Eppendorf estéreis e conservadas congeladas até o uso (1 mL de cada amostra). Para a determinação de fosfato, todas as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm (23500 g), 4°C, durante 30 min. Os sedimentos foram então suspensos com 1 mL de água Milli-Q estéril, com exceção das amostras de 0 h e 3 h, que foram suspensas com 0,2 mL de água Milli-Q estéril. A determinação foi realizada para as amostras em triplicata, de acordo com os volumes descritos na tabela 3.10. Na tabela 3.11, são mostrados os valores utilizados para cada curva padrão, feita em duplicata.

Após a colocação das amostras os tubos foram deixados na estufa a, aproximadamente, 100°C para secar. Depois da secagem e esfriamento, foi adicionado 0,3 mL de ácido perclórico concentrado, em cada tubo. Os tubos contendo as amostras foram então colocados em banho seco dentro de uma capela, tampados com bolas de vidro e deixados para digestão das amostras a 180°C, até que ficassem incolores (aproximada-

Tempo de cultivo da amostra (h)	Volume usado da amostra (μL)		
0	-	25	50
3	-	25	50
6	10	25	50
9	10	20	30
12	10	20	30
15	10	20	30
18	10	20	30
21	10	20	30
24	10	20	30

Tabela 3.10 - Volumes das amostras utilizados para determinação de fosfato, correspondente aos tempos de cultivo.

Tubos	Volume (μL) de solução padrão de fosfato (1mM)
1	0
2	10
3	30
4	50
5	70
6	90
7	100

Tabela 3.11 - Volumes utilizados para preparar a curva padrão de fosfato.

mente 4 h). As amostras foram retiradas, esfriadas e adicionadas de 1 mL de água e 0,4 mL de molibdato de amônio 1,25%. Cada amostra foi agitada com o uso de agitador mecânico. Depois, adicionada de 0,4 mL de ácido ascórbico 5%, e agitada como anteriormente. A seguir, os tubos foram colocados em banho-maria fervente por 5 min, mantendo as bolas de vidro em cima dos tubos. A absorbância a 795 nm foi medida em um espectrofotômetro Hitachi U-2000, contra o ponto 0 da curva-padrão. Foram realizadas curvas-padrões para cada experimento e os valores de concentração de fosfato de cada amostra foram determinados em mM. A concentração de fosfato foi colocada em gráfico, em função do tempo de cultivo.

3.8.2. Determinação da turbidez

Medidas de turbidez foram realizadas para todas as amostras de *C. albicans* cultivadas. Os comprimentos de onda utilizados foram de 400 nm, 600 nm, 625 nm, 670 nm e 795 nm. Após o cultivo, as amostras eram centrifugadas a 10000 rpm (12100 g) e lavadas duas vezes com D-Glicose 0,264 M estéril a 8000 rpm (7710 g) e, depois, suspensas em D-Glicose 0,264 M. O branco era constituído somente de D-Glicose. A turbidez em 625 nm foi colocada em gráfico, em função do tempo de cultivo.

3.8.3. Método do plaqueamento

O método de diluição em tubos seguido de plaqueamento (semeadura em placas), foi utilizado como medida do número de células viáveis, tanto para as bactérias como para o fungo.

Diluições seriadas das amostras foram feitas em tubos com água Milli-Q estéril até a concentração aproximada de 10^3 células/mL. A seguir, 0,1 mL foi espalhado em placa com ágar Sabouraud dextrose 2%, e a placa foi deixada em estufa a 30°C por 24 - 48 h. A leitura das placas foi feita através da contagem das colônias em contador manual modelo C-600 (Phoenix/Piracicaba, São Paulo). O resultado da contagem foi multiplicado pelo fator de diluição e expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro de suspensão (UFC/mL). A contagem de viáveis foi colocada em gráfico, em função do tempo de cultivo.

3.9. Determinação do efeito de vesículas de DODAB sobre a viabilidade celular da *C. albicans*

3.9.1. Cultivo da levedura

C. albicans ATCC 90028 isolada em ágar Sabouraud dextrose 4%, foi semeada em ágar Sabouraud dextrose 2%. Partindo desta cultura de 24 h, foi preparada uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de MacFarland, em 30 mL de caldo Sabouraud 2%. A suspensão foi incubada em shaker a 30°C, 160 rpm, durante 6 h. Depois, 20 mL foram centrifugados a 10.000 rpm (12100 g), por 15 min; então, centrifugados mais duas

vezes com D-glicose 0,264 M, a 8.000 rpm (7710 g), por 10 min, para lavagem. O sedimento foi suspenso em 20 mL de solução de D-glicose 0,264 M estéril. A suspensão de *C. albicans* foi então ajustada em espectrofotômetro Hitachi U-2000, de acordo com a turbidez obtida pela curva de crescimento, para a densidade numérica desejada. Em todos os experimentos uma amostra ajustada foi plaqueada e considerada como controle.

3.9.2. Viabilidade celular em função da concentração de DODAB

Foram realizadas duas curvas de viabilidade em função da concentração de vesículas pequenas de DODAB, para duas densidades numéricas da levedura, uma com 1×10^7 UFC/mL, e outra com 1×10^6 UFC/mL. As concentrações de DODAB foram de 0,005 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM. Estas concentrações foram diluídas de 1/10 quando no tubo em contato com a levedura, tendo sido colocado 0,1 mL de DODAB e 0,9 mL da suspensão de levedura, para cada concentração de DODAB. A levedura foi cultivada como descrito no item 3.9.1. e as suspensões foram ajustadas para concentrações finais nos tubos de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL e $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. O tempo de contato DODAB / *C. albicans* em cada curva foi de 1 h. A contagem das células viáveis foi obtida pelo método de diluição em tubos, seguido do plaqueamento. As curvas de viabilidade celular foram colocadas em gráfico, em função da concentração de DODAB.

3.9.3. Viabilidade celular em função do tempo de interação vesícula / fungo

Neste experimento, foram realizadas também duas curvas de viabilidade celular, mantendo fixa a densidade numérica da *C. albicans* em 1×10^6 UFC/mL para duas concentrações de DODAB: 1 mM e 10 mM, que foram diluídas de 1/10 quando colocadas no tubo, para interação. Em cada tubo de ensaio foram colocados 0,9 mL da suspensão de levedura em D-glicose 0,264 M, ajustada para 1×10^6 UFC/mL, e 0,1 mL da dispersão de DODAB sonificado. O tempo de interação DODAB / levedura em cada tubo foi o seguinte: 0 h, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 12 h, 24 h. Em outros 5 tubos, foram colocados 0,1 mL de D-glicose 0,264 M estéril no lugar do DODAB, para interagir com 0,9 mL da levedura, nos tempos de 0 h, 30 min, 1 h, 12 h e 24 h, que serviram como os controles do experimento. As curvas de viabilidade celular com número fixo de células para duas concentrações de DODAB foram colocadas em gráfico, em função do tempo de interação.

3.9.4. Viabilidade celular em função do tamanho das vesículas

A curva de viabilidade para vesículas grandes de DODAB (injetadas) foi feita exatamente como aquela realizada para as vesículas pequenas (sonicadas), para uma comparação do efeito do tamanho das vesículas sobre a viabilidade das células.

As concentrações de DODAB foram de 0,005 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM. Estas dispersões foram diluídas de 1/10 quando no tubo em contato com a levedura, tendo sido colocado 0,1 mL de DODAB injetado e 0,9 mL da suspensão de levedura, para cada concentração de DODAB. A suspensão de levedura foi ajustada para uma densidade numérica final no tubo de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. O tempo de contato DODAB / *C. albicans* foi de 1 h. A contagem das células viáveis foi obtida pelo método de diluição em tubos, seguido do plaqueamento. Num mesmo gráfico, foram colocadas as curvas de viáveis em função da concentração de DODAB, para as vesículas grandes e pequenas.

3.9.5. Mobilidade eletroforética das células em função da concentração de DODAB, para duas densidades numéricas de células

Foram realizadas duas curvas de mobilidade eletroforética: a primeira, usando *C. albicans* com 1×10^5 UFC/mL e, a outra, com 1×10^6 UFC/mL. Vesículas pequenas de DODAB, preparadas por sonicação, nas concentrações de 0,005 mM, 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM foram colocadas para interagir com a levedura durante 1 h, seguido então da leitura da mobilidade. Para cada curva foi feito um controle da densidade numérica de células da suspensão após o ajuste da turbidez, com diluição através do método de diluição em tubos e semeadura em placa de ágar Sabouraud 2%, seguido da contagem das colônias.

As medidas de mobilidade eletroforética foram feitas conforme descrito no item 3.5.4. As curvas de mobilidade eletroforética em função da concentração das vesículas sonicadas de DODAB foram colocadas em gráfico, como também, em outro gráfico, as curvas correlacionando viabilidade celular com a mobilidade eletroforética.

3.10. Solubilização e incorporação de drogas antifúngicas nos lipossomos de DODAB

3.10.1. Espectros UV-visível da anfotericina B em DMSO:metanol ou em água

Foi preparada uma solução de anfotericina B 10 µg/mL em dimetilsulfóxido:metanol (DMSO:metanol) 1:1 (V/V) e determinado o espectro UV-visível em comprimento de onda de 250 - 450 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm, espectrofotômetro Hitachi U-2000. Este espectro foi colocado em gráfico, juntamente com o espectro da droga a 10 µg/mL, solubilizada nos lipossomos catiônicos de DODAB.

O espectro da anfotericina B em solução aquosa de 2 mM de desoxicolato de sódio (DOC) também foi determinado, em função da concentração da droga, em comprimento de onda de 240 - 600 nm, usando cubetas de quartzo de 1cm e espectrofotômetro Hitachi U-2000. A partir de uma solução estoque de 1 mg/mL de anfotericina B, 1-25 µL da solução estoque foi adicionado a 1 mL de solução aquosa 2 mM de DOC. Os espectros das várias concentrações de anfotericina B em DOC 2 mM são mostrados no capítulo 4.

3.10.2. Determinação dos espectros UV-visível da anfotericina B e miconazol incorporados nos lipossomos catiônicos

Uma solução estoque de 1mg/mL de anfotericina B em solução de DMSO:metanol (1:1, V/V) foi preparada. Foi adicionado 1-25 µL desta solução estoque a 1mL de uma dispersão de DODAB ou a 1mL de DMSO:metanol 1:1. Foram medidos espectros da anfotericina B para vesículas sonicadas (1,5 e 3,6 mM) e injetadas (0,9 e 2,0 mM) de DODAB. Como branco, para a amostra de anfotericina B com lipossomo, 1-25 µL de DMSO:metanol 1:1 puro (sem anfotericina B) foi concomitantemente adicionado a 1 mL da mesma dispersão de DODAB, na cubeta de referência. O espectro da anfotericina B em DMSO:metanol 1:1 foi obtido contra uma solução de DMSO:metanol 1:1 (branco). Para as medidas, foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm, espectrofotômetro Hitachi U-2000, e comprimento de onda de 240 – 600 nm.

Uma solução estoque de 10 mg/mL de miconazol em metanol, foi preparada. Foi adicionado 1-25 µL da solução estoque a 1 mL de uma dispersão de DODAB ou a 1 mL de metanol. Foram usadas vesículas sonicadas (1,5 e 3,6 mM) e injetadas (0,9 e 2,0 mM) de DODAB. Para a amostra de miconazol com lipossomo, como branco, 1-25 µL de metanol puro (sem miconazol) foi adicionado a 1 mL da mesma dispersão de DODAB.

O espectro do miconazol em metanol foi obtido com metanol como branco. Os espectros do miconazol foram medidos em comprimento de onda de 230 - 350 nm, usando cubetas de quartzo de 1 cm, e espectrofotômetro Hitachi U-2000.

Os valores de absorptividade molar em $M^{-1}cm^{-1}$ foram calculados do mais alto pico de absorbância de cada droga e estão apresentados em uma tabela, no capítulo 4.

3.11. Verificação das propriedades físicas das drogas antifúngicas

3.11.1. Determinação da pureza da anfotericina B e miconazol

Foram realizadas pelo laboratório da Central Analítica do IQ - USP as análises de determinação da pureza das drogas usadas, para comparação com a literatura. A tabela 3.12 mostra os resultados da análise elementar de determinação de porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio da anfotericina B. A figura 3.7 mostra a análise complementar de espectroscopia em infra-vermelho da anfotericina B. (Asher, I.M., et al., 1977).

Para o miconazol, análise elementar de determinação de porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi também realizada no laboratório da Central Analítica do IQ - USP e os resultados foram comparados com dados da literatura (Merck index, 1989), apresentados na tabela 3.13. Também foi realizada análise complementar de espectroscopia de massa para o miconazol (não apresentada aqui).

A partir dos resultados de análise elementar de C (%), H (%) e N (%) do laboratório da Central Analítica do IQ -USP constatou-se que o miconazol (pó) utilizado em nosso trabalho apresenta pureza de $95,5 \% \pm 4$, para um peso molecular = 479 g (nitrato de miconazol). Considerada somente a porcentagem de carbono, a pureza foi de 99,98%.

3.11.2. Espectros de anfotericina B em metanol

Anfotericina B (Squibb, Princeton, NJ, USA) lote 750-13A, potência 955 mcg/mg foi usada em nossos experimentos. Para verificar a pureza da droga no pó, foi determinado o espectro óptico da anfotericina B em metanol, como previamente descrito (Vandeputte, J., et al., 1956). A absorptividade para anfotericina B em metanol a 405 nm foi descrita ser $E_{1cm}^{1\%} = 1812$, ou seja, 1 g da droga solubilizada em 100 mL de metanol, em comprimento de onda de 405 nm, daria uma absorbância igual a 1812.

Foi preparada uma solução estoque de 0,1 mg/mL (10 mg em 100 mL) de

Figura 3.7 - Espectros de absorção em infravermelho da anfotericina B. Comparação dos espectros da literatura (A, B, C, e D) (Asher, I.M., 1977) com aquele obtido com a nossa amostra (E), analisada pelo laboratório de Central Analítica do IQ-USP. Onde A, é o pó triturado com bastão, manualmente; B, C, é o pó triturado com vibrador e pressionado em discos de KBr; e D, em solução saturada de DMSO.

Elemento	Referência (MERCK Index, 1989) (a)	Referência (Asher, I.M., et al., 1977) (b)	Referência (Asher, I.M., et al., 1977) (c)	Laboratório de Central Analítica do IQ - USP
Carbono	61,09 %	61,12 %	57,58 %	56,91 %
Hidrogênio	7,96 %	7,96 %	7,67 %	8,03 %
Nitrogênio	1,51 %	1,52 %	1,46 %	1,82 %
Fórmula (a) e (b) = $C_{47}H_{73}NO_{17}$ PM = 924,11 (a) e 923,62 (b)				
Fórmula (c) = $C_{46}H_{73}NO_{20}$ PM = 959,62				

Tabela 3.12 - Comparação dos resultados de análise elementar da anfotericina B com a literatura.

Elementos	Referência (MERCK Index, 1989) (a)	Referência (MERCK Index, 1989) (b)	Laboratório de Central Analítica do IQ - USP
Carbono	51,96 %	45,09 %	45,08 %
Hidrogênio	3,93 %	3,13 %	3,26 %
Nitrogênio	6,73 %	8,77 %	9,60 %
Fórmula (a) = $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$ PM = 416,12			
Fórmula (b) = $C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$ PM = 479			

Tabela 3.13 - Comparação dos resultados de análise elementar do miconazol com a literatura.

anfotericina B em metanol. Dessa solução estoque, seis outras soluções em metanol contendo 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL, 3,0 µg/mL, e 4,0 µg/mL de anfotericina B foram preparadas. Foi determinado o espectro de cada solução em comprimento de onda de 250 - 450 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-2000, usando cubetas de quartzo de 1cm. Como branco, foi utilizado metanol sem a droga.

Desses dados, a anfotericina B usada em nosso trabalho rendeu $E_{1cm}^{1\%} = 1699$, com um desvio padrão de ± 65 , equivalente a uma absorptividade molar de $156.952 \pm 6.025 M^{-1} cm^{-1}$, o que indica uma porcentagem de droga presente no pó igual a $93 \pm 4\%$. A potência nominal da droga da Squibb é 95,5%. Se comparados esses valores com os da literatura (Vandeputte, J., et al., 1956; Pandey, R.C., Rinehart Jr., K.L., 1976), onde é dado um valor de $E_{1cm}^{1\%} = 1812$ (Vandeputte, J., et al., 1956), podemos considerar que a droga no pó, utilizada em nossos experimentos, apresenta-se com pureza de 93,8 % do pó de 95,5%, e encontra-se em boas condições de uso, apesar da anfotericina B ser

susceptível à autooxidação com o manuseio (Lamy-Freund, M.T., et al., 1985) e ter sido utilizada várias vezes. Os espectros de anfotericina B em metanol e a tabela com os valores de absorptividade molar, são apresentados na figura 3.8 e tabela 3.14.

Fórmula para cálculo da absorptividade molar (ϵ):

$$\epsilon = A/(CI)$$

onde,

A = absorbância máxima obtida

C = concentração molar (M)

l = caminho óptico (cm) = 1cm

Figura 3.8 – Espectros de absorção de anfotericina B em metanol, em comprimentos de onda de 250 – 450 nm. Em ordem crescente de concentração: 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 4,0 µg/mL. A droga solubilizada foi colocada em cubeta de quartzo de 1 cm, e o registro dos espectros foi feito em espectrofotômetro Hitachi U-2000. O branco correspondeu ao metanol sem droga.

C (µg/mL)	Abs. 405 nm	C (µM)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	E _{1cm} ^{1%}
0,5	0,087	0,541	0,16072 x 10 ⁶	1740
1,0	0,180	1,083	0,16625 x 10 ⁶	1800
1,5	0,254	1,624	0,15639 x 10 ⁶	1693
2,0	0,324	2,165	0,14962 x 10 ⁶	1620
3,0	0,493	3,248	0,15178 x 10 ⁶	1643
4,0	0,630	4,331	0,14547 x 10 ⁶	1575

Tabela 3.14 - Solubilização da anfotericina B em metanol. A tabela apresenta os valores de absorptividade molar calculados a partir dos espectros de absorção de anfotericina B solubilizada em metanol, nas concentrações acima.

3.12. Viabilidade celular da *C. albicans* em presença de drogas antifúngicas lipossomais

3.12.1. Cultivo da *C. albicans*

C. albicans ATCC 90028 isolada em ágar Sabouraud dextrose 4%, foi semeada em ágar Sabouraud dextrose 2%. Partindo desta cultura de 24 h, foi preparada uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de MacFarland, em 30 mL de caldo Sabouraud 2%. A suspensão foi incubada em shaker a 30 °C, 160 rpm, durante 6 h. Depois, 20 mL foram centrifugados a 10.000 rpm (12100 g), por 15 min; então, centrifugados mais duas vezes com D-glicose 0,264 M, a 8.000 rpm (7710 g), por 10 min, para lavagem. O sedimento foi suspenso em 20 mL de solução de D-glicose 0,264 M estéril. A suspensão foi então ajustada, em comprimento de onda de 625 nm e espectrofotômetro Hitachi U-2000, de acordo com a turbidez obtida pela curva de crescimento, para a densidade numérica desejada. Em todos os experimentos deste trabalho, uma amostra ajustada foi plaqueada e considerada como controle.

3.12.2. Determinação do efeito da concentração de anfotericina B lipossomal sobre a viabilidade celular da *C. albicans*

Foram realizadas três curvas de viabilidade celular para *C. albicans* ATCC 90028, utilizando dispersões de vesículas sonicadas de DODAB, com concentrações diversas de anfotericina B.

A suspensão de *C. albicans* foi ajustada pela turbidez para uma densidade numérica final de 1×10^6 UFC/mL para todas as curvas de interação, e foi plaqueado um controle para cada experimento. A concentração do DODAB foi ajustada para um final no tubo de interação de 1mM, disperso em D-glicose 0,264 M.

Na primeira curva foram deixados interagir DODAB / anfo B com *C. albicans* por 1 h, e nas outras duas por 24 h.

A solução estoque de anfo B foi preparada como descrito a seguir. Anfo B 1mg/mL foi solubilizada em DMSO/metanol 1:1 (V/V). Desta solução estoque volumes de 1 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL e 10 µL foram colocados com seringa Hamilton em tubos de Eppendorf contendo DODAB para um volume final de 1 mL. Obtivemos assim, concentrações finais na interação com a levedura de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3µg/mL, 4 µg/mL e 5 µg/mL, e estas foram as concentrações utilizadas para a primeira curva.

Para a segunda e terceira curvas, a solução estoque de anfotericina B foi também 1 mg/mL, preparada em DMSO/metanol (1:1 V/V) e, a seguir, diluída em 1/10. Para estas curvas foram utilizados volumes das duas soluções acima para obtermos concentrações finais no tubo de interação com a levedura de 0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL e 5 µg/mL, respectivamente.

Para a interação *C. albicans* / DODAB-anfotericina B, 0,5 mL da suspensão de levedura e 0,5 mL de cada concentração de vesículas com o antifúngico foram colocados em tubos estéreis e deixados para interagir durante 1 h (curva 1) e 24 h (curva 2 e 3). Após a interação, cada amostra foi diluída pelo método de diluição em tubos e 0,1 mL foi plaqueado por espalhamento com alça de Drigalski e incubado por 24 - 48 h a 30°C. A leitura das colônias foi realizada com contador manual da Phoenix Equipamentos Científicos (Araraquara-SP/Brasil), modelo C 600. O resultado foi expresso em UFC/mL. As curvas de viabilidade celular com densidade numérica fixa de células e concentração fixa de DODAB, foram colocadas em gráfico em função da concentração de droga lipossomal.

3.12.3. Determinação do efeito da concentração de miconazol lipossomal sobre a viabilidade celular da *C. albicans*

Foram realizadas duas curvas de viabilidade celular para *C. albicans* ATCC 90028 com vesículas sonicadas de DODAB, contendo miconazol. A densidade numérica final de células para interação foi ajustada por turbidimetria para 1×10^6 UFC/mL em D-glicose 0,264 M estéril, tendo sido plaqueado um controle para cada experimento. A concentração do DODAB foi ajustada para uma concentração final no tubo de interação de 1 mM, disperso em D-glicose 0,264 M. A primeira curva foi deixada para interagir durante 1 h e a outra por 24 h.

Uma solução estoque de miconazol 10 mg/mL em metanol foi preparada. A partir dessa solução foram preparadas novas soluções estoques, também em metanol, com 2 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,002 mg/mL. Dessa forma foi possível tomar apenas 10 µL (com seringa Hamilton) de cada uma das soluções anteriores e adicioná-las a 1 mL de DODAB 2 mM. Assim, as concentrações de miconazol obtidas foram de 0,02 µg/mL, 0,2 µg/mL, 2 µg/mL, e 20 µg/mL. Para obter 200 µg/mL, 20 µL da solução estoque de 10 mg/mL foi colocado em 1 mL da dispersão de DODAB 2 mM.

Para a interação *C. albicans* / DODAB-miconazol, 0,5 mL da suspensão de levedura e 0,5 mL das dispersões de DODAB contendo o antifúngico, foram colocados em tubos estéreis e deixados para interagir durante 1 h (curva 1) e 24 h (curva 2). As concentrações finais de miconazol na interação com a levedura foram de 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL.

Após a interação, cada amostra foi diluída pelo método de diluição em tubos e 0,1 mL foi plaqueado por espalhamento com alça de Drigalski, e incubado por 24 - 48 h a 30 °C. A leitura das colônias foi realizada através de contador manual de marca Phoenix Equipamentos Científicos (Araraquara-SP/Brasil), modelo C 600. O resultado foi expresso em UFC/mL. As curvas de viabilidade celular mantendo fixa a densidade numérica do fungo e a concentração de DODAB, foram colocadas em gráfico em função da concentração de droga lipossomal.

3.12.4. Determinação do efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da *C. albicans*, para concentrações fixas de DODAB e anfotericina B

Duas curvas de viabilidade celular contra tempo de interação foram realizadas para DODAB contendo anfotericina B.

A densidade numérica final de células utilizada para os experimentos foi a mesma das anteriores, ou seja, foi ajustada pela turbidez para 1×10^6 UFC/mL. A concentração das vesículas sonicadas de DODAB foi ajustada, para um final no tubo de interação, de 1mM na primeira curva e de 0,1 mM na segunda, ambas dispersas em D-glicose 0,264 M. A solução de anfotericina B foi preparada a partir de uma solução estoque de 1 mg/mL, solubilizada em DMSO/metanol 1:1 (V/V). A seguir, foi feita a mistura com DODAB, para a concentração final de anfotericina B no tubo de interação de 2µg/mL, tanto na primeira quanto na segunda curva.

Para a interação *C. albicans* / DODAB - anfotericina B, 0,5 mL da suspensão de levedura e 0,5 mL das dispersões de vesículas com o antifúngico foram colocados em tubos estéreis e deixados para interagir nos diferentes tempos: 0h, 1h, 2h, 24h, 48h e 72h. Após a interação, cada amostra foi diluída pelo método de diluição em tubos e, 0,1 mL foi plaqueado por espalhamento com alça de Drigalski, e incubado a 30 °C por 24 - 48h. A leitura das colônias foi realizada através de contador manual de marca Phoenix Equipamentos Científicos, modelo C 600. O resultado foi expresso em UFC/mL. Controles da levedura, DODAB e antifúngico em D-glicose 0,264 M, foram usados nas duas curvas.

As curvas de viabilidade celular foram colocadas em gráfico, em função do tempo de interação.

3.12.5. Determinação do efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da *C. albicans*, para concentrações fixas de DODAB e miconazol

A curva de viabilidade da *Candida albicans* para DODAB / miconazol foi realizada da mesma forma da última curva de DODAB / anfotericina B, usando uma concentração final de vesículas sonicadas de DODAB de 0,1 mM, dispersas em D-glicose 0,264 M. A densidade numérica de células foi ajustada para 1×10^6 UFC/mL. A solução de miconazol foi preparada a partir de uma solução estoque de 10 mg/mL, solubilizada em metanol. Depois, foi preparada a mistura com o DODAB, para uma concentração final de miconazol, no tubo de interação, de 20 µg/mL.

Para a interação *C. albicans* / DODAB - miconazol, 0,5 mL da suspensão de levedura e 0,5 mL da dispersão de vesículas contendo o antifúngico, foram colocados em tubos estéreis e deixados para interagir nos diferentes tempos: 0h, 1h, 2h, 24h, 48h e 72h. Após a interação, cada amostra foi diluída pelo método de diluição em tubos e, 0,1 mL foi plaqueado por espalhamento com alça de Drigalski, e incubado a 30°C por 24 - 48h. A leitura das colônias foi realizada através de contador manual de marca Phoenix Equipamentos Científicos, modelo C 600. O resultado foi expresso em UFC/mL. Controles da levedura, DODAB e antifúngico em D-glicose 0,264 M, foram usados no experimento.

A curva de viabilidade celular foi colocada em gráfico, em função do tempo de interação.

3.13. Lista de equipamentos, reagentes e microrganismos

Equipamentos

Aagitador com controle de temperatura e rotaça3o / Tecnal modelo TE - 420
Aparelho para microeletroforese de part3culas Mark II / Rank Brothers (Cambridge, England)
Autoclave FANEM
Balança anal3tica OHAUS modelo GA 110
Banho-maria
Centr3fuga Hitachi Himac SCR 20 B com rotor SS-34
Centr3fuga SORVALL com rotor SS-34
Contador de col3nias manual de marca Phoenix Equipamentos Cient3ficos (Araraquara-SP/Brasil), modelo C 600
Deionizador Milli-Q Plus / Millipore
Espectrofluor3metro Hitachi F - 4500
Espectrofot3metro Hitachi U - 2000
Espectrofot3metro spectronic 20
Estufa FANEM
Fluxo laminar TROX
Sonicador "cell disrupter virsonic-model 150"
Test tube heater - SHT 2D / Stuart Scientific

Reagentes

3gar M3eller-Hinton / OXOID
3gar Sabouraud dextrose 2% / MERCK
3gar Sabouraud dextrose 4% / MERCK
Anfotericina B / SQUIBB
Brometo de dioctadecildimetilam3nio (DODAB) / SIGMA
Caldo Sabouraud 2% / MERCK
D-glicose / MERCK
Miconazol
Reagentes A e B do kit de viabilidade BackLight L-7007 / Molecular Probes
Tryptone Soya Broth (caldo TSB) / OXOID

Microrganismos

C. albicans ATCC 90028
E. coli O111H⁻ (Coleça3o de culturas da UNIFESP)
P. aeruginosa ATCC 27853
S. aureus ATCC 25923
S. Typhimurium ATCC 14028

4. RESULTADOS

4.1. Susceptibilidades de diferentes espécies bacterianas às vesículas catiônicas de DODAB

A viabilidade celular (%) das bactérias foi medida através do método de diluição em tubos seguida do plaqueamento, a partir de uma amostra controle (suspensão bacteriana em água estéril).

O efeito da concentração de DODAB sobre a viabilidade celular de quatro espécies bacterianas é mostrado na figura 4.1, a uma densidade numérica fixa de células viáveis de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL, e tempo de interação entre vesícula / bactéria de 1 h. Como a figura 4.1 está mostrando, as vesículas sonicadas de DODAB exerceram ação bactericida para as quatro espécies, em baixas concentrações (dezenas de μM).

Houve um decréscimo de viabilidade em função do aumento da concentração de DODAB para as quatro espécies, sendo que para a obtenção de 0% de viabilidade foram necessários: 70 μM (*E. coli*), 80 μM (*S. Typhimurium*), e 20 μM (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) de DODAB. A bactéria mais resistente às concentrações de DODAB utilizadas foi a *E. coli* (figura 4.1 (a)), que somente quando em contato com 0,05 mM de DODAB, apresentou queda da viabilidade. Como todas as condições experimentais foram as mesmas para as quatro espécies, foi possível comparar a susceptibilidade das bactérias ao DODAB, para 50% e 5% de viabilidade celular, como mostrado na tabela 4.1. A bactéria mais resistente é a *E. coli*, que requer aproximadamente 50 μM de DODAB para manter uma viabilidade de 5%. A seguir, estão a *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

O efeito do tempo de contato das vesículas pequenas de DODAB sobre a viabilidade das células bacterianas (%) foi obtido a uma concentração fixa de DODAB (5 μM) e bactérias (aproximadamente de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL). A bactéria mais resistente das quatro espécies foi a *E. coli*, seguida de *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (figura 4.2). Houve queda brusca da viabilidade logo na primeira hora de contato, tanto para o *S. aureus* quanto para a *P. aeruginosa*, mantendo-se depois praticamente constante. No caso da *S. Typhimurium*, a viabilidade caiu mais lentamente em função do tempo de contato, até atingir $68\% \pm 3,5$. Para a *E. coli*, a viabilidade chegou a $72\% \pm 0$, em 24 h de interação. A susceptibilidade do *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi de $19,3\% \pm 1,5$ e $40,0\% \pm 4,5$, respectivamente.

Figura 4.1 - Efeito da concentração de DODAB sobre a viabilidade da célula, a uma densidade numérica fixa de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ UFC/mL e tempo de interação de 1 h, para 4 bactérias. 100% de viabilidade foi obtida para a amostra controle de cada bactéria (em ausência de DODAB). Antes do plaqueamento de 0,1 mL em ágar, as misturas vesículas/bactérias foram diluídas de 1:20.000. A densidade numérica de bactérias viáveis em cada mistura foi fixada aproximadamente em $2,5 \times 10^7$ UFC/mL, para as quatro espécies bacterianas. Obteve-se para *E. coli* $2,2 \times 10^7$ UFC/mL (a), *S. Typhimurium* $2,0 \times 10^7$ UFC/mL (b), *S. aureus* $2,5 \times 10^7$ UFC/mL (c), e *P. aeruginosa* $3,0 \times 10^7$ UFC/mL (d).

Figura 4.2 - Efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular, à concentração fixa de DODAB (5 μ M) e densidade numérica de bactérias. A densidade numérica das bactérias viáveis em cada mistura foi fixada em aproximadamente $2,5 \times 10^7$ UFC/mL, sendo de $2,1 \times 10^7$ UFC/mL para *E. coli* (a), $2,8 \times 10^7$ UFC/mL para *S. Typhimurium* (b), $2,7 \times 10^7$ UFC/mL para *S. aureus* (c), e $2,8 \times 10^7$ UFC/mL para *P. aeruginosa* (d). O plaqueamento em ágar (0,1 mL) foi feito depois de diluição de 1:20.000 da mistura DODAB/bactéria. A viabilidade celular dos controles (suspensões bacterianas em ausência de DODAB) foi determinada para cada tempo de interação e considerada 100%.

Microrganismo	Concentração celular (UFC/mL)x10 ⁷	Tempo de Interação (h)	Viabilidade celular (%)	Concentração de DODAB (μM)
<i>E. coli</i>	2	1	50	28
			5	48
<i>S. Typhimurium</i>	2	1	50	10
			5	41
<i>P. aeruginosa</i>	3	1	50	5
			5	10
<i>S. aureus</i>	3	1	50	6
			5	12
<i>S. aureus</i> *	5*	2*	0*	8*
* Dados tomados da referência (Martins, L.M.S., et al., 1997).				

Tabela 4.1 - Concentração de DODAB requerida para 5% e 50 % de viabilidade celular, para 4 espécies bacterianas de importância clínica. Nas misturas vesículas/bactérias, a densidade numérica bacteriana foi fixada em aproximadamente 2,5 X 10⁷ UFC/mL, e 1 h de tempo de interação.

A susceptibilidade das bactérias deve ser maior que os valores mostrados na tabela 4.1, porque as culturas estão na fase estacionária, e DODAB interage igualmente com células viáveis e não viáveis. Isso significa que DODAB está sendo “consumido” também pelas não viáveis, de forma a ter-se uma dose aparentemente maior que aquela necessária para matar todas as células viáveis. Possivelmente, isto vale também para os resultados obtidos na figura 4.2, quando usado 5 μM de DODAB.

4.2. Efeito da carga de superfície da bactéria sobre a viabilidade celular

Na figura 4.3 está representado o efeito simultâneo da concentração de DODAB sobre a viabilidade celular e sobre a mobilidade eletroforética de *E. coli* e *S. aureus*, a uma densidade numérica de células de 2,5 x 10⁷ UFC/mL, e um tempo de interação de 1 h.

A relação da carga das células com a perda de viabilidade está na figura 4.3. Células negativamente carregadas mostraram uma sobrevivência de 100%, enquanto células positivamente carregadas não sobreviveram, para as duas espécies. Isto pode ser visto melhor no gráfico de sobrevivência das bactérias, mostrado na figura 4.4.

Na tabela 4.2 estão relacionadas concentrações de DODAB necessárias para neutralizar densidades numéricas conhecidas de *E. coli* (4×10^8 UFC/mL, 1×10^8 UFC/mL, e 2×10^7 UFC/mL) a partir de dados de mobilidade eletroforética já publicados pelo grupo (Sicchierolli, S.M., et al., 1995). Essas são as concentrações de DODAB necessárias para a obtenção de uma mobilidade eletroforética equivalente a zero, ou seja, para uma viabilidade celular de 50%. Os dados foram comparados com a viabilidade celular obtida com as três densidades numéricas fixas de *E. coli*, quando interagiram com vesículas de DODAB na concentração de $5 \mu\text{M}$ e tempo de contato de 1 h.

A tabela mostra que a concentração de DODAB requerida para a neutralização da carga de superfície de *E. coli* (quando 50% das células estão positivas e 50% estão negativas) a uma concentração de 2×10^7 UFC/mL, é de $8 \mu\text{M}$ (Sicchierolli, S.M., et al., 1995). O resultado obtido para $5 \mu\text{M}$ de DODAB foi de $64 \pm 5\%$ de viabilidade (tabela 4.2).

Figura 4.3 - Efeito simultâneo da concentração de DODAB sobre a viabilidade celular e a mobilidade eletroforética (ME) de *E. coli* ($2,2 \times 10^7$ UFC/mL) e *S. aureus* ($2,5 \times 10^7$ UFC/mL). Bactérias e vesículas foram deixadas para interagir por 1 h antes da diluição e plaqueamento, ou medidas de ME.

Figura 4.4 - Relação entre carga de superfície da célula e viabilidade celular, para bactéria Gram-positiva e Gram-negativa. Células carregadas positivamente não sobrevivem para as duas espécies: *E. coli* e *S. aureus*. A correlação foi obtida dos dados da figura 4.3.

UFC/mL	Viabilidade celular (%)	Concentração de DODAB necessária para a neutralização da carga da célula (μM) (ME=0)*
4×10^8	95 ± 8	65
1×10^8	87 ± 5	35
2×10^7	64 ± 5	8
* : Dados tomados da referência (Sicchierolli, S.M., et al., 1995).		

Tabela 4.2 - Efeito do DODAB ($5 \mu\text{M}$) sobre a viabilidade celular de *E. coli*, para três densidades numéricas diferentes de células, e um tempo de interação de 1 h.

Como se observa, a $5 \mu\text{M}$ de DODAB, células que ainda não foram neutralizadas estão vivas (quase 100%) e células que foram neutralizadas (50% positivas e 50% negativas) apresentaram viabilidade em torno de 50%.

O experimento mostrou boa relação da neutralização da carga da superfície bacteriana com a viabilidade celular, dentro dos valores esperados.

4.3. Ausência de efeito da floculação sobre a viabilidade celular

Para averiguar se estava sendo subestimada a morte das bactérias devido à floculação, foi feito um experimento para bactérias floculadas nas concentrações de 4×10^8 UFC/mL e 4×10^7 UFC/mL, acompanhado da contagem de células viáveis, pelo método do plaqueamento (tabela 4.3). Cálculos feitos a partir de dados de mobilidade eletroforética das vesículas pequenas (Sicchierolli, S.M., et al., 1995), indicaram as concentrações de DODAB necessárias para a neutralização da *E. coli*, isto é, onde metade das células encontravam-se positivas e metade negativas, e o tempo requerido para isso, denominado $t_{1/2}$. Valores da turbidez inicial (tempo zero) e final (tempo calculado) resultantes da floculação bacteriana obtidos em comprimento de onda de 400 nm, espectrofotômetro Hitachi U-2000, também estão na tabela 4.3.

A viabilidade celular foi medida pelo método de diluição em tubos seguido do plaqueamento, e contagem das colônias (tabela 4.3).

Vesículas de DODAB sonicadas, injetadas (injeção clorofórmica), e aquecidas (banho-maria a 56°C), foram colocadas para interagir com a bactéria na concentração e tempo necessários para a neutralização. Os resultados de viabilidade obtidos com as vesículas pequenas de DODAB comprovaram a relação entre a morte da célula com sua troca de carga, (em torno de 50% de viabilidade, na neutralização). As bactérias floculadas, nas duas concentrações celulares, apresentaram viabilidade próxima de 50%, conforme previsto para essa concentração de vesículas sonicadas de DODAB (Sicchierolli, S.M., et al., 1995). Com as vesículas grandes, tanto para as injetadas quanto aquecidas, houve floculação das bactérias, porém, o resultado da contagem de viáveis não correspondeu ao cálculo feito para as vesículas sonicadas de DODAB.

Concentração de <i>E. coli</i> (UFC/mL)	Concentração de DODAB (M)	Tipo de vesícula	$t_{1/2}$ (min)	Tempo de Interação t (min)	Turbidez (T) a 400 nm		Viabilidade celular (%)
					t_0	t	
4×10^7	1×10^{-5}	Sonicada	83,33	90	0,049	0,115	56
4×10^7	1×10^{-5}	Injetada	83,33	90	0,090	0,152	40
4×10^7	1×10^{-5}	Aquecida	83,33	90	0,060	0,155	90
to: tempo inicial (cerca de 10 s após a mistura vesícula/bactéria)							
Obs.: A viabilidade celular para a densidade numérica de 4×10^8 UFC/mL na interação com as vesículas sonicadas ($6,5 \times 10^{-5}$ M) foi de 51%.							

Tabela 4.3 – Viabilidade celular para bactéria floculada. A floculação da bactéria foi induzida pelas vesículas pequenas e grandes de DODAB, que foram adicionadas a uma concentração de DODAB necessária para obter uma mobilidade eletroforética igual a zero para *E. coli* (ver figura 1 da referência Sicchierolli, S.M., et al., 1995). Cinéticas de floculação foram seguidas turbidimetricamente, em tempos de interação t maiores do que o $t_{1/2}$ requerido para a floculação.

4.3.1. Cinéticas de floculação bacteriana para vesículas grandes e vesículas pequenas de DODAB, interagindo com *E. coli*

Os gráficos com as curvas das cinéticas de floculação e/ou agregação da *E. coli* estão colocados na figura 4.5. A leitura da turbidez em comprimento de onda de 400 nm foi registrada em função do tempo de contato vesícula / bactéria ($t_{1/2}$).

Na figura 4.5 (a) está representado o gráfico das vesículas pequenas de DODAB preparadas por sonicação, e na figura 4.5 (b) as curvas das vesículas grandes de DODAB preparadas por injeção clorofórmica e por aquecimento, para a concentração de 4×10^7 UFC/ mL. Os gráficos com as cinéticas de floculação para a concentração de 4×10^8 UFC/ mL não foram colocados porque não conseguimos pegar o início da floculação, e portanto, as curvas não ficaram boas, apesar de ter-se observado a floculação. Uma curva semelhante foi mostrada em trabalho anterior do grupo, onde uma densidade numérica de *E. coli* de $2,1 \times 10^8$ células/mL interagindo com DODAB 5×10^{-5} M flocula rapidamente até 3,33 min (Sicchierolli, S.M., et al., 1995).

Figura 4.5 a – Cinética de floculação bacteriana para vesículas pequenas de DODAB. Foram colocados para interagir 0,1 mL de DODAB 1×10^{-5} M em cubeta contendo 0,9 mL de suspensão de *E. coli* 4×10^7 UFC/mL, à temperatura ambiente, com tempo de interação ($t_{1/2}$) de 90 min. O gráfico apresenta a leitura da turbidez a 400 nm, em função do tempo de contato (em minutos).

Figura 4.5 b – Cinéticas de flocculação bacteriana para vesículas grandes de DODAB. Os gráficos mostram a interação das vesículas injetadas (O) e aquecidas (●) em concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, com *E. coli* $4 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$. 0,1 mL de DODAB foi colocado em cubeta contendo 0,9 mL da suspensão bacteriana e foram feitas as leituras de turbidez da amostra em 400 nm, para um tempo de contato de 90 min (t_{90}).

As concentrações das vesículas de DODAB utilizadas neste experimento de flocculação foram de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $6,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, necessárias para neutralizar as suspensões de *E. coli* de $4 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$ e $4 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ (Sichierolli, S.M., et al., 1995).

Todas as curvas mostraram flocculação, com um aumento da turbidez logo após a colocação das vesículas na cubeta, no contato com a bactéria. Os gráficos indicam que o DODAB está aderindo à superfície bacteriana.

4.4. Efeito do tamanho das vesículas sobre a viabilidade celular de *E. coli*

A figura 4.6 mostra a curva de viabilidade celular da *E. coli* (3×10^7 UFC/mL) em função da concentração de DODAB, tanto para as vesículas grandes (injetadas), quanto para as vesículas pequenas (sonicadas). A comparação é possível, porque as mesmas condições experimentais foram utilizadas.

A figura 4.6 mostra que as vesículas grandes são mais efetivas como bactericidas do que as vesículas pequenas, para concentrações baixas de DODAB (10^{-7} M a 10^{-5} M). Para as vesículas grandes foram necessários $20 \mu\text{M}$ e, para as pequenas, $70 \mu\text{M}$, para alcançar 0% de viabilidade, em 1 h de interação.

Figura 4.6 - Efeito do tamanho das vesículas sobre a viabilidade. Viabilidade celular (%) de *E. coli* 3×10^7 UFC/mL como uma função da concentração (M) de pequenas (■) ou grandes (O) vesículas de DODAB, preparadas por sonicação ou injeção clorofórmica, respectivamente. Vesículas grandes têm uma maior constante de afinidade para a superfície bacteriana ($K = 35,71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), consistentemente com uma maior eficiência como bactericida, em comparação às vesículas pequenas ($K = 3,26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).

Das isotermas de adsorção para vesículas pequenas de DODAB ou grandes de DODAC sobre a *E. coli*, obtidas em trabalho do grupo (Tápias, G.N., et al., 1994) e assumindo o modelo de adsorção de Langmuir (Hiemenz, P.C., 1986) foi possível calcular as constantes de afinidade para os dois tipos de vesículas. A afinidade das vesículas pequenas é menor do que a afinidade das vesículas grandes (item 3.6.6. de Material e Métodos). Portanto, o efeito bactericida das vesículas grandes deve ser mais pronunciado do que o efeito das vesículas pequenas. O experimento mostrado na figura 4.6 está de acordo com estes dados.

4.5. Verificação da fase de crescimento da *E. coli*

Após os dados obtidos com o kit de viabilidade BacLight L-7007, entendemos que fazia-se necessário o experimento realizado aqui. Neste experimento, utilizamos o cultivo da bactéria de acordo com a padronização, mas variando o tempo de cultivo total da suspensão, para mostrar que a cultura de fato estava na fase estacionária, no tempo total de cultivo utilizado.

A tabela 4.4 mostra os resultados obtidos, segundo o ajuste da turbidez para os valores de 0,03 de absorbância, para comparação com o kit (1×10^8 UFC/mL, segundo o protocolo da Molecular Probes), e 0,126 de absorbância, que de acordo com a nossa padronização tem uma densidade numérica bacteriana de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL.

Os resultados deste experimento confirmaram os valores da tabela 3.2 de padronização (Material e Métodos, 3.2.2.), relacionando turbidez com o número de células, ou seja, estávamos trabalhando com o número desejado de viáveis. No entanto, como podemos ver, o tempo de cultivo para obter este número de células viáveis já era suficiente em 3,5 h de incubação. Isto quer dizer que a cultura já atingiu a fase estacionária em 3,5 h, ou seja, não se estava mais na fase de crescimento exponencial, havendo, portanto, células mortas na cultura.

Tempo total de cultivo da <i>E. coli</i> (h)	Ajuste da absorbância a 670 nm	Densidade numérica estimada (em UFC/mL)	Densidade numérica obtida por plaqueamento (em UFC/mL)
3,5	0,030	$0,6 \times 10^7$	$0,5 \times 10^7$
3,5	0,126	$2,5 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
4	0,030	$0,6 \times 10^7$	$0,7 \times 10^7$
4	0,126	$2,5 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$
5	0,030	$0,6 \times 10^7$	$0,6 \times 10^7$
5	0,126	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$

Tabela 4.4 – Verificação da fase de crescimento da *E. coli*. A tabela mostra a densidade numérica de células viáveis estimada e a obtida pela padronização (item 3.2.2) para tempos de cultivo de 3,5 h, 4 h, e 5 h. O ajuste da densidade numérica das suspensões foi feito para valores de absorbância indicados no kit de viabilidade BackLight L-7007 (Molecular Probes).

4.6. Curva de crescimento da *E. coli*

A curva de crescimento da *E. coli* foi realizada para mostrar o tempo de cultivo necessário para a obtenção de células viáveis (fase log). Como a maior parte dos experimentos com as bactérias foi realizada com *E. coli*, entendemos que seria adequado fechar o estudo das bactérias mostrando a curva de crescimento dessa espécie.

Na figura 4.7 (página 97) apresentamos a curva de crescimento da *E. coli* em função do tempo de cultivo e, na figura 4.8 (página 97) a curva da turbidez em relação ao tempo de cultivo. O tempo ideal para o cultivo da *E. coli* nas condições padronizadas (item 3.2.2. do capítulo Material e Métodos) é de 2-3 h, com as células viáveis em crescimento exponencial.

4.7. Curvas de crescimento da *C. albicans*

Para estabelecermos as condições de trabalho com a levedura na fase log e obtermos células viáveis, fizemos duas curvas de crescimento, as figuras 4.9 (página 98) e 4.10 (página 99). A fase log correspondeu a uma faixa entre 3 e 9 h de cultivo, nas condições padronizadas para esta cepa (*C. albicans* ATCC 90028) descritas no item 3.8 de Material e Métodos.

O gráfico da turbidez contra o tempo de cultivo da levedura (correspondente à curva de crescimento nº 2) é mostrado na figura 4.11 (página 99). Houve um aumento muito rápido da turbidez na fase log, acompanhando a curva de crescimento.

Os gráficos mostram que a fase estacionária é atingida a partir de 9 h de cultivo. Portanto, de acordo com os resultados dos gráficos, estabelecemos o cultivo da levedura em 6 h, para todos os nossos experimentos de viabilidade celular e mobilidade eletroforética com *C. albicans*.

Figura 4.7 – Curva de crescimento da *E. coli*. O log da densidade numérica de células viáveis está em função do tempo de cultivo (h). Foi preparada uma suspensão de células considerada como inóculo, equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. A seguir, amostras foram coletadas em diversos tempos de cultivo e, depois da lavagem, centrifugação, diluição seriada e plaqueamento em ágar Müeller-Hinton, foi realizada a contagem das colônias.

Figura 4.8 – Curva de turbidez correspondente à curva de crescimento da *E. coli*. A leitura da turbidez das amostras está representada em função do tempo de cultivo (h). Após o cultivo em caldo TSB, as amostras foram lavadas e suspendidas em D-glicose 0,264 M. Foram então realizadas as leituras em 625 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-2000.

Figura 4.9 – Curva de crescimento nº 1 da *C. albicans* ATCC 90028. Após o preparo do inóculo, contendo uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de MacFarland, a levedura foi cultivada em shaker a 150 rpm, temperatura entre 30°C – 35°C. Depois de lavada e suspendida em D-glicose 0,264 M, sofreu diluição seriada e plaqueamento em ágar Sabouraud dextrose. A contagem de colônias foi realizada após 24 – 48 h (30°C – 35°C). O gráfico mostra o log da densidade numérica de células em função do tempo de cultivo (h). Os pontos em preto foram obtidos no experimento, e o traçado em vermelho corresponde a curva real de crescimento do microrganismo.

4.8. Crescimento da *C. albicans* por três métodos diferentes

O objetivo deste experimento foi determinar a concentração de fosfato das amostras guardadas (congeladas) das curvas de crescimento de *C. albicans*, para verificar se era possível determinar a fase exponencial do fungo e relacionar com as células viáveis, determinada pelo método de diluição em tubos seguida de plaqueamento. A dosagem de fosfato foi realizada para todas as amostras das duas curvas de crescimento da *C. albicans*.

A figura 4.12 (página 100) apresenta 6 gráficos obtidos a partir das duas curvas de crescimento da *C. albicans*, relacionando: número de células determinada pelo método de plaqueamento (UFC/mL), concentração de fosfato (mM) e leitura de turbidez (400 nm), contra o tempo de cultivo da levedura (h). Este experimento foi utilizado para verificarmos se havia uma boa correlação entre a turbidez, contagem de viáveis por plaqueamento e dosagem de fosfato, para a localização da fase de crescimento exponencial e obtenção de células fúngicas viáveis. Pode-se dizer que tanto as dosagens de fosfato quanto as determinações de turbidez, acompanham as contagens de células viáveis obtidas pelo plaqueamento.

Figura 4.10 – Curva de crescimento nº 2 da *C. albicans* ATCC 90028. Após o preparo do inóculo, contendo uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de MacFarland, a levedura foi cultivada em shaker a 150 rpm, temperatura entre 30°C – 35°C. Depois de lavada e suspensa em D-glicose 0,264 M, sofreu diluição seriada e plaqueamento em ágar Sabouraud dextrose. A contagem de colônias foi realizada após 24 – 48 h (30°C – 35°C). O gráfico mostra o log da densidade numérica de células em função do tempo de cultivo (h). Os círculos vermelhos correspondem aos resultados do experimento, e o traçado em preto corresponde a curva real de crescimento de microrganismos.

Figura 4.11 – Turbidez relacionada com a densidade numérica de células, em função do tempo de cultivo (h). A leitura de turbidez foi realizada após o cultivo da levedura em caldo Sabouraud, lavagem e suspensão em D-glicose 0,264 M, em comprimento de onda de 625 nm, espectrofotômetro Hitachi U-2000. A curva corresponde ao segundo cultivo da *C. albicans* ATCC 90028.

Figura 4.12 – Curvas de 3 métodos diferentes para obtenção de células viáveis de *C. albicans*: log da densidade numérica (UFC/mL), concentração de fosfato (P, em mM) e leitura da turbidez (400 nm), em função do tempo de cultivo (h). O crescimento da cultura pode ser visto através de 3 métodos, para dois cultivos independentes (nº 1 e 2). Inóculo equivalente a 0,5 da escala de MacFarland foi cultivado em caldo Sabouraud, lavado e suspenso em D-glicose antes das determinações. Os traçados das curvas baseiam-se em curvas de crescimento de microrganismos.

4.9. Susceptibilidade da *C. albicans* às vesículas de DODAB

4.9.1. Efeito da concentração de DODAB sobre a viabilidade de *C. albicans*, a duas densidades numéricas de células e 1h de interação

O gráfico da figura 4.13 apresenta duas curvas de viabilidade celular em função da concentração de DODAB, fixo o tempo de contato em 1 h e a densidade numérica da levedura em $1,2 \times 10^7$ UFC/mL e $1,7 \times 10^6$ UFC/mL. Dos valores obtidos das curvas de viabilidade, a concentração de DODAB necessária para a obtenção de 50% de viabilidade é de 2×10^{-4} M para o número de células de 1×10^7 UFC/mL, e de 1×10^{-5} M para uma densidade numérica em torno de 2×10^6 UFC/mL.

C. albicans apresentou-se mais resistente ao DODAB do que as quatro espécies bacterianas estudadas, porque nas maiores concentrações de DODAB, o menor percentual de viabilidade atingido para a levedura foi de 10% a 15%, enquanto para as bactérias a viabilidade chegou a 0%. Para $1,7 \times 10^6$ UFC/mL, a viabilidade é de 10% - 18%, e para uma concentração aproximadamente 10 vezes mais alta, $1,2 \times 10^7$ UFC/mL, foi obtida uma viabilidade em torno de 50%.

4.9.2. Efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da *C. albicans* a 1×10^6 UFC/mL, e duas concentrações de DODAB

As curvas de viabilidade celular da *C. albicans*, mantendo fixa a densidade numérica de 1×10^6 UFC/mL para duas concentrações de DODAB (0,1 mM e 1,0 mM), variando o tempo de interação, estão na figura 4.14. Consistentemente, para a maior concentração de DODAB (1,0 mM) houve a menor viabilidade celular, em comparação com a curva obtida para 0,1 mM de DODAB. A figura 4.14 mostra que na primeira hora de interação há uma queda brusca da viabilidade, que depois permanece constante, em torno de 10% e 18% de viabilidade para 1,0 mM e 0,1 mM de DODAB, respectivamente.

Os resultados das figuras 4.13 e 4.14 mostram que DODAB não pode ser considerado como fungicida nestas concentrações. O fungo é mais resistente à ação antimicrobiana de DODAB do que as bactérias. DODAB de fato mostra uma toxicidade diferencial, variando também com relação a células de mamíferos, importante propriedade para usos terapêuticos (Carmona-Ribeiro, A.M., et al., 1997).

Para avaliar um possível efeito osmótico levando à lise e à perda de viabilidade celular, testamos a viabilidade da *C. albicans* ao longo do tempo, tanto em água quanto em D-glicose 0,264 M (comparação na figura 4.14). D-glicose 0,264 M é uma solução

Figura 4.13 - Efeito da concentração das vesículas pequenas de DODAB (M) sobre a viabilidade celular (%) de *C. albicans*, para duas densidades numéricas de células, em 1 h de interação entre DODAB e o fungo. Para os controles contendo o fungo somente (em ausência de DODAB), 100 % de viabilidade foi obtida.

Figura 4.14 - Efeito do tempo de interação sobre a viabilidade da *C. albicans*. Viabilidade celular (%) como uma função do tempo de interação (h) entre o fungo e vesículas pequenas de DODAB, para duas concentrações de DODAB. A densidade numérica de células viáveis é de $1,3 \times 10^6$ UFC/mL. 0,9 mL da suspensão do fungo foi usada na interação com 0,1 mL da dispersão de DODAB. Antes de plaquear 0,1 mL no ágar Sabouraud dextrose 2%, as misturas foram diluídas de 1:1.000.

isotônica em relação ao meio intracelular. Crescimento do fungo foi observado apenas em D-glicose, mas a viabilidade em água manteve-se durante 12 h em torno de 100% (figura 4.14). De qualquer forma, os cálculos de viabilidade foram feitos com relação aos respectivos controles para cada tempo de interação, em água ou em D-glicose 0,264 M.

4.9.3. Efeito do tamanho das vesículas de DODAB sobre a viabilidade celular da *C. albicans*

O gráfico da figura 4.15 mostra curvas de viabilidade celular em função da concentração de DODAB, para vesículas pequenas (sonicadas) e grandes (injetadas). A concentração de vesículas injetadas de DODAB necessária para uma viabilidade celular de 50% é de aproximadamente 6×10^{-6} M, menor do que aquela das vesículas sonicadas ($1,2 \times 10^{-5}$ M), mostrando que de fato as vesículas grandes poderiam ter uma afinidade maior do que as pequenas, para o fungo em estudo. Esse efeito de maior afinidade das vesículas grandes para baixas concentrações de DODAB, também foi obtido para bactérias.

Tanto as vesículas grandes quanto as pequenas não chegam a apresentar ação fungicida total, pois a menor viabilidade atingida em ambos os casos é em torno de 10% a 15%, para a maior concentração de DODAB utilizada nos experimentos (1mM).

Figura 4.15 – Efeito do tamanho das vesículas sobre a viabilidade de *C. albicans* a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL e 1 h de tempo de interação. Vesículas grandes apresentam um efeito antimicrobiano mais pronunciado com concentrações menores de DODAB (1 -10 μ M).

4.10. Efeito dos lipossomos de DODAB sobre a carga da superfície celular e sobre a viabilidade das células da *C. albicans*

Com a finalidade de estabelecer a relação entre carga da célula e viabilidade celular em presença de DODAB, foram obtidas curvas de mobilidade eletroforética e de viabilidade celular em função da concentração de DODAB, para as mesmas misturas de interação.

A figura 4.16 mostra o efeito do DODAB sobre a ME das células, para duas densidades numéricas celulares diferentes. Observa-se que para a menor densidade numérica, a neutralização da carga de superfície da célula ocorre com uma concentração mais baixa de DODAB, como seria de esperar.

A figura 4.17 mostra a relação entre a perda de viabilidade celular e a carga positiva da célula. A ME para a concentração de 1×10^6 UFC/mL é zero a aproximadamente $10 \mu\text{M}$ de DODAB, concentração onde 50% das células estão positivamente carregadas e mortas e 50% estão negativamente carregadas e vivas (fig. 4.17).

Figura 4.16 - Curvas de mobilidade eletroforética em função da concentração de DODAB, para duas densidades numéricas de células: 1×10^5 UFC/mL (O) e 1×10^6 UFC/mL (□). As vesículas interagiram por 1 h com as suspensões, antes das medidas de ME, realizadas em aparelho de microeletroforese de partículas Mark II/Rank Brothers, com cela chata, à temperatura média de 25°C . Foi registrado o tempo que uma levedura leva para atravessar um campo de distância conhecida, nos dois sentidos, com leitura de um mínimo de 10 leveduras por amostra.

Figura 4.17 - Efeito da concentração de DODAB (M) sobre a mobilidade eletroforética (ME) e viabilidade celular (%) da *C. albicans* 1×10^6 UFC/mL. O fungo e as vesículas foram deixados para interagir por 1 h, antes da diluição e plaqueamento, ou medidas de ME. Quando as células estão carregadas positivamente, a viabilidade celular diminui em torno de 10% - 20%, e quando as células estão negativamente carregadas, a viabilidade celular fica em torno de 100%.

4.11. Solubilização e incorporação de duas drogas antifúngicas nos lipossomos de DODAB

A figura 4.18 (a) mostra o espectro da anfotericina B 10 $\mu\text{g/mL}$, solubilizada em DMSO:metanol 1:1 ou em vesículas pequenas de DODAB 1,5 mM. Os espectros da anfotericina B nas vesículas pequenas de DODAB são muito semelhantes aqueles obtidos na mistura com solvente.

Figura 4.18 (a) - Absorvância como uma função do comprimento de onda para anfotericina B (AB) 10 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO:metanol 1:1 e em vesículas pequenas de DODAB 1,5 mM.

A figura 4.18 (b) mostra o espectro da anfotericina B em solução de 2 mM de desoxicolato de sódio. A mudança espectral é evidente. O espectro da figura 4.18 (a) (DMSO:metanol ou DODAB como solvente) indica maior presença de forma monomérica da droga, comparado com aquele da figura 4.18 (b) (desoxicolato). O desoxicolato não é um bom solubilizante para a anfotericina B, e mostra linearidade entre a absorvância e concentração de anfotericina B a uma faixa de concentração de droga muito baixa (0 - 2 $\mu\text{g/mL}$). Isto contrasta com o resultado da anfotericina B nas vesículas pequenas de DODAB, mostrado na figura 4.18 (c). Não somente os espectros são característicos da solubilização da anfotericina B nos seus melhores solventes orgânicos, como também obedece a lei de Lambert-Beer na faixa de 0 - 1,0 de absorvância (ver inserção na figura 4.18 (c)).

Vesículas grandes de DODAB foram também testadas como solubilizantes para anfotericina B. Na figura 4.18 (d), o espectro da droga nas vesículas grandes de DODAB (0,9 mM) também apresenta certa semelhança com o obtido com a anfotericina B nas vesículas pequenas (figura 4.18 (c)), porém, os picos máximos nos menores comprimentos

Figura 4.18 (b) - Absorbância como uma função do comprimento de onda. Espectro para anfotericina B em desoxicolato de sódio (DOC). A 408,5 nm, a dependência da absorbância (A) sobre a concentração de anfotericina B (C), está inserida no gráfico.

Figura 4.18 (c) - Absorbância como uma função do comprimento de onda. Espectros para AB em vesículas pequenas de DODAB 1,5 mM. A 412 nm, a dependência da absorbância (A) sobre a concentração de AB (C) é mostrada num inserto.

de onda, indicativos da formação de agregados de anfotericina B, estão mais pronunciados. Também, o pico de absorbância a 414,5 nm, característico do monômero de anfotericina B, está substancialmente mais baixo em relação a outros picos no mesmo espectro (figura 4.18 (d)). A solubilização da anfotericina B nas vesículas grandes não foi tão efetiva quanto a solubilização nas vesículas pequenas, embora tenha se mostrado mais eficiente do que no desoxicolato de sódio (figura 4.18 (b)). Isto pode ser visto melhor através dos valores de absorptividade molar calculados para anfotericina B em DMSO:metanol, vesículas pequenas de DODAB, e vesículas grandes de DODAB, colocados na tabela 4.7.

Figura 4.18 (d) - Absorbância como uma função do comprimento de onda. Espectros para AB em vesículas grandes de DODAB 0,9 mM. A 414,5 nm, a dependência da absorbância (A) sobre a concentração de AB (C) é mostrada num inserto.

Figura 4.18 (e) – Absorbância como uma função do comprimento de onda. Espectros de AB uma semana após a solubilização de AB em 2 mM de DOC ou 2 mM de vesículas pequenas de DODAB. A concentração final de AB em cada mistura é de 0,2 mM.

A figura 4.18 (e) mostra os espectros da anfotericina B em DODAB e DOC após uma semana da solubilização, mostrando a degradação da droga.

A tabela 4.5 mostra como a solubilização de anfotericina B no DODAB afeta os comprimentos de onda, para o máximo de absorbância de anfotericina B. Comprimentos de onda máximos para máxima absorbância de anfotericina B nas vesículas de DODAB, fornecem valores maiores que aqueles obtidos na mistura de solventes ou em desoxicolato de sódio 2,0 mM.

Figura 4.19 – Absorbância como uma função do comprimento de onda. Os espectros do miconazol em metanol (a), nas vesículas pequenas de DODAB (b), e nas vesículas grandes (c) estão expressas em função da concentração da droga ou de DODAB.

Meio de solubilização	Comprimentos de onda correspondentes a máximos de absorbância (nm)			
	λ_1	λ_2	λ_3	λ_4
DMSO:CH ₃ OH (1:1)	406,0	382,0	363,0	345,0
DOC 2,0 mM	408,5	385,0	365,5	346,0
DODAB SUV 1,5 mM	412,0	388,0	368,5	350,0
DODAB SUV 3,6 mM	412,5	388,5	369,0	350,0
DODAB LUV 0,9 mM	414,5	389,0	369,5	350,0
DODAB LUV 2,0 mM	413,5	388,6	369,0	350,0

Tabela 4.5 - Comprimentos de onda de absorção máxima da anfotericina B (AB) em diferentes meios de solubilização, incluindo vesículas unilamelares pequenas de DODAB (SUV) ou vesículas unilamelares grandes (LUV).

Meio de solubilização	Comprimentos de onda correspondentes a máximos de absorbância (nm)		
	λ_1	λ_2	λ_3
CH ₃ OH	406,0	382,0	363,0
DODAB SUV 1,5 mM	412,0	388,0	368,5
DODAB SUV 3,6 mM	412,5	388,5	369,0
DODAB LUV 0,9 mM	414,5	389,0	369,5
DODAB LUV 2,0 mM	413,5	388,6	369,0

Tabela 4.6 - Comprimentos de onda de absorção máxima para o miconazol (M) em diferentes meios de solubilização, incluindo DODAB SUV ou LUV.

A figura 4.19 e tabela 4.6 apresentam os dados de solubilização do miconazol. Os espectros do miconazol em metanol (figura 4.19 (a)), nas vesículas pequenas de DODAB (figura 4.19 (b)), e nas vesículas grandes (figura 4.19 (c)) estão expressas em função da concentração da droga ou de DODAB. Valores de absorptividade molar calculados dos espectros estão na tabela 4.7.

A solubilização do miconazol nas vesículas pequenas ($\epsilon = 533$ ou $718 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) é semelhante a sua solubilização em metanol ($\epsilon = 716 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que é o melhor solvente para esta droga (tabela 4.7).

Droga	Meio de solubilização	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Anfotericina B	DMSO:CH ₃ OH	406,0	164.300
	DODAB SUV 1,5 mM	412,0	160.406
	DODAB SUV 3,6 mM	412,5	172.278
	DODAB LUV 0,9 mM	414,5	69.515
Miconazol	CH ₃ OH	272,0	716
	DODAB SUV 1,5 mM	272,0	533
	DODAB SUV 3,6 mM	272,0	718
	DODAB LUV 0,9 mM	271,2	840
	DODAB LUV 2,0 mM	271,0	435
	DODAB LUV 4,0 mM	269,4	595

Tabela 4.7 - Solubilização de AB e M em DODAB SUV e LUV, em comparação a solubilização das drogas em solventes orgânicos usuais. Absorptividades molares (ϵ) para ambas as drogas a comprimentos de onda de absorção máxima (λ), são dados para diferentes meios de solubilização.

4.12. Curvas de viabilidade celular da *C. albicans* para formulações lipossomais de drogas antifúngicas

4.12.1. Efeito da anfotericina B lipossomal sobre a viabilidade celular da *C. albicans*

Na figura 4.20 está a curva de viabilidade celular para concentrações finais de anfotericina B solubilizadas nas vesículas pequenas de DODAB de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL e 5 µg/mL, para um tempo de interação de 1 h; e concentrações de 0,1 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL e 5 µg/mL, para um tempo de interação de 24 h, usando concentração fixa de 1 mM de DODAB e uma densidade numérica fixa de células de 1×10^6 UFC/mL.

As curvas mostram que, com o aumento do tempo de interação para 24 h, concentrações menores de anfotericina B exercem maior efeito antifúngico nas células de *C. albicans*. Quando usamos concentração de 0,1 µg/mL obtivemos uma viabilidade em torno de 20% (24 h de interação), e com a concentração de 0,5 µg/mL de 9% para tempo de interação de 24 h, e de 29% de células viáveis em 1 h de contato. A partir de 4 µg/mL, os resultados de morte para a levedura foram os mesmos nos dois tempos de contato.

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) da anfotericina B e do miconazol para *C. albicans* são de 1,9 e 0,016 – 100 µg/mL (Asher, I.M., et al., 1977) respectivamente, para a interação de 48 h droga / fungo, em meio enriquecido. Os valores de MIC foram usados para definir a faixa de concentração da droga a ser testada na verificação do sinergismo DODAB / droga, para *C. albicans* em D-glicose 0,264 M.

A viabilidade celular é consideravelmente afetada pelos lipossomos catiônicos de DODAB contendo anfotericina B (figura 4.20). A viabilidade celular caiu a 0% tanto para 3 - 4 µg/mL de anfotericina B lipossomal em 24 h de interação, quanto para 5 µg/mL de anfotericina B lipossomal em 1 h de tempo de interação.

Com o controle do DODAB (1mM) obtivemos 35% de viabilidade para o tempo de 1 h, e 17%, para 24 h de contato com o fungo.

4.12.2. Efeito do miconazol lipossomal sobre a viabilidade celular da *C. albicans*

Duas curvas de viabilidade celular foram feitas com o miconazol solubilizado nas vesículas pequenas de DODAB, e estão representadas na figura 4.21. A primeira curva foi com um tempo de interação de 1 h, usando concentrações finais de miconazol

Figura 4.20 - Efeito da concentração de anfotericina B lipossomal sobre as células da *C. albicans*. Viabilidade celular (%) como função da concentração de anfotericina B lipossomal ($\mu\text{g/mL}$) a 1 h de tempo de interação ($\square$) e $1,1 \times 10^6$ UFC/mL, ou 24 h de tempo de interação ($\bullet$) e $2,9 \times 10^6$ UFC/mL. A droga foi previamente incorporada nas vesículas pequenas de DODAB (concentração final de DODAB igual a 1 mM). O controle contendo vesículas de DODAB (sem droga) é mostrado nas interações de 1 h e 24 h (linhas pontilhadas).

Figura 4.21 - Efeito da concentração de miconazol lipossomal sobre as células de *C. albicans*. Viabilidade celular (%) como função da concentração de miconazol lipossomal ($\mu\text{g/mL}$) a 1 h de interação e $1,5 \times 10^6$ UFC/mL ou 24 h de tempo de interação e $3,5 \times 10^6$ UFC/mL. A droga foi incorporada em vesículas pequenas de DODAB (concentração final de DODAB igual a 1 mM). O controle contendo vesículas de DODAB somente (sem droga), também é mostrado para 1 h e 24 h de interação (linhas pontilhadas).

de 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL, e a segunda para um tempo de contato de 24 h, em concentrações finais de miconazol de interação de 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. A concentração de DODAB foi fixada em 1 mM e a concentração celular foi de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL.

Como no caso da anfotericina B, observa-se que em concentrações iguais de miconazol, a ação antifúngica é maior para tempo de interação maior, e para concentrações baixas da droga, de 0,01 µg/mL a 10 µg/mL, respectivamente.

Para o miconazol, 0% de viabilidade foi obtido a 100 µg/mL de miconazol lipossomal e 1 h de tempo de interação (figura 4.21). Esta dose em ausência de DODAB é esperada ser somente fungistática e não fungicida. Há portanto, uma ação sinérgica entre os lipossomos catiônicos e o miconazol, evidente pelo menor tempo de interação (1 h), usado no experimento (figura 4.21). DODAB sozinho (em ausência da droga) resultou em 28% (1 h) ou 18% (24 h) de sobrevivência da *C. albicans*.

4.12.3. Efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da *C. albicans*, para concentrações fixas de DODAB e anfotericina B

Na figura 4.22 são apresentadas as curvas de viabilidade celular em função do tempo de interação, quando usadas concentrações fixas de DODAB (0,1 mM e 1 mM), para concentrações fixas de fungo e de droga. Os tempos de contato estabelecidos nas duas curvas foram de 0 h, 1 h, 2 h, 24 h, 48 h, e 72 h.

A viabilidade celular é consideravelmente afetada pelos lipossomos de DODAB contendo anfotericina B, mas a droga sozinha ainda é mais efetiva como fungicida do que a preparação lipossomal (figura 4.22). Na figura 4.22 (B), DODAB 1,1 mM foi testado na presença e na ausência de 2 µg/mL de anfotericina B. A droga diluída na fase lipossomal levou a um mínimo de 16% de viabilidade, a mesma porcentagem obtida para 1,1 mM de DODAB, sem a droga. A fase lipossomal parece competir com a membrana da célula fúngica para a solubilização da droga. Portanto, uma redução de 10 vezes na concentração de DODAB deve melhorar a entrega da droga para a membrana. De fato, na figura 4.22 (A), a 0,11 mM de DODAB, a menor concentração de DODAB causou um aumento na concentração da droga na fase lipossomal e um concomitante aumento na entrega da droga para as membranas da célula, e 0% de viabilidade foi alcançada com a formulação lipossomal.

Como controle, a viabilidade da *C. albicans* na presença da droga sozinha (solubilizada na mistura de solvente orgânico) foi determinada, resultando em 0% de viabilidade (figura 4.22). A droga no seu melhor solvente é mais efetiva para matar o fungo "in vitro", mas a toxicidade do solvente limita o seu uso clínico.

Figura 4.22 - Efeito do tempo de interação da anfotericina B lipossomal sobre a viabilidade de *C. albicans*. Viabilidade celular (%) como uma função do tempo de interação entre o fungo e a anfotericina B lipossomal (AB) para duas diferentes concentrações de DODAB: 0,11 mM (A) e 1,1 mM (B). A concentração de células viáveis é de aproximadamente $1,3 \times 10^6$ UFC/mL, em ambos os casos. Foram feitos também controles para avaliar o efeito sobre a viabilidade celular, da droga sozinha ou DODAB sozinha.

4.12.4. Efeito do tempo de interação sobre a viabilidade celular da *C. albicans*, para concentrações fixas de DODAB e miconazol

Na figura 4.23 é apresentada a curva de viabilidade celular da *C. albicans* em função do tempo de interação, para a concentração fixa de 0,1 mM de DODAB, densidade numérica decélulas de 1×10^6 UFC/mL, e miconazol incorporado no DODAB na concentração final de 20 μ g/mL.

Miconazol não é tão potente quanto a anfotericina B, e sua ação inibitória para *C. albicans* ocorre para uma concentração de droga aproximadamente 10 vezes maior. Na figura 4.23 é mostrado que o miconazol carregado pelos lipossomos de DODAB torna-se efetivo como fungicida a 20 μ g/mL, uma concentração considerada normalmente como fungistática (Asher, I.M., et al., 1977).

Como mostrado no gráfico, um valor de 56 % de células viáveis foi obtido no início da interação (0 h), chegando em 0% de células viáveis no final das 72 h, para a droga no lipossomo. Os resultados são semelhantes aos obtidos para o controle de miconazol, diluído em metanol. O controle de DODAB resultou 83% (0 h) e 14% (72 h) de células viáveis.

Figura 4.23 - Efeito do tempo de interação do miconazol lipossomal sobre a viabilidade celular da *C. albicans*. Viabilidade celular (%) como uma função do tempo de interação entre o fungo e o miconazol lipossomal (M) a 0,11 mM de DODAB. A concentração de células viáveis é de $1,3 \times 10^6$ UFC/mL. Foram feitos controles para avaliar o efeito sobre a viabilidade celular, da droga sozinha ou DODAB sozinho.

5. DISCUSSÃO

Esta tese pode ser dividida em três partes:

- 1) susceptibilidade das espécies bacterianas *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* à ação bactericida do DODAB;
- 2) verificação da ação antifúngica do DODAB para a *C. albicans*;
- 3) incorporação de duas drogas antifúngicas nos lipossomos de DODAB e verificação da eficiência dos lipossomos com as drogas incorporadas.

Apesar de já ter sido descrita a ação bactericida do DODAB para estas quatro bactérias, ainda não tinha sido possível estabelecer uma comparação entre as espécies, em função das diferentes concentrações das suspensões bacterianas (Martins, L.M.S., et al., 1997). Em nosso trabalho, a ação bactericida do DODAB para as 4 espécies foi determinada e a susceptibilidade pode ser comparada. Foi fixada uma densidade numérica de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL para as bactérias, e curvas de viabilidade celular foram realizadas, nas mesmas condições experimentais, para as quatro espécies bacterianas.

Com os resultados das curvas de viabilidade celular em função da concentração de DODAB (mantendo fixa a densidade numérica de células e o tempo de interação, em 1 h) e em função do tempo de interação (mantendo fixa a concentração de DODAB em 5 μ M e de células em $2,5 \times 10^7$ UFC/mL), foi determinada a susceptibilidade das espécies. A ordem crescente de susceptibilidade à ação do DODAB foi: *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

A tabela 4.1 (resultados) mostra a comparação da viabilidade celular para as quatro espécies, sendo em torno de 50 μ M de DODAB a concentração necessária para obter-se 5 % de células viáveis de *E. coli*. Para chegar a 0% de viabilidade, são necessários 70 μ M de DODAB. Contudo, a susceptibilidade das bactérias deve ser maior que os valores obtidos, porque as culturas estavam na fase estacionária e DODAB interage igualmente com células viáveis e não viáveis, ou seja, DODAB estava sendo consumido também pelas células não viáveis, com uma dose aparentemente maior que aquela necessária para levar à morte todas as células.

O efeito simultâneo da concentração de DODAB sobre a viabilidade celular e mobilidade eletroforética de *E. coli* e *S. aureus* foi demonstrado, para uma densidade numérica fixa de células viáveis de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL e tempo de interação de 1 h. A relação entre a carga de superfície da célula com a perda de viabilidade foi apresentada. Quando as células encontravam-se negativamente carregadas apresentavam uma sobrevivência de 100%, e quando encontravam-se positivamente carregadas, as células não sobreviviam, para as duas espécies.

Como DODAB causa floculação das bactérias, a contagem de células viáveis poderia estar sendo subestimada, ou seja, um agregado de células com várias viáveis

poderia resultar em uma única contagem na placa. Para isso, experimentos com células floculadas e contagem de células viáveis foram realizados. A viabilidade celular obtida foi comparada àquela esperada. Através de curvas de mobilidade eletroforética para várias densidades numéricas de *E. coli* realizadas pelo grupo (Sicchierolli, S.M., et al., 1995), foram obtidos os valores de concentração de DODAB necessários para neutralizar as células da *E. coli*, isto é, onde metade das células encontram-se positivamente carregadas e metade negativamente carregadas. Densidades numéricas de 4×10^7 UFC/mL e 4×10^8 UFC/mL foram usadas e curvas de cinética de floculação foram acompanhadas para vesículas pequenas (sonicadas) e grandes (injetadas e aquecidas) de DODAB, para o $t_{1/2}$ calculado. Foi mostrada a floculação das bactérias nestas concentrações e, a determinação das células viáveis pelo método do plaqueamento para as vesículas sonicadas resultou em boa concordância com os cálculos (em torno de 50 % de células viáveis). A diluição seriada da amostra, no método do plaqueamento, provavelmente elimina a possibilidade de subestimar-se a contagem de células viáveis. Já as vesículas grandes não demonstraram uma boa relação com os cálculos, possivelmente porque a curva relacionando densidade numérica de bactérias e concentração de DODAB para uma ME = 0 foi obtida para as vesículas pequenas, e não para as vesículas grandes.

Das isotermas de adsorção para vesículas pequenas de DODAB ou grandes de DODAC sobre a *E. coli* (Tápias, G.N., et al., 1994), e assumindo o modelo de adsorção de Langmuir (Hiemenz, P.C., 1986), foi possível calcular constantes de afinidade para ambos os tipos de vesículas. A afinidade (K) das vesículas pequenas de DODAB foi menor do que aquela das vesículas grandes, portanto, o efeito bactericida das vesículas grandes deveria ser mais pronunciado do que aquele exibido pelas vesículas pequenas. A curva de viabilidade celular realizada para as vesículas grandes comprova esta maior afinidade. As vesículas grandes mostraram, de fato, maior eficiência do efeito bactericida em baixas concentrações de DODAB, mostrando uma maior afinidade (figura 4.6).

A definição da constante de afinidade K requer algum cuidado. Conforme as retas de isotermas linearizadas, foram calculados dois valores diferentes para as constantes de afinidade (K) de vesículas grandes e pequenas de DODAB: $35,71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (grandes) e $3,26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (pequenas). A existência desses valores diferentes para o que deveria ser uma constante de afinidade, pode parecer incompreensível. Todavia, devemos lembrar que a adsorção do DODAB à superfície da bactéria se dá via “vesícula inteira” e não via “monômero”, e, portanto, só faz sentido definir uma constante de afinidade entre a vesícula e a superfície. Como previamente demonstrado para a adsorção de vesículas sintéticas ou de fosfolipídios sobre diferentes superfícies, se a adsorção fosse via adsorção de monômero, o tempo requerido deveria ser cerca de 10^8 h, em contraste aos poucos segundos necessários para adsorção via difusão de vesícula e bicamada inteira (Jackson, S., et al., 1986; Carmona-Ribeiro, A.M., e Midmore, B.R., 1992; Rapuano, R., e Carmona-Ribeiro, A.M., 2000).

O número de partículas “q” que possuem um coeficiente de difusão “D” e concentração “n”, atingem uma unidade de área de superfície no tempo “t” (Jackson, S., et al., 1986):

$$q = n (Dt / 2)^{1/2}$$

Considerando vesículas de DPPC com coeficiente de difusão de $1,4 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ e uma concentração de aproximadamente $4 \times 10^{-5} \text{ mol m}^{-3}$, teremos $q(\text{vesícula}) \cong 1 \times 10^{-10} \text{ t}^{1/2}$. A concentração de DPPC monomérico não será maior de $4,7 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-3}$ e o coeficiente de difusão será de aproximadamente $20 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$; tem-se portanto, $q(\text{monômero}) \cong 5 \times 10^{-12} \text{ t}^{1/2}$. A relação das taxas de difusão de vesículas para monômeros alcançando a superfície em unidade de tempo será da ordem de 20:1, embora essa relação decresça com o aumento no tamanho da vesícula. Levando em consideração que as vesículas contém aproximadamente 14000-74000 moléculas lipídicas (dependendo do seu tamanho), a entrega de lipídios para a superfície será predominantemente “via vesículas” em vez de “via monômero”.

A ação bactericida exercida pelos lipossomos de DODAB parece ser diferente de outros agentes catiônicos que rompem a membrana citoplasmática, pois as vesículas de DODAB aderem sem a ruptura das vesículas ou lise das células (Martins, L.M.S., et al., 1997). Surfactantes formadores de bicamadas como DODAB ou DODAC têm comportamento diferente de outros surfactantes de amônio quaternário que formam estruturas micelares, e devem causar morte via um mecanismo que não inclui lise celular. A interação entre bactéria e vesículas grandes de DODAB não induziu o extravasamento de conteúdos intravesiculares (Martins, L.M.S., et al., 1997). A fusão da vesícula com a membrana da célula necessariamente levaria ao extravasamento. Portanto, lipídios da membrana da célula e moléculas de DODAB das vesículas não parecem misturar-se, como esperado para lipídios que estão em diferentes estados físicos (lipídios da membrana celular estão no estado líquido-cristalino, num estado mais fluido do que DODAB ou DODAC, que estão no estado rígido, de gel). De fato, DODAC ou DODAB não são agentes micelizantes capazes de romper membranas celulares. Além disso, já foi quantificada a quantidade de vesículas de DODAB adsorvidas na superfície da célula de *E. coli*, em trabalho do grupo (Tápias, G.N., et al., 1994). Na adsorção limite, uma paliçada de vesículas, isto é, uma camada única de vesículas recobrimdo a superfície da célula bacteriana, foi demonstrada. O modelo da paliçada explica adequadamente a quantidade de anfifílico adsorvido sobre a superfície bacteriana. A adesão de vesículas inteiras na célula parece ter efeitos devastadores, que levam a célula à morte. O mecanismo de ação de DODAB pode estar relacionado a danos a proteínas funcionais da parede externa da célula, pelo bloqueio do transporte de substâncias ou funções fundamentais para a sobrevivência da bactéria.

Os resultados apresentados neste trabalho estabelecem os lipossomos de DODAB como bactericidas, apontando um efeito diferencial de ação na troca de carga da célula, em contraste aos efeitos inócuos usuais de lipossomos convencionais usados como carreadores de drogas. Com respeito à utilização clínica de DODAB como bactericida, este trabalho foi realizado em água, a força iônica praticamente zero, enquanto que, em condições fisiológicas, a força iônica é da ordem de 150 mM de sal monovalente. A estabilidade coloidal das vesículas de DODAB nessa força iônica é baixa (Carmona-Ribeiro, A.M., et al., 1985; Carmona-Ribeiro, A.M., 1993). Pode-se pensar em contornar isto pelo uso de uma mistura de lipídios em DODAB capaz de produzir vesículas de alta estabilidade coloidal, sob condições fisiológicas. Ainda, um “polieletrólito” bactericida como as vesículas catiônicas de DODAB, ativo em baixas concentrações e força iônica, pode ter um potencial de uso na prevenção de contaminação de águas por bactérias. Além disso, DODAB é efetivo bactericida na ordem de 0,01 - 0,1 mM, ou seja, em baixas concentrações, enquanto 40-50% de morte para células de mamíferos foi observada na presença de 1 mM de DODAB (Carmona-Ribeiro, A.M., et al., 1997).

A primeira parte do trabalho foi para confirmar o efeito bactericida e estabelecer uma ordem de susceptibilidade às dispersões de DODAB, para quatro espécies bacterianas comumente encontradas em casos de infecção hospitalar; observar se o tamanho das vesículas exerce um fator importante na ação bactericida; e investigar se o mecanismo de morte está relacionado com a troca da carga de superfície da célula.

A segunda etapa consistiu em verificar a ação antifúngica do DODAB para a *C. albicans* ATCC 90028.

As curvas de viabilidade das figuras 4.13 e 4.14 indicam que os lipossomos de DODAB não podem ser considerados como fungicidas para concentrações até 1 mM, ou seja, o fungo é mais resistente à ação antimicrobiana de DODAB do que as bactérias. Contudo, células de mamíferos são ainda mais resistentes que o fungo (Carmona-Ribeiro, A.M., et al., 1997). DODAB de fato exibe uma toxicidade diferencial, uma importante propriedade para usos terapêuticos. A explicação para essa toxicidade diferencial parece estar estruturalmente relacionada à crescente complexidade das barreiras que as células interpõem entre o DODAB e o interior celular (vide complexidade da parede do fungo contra a complexidade da parede de bactéria).

A última etapa do trabalho foi a incorporação das drogas antifúngicas anfotericina B e miconazol nos lipossomos de DODAB, para avaliação da eficiência antifúngica dessas drogas nos lipossomos, uma vez que as vesículas catiônicas mostraram ser excelentes solubilizantes para as duas drogas hidrofóbicas (Campanhã, M.T.N., et al., 2000). A incorporação de drogas em lipossomos é útil porque limita a entrega das drogas a sítios específicos, diminuindo a toxicidade para outros tecidos e preservando a droga encapsulada até ser entregue à célula alvo. Lipossomos e outras formulações lipídicas solubilizando anfotericina B estão disponíveis comercialmente.

Encontram-se também formulações de antibióticos e de vacinas antibacterianas, usando lipossomos, em fase avançada de testes (Gregoriadis, G., 1995; Gregoriadis, G., 1998). Como os lipossomos de DODAB solubilizam os dois antifúngicos tão bem quanto seus melhores solventes orgânicos, e exercem por si mesmos uma ação antimicrobiana, podem ser úteis como carreadores das drogas, potencializando a ação fungicida. Além disso, podem carrear a droga numa concentração maior, fator (concentração) que é limitado pela toxicidade que as drogas exercem em outros tecidos, como por exemplo, a nefrotoxicidade exercida pela anfotericina B. Como já foi mostrado que as vesículas de DODAB possuem uma toxicidade diferencial (Carmona-Ribeiro, A.M., et al., 1997), a utilização "in vivo" poderia ser contornada pela modificação da composição da membrana (bicamada).

Os espectros da anfotericina B (AB) e miconazol (M) incorporados em vesículas pequenas e grandes foram determinados. A figura 4.18 (a) mostra o espectro óptico para anfotericina B a 10 µg/mL, solubilizada em dimetilsulfóxido:metanol 1:1 ou em vesículas sonicadas de DODAB a 1,5 mM. O espectro da anfotericina B em DODAB é muito semelhante aquele obtido para anfotericina B na mistura de solvente orgânico. Desde que a concentração inibitória mínima (MIC) da anfotericina B para *C. albicans* é 1,9 µg/mL (Asher, I.M., et al., 1977) e DODAB facilmente solubiliza 10 µg/mL, este resultado mostra claramente uma propriedade excelente para as vesículas catiônicas: sua habilidade para solubilizar e agir como carreador de doses efetivas de anfotericina B contra *C. albicans*. Esta propriedade isolada, juntamente com a ação antimicrobiana descrita destes lipossomos, apontam para a possibilidade de efeitos sinérgicos da anfotericina B e DODAB contra candidíase, capaz de diminuir as doses requeridas para ambas as drogas. Por outro lado, é sabido para lipossomos de modo geral que a fase lipossomal pode solubilizar concentrações enormes de droga sem que se observe efeitos tóxicos, o que também pode representar uma vantagem. Através disso, a toxicidade da droga pode ser diminuída e a concentração aumentada. Ainda, pode-se imaginar um sistema de ação polivalente, da anfotericina B / DODAB, contra múltiplas infecções envolvendo bactérias e fungos.

A anfotericina B em solução aquosa não obedece a lei de Lambert-Beer (Rinnert, H., e Thirion, C., 1977). A figura 5.1 (próxima página) mostra o espectro de absorção característico da anfotericina B em fase aquosa: o aumento progressivo de álcool etílico em uma solução aquosa de anfotericina B causa um decréscimo rápido do pico de 328 nm e um aumento dos picos entre 350 e 420 nm (Rinnert, H., e Thirion, C., 1977).

A figura 4.18 (b) mostra o espectro de anfotericina B em 2 mM de uma solução de desoxicolato de sódio. Pode-se ver a mudança espectral quando comparada com a figura 4.18 (a), usando DMSO:metanol 1:1 ou SUV de DODAB. Desoxicolato (DOC) solubiliza fracamente a anfotericina B e mostra uma dependência linear entre a absorbância e a concentração de AB (característica da lei de Lambert-Beer) em uma faixa muito baixa de concentração, de 0-2 µg/mL. Ao contrário, o comportamento da anfotericina B nas

Figura 5.1 - Espectros de anfotericina B em solução aquosa, com aumento de concentração de álcool etílico: 0 %; 5 %; 10 %; 20 %; 25 %; 35 %; 40 %. O gráfico mostra a leitura de absorvância em função do comprimento de onda (Rinnert, H., e Thirion, C., 1977).

vesículas pequenas de DODAB traz o espectro característico da solubilização da droga nos seus melhores solventes, como também obedece a lei de Lambert-Beer, do zero a 1,0 de absorvância (figura 4.18 (c)). A solubilização de anfotericina B em vesículas grandes também foi mostrada, porém, apesar de apresentar uma maior solubilidade do que o desoxicolato, a solubilização de AB em vesículas grandes é certamente menor do que nas vesículas pequenas. Estas relações são mostradas na tabela 4.7, onde foram colocados os valores de absorptividade molar para anfotericina B em DMSO:metanol 1:1, DOC, SUV de DODAB, e LUV de DODAB. Como pode ser visto, as vesículas pequenas de DODAB e DMSO:metanol exibem os maiores valores de absorptividade molar (ϵ), ou melhor, possuem valores muito próximos. Há solubilização de AB nas bicamadas das vesículas de DODAB, sem a necessidade de esteróis. Quando falamos de solubilização da droga, estamos nos referindo a droga presente como monômero na solução, ou seja, se ela está solubilizada em seu melhor solvente, apresentando picos de absorção máximos para as formas monoméricas, podemos comparar estes picos para outros agentes solubilizantes, como o DODAB. Como as drogas apresentaram perfil semelhante nas vesículas pequenas de DODAB aqueles apresentados quando solubilizadas em seus melhores solventes, espera-se que as drogas estejam solubilizadas e incorporadas nas vesículas.

A tabela 4.5 mostra como a solubilização de AB em DODAB afeta os comprimentos de onda para a absorbância máxima de AB. Comprimentos de onda máximos para absorbância máxima de anfotericina B nas vesículas de DODAB, mudam para valores que são maiores do que aqueles obtidos na mistura de solventes ou em DOC 2,0 mM. A anfotericina B é uma molécula anfotérica que dissolve muito pouco na maioria dos solventes, com exceção de dimetilsulfóxido e dimetilformamida (Merck Index, 1989). A solubilidade pode ser aumentada pela adição de desoxicolato de sódio, como encontrada na formulação comercial, Fungizon. A anfotericina B dissolve em vesículas de lecitina-colesterol e membranas naturais contendo colesterol (Kruijff, B. de, e Demel, R.A., 1974; Bittman, R., et al., 1974). A anfotericina B possui um espectro de absorção de UV característico em DMSO:metanol 1:1 (um intenso quadruplete a 406, 382, 363, 345 nm, figura 18 (a)). Esta aguda e intensa banda aparece de transições $\pi - \pi^*$ do cromóforo heptaeno. Os espectros de anfotericina B em solução aquosa (solubilizada pelo desoxicolato de sódio) são diferentes (figura 4.18 (b)) e mudam após a adição de lecitina e/ou colesterol (Ockman, N., 1974). Estas trocas aparentemente refletem a presença de grandes e lábeis agregados, em tais soluções aquosas.

A solubilização de miconazol nas vesículas pequenas ($\epsilon = 533$ ou $718 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) é semelhante a solubilização deste antifúngico em metanol ($\epsilon = 716 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), como mostrado na tabela 4.7, que é o melhor solvente para esta droga (Merck Index, 1989). O miconazol apresentou um padrão de solubilização semelhante ao da anfotericina B, pois a solubilização do miconazol pelos lipossomos catiônicos é, na mesma extensão, igual aquela obtida para a droga no seu melhor solvente, metanol.

A concentração inibitória mínima (MIC) da anfotericina B e miconazol para *C. albicans* foi descrita como $1,9 \mu\text{g/mL}$ (Asher, I.M., 1977) e $0,016 - 100 \mu\text{g/mL}$ (McGinnis, M.R., e Rinaldi, M.G., 1996), respectivamente, para uma interação droga / fungo de 48 h em um meio rico (NCCLS, 1997). Estes valores de MIC foram tomados para definir a faixa de concentração de droga a ser utilizada para testar o sinergismo da droga com o DODAB, para *C. albicans* em D-glicose $0,264 \text{ M}$. Portanto, a razão da escolha de valores na faixa do MIC foi para a detecção de um efeito fungicida da droga dentro das vesículas de DODAB, que não era encontrado na droga sozinha. Embora nossos experimentos não tenham sido realizados sob as condições padrões de determinação de MIC (lipossomos e células estão em D-glicose $0,264 \text{ M}$), a concentração inibitória mínima para as células em meio rico, foi utilizada como referência. A viabilidade celular decresceu como uma função da anfotericina B lipossomal, alcançando um mínimo igual a 0 % de sobrevivência a $3 - 4 \mu\text{g/mL}$ de anfotericina B e 24 h de interação, ou a $5 \mu\text{g/mL}$ de anfotericina B e 1 h de tempo de interação (figura 4.20). Para o miconazol, a ausência de sobrevivência foi obtida somente a $100 \mu\text{g/mL}$ de miconazol lipossomal e 1 h de tempo de interação (figura 4.21). Esta dose, na ausência de DODAB, é esperada ser somente fungistática, e não fungicida. Nesse ponto é importante discutir se há ou não uma ação sinérgica entre os lipossomos e

o miconazol. Por exemplo, na figura 4.23, a droga sozinha é tão efetiva quanto a droga lipossomal, a partir de 24 h de interação. Se quiséssemos confrontar a eventual ocorrência de sinergismo, um estudo mais adequado seria com o instante de 2 h, onde parece haver uma ação mais efetiva da droga lipossomal em relação à droga sozinha. Esse experimento está no ítem de perspectivas.

Curvas de viabilidade celular com valor fixo da droga na formulação lipossomal em função do tempo de interação foram determinadas, mantendo fixa a concentração de células em $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Na figura 4.22 (B), DODAB com ou sem a anfotericina B (na concentração de $2 \mu\text{g/mL}$) foi testado, em concentração de 1,1 mM. Neste caso, a diluição da droga na fase lipossomal leva a uma viabilidade mínima de 16 %, percentual também obtido para 1,1 mM de DODAB sem a droga. A fase lipossomal parece estar competindo com as membranas da célula fúngica para a solubilização da droga. Em grandes quantidades de DODAB, como 1,1 mM, a fase lipossomal ganha a competição e a droga não é entregue para a membrana da célula. Se assim fosse, uma redução de dez vezes na concentração de DODAB deveria melhorar a entrega da droga para a membrana celular. De fato, na figura 4.22 (A), a 0,11 mM de DODAB, o decréscimo na concentração de DODAB possivelmente levou a um aumento na concentração da droga na fase lipossomal, e um concomitante aumento na entrega da droga para as membranas da célula, alcançando 0 % de viabilidade.

Como controle, a viabilidade da *C. albicans* na presença da droga sozinha (solubilizada na mistura de solventes orgânicos) foi determinada, resultando em 0 % de viabilidade celular (figura 4.22). Neste caso a droga, uma vez adicionada à solução aquosa de D-glicose 0,264 M onde os fungos estão, rapidamente vai para a membrana celular dos fungos, efetivamente causando a sua morte (figura 4.22). A droga no seu melhor solvente é aparentemente muito eficiente em matar o fungo “in vitro”, apesar da toxicidade do solvente invalidar o seu uso como solubilizador da droga, na terapia clínica. Os lipossomos de DODAB são tão eficientes como solubilizantes como são os melhores solventes da droga. Assim, se a barreira de toxicidade diferencial for ultrapassada, DODAB terá pelo menos duas funções importantes: 1) solubilização da droga; 2) potencialização da ação da droga devido ao seu próprio efeito antimicrobiano.

Para confirmar os dados obtidos com a anfotericina B, o miconazol, outra droga hidrofóbica utilizada como agente antifúngico, também foi testado. O miconazol não é tão potente como a anfotericina B e sua concentração inibitória mínima (MIC) contra *C. albicans* tem uma concentração da droga 10 vezes maior do que aquela para anfotericina B (McGinnis, M.R., e Rinaldi, M.G., 1996). A figura 4.23 mostra que o miconazol carregado pelos lipossomos de DODAB torna-se bem efetivo como um agente fungicida a $20 \mu\text{g/mL}$, uma concentração final de miconazol previamente descrita apenas como fungistática (McGinnis, M.R., e Rinaldi, M.G., 1996). Além disso, é importante enfatizar que nós testamos a ação antifúngica do miconazol carregado pelas vesículas de DODAB, a uma

concentração final de células de 10^6 UFC/mL. Esta concentração é cerca de 10 - 100 vezes maior do que aquela concentração normalmente usada para obtenção do MIC. Portanto, talvez possa ocorrer uma ação sinérgica entre as vesículas de DODAB e o fungicida carregado. Contudo, é difícil ser definitivo com respeito a ação sinérgica entre a droga e os lipossomos, com os resultados presentes. A droga solubilizada no seu solvente é ainda a melhor opção, apesar da limitação para uso clínico, pela sua toxicidade. A diferença na viabilidade celular obtida para a droga sozinha no seu solvente orgânico e a droga mais lipossomo, não pode ser considerada significativa dentro do erro experimental (figura 4.23). Contudo, permanece o fato que 0 % de viabilidade foi obtida para ambas as drogas, quando formuladas como uma combinação da droga com os lipossomos catiônicos em ausência de solvente da droga, ou quando a droga estava apenas no seu solvente (figuras 4.22 e 4.23).

Os lipossomos de DODAB, por si mesmos, possuem uma ação antifúngica. A interação entre os lipossomos de DODAB e células em solução de D-glicose 0,264 M (escolhida para preservar a isotonicidade entre o ambiente interno e externo da célula), causa uma citotoxicidade bem definida, na mesma faixa de concentração de DODAB que troca a carga da superfície da célula de negativa para positiva, e esta toxicidade é muito maior para bactérias e fungos do que para células de mamíferos em cultura. O desafio seria a preservação deste efeito de citotoxicidade diferencial em condições fisiológicas.

Este trabalho não mostrou que a droga é definitivamente entregue à célula pelo lipossomo. Há também a possibilidade que o lipossomo esteja, de fato, como um solvente, e há partição da droga do lipossomo na fase aquosa, a partir da qual ela interage com as células. Embora esta possibilidade seja remota porque a anfotericina B e o miconazol são insolúveis como monômeros em água, e admitindo que nós não podemos especificar um mecanismo de entrega neste ponto, eventualmente lipossomos e droga podem ter efeitos separados sobre as células, ainda assim sinérgicos.

6. CONCLUSÕES

A utilização dos lipossomos de DODAB como agentes antimicrobianos e como possíveis carreadores de drogas foi o objetivo de estudo desta tese. Com os resultados obtidos, concluímos:

- 1) A susceptibilidade bacteriana ao DODAB aumenta na seguinte ordem: *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.
- 2) Células carregadas negativamente permanecem vivas, enquanto células carregadas positivamente não sobrevivem.
- 3) Vesículas grandes de DODAB apresentam maior afinidade pela *E. coli* do que vesículas pequenas. Essa maior afinidade pelas vesículas grandes está associada à perda de viabilidade em faixas de concentrações mais baixas de DODAB.
- 4) Não há relação entre a perda de viabilidade celular e a agregação bacteriana provocada pelo lipossomo catiônico.
- 5) O mecanismo de ação de DODAB parece ser diferente de outros compostos de amônio quaternário, que não formam vesículas. DODAB deve causar morte através de mecanismo que não inclui lise celular ou ruptura vesicular.
- 6) Vesículas de DODAB exercem ação antifúngica.
- 7) A fase lipossomal compete com a membrana da célula fúngica pela anfotericina B na concentração de 1 mM de DODAB, e a droga não é completamente entregue para a célula. Na concentração de 0,1 mM de DODAB, a membrana da célula fúngica ganha a competição com a fase lipossomal e a anfotericina B é entregue para a célula.
- 8) Miconazol lipossomal apresenta ação fungicida para concentrações descritas como apenas inibitórias de crescimento.
- 9) Pode haver uma ação sinérgica entre as drogas antifúngicas e o DODAB, a ser verificada futuramente.
- 10) *C. albicans* é o microrganismo mais resistente ao DODAB, dentre os 5 microrganismos estudados.

7. PERSPECTIVAS

A continuidade dessa linha de pesquisa envolverá:

- Determinar isotermas de adsorção do DODAB (vesículas grandes e vesículas pequenas) sobre *C. albicans*.
- Determinar as constantes de afinidade das vesículas de DODAB pela *C. albicans*.
- Determinar cinéticas de floculação de *C. albicans* induzidas pelo DODAB.
- Fixando o crescimento dos cultivos na fase exponencial, reavaliar as doses mínimas bactericidas de DODAB.
- Determinar isotermas de adsorção de DODAB sobre as quatro espécies bacterianas, e calcular as constantes de afinidade a partir da linearização das isotermas.
- Comparar a eficiência da anfotericina B lipossomal em lipossomos de DODAB com a formulação em desoxicolato (fungizon) e formulações lipídicas.
- Modificar a composição da membrana (bicamada) de DODAB, introduzindo lipídios naturais ou lipídios modificados com polietilenoglicol, para aumentar a estabilidade coloidal e a estabilidade biológica das formulações.
- Determinar a estabilidade coloidal e biológica, e toxicidade dos lipossomos de DODAB, após modificar a composição da bicamada.
- Verificar se houve a incorporação das drogas nos lipossomos, através de técnica, por exemplo, de filtração das misturas droga/vesícula através de filtros de policarbonato, com determinação espectroscópica da droga no filtrado.
- Averiguar o efeito da anfotericina B lipossomal, miconazol lipossomal, e das drogas sozinhas, em cultura de células de mamíferos.
- Averiguar o efeito antioxidante dos lipossomos de DODAB sobre a anfotericina B, em comparação com lipossomos convencionais.
- Averiguar a ação da anfotericina B como agente modificador de permeabilidade de vesículas grandes de DODAB.

Se as barreiras de toxicidade e instabilidade coloidal e biológica dos lipossomos de DODAB forem superadas, estes lipossomos eventualmente poderão ter as seguintes aplicações tecnológicas:

Carreadores de drogas múltiplas, no tratamento de infecções por *C. albicans* e bactérias.

Anti-sépticos bactericidas, para cepas resistentes a antibióticos.

DODAB pode ser usado também para fins ambientais, como floculante de bactérias no tratamento de efluentes e reservatórios de água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com a NBR 6023/90 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997 [CD-ROM].

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANTEA, M.A., BOWDEN, R.A., FORREST, A., WORKING, P.K., NEWMAN, M.S., MAMELOK, R.D. The population pharmacokinetics of amphotericin B colloidal dispersion in patients receiving bone marrow transplants. **Chemotherapy**, Basel, v. 45, sup. 1, p. 48-53, 1999.
- ANDREOLI, T.E. In Part V. Membranes as targets for antibiotic action. The structure and function of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, p. 448-468, 1984.
- ARACA, Y., SMITH, I.C.P., SCHREIER, S. Effect of amphotericin B on membranes: a spin probe study. **Biochemistry**, Columbus, v. 20, n. 20, p. 5702-5707, 1981.
- ARORA, A., RINEHART, D., SZABO, G., TAMM, L.K. Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 275, n. 3, p. 1594-1600, 2000.
- ASHER, I.M., SCHWARTZMAN, G., USARG. Amphotericin B. In: Florey, K., ed. **Analytical profiles of drug substances**. New York: Academic Press, 1977. v. 6, p. 1-42.
- BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M., KATE, M.T.T., STEARNE-CULLEN, L.E.T., WOODLE, M.C. Efficacy of gentamicin or ceftazidime entrapped in liposomes with prolonged blood circulation and enhanced localization in *Klebsiella pneumoniae*-infected lung tissue. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 171, p. 938-947, 1995.
- BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M., LOKERSE, A.F., TEN KATE, M.T., MELISSEN, P.M.B., VAN VIANEN, W., VAN ETEN, E.W.M. Liposomes as carriers of antimicrobial agents or immunomodulatory agents in the treatment of infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v. 12, p. 61-67, 1993.
- BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M., LOKERSE, A.F., VINK-VAN DER BERG, J.C., ROERDINK, F.H., MICHEL, M.F. Effect of liposome-entrapped ampicillin on survival of *Listeria monocytogenes* in murine peritoneal macrophages. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 30, p. 295-300, 1986.
- BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M., TEN KATE, M.T., STORM, G., VAN ETEN, E.W.M. Administration of liposomal agents and the phagocytic function of the mononuclear phagocyte system. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 162, p. 5-10, 1998.
- BANGHAM, A. D. **Liposome Letters**. London: Academic Press, 1983. p. 421.
- BANGHAM, A.D., DE GIER, J., GREVILLE, G.D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. **Chem. Phys. Lipids**, Shannon, v. 1, p. 225-246, 1967.
- BANGHAM, A.D., STANDISH, M.M., MILLER, N. Cation permeability of phospholipid model membranes: effect of narcotics. **Nature**, London, v. 208, n. 5017, p. 1295-1297, 1965.

- BARBOSA, H.R., TORRES, B.B. **Microbiologia Básica**. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. p. 196.
- BARENHOLZT, Y., AMSELEM, S., LICHTENBERG, D. A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes) - French press. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 210-214, 1979.
- BATZRI, S., KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 298, p. 1015-1019, 1973.
- BEAULAC, C., CLÉMENT-MAJOR, S., HAWARI, J., LAGACÉ, J. Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 40, n. 3, p. 665-669, 1996.
- BEAULAC, C., SACHETELLI, S., LAGACE, J. In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 41, p. 35-41, 1998.
- BEN-JOSEF, A.M., MANAVATHU, E.K., PLATT, D., SOBEL, J.D. *In vitro* antifungal activity of CAN-296: a naturally occurring complex carbohydrate. **J. Antibiotics**, Tokyo, v. 50, n. 11, p. 937-943, 1997.
- BOLARD, J., LEGRAND, P., HEITZ, F., CYBULSKA, B. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. **Biochemistry**, Columbus, v. 30, n. 23, p. 5707-5715, 1991.
- BOLARD, J., SEIGNEURET, M., BOUDET, G. Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin B. Lipid state and cholesterol content dependence. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 599, p. 280-293, 1980.
- BONVENTRE, P.F., GREGORIADIS, G. Killing of intraphagocytic *Staphylococcus aureus* by dihydrostreptomycin entrapped within liposomes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 13, n. 6, p. 1049-1051, 1978.
- BOSSCHE, H.V. Importance and role of sterols in fungal membranes. In: Kuhn, P. J., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W., Copping, L.G., eds. **Biochemistry of cell walls and membranes in fungi**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 135-157.
- BRAJTBURG, J., BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 9, n. 4, p. 512-531, 1996.
- BRAJTBURG, J., ELBERG, S., BOLARD, J., KOBAYASHI, G.S., LEVY, R.A., OSTLUND, R.E., JR., SCHLESSINGER, D., MEDOFF, G. Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 149, n. 6, p. 986-997, 1984.
- BRAJTBURG, J., POWDERLY, W.G., KOBAYASHI, G.S., MEDOFF, G. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 34, n. 2, p. 183-188, 1990.

- CAMPANHÃ, M.T.N., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Antifungal cationic liposomes and drug delivery to *Candida albicans*. Submetido.
- CAMPANHÃ, M.T.N., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. **J. Lipid Res.**, New York, v. 40, p. 1495-1500, 1999.
- CAMPANHÃ, M.T.N., MARTINS, L.M.S., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Fungicides solubilization in antimicrobial cationic liposomes. Submetido.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 1, p. 40-43, 2000.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between charged spheric vesicles. **J. Phys. Chem.**, Washington, v. 97, p. 11843-11846, 1993.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic amphiphile vesicles. **Chem. Soc. Rev.**, Cambridge, v. 21, n. 3, p. 209-214, 1992.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., CASTUMA, C.E., SESSO, A., SCHREIER, S. Bilayer structure and stability in dihexadecyl phosphate dispersions. **J. Phys. Chem.**, Washington, v. 95, p. 5361-5366, 1991.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 733, p. 172-179, 1983.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., HERRINGTON, T.M. Phospholipid adsorption onto polystyrene microspheres. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 156, p. 19-23, 1993.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., MIDMORE, B.R. Synthetic bilayer adsorption onto polystyrene microspheres. **Langmuir**, Columbus, v. 8, n. 3, p. 801-806, 1992.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., ORTIS, F., SCHUMACHER, R.I., ARMELIN, M.C.S. Interactions between cationic vesicles and cultured mammalian cells. **Langmuir**, Columbus, v. 13, n. 8, p. 2215-2218, 1997.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., YOSHIDA, L.S., CHAIMOVICH, H. Salt effects on the stability of dioctadecyldimethylammonium chloride and sodium dihexadecylphosphate vesicles. **J. Phys. Chem.**, Washington, v. 89, p. 2928-2933, 1985.
- CEVC, G., MARSH, D. **Phospholipid bilayers. Physical principles and models**. New York: Wiley-Interscience Publication, 1987. p.442.
- CHEN, W.C., BITTMAN, R. Kinetics of association of amphotericin B with vesicles. **Biochemistry**, Columbus, v. 16, n. 19, p. 4145-4149, 1977.
- COHEN, B.E. A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1108, p. 49-58, 1992.
- COHEN, B.E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 162, p. 95-106, 1998.

- COTERO, B.V., REBOLLEDO-ANTÚNEZ, S., ORTEGA-BLAKE, I. On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1375, p. 43-51, 1998.
- DARNELL, J.E., LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P. **Molecular cell biology**. 3.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. p. 1344.
- DEAMER, D., BANGHAM, A.D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 443, p. 629-634, 1976.
- DIRIENZO, J.M., NAKAMURA, K., INOUE, M. The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 47, p. 481-532, 1978.
- DOYLE, R.J., ROSENBERG, M. **Microbial cell surface hydrophobicity**. Washington: American Society for Microbiology, 1990. p. 425.
- DUPONT, B. Clinical efficacy of amphotericin B colloidal dispersion against infections caused by *Candida* spp. **Chemotherapy**, Basel, v. 45, sup. 1, p. 27-33, 1999.
- ERNST, M.E., KLEPSE, M.E., WOLFE, E.J., PFALLER, M.A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* ssp. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 26, p. 125-131, 1996.
- ESPUELAS, M.S., LEGRAND, P., CHERON, M., BARRATT, G., PUISIEUX, J.-PH.D., IRACHE, J.M. Interaction of amphotericin B with polymeric colloids - A spectroscopic study. **Colloids Surf., B**, Amsterdam, v. 11, p. 141-151, 1998.
- FALKOW, S., MEKALANOS, J. The enteric bacilli and vibrios. In: Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., eds. **Microbiology**. 4.ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1990. p. 561-587.
- FENDLER, J.H. Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: characterization and utilization. **Acc. Chem. Res.**, Washington, v. 13, p. 7-13, 1980.
- FILION, M.C., PHILLIPS, N.C. Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 162, p. 159-170, 1998.
- FRIEND, D.S., PAPAHAADJOPOULOS, D., DEBS, R.J. Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1278, p. 41-50, 1996.
- FROMTLING, R.A. Amphotericin B lipid complex. **Drugs Fut.**, Barcelona, v. 20, n. 2, p. 129-134, 1995.
- FÜLDNER, H.H. Characterization of a third phase transition in multilamellar dipalmitoyllecithin Liposomes. **Biochemistry**, Columbus, v. 20, n. 20, p. 5707-5710, 1981.

- GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G.I., VAN DER MEI, H.C., BUSSCHER, H.J. Microbial cell surface hydrophobicity - The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). **J. Microbiol. Methods**, Shannon, v. 18, p. 61-68, 1993.
- GILES, C.H., McEWAN, T.H., NAKHWA, S.N., SMITH, D. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solutions adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of specific surface areas of solids. **J. Chem. Soc.**, London, p. 3973-3993, 1960.
- GOLD, W., STOUT, H.A., PAGANO, J.F., DONOVICK, R. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomycete. **Antibiot. Annu.**, p. 579-586, 1955-1956.
- GREGORIADIS, G. Genetic vaccines: strategies for optimization. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 15, n. 5, p. 661-670, 1998.
- GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. **TIBTECH**, v. 13, p. 527-537, 1995.
- GREGORIADIS, G., SAFFIE, R., SOUZA, J.B. Liposome-mediated DNA vaccination. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 402, p. 107-110, 1997.
- HAMILTON-MILLER, J.M.T. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. **Bacteriol. Rev.**, Washington, v. 37, n. 2, p. 166-196, 1973.
- HERBRECHT, R., LETSCHER, V., ANDRES, E., CAVALIER, A. Safety and efficacy of amphotericin B colloidal dispersion. **Chemotherapy**, Basel, v. 45, sup. 1, p. 67-76, 1999.
- HIEMENZ, P.C. **Principles of colloid and surface chemistry**. 2.ed., New York: Marcel Dekker, 1986. p. 815.
- HONG, K., ZHENG, W., BAKER, A., PAPAHAADJOPOULOS, D. Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 400, p. 233-237, 1997.
- HUANG, C.-H. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. **Biochemistry**, Columbus, v. 8, n. 1, 1969.
- ISHII, J.; NAKAE, T. Specific interaction of the protein-D2 porin of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotics. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 136, p. 85-90, 1996.
- ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and surface forces**. 2.ed. London: Academic Press, 1992. p. 450.
- JÄÄSKELÄINEN, I., STERNBERG, B., MÖNKKÖNEN, J., URTTI, A. Physicochemical and morphological properties of complexes made of cationic liposomes and oligonucleotides. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 167, p. 191-203, 1998.
- JACKSON, S., REBOIRAS, M.D., LYLE, I.G., JONES, M.N. Adsorption of phospholipid vesicles on solid surfaces. **Faraday Discuss. Chem. Soc.**, v. 85, p. 291-301, 1986.

- JANKNEGHT, R., DE MARIE, S., BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M., CROMMELIN, D.J.A. Liposomal and lipids formulations of amphotericin B. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 23, n. 4, p. 279-291, 1992.
- KIKUCHI, I.S., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between DNA and Synthetic Cationic Liposomes. **J. Phys. Chem. B**, Columbus, v. 104, n. 13, p. 2829-2835, 2000.
- KIKUCHI, I.S., VIVIANI, W., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Nucleotide insertion in cationic bilayers. **J. Phys. Chem. A**, Columbus, v. 103, n. 40, p. 8050-8055, 1999.
- KRUIJFF, B. DE, DEMEL, R.A. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 339, p. 57-70, 1974.
- KRUIJFF, B. DE, GERRITSEN, W.J., OERLEMANS, A., DEMEL, R.A., VAN DEENEN, L.L.M. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 339, p. 30-43, 1974.
- KUNITAKE, T., OKAHATA, Y., TAMAKI, K., KUMAMARU, F., TAKAYANAGI, M. Formation of the bilayer membrane from a series of quaternary ammonium salts. **Chem. Lett.**, Tokyo, n. 4, p. 387-390, 1977.
- LAMY-FREUND, M.T., FERREIRA, V.F.N., SCHREIER, S. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. **J. Antibiotics**, Tokyo, v. XXXVIII, n. 6, p. 753-757, 1985.
- LEGENDRE, J.-Y., SZOKA Jr., F.C. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 9, n. 10, p. 1235-1242, 1992.
- LESSA, M.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayer wetting on polymer surfaces. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 182, p. 166-171, 1996.
- LIAO, R.S., RENNIE, R.P., TALBOT, J.A. Assessment of the effect of amphotericin B on vitality of *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1034-1041, 1999.
- LITZINGER, D.C., HUANG, L. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1113, p. 201-227, 1992.
- LOPEZ-BERESTEIN, G. Liposomes as carriers of antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 31, n. 5, p. 675-678, 1987.
- LOPEZ-BERESTEIN, G., BODEY, G.P., FRANKEL, L.S., MEHTA, K. Treatment of hepatosplenic fungal infections with liposomal-amphotericin B. **J. Clin. Oncol.**, Hagerstown, v. 5, p. 310-317, 1987.

- LOPEZ-BERESTEIN, G., HOPFER, R.L., MEHTA, R., MEHTA, K., HERSH, E.M., JULIANO, R.L. Liposome-encapsulated amphotericin B for the treatment of disseminated candidiasis in neutropenic mice. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 150, p. 278-283, 1984.
- LOPEZ-BERESTEIN, G., MACQUEEN, T., MEHTA, K. Protective effect of liposomal-amphotericin B against candida infection in mice. **Cancer Drug Delivery**, v. 1, p. 37-42, 1985.
- LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 4.ed. Baltimore: Williams&Wilkins, 1996. 1238 p.
- LOUIE, A., DRUSANO, G.L., BANERJEE, P., LIU, Q.F., LIU, W., KAW, P., SHAYEGANI, M., TABER, H., MILLER, M.H. Pharmacodynamics of fluconazole in a murine model of systemic candidiasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 42, p. 1105-1109, 1998.
- MARTIN, I., PÉCHEUR, E.-I., RUYSSCHAERT, J.-M., HOEKSTRA, D. Membrane fusion induced by a short fusogenic peptide is assessed by its insertion and orientation into target bilayers. **Biochemistry**, Columbus, v. 38, n. 29, p. 9337-9347, 1999.
- MARTINS, L.M.S., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic vesicles as bactericides. **Langmuir**, Columbus, v. 13, n. 21, p. 5583-5587, 1997.
- MATSUZAKI, K., SUGISHITA, K.-I., HARADA, M., FUJII, N., MIYAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1327, p. 119-130, 1997.
- MCDONNELL, G., RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.12, n. 1, 1999.
- MCGINNIS, M.R., RINALDI, M.G. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. In: LORIAN, V., ed. **Antibiotics in laboratory medicine**. 4.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 176-211.
- MEHTA, R.T., MEHTA, K., LOPEZ-BERESTEIN, G., JULIANO, R.L. Effect of liposomal amphotericin B on murine macrophages and lymphocytes. **Infect. Immun.**, Washington, v. 47, n. 2, p. 429-433, 1985.
- MEINDERS, J.M., VAN DER MEI, H.C., BUSSCHER, H.J. Deposition efficiency and reversibility of bacterial adhesion under flow. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 176, p. 329-341, 1995.
- Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11 ed. Rahway: Merck, 1989. p. 10100.
- MEYER, O., KIRPOTIN, D., HONG, K., STERNBERG, B., PARK, J.W., WOODLE, M.C., PAPAHAZDOPOULOS, D. Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, n. 25, p. 15621-15627, 1998.

- MILHAUD, J., LANCELIN, J.M., MICHELS, B., BLUME, A. Association of polyene antibiotics with sterol-free lipid membranes: I. Hydrophobic binding of filipin to dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1278, p. 223-232, 1996.
- MORTARA, R.A., QUINA, F.H., CHAIMOVICH, H. Formation of closed vesicles from a simple phosphate diester. Preparation and some properties of vesicles of dihexadecyl phosphate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 81, n. 4, p. 1080-1086, 1978.
- MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 6.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p. 1482.
- NASCIMENTO, D.B., RAPUANO, R., LESSA, M.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Counterion effects on properties of cationic vesicles. **Langmuir**, Columbus, v. 14, n. 26, p. 7387-7391, 1998.
- NCCLS. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087.
- NEW, R.R.C. Introduction. In: New, R.R.C., ed. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL PRESS, 1994. p. 1-32.
- NEW, R.R.C. Preparation of liposomes. In: New, R.R.C., ed. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL PRESS, 1994. p. 33-104.
- NEW, R.R.C., BLACK, C.D.V., PARKER, R.J., PURI, A., SCHERPHOF, G.L. Liposomes in biological systems. In: New, R.R.C., ed. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: IRL PRESS, 1994. p. 221-252.
- NEW, R.R.C., CHANCE, M.L., HEATH, S. Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 8, p. 371-381, 1981.
- NEW, R.R.C., CHANCE, M.L., THOMAS, S.C., PETERS, W. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. **Nature**, London, v. 272, n. 2, p. 55-56, 1978.
- NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 6, p. 3905-3908, 1994.
- OCKMAN, N. Reflection spectra from monolayers of amphotericin B and amphotericin B-cholesterol spread on water. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 373, p. 481-489, 1974.
- OMRI, A., RAVAOARINORO, M., POISSON, M. Incorporation, release and in-vitro antibacterial activity of liposomal aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 36, p. 631-639, 1995.
- OUSSOREN, C., STORM, G. Targeting to lymph nodes by subcutaneous administration of liposomes. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 162, p. 39-44, 1998.

- OVERBEEK, J.T.H.G. Recent developments in the understanding of colloid stability. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 58, p. 408-422, 1977.
- PANDEY, R.C., RINEHART Jr., K.L. Polyene Antibiotics. VII. Carbon-13 nuclear magnetic resonance evidence for cyclic hemiketals in the polyene antibiotics amphotericin B, nystatin A₁, tetrin A, tetrin B, lucensomycin, and pimaricin ^{1,2)}. **J. Antibiotics**, Tokyo, v. XXIX, n. 10, p. 1035-1042, 1976.
- PAPAHADJOPOULOS, D., ALLEN, T.M., GABIZON, A., MAYHEW, E., MATTHAY, K., HUANG, S.K., LEE, K.-D., WOODLE, M.C., LASIC, D.D., REDEMANN, C., MARTIN, F.J. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 88, p. 11460-11464, 1991.
- PEBERDY, J.F. Fungal cell walls - A review. In: KUHN, P.J., TRINCI, A.P.J., JUNG, M.J., GOOSEY, M.W., COPPING, L.G., eds. **Biochemistry of cell walls and membranes in fungi**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 5-30.
- PÉCHEUR, E.-I., SAINTE-MARIE, J., BIENVENÜE, A., HOEKSTRA, D. Lipid headgroup spacing and peptide penetration, but not peptide oligomerization, modulate peptide-induced fusion. **Biochemistry**, Columbus, v. 38, n. 1, p. 364-373, 1999.
- PÉCHEUR, E.I., SAINTE-MARIE, J., BIENVENÜE, A., HOEKSTRA, D. Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion. **J. Membrane Biol.**, v. 167, p. 1-17, 1999.
- POURKAVOOS, N. Antimicrobial activity of cephaloridine in the presence of crude and purified preparations of bacterial β -lactamases before and after liposome encapsulation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 82, p. 53-60, 1992.
- RÄDLER, J.O., KOLTOVER, I., SALDITT, T., SAFINYA, C.R. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. **Science**, Washington, v. 275, n. 7, p. 810-814, 1997.
- RAPUANO, R., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Physical adsorption of bilayer membranes on silica. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 193, p. 104-109, 1997.
- RAPUANO, R., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Supported bilayers on silica. **J. Colloid Interface Sci.**, New York, v. 226, 2000.
- RHO, J.P., CUPO, J.H. Efficacy and toxicity of amphotericin B liposomal and lipid formulations. **J. Pharmacy Technology**, V. 11, p 99-104, 1995.
- RINALDI, M.G. Biology and pathogenicity of *Candida* species. In: BODEY, G.P., ed. **Candidiasis - Pathogenesis, diagnosis, and treatment**. 2.ed. New York: Raven Press, 1993. p. 1-20.
- RINNERT, H., THIRION, C., DUPONT, G., LEMATRE, J. Structural studies on aqueous and hydroalcoholic solutions of a polyene antibiotic: amphotericin B. **Biopolymers**, v. 16, p. 2419-2427, 1977.

- RODIONOVA, N.A., TATULIAN, S.A., JÄHNIG, F., TAMM, L.K. Characterization of two membrane-bound forms of OmpA. **Biochemistry**, Columbus, v. 34, n. 6, p. 1921-1929, 1995.
- ROMANINI, D., AVALLE, G., FARRUGGIA, B., NERLI, B., PICÓ, G. Spectroscopy features of the binding of polyene antibiotics to human serum albumin. **Chem.-Biol. Interact.**, Shannon, v. 115, p. 247-260, 1998.
- ROSE, A.H., HARRISON, J.S. **The yeasts**. 2.ed. London: Academic Press, v. 4, 1991. p. 765.
- ROUSER, G., FLEISCHER, S., YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids**, Champaign, v. 5, n. 5, p. 494-496, 1970.
- SALAY, L.C., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic bilayer wetting on SiO₂ surfaces. **J. Phys. Chem., B**, Columbus, v. 102, n. 20, p. 4011-4015, 1998.
- SALAY, L.C., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Wetting of SiO₂ surfaces by phospholipid dispersions. **J. Adhesion Sci. Technol.**, v. 13, n. 10, p. 1165-1179, 1999.
- SCHALES, O., SCHALES, S.S. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 140, p. 879-884, 1941.
- SCHIFFELERS, R.M., BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M., SNIJDERS, S.V., STORM, G. Localization of sterically stabilized liposomes in Klebsiella pneumoniae-infected rat lung tissue: influence of liposome characteristics. **Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1421, p. 329-339, 1999.
- SCHLEGEL, H.G. **General Microbiology**. 7.ed. Cambridge: University Press, 1993. p. 655.
- SEOANE, R., MIÑONES, J., CONDE, O., CASAS, M., IRIBARNEGARAY, E. Molecular organisation of amphotericin B at the air-water interface in the presence of sterols: a monolayer study. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1375, p. 73-83, 1998.
- SIAU, H., KERRIDGE, D. The effect of antifungal drugs in combination on the growth of *Candida glabrata* in solid and liquid media. **J. Antimicrob. Chemother.**, Lodon, v. 41, p. 357-366, 1998.
- SICCHIEROLLI, S.M., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bacteria flocculation and death by cationic vesicles. **Langmuir**, Columbus, v. 11, n. 8, p. 2991-2995, 1995.
- SINGH, S.P., SINGH, S.R., WILLIAMS, Y.U., JONES, L., ABDULLAH, T. Antigenic determinants of the OmpC porin from *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4600-4605, 1995.
- SKVARIA, J. A physico-chemical model of microbial adhesion. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, v. 89, n. 15, p. 2913-1921, 1993.
- SOUZA, L.C., MARANHÃO, R.C., SCHREIER, S., CAMPA, A. In-vitro and in-vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with a triglyceride-rich emulsion. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 32, p. 123-132, 1993.

- STEIN, C.A., CHENG, Y.-C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents-is the bullet really magical? **Science**, Washington, v. 261, n. 20, p. 1004-1011, 1993.
- STERNBERG, B., HONG, K., ZHENG, W., PAPAHAADJOPOULOS, D. Ultrastructural characterization of cationic liposome-DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity in vivo. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1375, p. 23-35, 1998.
- STORM, G., TEN KATE, M.T., WORKING, P.K., BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes: effects on bacterial blood clearance capacity of the mononuclear phagocyte system. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 3, p. 111-115, 1998.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 4.ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995. 1064 p.
- SZOKA, F., PAPAHAADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipides vesicles (liposomes). **Annu. Rev. Biophys. Bioeng.**, v. 9, p. 465-506, 1980.
- TÁPIAS, G.N., SICCHIEROLLI, S.M., MAMIZUKA, E.M., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic vesicles and *Escherichia coli*. **Langmuir**, Columbus, v. 10, n. 10, p. 3461-3465, 1994.
- TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. p. 586.
- TSURUTA, L.R., QUINTILIO, W., COSTA, M.H.B., CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and an antigenic protein: the physical chemistry of the immunoadjuvant action. **J. Lipid Res.**, New York, v. 38, p. 2003-2011, 1997.
- VAN ETEN, E.W.M., TEN KATE, M.T., STEARNE, L.E.T., BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Amphotericin B liposomes with prolonged circulation in blood: in vitro antifungal activity, toxicity, and efficacy in systemic candidiasis in leukopenic mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 39, n. 9, p. 1954-1958, 1995.
- VANDEPUTTE, J., WACHTEL, J.L., STILLER, E.T. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a Streptomyces. **Antibiot. Annu.**, p. 587-591, 1955-1956.
- VITAS, A.I., DÍAZ, R., GAMAZO, C. Effect of composition and method of preparation of liposomes on their stability and interaction with murine monocytes infected with *Brucella abortus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 40, n. 1, p. 146-151, 1996.
- VOET, D., VOET, J.G. **Biochemistry**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. p. 1361.
- WACKER, M., SCHUBERT, R. From mixed micelles to liposomes: critical steps during detergent removal by membrane dialysis. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 162, 171-175, 1998.
- WEBB, M.S., WHEELER, J.J., BALLY, M.B., MAYER, L.D. The cationic lipid stearylamine reduces the permeability of the cationic drugs verapamil and prochlorperazine to lipid bilayers: implications for drug delivery. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1238, p. 147-155, 1995.

- WEISS, M.S., KREUSCH, A., SCHILTZ, E., NESTEL, U., WELTE, W., WECKESSER, J., SCHULZ, G.E. The structure of porin *Rhodobacter capsulatus* at 1.8 Å resolution. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 280, n. 2, p. 379-382, 1991.
- WELTE, W., NESTEL, U., WACKER, T., DIEDERICH, K. Structure and function of the porin channel. **Kidney Int.**, New York, v. 48, p. 930-940, 1995.
- WHITE, T.C., MARR, K.A., BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, p. 382-402, 1998.
- WIESE, A., REINERS, J.O., BRADENBURG, K., KAWAHARA, K., ZÄHRINGER, U., SEYDEL, U. Planar asymmetric lipid bilayers of glycosphingolipid or lipopolysaccharide on one side and phospholipids on the other: membrane potential, porin function, and complement activation. **Biophys. J.**, New York, v. 70, p. 321-329, 1996.
- WOODLE, M.C., COLLINS, L.R., SPONSLER, E., KOSSOVSKY, N., PAPAHAADJOPOULOS, D., MARTIN, F. J. Sterically stabilized liposomes - Reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. **Biophys. J.**, New York, v. 61, p. 902-910, 1992.
- WOODLE, M.C., LASIC, D.D. Sterically stabilized liposomes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1113, p. 171-199, 1992.
- WOODLE, M.C., PAPAHAADJOPOULOS, D. Liposome preparation and size characterization. In: PACKER, L., FLEISCHER, S., ed. **Biomembranes**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 431-455.
- WORKING, P.K. Amphotericin B colloidal dispersion. **Chemotherapy**, Basel, v. 45, sup. 1, p. 15-26, 1999.
- WORKING, P.K., NEWMAN, M.S., SULLIVAN, T., YARRINGTON, J. Reduction of the cardiotoxicity of doxorubicin in rabbits and dogs by encapsulation in long-circulating, pegylated liposomes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 289, p. 1128-1133, 1999.

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO