UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Arranjos supramoleculares de lípide catiônico, antibióticos e polímeros: preparação, caracterização e atividade contra bactérias multirresistentes e micobactérias de crescimento rápido.

Letícia Dias de Melo Carrasco

Tese para a obtenção do título de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

SÃO PAULO
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Arranjos supramoleculares de lípide catiônico, antibióticos e polímeros: preparação, caracterização e atividade contra bactérias multirresistentes e micobactérias de crescimento rápido.

Letícia Dias de Melo Carrasco

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de DOUTOR.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

SÃO PAULO
2016

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

Carrasco, Letícia Dias de Melo
C313a Arranjos supramoleculares de lípide catiônico, antibióticos e polímeros: preparação, caracterização e atividade contra bactérias multirresistentes e micobactérias de crescimento rápido / Letícia Dias de Melo Carrasco. -- São Paulo, 2016.
138p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Carmona-Ribeiro, Ana Maria
Co-orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello

1. Microbiologia médica 2. Materiais nanoestruturados I. T. II. Carmona-Ribeiro, Ana Maria, orientador. III. Sampaio, Jorge Luiz Mello, co-orientador.

616.01 CDD

Letícia Dias de Melo Carrasco

Arranjos supramoleculares de lípide catiônico, antibióticos e polímeros: preparação, caracterização e atividade contra bactérias multirresistentes e micobactérias de crescimento rápido

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro
Orientadora / Presidente

Prof.
1° examinador

Prof.
2° examinador

Prof.
3° examinador

Prof.
4° examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

Aos meus tesouros...

Meu esposo Fábio,
Por acreditar na minha capacidade e talento, por abdicar de seus sonhos pela realização dos meus, e por me mostrar que sou forte!
Obrigada pelo incansável incentivo, pela motivação diária, compreensão, paciência e companheirismo!
Juntos somos mais!

Minha amada filha, Melissa,
Por agregar tanta doçura e alegria aos meus dias, e que mesmo tão pequenina e inocente já me ensinou tantas coisas da vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha força, luz e suporte!

À profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro, pela confiança, compreensão e orientação, pelos incontáveis ensinamentos ao longo desses (quase) 8 anos juntas, por todas as oportunidades e conhecimentos transmitidos, e por mostrar que o entusiasmo frente a novos desafios é fundamental!

Ao prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio, por despertar em mim o desejo de retornar à pesquisa! Mais que um chefe, foi e sempre será referência de amor e dedicação à microbiologia, obrigada pelos ensinamentos e incentivos!

À minha família... Meus pais, pelo incentivo, carinho, disponibilidade, orações; Em especial à mamãe, que abdicou dos seus compromissos, por muitas vezes, para me ajudar com a Melissa; Minha sogra, por sempre ter uma palavra de incentivo e sabedoria e pelas orações; Keila, pela paciência com meus desabafos; Juninho e Tati pelo pouso e amizade repletos de generosidade... Enfim, a contribuição de todos foi essencial para a concretização deste sonho!

Aos amigos do laboratório de Biocolóides, Rodrigo, Luccas, Ronaldo, Sirlei e Eliete, agradeço todo o apoio, amizade e auxílio ao longo da realização deste trabalho!

Às amigas do laboratório de Microbiologia, Fabiana, Bruna, Juliana, Mayne, pela colaboração, descontração e amizade. Com a companhia de vocês o trabalho foi até mais leve! Em especial à querida Hadassa, palavras não me bastam para lhe agradecer a receptividade e a gratuidade com que você contribuiu enormemente para a conclusão deste trabalho. Obrigada amore, você é 10!

Ao prof. Dr. Mario H. Hirata pela concessão das células THP-1, e à Gabriela Guimarães Sousa Leite, por todo apoio, suporte e conhecimentos transmitidos para a execução dos ensaios com os macrófagos.

Aos funcionários da Central Analítica do IQ-USP, particularmente Vânia e Alfredo, pela disponibilidade, auxílio e análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e apoio, e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tencológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Porque onde estiver o vosso tesouro, aí estará também o vosso coração”.

(Mateus 6, 21)

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biocolóides do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, bem como no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ambos na Universidade de São Paulo, com bolsa de Doutorado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2012/24534-1.

RESUMO

CARRASCO, L.D.M. Arranjos supramoleculares de lípide catiônico, antibióticos e polímeros: preparação, caracterização e atividade contra bactérias multirresistentes e micobactérias de crescimento rápido. **Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo,** São Paulo, 2016.

Arranjos supramoleculares combinando o lípide catiônico brometo de dioctadecildimetilamônio (DOD) com polímeros, como carboximetilcelulose (CMC) e cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA), foram preparados na forma de nanopartículas (NPs), na ausência ou presença de antimicrobiano tradicional, como a claritromicina (CLA). NPs preparadas por atração eletrostática entre os fragmentos de bicamada (BF) de DOD, CMC e PDDA foram avaliadas, *in vitro*, quanto à atividade contra isolados clínicos de micro-organismos multirresistentes (MR) a antimicrobianos, como *Pseudomonas aeruginosa* MR, *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima carbapenemase do tipo KPC, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina (MRSA) e *Candida albicans* resistente ao fluconazol, através do método de plaqueamento e contagem de viáveis. As NPs de DOD BF/CMC/PDDA apresentam alta atividade de amplo espectro contra micro-organismos MR, em que o PDDA é o componente responsável pela excelente atividade biocida das NPs. O mecanismo de ação antimicrobiana indica a dissociação dessas NPs na presença dos micro-organismos, com a remoção de biopolímeros da parede celular microbiana pelo PDDA, conforme visualizado por microscopia eletrônica de varredura, ocorrendo lise da membrana microbiana e liberação de compostos fosforilados para o meio extracelular. Também foram desenvolvidas neste trabalho NPs carreadoras de CLA à base de DOD e polímeros. Solução etanólica contendo CLA/DOD foi injetada em solução aquosa de CMC, formando arranjos coloidalmente estáveis e aniônicos, que posteriormente foram adicionados de solução de PDDA, para a obtenção de arranjos estáveis e catiônicos. CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA NPs incorporaram CLA em quantidade suficiente para inibir o crescimento de *M. abscessus* no interior de macrófagos bem como evitar a formação de biofilmes, sendo que altas doses de CLA foram tóxicas aos macrófagos, enquanto doses menores apresentaram baixa toxicidade e boa atividade antimicrobiana. NPs catiônicas carreando CLA foram tóxicas aos macrófagos nas concentrações de PDDA testadas. A natureza particulada das CLA NPs possivelmente aumenta a retenção intracelular de CLA em comparação com CLA livre, podendo prolongar atividade da CLA contra patógenos intracelulares. Desta maneira, arranjos supramoleculares combinando lípide e polímeros, com ou sem antimicrobianos tradicionais poderão encontrar diversas aplicações nas áreas farmacêutica, médica, alimentícia e biotecnológica.

Palavras-chave: Auto-associação de lípide, antibiótico e polímeros; nanopartículas antimicrobianas; micro-organismos multirresistentes; extravasamento de compostos fosforilados intracelulares; micobactéria de crescimento rápido; nanocarreadores de claritromicina; efeito bacteriostático intracelular; inibição de crescimento de biofilme.

ABSTRACT

CARRASCO, L.D.M. Supramolecular assemblies of cationic lipid, antibiotics and polymers: preparation, characterization and activity against multidrug resistant bacteria and fast growing mycobacteria. **Thesis (PhD degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo,** São Paulo, 2016.

Supramolecular assemblies combining cationic lipid dioctadecyldimethylammonium bromide (DOD) and polymers, such as sodium carboxymethylcellulose (CMC) and poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA), were prepared as nanoparticles (NPs), in the absence or presence of traditional antibiotic, such as clarithromycin (CLA). NPs prepared by electrostatic attraction between DOD bilayer fragments (BF), CMC and PDDA were evaluated against clinical strains of multidrug resistant (MDR) microorganisms, such as *Pseudomonas aeruginosa* MDR, *Klebsiella pneumoniae* producer of KPC carbapenemase enzyme, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Candida albicans* fluconazole resistant, by plating and colony forming unities counting. DOD BF/CMC/PDDA NPs display high and broad-spectrum activity against MDR microrganisms, and PDDA is the excellent biocidal component in the NPs. The mechanism of antimicrobial action shows that NPs disassembly in the presence of microrganisms, with biopolymers withdrawn from the cell wall, as observed by scanning electron microscopy, consecutively lysing bacterial membrane as determined from the leakage of inner phosphorylated compounds. In this work there have also been developed NPs, based on lipid and polymers, as carriers for CLA. Ethanolic solution co-solubilizing CLA/DOD was injected in CMC aqueous solution, yielding colloidaly stable and anionic NPs, that were further added of PDDA solution, yielding stable and cationic NPs. CLA/DOD/CMC NPs and CLA/DOD/CMC/PDDA NPs incorporated CLA at doses high enough to inhibit *M. abscessus* growth inside macrophages or in biofilms. Larger CLA doses were toxic to macrophages while lower CLA doses reduced toxicity to macrophages despite their high antimicrobial activity. Cationic CLA NPs exhibited substantial toxicity against macrophages at the PDDA concentrations tested. The particulate nature of these CLA NPs possibly increases intracellular CLA retention in comparison to free CLA, probably extending CLA activity against intracellular pathogens. In conclusion, supramolecular assemblies combining cationic lipid and polymers, with or without traditional antibiotics, may find multiple possibilities of applications at pharmaceutical, medical, food and biotecnological fields.

Keywords: Self-assembly of lipid and polymers; antimicrobial nanoparticles; multidrug resistant microrganisms; leakage of intracelular phosphorilated compounds; rapidly growing mycobacteria; clarithromycin nanocarriers; intracelular bacteriostatic effect; inhibition of biofilm growth.

Artigos Completos Publicados em Periódicos Durante o Doutoramento

- Carmona-Ribeiro, A. M. e de Melo Carrasco, L. D. (2013). "Cationic antimicrobial polymers and their assemblies." International Journal of Molecular Sciences **14**(5): 9906-9946.

- Naves, A. F., Palombo, R. R., Carrasco, L. D., Carmona-Ribeiro, A. M. (2013). "Antimicrobial particles from emulsion polymerization of methyl methacrylate in the presence of quaternary ammonium surfactants." Langmuir **29**(31): 9677-9684.

- Carmona-Ribeiro, A. M. e Carrasco, L. D. M. (2013). "Fungicidal assemblies and their mode of action." OA Biotechnology **2**(3): 25.

- Ragioto, D. A., Carrasco, L. D., Carmona-Ribeiro, A. M. (2014). "Novel gramicidin formulations in cationic lipid as broad-spectrum microbicidal agents." International Journal of Nanomedicine **9**: 3183-3192.

- Carmona-Ribeiro, A. M., de Melo Carrasco, L. D. (2014). "Novel formulations for antimicrobial peptides." International Journal of Molecular Sciences **15**(10): 18040-18083.

- Carrasco, L. D., Sampaio, J. L. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2015). "Supramolecular cationic assemblies against multidrug-resistant microorganisms: activity and mechanism of action." International Journal of Molecular Sciences **16**(3): 6337-6352.

- Sanches, L. M., Petri, D. F., de Melo Carrasco, L. D., Carmona-Ribeiro, A. M. (2015). "The antimicrobial activity of free and immobilized poly (diallyldimethylammonium) chloride in nanoparticles of poly (methylmethacrylate)." Journal of Nanobiotechnology **13**: 58.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Dz	Diâmetro hidrodinâmico médio
et al.	e outros
% Inc	Porcentagem de Incorporação
ALB	Ágar Luria Broth
AMH	Ágar Mueller Hinton
ANOVA	Análise de variância
AS	Ágar Sabouraud
ATCC	*American Type Culture Collection*
BF	Fragmentos de Bicamada
BPC	Cromatograma de Pico Base
CAQs	Compostos de Amônio Quaternário
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLA	Claritromicina
CMC	Carboximetilcelulose
CMM	Concentração Microbicida Mínima
Col	Colesterol
CVV	Candidíase Vulvovaginal
DCP	Dicetilfosfato
DDAB	Brometo de Dicetildimetilamônio
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOD	Brometo de Dioctadecildimetilamônio
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGCG	Epigalocatequina galato
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
FACS	Separador de células por fluorescência ativada
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
KPC	*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
LB	Luria Broth

MAC Complexo *Mycobacterium avium*

MBL Metalo-Beta-Lactamase

MDR *Multidrug Resistant*

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

MHB-II Caldo Mueller-Hinton II cátion ajustado

MNT Micobactérias Não Tuberculosas

MOI Multiplicidade de infecção

MPEG-DSPE Metilpolietilenoglicol-diestearoil-fosfatidil etanolamina

MR Multirresistente

MRSA *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MS Espectrometria de Massas

MM Massa Molar

NHS-PEG-DSPE Aminopropil-polietilenoglicol-carbamildiestearoil-fosfatidil etanolamina

NPs Nanopartículas

OMS Organização Mundial da Saúde

P Polidispersidade

PBP2a Proteína Ligante de Penicilina Alterada do MRSA

PDDA Cloreto de poli(dialildimetilamônio)

PEG polietilenoglicol

PGA poli(ácido glicólico)

Pi Fosfato inorgânico

PI Iodeto de propídeo

PLA poli(ácido lático)

PLGA poli(lático-co-glicólico)

PMA Acetato de forbol-miristato

PVA Álcool polivinílico

R Resistente

TSB *Tryptic Soy Broth*

UFC Unidades Formadoras de Colônias

UV Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

ζ	Potencial zeta
λ	Comprimento de onda
ε	Absortividade molar
l	Comprimento da cubeta
C	Concentração
μ	Mobilidade eletroforética
η	Viscosidade
ξ	Constante dielétrica
T	Temperatura (kelvin)
d	Diâmetro médio do particulado
k_b	Constante de Boltzmmann

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática de arranjos supramoleculares como plataformas para entrega de fármacos: lipossomo (A) e nanopartícula polimérica (B). 32

Figura 2. Injeção de solução etanólica de CLA/DOD em solução aquosa de CMC para o preparo das dispersões de CLA/DOD/CMC. 51

Figura 3. Porcentagem de metanol (solvente B) presente na fase móvel em função do tempo da realização do cromatograma do HPLC. 56

Figura 4. Esquema da microplaca para determinação da CIM da CLA livre ou combinada às NPs, para a cepa ATCC 29213 de *S. aureus*, em que um composto/NPs foi adicionado em cada linha (A-H), e realizada diluição seriada (fator 2) do poço 1 em direção ao poço 11. O poço 12 foi mantido apenas com meio de cultura e D-glicose, para controle (C+). 57

Figura 5. Resultados descritos nesta tese para NPs e suas respectivas atividades contra micro-organismos. 65

Figura 6. Distribuição de tamanho de DOD BF 2 mM em solução de D-glicose 0,264 M (A) e representação esquemática de DOD BF (B). 66

Figura 7. Distribuição de tamanho dos arranjos aniônicos compostos de 0,1 mM de DOD BF e 0,1 mg/mL de CMC em solução de D-glicose 0,264 M (A) e representação esquemática de DOD BF/CMC (B). 67

Figura 8. Distribuição de tamanho das NPs híbridas compostas de 0,1 mM de DOD BF, 0,1 mg/mL de CMC e 0,1 mg/mL de PDDA, preparadas por auto-associação em solução de D-glicose 0,264 M (A) e representação esquemática de DOD BF/CMC/PDDA (B). 68

Figura 9. Viabilidade celular em função das concentrações de DOD ou PDDA para *P. aeruginosa* MR (5-7x10^7 UFC/mL) (A), *K. pneumoniae* produtora de KPC (4-5x10^7 UFC/mL) (B) ou MRSA (8x10^7 – 3x10^8 UFC/mL) (C); extravasamento de compostos fosforilados (%) em função das concentrações de DOD ou PDDA para cepas ATCC ou MR de *P. aeruginosa* (2x10^8 – 5x10^{10} UFC/mL) (D), *K. pneumoniae* (3x10^8–1x10^{10} UFC/mL) (E) ou *S. aureus* (5x10^9 – 6x10^{11} UFC/mL) (F). As interações ocorreram durante 1 hora, e as CMM para PDDA nas NPs estão indicadas por setas (A, B e C). 70

Figura 10. Viabilidade celular em função das concentrações de DOD ou PDDA para *C. albicans* fluconazol R a 6-8x10^5 UFC/mL. As interações ocorreram durante 1 hora, e a CMM para PDDA nas NPs está indicada por seta. 71

Figura 11. Log de UFC/mL em função das concentrações de DOD ou PDDA para a cepa de *C. albicans* fluconazol R, a 5-6x10^6 UFC/mL (A); Porcentagem de extravasamento de compostos fosforilados em função das concentrações de DOD ou PDDA para as cepas

ATCC e fluconazol resistente de *C. albicans* a $7x10^6$ – $1x10^7$ UFC/mL (B). As interações ocorreram por 1 hora. 73

Figura 12. Imagens obtidas por MEV da NPs (A); das NPs interagindo com $4,4x10^3$ (B) ou $8,9x10^5$ UFC/mL (C) de *P. aeruginosa* MR. Imagens de MEV da interação de PDDA (a 1,0 mg/mL de concentração final) com $8,9x10^5$ UFC/mL (D-E) de *P. aeruginosa* MR; imagem das células de *P. aeruginosa* MR após interação com D-glicose 0,264 M. As concentrações finais das NPs utilizadas nas interações com as células de *P. aeruginosa* MR foram 0,05 mM DOD, 0,05 mg/mL CMC e 0,05 mg/mL PDDA..... 74

Figura 13. Diâmetro médio (Dz), potencial zeta (ζ) e polidispersidade (P) das dispersões de CLA/DOD/CMC (A, B, C) ou CLA/DOD/CMC/PDDA (D, E, F), em função da concentração de CMC ou PDDA. Concentrações finais de CLA, DOD e etanol são 130 μg/mL, 53 μg/mL e 2,5 %. As concentrações de CMC ou PDDA selecionadas para combinação nas NPs estão demonstradas por setas..... 77

Figura 14. Distribuições de tamanho da dispersão de DOD/CMC (A) e das NPs aniônicas de CLA/DOD/CMC antes (B) ou após diálise (C), e da dispersão de DOD/CMC/PDDA (D) e das NPs catiônicas de CLA/DOD/CMC/PDDA antes (E) ou após diálise (F). As dispersões sem CLA e antes da diálise continham 2,5 % de etanol. 78

Figura 15. Imagens obtidas por MEV dos arranjos aniônicos de CLA/DOD/CMC (A, B) e catiônicos de CLA/DOD/CMC/PDDA (C, D), ambos após diálise. 79

Figura 16. Cromatograma de pico base (BPC) (A) ao longo do tempo de eluição e espectro de massa (B) para o pico eluído por volta dos 15 minutos resultou em dois picos, da molécula inteira de CLA em m/z 748.7 e seu fragmento em m/z 590.5 (B), obtidos a partir da dispersão dialisada de CLA/DOD/CMC. 80

Figura 17. Viabilidade intracelular (%) de *M. abscessus*, a partir de $2,4x10^5$ UFC/mL, em função do tempo após infecção dos macrófagos THP-1. Macrófagos infectados interagiram por até 4 dias com o meio de cultura RPMI (linha pontilhada), CLA livre, CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA NPs. NPs sem CLA apresentaram viabilidade bacteriana semelhante à obtida na presença de meio de cultura apenas (não mostrado). Experimentos realizados em duplicata. 85

Figura 18. Viabilidade intracelular (%) de *M. abscessus*, a partir de $2,4x10^5$ UFC/mL, em função do tempo após infecção dos macrófagos THP-1. Macrófagos infectados interagiram por até 4 dias com o meio de cultura RPMI (linha pontilhada), CLA livre, ou com as NPs de CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA após diálise. Experimentos realizados em duplicata. 87

Figura 19. Viabilidade de macrófagos THP-1 (%) a partir de $1x10^5$ macrófagos/poço e análise por citometria de fluxo, na presença de RPMI (linha pontilhada), CLA livre, NPs controles (DOD/CMC e DOD/CMC/PDDA) e CLA NPs antes da diálise. Meio de cultura RPMI adicionado de 10% de DMSO interagiu com os macrófagos por 24h antes da análise. 89

Figura 20. Viabilidade de macrófagos THP-1 (%) a partir de $1x10^5$ macrófagos/poço e análise por citometria de fluxo, na presença de RPMI (linha pontilhada), CLA livre, NPs controles (DOD/CMC e DOD/CMC/PDDA) e CLA NPs após da diálise. Meio de cultura RPMI adicionado de 10% de DMSO interagiu com os macrófagos por 24h antes da análise. 90

Figura 21. Formação de biofilme de *M. abscessus* (ATCC 19977) na presença de CLA livre, CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA NPs durante 72h. Absorbâncias representam valores médios ± desvio padrão médio de duplicata de leituras para dois experimentos. Asterisco significa P<0,05 comparado com controle (biofilme *M. abscessus*), determinado utilizando análise de variância seguida do teste de Tulkey. 91

Figura 22. Formação de biofilme de *M. abscessus* (ATCC 19977) na presença de CLA livre, ou de CLA nas NPs dialisadas de CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA, durante 72h. Absorbâncias representam valores médios ± desvio padrão médio de duplicata de leituras para dois experimentos. Asterisco significa P<0,05 comparado com controle (biofilme *M. abscessus*), determinado utilizando análise de variância seguida do teste de Tulkey. 92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de arranjos nanoestruturados com atividade contra micro-organismos multirresistentes 38

Tabela 2. Exemplos de arranjos nanoestruturados com atividade contra micobactérias 41

Tabela 3. Exemplos de arranjos carreadores de CLA 43

Tabela 4. Estruturas químicas do lípide catiônico, dos polímeros e do antimicrobiano utilizados na preparação dos arranjos descritos neste trabalho. 44

Tabela 5. Valores de CMM para DOD BF e PDDA livre ou PDDA nas NPs contra cepas de micro-organismos MR. DOD BF está presente nas NPs na concentração de *2,5 ou **8,0 μ M. 71

Tabela 6. Determinação de fosfato inorgânico (Pi) total para os micro-organismos MR em duas quantidades de células distintas. 72

Tabela 7. Estabilidade coloidal dos arranjos de CLA/DOD preparados próximos à proporção equimolar de CLA:DOD. Antimicrobiano e lípide solubilizados em etanol foram dispersos em solução de D-glicose 0,264 M, obtendo as concentrações finais de CLA, DOD e etanol demonstradas abaixo. 75

Tabela 8. Estabilidade coloidal e propriedades físicas (Dz, P e ζ) dos arranjos de CLA/DOD/CMC preparados próximos à proporção equimolar de CLA:DOD em 100 μ g/mL de CMC, 0,264 M de D-glicose e 2,5 % de etanol. 76

Tabela 9. Composição e propriedades físicas (Dz, P e ζ) dos arranjos obtidos por injeção de solução etanólica de CLA/DOD em solução aquosa de CMC, a 2,5% de etanol, antes (ad) ou após diálise (dd). Alguns arranjos foram adicionados de solução de PDDA. PD: posteriormente determinado. 79

Tabela 10. Intensidade dos picos detectados para CLA por HPLC-MS, antes (ad) ou após diálise das CLA NPs (dd). 81

Tabela 11. CIM de CLA, DOD, CMC e PDDA contra *S. aureus* ATCC 29213, [CLA] nas CLA NPs antes (ad) e após diálise (dd), e porcentagem da incorporação de CLA nos arranjos (% Inc). 82

Tabela 12. Concentração dos componentes das NPs no ponto da inibição do crescimento bacteriano de *S. aureus* ATCC 29213. ad: antes da diálise; dd: após diálise. 83

Tabela 13. CIM dos compostos isolados e de seus arranjos, antes (ad) ou após a diálise (dd), contra duas cepas referência (*M. abscessus* ATCC 19977 e *M. peregrinum* ATCC 700686) e quatro isolados clínicos de *M. abscessus* (M1, M2, M3 e M4). O asterisco refere-se à [DOD] (µg/mL). 83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21

1.1. Micro-organismos multirresistentes a antimicrobianos 22

1.2. Micobactérias de crescimento rápido – *Mycobacterium abscessus* 26

1.2.1. Claritromicina no tratamento de *M. abscessus* 30

1.3. Arranjos supramoleculares antimicrobianos 31

1.4. Objetivos 45

2. MÉTODOS 46

2.1. Materiais 47

2.2. Procedência e cultivo de micro-organismos de importância clínica 47

2.3. Preparação das partículas de DOD BF/CMC/PDDA por auto-associação, conforme previamente descrito em (Melo *et al.*, 2010) 49

2.4. Preparação das nanopartículas de CLA/DOD pelo método da injeção etanólica, estabilizadas por CMC e auto-associadas com PDDA 50

2.5. Determinação de diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta das dispersões por espalhamento de luz dinâmico (DLS) 51

2.6. Determinação de lise de microorganismos por extravasamento de compostos fosforilados do intracelular e dosagem de fósforo inorgânico 52

2.7. Determinação da incorporação de CLA nas CLA NPs 54

2.7.1. Diálise para remoção da CLA livre 55

2.7.2. Determinação da incorporação de CLA nas NPs por HPLC-MS 55

2.7.3. Incorporação de CLA nas NPs (% Inc) por determinação da CIM de CLA 56

2.8. Determinação da atividade antimicrobiana 58

2.8.1. Atividade de NPs de DOD BF/CMC/PDDA contra micro-organismos multirresistentes por plaqueamento e contagem de viáveis 58

2.8.2. Atividade de CLA NPs contra *M. abscessus* por determinação da CIM 58

2.9. Determinação da atividade antimicrobiana de CLA NPs contra *M. abscessus* infectando macrófagos 59

2.9.1. Cultivo de células THP-1 e diferenciação em macrófagos 59

2.9.2. Infecção dos macrófagos por *M. abscessus* e interação com CLA NPs 60

2.10. Determinação de toxicidade das NPs contra macrófagos por citometria de fluxo 61

2.11. Determinação do crescimento de biofilme de *M. abscessus* na presença das CLA-NPs 62

2.12. Determinação de morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) 63

2.12.1. MEV das dispersões DOD BF/CMC/PDDA-bactérias após interação 63

2.12.2. MEV das dispersões de CLA/DOD/polímeros 63

3. RESULTADOS 64

3.1. Propriedades físicas de arranjos supramoleculares de DOD BF/CMC/PDDA... 66

3.2. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação de arranjos supramoleculares de DOD BF/CMC/PDDA contra micro-organismos multirresistentes 68

3.3. Propriedades físicas das NPs de CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA ... 75
3.4. Morfologia dos arranjos de CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA 79
3.5. Incorporação da CLA nas CLA NPs 80
3.5.1. Confirmação da presença de CLA por HPLC-MS 80
3.5.2. Quantificação de CLA por CIM 81
3.6. Atividade antimicrobiana das CLA NPs contra *M. abscessus* 83
3.6.1. CIM de CLA..... 83
3.6.2. Atividade contra *M. abscessus* intracelular infectando macrófagos 84
3.7. Toxicidade de CLA e CLA NPs contra macrófagos..... 88
3.8. Formação de biofilme de *M. abscessus* na presença de CLA e CLA NPs 91

4. DISCUSSÃO.....93
4.1. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação das NPs de DOD BF/CMC/PDDA contra micro-organismos MR 94
4.2. Atividade antimicrobiana das NPs de CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA contra *M. abscessus*..... 98

5. CONCLUSÕES 107

6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....110

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 112

8. SUPORTE FINANCEIRO 138

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Micro-organismos multirresistentes a antimicrobianos

Micro-organismos multirresistentes (MR) são assim definidos quando apresentam resistência contra duas ou mais classes distintas de antimicrobianos. O surgimento de micro-organismos MR é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das três maiores ameaças à saúde pública mundial (Bassetti *et al.*, 2011), o que gera impacto econômico e social sobre o sistema de saúde em todo o mundo As principais formas de resistência a antimicrobianos ocorrem por inativação enzimática do fármaco, modificação do alvo do antimicrobiano, diminuição da entrada do antimicrobiano na célula microbiana e efluxo do fármaco (Brooks e Brooks, 2014). Além disso, a disseminação dessas formas de resistência ocorre facilmente e pelo mundo todo, e o uso indiscriminado de antimicrobianos é o fator mais importante que contribui para o surgimento de resistência (CDC, 2013).

Quando as opções de tratamento com antimicrobianos de primeira e segunda escolha são limitadas em decorrência de resistência, é necessário o uso de antimicrobianos que podem ser mais tóxicos aos pacientes, que geralmente são mais caros e menos eficientes (CDC, 2013). Além do mais, o surgimento e disseminação de novos mecanismos de resistência a antimicrobianos ocorrem de forma muito mais rápida do que o desenvolvimento de novos fármacos (Brooks e Brooks, 2014; Ling *et al.*, 2015).

Algumas bactérias são patógenos humanos clássicos e podem apresentar perfis de resistência que limitam as opções de tratamento. *Staphylococcus aureus* é um desses patógenos. Trata-se de um coco Gram-positivo que pode causar uma ampla variedade de doenças no ser humano, desde infecções de pele e tecidos moles (Moran *et al.*, 2006) até infecções pulmonares (Parkins e Floto, 2015). Desde o surgimento e disseminação da resistência à penicilina, a meticilina e outras penicilinas semi-sintéticas tornaram-se a primeira linha de tratamento contra *Staphylococcus* spp. Porém, pouco tempo após a introdução da meticilina como tratamento de escolha, a resistência a esse antimicrobiano foi reportada (Enright *et al.*, 2002). *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) possui o gene *mecA*, presente

em uma ilha genômica móvel, o cassete cromossômico estafilocócico SCCmec. Este gene codifica a produção de proteína ligante de penicilina (PBP2a), funcional porém sem afinidade às penicilinas e outros beta-lactâmicos, acarretando a resistência a estes antimicrobianos, já que os beta-lactâmicos ligam-se a proteínas que participam da síntese da parede celular bacteriana, impedindo a formação da parede celular, resultando em lise bacteriana (Enright *et al.*, 2002). *S. aureus* é capaz de sobreviver em objetos inanimados e fômites, são resistentes à desidratação, o que favorece sua transmissão, mesmo sem contato direto entre as pessoas (Zuckerman *et al.*, 2009). Infecções causadas por MRSA anteriormente eram reportadas apenas em ambientes hospitalares, porém diversos casos tem sido relatados em pacientes comunitários (Pantosti e Venditti, 2009). Entre os antimicrobianos mais comumente utilizados para tratamento de infecções causadas por MRSA estão vancomicina, teicoplanina, linezolida e daptomicina. Porém já há relatos da resistência a alguns desses antimicrobianos (Kali, 2015). Desta forma, as opções terapêuticas para infecções causadas por MRSA estão cada vez mais restritas, por isso a necessidade de novos arranjos antimicrobianos como eficientes alternativas de tratamento.

Entretanto, dentre todos os problemas de resistência bacteriana, o mais preocupante envolve as bactérias Gram-negativas, pois elas estão tornando-se resistentes a quase todos os antimicrobianos que poderiam ser utilizados para seu tratamento (CDC, 2013). Bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos antimicrobianos são comumente relacionadas com processos infecciosos associados a ambientes hospitalares, contribuindo para o aumento de morbidade, mortalidade e custos (Nordmann *et al.*, 2009; Rosenthal *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2014), sendo que as bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* são os patógenos mais comuns (Jones, 2001; CDC, 2013; Curcio, 2014).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae, que pode produzir enzimas responsáveis pela resistência aos antimicrobianos, tais como beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e as carbapenemases, a exemplo de *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC). A produção de ESBLs leva à resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, com exceção de cefamicina e carbapenêmicos, mas estas enzimas podem ser inibidas por inibidores

de beta-lactamases, como o ácido clavulânico. Já as enzimas do tipo KPC são capazes de hidrolisar todos os antimicrobianos das classes das cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e até mesmo os inibidores de beta-lactamases, tornando as opções de tratamento bastante restritas. *K. pneumoniae* produtora de KPC pode causar diversos tipos de infecções, desde urinária até corrente sanguínea, podendo ser de difícil erradicação e tratamento, causando alto índice de mortalidade nas infecções de corrente sanguínea, por exemplo (CDC, 2013; Munoz-Price *et al.*, 2013).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa não fermentadora de glicose, e também representa um dos principais agentes de infecções hospitalares. É um importante patógeno de infecções da corrente sanguínea, do trato urinário e respiratório, principalmente em pacientes internados na unidade de terapia intensiva e imunocomprometidos (Rosenthal *et al.*, 2010). É uma espécie bacteriana que apresenta mecanismos indutivos de resistência, que face à pressão seletiva de antimicrobianos pode se tornar resistente a múltiplos antimicrobianos, particularmente por expressão de sistemas de efluxo e hiperexpressão de AmpC cromossômica (Potron *et al.*, 2015). A presença de enzimas que causam resistência a antimicrobianos, como ESBL, carbapenemases e as chamadas metalo-betalactamases (MBL) tem sido frequentemente relatada em bacilos Gram-negativos não fermentadores de Glicose, tais como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (Curcio, 2014). MBL são enzimas pertencentes ao grupo das betalactamases que possuem um ou mais íons metálicos em seu sítio catalítico. Devido à dependência do íon Zn^{+2}, a atividade dessas enzimas pode ser inibida pela presença de agentes quelantes de metais, tal como o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). Bactérias que expressam enzimas do tipo MBL usualmente apresentam resistência a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, inclusive aos carbapenêmicos, com exceção do aztreonam (Nordmann *et al.*, 2011). Mas além da atividade enzimática, a resistência de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos também pode ser decorrente da deficiência de porinas ou presença de bombas de efluxo, ou ainda por outras mutações genéticas (Potron *et al.*, 2015). Para estas cepas MR, as polimixinas (polimixina B e colistina) tem sido utilizadas, muitas vezes, como última opção de tratamento (Falagas e Michalopoulos, 2006; Biswas *et al.*, 2012). Todavia, a

reintrodução do uso destes antimicrobianos antigos para o tratamento de bactérias Gram-negativas MR foi seguida do surgimento de cepas também resistentes às polimixinas (Johansen *et al.*, 2008; Mammina *et al.*, 2012; Olaitan *et al.*, 2014), o que torna o tratamento de tais infecções um constante desafio na prática clínica.

Leveduras do gênero *Candida* vivem normalmente na pele e mucosas sem causar infecções, no entanto quando estas passam a se multiplicar excessivamente e causar sintomas, geram a candidídase, que é o processo infeccioso causado por estes patógenos. Dentre as diversas espécies desta levedura, *Candida albicans* é a mais comum, podendo causar candidíase em diversas sítios, desde as mucosas gastrointestinal, vaginal, esofagiana e orofaríngea até a corrente sanguínea, sendo responsável por infecções fúngicas tanto na comunidade como no ambiente hospitalar (CDC, 2013; Kabir e Ahmad, 2013). A maioria dos antifúngicos tem como alvo o ergosterol, que é o principal esterol presente na membrana plasmática dos fungos, seja interferindo na sua síntese (como é o caso dos azóis) ou removendo-o diretamente da membrana plasmática (como é o caso dos compostos poliênicos), o que acaba prejudicando o crescimento e proliferação celular (Prasad *et al.*, 2016). Além disso, os antifúngicos podem interferir com a síntese de componentes da parede celular fúngica (como é o caso das equinocandinas), afetando a integridade da célula, levando-a à morte (Prasad *et al.*, 2016).

O surgimento de resistência em leveduras como *Candida* spp. a antifúngicos tradicionalmente utilizados no tratamento de infecções fúngicas, como os da classe dos azóis (fluconazol, itraconazol, miconazol e cetoconazol), tem sido preocupante, já que dificulta muito o tratamento destes patógenos, aumentando a gravidade e a mortalidade das infecções por eles causadas (Kontoyiannis e Lewis, 2002; Carrillo-Munoz *et al.*, 2006; CDC, 2013; Kabir e Ahmad, 2013). A resistência de *Candida* spp. à classe dos azóis é a resistência antifúngica de maior prevalência (Kontoyiannis e Lewis, 2002), e é de natureza multifatorial, podendo envolver a modificação da proteína alvo na biossíntese do ergosterol ou até a superexpressão de genes codificadores de bombas de efluxo (Perea *et al.*, 2001; Cernicka e Subik, 2006; Prasad *et al.*, 2016). Infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. geralmente restringem-se a ambientes hospitalares e/ou pacientes com sistema imunológico bastante debilitado, ao passo que na comunidade, uma das infecções

mais comuns do trato genital feminino é a candidíase vulvovaginal (CVV). *Candida albicans* é responsável por cerca de 80-90% dos casos de CVV (Singh *et al.*, 2002), e é a espécie de *Candida* com maior sensibilidade aos antifúngicos da classe dos azóis (Sobel *et al.*, 1998). Porém, a resistência aos azóis tem se tornado cada vez mais frequente nestas infecções, principalmente em casos de CVV recorrente (Iavazzo *et al.*, 2011), que compreende a ocorrência de quatro ou mais episódios de CVV em um período de um ano (Mardh *et al.*, 2002). O tratamento de CVV recorrente geralmente é realizado com dose semanal de fluconazol por, pelo menos, 6 meses (Sobel *et al.*, 2004; CDC, 2006).

1.2. Micobactérias de crescimento rápido – *Mycobacterium abscessus*

Micobactérias são bacilos aeróbios, imóveis, que possuem uma distinta parede celular, rica em ácidos graxos de cadeias longas (ácidos micólicos) que estão covalentemente ligados ao peptídeoglicano-arabinogalactano, e também contendo lipídeos não covalentemente ligados a este polímero (Brennan, 2003; Kieser e Rubin, 2014). Esta espessa parede celular funciona como uma barreira contra a entrada de compostos antimicrobianos, contribuindo para a patogenicidade e resistência destes patógenos (Abedinzadeh *et al.*, 2015). .

Micobactérias não tuberculosas (MNT) são assim definidas como aquelas micobactérias de outras espécies que não complexo *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* (Parkins e Floto, 2015). Embora sejam conhecidas há bastante tempo, ainda sabe-se muito pouco sobre a patogenicidade das MNT em comparação com *M. tuberculosis* ou *M. leprae* (Orme e Ordway, 2014). As MNT são conhecidas como micobactérias de crescimento rápido, comparadas ao tempo de crescimento de *M. tuberculosis* (que leva de 3 a 4 semanas para formar colônias visíveis em meio de cultura), e são micro-organismos ubíquos, amplamente distribuídos no meio-ambiente, que podem ser isolados do solo e de fontes de água naturais. Tais bactérias podem causar principalmente infecções oportunistas, sendo que *Mycobacterium abscessus* e *Mycobacterium fortuitum* são as MNT mais associadas com surtos de infecções hospitalares, podendo inclusive ser altamente resistentes a organomercúrios, cloro, formaldeído (2%), glutaraldeído e outros desinfetantes comumente utilizados (Wallace *et al.*, 1998; Griffith *et al.*, 2007).

Uma importante habilidade das MNT que tem se tornado bastante relevante é a sua capacidade de aderir a superfícies, formando biofilmes, no ambiente e hipoteticamente *in vivo*, o que permite a sobrevivência destes bacilos por longos períodos de tempo, contribuindo para a persistência de suas infecções, já que funcionam como estratégia para resistir a condições adversas do ambiente no qual se encontram (Williams *et al.*, 2009; Orme e Ordway, 2014; Richards e Ojha, 2014). De fato, bactérias apresentam uma tendência natural de crescer como comunidades multicelulares, fixas a um substrato/superfície e encapsuladas em uma matriz, formando os biofilmes, e a maioria das espécies de micobactérias apresentam forte tendência de aderir a um substrato assim como às outras células de micobactérias presentes, podendo formar uma variedade de estruturas multicelulares micro e macroscópicas (Richards e Ojha, 2014). Além disso, infecções causadas por micobactérias geralmente apresentam longa persistência e alta tolerância a antimicrobianos, características muito compatíveis com às de infecções associadas com a presença de biofilmes, já que os micro-organismos encapsulados em biofilmes podem resistir até aos mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro (Anderson e O'Toole, 2008).

As MNT podem causar uma diversidade de processos infecciosos, sendo os mais comuns aqueles envolvendo pele e tecidos moles, principalmente relacionados a traumas e/ou procedimentos cirúrgicos, e os respiratórios, também conhecidos como micobacterioses pulmonares (Gonzalez-Santiago e Drage, 2015; Kasperbauer e De Groote, 2015). As infecções pulmonares crônicas causadas por MNT estão associadas a processo inflamatório gradual, com destruição do tecidual pulmonar, e são de prevalência pouco conhecida (Parkins e Floto, 2015). Complexo *Mycobacterium avium* (MAC), seguido de *Mycobacterium kansasii* e complexo *M. abscessus* são as três MNT que mais comumente causam tais doenças pulmonares em humanos nos Estados Unidos, sendo complexo *M. abscessus* a mais patogênica (Griffith *et al.*, 2007; Gonzalez-Santiago e Drage, 2015; Kobayashi *et al.*, 2015). Os sintomas das doenças pulmonares causadas por NTM são variáveis e não específicos, mas geralmente inclui tosse crônica ou recorrente. Os pacientes também podem apresentar fadiga, dispneia, febre, dor no peito, hemoptise e perda de peso, e conforme ocorre a evolução da doença, os sintomas são cada vez mais prevalentes

(Griffith *et al.*, 2007). A avaliação clínica do paciente com micobacteriose pulmonar pode ser ainda mais complicada devido à presença concomitante de outras doenças pulmonares, tais como fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica associada ao tabagismo, bronquiectasia, etc, e na ausculta pulmonar podem estar presentes roncos, crepitações, sibilos e guinchos (Griffith *et al.*, 2007).

Complexo *M. abscessus* é um grupo de MNT de crescimento rápido e multirresistentes a antimicrobianos, que causa majoritariamente infecções pulmonares, mas também infecções de pele e tecidos moles, osteomielite, linfadenite ou até infecções sistêmicas, sendo que este patógeno pode ser disseminado por medicamentos, anti-sépticos ou materiais médico-hospitalares contaminados, comumente causando surtos (Tiwari *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015). Tais patógenos apresentam resistência aos agentes antituberculosos de primeira linha, como rifampicina, isoniazida, etambutol e pirazinamida, e geralmente apresentam sensibilidade à amicacina, cefoxitina e claritromicina (CLA), e sensibilidade moderada ao imipenem (Griffith *et al.*, 2007; Griffith *et al.*, 2015). Porém, mesmo apresentando sensibilidade *in vitro* a alguns antimicrobianos, não há regime de tratamento que efetivamente cure a doença pulmonar causada por *M. abscessus* (Griffith *et al.*, 2007). Tratamentos com múltiplos antimicrobianos, incluindo a CLA, podem causar uma melhora clínica e regressão na doença pulmonar causada por este patógeno, combinados ou não com intervenções cirúrgicas (Griffith *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2015). Apesar do sucesso de tratamento variar de 25-30%, o prognóstico da doença pulmonar causada por *M. abscessus* é ruim, com taxa de mortalidade de 16-20% (Jarand *et al.*, 2011). O maior grupo de pacientes com micobacteriose pulmonar é composto por mulheres acima de 60 anos, caucasianas, não fumantes e sem predisposições ou doenças pulmonares conhecidas. Nestes casos, a progressão da doença pode ser mais lenta. No entanto, quando está associada com bronquiectasia ou doença micobacteriana prévia, ou ainda em associação com problemas gastro-esofágicos ou fibrose cística, a micobacteriose pulmonar por *M. abscessus* pode progredir rapidamente e de maneira fulminante (Griffith *et al.*, 2007).

Sabe-se que *M. abscessus* é capaz de evadir do sistema imunológico de defesa do ser humano, infectando e multiplicando-se dentro de fibroblastos e de macrófagos pulmonares (Byrd e Lyons, 1999; Jayachandran *et al.*, 2007). Ao contrário do que

ocorre com bactérias não patogênicas, que após serem fagocitadas acabam morrendo no meio ácido do lisossoma, o fagossoma contendo as células de *M. abscessus* que foram fagocitadas não consegue fundir-se com o lisossoma para exercer seu efeito contra os patógenos, permitindo que esta MNT permaneça viva, cresça e multiplique-se intracelularmente (Byrd e Lyons, 1999; Pieters, 2001a).

Complexo *M. abscessus* é composto por três subespécies: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* e *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Pela análise do sequenciamento completo do gene 16S rRNA as três subespécies são idênticas, sendo que esta é a técnica mais utilizada para identificação de espécies micobacterianas, pois este gene é altamente conservado nas micobactérias (Griffith *et al.*, 2015). No entanto, se for utilizado o sequenciamento parcial do gene *rpoB*, *M. abscessus* pode ser identificado em nível de subespécie (Adekambi *et al.*, 2006). A diferenciação a nível de subespécie é importante pois elas diferem entre si quanto à atividade, ou inatividade, de um gene indutível de resistência aos antimicrobianos da classe dos macrolídeos: o gene eritromicina metilase – *erm* – que codifica uma coletânea de metilases que impedem a ligação do macrolídeo ao seu alvo de ação (ribossomos), reduzindo a atividade inibitória destes fármacos (Griffith, 2014). *M. abscessus* subsp. *abscessus e M. abscessus* subsp. *bolletii* possuem o gene *erm* funcional, o que significa que se estes patógenos forem expostos a tratamento com macrolídeos, a atividade do gene *erm* é induzida, levando à resistência aos macrolídeos *in vivo*, mesmo que o resultado *in vitro* da concentração inibitória mínima (CIM) mostre sensibilidade aos macrolídeos. No entanto, deve-se destacar que cerca de 15 % dos isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* possuem uma mutação no gene *erm* que pode torná-lo não funcional (Brown-Elliott *et al.*, 2015). Já os isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense* possuem o gene *erm* menor e não funcional sendo, portanto, intrinsicamente sensíveis aos macrolídeos (Bastian *et al.*, 2011; Griffith, 2014). Por isso, a importância de diferenciar as subespécies de *M. abscessus*, já que podem ser determinantes para aumentar a chance de resposta ao tratamento.

1.2.1. Claritromicina no tratamento de *M. abscessus*

A claritromicina (CLA) (massa molecular - MM: 747,95 g/mol) é um antimicrobiano da classe dos macrolídeos, que atua no processo de síntese de proteínas pelas bactérias, ligando-se à porção 50S do ribossomo bacteriano, inibindo a atividade da enzima peptidil transferase, consequentemente interferindo com a translocação do aminoácido durante a síntese protéica (Brunton *et al.*, 2010). Possui um amplo anel de lactona, com 14 componentes, em sua estrutura química (Kanoh e Rubin, 2010), além de um grupamento amino terciário (pK 8,99) (McFarland *et al.*, 1997) que concede caráter catiônico à molécula em pH próximo ao fisiológico. A CLA apresenta absorbância máxima a 288 nm em espectro ultravioleta (UV), quando em clorofórmio, com $\varepsilon = 28$ (Moffat *et al.*, 2004), e é solúvel em acetona e clorofórmio, pouco solúvel em metanol, etanol e acetonitrila, e praticamente insolúvel em água (0,33 mg/L) (Em: <http://www.drugbank.ca/drugs/db01211>. Acesso em 01 maio 2016), sendo esta baixa solubilidade pH dependente (Salem, 1996). É considerada como um antimicrobiano com amplo espectro de ação, apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, inclusive contra *Helycobacter pylori* e *Mycobacterium* sp. (Salem e Duzgunes, 2003; Mohammadi *et al.*, 2011; Zuckerman *et al.*, 2011; Alhajlan *et al.*, 2013; Pan-In *et al.*, 2014), e geralmente é utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório e de tecidos moles (Wierzbowski *et al.*, 2006; Kanoh e Rubin, 2010).

Apesar da possibilidade de resistência indutível aos macrolídeos apresentada pelas subespécies de *M. abscessus*, e da baixa correlação entre a susceptibilidade *in vitro* de um antimicrobiano e sua resposta *in vivo*, os regimes de tratamento contra estes patógenos, mesmo variando de acordo com o local da infecção, incluem um macrolídeo no esquema terapêutico, sendo geralmente a CLA, em combinação com outros antimicrobianos por, pelo menos, quatro meses (Griffith *et al.*, 2007; Esteban e Ortiz-Perez, 2009; Lee *et al.*, 2015). Até porque CLA e azitromicina são os únicos fármacos cuja administração é por via oral e que apresentam atividade *in vitro* contra *M. abscessus* (Petrini, 2006). Estudos mostram que 91 % (Park *et al.*, 2008), 92,5 % (Huang *et al.*, 2010) e 60 % dos isolados clínicos de complexo *M. abscessus* apresentaram sensibilidade *in vitro* à CLA (Zhuo *et al.*, 2013). São considerados sensíveis à CLA os isolados com CIM ≤ 2 µg/mL para micobactérias de crescimento rápido (CLSI, 2011).

Além do mais, já foi observado que CLA é capaz de adentrar a diversos tipos de células em cultura, dentre elas os macrófagos, que são de extrema importância no que se refere a infecções causadas por *M. abscessus.* A entrada de CLA nos macrófagos é geralmente rápida e não saturável, no entanto o efluxo deste fármaco também é rápido (meia-vida de no máximo 15-20 minutos) (Carlier *et al.*, 1987; Tulkens, 1991). CLA parece poder acumular dentro de macrófagos ativados, mas provavelmente permanecendo nos lisossomas, tendo acesso limitado aos fagossomas onde ficam os patógenos, já que anteriormente já foi verificado que a CIM de CLA é maior para complexo *M. avium* intracelular do que extracelular (Carlier *et al.*, 1987; Mor *et al.*, 1994).

1.3. Arranjos supramoleculares antimicrobianos

Arranjos supramoleculares são complexos bem definidos de moléculas que se formam por interações não covalentes, as chamadas interações supramoleculares, que podem ser iônicas, hidrofóbicas, de van der Waals e pontes de hidrogênio (Varshey *et al.*, 2012). Tais interações permitem a formação de nanoestruturas, que refletem as informações das moléculas individuais, como carga e forma, e determinam suas interações atrativas ou repulsivas (Lehn, 2006), podendo ser utilizadas em inúmeras áreas, tais como no desenvolvimento de arranjos para aplicações biomédicas, materiais para tecnologia da informação, dispositivos para controle de problemas ambientais, etc. (Busseron *et al.*, 2013).

Lipossomos e nanopartículas (NPs) são os principais exemplos de arranjos supramoleculares utilizados para carrear e entregar fármacos. Lipossomos são estruturas vesiculares formadas por fosfolipídeos organizados em bicamadas concêntricas que envolvem um compartimento aquoso interno. Eles são formados espontaneamente quando anfifílicos são dispersos em água (Fielding e Lasic, 1999). Estes sistemas podem solubilizar fármacos hidrofóbicos na bicamada lipídica, ou susbtâncias hidrofílicas no compartimento aquoso interno, ou ainda moléculas anfifílicas entre a bicamada e a fase aquosa, e podem ser utilizados para proteger, imobilizar, isolar e liberar compostos em locais específicos (Munin e Edwards-Levy, 2011). Já as NPs podem ser formadas por polímeros, metais, compostos inorgânicos, dendrímeros e/ou lipídeos (Carmona-Ribeiro *et al.*, 2011). As partículas poliméricas,

por exemplo, podem ser formadas por auto-associação de copolímeros com segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos ou ainda por polímeros lineares, como poliacrilatos e poli(metacrilato de metila). Além disso, polímeros biodegradáveis podem ser utilizados na formação das NPs, tais como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(lático-co-glicólico) (PLGA) e polietilenoglicol (PEG) (Pandey e Khuller, 2004; Sharma *et al.*, 2004; Haerdi-Landerer *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). A combinação dos fármacos a estes arranjos pode ocorrer de formas variadas. No caso de polimerização dos monômeros para preparar as NPs, os fármacos podem ser combinados a estas NPs no momento da polimerização ou então covalentemente ligados às NPs já prontas. Já no caso de preparação das NPs por evaporação de solvente, polímero e fármaco são dissolvidos em um solvente orgânico miscível em água, e após ser adicionado em solução aquosa, é realizada a evaporação da fase orgânica, nanoprecipitando drogas e polímeros em NPs, de forma que o seu núcleo seja hidrofóbico e sua camada externa, hidrofílica (Zhang *et al.*, 2010). E no caso de dendrímeros, fármacos hidrofóbicos podem ser carreados no núcleo hidrofóbico enquanto fármacos hidrofílicos podem ligar-se às suas superfícies multivalentes por conjugação covalente ou atração eletrostática (Florence, 2005). A Figura 1 mostra uma representação esquemática de lipossomo e de nanopartícula polimérica como exemplos de arranjos carreadores de fármacos.

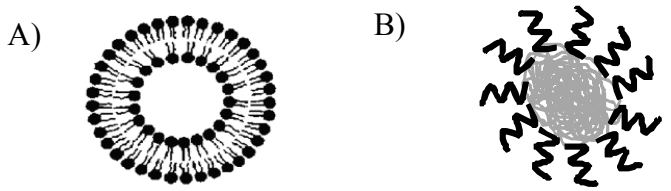


Figura 1. Ilustração esquemática de arranjos supramoleculares como plataformas para entrega de fármacos: lipossomo (A) e nanopartícula polimérica (B).

A vantagem de utilizar arranjos supramoleculares como carreadores de fármacos é que quando eles são administrados por via intravenosa, rapidamente são retirados da circulação por células do sistema fagocítico mononuclear, e tipicamente aumentam o acúmulo dos fármacos que carregavam em órgãos ricos em macrófagos (Gregoriadis, 1995; Gulyaev *et al.*, 1999; Bakker-Woudenberg *et al.*, 2005). Além do mais, a entrega de fármacos por carreadores nanoestruturados, como lipossomos e

NPs, pode favorecer a utilização de doses reduzidas do fármaco ou a redução na frequência de doses administradas, em função do aumento ou prolongamento da concentração do fármaco no local desejado, e com isso reduzindo sua toxicidade (Pinto-Alphandary *et al.*, 2000; Schiffelers *et al.*, 2001; Abed e Couvreur, 2014).

Particularmente, os fagócitos são fundamentais no combate a infecções bacterianas, já que eles são capazes de ingerir/fagocitar e destruir estes micro-organismos nos tecidos e/ou na corrente sanguínea (Briones *et al.*, 2008). No entanto, algumas bactérias são capazes de sobreviver no interior destes fagócitos, inibindo a fusão de lisossomas com fagossomas para formar os fagolisossomas (Pieters, 2001b), ou escapando do fagossoma e permanecendo no citoplasma do macrófagos (Hara *et al.*, 2007), ou ainda resistindo aos mecanismos microbicidas no fagolisossoma onde permanecem vivendo (Pinto-Alphandary *et al.*, 2000). Desta maneira, muitos patógenos são capazes de sobreviver e multiplicarem-se no interior de fagócitos, dando origem aos processos infecciosos intracelulares, causados por patógenos intracelulares obrigatórios ou facultativos (Pieters, 2001a; Briones *et al.*, 2008). Por isso, lipossomos ou NPs como carreadores de antibióticos representam uma estratégia interessante para o tratamento de infecções intracelulares, já que os arranjos combinados com o fármaco são capazes de adentrar aos fagócitos de maneira semelhante à dos patógenos intracelulares, conhecida como entrega passiva (*"passive targeting"*) (Richardson e Smith, 1983; Pinto-Alphandary *et al.*, 2000; Pumerantz *et al.*, 2011; Abed e Couvreur, 2014). No entanto, para exercer tal atividade intracelular, é necessário que o arranjo penetre o interior celular, liberando o antimicrobiano de forma suficiente e contínua dentro da célula em co-localização com os patógenos (Briones *et al.*, 2008).

A fagocitose de partículas carreadoras de fármacos pelos macrófagos depende das propriedades físico-químicas destes arranjos, tais como composição, formato, tamanho e propriedades de superfície, como o potencial zeta. A presença de lípides na composição dos arranjos supramoleculares, por exemplo, pode facilitar sua permeação pelas membranas das células do organismo, e ainda favorecer a incorporação de substâncias com baixa solubilidade em água, as quais apresentam limitações na administração e transporte pelas barreiras fisiológicas. Combinar fármacos hidrofóbicos em arranjos à base de lípides, como os lipossomos, melhoram

a solubilidade, biodisponibilidade, liberação, entrega e absorção do fármaco no organismo (Wang *et al.*, 2015). Lipossomos negativamente ou positivamente carregados são reconhecidos pelos macrófagos de maneira mais eficiente do que lipossomos neutros, por exemplo (Ahsan *et al.*, 2002; Salem e Duzgunes, 2003).

De fato, carrear fármacos em arranjos positivamente carregados pode facilitar o contato com as células, que geralmente são negativamente carregadas, assim como a internalização do arranjo e seu acesso ao citosol (Raychaudhuri e Rock, 1998). No caso das células microbianas, que também são negativamente carregadas, elas preferencialmente interagem com arranjos catiônicos, podendo exercer atividade antimicrobiana por contato, ou então disponibilizar o fármaco antimicrobiano para exercer sua ação (Hayashi *et al.*, 2003; Timofeeva *et al.*, 2015). De uma maneira geral, a superfície celular da maior parte dos micro-organismos é negativamente carregada, devido à prevalência de fosfato aniônico, carboxilato e grupos sulfato na parede celular (polímeros aniônicos, como ácido teicóico, em bactérias Gram-positivas; lipopolissacarídeos e proteínas em bactérias Gram-negativas; ácidos micólicos e proteínas em micobactérias) (Alterthum, 2008). No entanto, este efeito de atração eletrostática entre bactérias e arranjos catiônicos, em meios com alta força iônica, como o fisiológico, pode não ocorrer devido à blindagem das cargas (Renner e Weibel, 2011).

Para preparar carreadores catiônicos de fármacos, e com propriedades antimicrobianas, é possível utilizar lípides, surfactantes, peptídeos e/ou polímeros catiônicos (Carmona-Ribeiro e de Melo Carrasco, 2013). Compostos de amônio quaternário (CAQs) são agentes catiônicos, em função da presença do grupamento amônio quaternário, positivamente carregado, em sua estrutura química. Os CAQs são bastante utilizados no desenvolvimento de arranjos supramoleculares antimicrobianos, pois além de formarem arranjos positivamente carregados que podem carrear fármacos antimicrobianos, os CAQs ainda podem apresentar atividade antimicrobiana por si (Carmona-Ribeiro e de Melo Carrasco, 2013; Tan *et al.*, 2013; Khaira *et al.*, 2014; Staneva *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015). O efeito antimicrobiano do grupamento amônio quaternário é descrito há bastante tempo na literatura, podendo causar distorções nas membranas dos micro-organismos e lise de esferoplastos e protoplastos (Salton, 1968; Davies e Field, 1969; Hugo e Frier, 1969;

Cabral, 1992; Denyer, 1995; Kanazawa *et al.*, 1995; Russel e Chopra, 1996; Merianos, 2001; Fuhrhop e Wang, 2004; Russel *et al.*, 2013). Os CAQs ainda podem inibir/bloquear canais de potássio na membrana de bactérias Gram-negativas, desestabilizando a célula bacteriana, levando-a à morte (Raja e Vales, 2009). Neste sentido, o CAQ sintético brometo de dioctadecildimetilamônio (DOD) já foi estabelecido como agente antimicrobiano que, dependendo da maneira como é disperso em água, forma bicamadas positivamente carregadas na forma de lipossomos ou outros arranjos supramoleculares (Carmona-Ribeiro, 1992; Tapias *et al.*, 1994; Sicchierolli *et al.*, 1995; Campanhã *et al.*, 2001; Carmona-Ribeiro *et al.*, 2006; Vieira e Carmona-Ribeiro, 2008). Este lípide anfifílico possui uma notável capacidade de solubilização de fármacos pouco solúveis em água, formando carreadores de anfotericina B (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001; Lincopan *et al.*, 2003), miconazol (Pacheco e Carmona-Ribeiro, 2003), rifampicina (Barbassa *et al.*, 2011) e indometacina, por exemplo (Lima *et al.*, 2016).

Polímeros antimicrobianos e biocompatíveis também são frequentemente utilizados no desenvolvimento de arranjos antimicrobianos de importância biomédica, inclusive aqueles com grupamento amônio quaternário em suas estruturas, para carrear fármacos e exercer ação antimicrobiana por si, como um efeito sinérgico dos componentes do arranjo (Carmona-Ribeiro e de Melo Carrasco, 2013; Sobczak *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013; Khaira *et al.*, 2014; Staneva *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015). As propriedades antimicrobiana, antifúngica e tumoricida dos ionenos, que são polieletrólitos catiônicos com átomos de nitrogênio na cauda da cadeia polimérica, indicam que os polímeros são mais ativos do que seus monômeros correspondentes, devido à melhor adsorção do polímero à superfície da célula bacteriana e à membrana citoplasmática, geralmente levando ao seu subseqüente rompimento (Ikeda e Tazuke, 1983). Neste sentido, entre os polímeros que possuem amônio quaternário em sua estrutura com excelente atividade biocida está o cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2008; Melo *et al.*, 2010; Carmona-Ribeiro e Carrasco, 2013; Carrasco *et al.*, 2015). As aplicações do PDDA podem variar desde a indústria de papel, mineração, alimentícia até como floculante de bactérias no tratamento de água (Zhao e Zhang, 2013). Além disso, este polímero antimicrobiano já demonstrou ser o princípio ativo de NPs antimicrobianas,

seja compondo a camada mais externa de NPs formadas por auto-associação ou imobilizado no momento da síntese por polimerização em emulsão de NPs de poli(metacrilato de metila) (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2008; Melo *et al.*, 2010; Carmona-Ribeiro e Carrasco, 2013; Carrasco *et al.*, 2015; Sanches *et al.*, 2015). Polímeros não quaternários derivados do PDDA também já demonstraram atividade antimicrobiana de amplo espectro, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e micobactérias, interferindo com a integridade da parede celular de micobactérias, por exemplo, através de danos na permeabilidade da membrana interna bacteriana, e também poderiam ser utilizados no desenvolvimento de arranjos supramoleculares (Timofeeva *et al.*, 2009; Timofeeva *et al.*, 2015).

A combinação, em um mesmo arranjo, de compostos que agem em diferentes alvos na célula microbiana é uma maneira interessante de criar um "coquetel" antimicrobiano, principalmente com o objetivo de combater patógenos de difícil erradicação, como os micro-organismos multirresistentes aos antimicrobianos. Ao associar um antimicrobiano tradicional em um sistema que por si só já apresenta efeito contra os micro-organismos, todos agindo de maneiras distintas ou em diferentes alvos na célula bacteriana, pode prolongar e até mesmo restaurar a eficácia do antimicrobiano tradicional, reduzindo a possibilidade, dificultando ou, pelo menos, retardando o desenvolvimento de resistência dos micro-organismos a tais arranjos (Smith *et al.*, 2013), além de poder reduzir as doses dos compostos que seriam necessárias caso fossem utilizados livremente, não combinados a um mesmo sistema (Brooks e Brooks, 2014).

Na Tabela 1 estão demonstrados alguns exemplos de arranjos carreadores com atividade antimicrobiana contra micro-organismos multirresistentes. S-tanatina, por exemplo, é um peptídeo catiônico, antimicrobiano, que possui afinidade para ligar-se aos lipopolissacarídeos, presentes na parede celular, e aos lípides da membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas, que sendo negativamente carregados atraem o peptídeo por atração eletrostática, o qual se intercala na membrana bacteriana, tornando-a permeável, chegando até a rompê-la (Wu *et al.*, 2010). Como este peptídeo é pouco efetivo contra bactérias Gram-positivas, ele foi ligado à superfície de lipossomos carreando levofloxacino para desenvolver arranjos com atividade potencialmente seletiva contra bactérias Gram-negativas. S-tanatina e

levofloxacino, combinados em lipossomos, mostraram efeito sinérgico contra cepa de *K. pneumoniae*, *in vitro* e em um modelo de septicemia *in vivo*, e cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* recuperaram a susceptibilidade a levofloxacino *in vitro* (Fan *et al.*, 2015). Foi proposto o seguinte mecanismo de ação para estes lipossomos de levofloxacino e S-tanatina: os lipossomos interagem com os compostos negativamente carregados da superfície celular bacteriana (como lipopolissacarídeos), então eles fundem-se com a membrana externa da bactéria, interferindo com a integridade da membrana, permitindo maior entrada de levofloxacino na célula e ainda dificultando a ação de bombas de efluxo (Furneri *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2015). Outro composto utilizado na combinação com antimicrobianos para o preparo de arranjos contra micro-organismos multirresistentes é a piperina (Khameneh *et al.*, 2015). Piperina é um alcaloide (piperidina) que apresenta diversas atividades biológicas, dentre elas a antibacteriana em decorrência da inibição de bombas de efluxo de antimicrobianos (Khan *et al.*, 2006). Assim, a piperina já mostrou efeito sinérgico com a gentamicina, contra MRSA, quando ambos foram incorporados em nanolipossomos de fosfatidilcolina e colesterol (Khameneh *et al.*, 2015). NPs de quitosana carreando cefotaxima também apresentaram atividade de amplo espectro contra micro-organismos MR (Jamil *et al.*, 2016). Tas NPs foram preparadas pelo método da gelificação ionotrópica, que é baseado na capacidade dos polieletrólitos fazerem ligações cruzadas na presença de contra-íons, para formar pérolas de hidrogel – gelisferas (Patil *et al.*, 2012). Estas gelisferas são capazes de liberar fármacos de maneira controlada, e a cefotaxima, em solução de tripolifosfato, foi adicionada gota a gota, em que o tripolifosfafto se difunde lentamente pela solução de quitosana, formando uma estrutura tridimensional que retém o fármaco (Jamil *et al.*, 2016).

Tabela 1. Exemplos de arranjos nanoestruturados com atividade contra micro-organismos multirresistentes

Arranjo	Antimicrobiano	Patógeno alvo	Referência
	Lipossomos		
Diestearoil-glicero-fosfocolina/ colesterol e/ou MPEG-DSPE*	Vancomicina	MRSA – intracelular/ *in vitro*	(Pumerantz *et al.*, 2011)
Fofatidilcolina/ colesterol/ NHS-PEG-DSPE*/ S-tanatina	Levofloxacino	*K. pneumoniae*/ *in vitro* e *in vivo*	(Fan *et al.*, 2015)
Fosfatidilcolina/ colesterol	Gentamicina e ácido oleico	MRSA/ *in vitro*	(Atashbeyk *et al.*, 2014)
Fosfatidilcolina/ colesterol	Gentamicina e piperina	MRSA/ *in vitro*	(Khameneh *et al.*, 2015)
Lecitina/ colesterol/ EGCG e/ou estearilamina ou dicetilfosfato	Epigalocatequina galato (EGCG)	MRSA/ *in vitro* e *in vivo*	(Gharib *et al.*, 2013)
Fosfatidilcolina/ colesterol	Ácido linolênico	*H. pylori*/ *in vitro*	(Obonyo *et al.*, 2012)
Dipalmitoil-glicero-fosfatidilcolina (DPPC)/ dimiristoil-glicero-fosfatidilglicerol	Gálio e gentamicina	*P. aeruginosa*/ *in vitro*	(Halwani *et al.*, 2008)
Colesterol/ DPPC ou palmitoil-oleil-glicero-fosfatidilcolina/	Polimixina B	*P. aeruginosa*/ *in vitro*	(Alipour *et al.*, 2008)
DPPC/ colesterol	Timoquinona	*C. albicans*/ *in vivo*	(Khan *et al.*, 2015)
	NPs		
$AgNO_3$/citrato ou álcool polivinílico ou quitosana	Prata	MRSA, *Enterococcus* spp. resistente a vancomicina, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* / *in vitro*	(Cavassin *et al.*, 2015)
Núcleo de ouro com superfície funcionalizada com compostos catiônicos de diferentes comprimentos de cadeia e aromaticidade	Ouro	*P. aeruginosa*, *E. coli*, complexo *E. cloacae*, MRSA/ *in vitro*	(Li *et al.*, 2014)
Quitosana – gelificação ionotrópica	Cefotaxima	*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, MRSA/ *in vitro*	(Jamil *et al.*, 2016)
Lipopeptídeos se auto-associam em NPs em meio aquoso	Lipopeptídeos cíclicos sintéticos	*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* sp./ *in vitro*	(Azmi *et al.*, 2015)

*MPEG-DSPE: metilpolietilenoglicol-diestearoil-fosfatidil etanolamina; NHS-PEG-DSPE: aminopropil-polietilenoglicol-carbamildiestearoil-fosfatidil etanolamina;

NPs compostas pelo lípide catiônico DOD, na forma de fragmentos de bicamada (BF), consecutivamente revestidos pelos polieletrólitos aniônico carboximetilcelulose (CMC) e catiônico PDDA podem ser obtidas por auto-associação, conforme descrito anteriormente (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2008; Melo *et al.*, 2010). O princípio da técnica de auto-associação, camada por camada, por atração eletrostática entre as camadas de carga oposta foi reportado por Decher e cols. (Decher e Hong, 1991; Decher *et al.*, 1992; Lvov *et al.*, 1993). Tais NPs híbridas de DOD BF/CMC/PDDA tem em sua estrutura dois compostos catiônicos antimicrobianos, DOD e PDDA, que combinados, formam um arranjo supramolecular único. Estas NPs exibem potente atividade antimicrobiana contra cepas sensíveis aos antimicrobianos da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*, em baixas concentrações de PDDA e sem toxicidade hemolítica nas concentrações microbicidas (Melo *et al.*, 2010; Melo e Carmona-Ribeiro, 2012; Carmona-Ribeiro e Carrasco, 2013). Tais NPs híbridas de DOD BF/CMC/PDDA foram objetos de pedido de patente de invenção protocolado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (Patente: Partículas híbridas antibacterianas, processo de preparação de partículas híbridas antibacterianas, composição farmacêutica, uso e material antibacteriano contendo as mesmas, com Nº de Protocolo no INPI/SP: 018100024951), sendo inclusa uma adição a esse pedido de patente para incluir a propriedade fungicida de tais NPs (n° C11.002.559-6).

No entanto, estes arranjos supramoleculares ainda não haviam sido avaliados frente a micro-organismos MR. Como o PDDA exerce potente atividade biocida contra cepas ATCC, tanto livre em solução, quanto combinado na camada mais externa das NPs, poderia representar uma excelente alternativa no tratamento de micro-organismos MR. Além disso, a combinação, em um mesmo arranjo supramolecular, de um lípide antimicrobiano (DOD) e um polímero antimicrobiano (PDDA), mesmo na ausência de um antimicrobiano tradicional, pode representar uma possível estratégia para combater infecções, colonizações ou ainda contaminações causadas por micro-organismos MR. Tais NPs, se eficientes contra patógenos MR, poderiam representar uma possibilidade de tratamento na prática clínica ou ainda, se forem incorporadas em superfícies e/ou materiais, poderiam

contribuir dificultando a disseminação e a propagação destes micro-organismos MR, seja no ambiente hospitalar ou mesmo na comunidade. Por isso, neste trabalho foi determinada a atividade antimicrobiana do PDDA livre ou nas NPs de DOD BF/CMC/PDDA contra quatro micro-organismos MR isolados de amostras clínicas. Também foi elucidado o mecanismo pelo qual as NPs e/ou PDDA exercem sua atividade biocida, através da combinação de resultados obtidos de extravasamento de compostos intracelulares fosforilados após interação com as NPs e também das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Arranjos nanoestruturados com atividade contra micobactérias são preparados carreando fármacos e/ou compostos que apresentem atividade majoritariamente contra *M. tuberculosis* (Gupta *et al.*, 2012). Assim, o desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos visando o tratamento de MNT são, de uma certa maneira, negligenciados. Na Tabela 2 estão demonstrados alguns exemplos de arranjos nanoestruturados com atividade contra micobactérias.

Foram desenvolvidos, por exemplo, prolipossomos carreando isoniazida com atividade contra *M. bovis* (Rojanarat *et al.*, 2011). Estes prolipossomos em pó foram obtidos pela técnica de secagem por pulverização mecânica (*"spray dryer"*), que ao entrar em contato com água ou fluidos biológicos, este pó é hidratado, imediatamente formando os lipossomos carreadores de isoniazida, que apresentaram atividade maior do que isoniazida livre contra *M. bovis in vitro* e infectando macrófagos alveolares (Rojanarat *et al.*, 2011). NPs de PLGA carreando simultaneamente rifampicina, isoniazida e pirazinamida foram desenvolvidas pelo método de emulsificação seguida de evaporação de solvente (Johnson *et al.*, 2005). Cobaias infectadas com *M. tuberculosis* foram tratadas, por via oral, com estas NPs e demonstraram o mesmo efeito de redução nas células viáveis de *M. tuberculosis* isoladas de pulmão e baço que os antimicrobianos não encapsulados. A diferença é que as drogas livres foram administradas diariamente durante seis semanas (46 doses), enquanto as mesmas concentrações dos antimicrobianos carreados nas NPs foram administradas apenas 5 vezes durante o mesmo período (uma dose a cada 10 dias), mostrando que as NPs podem liberar os antimicrobianos de maneira controlada, sendo uma estratégia efetiva, podendo contribuir até com a melhor adesão do paciente ao tratamento da tuberculose (Johnson *et al.*, 2005).

Tabela 2. Exemplos de arranjos nanoestruturados com atividade contra micobactérias

Arranjos	Antimicrobianos	Patógeno alvo	Referência
	Lipossomos		
Fosfatidilcolina/ cardiolipina	Bacteriocinas	*M. tuberculosis*/ *in vitro* e *in vivo*	(Sosunov *et al.*, 2007)
Fosfatidilcolina/ colesterol/ estearilamina ou ácido fosfatídico	Ácido úsnico	*M. tuberculosis*/ *in vitro*	(Lira *et al.*, 2009)
Fosfatidilcolina/ colesterol	Isoniazida*	*M. bovis*/ *in vitro*	(Rojanarat *et al.*, 2011)
Fosfatidilcolina/ colesterol/ dicetilfosfato ou ligantes de macrófagos alveolares	Rifampicina	*M. tuberculosis*/ *in vitro* e *in vivo*	(Vyas *et al.*, 2004)
DOD	Rifampicina	*M. tuberculosis* e *M. smegmatis*/ *in vitro*	(Barbassa *et al.*, 2011)
Lecitina de soja/ fosfatidilcolina e/ou colesterol	Rifampicina	MAC/ *in vitro* e *in vivo*	(Zaru *et al.*, 2009)
Fosfatidilcolina/ colesterol/ diestearoil-glicero-fosfoetanolamina-polietilenoglicol	Amicacina	MAC/ *in vivo*	(de Steenwinkel *et al.*, 2007)
Fosfatidilglicerol/ fosfatidilcolina/ colesterol	Amicacina, Estreptomicina, Ciprofloxacina	MAC/ *in vitro* e *in vivo*	(Salem *et al.*, 2005)
	NPs		
Quitosana	Prata	*M. smegmatis*/ *in vitro*	(Jena *et al.*, 2012)
PLGA	Rifampicina, Tioridazina	*M. tuberculosis* e *M. bovis*/ *in vitro* e *in vivo*	(Vibe *et al.*, 2016)
Sílica mesoporosa/ polietilenoimina ou ciclodextrina	Isoniazida, Rifampicina	*M. tuberculosis*/ *in vitro*	(Clemens *et al.*, 2012)
Alginato	Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida	*M. tuberculosis*/ *in vivo*	(Zahoor *et al.*, 2005)
PLGA	Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida	*M. tuberculosis*/ *in vivo*	(Johnson *et al.*, 2005)
PLGA	Rifampicina, Capreomicina, Ácido paraamino salicílico	*M. tuberculosis*/ *in vitro*	(Lawlor *et al.*, 2012)
Alginato	Econazol, Etambutol, Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida	*M. tuberculosis*/ *in vivo*	(Ahmad *et al.*, 2007)
PLGA	Econazol, Moxifloxacino, Rifampicina	*M. tuberculosis*/ *in vivo*	(Ahmad *et al.*, 2008)
Poli(butil cianoacrilato)	Moxifloxacino	*M. tuberculosis*/ *in vitro*	(Kisich *et al.*, 2007)

*Prolipossomos

Combinar um antimicrobiano pouco solúvel em água, como a CLA, em carreadores nanoestruturados também facilitam a entrega deste fármaco, principalmente quando envolve patógenos capazes de sobreviverem no interior de macrófagos. Assim, na Tabela 3, estão exemplificados alguns arranjos carreadores de CLA descritos na literatura, com atividade antimicrobiana. CLA lipossomal ou complexada com ciclodextrina foram comparadas quanto à atividade contra complexo *Mycobacterium avium* (MAC) infectando macrófagos humanos (Salem e Duzgunes, 2003). Lipossomos de fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol carreando CLA foram discretamente mais efetivos contra o crescimento de MAC intracelular do que o fármaco livre. Já a eficácia de CLA complexada com ciclodextrina contra MAC em macrófagos foi menor do que a CLA livre (Salem e Duzgunes, 2003). Um outro estudo comparou lipossomos catiônicos, aniônicos e neutros quanto à eficácia e segurança de arranjos carreando CLA (Alhajlan *et al.*, 2013). Os lipossomos positivamente carregados eram compostos de brometo de didecildimetilamônio (DDAB), DPPC e colesterol (proporção molar de 4:2:1), os lipossomos negativamente carregados, compostos de dicetilfosfato (DCP), DPPC e colesterol (proporção molar de 4:2:1), e os lipossomos sem carga, compostos de DPPC e colesterol (proporção molar de 6:1). Neste caso, os lipossomos negativamente carregados foram os que incorporaram maior quantidade de CLA (30%) em comparação com os lipossomos neutros e catiônicos (que incorporaram 16% e 5%, respectivamente). Apesar de incorporar menor quantidade de fármaco, os lipossomos catiônicos combinados com CLA foram os mais eficientes, inibindo o crescimento ou mesmo matando células de *P. aeruginosa* MR (isoladas de secreções de fibrose cística) nas menores concentrações, além de também eliminar completamente as células em biofilme de uma cepa de isolado clínico de *P. aeruginosa*. No entanto, quando células pulmonares foram expostas ao dobro da CIM de cada lipossomo, as viabilidades celulares foram de 100%, 99% e 1% para os lipossomos aniônicos, neutros e catiônicos, respectivamente. Assim, lipossomos negativamente carregados como carreadores de CLA foram menos tóxicos e bastante eficazes na redução de *P. aeruginosa* (Alhajlan *et al.*, 2013).

Tabela 3. Exemplos de arranjos carreadores de CLA

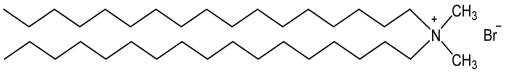
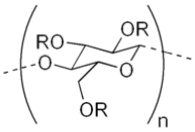
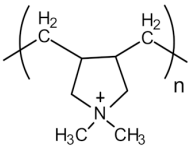
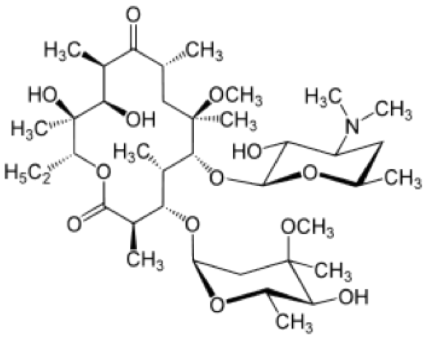
Arranjos	[CLA] incorporada µg/mL / %	Patógeno alvo	Referência
	Lipossomos		
DDAB/DPPC/Col* (catiônicos) ou DCP/DPPC/Col* (aniônicos) ou DPPC/Col* (neutros)	57 / 5,7 303 / 30,3 159 / 15,9	*P. aeruginosa* de fibrose cística – biofilmes/ *in vitro*	(Alhajlan *et al.*, 2013)
Fosfatidilcolina/ Col/ colesteril-dimetilamino-etilcarbamato/ polietilenoglicol e/ou aglutinina de gérmen de trigo (Catiônicos)	- / 92,4-97,8	MRSA – intracelular e biofilmes/ *in vitro* e *in vivo*	(Meng *et al.*, 2016)
Fosfatidilglicerol/fosfatidilcolina/Col	0-152 / 0-61,7	MAC – intracelular/ *in vitro*	(Salem e Duzgunes, 2003)
Fosfatidilcolina/ Dicetilfosfato/Col	220-300 / 22-30	MAC – intracelular/ *in vitro*	(Onyeji *et al.*, 1994)
	NPs		
Quitosana modificada/ PLGA (Catiônicas)	-/ 0,25	*Staphylococcus epidermidis* – biofilmes/ *in vitro*	(Takahashi *et al.*, 2016)
Etil celulose	860 / 86,0	*H. pylori*/ *in vitro* e *in vivo*	(Pan-In *et al.*, 2014)
PLGA/ ácido acetohidroxâmico conjugadas com concanavalina	530,1 / 53,1	*H. pylori*/ *in vitro*	(Jain *et al.*, 2015)
PLGA	- / 57,4-80,2	*H. pylori*/ *in vitro*	(Lotfipour *et al.*, 2016)
PLGA (Aniônicas)	501-717 / 57,4-80,2	S. *aureus*/ *in vitro*	(Mohammadi *et al.*, 2011)

*Col: Colesterol

A incorporação de CLA em arranjos nanoestruturados contendo o lípide catiônico DOD em combinação com o polieletrólito aniônico CMC, poderia facilitar a internalização celular destes, liberando o antimicrobiano no mesmo local em que estão localizados os patógenos intracelulares, o que representa uma abordagem interessante para o tratamento de micobactérias de crescimento rápido. Além disso, a presença de uma camada externa de PDDA nestes arranjos poderia fornecer cargas positivas ao sistema para facilitar a interação com os patógenos, bem como maior potência antimicrobiana ao arranjo, visto que é um polímero microbicida (Melo *et al.*, 2010; Carrasco *et al.*, 2015; Sanches *et al.*, 2015). Três compostos

antimicrobianos distintos (CLA, DOD e PDDA) presentes em um mesmo arranjo supramolecular poderiam eventualmente agir em sinergismo, aumentando a potência antimicrobiana do arranjo preparado. As estruturas químicas dos compostos utilizados na preparação de arranjos supramoleculares descritos ao longo deste trabalho estão demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4. Estruturas químicas do lípide catiônico, dos polímeros e do antimicrobiano utilizados na preparação dos arranjos descritos neste trabalho.

Nome (abreviação) do composto	Estruturas químicas
Brometo de Dioctadecildimetilamônio (DOD)	
Carboximetilcelulose sódica (CMC)	 R = H ou CH_2CO_2H
Cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA)	
Claritromicina (CLA)	

1.4. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de novos arranjos supramoleculares, combinando o lípide catiônico DOD com polímeros, na presença ou ausência de um antibiótico tradicional, para avaliar suas atividades contra bactérias multirresistentes ou micobactérias de crescimento rápido.

De maneira mais específica, este trabalho teve como objetivos, num primeiro momento, avaliar a atividade das nanopartículas híbridas de DOD BF/CMC/PDDA, sem um antibiótico tradicional, contra amostras clínicas de micro-organismos multirresistentes, bem como elucidar o mecanismo de ação microbicida das mesmas. Particularmente, foram utilizadas cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* como bactérias Gram-negativas, MRSA como bactéria Gram-positiva, e *C. albicans* resistente ao fluconazol como levedura.

Em um segundo momento, os objetivos específicos deste trabalho foram a preparação e caracterização de novos arranjos supramoleculares carreadores de um antibiótico tradicional (CLA), aniônicos ou catiônicos (compostos respectivamente por CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA), bem como avaliar a incorporação de CLA nestes arranjos e a sua atividade antimicrobiana contra *M. abscessus* intracelular ou na inibição da formação de biofilmes, além de determinar a toxicidade destes arranjos frente à interação com macrófagos.

2. MÉTODOS

2. MÉTODOS

2.1. Materiais

Carboximetilcelulose sódica (CMC), de baixa viscosidade e com grau de substituição médio de 0,60 – 0,95 (#9004-32-4), ágar mueller hinton (AMH) e Ágar Sabouraud com 4% Glicose (AS) foram obtidos da Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Brometo de dioctadecildimetilamônio (DOD), cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) com 20% peso em água, e MM: 100.000 a 200.000 g/mol, claritromicina (CLA) (≥ 98% pureza e MM: 747,95 g/mol), D-glicose (≥ 99,5% pureza), RPMI-1640, acetato de forbol-miristato (PMA), dimetilsulfóxido (DMSO) e ácido perclórico foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Caldo luria broth (LB) foi obtido da Life Technologies (Itapevi, Brasil), ágar ágar obtido da Oxoid (Basingstoke, Inglaterra) e caldo Mueller-Hinton II, cátion ajustado, obtido da Difco (Becton Dickinson & Co., Sparks, MD, USA). Fosfato dissódico, molibdato de amônio, ácido ascórbico, cloreto de sódio, difenilcarbazona, nitrato de mercúrio e caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). Ampicilina sódica foi obtida da Teuto Brasileiro S/A (Anápolis, Brasil), tripsina e soro fetal bovino da Gibco (Life Technologies, Denmark). Em todas as preparações foi utilizada água ultrapura.

2.2. Procedência e cultivo de micro-organismos de importância clínica

Nos ensaios microbiológicos deste trabalho foram utilizadas as cepas *American Type Culture Collection* (ATCC): *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *S. aureus* ATCC 29213 e/ou *C. albicans* ATCC 90028. As cepas de micro-organismos MR foram disponibilizadas pelo laboratório do Prof. Sampaio, oriundas do banco de amostras clínicas do grupo Fleury, cuja numeração de controle interno está descrita entre parênteses. Os micro-organismos utilizados foram: *P. aeruginosa* MR (D5170990), *K. pneumoniae* MR e produtora de carbapenemase do tipo KPC (D7140169), *S. aureus* resistente à meticilina – MRSA – (E1260359) e *C. albicans* resistente (R) a fluconazol (D6191267). As cepas

bacterianas foram isoladas de amostras de sangue, e a cepa de levedura, de secreção vaginal. A cepa de MRSA apresenta resistência à oxacilina e a todos os beta-lactâmicos. A cepa da *P. aeruginosa* MR apresenta resistência às cefalosporinas, carbapenêmicos, amicacina, aztreonam e polimixina B. A cepa de *K. pneumoniae* KPC+ apresenta resistência às penicilinas, aminoglicosídeos, cefalosporinas, carbapenêmicos, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima, polimixina B e fosfomicina. A cepa de *C. albicans* é resistente ao fluconazol.

As cepas de micobactérias utilizadas foram: *M. abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686, e quatro amostras clínicas de *M. abscessus* (M1, M2, M3 e M4), isoladas de escarro (M1, M3 e M4) e de lavado brônquico alveolar (M2). As espécies das amostras clínicas M1-M4 foram previamente identificadas como *Mycobacterium abscessus* susbsp. *abscessus*, por metodologia específica para a diferenciação de subespécies (sequenciamento parcial do gene *rpoB*, cuja sequência obtida foi comparada com as sequências de micro-organismos depositadas no banco de dados internacional GenBank, com 100,00 % de similaridade com a cepa padrão de *M. abscessus* susbsp. *abscessus*). A cepa de *S. aureus* utilizada como controle no ensaio da quantificação de CLA presente nos nanoarranjos foi a ATCC 29213. Todas estas cepas também foram disponibilizadas pelo laboratório do Prof. Sampaio, oriundas do banco de amostras clínicas do grupo Fleury, e a numeração de controle interno das amostras clínicas está descrita a seguir: M1 (E3263161), M2 (F7163073), M3 (F6053131) e M4 (F4073131).

As cepas microbianas foram reativadas a partir de amostras congeladas (-80°C), em microtubos contendo caldo TSB com 15% de Glicerol. Tais amostras foram semeadas em placas com ágar mueller-hinton (AMH), ágar luria-broth (ALB) ou ainda ágar sabouraud (AS), no caso das leveduras, e incubadas por 24/48 horas em estufa a 37°C (no caso das bactérias e leveduras) ou por 5-7 dias em estufa a 30°C (no caso das micobactérias). Algumas colônias isoladas desta cultura foram transferidas para um tubo contendo solução de D-glicose 0,264 M e/ou caldo mueller-hinton II (MHB-II) para o preparo de uma suspensão microbiana que foi padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland (Chapin e Lauderdale, 2007).

2.3. Preparação das partículas de DOD BF/CMC/PDDA por auto-associação, conforme previamente descrito em (Melo *et al.*, 2010)

As nanopartículas (NPs) de DOD BF/CMC/PDDA foram preparadas utilizando a dispersão dos fragmentos de bicamada (BF) do lípide catiônico DOD como base. Para a preparação de DOD BF, o pó de DOD foi disperso em solução de D-glicose 0,264 M e submetido a processo de ultrassom por sonicação, com sonda de titânio e ultrassom com potência de 90 W, por 20 minutos a 70 °C (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1991; Carmona-Ribeiro, 1992). Este processo dispersa o pó anfifílico em solução aquosa através do fornecimento de alta energia na amostra, que produz vesículas de bicamada e as rompe, gerando os BF. O próprio processo de sonicação aquece a amostra a temperaturas acima da transição de fase da bicamada de DOD (transição de fase de gel para líquido-cristalino da bicamada). Após o preparo de DOD BF, mas antes de prosseguir com a preparação das NPs e a caracterização da amostra por espalhamento de luz dinâmico (DLS), foi realizada a titulação com nitrato de mercúrio a fim de determinar a concentração analítica de DOD (Schales e Schales, 1941). Nesta titulação, os íons mercúrio reagem com os íons brometo, formando brometo de mercúrio. O excesso de íons mercúrio forma um complexo com a difenilcarbazona (indicador), mudando a cor da solução de amarelo para púrpura.

A dispersão de DOD BF, a uma concentração de 0,1 mM, interagiu com uma solução de CMC, a 0,1 mg/mL de concentração final, durante 20 minutos, para obtenção de um arranjo aniônico composto por DOD BF/CMC. A esta dispersão foi adicionada uma solução de PDDA, em uma concentração final de 0,1 mg/mL, que interagiu por mais 20 minutos, para obter o arranjo catiônico final, composto por DOD BF/CMC/PDDA, conforme previamente descrito em (Melo *et al.*, 2010). Após o preparo das NPs, as amostras foram caracterizadas por DLS. A produção das NPs híbridas de DOD BF/CMC/PDDA, e sua caracterização quanto ao diâmetro médio e potencial-zeta está de acordo com os dados publicados anteriormente (Melo *et al.*, 2010).

2.4. Preparação das nanopartículas de CLA/DOD pelo método da injeção etanólica, estabilizadas por CMC e auto-associadas com PDDA

CLA é um fármaco cuja solubilidade em água é de 0,33 mg/L. Em etanol, CLA e o lípide DOD são solúveis, portanto uma solução etanólica estoque foi preparada pela co-solubilização de CLA e DOD, e 250 µL desta solução foi injetado em solução aquosa, com auxílio de microsseringa, em volume final de 10 mL, sob constante e vigorosa agitação e em banho-maria, a 50 °C, conforme método previamente descrito para combinar fármacos hidrofóbicos, pouco solúveis em água, com o lípide catiônico DOD (Lima *et al.*, 2016). A temperatura de aquecimento utilizada neste método não é suficiente para interferir com a atividade do antimicrobiano. A injeção da solução etanólica em solução aquosa dispersou antimicrobiano e lípide combinados em particulados e/ou agregados nanoestruturados.

Solução etanólica estoque foi preparada em três diferentes proporções molares de CLA/DOD: 1:1, 1:2 e 2:1 (7:7 mM, 7:14 mM e 7:3,5 mM), e inicialmente injetadas em solução de D-glicose 0,264 M, formando dispersões de baixa estabilidade coloidal. Assim, estas mesmas soluções etanólicas estoque a diferentes proporções molares de CLA:DOD foram injetadas em solução aquosa contendo o polieletrólito aniônico e biocompatível CMC (a 0,1 mg/mL) como agente estabilizante da dispersão, permitindo aumento da estabilidade coloidal da dispersão. Então, a solução etanólica na proporção molar de 2:1 CLA/DOD, contendo a menor concentração de DOD, foi selecionada para ser injetada em soluções de diferentes concentrações de CMC (0,005 a 1,0 mg/mL). A dispersão contendo CLA/DOD/CMC a 130/ 53/ 100 µg/mL, respectivamente, foi adicionada de solução do polieletrólito catiônico PDDA em diferentes concentrações (0,005 a 1,0 mg/mL), sendo que a concentração de 100 µg/mL de PDDA foi escolhida para revestir as NPs aniônicas de CLA/DOD/CMC, produzindo NPs catiônicas de CLA/DOD/CMC/PDDA. Após a injeção, as dispersões foram caracterizadas por DLS, por até 7 dias após o seu preparo, para acompanhar a estabilidade coloidal. Um esquema representando o método de injeção da solução etanólica de CLA/DOD em solução aquosa está na Figura 2.

Desta maneira foram obtidas as NPs carreadoras de CLA pelo método da injeção etanólica: aniônicas formadas por CLA/DOD/CMC e catiônicas, de CLA/DOD/CMC/PDDA, que foram posteriormente comparadas quanto à incorporação de CLA, atividade antimicrobiana contra micobactéria de crescimento rápido de importância clínica, como *Mycobacterium abscessus*, e toxicidade frente a macrófagos.

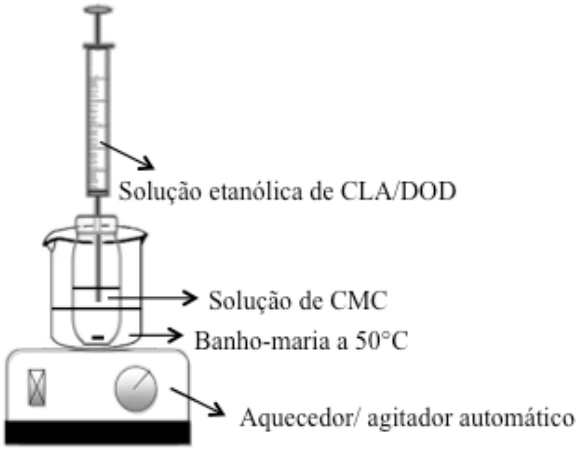


Figura 2. Injeção de solução etanólica de CLA/DOD em solução aquosa de CMC para o preparo das dispersões de CLA/DOD/CMC.

2.5. Determinação de diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta das dispersões por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A caracterização das dispersões por DLS foi realizada em equipamento ZetaPlus Zeta-Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holstville, NY, USA), equipado com laser de 570 nm. O diâmetro hidrodinâmico médio (Dz) e a polidispersidade (P) das amostras foram determinados por espalhamento quase-elástico da luz, com detector de foto-correlação de luz espalhada fixo em 90°. Como as partículas são fontes secundárias de luz espalhada, e estão em movimento "*Browniano*", produzem flutuações desordenadas na intensidade de luz espalhada, com um procedimento temporal dependente do tamanho e forma da partícula. Quando a partícula atravessa o feixe de luz incidente ocorre redução da intensidade de luz transmitida, que é quantificada pelo decaimento da função de autocorrelação temporal das flutuações da intensidade da luz espalhada, tornando possível medir

diretamente o coeficiente de difusão translacional, o qual está inversamente relacionado com o raio hidrodinâmico da partícula (Pecora, 2000). Para uma dispersão diluída, o diâmetro médio das partículas pode ser calculado através da equação de Stokes-Einstein $D_0 = k_bT / 6\pi\eta(t)d$, em que k_b é a constante de Boltzmmann (1,38054 x 10^{-16} erh/deg), T é a temperatura em Kelvin, $\eta(t)$ é a viscosidade do solvente e d, o diâmetro médio do particulado (Hanus e Ploehn, 1999; Pecora, 2000). Portanto, para uma partícula esférica é possível calcular o seu raio hidrodinâmico (Dz), o qual inclui uma camada de solvatação.

Já a determinação do potencial zeta (ζ) das partículas é baseada pelo "*eletrophoretic light scattering*", pelo princípio de que quando é aplicado um campo elétrico em partículas carregadas, estas movem-se para o pólo positivo ou negativo do campo aplicado, causando mudança na frequência da luz de laser espalhada (Shaw, 1992). O sentido que elas tomam é indicação do sinal da carga que carregam, e a velocidade com que se movem é proporcional ao valor da carga. Assim, é determinado o potencial no plano de cisalhamento da partícula, através da mobilidade eletroforética (μ) e da equação de Smoluchowski ($\zeta = \mu\eta/\xi$, em que η é a viscosidade do meio e ξ, a constante dielétrica), admitindo um determinado tamanho de partícula na presença de um campo elétrico (O'Brien e White, 1978). Todas as medidas de potencial zeta foram feitas em pH da água (6.3-6.5) e sem uso de tampão. A condutividade variou entre as dispersões analisadas, sendo geralmente próxima ou inferior à condutividade apresentada por uma solução de 1 mM de KCl (146,9 µS/cm) (Wu *et al.*, 1994).

2.6. Determinação de lise de microorganismos por extravasamento de compostos fosforilados do intracelular e dosagem de fósforo inorgânico

Foi avaliada liberação de compostos fosforilados intracelulares das cepas ATCC e MR dos micro-organismos após interação com NPs, DOD BF ou PDDA. Todas as cepas microbianas foram reativadas a partir de amostras congeladas, e após crescimento em AMH (ou AS), algumas colônias isoladas foram transferidas para uma solução aquosa de NaCl 1 mM, e a turbidez desta suspensão bacteriana foi ajustada a uma absorbância de aproximadamente 0,400, a 625 nm. No caso da levedura (*C. albicans*), a turbidez foi ajustada em valores próximos a 1,000 de

absorbância. Alíquotas de 1,5 mL desta suspensão foram transferidas para microtubos e centrifugadas (6000 rpm/15 minutos) para formar um pellet de células. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspendido em 0,5 mL da suspensão do arranjo desejado. A mistura de micro-organismos e arranjos antimicrobianos interagiu por 1h. As suspensões de DOD BF e PDDA que interagiram com as células, estavam em diferentes concentrações, variando de 2 até 10^{-5} mM de DOD ou mg/mL de PDDA, respectivamente. Já as concentrações de PDDA nas NPs variaram, com uma diluição seriada de fator 2, desde 1 até 1:128

Após 1h de interação células-arranjos, as misturas foram novamente centrifugadas (6000 rpm/ 15 minutos) para posterior determinação da concentração de fosfato inorgânico (Pi) extravasado para o sobrenadante, de acordo com o método colorimétrico previamente descrito (Carmona-Ribeiro, 2012). Como controle positivo, Pi foi determinado a partir de suspensões microbianas puras, em NaCl 1 mM, sem contato com os arranjos catiônicos antimicrobianos, e ainda sem serem submetidas à segunda centrifugação (para remoção das células e análise do sobrenadante). Como controle negativo, Pi foi também determinado no sobrenadante destas suspensões microbianas puras, após então serem submetidas à segunda centrifugação. Isto para analisar a possível lise celular em ausência de qualquer agente lítico ou antimicrobiano. As interações células-arranjos antimicrobianos ocorreram em concentrações celulares que variaram de $2x10^8$ a $6x10^{11}$ UFC/mL para as bactérias, e $7x10^6$ a $1x10^7$ UFC/mL para as leveduras.

A determinação de Pi procedeu-se conforme previamente descrito (Carmona-Ribeiro, 2012). Em suma, duas alíquotas de 50 µL e uma de 100 µL do sobrenadante das amostras (ou da amostra em si, no caso do controle positivo) foram transferidas para tubos de vidro, os quais foram submetidos a aquecimento em torno de 100°C até completa evaporação das alíquotas. Então os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e acrescentados de 0,3 mL de ácido perclórico 70% para digestão molecular e liberação do fosfato inorgânico. Então, os tubos foram fechados com bolas de vidro, a fim de evitar a evaporação do ácido, e aquecidos a 180°C, em um banho seco, dentro da capela, por 1h. Após, os tubos foram resfriados até temperatura ambiente, e adicionados sequencialmente de 1 mL de água ultrapura, 0,4 mL de uma solução a 1,25% de molibdato de amônio e 0,4 mL de uma solução a 5%

de ácido ascórbico, sendo submetidos a uma cuidadosa agitação após cada adição. Os tubos, então, foram novamente fechados com as bolas de vidro e inseridos em banho fervente por 5 minutos. Após resfriarem à temperatura ambiente, procedeu-se com as leituras de absorbâncias de cada amostra, a 795 nm. Uma curva de calibração a partir de tubos contendo alíquotas de 0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 μL de uma solução padronizada de fosfato dissódico – Na_2HPO_4 – a 1 mM, e submetidos ao mesmo processo descrito acima, foi preparada a cada experimento de determinação de Pi.

A lise celular bacteriana é assumida como sendo linearmente relacionada à porcentagem de extravasamento de compostos fosforilados detectados no sobrenadante. Esta porcentagem é calculada através da relação entre a concentração de Pi no sobrenadante da amostra e a concentração de Pi no controle positivo (Martins *et al.*, 1997):

% extravasamento de fosfato = 100 x [Pi(sobrenadante)/Pi(controle)]

Todos os arranjos de NPs, DOD BF ou PDDA que interagiram com as células, para análise do extravasamento de fosfato inorgânico, foram previamente preparados em solução aquosa de NaCl 1 mM.

2.7. Determinação da incorporação de CLA nas CLA NPs

A CLA, sendo um fármaco com baixo valor de ε, ou seja, com baixa capacidade de absorção de luz, não pôde ser determinada nos arranjos de DOD e polímeros através de espectrofotometria. Os antimicrobianos da classe dos macrolídeos não possuem grupos cromóforos suficientes, que permitiriam a detecção direta por espectrofotometria. Além disso, esta classe de antimicrobianos absorve luz em baixos comprimentos de onda, o que contribui para a presença de muitos interferentes. Por isso, para ser determinado espectrofotometricamente, precisariam ser derivatizados ou complexados a outros compostos coloridos (Bekele e Gebeyehu, 2012). Por isso, diferentes estratégias para determinar a incorporação de CLA nas NPs foram utilizadas, tais como técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrometria de massas (HPLC-MS) (Snyder *et al.*, 2009; Rodriguez-Aller *et al.*, 2013) para confirmar a presença de CLA, ou ainda ensaio microbiológico para determinação da CIM da CLA, para quantificar a CLA incorporada aos arranjos.

2.7.1. Diálise para remoção da CLA livre

Amostras de 10 mL de cada dispersão, previamente preparada pelo método da injeção etanólica, foram adicionadas em membranas de celulose e submetidas à extensiva diálise (separadamente), em 100 mL de água, durante 24 horas, com quatro trocas da solução dialisante, a fim de remover todo o excesso de CLA não combinado às NPs.

2.7.2. Determinação da incorporação de CLA nas NPs por HPLC-MS

A técnica de HPLC é utilizada para separar, identificar e quantificar componentes de uma mistura, em que cada componente interage diferentemente com os materiais adsorventes da coluna, levando à separação dos compostos conforme estes saem da coluna, a velocidades distintas, isto é, em tempos de retenção distintos (Snyder *et al.*, 2009). Já a técnica de MS é utilizada para medir a relação massa/carga (*m/z*) de partículas carregadas, sendo que a amostra é ionizada, formando partículas carregadas (íons) que são separadas de acordo com sua razão *m/z*, e o sinal do íon detectado é mostrado em espectro de massa. Ao acoplar a técnica de MS ao HPLC, é possível a combinação das capacidades de separação dos componentes pelo HPLC com a capacidade de análise de massas do MS. Tal combinação oferece maior sensibilidade e especificidade para analisar componentes de particular interesse (consequentemente de particular massa) (Rodriguez-Aller *et al.*, 2013).

Para serem analisadas por HPLC-MS, alíquotas de 100 µL das amostras, antes e após a diálise, foram liofilizadas e, então solubilizadas em 30 µL de acetonitrila (solvente da CLA) e o volume completado com água para 100 µL. As amostras foram avaliadas em equipamento de HPLC da Shimadzu modelo LC20AD e espectrômetro de massas modelo Esquire 3000 Plus, da Bruker. Para tal determinação, foi utilizada coluna analítica para separação cromatográfica Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µ), em forno a 40°C e fluxo de 0,5 mL/min. O comprimento de onda do detector foi fixado a 210 nm e o volume da injeção foi de 5 µL. Para fase móvel, foram utilizados solventes A e B, em que solvente A corresponde a água, ácido fórmico 0,1% e acetato de amônio 5 mM, e solvente B é metanol (Shin *et al.*, 2008). A eluição de amostra é feita em gradiente de solvente tal que a fase móvel contem proporções variáveis dos dois solventes. A curva de

gradiente da fase móvel, com as respectivas proporções do solvente B (metanol), ao longo do tempo da análise está demonstrada na Figura 3.

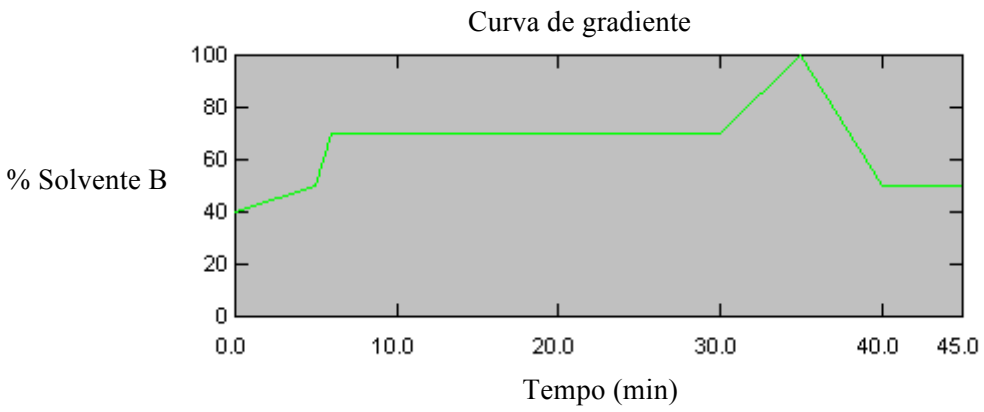


Figura 3. Porcentagem de metanol (solvente B) presente na fase móvel em função do tempo da realização do cromatograma do HPLC.

O espectrômetro de massas é equipado com fonte *electrospray*, operando no modo positivo, a uma voltagem de 4 kV e temperatura de 300 °C. A presença da CLA nas dispersões é confirmada pela observação do pico $[M+H]^+$ da CLA a uma relação massa/carga (*m/z*) por volta de 748 e pela fragmentação desse pico, gerando fragmento em *m/z* de 590 (MM CLA: 747,95 g/mol) (Li *et al.*, 2006).

2.7.3. Incorporação de CLA nas NPs (% Inc) por determinação da CIM de CLA

CIM de CLA contra cepa ATCC 29213 de *S. aureus* é de 0,12 a 0,5 µg/mL (CLSI, 2015). Desta maneira, a CIM de CLA foi utilizada para estimar a % Inc nas CLA NPs. Como controles, as CIM de DOD, CMC ou PDDA, ou das NPs sem CLA (DOD/CMC e DOD/CMC/PDDA) contra *S. aureus* também foram determinadas. Em placa de microdiluição com 96 poços, cada linha continha 50 µL das CLA NPs ou dos controles previamente diluídos seriadamente (fator 2), em MHB-II. Entao, 50 µL da suspensão bacteriana, previamente preparada de acordo com escala 0,5 McFarland e diluída 1:100 em MHB-II, foi inoculada em cada poço da microplaca, que foi incubada a 37 °C/ 18-24 h para posterior observação visual dos poços turvos e/ou com a presença de aglomerado de células bacterianas no fundo do poço. A CIM é considerada a menor concentração do composto que inibe completamente o crescimento bacteriano. A Figura 4 ilustra um esquema da microplaca e a sequência

da diluição seriada dos controles e das NPs, antes da adição da suspensão bacteriana. A solução estoque de CLA (64 µg/mL) após adição do inóculo bacteriano foi diluída para 32 µg/mL, sendo que o mesmo ocorre para todos os outros compostos isolados ou NPs testados (concentrações iniciais de 53, 100 e 100 µg/mL para DOD, CMC e PDDA, respectivamente). Também foram realizados controle negativo (somente MHB-II, sem bactérias) e positivo do experimento (somente bactéria em MHB-II, sem antimicrobianos). Os experimentos foram realizados em duplicata. O valor da CIM obtida para a solução estoque de CLA foi assumido como a quantidade de CLA presente na diluição das CLA NPs que inibiu o crescimento bacteriano, sendo então multiplicado por esta diluição para estimar a concentração de CLA presente na dispersão inicial das CLA NPs. Assim, com os valores de CLA presente nas CLA NPs antes e após a diálise, foi calculada a % Inc = 100 $[CLA]_{após\ diálise}$ / $[CLA]_{antes\ diálise}$.

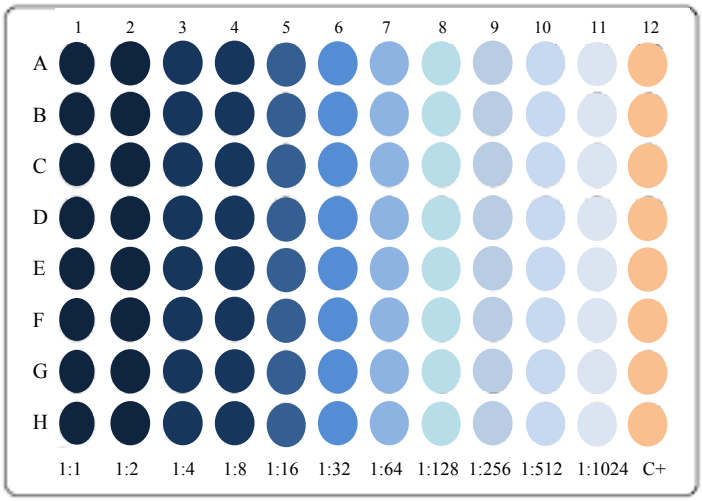


Figura 4. Esquema da microplaca para determinação da CIM da CLA livre ou combinada às NPs, para a cepa ATCC 29213 de *S. aureus*, em que um composto/NPs foi adicionado em cada linha (A-H), e realizada diluição seriada (fator 2) do poço 1 em direção ao poço 11. O poço 12 foi mantido apenas com meio de cultura e D-glicose, para controle (C+).

2.8. Determinação da atividade antimicrobiana

2.8.1. Atividade de NPs de DOD BF/CMC/PDDA contra micro-organismos multirresistentes por plaqueamento e contagem de viáveis

A atividade antimicrobiana das partículas híbridas e dos compostos catiônicos de maneira isolada (DOD BF e PDDA) foi realizada em ensaios com 1 hora de interação entre 0,5 mL da suspensão microbiana padronizada e 0,5 mL de diferentes diluições das NPs ou do PDDA. No caso das NPs, a atividade antimicrobiana foi avaliada em função da concentração dos compostos catiônicos hibridizados, principalmente o PDDA, cuja localização no arranjo supramolecular é mais externa. Após o tempo de interação, procedeu-se com o plaqueamento (semeadura em superfície), em triplicata, em AMH ou AS, de 100µL de cada concentração dos arranjos avaliados, diluídos em até 100.000 vezes, em solução de D-glicose 0,264 M. As placas foram incubadas a 37°C/24 ou 48 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). O controle positivo foi realizado pela interação de 0,5 mL da suspensão microbiana e 0,5 mL de solução de D-glicose 0,264 M, e posteriormente plaqueado após diluição. A viabilidade celular apresentada como a redução do log das células viáveis refere-se a um valor médio da triplicata da contagem das UFCs ± o desvio padrão médio. As concentrações microbicidas mínimas (CMM) foram consideradas como as menores concentrações de PDDA, tanto livre quanto hibridizado nas NPs, que causaram redução do log das células viáveis até zero.

2.8.2. Atividade de CLA NPs contra *M. abscessus* por determinação da CIM

CIM de CLA foi determinada pelo método da microdiluição em caldo contra cepas ATCC (*M. abscessus* ATCC 19977 e *M. peregrinum* ATCC 700686) e isolados clínicos de *M. abscessus* (M1-M4) para todos os componentes, NPs sem CLA e CLA NPs, antes e após diálise. Microplaca foi preparada com 50 µL de cada dispersão e sua diluição seriada de fator 2, em MHB-II. Então, colônias isoladas de uma cultura fresca de cada cepa foram utilizadas para o preparo de uma suspensão bacteriana ajustada de acordo com escala 0,5 de McFarland, diluiída em MHB-II em 1:100, e adicionada 50 µL desta suspensão em cada poço da microplaca. Controles também foram realizados na ausência de bactéria bem como na ausência de

antimicrobianos. Microplaca foi incubada a 30°C/ 72 h, embaladas em papel filme para não ocorrer desidratação do meio, para posterior determinação da CIM. Experimentos foram realizados em duplicata.

2.9. Determinação da atividade antimicrobiana de CLA NPs contra *M. abscessus* infectando macrófagos

2.9.1. Cultivo de células THP-1 e diferenciação em macrófagos

Células da linhagem de monócitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202^{TM}) foram gentilmente cedidas pelo professor Mario H. Hirata (FCF-USP). As células, estocadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em garrafas para cultura de células (100 mm), em meio RPMI 1640 suplementado com 0,2 % de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino e ampicilina (100 µg/mL). As culturas foram mantidas em estufa limpa, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2, por 5 a 10 dias, com adição e/ou troca de meio de cultura a cada 2-3 dias. O antimicrobiano ampicilina foi utilizado no meio de cultura das células THP-1 para evitar a contaminação das células em expansão.

Então foi realizada a contagem de células viáveis, utilizando o reagente Azul de Trypan (1%), em câmara de Neubauer, sendo então centrifugada (1000 rpm/5 minutos) e o pellet de células ressuspendido em RPMI suplementado, porém sem ampicila, em volume suficiente para obter a concentração celular desejada, de $1x10^5$ células/mL. Desta suspensão foram distribuídas alíquotas de 1 mL em cada poço de placa com 12 poços. As células foram, então, estimuladas com 20 ng/mL de acetato de forbol-miristato (PMA) durante 24 horas (37°C/ 5% CO2), que induz a diferenciação das células em macrófagos ativos, que aderem ao fundo do poço da placa. Após este período, o meio de cultura sobrenadante contendo PMA foi substituído por RPMI suplementado (sem ampicilina), e as placas permaneceram incubadas (37°C/5% CO2) por mais 72 horas antes de proceder com a infecção ou com o ensaio de citotoxicidade (Oberley-Deegan *et al.*, 2009; Daigneault *et al.*, 2010). Isto porque células THP-1 tratadas com PMA e, em seguida, repousadas na ausência de PMA apresentam aumento de volume citoplasmático semelhante a

macrófagos derivados de monócitos e com adesão muito mais firme (Daigneault *et al.*, 2010).

2.9.2. Infecção dos macrófagos por *M. abscessus* e interação com CLA NPs

Células de *M. abscessus* ATCC 19977 foram cultivadas (30°C/ 48 horas/ 150-200 rpm) em caldo MHB-II suplementado com 0,1% de Triton-X, para evitar a formação de grumos bacterianos. Então, esta suspensão bacteriana foi padronizada com escala 0,5 de McFarland, em meio RPMI suplementado com bicarbonato de sódio e soro fetal bovino, sem ampicilina, seguida de diluição em RPMI (1:100) a fim de obter uma concentração de aproximadamente $1x10^6$ UFC/mL. O meio sobrenadante de cada poço da placa com os macrófagos diferenciados foi removido para proceder com a infecção dos macrófagos através da adição de 1 mL da suspensão diluída de *M. abscessus* (adição de $1x10^6$ UFC/mL por poço contendo $1x10^5$ macrófagos). A infecção dos macrófagos ocorreu durante 1 h, na proporção de 10 bactérias para cada macrófago (multiplicidade de infecção – MOI – de 10:1) (Oberley-Deegan *et al.*, 2009). Após esse tempo, o meio foi removido e as células foram lavadas com tampão PBS estéril (dia 0), seguido da adição de 3 mL de meio RPMI contendo: apenas RPMI (controle, na ausência de antimicrobianos), CLA livre, NPs sem CLA – DOD/CMC e DOD/CMC/PDDA, e CLA NPs antes e após diálise. CLA NPs antes da diálise foram testadas nas concentrações de 3,25 ou 32,5 µg/mL de CLA. Após diálise, CLA/DOD/CMC NPs foram testadas nas concentrações de 0,4 ou 4,0 µg/mL de CLA, enquanto CLA/DOD/CMC/PDDA NPs, nas concentrações de 0,1 ou 1,0 µg/mL de CLA. CLA livre foi testada nas seguintes concentrações: 0,5, 2,0, 3,25 ou 32,5 µg/mL. As NPs sem CLA foram testadas nas mesmas concentrações de DOD, CMC e/ou PDDA que as CLA NPs. Macrófagos infectados com *M. abscessus* e NPs interagiram por até 4 dias, sendo que nos dias 2, 3 e 4 de interação foi realizada remoção do meio de cultura e adição de 1 mL de tampão PBS gelado com 1% de Triton-X, por 5 minutos e homogeneizado até lisar todas as células aderidas. Então, foi realizada diluição seriada (fator 10) e plaqueamento de 100µL (em duplicata) para incubação a 30 °C/ 5-7 dias, e contagem de UFC/mL. Experimentos foram realizados em duplicata. Como um controle, foi realizada determinação da CIM de todos os componentes e NPs contra *M. abscessus*

em meio RPMI, obtendo os mesmos valores de CIM que aqueles obtidos em meio MHB-II.

2.10. Determinação de toxicidade das NPs contra macrófagos por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método capaz de analisar componentes estruturais das células de maneira individual e simultaneamente, e ainda analisar a expressão de diferentes moléculas do interior ou da superfície celular. Utilizando a técnica de separador de células por fluorescência ativada (*Fluorescence-Activated Cell Sorting – FACS)*, as células são geralmente marcadas com fluorocromos, e a fluorescência emitida pela célula é medida pelo desvio da luz incidente, que são específicas para cada tipo de célula. É um método prático que permite a contagem e a distinção do tipo celular, bem como a detecção de biomarcadores (Pick *et al.*, 2004).

Macrófagos não infectados foram adicionados de 3 mL de RPMI contendo cada componente ou NPs, interagindo por 2, 3 ou 4 dias. Então, o meio de cultura sobrenadante de cada poço foi coletado, e as células aderidas ao fundo do poço foram lisadas com 100 μL de tripsina (37°C/ 5 minutos), até que estivessem visivelmente desprendidas do fundo do poço, e coletadas junto com o sobrenadante previamente removido. Os macrófagos em meio RPMI mais a tripsina foram centrifugados (1000 rpm/ 5 minutos), o pellet ressuspendido em 1 mL de tampão PBS contendo 3% de soro fetal bovino, para lavagem das células, e novamente centrifugados antes de adicionar solução de iodeto de propídeo (PI) (1 mg/mL), que permaneceu em contato com as células por 5 min, em ambiente escuro e temperatura ambiente. Após, as células foram analisadas pela técnica de separador de células por fluorescência ativada FACS, em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e os dados de 10000 eventos (células) por condição foram coletados e analisados com auxílio do software FlowJo (Orlando, FL, USA).

PI é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável e/ou danificada, o que é um indicativo de morte celular. Tal propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o PI, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu

tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais de apoptose (Darzynkiewicz *et al.*, 1992; Rieseberg *et al.*, 2001). Portanto, utilizando esta ensaio, é possível avaliar a integridade de membrana dos macrófagos, que foi danificada possivelmente decorrente de apoptose tardia ou necrose celular, não sendo possível diferenciar qual o tipo de morte celular presente.

Como controle negativo do experimento, os macrófagos permaneceram em contato apenas com o meio de cultura RPMI, enquanto como controle positivo de toxicidade, foi utilizado meio RPMI contendo 10% de DMSO, que permaneceu em contato com as células aderidas durante 24 horas antes da análise, o qual acarretou danos às membranas de cerca de 60-70% dos macrófagos

2.11. Determinação do crescimento de biofilme de *M. abscessus* na presença das CLA-NPs

Em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, foram preparadas diluições seriadas (fator 2) de CLA ou NPs, em 50 µL de volume final de meio de cultura Sauton. Colônias isoladas a partir de uma cultura fresca de *M. abscessus* ATCC 19977 foram utilizadas no preparo de uma suspensão bacteriana em meio Sauton, ajustada de acordo com escala 0,5 de McFarland. Biofilmes bacterianos foram formados pela imersão de "ponteiras" de uma tampa de microplaca de poliestireno modificada nos poços da microplaca de crescimento do biofilme, seguido de incubação a 30 °C/ 72h/ 150 rpm, em um dispositivo de biofilme "Calgary" (Ceri *et al.*, 1999). Então, a tampa com as ponteiras foi lavada por três vezes em tampão PBS estéril, e as bactérias estruturadas em biofilme que se mantiveram presas às ponteiras foram fixadas com metanol por 30 minutos, Após, prosseguiu-se com coloração das ponteiras com cristal violeta 1,0 % (p/v) por 1h, que então foram lavadas três vezes com tampão PBS estéril e finalmente descoradas em etanol 100% por 15 minutos antes de proceder as leituras de absorbância (em duplicata), a 570 nm, da solução etanólica com o cristal violeta descorado (Howard *et al.*, 2006). Os controles realizados foram o crescimento do biofilme de *M. abscessus* na ausência de antimicrobianos, e o meio de cultura Sauton na ausência de bactérias. O experimento foi realizado em duplicata, e múltiplas comparações entre os dados obtidos foram

estatisticamente analisadas por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tulkey, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando $P<0,05$.

2.12. Determinação de morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

2.12.1. MEV das dispersões DOD BF/CMC/PDDA-bactérias após interação

Suspensões de *P. aeruginosa* MR e dispersões de NPs (na concentração final de 0,05 mM, 0,05 mg/mL e 0,05 mg/mL de DOD, CMC e PDDA, respectivamente) ou somente PDDA (a 1,0 mg/mL) interagiram por 1 hora antes de serem centrifugadas (12000 rpm/ 10 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet das amostras foi submetido a uma desidratação sequencial e em concentrações crescentes de etanol (de 30, 50, 70, 80, 90 e 100%), permanecendo por 15 minutos em cada concentração de etanol (Hoque *et al.*, 2012). Duas diferentes densidades de células bacterianas foram utilizadas para interagir com NPs ou PDDA: $4,4x10^3$ e $8,9x10^5$ UFC/mL. Após a desidratação, 5 µL das amostras células-arranjos desidratadas foram adicionados sobre uma superfície de óxido de silício (wafer ou bolacha de silício), que secou à temperatura ambiente, em dessecador. Estas amostras foram então revestidas com ouro e visualizadas por MEV com emissão de campo em um aparelho Jeol JSM-7401F (Japan Electron Optics Laboratory, Tokyo, Japan), operado a 5 kV, na Central Analítica do Instituto de Química da Univerisdade de São Paulo. Suspensões bacterianas na ausência de agentes antimicrobianos foram utilizadas como controles.

2.12.2. MEV das dispersões de CLA/DOD/polímeros

NPs de CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA, após serem dialisadas, permaneceram em contato por 18 horas com uma solução de OsO_4 4% (m/m) (4 partes da amostra + 1 parte de OsO_4). Então, uma pequena alíquota (5 µL) de cada dispersão foi adicionada sobre uma superfície de óxido de silício, que secou à temperatura ambiente, em dessecador. Estas amostras foram então revestidas com ouro para serem visualizadas por MEV com emissão de campo em um aparelho Jeol JSM-7401F (Japan Electron Optics Laboratory, Tokyo, Japan), operado a 1 ou 5 kV.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são divididos em duas vertentes principais: 1) NPs de DOD BF/CMC/PDDA, que foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana contra micro-organismos multirresistentes e elucidação do seu mecanismo de ação, sendo que a preparação destes arranjos pela técnica de auto-montagem, bem como sua atividade contra micro-organismos referência (ATCC) e toxicidade hemolítica já haviam sido descritas anteriormente (Melo *et al.*, 2010; Melo e Carmona-Ribeiro, 2012), resultados de nosso projeto de mestrado; 2) Arranjos carreadores de CLA, que foram preparados por injeção de solução etanólica de CLA/DOD em solução aquosa, caracterizados e avaliados quanto à sua atividade contra *M. abscessus.* A Figura 5 ilustra, de maneira esquemática, todo o trabalho realizado neste projeto.

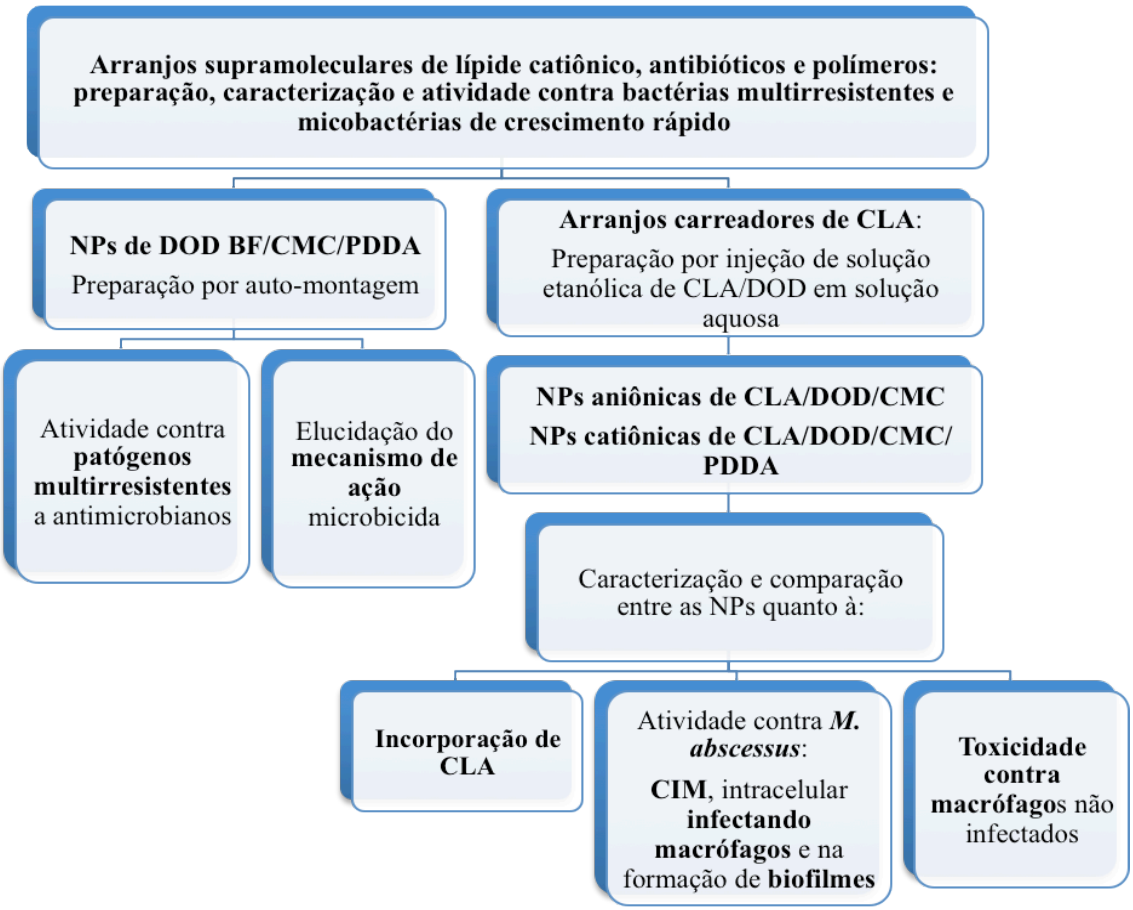


Figura 5. Resultados descritos nesta tese para NPs e suas respectivas atividades contra micro-organismos.

3.1. Propriedades físicas de arranjos supramoleculares de DOD BF/CMC/PDDA

Pelo método da sonicação (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1991), foram obtidos, em solução isotônica de D-glicose 0,264M, DOD BF, positivamente carregados, de Dz = 81 nm, P = 0,172 e ζ = 52 mV, a uma condutividade de 54 µS/cm. A Figura 6 ilustra a distribuição de tamanho bimodal destes DOD BF e a ilustração esquemática de DOD BF.

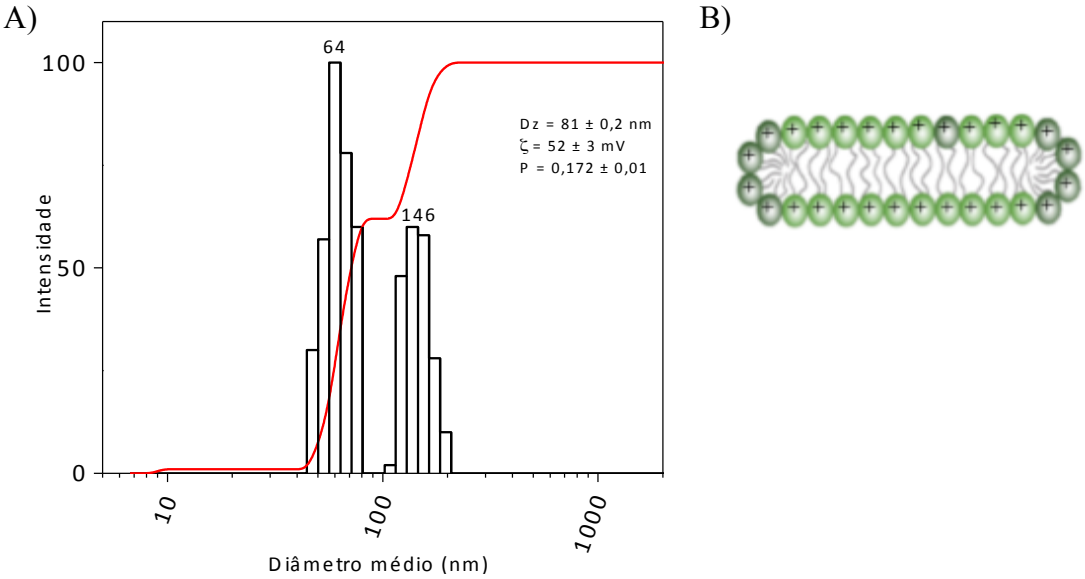


Figura 6. Distribuição de tamanho de DOD BF 2 mM em solução de D-glicose 0,264 M (A) e representação esquemática de DOD BF (B).

A partir de DOD BF, catiônicos, foram construídos os arranjos supramoleculares, pela técnica da auto-associação, em que as bicamadas foram envolvidas pelo polieletrólito aniônico CMC, em uma concentração em que os arranjos de DOD BF/CMC se encontrassem estáveis e negativamente carregados, conforme previamente descrito (Melo *et al.*, 2010). Desta forma, DOD BF interagiram por 20 minutos com CMC, obtendo arranjos com Dz = 114 nm, P = 0,125 e ζ = -43 mV, a condutividade de 45 µS/cm. A Figura 7 ilustra a distribuição de tamanho e a ilustração esquemática dos arranjos aniônicos de DOD BF/ CMC em concentrações de DOD e CMC de 0,1 mM e 0,1 mg/mL, respectivamente.

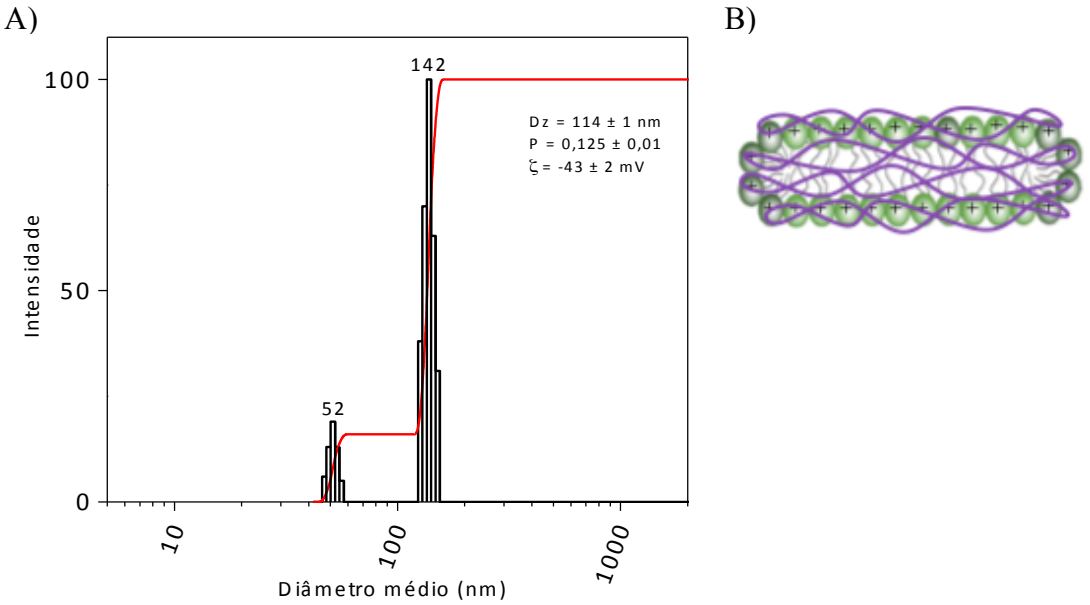


Figura 7. Distribuição de tamanho dos arranjos aniônicos compostos de 0,1 mM de DOD BF e 0,1 mg/mL de CMC em solução de D-glicose 0,264 M (A) e representação esquemática de DOD BF/CMC (B).

A seguir, estes arranjos aniônicos de DOD BF/CMC foram envolvidos pelo polieletrólito catiônico PDDA, em uma determinada concentração para que os arranjos de DOD BF/CMC/PDDA fossem estáveis e positivamente carregados, conforme já estudado e descrito anteriormente (Melo *et al.*, 2010). Desta forma, os arranjos de DOD BF/CMC interagiram por 20 minutos com PDDA, na concentração final de 0,1 mg/mL, obtendo assim as NPs híbridas e catiônicas de DOD BF/CMC/PDDA, com Dz = 108 nm, P = 0,131 e ζ = 37 mV, a uma condutividade de 106 µS/cm. Todas as dispersões e soluções utilizadas para a preparação das NPs foram preparadas em solução isotônica de D-glicose 0,264 M. A Figura 8 ilustra a distribuição de tamanho e a ilustração esquemática das NPs de DOD BF/CMC/PDDA nas concentrações de 0,1 mM, 0,1mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente. Assim, tais NPs obtidas estão de acordo com aquelas obtidas anteriormente, que apresentavam Dz = 108 nm e ζ = 30mV (Melo *et al.*, 2010).

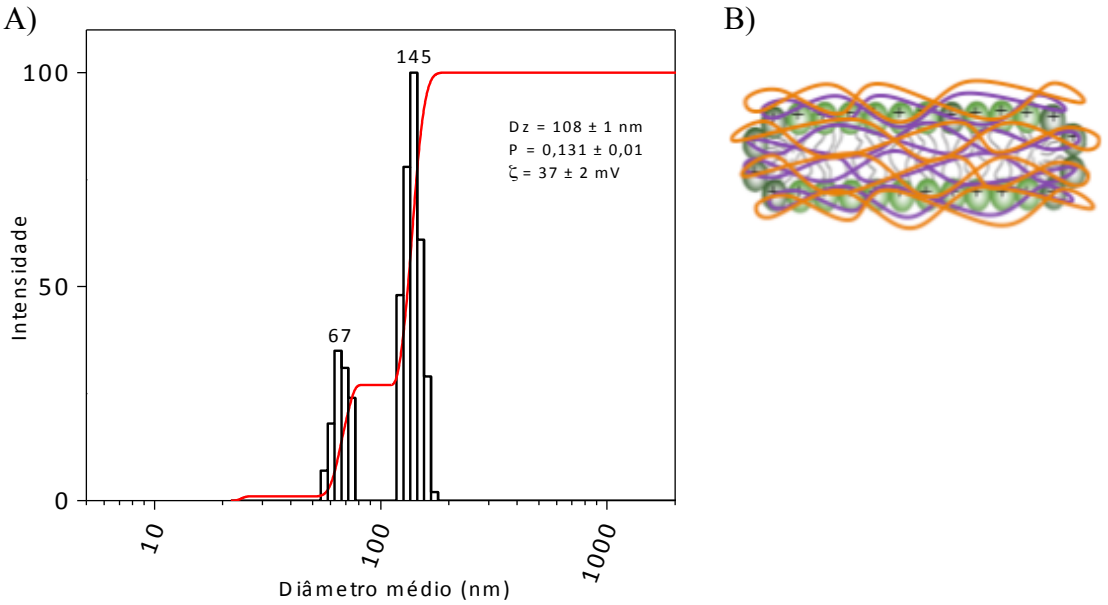


Figura 8. Distribuição de tamanho das NPs híbridas compostas de 0,1 mM de DOD BF, 0,1 mg/mL de CMC e 0,1 mg/mL de PDDA, preparadas por auto-associação em solução de D-glicose 0,264 M (A) e representação esquemática de DOD BF/CMC/PDDA (B).

3.2. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação de arranjos supramoleculares de DOD BF/CMC/PDDA contra micro-organismos multirresistentes

Após a preparação das NPs híbridas de DOD BF/CMC/PDDA, foi avaliada sua atividade antimicrobiana contra isolados clínicos de micro-organismos MR, além da determinação do extravasamento de compostos intracelulares fosforilados, o qual indica a lise da estrutura celular microbiana, bem como a visualização da morfologia das dispersões após interação NPs- ou PDDA-bactérias através de MEV. Para tais determinações foram testadas as cepas de duas bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa* MR e *K. pneumoniae* produtora de KPC (KPC+), uma de bactéria Gram-positiva, MRSA, e uma de levedura, *C. albicans* resistente ao fluconazol. Para o extravasamento de fosfato, também foram testadas as cepas ATCC destes micro-organismos. Tanto a ação antimicrobiana como o extravasamento de compostos fosforilados após a interação das células com cada componente catiônico das NPs de maneira isolada, DOD BF e PDDA, também foram avaliadas como controles. O MEV foi realizado após interação de NPs ou PDDA com células de *P. aeruginosa* MR. Importante ressaltar que já foi anteriormente demonstrado que, para estas mesmas NPs, a concentração microbicida do PDDA isoladamente foi igual ou muito

próxima à concentração microbicida de PDDA, quando incorporado nas NPs (Melo *et al.*, 2010), contra cepas padrão de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Na Figura 9 está demonstrada a atividade antimicrobiana das NPs contra as cepas bacterianas MR, em comparação com os controles (DOD e PDDA livres). A partir do log do número de UFC/mL viáveis, observa-se que PDDA livre ou hibridizado nas NPs causou uma redução de oito ciclos logarítmicos de viabilidade celular (8-logs) para as três bactérias MR testadas (Figuras 9A-C), atingindo a CMM em baixas concentrações. Contra *P. aeruginosa* MR, o efeito de DOD BF foi semelhante ao do PDDA livre ou nas NPs (Figura 9A). Entretanto, contra *K. pneumoniae* KPC+ e MRSA, DOD BF causou uma redução de 2- e 1-log, respectivamente, na viabilidade celular (Figuras 9B-C), em contraste com a excelente redução de 8-logs de PDDA livre ou nas NPs. As Figuras 9 D-F mostram o extravasamento de compostos fosforilados induzidos pela interação dos arranjos catiônicos com células bacterianas (ATCC e MR) em função das concentrações de DOD ou PDDA. Em baixas concentrações de DOD ou PDDA, não se observa extravasamento de compostos fosforilados intracelulares, mas acima de $6x10^{-3}$ mg/mL de PDDA o extravasamento aumenta com a concentração de PDDA para todas as cepas bacterianas testadas, resultado que está associado com o mecanismo de ação biocida das NPs.

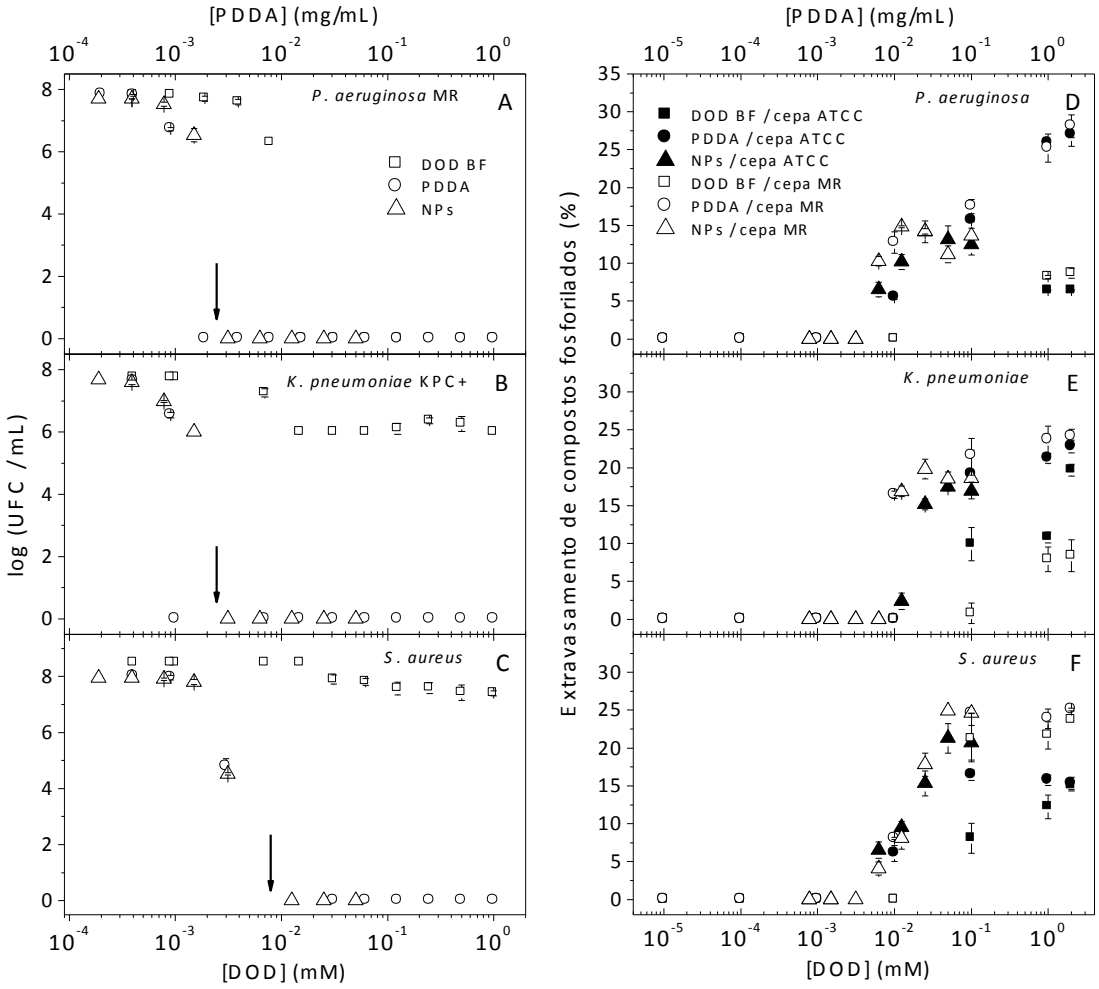


Figura 9. Viabilidade celular em função das concentrações de DOD ou PDDA para *P. aeruginosa* MR (5-7x10^7 UFC/mL) (A), *K. pneumoniae* produtora de KPC (4-5x10^7 UFC/mL) (B) ou MRSA (8x10^7 – 3x10^8 UFC/mL) (C); extravasamento de compostos fosforilados (%) em função das concentrações de DOD ou PDDA para cepas ATCC ou MR de *P. aeruginosa* (2x10^8 – 5x10^{10} UFC/mL) (D), *K. pneumoniae* (3x10^8–1x10^{10} UFC/mL) (E) ou *S. aureus* (5x10^9 – 6x10^{11} UFC/mL) (F). As interações ocorreram durante 1 hora, e as CMM para PDDA nas NPs estão indicadas por setas (A, B e C).

A Figura 10 mostra a importante atividade fungicida apresentada pelas NPs e pelo PDDA livre contra isolado clínico de *C. albicans* fluconazol R. Pode-se observar uma redução de 6-logs na viabilidade celular (CMM), o que contrasta com a inatividade de DOD BF frente às leveduras.

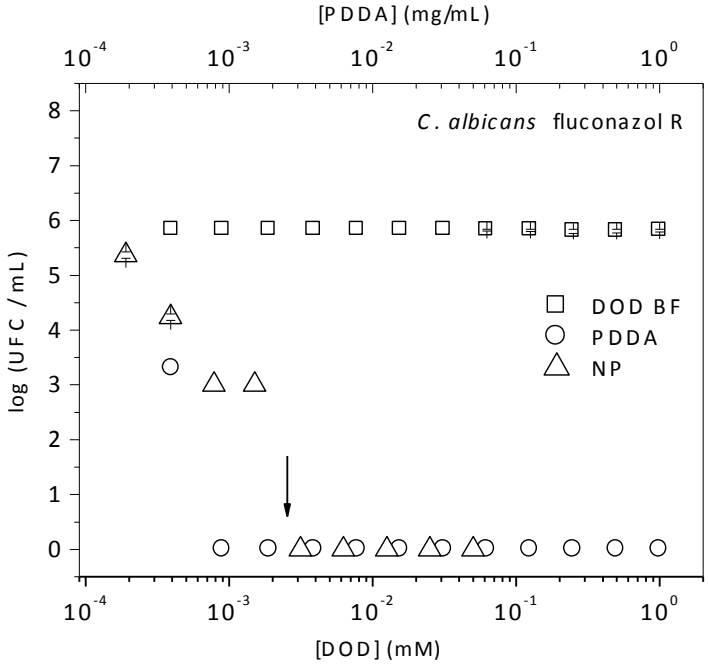


Figura 10. Viabilidade celular em função das concentrações de DOD ou PDDA para *C. albicans* fluconazol R a 6-8x105 UFC/mL. As interações ocorreram durante 1 hora, e a CMM para PDDA nas NPs está indicada por seta.

Os valores das CMM para DOD livre, PDDA livre ou PDDA nas NPs contra os micro-organismos MR testados estão reportados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de CMM para DOD BF e PDDA livre ou PDDA nas NPs contra cepas de micro-organismos MR. DOD BF está presente nas NPs na concentração de *2,5 ou **8,0 μM.

Micro-organismos MR	[DOD](μM)	[PDDA](μg/mL)	$[PDDA]_{nasNPs}$ (μg/mL)
P. aeruginosa MR	10	1,5	2,5*
K. pneumoniae KPC+	>1000	0,9	2,5*
MRSA	>1000	5,0	8,0**
C. albicans fluconazol R	>1000	0,8	2,5*

DOD BF é um agente bactericida apenas contra a cepa de *P. aeruginosa* MR, em 10 μM. O PDDA livre mostrou excelente ação microbicida contra todas as cepas testadas, em concentrações bastante pequenas (Tabela 5), sendo que a cepa mais sensível ao PDDA foi a levedura, com CMM de 0,8 μg/mL de PDDA. Já quando o PDDA está presente nas NPs, é efetivo contra os micro-organismos em concentrações discretamente maiores do que quando age livre, em solução, como microbicida, tanto para as bactérias quanto para as leveduras (Tabela 5).

Apesar da sensibilidade de detecção 10 nanomols de Pi (ou absorbância de 0,1) do método utilizado para a determinação do extravasamento de compostos fosforilados das células microbianas (Carmona-Ribeiro, 2012), não foi possível detectar tal extravasamento em suspensões bacterianas contendo cerca de 10^7 UFC/mL (ou 10^5 UFC/mL de suspensão fúngica), que foi a concentração celular utilizada na determinação da CMM. Desta forma, concentrações celulares de 10 a 100 vezes maiores do que aquelas utilizadas na obtenção dos resultados das Figuras 9A-C foram utilizadas para obtenção dos resultados demonstrados nas Figuras 9D-F. A Tabela 6 mostra a quantidade total de Pi determinada pelo método descrito acima, presente em amostras com duas quantidades de células diferentes dos micro-organismos MR utilizados.

Tabela 6. Determinação de fosfato inorgânico (Pi) total para os micro-organismos MR em duas quantidades de células distintas.

Micro-organismo	Número de células	Absorbância	Nanomols Pi
P. aeruginosa MR	$2,1 \times 10^7$	0,052 ± 0,003	5,2 ± 0,3
	$1,6 \times 10^9$	0,441 ± 0,010	44,1 ± 1,0
K. pneumoniae KPC+	$8,6 \times 10^6$	0,045 ± 0,010	4,5 ± 1,0
	$1,2 \times 10^8$	0,216 ± 0,006	21,6 ± 0,6
MRSA	$9,1 \times 10^6$	0,032 ± 0,004	3,2 ± 0,4
	$6,3 \times 10^{10}$	0,260 ± 0,001	26,0 ± 0,1
C. albicans fluconazol R	$8,9 \times 10^4$	0,008 ± 0,002	0,8 ± 0,2
	$3,3 \times 10^6$	0,401 ± 0,010	40,1 ± 1,0

A limitação da sensibilidade da técnica de determinação de Pi justifica a necessidade de utilizar uma suspensão microbiana com maior quantidade de células para a detecção do extravasamento de compostos fosforilados. A partir disto, um experimento adicional foi realizado para avaliar a atividade antimicrobiana do PDDA livre e hibridizado nas NPs, interagindo por 1 hora com uma suspensão microbiana com a mesma quantidade de células utilizadas nas determinações de extravasamento de fosfato (Figura 11). Para efeito de comparação, este experimento foi realizado apenas contra células de *C. albicans* fluconazol R.

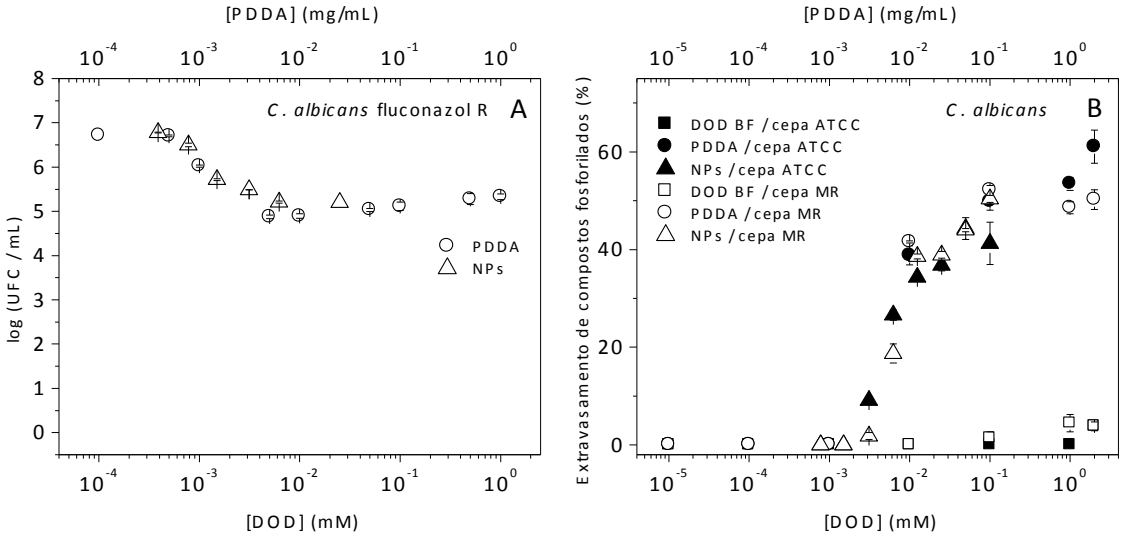


Figura 11. Log de UFC/mL em função das concentrações de DOD ou PDDA para a cepa de *C. albicans* fluconazol R, a 5-6x10^6 UFC/mL (A); Porcentagem de extravasamento de compostos fosforilados em função das concentrações de DOD ou PDDA para as cepas ATCC e fluconazol resistente de *C. albicans* a 7x10^6 – 1x10^7 UFC/mL (B). As interações ocorreram por 1 hora.

Em uma faixa de concentração de DOD ou PDDA, interagindo com uma quantidade de células de 10 a 100 vezes maior do que aquela utilizada em experimento anterior, observou-se redução de 2-logs na viabilidade celular (Figura 11A) e a detecção do extravasamento de compostos fosforilados (Figura 11B), sugerindo uma inequívoca correlação entre morte celular e o extravasamento de Pi. Para DOD BF, nem extravasamento (Figura 11B) ou efeito fungicida (Figura 10) foi detectado em toda a faixa de concentração de DOD testada.

As imagens obtidas por MEV das NPs em dispersão, na ausência de bactérias, ou interagindo com células de *P. aeruginosa* MR estão demonstradas na Figura 12A-C, e imagens da interação de PDDA livre com esta bactéria estão na Figura 12D,E. A imagem do controle, em que apenas a suspensão bacteriana está presente é demonstrada na Figura 12F. As NPs, antes de entrarem em contato com as células bacterianas, possuem uma forma discoidal e alta polidispersidade (Figura 12A), em concordância com os dados obtidos por DLS. No entanto, ao passo que a quantidade de células bacterianas presentes na amostra aumenta (da Figura 12B para a 12C), as NPs íntegras praticamente desaparecem, sugerindo que elas se desarranjem após a exposição às bactérias, ocorrendo uma disassociação de DOD BF, com liberação das

camadas poliméricas externas. O PDDA, como a camada mais externa das NPs, é atraído eletrostaticamente pelas cargas negativas dos compostos da estrutura da parede celular microbiana (lipopolissacaríedos para as Gram-negativas e ácidos teicóicos para as Gram-positivas), ocorrendo uma certa competição com a sua combinação com o CMC. Assim, o PDDA acaba sendo liberado das NPs para ficar em contato com as células bacterianas, e estando livre pode exercer seu efeito antimicrobiano máximo.

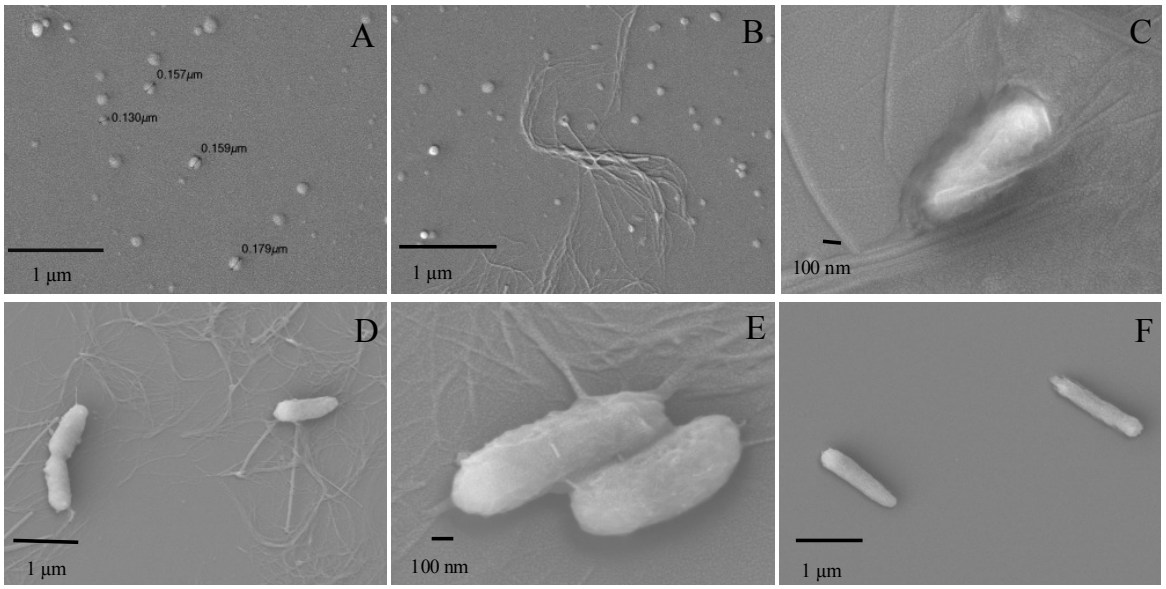


Figura 12. Imagens obtidas por MEV da NPs (A); das NPs interagindo com $4{,}4x10^3$ (B) ou $8{,}9x10^5$ UFC/mL (C) de *P. aeruginosa* MR. Imagens de MEV da interação de PDDA (a 1,0 mg/mL de concentração final) com $8{,}9x10^5$ UFC/mL (D-E) de *P. aeruginosa* MR; imagem das células de *P. aeruginosa* MR após interação com D-glicose 0,264 M. As concentrações finais das NPs utilizadas nas interações com as células de *P. aeruginosa* MR foram 0,05 mM DOD, 0,05 mg/mL CMC e 0,05 mg/mL PDDA.

Além disso, a relação NPs/células parece ser importante para a visualização de fibras nas micrografias, associadas ao desaparecimento das NPs íntegras. A uma baixa relação NPs/células, aumentam o número de fibras visualizadas nas imagens, sugerindo a participação dos biopolímeros da parede celular na formação de fibras e feixes espessos que estão saindo das superfícies celulares, mas parecem ser capazes de manter um certo nível de organização em multicamadas (Figura 12C). A importância do PDDA na retirada de material da parede celular está melhor ilustrada

nas Figuras 12D-E, em que o PDDA livre interage com as células e há uma clara presença de fibras e feixes nas imagens. A imagem da amostra controle mostra a presença somente das células bacterianas, evidenciando a ausência de fibras (Figura 12F). Mas é importante destacar que em uma relação NPs/células alta, as condições experimentais são completamente diferentes daquelas utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana (baixa relação NPs/células). No entanto, quando há a presença de muitas células nas imagens obtidas por MEV, é difícil observar as NPs íntegras, fibras e feixes. Desta forma, as melhores condições para visualização por MEV da interação das NPs com as células microbianas foram obtidas em uma alta relação NPs/células.

3.3. Propriedades físicas das NPs de CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA

A fim de aproveitar as propriedades de solubilidade em etanol de ambos os compostos hidrofóbicos, CLA e lípide catiônico DOD, foram preparadas soluções etanólicas com ambos os compostos co-solubilizados em 3 diferentes proporções molares, e injetadas em solução aquosa de D-glicose 0,264 M, sob agitação e aquecimento, cujas concentrações finais de CLA, DOD e etanol, e o aspecto visual das dispersões, no dia do preparo e 7 dias após o preparo estão na Tabela 7

Tabela 7. Estabilidade coloidal dos arranjos de CLA/DOD preparados próximos à proporção equimolar de CLA:DOD. Antimicrobiano e lípide solubilizados em etanol foram dispersos em solução de D-glicose 0,264 M, obtendo as concentrações finais de CLA, DOD e etanol demonstradas abaixo.

Proporção molar CLA:DOD	[CLA] (mM / µg/mL)	[DOD] (mM / µg/mL)	[Etanol] (%)	Estabilidade coloidal	
				Dia 0	Dia 7
1:1	0,17 / 130	0,170 / 110	2,5	Límpido	Floculado
2:1	0,17 / 130	0,085 / 53	2,5	Floculado	-
1:2	0,17 / 130	0,350 / 220	2,5	Límpido	Floculado

As partículas de CLA:DOD na proporção molar 1:1 em D-glicose, que estavam límpidas visualmente logo após seu preparo, apresentaram Dz = 319 ± 13 nm, P = 0,39 ± 0,07 e ζ = 30 ± 2 mV. No entanto, este arranjo perdeu estabilidade após 24 horas do seu preparo, apresentando aumento nos valores de Dz e P, além de precipitação. Já a dispersão composta pela proporção molar de 1:2 CLA:DOD, que

também estava visivelmente límpida após seu preparo, quando caracterizada por DLS apresentou Dz = 275 ± 15 nm, P = 0,29 ± 0,01 e ζ = 38 ± 2 mV, mas ao longo do tempo também perdeu a estabilidade coloidal.

Como as dispersões de CLA/DOD próximas à proporção equimolar apresentaram baixa estabilidade coloidal (Tabela 7), o polieletrólito aniônico CMC presente na solução aquosa foi capaz de combinar-se com os catiônicos CLA e DOD injetados na solução etanólica, harmonizando as NPs de CLA/DOD/CMC, formando dispersões coloidalmente estáveis por, no mínimo, 7 dias após o seu preparo (a 2,5 % de etanol). Assim, os dados obtidos por DLS das dispersões injetadas de CLA/DOD, a diferentes proporções molares, em solução aquosa de CMC (0,1 mg/mL) estão demonstrados na Tabela 8. Como os valores de Dz, P e ζ obtidos 7 dias após o preparo das dispersões foram muito semelhantes aos valores obtidos logo após seu preparo, foram reportados na Tabela 8 apenas os resultados de DLS obtidos das dispersões recém preparadas.

Tabela 8. Estabilidade coloidal e propriedades físicas (Dz, P e ζ) dos arranjos de CLA/DOD/CMC preparados próximos à proporção equimolar de CLA:DOD em 100 µg/mL de CMC, 0,264 M de D-glicose e 2,5 % de etanol.

Proporção molar CLA:DOD	[CLA] (µg/mL)	[DOD] (µg/mL)	Dz (nm)	P	ζ (mV)	Estabilidade coloidal	
						Dia 0	Dia 7
1:1	130	110	139 ± 1	0,20 ± 0,01	-25 ± 1	Límpido	Límpido
2:1	130	53	144 ± 1	0,22 ± 0,01	-33 ± 2	Límpido	Límpido
1:2	130	220	274 ± 2	0,28 ± 0,01	+17 ± 1	Límpido	Límpido

As NPs de CLA/DOD/CMC, estáveis, podem apresentar cargas negativas ou positivas, dependendo da proporção molar de CLA/DOD. A dispersão com ζ positivo ocorreu a CLA:DOD 1:2, embora o valor de ζ seja baixo (17 ± 1 mV) (Tabela 8).

A solução etanólica de CLA:DOD contendo a menor concentração de DOD (proporção molar de 2:1) foi escolhida para ser injetada em uma faixa de concentrações de CMC, obtendo dispersões que foram caracterizadas de acordo com Dz, ζ e P, demonstradas na Figura 13 A-C. A dispersão contendo a menor proporção de DOD foi escolhida a fim de reduzir a eventual contribuição de DOD à toxicidade dos arranjos formados. Na presença de 0,1 mg/mL de CMC na solução aquosa, foram obtidos arranjos particulados com Dz inferior a 200 nm, baixa polidispersidade e negativamente carregados. Assim, as NPs aniônicas

(CLA/DOD/CMC) obtidas na concentração de 0,1 mg/mL de CMC foram posteriormente combinadas com o polieletrólito catiônico PDDA em uma faixa de concentrações, que foram caracterizadas por DLS e os resultados estão na Figura 13 D-F. A dispersão de CLA/DOD/CMC adicionada de uma solução de PDDA a 0,1 mg/mL formou arranjos nanoparticulados (Dz < 200 nm), baixa polidispersidade e potencial zeta positivo. As setas na Figura 13 indicam as NPs aniônicas de CLA/DOD/CMC e catiônicas de CLA/DOD/CMC/PDDA que foram avaliadas quanto à incorporação de CLA, atividade contra *M. abscessus* e toxicidade contra os macrófagos THP-1. As caracterizações por DLS foram realizadas por até 7 dias após o preparo das dispersões, que apresentaram alta estabilidade coloidal.

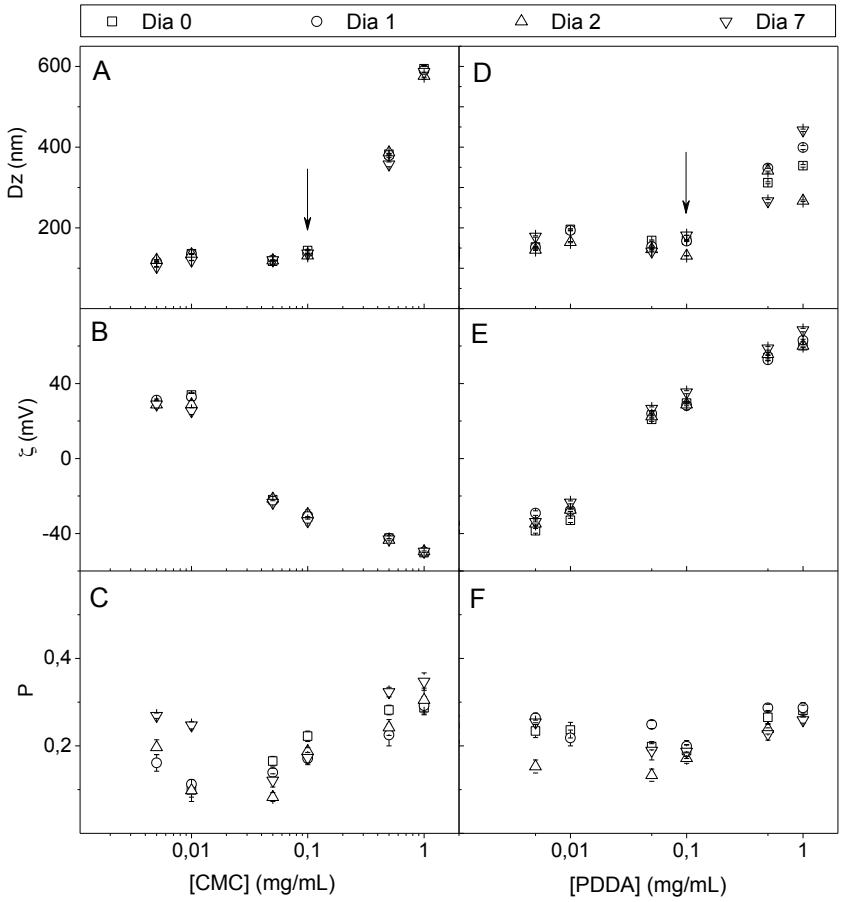


Figura 13. Diâmetro médio (Dz), potencial zeta (ζ) e polidispersidade (P) das dispersões de CLA/DOD/CMC (A, B, C) ou CLA/DOD/CMC/PDDA (D, E, F), em função da concentração de CMC ou PDDA. Concentrações finais de CLA, DOD e etanol são 130 µg/mL, 53 µg/mL e 2,5 %. As concentrações de CMC ou PDDA selecionadas para combinação nas NPs estão demonstradas por setas.

Ambas as NPs de CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA, preparadas nas concentrações selecionadas, foram dialisadas após suas preparações, para remover o excesso de CLA além de todo o etanol presente na dispersão. Após diálise, as dispersões também foram caracterizadas por DLS para monitorar suas estabilidades coloidais. As distribuições de tamanho das NPs aniônicas e catiônicas, antes e após diálise, bem como das NPs controle, preparadas na ausência de CLA (DOD/CMC ou DOD/CMC/PDDA) estão na Figura 14, e os valores de Dz, P e ζ destas dispersões estão na Tabela 9. A condutividade destas dispersões foi de 50 ou 46 μS/cm para as NPs aniônicas ou catiônicas sem CLA, enquanto foi de 64 e 24 μS/cm para as aniônicas antes e após diálise, e 158 e 129 μS/cm para as catiônicas, antes e após diálise, respectivamente.

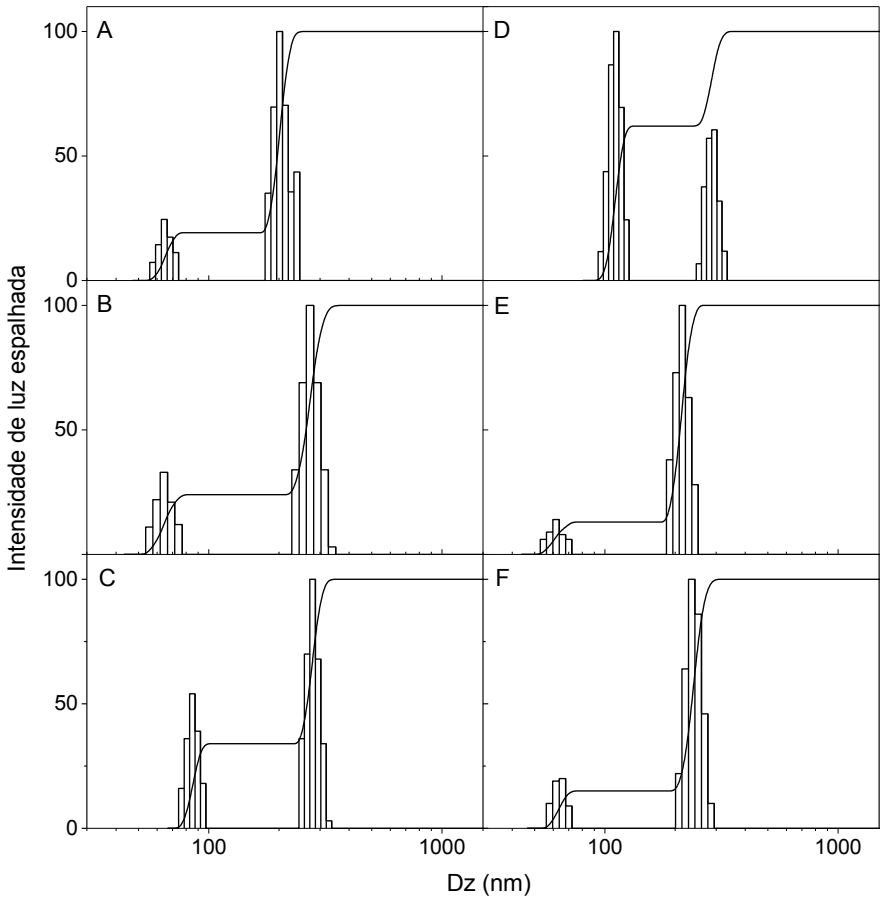


Figura 14. Distribuições de tamanho da dispersão de DOD/CMC (A) e das NPs aniônicas de CLA/DOD/CMC antes (B) ou após diálise (C), e da dispersão de DOD/CMC/PDDA (D) e das NPs catiônicas de CLA/DOD/CMC/PDDA antes (E) ou após diálise (F). As dispersões sem CLA e antes da diálise continham 2,5 % de etanol.

Comparando as propriedades físicas das NPs sem CLA e das CLA NPs, é possível observar que os arranjos são nanoestruturados, com polidispersidade relativamente baixa, apresentando distribuição bimodal de tamanho de partícula, em que a carga das NPs é dependente da natureza do polieletrólito revestindo externamente o particulado (Figura 14, Tabela 9). A diálise das CLA NPs resultou em pequena alteração nos valores médios de Dz, P e ζ (Tabela 9).

Tabela 9. Composição e propriedades físicas (Dz, P e ζ) dos arranjos obtidos por injeção de solução etanólica de CLA/DOD em solução aquosa de CMC, a 2,5% de etanol, antes (ad) ou após diálise (dd). Alguns arranjos foram adicionados de solução de PDDA. PD: posteriormente determinado.

Arranjo	[CLA] (µg/mL)	[DOD] (µg/mL)	[CMC] (µg/mL)	[PDDA] (µg/mL)	Dz (nm)	P	ζ (mV)
DOD/CMC	0	53	100	-	153±1	0,19±0,01	-34±1
CLA/DOD/CMC$_{ad}$	130	53	100	-	150±1	0,19±0,01	-32±2
CLA/DOD/CMC$_{dd}$	PD	53	100	-	121±1	0,22±0,01	-43±5
DOD/CMC/PDDA	0	53	100	100	148±1	0,16±0,01	22±1
CLA/DOD/CMC/PDDA$_{ad}$	130	53	100	100	138±1	0,16±0,01	24±1
CLA/DOD/CMC/PDDA$_{dd}$	PD	53	100	100	168±1	0,12±0,02	48±1

3.4. Morfologia dos arranjos de CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA

As imagens obtidas por MEV dos arranjos aniônicos e catiônicos, dialisados para remoção da CLA livre, estão na Figura 15.

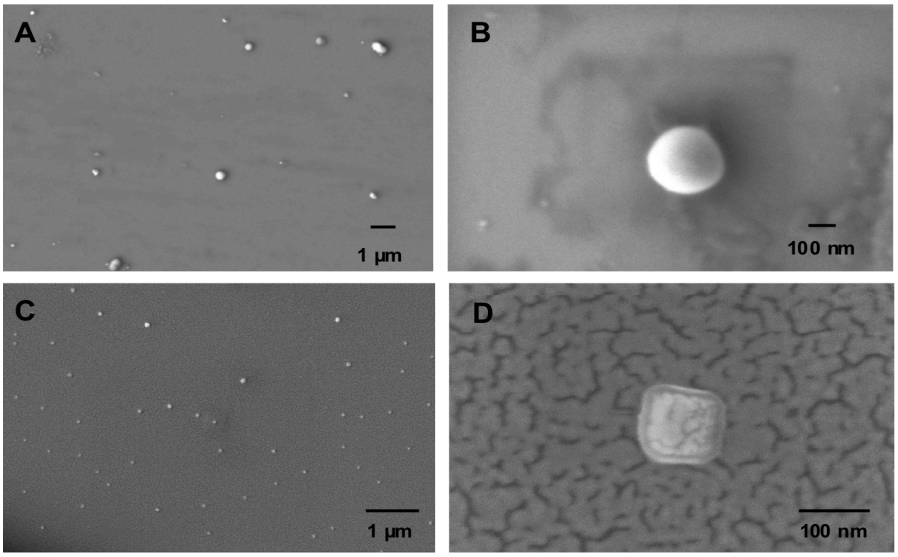


Figura 15. Imagens obtidas por MEV dos arranjos aniônicos de CLA/DOD/CMC (A, B) e catiônicos de CLA/DOD/CMC/PDDA (C, D), ambos após diálise.

Os arranjos apresentam-se dispersos e nanoparticulados, sendo que os arranjos aniônicos de CLA/DOD/CMC aparentam uma morfologia mais arredondada (Figura 15B) do que os arranjos catiônicos de CLA/DOD/CMC/PDDA (Figura 15D).

3.5. Incorporação da CLA nas CLA NPs

3.5.1. Confirmação da presença de CLA por HPLC-MS

O cromatograma de pico base (BPC), que monitora apenas o pico mais intenso do espectro, e o espectro de massas do BPC, obtido por HPLC-MS para os arranjos dialisados de CLA/DOD/CMC estão na Figura 16.

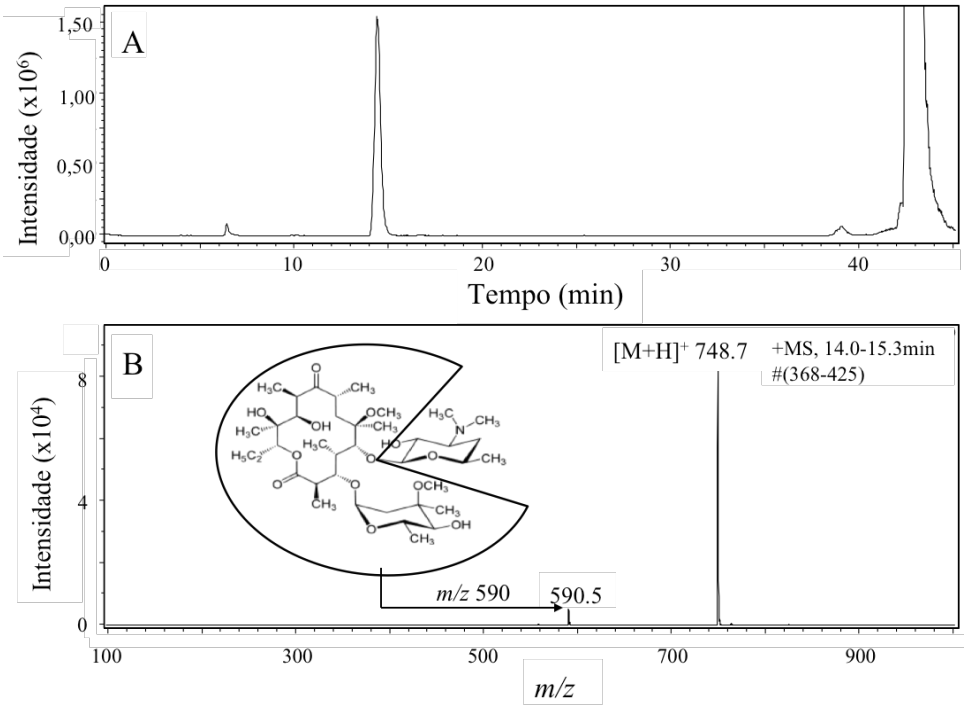


Figura 16. Cromatograma de pico base (BPC) (A) ao longo do tempo de eluição e espectro de massa (B) para o pico eluído por volta dos 15 minutos resultou em dois picos, da molécula inteira de CLA em *m/z* 748.7 e seu fragmento em *m/z* 590.5 (B), obtidos a partir da dispersão dialisada de CLA/DOD/CMC.

O BPC de CLA é observado entre 14-18 minutos de eluição da amostra (Figura 16A), e o pico do MS detectado em *m/z* de ~ 748 e seu fragmento em *m/z* de ~590 confirma a presença de CLA (Figura 16B). Tais resultados foram obtidos para

todos os arranjos analisados, diferindo apenas com relação à intensidade de sinal detectada nos picos, que foi maior para as amostras não dialisadas (Tabela 10).

Desta forma, a presença de CLA nas CLA NPs é confirmada por HPLC-MS, mesmo com a diálise removendo grande parte da CLA inicialmente ligada aos arranjos, e a permanência de CLA nas CLA NPs dialisadas, mesmo que aparentemente em baixas concentrações fica evidente. Importante destacar que não foi possível quantificar CLA nas NPs pela metodologia utilizada por HPLC-MS, pois o erro a ser considerado em cada amostra era relativamente grande (≥ 10 µg/mL). Mas ainda assim, as NPs dialisadas de CLA/DOD/CMC apresentaram maior intensidade de sinal detectados nos picos do HPLC-MS do que as NPs de CLA/DOD/CMC/PDDA (Tabela 10).

Tabela 10. Intensidade dos picos detectados para CLA por HPLC-MS, antes (ad) ou após diálise das CLA NPs (dd).

Arranjo	Intensidade máxima dos picos de CLA	
	BPC	pico *m/z* 748 do MS
$CLA/DOD/CMC_{ad}$	$7{,}0x10^7$	$4{,}5x10^6$
$CLA/DOD/CMC_{dd}$	$1{,}5x10^6$	$9{,}0x10^4$
$CLA/DOD/CMC/PDDA_{ad}$	$4{,}0x10^7$	$1{,}2x10^6$
$CLA/DOD/CMC/PDDA_{dd}$	$1{,}2x10^4$	$1{,}1x10^3$

3.5.2. Quantificação de CLA por CIM

A determinação da CIM de CLA contra a cepa referência de *S. aureus* ATCC 29213 foi realizada para quantificar a concentração de CLA presente nas CLA NPs, antes e após a diálise. Como o valor obtido da CIM de CLA livre foi assumido como o valor de CLA presente na diluição das NPs que inibiu o crescimento de *S. aureus*, desta maneira foram calculadas as concentrações de CLA que, de fato, estavam presentes nas CLA NPs, antes e após diálise, permitindo ainda o cálculo da porcentagem de incorporação de CLA às NPs dialisadas (% Inc). Como controles, a inibição do crescimento de *S. aureus* também foi determinada para cada componente de maneira isolada (DOD, CMC, PDDA). A CIM de CLA livre e dos compostos de maneira isolada, bem como as concentrações de CLA combinadas às NPs e a % Inc estão na Tabela 11. Como a CIM obtida para a CLA livre foi de 0,5 µg/mL (Tabela 11), dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pelo documento A100-S25 (CLSI,

2015), tal valor foi utilizado para calcular a concentração de CLA nas CLA NPs (Tabela 11).

Tabela 11. CIM de CLA, DOD, CMC e PDDA contra *S. aureus* ATCC 29213, [CLA] nas CLA NPs antes (ad) e após diálise (dd), e porcentagem da incorporação de CLA nos arranjos (% Inc).

Arranjo	CIM (µg/mL)	[CLA] nas NPs (µg/mL)	% Inc
Solução padrão CLA (64 µg/mL)	0,5		
DOD BF 63 µg/mL	> 31,5		
CMC 100 µg/mL	> 50,0		
PDDA 100 µg/mL	6,2		
CLA/DOD/CMC_{ad}		128	
CLA/DOD/CMC_{dd}		16,0	12,5
CLA/DOD/CMC/$PDDA_{ad}$		128	
CLA/DOD/CMC/$PDDA_{dd}$		4,0	3,1

Para ambas as CLA NPs não dialisadas, aniônicas ou catiônicas, foi determinada a presença de 128 µg/mL de CLA, enquanto para as CLA NPs dialisadas, foi quantificada a presença de 16,0 µg/mL de CLA nas aniônicas, e de 4,0 µg/mL nas catiônicas, sendo a % Inc nas CLA NPs aniônicas quatro vezes maior do que nas catiônicas (Tabela 11). As CIMs obtidas para os controles mostram que o lípide catiônico DOD e o polímero CMC não apresentam atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Para CMC tal resultado já era esperado, pois sabe-se que é um composto inerte. Já o lípide DOD, que qpresenta atividade contra *S. aureus* em soluções de baixa força iônica tal qual D-glicose 0,264 M (Campanha *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2010), esta inatividade observada provavelmente deve-se à presença do meio de cultura MHB-II, cuja força iônica pode variar de 0,9 a 2,29 mM, podendo exercer efeito de blindagem das cargas positivas de DOD, e consequentemente reduzindo sua efetividade antimicrobiana.

Na Tabela 12 estão reportados os valores de cada componente presente nas CLA NPs bem como nas NPs controle (sem CLA) no ponto em que as mesmas inibiram o crescimento de *S. aureus* (Cepa ATCC 29213). As NPs aniônicas sem CLA (DOD/CMC) não apresentam atividade antimicrobiana nem mesmo nas maiores concentrações testadas (Tabela 12). O PDDA livre apresenta CIM de 6,2 µg/mL (Tabela 11), enquanto as NPs catiônicas, na ausência CLA (DOD/CMC/PDDA) ou na presença de baixas concentrações de CLA (NPs após

diálise), inibiram o crescimento de *S. aureus* na presença de 12,5 µg/mL de PDDA (Tabela 12), o que significa que o PDDA pode contribuir com efeito antimicrobiano adicional àquele atribuído à presença de CLA nas CLA/DOD/CMC/PDDA NPs. No entanto, a atividade antimicrobiana do PDDA contra *S. aureus* parece ser insignificante na presença de altas concentrações de CLA (Tabela 12).

Tabela 12. Concentração dos componentes das NPs no ponto da inibição do crescimento bacteriano de *S. aureus* ATCC 29213. ad: antes da diálise; dd: após diálise.

Arranjo	[CLA] (µg/mL)	[DOD] (µg/mL)	[CMC] (µg/mL)	[PDDA] (µg/mL)
DOD/CMC	-	> 26,5	> 50,0	-
CLA/DOD/CMC$_{ad}$	0,5	0,2	0,4	-
CLA/DOD/CMC$_{dd}$	0,5	1,6	3,1	-
DOD/CMC/PDDA	-	6,6	12,5	12,5
CLA/DOD/CMC/PDDA$_{ad}$	0,5	0,2	0,4	0,4
CLA/DOD/CMC/PDDA$_{dd}$	0,5	6,6	12,5	12,5

3.6. Atividade antimicrobiana das CLA NPs contra *M. abscessus*

3.6.1. CIM de CLA

As CIMs dos compostos de maneira isolada, das NPs sem CLA bem como das CLA NPs, antes e após diálise, foram determinadas contra as cepas ATCC de *M. abscessus* e *M. peregrinum*, e quatro cepas de isolados clínicos de *M. abscessus* (M1-M4) e os resultados estão na Tabela 13. Como CMC é um polímero inerte, a CIM do mesmo não foi determinada.

Tabela 13. CIM dos compostos isolados e de seus arranjos, antes (ad) ou após a diálise (dd), contra duas cepas referência (*M. abscessus* ATCC 19977 e *M. peregrinum* ATCC 700686) e quatro isolados clínicos de *M. abscessus* (M1, M2, M3 e M4). O asterisco refere-se à [DOD] (µg/mL).

Arranjos	CIM de CLA / CIM de PDDA (µg/mL)					
	ATCC 19977	ATCC 700686	M1	M2	M3	M4
CLA	0,250/ -	0,125/ -	0,031/ -	0,031/ -	>32,0/ -	>32,0/ -
DOD*	>27,0	>27,0	>27,0	>27,0	>27,0	>27,0
PDDA	- /50,0	- /13,0	- />50,0	- /6,0	- /13,0	- /50,0
DOD*/CMC	>27,0	>27,0	>27,0	>27,0	>27,0	>27,0
CLA/DOD/CMC$_{ad}$	0,250/ -	0,125/ -	0,063/ -	0,063/ -	>128/ -	>128/ -
CLA/DOD/CMC$_{dd}$	0,125/ -	0,125/ -	0,063/ -	0,125/ -	>16/ -	>16/ -
DOD/CMC/PDDA	- />50,0	- />50,0	- />50,0	- /6,0	- /13,0	- /50,0
CLA/DOD/CMC/PDDA$_{ad}$	0,125/ 0,1	0,063/ 0,5	0,063/ 0,5	0,063/ 0,5	>128/ >50	>128/ >50
CLA/DOD/CMC/PDDA$_{dd}$	0,250/ 6,3	0,250/ 6,3	0,125/ 3,1	0,250/ 6,3	>4/ >50	>4/ >50

As CIMs de CLA para CLA livre ou CLA nas NPs contra *M. abscessus*, *M. peregrinum* e cepas M1 e M2 são sempre muito menores do que aquelas obtidas para os compostos isolados DOD e PDDA, ou para as NPs sem CLA (DOD/CMC, DOD/CMC/PDDA). Já contra as cepas clínicas resistentes à CLA (M3 e M4), CLA foi inativo nas maiores concentrações testadas, mesmo quando combinada às NPs (Tabela 13). As CIMs de CLA determinadas para as CLA NPs foram próximas às CIMs de CLA livre (Tabela 13). PDDA livre mostrou atividade contra a cepa ATCC de *M. peregrinum* (CIM de 13,0 µg/mL) e contra duas amostras clínicas de *M. abscessus* (M2 e M3), inclusive uma cepa resistente à CLA (M3) (Tabela 13). Porém quando combinado nas CLA NPs, tal atividade é insignificante, prevalecendo a atividade das baixas concentrações de CLA.

Desta maneira, é possível observar que nas NPs, a CLA é a responsável pelo desempenho da atividade antimicrobiana, e que nem DOD ou mesmo PDDA foram capazes de aumentar a potência antimicrobiana das NPs. Mas é preciso ressaltar que a cepa ATCC de *M. abscessus* é bastante sensível à CLA (CIM de 0,250 µg/mL), com CIM de CLA muito menor do que aquela estabelecida para cepas de micobactérias de crescimento rápido (2,0 µg/mL) (CLSI, 2011).

3.6.2. Atividade contra *M. abscessus* intracelular infectando macrófagos

Macrófagos THP-1 foram infectados com *M. abscessus*, a uma MOI de 10:1, durante 1 hora. Após o tempo de infecção, as células foram lavadas para remoção das bactérias não fagocitadas, para só então interagir com a CLA, livre ou combinada às NPs por até 4 dias, e os resultados estão na Figura 17. As NPs controle, sem CLA (DOD/CMC e DOD/CMC/PDDA), também interagiram com macrófagos infectados, permitindo o crescimento bacteriano intracelular equivalente àquele apresentado por *M. abscessus* na ausência de antimicrobianos (apenas meio RPMI) (Figura 17).

Uma porcentagem de 36,4 % ($2,4x10^5$ UFC/mL) das células de *M. abscessus* que foram expostas aos macrófagos foram internalizadas, e consideradas como o total (100 %) de bactérias intracelulares viáveis (dia 0).

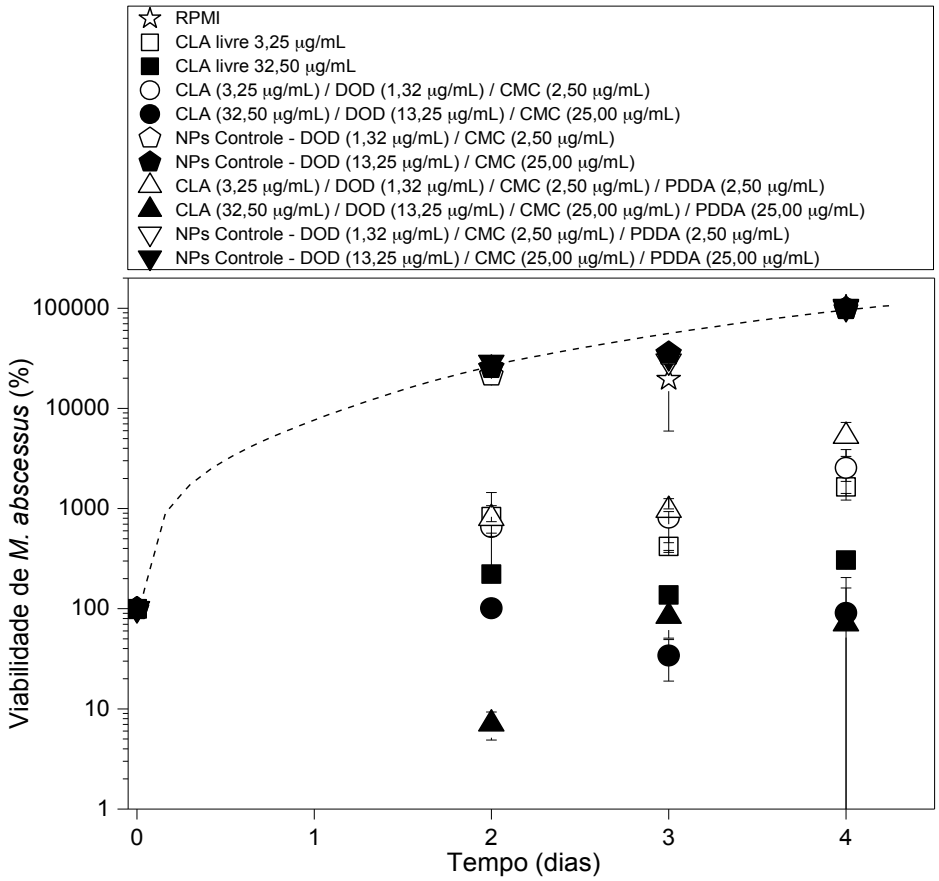


Figura 17. Viabilidade intracelular (%) de *M. abscessus*, a partir de $2{,}4 \times 10^5$ UFC/mL, em função do tempo após infecção dos macrófagos THP-1. Macrófagos infectados interagiram por até 4 dias com o meio de cultura RPMI (linha pontilhada), CLA livre, CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA NPs. NPs sem CLA apresentaram viabilidade bacteriana semelhante à obtida na presença de meio de cultura apenas (não mostrado). Experimentos realizados em duplicata.

As células de micobactérias, na ausência de qualquer antimicrobiano, são capazes de crescer e multiplicar no interior de macrófagos, aumentando em 3-logs o número de bactérias intracelulares viáveis, atingindo um total de cerca de 10^8 UFC/mL, após quatro dias de incubação (Figura 17). Tal crescimento bacteriano intracelular é substancialmente inibido por CLA livre ou CLA NPs: dentre as duas concentrações de CLA testadas (3,25 e 32,5 μg/mL), a maior dose apresentou a maior atividade inibitória contra *M. abscessus* intracelular, praticamente mantendo a mesma porcentagem inicial de células viáveis ao longo dos 4 dias de incubação, ao passo que a concentração de 3,25 μg/mL de CLA, livre ou combinada nas NPs, foi menos potente que a maior dose de CLA, mas ainda assim capaz de evitar a

multiplicação intracelular de *M. abscessus* em 2-logs (Figura 17). Portanto, a atividade inibitória do crescimento intracelular de *M. abscessus* é dependente da concentração de CLA, livre ou nas NPs.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 17, CLA livre é capaz de penetrar o interior de macrófagos e ali desempenhar sua atividade inibitória. Mas também é possível verificar que as CLA NPs são eficientes em liberar e entregar CLA para exercer sua atividade antimicrobiana no interior dos macrófagos.

Na Figura 18 estão os resultados da viabilidade intracelular de *M. abscessus* que interagiram com CLA livre em baixas concentrações (foram testadas as concentrações de CLA de 0,5 e 2,0 µg/mL, em virtude de serem, respectivamente, o dobro da CIM obtida neste trabalho para a cepa ATCC de *M. abscessus* bem como a CIM estabelecida pelo CLSI para micobactérias de crescimento rápido) ou com as CLA NPs após diálise. As CLA NPs dialisadas foram testadas nas mesmas concentrações de DOD, CMC e PDDA que as NPs antes da diálise (Figura 17). Assim, para as NPs dialisadas de CLA/DOD/CMC foram avaliadas as atividades nas concentrações finais de CLA de 4,0 e 0,4 µg/mL, enquanto para as NPs dialisadas de CLA/DOD/CMC/PDDA foram testadas as concentrações finais de CLA de 1,0 e 0,1 µg/mL (Figura 18). Deve-se destacar que a comparação direta entre os efeitos das NPs dialisadas com aqueles ocasionados pela CLA livre é um pouco dificultada em virtude das diferentes incorporações de CLA nas NPs, já que foram mantidas as mesmas concentrações de DOD, CMC e/ou PDDA em todos os arranjos testados, com ou sem CLA. Por aproximação, as NPs dialisadas de CLA/DOD/CMC (diluídas a 4,0 ou 0,4 µg/mL de CLA) podem ser comparadas com as concentrações de 3,25 ou 0,5 µg/mL de CLA livre. Já para as NPs catiônicas, após diálise, tal comparação por aproximação é mais difícil, pois ambas as concentrações de CLA testadas em combinação com CLA/DOD/CMC/PDDA (1,0 e 0,1 µg/mL) mais se aproximam da concentração de 0,5 µg/mL de CLA livre.

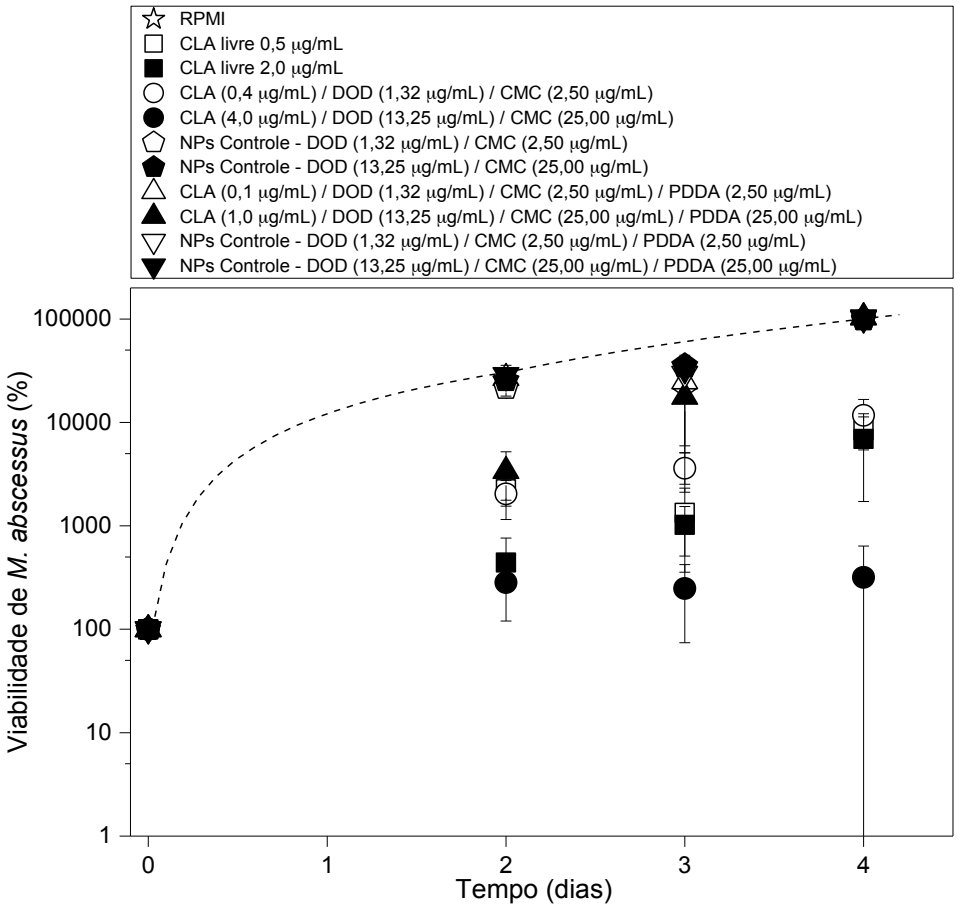


Figura 18. Viabilidade intracelular (%) de *M. abscessus*, a partir de $2{,}4 \times 10^5$ UFC/mL, em função do tempo após infecção dos macrófagos THP-1. Macrófagos infectados interagiram por até 4 dias com o meio de cultura RPMI (linha pontilhada), CLA livre, ou com as NPs de CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA após diálise. Experimentos realizados em duplicata.

Ao longo dos 4 dias de incubação, as NPs aniônicas carreando 4,0 μg/mL de CLA mostraram a maior atividade, enquanto as que carreavam 0,4 μg/mL de CLA bem como a CLA livre nas duas doses aqui demonstradas (0,5 e 2,0 μg/mL) apresentaram desempenho equivalente. As NPs catiônicas de CLA/DOD/CMC/PDDA não inibiram a multiplicação intracelular de *M. abscessus* nas duas concentrações testadas, permitindo a multiplicação intracelular em cerca de 3-logs, assim como o crescimento bacteriano na ausência de antimicrobianos (RPMI) ou ainda na presença das NPs controles (aniônicas ou catiônicas), destacado na figura pela linha pontilhada (Figura 18). Assim, com exceção das CLA NPs catiônicas dialisadas, é possível reafirmar que a atividade inibitória do crescimento intracelular

de *M. abscessus* é dependente da concentração de CLA, e que a atividade apresentada por 4,0 µg/mL de CLA nas CLA NPs aniônicas dialisadas (Figura 18) é semelhante àquela desempenhada pela CLA na maior concentração testada (32,5 µg/mL) (Figura 17). E de uma maneira geral, as NPs aniônicas apresentaram atividade igual ou superior à das NPs catiônicas.

3.7. Toxicidade de CLA e CLA NPs contra macrófagos

Os efeitos de CLA livre, das NPs controle sem CLA e também das CLA NPs, antes ou após a diálise, sobre a integridade de membranas de macrófagos THP-1 estão nas Figura 19 ou 20, respectivamente. Na ausência de qualquer composto antimicrobiano (apenas meio RPMI) ao longo de 4 dias de incubação há cerca de 75% dos macrófagos com a integridade de membrana preservada. Como indutor de danos aos macrófagos, foi adicionado 10% de DMSO ao meio RPMI para interagir com as células nas últimas 24h antes da avaliação por citometria de fluxo, deixando cerca de 35, 30 e 25% de macrófagos com integridade de membranas preservada após 2, 3 e 4 dias de interação, respectivamente (Figuras 19 e 20).

CLA apresenta toxicidade contra os macrófagos dose-dependente, e deveria ser utilizada em baixas concentrações (≤ 3,25 µg/mL) para permitir alta porcentagem de sobrevivência celular, já que alta concentração de CLA (32,5 µg/mL), livre ou combinada às NPs, induziu danos na grande maioria dos macrófagos, restando menos de 20% de células íntegras após 4 dias de exposição (Figura 19). Já a concentração de 3,25 µg/mL de CLA combinada às NPs aniônicas não dialisadas não foi tóxica aos macrófagos. Porém a mesma concentração de CLA combinada às NPs catiônicas acarretou cerca de 80% de perda da viabilidade de macrófagos após 4 dias de interação (Figura 19).

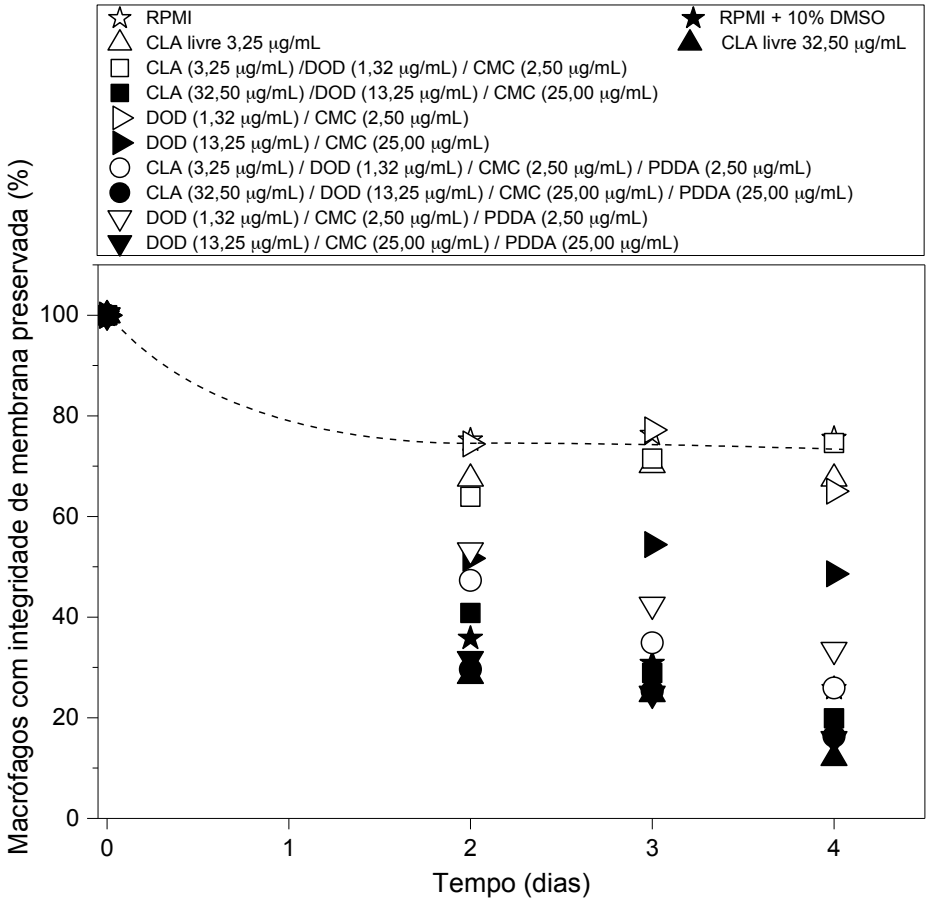


Figura 19. Viabilidade de macrófagos THP-1 (%) a partir de $1x10^5$ macrófagos/poço e análise por citometria de fluxo, na presença de RPMI (linha pontilhada), CLA livre, NPs controles (DOD/CMC e DOD/CMC/PDDA) e CLA NPs antes da diálise. Meio de cultura RPMI adicionado de 10% de DMSO interagiu com os macrófagos por 24h antes da análise.

Na verdade, as NPs catiônicas, dialisadas ou não, em todas as concentrações testadas foram altamente tóxicas aos macrófagos (Figuras 19 e 20), o que provavelmente ocorre devido à presença do PDDA, mesmo que em baixas concentrações (2,50 μg/mL PDDA). Isto porque as NPs catiônicas controle, sem CLA, (DOD/CMC/PDDA) também induziram toxicidade aos macrófagos semelhante àquelas induzidas pelas NPs catiônicas carreando CLA (CLA/DOD/CMC/PDDA) (Figuras 19 e 20).

As NPs aniônicas controle, sem CLA (DOD/CMC), na concentração de DOD de 13,25 μg/mL induziu danos às membranas de cerca de 50% dos macrófagos, enquanto na concentração de 1,32 μg/mL de DOD, cerca de 70% das células apresentam membranas preservadas (Figuras 19 e 20). Desta maneira, as NPs

dialisadas de CLA/DOD/CMC, mesmo com baixa concentração de CLA (4,0 μg/mL), apresentam toxicidade importante contra os macrófagos, provavelmente decorrente da presença de 13,25 μg/mL DOD, já que as concentrações de CLA livre de 2,0 μg/mL (Figura 20) e de 3,25 μg/mL (Figura 19) apresentam, em média, toxicidade contra os macrófagos semelhante àquela que ocorre em meio RPMI, apenas. Com a redução na concentração de DOD combinada nestas CLA NPs, sua toxicidade também é reduzida (Figura 20).

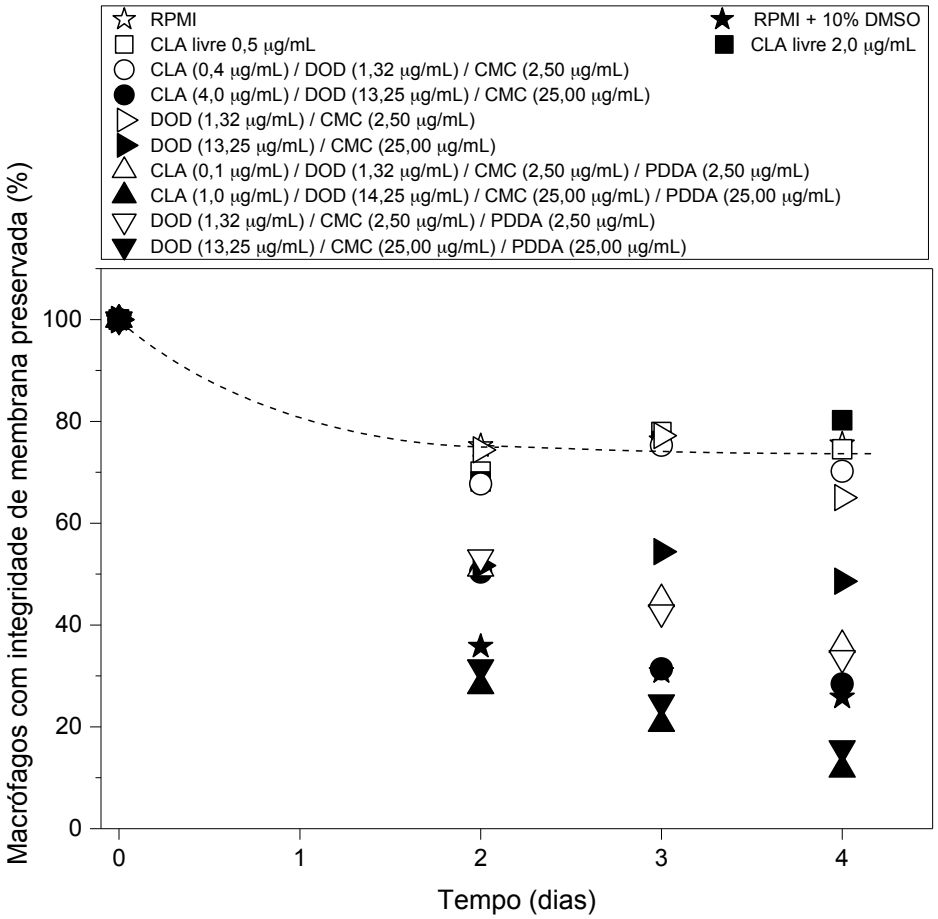


Figura 20. Viabilidade de macrófagos THP-1 (%) a partir de $1x10^5$ macrófagos/poço e análise por citometria de fluxo, na presença de RPMI (linha pontilhada), CLA livre, NPs controles (DOD/CMC e DOD/CMC/PDDA) e CLA NPs após da diálise. Meio de cultura RPMI adicionado de 10% de DMSO interagiu com os macrófagos por 24h antes da análise.

3.8. Formação de biofilme de *M. abscessus* na presença de CLA e CLA NPs

A Figura 21 mostra o efeito de CLA e CLA NPs, antes da diálise, na formação de biofilmes de *M. abscessus*.

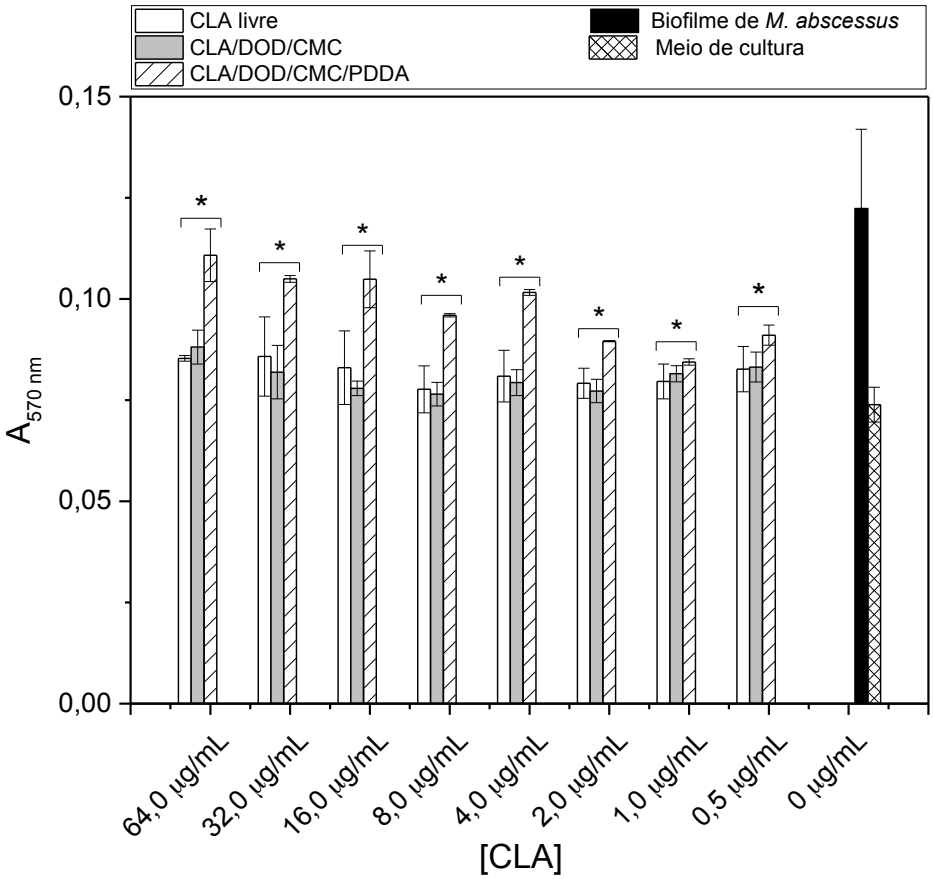


Figura 21. Formação de biofilme de *M. abscessus* (ATCC 19977) na presença de CLA livre, CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA NPs durante 72h. Absorbâncias representam valores médios ± desvio padrão médio de duplicata de leituras para dois experimentos. Asterisco significa P<0,05 comparado com controle (biofilme *M. abscessus*), determinado utilizando análise de variância seguida do teste de Tulkey.

Em todas as concentrações de CLA testadas, tanto CLA livre quanto CLA NPs inibiram significativamente a formação de biofilmes de *M. abscessus* em comparação com a formação de biofilme na ausência de antimicrobianos (P<0,05) (Figura 21). A inibição da formação de biofilmes de CLA livre e CLA nas NPs aniônicas foi semelhante em todas as concentrações testadas. As NPs catiônicas de CLA/DOD/CMC/PDDA, principalmente nas maiores concentrações de CLA (e

consequentemente de PDDA), foram menos eficientes na inibição da formação de biofilmes de *M. abscessus* (Figura 21).

A Figura 22 mostra o efeito de CLA e CLA nas NPs dialisadas na formação de biofilmes de *M. abscessus*.

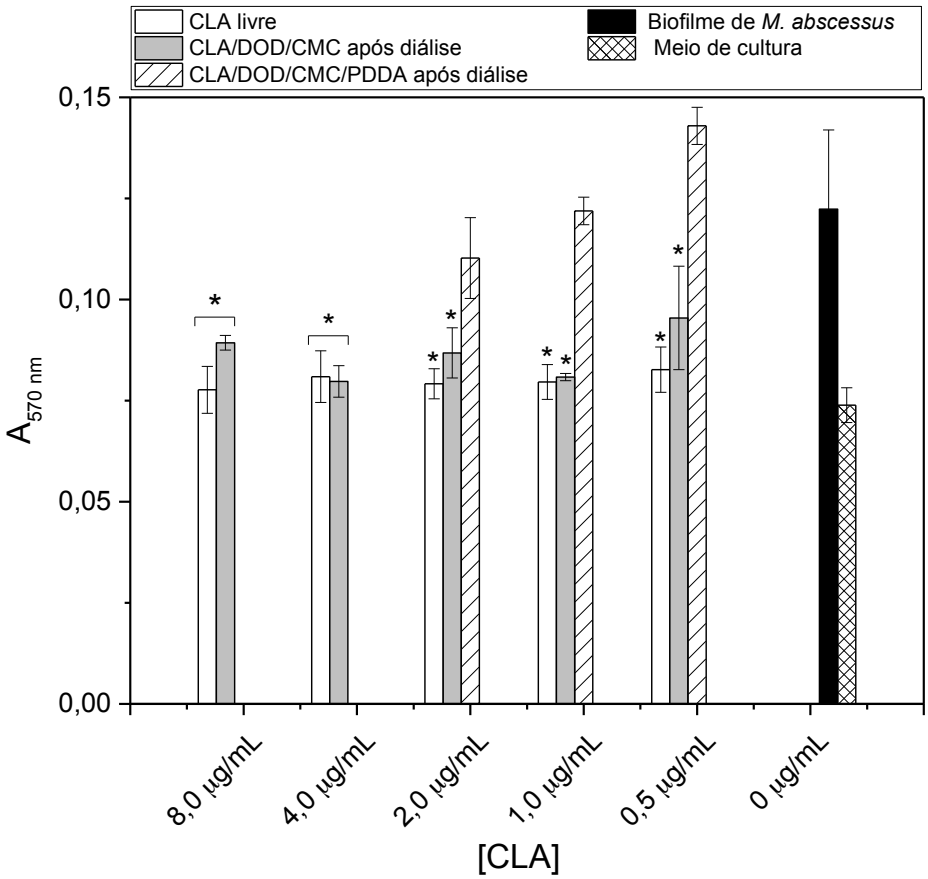


Figura 22. Formação de biofilme de *M. abscessus* (ATCC 19977) na presença de CLA livre, ou de CLA nas NPs dialisadas de CLA/DOD/CMC ou CLA/DOD/CMC/PDDA, durante 72h. Absorbâncias representam valores médios ± desvio padrão médio de duplicata de leituras para dois experimentos. Asterisco significa P<0,05 comparado com controle (biofilme *M. abscessus*), determinado utilizando análise de variância seguida do teste de Tulkey.

As baixas concentrações de CLA nas NPs aniônicas dialisadas inibiram significativamente a formação de biofilmes, assim como CLA livre. No entanto, as NPs catiônicas dialisadas não afetaram a formação de biofilmes de *M. abscessus* (Figura 22). Esse resultado reforça a importância dos arranjos aniônicos para entregar a CLA aos macrófagos já que apenas estes inibem significativamente a formação dos biofilmes e apresentam baixa toxicidade contra os macrófagos.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação das NPs de DOD BF/CMC/PDDA contra micro-organismos MR

A atividade antimicrobiana de um composto determinada pela porcentagem de células viáveis não permite a distinção entre um agente antimicrobiano potente, que causa uma redução de 8-logs, por exemplo, com um agente antimicrobiano moderado, que causa uma redução de 3-logs. Isto porque uma redução de 3-logs na viabilidade celular representa uma redução de 99,9% das células viáveis. Compostos que causam redução de 3-logs na viabilidade celular podem ser considerados como microbicidas eficazes para uso como desinfetantes (Lilly *et al.*, 1979; Veldhuizen *et al.*, 2013). Entretanto, o fato do PDDA livre ou hibridizado nas NPs causar uma redução de 8-logs na viabilidade celular bacteriana é notável (Figuras 9A-C), podendo ser considerado como potente antimicrobiano. Já as dispersões de DOD BF podem ser consideradas com moderada atividade antimicrobiana, visto que causa uma redução de aproximadamente 2- ou 1-log, respectivamente, contra *K. pneumoniae* KPC+ (Figura 9B) ou MRSA (Figura 9C), o que corresponde a uma redução de 98% ou 92% na viabilidade celular destes micro-organismos. No entanto, a suspensão de DOD BF foi tão efetiva contra células de *P. aeruginosa* MR quanto PDDA livre ou hibridizado nas NPs (Figura 9A). Esta diferença no potencial antimicrobiano de DOD BF contra as duas bactérias Gram-negativas testadas, *P. aeruginosa* MR e *K. pneumoniae* KPC+, provavelmente ocorreu em virtude da característica de produção de material capsular apresentada pela cepa de *K. pneumoniae* KPC+ utilizada neste trabalho, o que difere da cepa de *P. aeruginosa* MR testada. Já a baixa eficiência antimicrobiana de DOD BF contra a bactéria Gram-positiva MRSA pode ser explicada pelo sistema sensor apresentado por espécies de *Staphylococcus*, que ao detectar a presença de compostos antimicrobianos com carga positiva, desencadeia a D-alanilação dos ácidos teicóicos e a lisilação do fosfatidilglicerol, reduzindo a carga negativa da superfície celular, e consequentemente dificultando a atração e adsorção de compostos antimicrobianos catiônicos (Otto, 2009). Além disso, partículas positivamente carregadas (Merchat *et*

al., 1996) ou agentes que aumentam a permeabilidade da membrana externa são agentes reconhecidamente mais eficazes contra bactérias Gram-negativas (Nitzan *et al.*, 1992).

O fato do PDDA, quando hibridizado nas NPs, ser microbicida em concentrações discretamente maiores do que quando está livre em solução pode ser explicado em virtude da neutralização parcial das cargas positivas do PDDA como camada mais externa das NPs, que precisa ligar-se às cargas negativas da camada de CMC. Desta forma, nem todas as cargas positivas do PDDA estão disponíveis para interagir com as células. As NPs foram mais efetivas contra as bactérias MR Gram-negativas e as leveduras, enquanto que a cepa de MRSA foi a que apresentou a maior CMM de PDDA nas NPs (Tabela 5).

A inatividade de DOD BF bem como a potente atividade do PDDA, tanto livre quanto hibridizado nas NPs, contra células de *C. albicans* resistente ao fluconazol (Figura 10) estão de acordo com resultados de trabalho anterior contra cepa ATCC de *C. albicans* (Melo e Carmona-Ribeiro, 2012). Todavia, quando aumenta a concentração celular de *C. albicans* fluconazol R que interage com o PDDA livre ou presente na camada mais externa das NPs, ocorre uma esperada redução do potencial antifúngico de PDDA (Figura 11A), já que a CMM deve aumentar conforme aumenta a concentração celular. Além disso, pode ainda ter ocorrido agregação celular induzida pelo PDDA, protegendo as células mais internas do agregado do efeito antimicrobiano. De fato, o PDDA é comumente utilizado como um floculante de bactérias no tratamento de água (Zhao e Zhang, 2013). Além disso, a floculação de bactérias em altas concentrações celulares (a partir de 10^8 UFC/mL para bactérias) induzida por arranjos catiônicos já foi anteriormente descrita (Sicchierolli *et al.*, 1995).

O máximo de morte microbiana e o início do extravasamento de compostos fosforilados ocorrem por volta da mesma concentração de PDDA, tanto para as bactérias (Figura 9) quanto para as leveduras (Figuras 10 e 11), em ambas as concentrações celulares, o que nos leva a concluir que a morte celular está diretamente ligada com a ruptura da membrana e o extravasamento de compostos intracelulares. De fato, a lise celular tem sido associada com a morte microbiana causada por CAQs (Salton, 1968; Denyer, 1995), NPs funcionalizadas com quitosana

(Jeon *et al.*, 2014), dendrímeros de poli(amidoamina) (Calabretta *et al.*, 2007; Devarakonda *et al.*, 2007), polímeros sensíveis à luz, como os polieletrólitos catiônicos conjugados à base de poli(fenileno-etinileno) (Wang *et al.*, 2011), hidrogéis de peptídeos com alto conteúdo de arginina auto-associados (Veiga *et al.*, 2012) e outros peptídeos antimicrobianos (Stromstedt *et al.*, 2010; Pasupuleti *et al.*, 2012).

Apesar da morfologia celular bacteriana, após interação com NPs ou PDDA, não ser avaliada em concentrações celulares próximas àquelas em que foram determinadas as CMMs, foi possível concluir que a estrutura das NPs é desmontada conforme tais arranjos supramoleculares são expostos a crescentes concentrações celulares microbianas (Figura 12). Além disso, as imagens obtidas por MEV também permitiram a visualização de feixes formados entre os polímeros componentes das NPs (CMC e PDDA) e os biopolímeros presentes na parede e membrana microbiana, os quais parecem estar saindo da estrutura celular microbiana (Figura 12), resultado que está de acordo com o extravasamento de compostos fosforilados, que sugere a penetração do PDDA, livre ou a partir das NPs, na parede e membrana celular. Desta forma, o mecanismo de ação das NPs de DOD BF/CMC/PDDA parece ocorrer através da liberação das camadas poliméricas da estrutura das NPs após entrar em contato com os micro-organismos, com a consequente associação entre estas camadas e os biopolímeros microbianos, ocorrendo a inserção da estrutura linear do PDDA na parede celular e membrana do micro-organismo e a subsequente ruptura destas estruturas.

Outros autores também já evidenciaram a penetração de cadeias poliméricas catiônicas na membrana microbiana (Tiller *et al.*, 2001; Milovic *et al.*, 2005). Para hidrogéis antimicrobianos, por exemplo, a uma alta relação de polímero/células, os polímeros catiônicos causam um efeito esponja, succionando pedaços da parede celular microbiana, negativamente carregada, para dentro da camada de hidrogel (Li *et al.*, 2011). Além do mais, compostos que matam micro-organismos por contato, rompendo ou perturbando a estrutura celular microbiana, parecem não atingir a atividade metabólica do micro-organismo, a qual está frequentemente associada com o desenvolvimento de resistência (Ling *et al.*, 2015). No caso de peptídeos catiônicos antimicrobianos, alguns mecanismos de resistência já foram reportados, como a

regulação positiva da atividade proteolítica, a liberação de polissacarídeos polianiônicos extracelulares para a remoção eletrostaticamente direcionada dos peptídeos catiônicos, e a redução da carga negativa da superfície (Nizet, 2006). Embora tais mecanismos de resistência ainda não tenham sido demonstrados, em tais níveis de sofisticação, para NPs catiônicas e auto-associadas, não há garantia de que tais mecanismos não sejam também articulados, futuramente, pelas células microbianas frente a antimicrobianos catiônicos em geral.

O fato das NPs liberarem seus componentes e desaparecerem para exercer seu efeito antimicrobiano reforça a idéia de que DOD BF seja importante apenas na estruturação das NPs, servindo como um suporte para as camadas poliméricas subsequentes, e o PDDA sendo a camada mais externa é o composto biocida do arranjo, em concordância com os resultados obtidos na determinação da viabilidade celular (Figuras 9, 10 e 11). Além disso, mesmo após o processo de desidratação e secagem das amostras para realização do MEV, as NPs mantiveram um formato discoidal, o que mostra que as camadas consecutivas de CMC e PDDA estabilizam DOD BF, que é discoidal (Figura 12). As NPs de DOD BF/CMC/PDDA são mais interessantes para serem utilizadas como antimicrobianos *in vivo* do que o PDDA livre em solução. Isto porque as NPs, ao serem injetadas na circulação, são rapidamente opsonizadas e envolvidas por proteínas do soro, permanecendo estáveis na circulação até os macrófagos as fagocitarem. Sendo fagocitadas, as NPs se co-localizam com os micro-organismos patogênicos, assim podendo exercer sua função biocida dentro dos próprios macrófagos (Gregoriadis, 1995; Gulyaev *et al.*, 1999; Bakker-Woudenberg *et al.*, 2005). No entanto, a atividade *in vivo* das NPs de DOD BF/CMC/PDDA ainda precisa ser estudada. Um estudo anterior demonstrou a interação de bicamadas catiônicas com proteínas séricas, revelando a estabilização coloidal que sistemas catiônicos semelhantes ao das NPs atingiram *in vivo* (Carvalho e Carmona-Ribeiro, 1998). Desta forma, não é esperada, *in vivo*, a inativação do sistema microbicida apresentado neste trabalho.

Além disso, os danos causados às membranas de macrófagos THP-1 por baixas concentrações de PDDA (Figuras 19 e 20) reforçam a necessidade de realizar estudos *in vivo* com tais NPs contendo PDDA. Por outro lado, estas NPs antimicrobianas já poderiam ser utilizadas, *ex vivo*, por exemplo no desenvolvimento

de materiais e superfícies biocidas para uso nas áreas médico-hospitalar, biotecnológica ou alimentícia, sem que ocorram maiores danos decorrentes de sua potencial toxicidade. Sabe-se, por exemplo, que NPs à base de poli(metacrilato de metila), que incorporaram PDDA em sua estrutura no momento da polimerização, não são capazes de liberar o PDDA da partícula, mas mesmo assim exercem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade contra hemácias (Sanches *et al.*, 2015). NPs antimicrobianas que não liberam o princípio ativo do arranjo, bem como polímeros antimicrobianos podem ser utilizados para desenvolver superfícies e/ou revestimentos que exerçam ação biocida pelo contato com micro-organismos sem, no entanto, liberar o agente responsável pela atividade antimicrobiana, podendo ser utilizados em ambientes hospitalares e na indústria de tintas, por exemplo (Tiller *et al.*, 2001; Timofeeva e Kleshcheva, 2011; Carmona-Ribeiro e de Melo Carrasco, 2013).

Particularmente, a atividade das NPs de DOD BF/CMC/PDDA contra bactérias Gram-negativas MR é interessante, visto que as possibilidades de tratamento de infecções causadas por tais micro-organismos são cada vez mais restritas (Curcio, 2014). Além disso, novos compostos antimicrobianos, como a teixobactina, mostram um bom desempenho biocida contra bactérias Gram-positivas, mas não são tão efetivos contra as Gram-negativas (Ling *et al.*, 2015). Por isso, merece devido destaque a excelente atividade antimicrobiana contra patógenos MR, apresentada pelas NPs de DOD BF/CMC/PDDA contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras.

4.2. Atividade antimicrobiana das NPs de CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA contra *M. abscessus*

CLA é um macrolídeo com baixa solubilidade em água, propenso a combinar-se com lípides em decorrência de sua natureza hidrofóbica (Salem e Duzgunes, 2003; Alhajlan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Possui um grupamento amino terciário em sua estrutura (pK 8,99) (McFarland *et al.*, 1997) que concede caráter catiônico à molécula em pH próximo ao fisiológico, o que favorece sua combinação com polímeros aniônicos como PLGA (Mohammadi *et al.*, 2011) e CMC (este trabalho). A injeção de solução etanólica contendo CLA/DOD em água

não produziu arranjos coloidalmente estáveis (Tabela 7), possivelmente porque a interação hidrofóbica entre o lípide catiônico e CLA não é suficiente para superar a repulsão eletrostática entre CLA e DOD, ambos positivamente carregados. Para obter estabilidade coloidal, a injeção da solução etanólica contendo CLA/DOD em solução aquosa de CMC forneceu um microambiente lipofílico e aniônico para a CLA (Tabela 8), estabilizando as NPs de CLA/DOD/CMC obtidas. De fato, quando um método semelhante foi utilizado para a indometacina, um composto aniônico e hidrofóbico, pela injeção de solução etanólica de DOD/indometacina em água, observou-se a formação de dispersões estáveis, possivelmente devido ao efeito aditivo da atração eletrostática e da interação hidrofóbica (Lima *et al.*, 2016). De uma maneira consistente, a incorporação de CLA nas NPs catiônicas de CLA/DOD/CMC/PDDA é muito menor (3,1 %) do que nas NPs aniônicas de CLA/DOD/CMC (12,5 %) provavelmente devido à repulsão eletrostática entre o antimicrobiano catiônico e as NPs catiônicas (Tabela 11), embora ambas as CLA NPs apresentem boa estabilidade coloidal em solução aquosa (Tabela 9, Figura 13). A melhor incorporação de CLA em arranjos negativamente carregados do que naqueles positivamente carregados já havia sido anteriormente relatada ao comparar a incorporação de CLA em lipossomos de diferentes cargas (Alhajlan *et al.*, 2013) (Tabela 3). Além do mais, a atração eletrostática entre arranjos catiônicos e ciprofloxacina, que é um antimicrobiano negativamente carregado, também parece ser importante para sua maior incorporação (Hosny, 2010).

O etanol inicialmente presente nas dispersões de CLA/DOD/polímeros (2,5%) poderia causar alterações na bicamada lipídica do DOD, tais como interdigitações. Sendo um álcool de pequena cadeia, o etanol pode modular propriedades das membranas lipídicas, podendo torná-las mais fluidas e permeáveis, reduzindo a organização das cadeias lipídicas (Patra *et al.*, 2006). As moléculas de etanol, após entrarem em contato com a bicamada, ligam-se às cabeças polares dos lípides, aumentando a área de superfície destes grupamentos polares, gerando uma desordem nas cadeias lipídicas e, consequentemente, aumentando a fluidez da membrana (Vierl *et al.*, 1994; Feller *et al.*, 2002). Além disso, a porção hidrofóbica das moléculas de etanol podem ligar-se à cauda hidrofóbica do lípide, favorecendo a indução da formação de estruturas não-bicamada e/ou interdigitação (Simon e

Mcintosh, 1984; Gurtovenko e Anwar, 2009). Mas geralmente, tais efeitos nas bicamadas lipídicas são causados pela presença de concentrações maiores de etanol na dispersão (~30,5% v/v) (Gurtovenko e Anwar, 2009). De qualquer forma, o processo de diálise, ao qual as dispersões foram submetidas para remoção da CLA não incorporada, remove também todo o etanol que inicialmente estava presente nas dispersões, não mais exercendo qualquer influência sobre a estrutura das bicamadas de DOD.

Portanto, foram obtidos dois sistemas nanoestruturados, pelo método da injeção etanólica: arranjos aniônicos de CLA/DOD/CMC e arranjos catiônicos de CLA/DOD/CMC/PDDA (Tabela 9), estáveis mesmo após a diálise (Figura 14) que foram comparados quanto à incorporação de CLA, quanto à atividade antimicrobiana contra *M. abscessus* e quanto à toxicidade frente a macrófagos THP-1 não infectados.

Arranjos antimicrobianos, carreadores de CLA, em combinação com polímeros, preparados pelo método da injeção de solução orgânica em solvente aquoso, já foram descritos na literatura (Mohammadi *et al.*, 2011; Moghaddam *et al.*, 2013; Pan-In *et al.*, 2014). CLA co-solubilizada com o polímero biocompatível PLGA em acetona foi nanoprecipitada em solução aquosa contendo o álcool polivinílico (PVA) como agente estabilizante da dispersão, em três diferentes proporções molares fármaco:polímero (1:1, 1:2 e 1:3). As NPs resultantes apresentaram valores de Dz de 280, 223 e 189 nm, potencial zeta de -6, -10 e -14 mV e eficiência de encapsulamento de CLA, determinada por HPLC, de 57, 73 e 80%, respectivamente, para as dispersões de CLA:PLGA 1:1, 1:2 e 1:3. Tais NPs apresentaram liberação inicial elevada da CLA, seguida de um platô durante um período de 24 horas, e atividade antimicrobiana contra *S. aureus* mais eficiente do que CLA livre (Mohammadi *et al.*, 2011). NPs de etilcelulose carreando CLA, de 449 nm e 86% de eficiência de encapsulamento, mostraram excelente atividade *in vitro* e *in vivo* contra *Helycobacter pylori* (Pan-In *et al.*, 2014). Tais NPs foram preparadas por um método inverso ao da injeção etanólica apresentada neste trabalho. De acordo com Pan-In *et al.*, água foi injetada em uma solução orgânica de acetona, na qual foram previamente solubilizadas CLA e etilcelulose, formando as NPs por indução anti-solvente (Pan-In *et al.*, 2014).

A visualização da morfologia dos arranjos preparados pela injeção de solução etanólica de CLA/DOD em solução aquosa de CMC, com ou sem adição de PDDA, como estruturas nanoparticuladas (Figura 15), foi essencial para complementar a caracterização deste novo sistema desenvolvido para carrear fármacos hidrofóbicos em combinação com lípides e polímeros. A reticulação da camada mais externa das NPs utilizando tetróxido de ósmio como agente fixador impediu a desassociação do arranjo que, de outra maneira poderia acontecer após a secagem das amostras para serem analisadas por MEV (Figura 15), já que os catiônicos CLA e DOD possivelmente repeleriam-se do arranjo ao secar a dispersão. Manter a estrutura das NPs com auxílio de agente de fixação para realizar as microscopias eletrônicas é importante, visto que o MEV realizado para sistema semelhante de dispersão, porém sem ser submetido ao processo de reticulação com tetróxido de ósmio, não permitiu a visualização de NPs auto-associadas em decorrência de sua desassociação no momento da secagem (Lima *et al.*, 2016). Além disso, quando NPs de DOD BF/CMC/PDDA foram desidratadas sequencialmente com etanol, tal fixação não foi necessária para visualização dos arranjos por MEV (Figura 12A).

A detecção de CLA por HPLC-MS foi apenas qualitativa, em função do elevado erro a ser considerado em cada amostra se quantificado por esta técnica (≥ 10 μg/mL). Mas ainda assim tanto a detecção qualitativa de CLA por HPC-MS (Figura 16, Tabela 10) quanto a análise quantitativa da atividade contra *S. aureus* evidenciaram a incorporação de CLA nas NPs (Tabela 11). A concentração de CLA determinada para as NPs antes da diálise a partir do MIC de CLA foi de 128 μg/mL, concordando com 130 μg/mL de CLA utilizados na preparação das NPs (item 2.4). Já nas NPs dialisadas, CLA/DOD/CMC incorporou maior porcentagem de CLA (12,5 % - 16,0 μg/mL) do que as NPs de CLA/DOD/CMC/PDDA (3,1 % - 4,0 μg/mL) (Tabela 11). De fato, a maior incorporação de CLA em arranjos aniônicos do que em catiônicos já havia sido anteriormente reportada (Alhajlan *et al.*, 2013), e é perceptível ao compararmos arranjos carreadores de CLA de diferentes cargas (Tabela 3). No caso das CLA NPs descritas neste trabalho, a menor incorporação de CLA nas NPs catiônicas sugere que a combinação do polímero catiônico PDDA nas NPs possa exercer algum tipo de competição, repelindo eletrostaticamente a CLA do

arranjo. Ambas as NPs de DOD/CMC/PDDA e CLA/DOD/CMC/PDDA (após diálise) inibiram o crescimento de *S. aureus* em uma concentração de 12,5 µg/mL (Tabela 12) de PDDA, mostrando que o PDDA pode contribuir com a atividade antimicrobiana mais do que a CLA nas NPs catiônicas dialisadas, quando há baixa concentração de CLA (4,0 µg/mL), podendo esta ser ainda menor (Tabela 11). Entretanto, a toxicidade apresentada pelas NPs catiônicas contra os macrófagos, mesmo dialisadas, possivelmente exclui sua utilização como carreadores para CLA *in vivo* (Figuras 19 e 20).

As CIMs de CLA para as CLA NPs aniônicas ou catiônicas foram próximas às CIMs de CLA livre contra *M. abscessus* (Tabela 13). Portanto, a concentração de CLA nas NPs é a determinante da potência antimicrobiana de tais arranjos contra *M. abscessus*, pois nem DOD ou PDDA nas NPs foram eficientes em concentrações tão baixas quanto a CLA em inibir o crescimento de *M. abscessus*. Cepas resistentes à CLA permaneceram resistentes às CLA NPs (Tabela 13), já que devem possuir o gene de resistência indutível aos macrolídeos – *erm* – funcional e não afetado pelas NPs (Koh *et al.*, 2011). De fato, as quatro cepas de amostras clinicas (M1-M4) foram identificadas como *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Sabe-se que a maioria das cepas pertencentes a esta subespécie de *M. abscessus* possui o gene *erm* funcional, conferindo resistência intrínseca aos macrolídeos. Assim, mediante os resultados fenotípicos obtidos pela CIM de CLA (Tabela 13) é possível dizer que as amostras clínicas M3 e M4 possuem o gene *erm* funcional. Já as cepas M1 e M2, sensíveis *in vitro* à CLA, podem não ter expressado ainda sua resistência por não ter entrado em contato prévio com macrolídeos, ou ainda podem fazer parte da exceção, em que cerca de 15 % dos isolados de *M. abscessus* subsp. *abscessus* apresentam mutação no gene *erm* tornando-o não funcional (Brown-Elliott *et al.*, 2015; Griffith *et al.*, 2015)

Deve-se destacar que o PDDA, livre ou nas NPs sem CLA (DOD/CMC/PDDA) mostrou atividade contra uma cepa resistente à CLA (M3) na concentração de 13,0 µg/mL (Tabela 13). Tal resultado pode ser possivelmente decorrente do efeito de atração eletrostática entre o PDDA, em força iônica baixa, e os componentes aniônicos das paredes e membranas das bactérias (Carrasco *et al.*, 2015). No entanto, tal mecanismo não foi eficiente contra todas as cepas de *M abscessus* testadas, resistentes ou não à CLA (Tabela 13). De fato, a fraca atividade

ou até inatividade do PDDA frente a micobactérias foi recentemente relatada (Timofeeva *et al.*, 2015), em concordância com os resultados obtidos neste trabalho (Tabela 13). Além disso, CAQs, como o PDDA, foram considerados como desinfetantes com atividade apenas bacteriostática contra micobactérias (McDonnell e Russell, 1999). A atividade bactericida de CAQs contra cepa de *M. smegmatis* já foi descrita, porém contra cepas de *M. abscessus*, os CAQs testados não foram tão eficientes, restando de 5 a 10% de células viáveis, suficientes para multiplicarem-se e restabelecer novamente a infecção/contaminação, por isso os CAQs, tal como o PDDA, não podem ser considerados como desinfetantes capazes de prevenir infecções por estes patógenos (Cortesia *et al.*, 2010).

A interação da superfície aniônica da membrana de bactérias com compostos catiônicos antimicrobianos inicia-se por atração eletrostática. Então, como no caso de peptídeos catiônicos, por exemplo, eles acumulam-se na superfície da membrana de bactérias, onde conseguem se ligar, produzindo alterações como adelgaçamento da membrana, formação de poros, alteração de carga na superfície, etc, podendo adentrar à célula e interagir com alvos intracelulares (Fjell *et al.*, 2012). Na interação com micobactérias, estes peptídeos aumentariam a permeabilidade da membrana celular pela criação de poros ou interrompendo a síntese da parede celular (Mendez-Samperio, 2008). No entanto, já foram demonstrados mecanismos de resistência bacteriana a compostos catiônicos (Nuri *et al.*, 2015), como a modificação da superfície bacteriana, tornando-a menos negativamente carregada, o que consequentemente atrairia menos os antimicrobianos positivamente carregados, além de tornar a célula menos permeável a estes compostos (Peschel, 2002; Nizet, 2006); enzimas que degradam (Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004) ou bombas de efluxo (Warner *et al.*, 2008) que expulsam peptídeos catiônicos, por exemplo; ou ainda a produção de moléculas ou vesículas que aprisionam estes compostos catiônicos, prevenindo que estes alcancem a bactéria (Manning e Kuehn, 2011).

As CLA NPs possuem importante atividade bacteriostática intracelular ao longo de 4 dias (Figuras 17 e 18). CLA livre é capaz de penetrar nos macrófagos, agindo em bactérias intracelulares, porém seu efluxo é rápido, dificultando uma atividade intracelular sustentada (Carlier *et al.*, 1987; Tulkens, 1991). CLA combinada em NPs poderiam favorecer a retenção de CLA no interior dos

macrófagos e o tratamento sustentado de infecções intracelulares. E por isso a utilização de antimicrobianos como a CLA em sistemas de entrega, como é o caso dos arranjos supramoleculares descritos neste trabalho, seria uma estratégia bastante interessante na prática clínica, particularmente contra processos infecciosos intracelulares. Porém, serão necessários posteriores testes *in vivo* para avaliar a atividade intracelular das CLA NPs.

Apesar da inibição do crescimento intracelular de *M. abscessus* (3-logs) por CLA livre ou nas NPs a 32,5 μg/mL (Figura 17), tal concentração de CLA é tóxica aos macrófagos (Figura 19), e consequentemente inadequada para utilizações *in vivo*. Em concentrações menores de CLA (≤ 3,25 μg/mL), há a inibição de aproximadamente 2-logs no crescimento intracelular de *M. abscessus* (Figuras 17 e 18), mas importante redução na toxicidade aos macrófagos (Figuras 19 e 20). Porém, as NPs catiônicas ainda são muito tóxicas aos macrófagos, mesmo em baixas concentrações de CLA, possivelmente em decorrência da presença do PDDA (a 25,0 ou 2,5 μg/mL) (Figuras 19 e 20). Curiosamente, altas concentrações de PDDA ou DOD (1000 ou 631 μg/mL, respectivamente) livres ou auto-associadas em NPs não causam hemólise após 1h de interação arranjos-hemácias (Carmona-Ribeiro e Carrasco, 2013) mas apresentam toxicidade contra os macrófagos (Figuras 19 e 20). Além disso, a toxicidade de DOD contra fibroblatos de ratos, normais ou transformados, após 30 minutos de interação, induziram 20% ou 0% de morte celular (10^4 células/mL, a 63,1 μg/mL de DOD), e a 631 μg/mL de DOD houve morte de 50% dos fibroblatos (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1997). Entretanto, este trabalho mostra que DOD a 13,25 μg/mL e PDDA a 2,5 μg/mL, interagindo continuamente com macrófagos por até 4 dias, causam danos substanciais às membranas da maioria das células (Figuras 19 e 20).

Uma alternativa para a composição de NPs catiônicas carreadoras de CLA seria a substituição do PDDA por polímeros com atividade mais seletiva e biocompatível, necessariamente apresentando baixa toxicidade a células, como os macrófagos, por exemplo, podendo ou não apresentar atividade antimicrobiana adicional à CLA. Polímeros derivados do PDDA, com grupamentos de amônio secundário ou terciário, já demonstraram importantes efeitos antimicrobianos, inclusive contra micobactérias, sem no entanto causar alta toxicidade (Timofeeva e

Kleshcheva, 2011; Timofeeva *et al.*, 2015), e poderiam ser utilizados como alternativa ao PDDA na preparação de arranjos catiônicos carreadores de CLA.

As CLA NPs, principalmente as aniônicas, também mostraram ser capazes de inibir significativamente o crescimento de *M. abscessus* na forma de biofilmes, nas concentrações de CLA testadas (Figuras 21 e 22), enquanto as CLA NPs catiônicas impediram tal crescimento de *M. abscessus* somente nos arranjos não dialisados (Figura 21). As NPs dialisadas de CLA/DOD/CMC/PDDA não inibiram a formação do biofilme de *M. abscessus* (Figura 22). Os biofilmes são estratégias utilizadas por estes patógenos, e por micobactérias em geral, para causar infecções persistentes e invasivas (Howard *et al.*, 2006; Greendyke e Byrd, 2008), e evitar a sua formação parece ser uma exigência para o sucesso do tratamento de infecções causadas por *M. abscessus in vivo*. Como a completa erradicação de infecções intracelulares é raramente alcançada com tratamentos baseados apenas em medicamentos antimicrobianos (Abed e Couvreur, 2014), os resultados descritos neste trabalho podem, ao menos, contribuir com novas NPs antimicrobianas capazes de reduzir a contagem bacteriana intracelular e o crescimento/formação de biofilmes. Por isso, é possível escolher as NPs aniônicas de CLA/DOD/CMC, não dialisadas, mas diluídas a uma concentração de CLA de 3,25 µg/mL, como o principal arranjo descrito neste trabalho por apresentar boa atividade inibitória contra o crescimento de *M. abscessus*, quer seja *in vitro*, infectando macrófagos ou formando biofilmes, e com baixa toxicidade contra as células testadas (macrófagos THP-1).

O uso de DOD como carreador de fármacos hidrofóbicos é descrito na literatura há alguns anos, apresentando melhor solubilização nos fragmentos de bicamada de DOD (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001; Pacheco e Carmona-Ribeiro, 2003; Vieira *et al.*, 2006), do que em dispersões lipossomais do lípide (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001; Pacheco e Carmona-Ribeiro, 2003; Barbassa *et al.*, 2011). A solubilização da anfotericina B, um antifúngico muito pouco solúvel em água, ocorre nas bordas hidrofóbicas do BF, que interagem com a porção poliênica do antimicrobiano, deixando a porção hidroxilada da anfotericina B livre para interagir com o ambiente aquoso externo (Vieira e Carmona-Ribeiro, 2001). Desta forma, DOD BF disponibilizam uma grande área de superfície que pode ser utilizada como sítio de solubilização de fármacos hidrofóbicos. O arranjo de DOD BF/anfotericina B

foi tão efetivo *in vivo* quanto a anfotericina livre no tratamento de candidíase sistêmica (Lincopan *et al.*, 2003). A solubilização de outro antifúngico hidrofóbico, o miconazol, em DOD BF, produziu dispersões com alta estabilidade coloidal, sendo que em altas concentrações de fármaco e baixas concentrações de BF, ficou demonstrado o revestimento das partículas de miconazol com os fragmentos de bicamada de carga oposta. Já em altas concentrações de BF, a solubilização do fármaco ocorre em sua forma monomérica nas bordas do BF (Pacheco e Carmona-Ribeiro, 2003), sendo que a concentração fungicida mínima contra *C. albicans* foi 4 vezes menor para o arranjo de DOD BF/miconazol em comparação com o fármaco livre (Vieira *et al.*, 2006). Um outro exemplo de uso de DOD BF como veículo para antimicrobiano hidrofóbico (rifampicina) mostrou, inclusive, efeito sinérgico de DOD e fármaco contra *Mycobacterium smegmatis* (Barbassa *et al.*, 2011). Ao contrário dos antifúngicos descritos acima, a rifampicina apresentou alta porcentagem de incorporação tanto em DOD BF (75%) quanto em DOD LV (81%), o que pode ser justificado pela presença de efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos solubilizando a rifampicina na bicamada do lipossomo (Barbassa *et al.*, 2011).

No caso dos arranjos preparados por injeção de solução etanólica, descritos neste trabalho, para serem carreadores do antimicrobiano hidrofóbico CLA, a presença de DOD contribuiu apenas com efeito estrutural às CLA NPs, permitindo que estas pudessem se auto-associar com o polímero de carga oposta CMC, estabilizando a dispersão. Portanto, nesta combinação o lípide catiônico não exerceu qualquer efeito antimicrobiano contra as cepas de *M. abscessus* testadas, e para não induzir toxicidade aos macrófagos, DOD deve estar presente nas NPs em baixas concentrações (~1 μg/mL) (Figuras 19 e 20).

Até o nosso conhecimento, nenhum arranjo carreando CLA, descrito na literatura, seja na forma de lipossomos como na forma de NPs, foi avaliado contra *M. abscessus*. Por isso, a obtenção de novos arranjos supramoleculares carreando CLA, à base de lípide catiônico e polímeros, apresentando importante inibição do crescimento de *M. abscessus*, quer seja infectando o interior de macrófagos ou formando biofilmes, e ainda sem causarem maiores danos a células, como os macrófagos, são importantes para vislumbrar possíveis futuras contribuições ao tratamento clínico de infecções causadas por *M. abscessus*.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A preparação e caracterização de novos arranjos supramoleculares de lípide catiônico, antibióticos e polímeros, bem como sua atividade contra bactérias multirresistentes ou micobactérias de crescimento rápido foi o objetivo deste trabalho. Com os resultados obtidos, concluímos:

1. As NPs de DOD BF/CMC/PDDA são arranjos antimicrobianos de amplo espectro de ação contra micro-organismos MR, como bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e leveduras. Além disso, estas NPs podem se dissociar na presença dos micro-organismos, liberando as camadas poliméricas externas para interagir com a parede e membrana microbianas, causando rompimento das mesmas e consequente extravasamento de compostos fosforilados intracelulares (Carrasco *et al.*, 2015).
2. A combinação, em um mesmo arranjo supramolecular, de lípide (DOD) e polímero antimicrobianos (PDDA), mesmo na ausência de um antimicrobiano tradicional, podem representar estratégias eficientes contra micro-organismos MR (Carrasco *et al.*, 2015), principalmente visando aplicações *ex vivo*, já que foi verificado o potencial tóxico do PDDA contra macrófagos.
3. Pelo método de injeção de solução etanólica em solução aquosa, foram obtidos os arranjos supramoleculares aniônicos e catiônicos carreadores do antimicrobiano CLA: CLA/DOD/CMC e CLA/DOD/CMC/PDDA, respectivamente, ambos coloidalmente estáveis e nanoparticulados.
4. CLA NPs aniônicas ou catiônicas incorporaram, respectivamente, 12,5 ou 3,1 % de CLA. Apesar da aparente baixa incorporação, estas NPs foram efetivas em inibir o crescimento intracelular de *M. abscessus* ou a formação de biofilmes.
5. A concentração de CLA é determinante na potência antimicrobiana das CLA NPs, pois nem DOD ou PDDA nas NPs apresentaram efeito bacteriostático contra *M. abscessus* em concentrações tão baixas quanto a CLA.
6. CLA NPs contendo 32,5, 13,25 ou ≥ 2,5 µg/mL de CLA, DOD ou PDDA, respectivamente, acarretaram danos às membranas de alta porcentagem de macrófagos, apesar de exercerem efeito bacteriostático intracelular. Portanto, as NPs devem ser compostas por baixas concentrações de CLA e DOD (≤ 3,25 e ≤ 1,3

μg/mL, respectivamente) e sem PDDA para induzirem baixa toxicidade aos macrófagos.

6. NPs aniônicas carreadoras de CLA (CLA/DOD/CMC) apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra *M. abscessus*, seja infectando o interior de macrófagos ou evitando a formação de biofilmes, com menor indução de toxicidade aos macrófagos do que as NPs catiônicas (CLA/DOD/CMC/PDDA).

7. As inibições do crescimento intracelular e da formação de biofilmes de *M. abscessus* causadas por um único arranjo supramolecular, sem induzir maiores danos aos macrófagos, pode representar uma possível futura estratégia de tratamento para infecções causadas por estes patógenos. No entanto, somente testes *in vivo* podem confirmar o potencial de aplicação clínica destas CLA NPs.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os arranjos supramoleculares antimicrobianos preparados neste trabalho mostraram-se bastante promissores por fornecerem atividades contra micro-organismos bastante refratários a tratamentos, como os multirresistentes a antimicrobianos e *M. abscessus.* Apesar da toxicidade do polímero antimicrobiano PDDA contra macrófagos THP-1, visto em ensaios preliminares, as NPs combinadas com PDDA podem ser incorporadas em materiais e/ou superfícies, fornecendo propriedades antimicrobianas de rápida ação, de amplo espectro de atividade, gerando inúmeras possibilidades de aplicações *ex vivo*, *nas* áreas farmacêutica, médica e biotecnológica, etc. Entretanto a escolha do material polimérico para inserção destas NPs deve levar em conta a disponibilidade e/ou liberação destas NPs para exercer seu efeito antimicrobiano, além da especificidade de cada uso/aplicação desejados. Além disso, a substituição do PDDA por um outro polímero catiônico com atividade mais seletiva e biocompatível seria uma alternativa para a composição de NPs carreadoras de CLA.

Já as NPs aniônicas carreadoras de CLA devem ser testadas *in vivo*, para verificar seu potencial efeito antimicrobiano quando administradas em um organismo vivo, além de ser realizado completo e sistemático estudo de sua toxicidade. Além disso, essas NPs podem ser utilizadas no desenvolvimento de formulações farmacêuticas para administração tópica (cremes/pomadas/loções) ou pulmonar (inalação/nebulização) visando o possível tratamento contra infecções de pele/tecidos moles ou pulmonares causadas por *M. abscessus.*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abed, N. e Couvreur, P. (2014). "Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections." International Journal of Antimicrobial Agents **43**(6): 485-496.

Abedinzadeh, M., Gaeini, M. e Sardari, S. (2015). "Natural antimicrobial peptides against *Mycobacterium tuberculosis*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **70**(5): 1285-1289.

Adekambi, T., Berger, P., Raoult, D. e Drancourt, M. (2006). "rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **56**(Pt 1): 133-143.

Ahmad, Z., Sharma, S. e Khuller, G. K. (2007). "Chemotherapeutic evaluation of alginate nanoparticle-encapsulated azole antifungal and antitubercular drugs against murine tuberculosis." Nanomedicine **3**(3): 239-243.

Ahmad, Z., Pandey, R. E., Sharma, S. e Khuller, G. K. (2008). "Novel chemotherapy for tuberculosis: chemotherapeutic potential of econazole-and moxifloxacin-loaded PLG nanoparticles." International Journal of Antimicrobial Agents **31**(2): 142-146.

Ahsan, F. L., Rivas, I. P., Khan, M. A. e Suarez, A. I. T. (2002). "Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers-liposomes and microspheres-on the phagocytosis by macrophages." Journal of Controlled Release **79**(1-3): 29-40.

Alhajlan, M., Alhariri, M. e Omri, A. (2013). "Efficacy and Safety of Liposomal Clarithromycin and Its Effect on *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **57**(6): 2694-2704.

Alipour, M., Halwani, M., Omri, A. e Suntres, Z. E. (2008). "Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains." International Journal of Pharmaceutics **355**(1-2): 293-298.

Alterthum, F. (2008). Morfologia e estrutura da célula bacteriana. Microbiologia. Trabulsi, L. R. e Alterthum, F. São Paulo, Atheneu**:** 7-19.

Anderson, G. G. e O'Toole, G. A. (2008). "Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms." Current Topics in Microbiology and Immunology **322**: 85-105.

Atashbeyk, D. G., Khameneh, B., Tafaghodi, M. e Fazly Bazzaz, B. S. (2014). "Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection by nanoliposomes loaded with gentamicin and oleic acid." Pharmaceutical Biology **52**(11): 1423-1428.

Azmi, F., Elliott, A. G., Khalil, Z. G.*, et al.* (2015). "Self-assembling lipopeptides with a potent activity against Gram-positive bacteria, including multidrug resistant strains." Nanomedicine **10**(22): 3359-3371.

Bakker-Woudenberg, I. A., Schiffelers, R. M., Storm, G., Becker, M. J. e Guo, L. (2005). "Long-circulating sterically stabilized liposomes in the treatment of infections." Methods in Enzymology **391**: 228-260.

Barbassa, L., Mamizuka, E. M. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2011). "Supramolecular assemblies of rifampicin and cationic bilayers: preparation, characterization and micobactericidal activity." BMC Biotechnology **11**.

Bassetti, M., Ginocchio, F. e Mikulska, M. (2011). "New treatment options against gram-negative organisms." Critical Care **15**(2): 215.

Bastian, S., Veziris, N., Roux, A. L.*, et al.* (2011). "Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by erm(41) and rrl sequencing." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **55**(2): 775-781.

Bekele, L. K. e Gebeyehu, G. G. (2012). "Application of different analytical techniques and microbiological assays for the analysis of macrolide antibiotics from pharmaceutical dosage forms and biological matrices." ISRN Analytical Chemistry: 17.

Biswas, S., Brunel, J. M., Dubus, J. C., Reynaud-Gaubert, M. e Rolain, J. M. (2012). "Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century." Expert Review of Anti-Infective Therapy **10**(8): 917-934.

Brennan, P. J. (2003). "Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*." Tuberculosis (Edinb) **83**(1-3): 91-97.

Briones, E., Colino, C. I. e Lanao, J. M. (2008). "Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells." Journal of Controlled Release **125**(3): 210-227.

Brooks, B. D. e Brooks, A. E. (2014). "Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance." Advanced Drug Delivery Reviews **78**: 14-27.

Brown-Elliott, B. A., Vasireddy, S., Vasireddy, R., *et al.* (2015). "Utility of sequencing the erm(41) gene in isolates of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* with low and intermediate clarithromycin MICs." Journal of Clinical Microbiology **53**(4): 1211-1215.

Brunton, L. L., Parker, K. L., Blumenthal, D. K. e Buxton, I. L. O. (2010). Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. Goodman & Gilman: Manual de Farmacologia e Terapêutica. Brunton, L., Parker, K., Blumenthal, D. e Buxton, I. Porto Alegre, AMGH**:** 762-783.

Busseron, E., Ruff, Y., Moulin, E. e Giuseppone, N. (2013). "Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials." Nanoscale **5**(16): 7098-7140.

Byrd, T. F. e Lyons, C. R. (1999). "Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection." Infection and Immunity **67**(9): 4700-4707.

Cabral, J. P. (1992). "Mode of antibacterial action of dodine (dodecylguanidine monoacetate) in *Pseudomonas syringae*." Canadian Journal of Microbiology **38**(2): 115-123.

Calabretta, M. K., Kumar, A., McDermott, A. M. e Cai, C. (2007). "Antibacterial activities of poly(amidoamine) dendrimers terminated with amino and poly(ethylene glycol) groups." Biomacromolecules **8**(6): 1807-1811.

Campanha, M. T. N., Mamizuka, E. M. e Carmona-Ribeiro, A. M. (1999). "Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action." Journal of Lipid Research **40**(8): 1495-1500.

Campanhã, M. T. N., Mamizuka, E. M. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2001). "Interactions between Cationic Vesicles and *Candida albicans*." The Journal of Physical Chemistry B **105**(34): 8230-8236.

Carlier, M. B., Zenebergh, A. e Tulkens, P. M. (1987). "Cellular uptake and subcellular distribution of roxithromycin and erythromycin in phagocytic cells." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **20 Suppl B**: 47-56.

Carmona-Ribeiro, A. M., Castuma, C. E., Sesso, A. e Schreier, S. (1991). "Bilayer structure and stability in dihexadecyl phosphate dispersions." The Journal of Physical Chemistry **95**(13): 5361-5366.

Carmona-Ribeiro, A. M. (1992). "Synthetic amphiphile vesicles." Chemical Society Reviews **21**(3): 209-214.

Carmona-Ribeiro, A. M., Ortis, F., Schumacher, R. I. e Armelin, M. C. S. (1997). "Interactions between Cationic Vesicles and Cultured Mammalian Cells." Langmuir **13**(8): 2215-2218.

Carmona-Ribeiro, A. M., Vieira, D. B. e Lincopan, N. (2006). "Cationic Surfactants and Lipids as Anti-Infective Agents." Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly ‘Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents) **5**(1): 33-51.

Carmona-Ribeiro, A. M., Barbassa, L. e Melo, L. D. (2011). Antimicrobial Biomimetics. Biomimetic Based Applications. Cavrak, M. Rijeka, Croatia, InTech.

Carmona-Ribeiro, A. M. (2012). "Preparation and characterization of biomimetic nanoparticles for drug delivery." Methods in Molecular Biology **906**: 283-294.

Carmona-Ribeiro, A. M. e Carrasco, L. D. M. (2013). "Fungicidal assemblies and their mode of action." OA Biotechnology **2**(3): 25.

Carmona-Ribeiro, A. M. e de Melo Carrasco, L. D. (2013). "Cationic antimicrobial polymers and their assemblies." International Journal of Molecular Sciences **14**(5): 9906-9946.

Carrasco, L. D., Sampaio, J. L. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2015). "Supramolecular cationic assemblies against multidrug-resistant microorganisms: activity and mechanism of action." International Journal of Molecular Sciences **16**(3): 6337-6352.

Carrillo-Munoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A. e Quindos, G. (2006). "Antifungal agents: mode of action in yeast cells." Revista Española de Quimioterapia **19**(2): 130-139.

Carvalho, L. A. e Carmona-Ribeiro, A. M. (1998). "Interactions between cationic vesicles and serum proteins." Langmuir **14**(21): 6077-6081.

Cavassin, E. D., de Figueiredo, L. F., Otoch, J. P., *et al.* (2015). "Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria." Journal of Nanobiotechnology **13**: 64.

CDC, (2006). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006. Workowski, K. A. e Berman, S. M., Division of STD Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention**:** 1-94.

CDC, (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. U. S., U. S. Department of Health and Human ServicesCenters for Disease Control and Prevention CDC**:** 113.

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., *et al.* (1999). "The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms." Journal of Clinical Microbiology **37**(6): 1771-1776.

Cernicka, J. e Subik, J. (2006). "Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis." International Journal of Antimicrobial Agents **27**(5): 403-408.

Chapin, K. C. e Lauderdale, T. (2007). Reagents, stains, and media: Bacteriology. Manual of Clinical Microbiology. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. e Pfaller, M. A. Washington, DC, USA, ASM Press. **1:** 334-364.

Clemens, D. L., Lee, B. Y., Xue, M., *et al.* (2012). "Targeted intracellular delivery of antituberculosis drugs to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages via functionalized mesoporous silica nanoparticles." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **56**(5): 2535-2545.

CLSI, (2011). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. Document M24-A2. Second Edition. USA**:** 72.

CLSI, (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document A100-S25. USA.

Cortesia, C., Lopez, G. J., de Waard, J. H. e Takiff, H. E. (2010). "The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks

of soft tissue infections." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **65**(12): 2574-2581.

Curcio, D. (2014). "Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: are you ready for the challenge?" Current Clinical Pharmacology **9**(1): 27-38.

Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. e Dockrell, D. H. (2010). "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages." PLoS One **5**(1): e8668.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G.*, et al.* (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." Cytometry **13**(8): 795-808.

Davies, A. e Field, B. S. (1969). "Action of biguanides, phenols and detergents on *Escherichia coli* and its sphereoplasts." The Journal of Applied Bacteriology **32**(2): 233-243.

de Steenwinkel, J. E., van Vianen, W., Ten Kate, M. T.*, et al.* (2007). "Targeted drug delivery to enhance efficacy and shorten treatment duration in disseminated *Mycobacterium avium* infection in mice." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **60**(5): 1064-1073.

Decher, G. e Hong, J. D. (1991). "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .2. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces." Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics **95**(11): 1430-1434.

Decher, G., Hong, J. D. e Schmitt, J. (1992). "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .3. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces." Thin Solid Films **210**(1-2): 831-835.

Denyer, S. P. (1995). "Mechanisms of action of antibacterial biocides." International Biodeterioration & Biodegradation **36**(3-4): 227-245.

Devarakonda, B., Judefeind, A., Chigurupati, S.*, et al.* (2007). "The effect of polyamidoamine dendrimers on the in vitro cytotoxicity of paclitaxel in cultured prostate cancer (PC-3M) cells." Journal of Biomedical Nanotechnology **3**(4): 384-393.

Duarte, R. S., Lourenco, M. C., Fonseca Lde, S., *et al.* (2009). "Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*." Journal of Clinical Microbiology **47**(7): 2149-2155.

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., *et al.* (2002). "The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(11): 7687-7692.

Esteban, J. e Ortiz-Perez, A. (2009). "Current treatment of atypical mycobacteriosis." Expert Opinion on Pharmacotherapy **10**(17): 2787-2799.

Falagas, M. E. e Michalopoulos, A. (2006). "Polymyxins: old antibiotics are back." Lancet **367**(9511): 633-634.

Fan, X., Fan, J., Wang, X., Wu, P. e Wu, G. (2015). "S-thanatin functionalized liposome potentially targeting on *Klebsiella pneumoniae* and its application in sepsis mouse model." Frontiers in Pharmacology **6**: 249.

Feller, S. E., Brown, C. A., Nizza, D. T. e Gawrisch, K. (2002). "Nuclear overhauser enhancement spectroscopy cross-relaxation rates and ethanol distribution across membranes." Biophysical Journal **82**(3): 1396-1404.

Fielding, R. M. e Lasic, D. D. (1999). "Liposomes in the treatment of infectious diseases." Expert Opinion on Therapeutic Patents **9**(12): 1679-1688.

Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W. e Schneider, G. (2012). "Designing antimicrobial peptides: form follows function (vol 11, pg 37, 2012)." Nature Reviews Drug Discovery **11**(2): 124-124.

Florence, A. T. (2005). "Preface - Dendrimers: a versatile targeting platform." Advanced Drug Delivery Reviews **57**(15): 2104-2105.

Fuhrhop, J. H. e Wang, T. (2004). "Bolaamphiphiles." Chemical Reviews **104**(6): 2901-2937.

Furneri, P. M., Fresta, M., Puglisi, G. e Tempera, G. (2000). "Ofloxacin-loaded liposomes: In vitro activity and drug accumulation in bacteria." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44**(9): 2458-2464.

Gharib, A., Faezizadeh, Z. e Godarzee, M. (2013). "Therapeutic efficacy of epigallocatechin gallate-loaded nanoliposomes against burn wound infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Skin Pharmacology and Physiology **26**(2): 68-75.

Gonzalez-Santiago, T. M. e Drage, L. A. (2015). "Nontuberculous Mycobacteria: Skin and Soft Tissue Infections." Dermatologic Clinics **33**(3): 563-577.

Greendyke, R. e Byrd, T. F. (2008). "Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **52**(6): 2019-2026.

Gregoriadis, G. (1995). "Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems." Trends in Biotechnology **13**(12): 527-537.

Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., *et al.* (2007). "An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **175**(4): 367-416.

Griffith, D. E. (2014). "*Mycobacterium abscessus* subsp *abscessus* lung disease: 'trouble ahead, trouble behind...'." F1000Prime Reports **6**: 107.

Griffith, D. E., Brown-Elliott, B. A., Benwill, J. L. e Wallace, R. J., Jr. (2015). "*Mycobacterium abscessus*. "Pleased to meet you, hope you guess my name..."." Annals of the American Thoracic Society **12**(3): 436-439.

Gulyaev, A. E., Gelperina, S. E., Skidan, I. N., *et al.* (1999). "Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles." Pharmaceutical Research **16**(10): 1564-1569.

Gupta, S., Kumar, P., Gupta, M. K. e Vyas, S. (2012). "Colloidal carriers: a rising tool for therapy of tuberculosis." Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems **29**(4): 299-253.

Gurtovenko, A. A. e Anwar, J. (2009). "Interaction of Ethanol with Biological Membranes: The Formation of Non-bilayer Structures within the Membrane Interior and their Significance." Journal of Physical Chemistry B **113**(7): 1983-1992.

Haerdi-Landerer, M. C., Suter, M. M., Steiner, A., *et al.* (2008). "In vitro cell compatibility and antibacterial activity of microencapsulated doxycycline designed

for improved localized therapy of septic arthritis." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **61**(2): 332-340.

Halwani, M., Yebio, B., Suntres, Z. E., *et al.* (2008). "Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **62**(6): 1291-1297.

Hanus, L. H. e Ploehn, H. J. (1999). "Conversion of intensity-averaged photon correlation spectroscopy measurements to number-averaged particle size distributions. 1. Theoretical development." Langmuir **15**(9): 3091-3100.

Hara, H., Kawamura, I., Nomura, T., *et al.* (2007). "Cytolysin-dependent escape of the bacterium from the phagosome is required but not sufficient for induction of the Th1 immune response against *Listeria monocytogenes* infection: Distinct role of listeriolysin O determined by cytolysin gene replacement." Infection and Immunity **75**(8): 3791-3801.

Hayashi, H., Seiki, H., Tsuneda, S., Hirata, A. e Sasaki, H. (2003). "Influence of growth phase on bacterial cell electrokinetic characteristics examined by soft particle electrophoresis theory." Journal of Colloid and Interface Science **264**(2): 565-568.

Hoque, J., Akkapeddi, P., Yarlagadda, V., *et al.* (2012). "Cleavable Cationic Antibacterial Amphiphiles: Synthesis, Mechanism of Action, and Cytotoxicities." Langmuir **28**(33): 12225-12234.

Hosny, K. M. (2010). "Ciprofloxacin as ocular liposomal hydrogel." AAPS PharmSciTech **11**(1): 241-246.

Howard, S. T., Rhoades, E., Recht, J., *et al.* (2006). "Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype." Microbiology **152**(Pt 6): 1581-1590.

Huang, Y. C., Liu, M. F., Shen, G. H., *et al.* (2010). "Clinical outcome of *Mycobacterium abscessus* infection and antimicrobial susceptibility testing." Journal of Microbiology, Immunology, and Infection **43**(5): 401-406.

Hugo, W. B. e Frier, M. (1969). "Mode of action of the antibacterial compound dequalinium acetate." Applied Microbiology **17**(1): 118-127.

Iavazzo, C., Gkegkes, I. D., Zarkada, I. M. e Falagas, M. E. (2011). "Boric Acid for Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: The Clinical Evidence." Journal of Womens Health **20**(8): 1245-1255.

Ikeda, T. e Tazuke, S. (1983). "Biologically-Active Polycations - Anti-Microbial Activities of Poly[Trialkyl(Vinylbenzyl)Ammonium Chloride] Type Polycations." Makromolekulare Chemie-Rapid Communications **4**(7): 459-461.

Jain, S. K., Haider, T., Kumar, A. e Jain, A. (2015). "Lectin-Conjugated Clarithromycin and Acetohydroxamic Acid-Loaded PLGA Nanoparticles: a Novel Approach for Effective Treatment of *H. pylori*." AAPS PharmSciTech.

Jamil, B., Habib, H., Abbasi, S. A., *et al.* (2016). "Development of Cefotaxime Impregnated Chitosan as Nano-antibiotics: De Novo Strategy to Combat Biofilm Forming Multi-drug Resistant Pathogens." Frontiers in Microbiology **7**.

Jarand, J., Levin, A., Zhang, L., *et al.* (2011). "Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease." Clinical Infectious Diseases **52**(5): 565-571.

Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., *et al.* (2007). "Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin." Cell **130**(1): 37-50.

Jena, P., Mohanty, S., Mallick, R., Jacob, B. e Sonawane, A. (2012). "Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells." International Journal of Nanomedicine **7**: 1805-1818.

Jeon, S. J., Oh, M., Yeo, W. S., Galvao, K. N. e Jeong, K. C. (2014). "Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases." PLoS One **9**(3): e92723.

Johansen, H. K., Moskowitz, S. M., Ciofu, O., Pressler, T. e Hoiby, N. (2008). "Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients." Journal of Cystic Fibrosis **7**(5): 391-397.

Johnson, C. M., Pandey, R., Sharma, S., *et al.* (2005). "Oral therapy using nanoparticle-encapsulated antituberculosis drugs in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**(10): 4335-4338.

Jones, R. N. (2001). "Resistance patterns among nosocomial pathogens - Trends over the past few years." Chest **119**(2): 397s-404s.

Kabir, M. A. e Ahmad, Z. (2013). "Candida infections and their prevention." ISRN Preventive Medicine **2013**: 13.

Kali, A. (2015). "Antibiotics and bioactive natural products in treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A brief review." Pharmacognosy Reviews **9**(17): 29-34.

Kanazawa, A., Ikeda, T. e Endo, T. (1995). "A novel approach to mode of action of cationic biocides: morphological effect on antibacterial activity." The Journal of Applied Bacteriology **78**(1): 55-60.

Kang, H. K., Park, H. Y., Kim, D.*, et al.* (2015). "Treatment outcomes of adjuvant resectional surgery for nontuberculous mycobacterial lung disease." BMC Infect Dis **15**: 76.

Kanoh, S. e Rubin, B. K. (2010). "Mechanisms of Action and Clinical Application of Macrolides as Immunomodulatory Medications." Clinical Microbiology Reviews **23**(3): 590-+.

Kasperbauer, S. H. e De Groote, M. A. (2015). "The treatment of rapidly growing mycobacterial infections." Clinics in Chest Medicine **36**(1): 67-78.

Khaira, G. K., Ganguli, A. e Ghosh, M. (2014). "Synthesis and evaluation of antibacterial activity of quaternized biopolymer from *Klebsiella terrigena*." Journal of Applied Microbiology **116**(3): 511-518.

Khameneh, B., Iranshahy, M., Ghandadi, M.*, et al.* (2015). "Investigation of the antibacterial activity and efflux pump inhibitory effect of co-loaded piperine and gentamicin nanoliposomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Drug Development and Industrial Pharmacy **41**(6): 989-994.

Khan, I. A., Mirza, Z. M., Kumar, A., Verma, V. e Qazi, G. N. (2006). "Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **50**(2): 810-812.

Khan, M. A., Aljarbou, A. N., Khan, A. e Younus, H. (2015). "Liposomal thymoquinone effectively combats fluconazole-resistant *Candida albicans* in a murine model." International Journal of Biological Macromolecules **76**: 203-208.

Kieser, K. J. e Rubin, E. J. (2014). "How sisters grow apart: mycobacterial growth and division." Nature Reviews Microbiology **12**(8): 550-562.

Kisich, K. O., Gelperina, S., Higgins, M. P., *et al.* (2007). "Encapsulation of moxifloxacin within poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles enhances efficacy against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*." International Journal of Pharmaceutics **345**(1-2): 154-162.

Kobayashi, D., Ito, S., Hirata, A., *et al.* (2015). "*Mycobacterium abscessus* Pulmonary Infection under Treatment with Tocilizumab." Internal Medicine **54**(10): 1309-1313.

Koh, W. J., Jeon, K., Lee, N. Y., *et al.* (2011). "Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **183**(3): 405-410.

Kontoyiannis, D. P. e Lewis, R. E. (2002). "Antifungal drug resistance of pathogenic fungi." Lancet **359**(9312): 1135-1144.

Lawlor, C., O'Sullivan, M. P., Rice, B., *et al.* (2012). "Therapeutic aerosol bioengineering of targeted, inhalable microparticle formulations to treat *Mycobacterium tuberculosis* (MTb)." Journal of Materials Science. Materials in Medicine. **23**(1): 89-98.

Lee, M. R., Sheng, W. H., Hung, C. C., *et al.* (2015). "*Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans." Emerging Infectious Diseases **21**(9): 1638-1646.

Lehn, J. M. (2006). Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

Li, P., Poon, Y. F., Li, W. F., *et al.* (2011). "A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability." Nature Materials **10**(2): 149-156.

Li, W., Rettig, J., Jiang, X., Francisco, D. T. e Naidong, W. (2006). "Liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric determination of clarithromycin in human plasma." Biomedical Chromatography: BMC **20**(11): 1242-1251.

Li, X. N., Robinson, S. M., Gupta, A., *et al.* (2014). "Functional Gold Nanoparticles as Potent Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant Bacteria." ACS Nano **8**(10): 10682-10686.

Lilly, H. A., Lowbury, E. J. e Wilkins, M. D. (1979). "Limits to progressive reduction of resident skin bacteria by disinfection." Journal of Clinical Pathology **32**(4): 382-385.

Lima, E. G., Gomes, L. R. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2016). "Stable indomethacin dispersions in water from drug, ethanol, cationic lipid and carboxymethyl-cellulose." Pharmaceutical Nanotechnology **4**(2): 126-135.

Lincopan, N., Mamizuka, E. M. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2003). "In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **52**(3): 412-418.

Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., *et al.* (2015). "A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance." Nature **517**(7535): 455-459.

Lira, M. C. B., Siqueira-Moura, M. P., Rolim-Santos, H. M. L., *et al.* (2009). "In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation." Journal of Liposome Research **19**(1): 49-58.

Liu, X. N., Sun, W., Zhang, B., *et al.* (2013). "Clarithromycin-loaded liposomes offering high drug loading and less irritation." International Journal of Pharmaceutics **443**(1-2): 318-327.

Lotfipour, F., Valizadeh, H., Milani, M., Bahrami, N. e Ghotaslou, R. (2016). "Study of Antimicrobial Effects of Clarithromycin Loaded PLGA Nanoparticles against Clinical Strains of *Helicobacter pylori*." Drug Research (Stuttg) **66**(1): 41-45.

Lvov, Y., Decher, G. e Mohwald, H. (1993). "Assembly, Structural Characterization, and Thermal-Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(Vinyl Sulfate) and Poly(Allylamine)." Langmuir **9**(2): 481-486.

Mammina, C., Bonura, C., Di Bernardo, F., *et al.* (2012). "Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011." Eurosurveillance **17**(33): 9-14.

Manning, A. J. e Kuehn, M. J. (2011). "Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense." Bmc Microbiology **11**.

Mardh, P. A., Rodrigues, A. G., Genc, M., *et al.* (2002). "Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis - a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy." International Journal of Std & Aids **13**(8): 522-539.

Martins, L. M. S., Mamizuka, E. M. e Carmona-Ribeiro, A. M. (1997). "Cationic vesicles as bactericides." Langmuir **13**(21): 5583-5587.

McDonnell, G. e Russell, A. D. (1999). "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance." Clinical Microbiology Reviews **12**(1): 147-179.

McFarland, J. W., Berger, C. M., Froshauer, S. A., *et al.* (1997). "Quantitative structure-activity relationships among macrolide antibacterial agents: In vitro and in vivo potency against *Pasteurella multocida*." Journal of Medicinal Chemistry **40**(9): 1340-1346.

Melo, L. D., Mamizuka, E. M. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2010). "Antimicrobial particles from cationic lipid and polyelectrolytes." Langmuir **26**(14): 12300-12306.

Melo, L. D. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2012). Fungicidal nanoparticles of low toxicity from cationic lipid and polyelectrolytes. 2012 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI Nanotech. Group, C. P.-T. F. Santa Clara, CA, USA, Nano Science and Technology Institute. **3:** 350-353.

Mendez-Samperio, P. (2008). "Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections." Peptides **29**(10): 1836-1841.

Meng, Y., Hou, X., Lei, J., *et al.* (2016). "Multi-functional Liposomes Enhancing Target and Antibacterial Immunity for Antimicrobial and Anti-Biofilm Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*." Pharmaceutical Research **33**(3): 763-775.

Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villanueva, A. e Jori, G. (1996). "Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria." Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology **32**(3): 153-157.

Merianos, J. J. (2001). Surface-active agents. Disinfection, sterilization, and preservation. Block, S. S. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins**:** 283-320.

Milovic, N. M., Wang, J., Lewis, K. e Klibanov, A. M. (2005). "Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed." Biotechnology and Bioengineering **90**(6): 715-722.

Moffat, A. C., Osselton, M. D. e Widdop, B. (2004). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. London, Pharmaceutical Press.

Moghaddam, P. H., Ramezani, V., Esfandi, E., *et al.* (2013). "Development of a nano-micro carrier system for sustained pulmonary delivery of clarithromycin." Powder Technology **239**: 478-483.

Mohammadi, G., Nokhodchi, A., Barzegar-Jalali, M., *et al.* (2011). "Physicochemical and anti-bacterial performance characterization of clarithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **88**(1): 39-44.

Mor, N., Vanderkolk, J., Mezo, N. e Heifets, L. (1994). "Effects of clarithromycin and rifabutin alone and in combination on intracellular and extracellular replication of *Mycobacterium avium*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **38**(12): 2738-2742.

Moran, G. J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., *et al.* (2006). "Methicillin-resistant *S-aureus* infections among patients in the emergency department." New England Journal of Medicine **355**(7): 666-674.

Munin, A. e Edwards-Levy, F. (2011). "Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review." Pharmaceutics **3**(4): 793-829.

Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., *et al.* (2013). "Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases." The Lancet. Infectious Diseases **13**(9): 785-796.

Nitzan, Y., Gutterman, M., Malik, Z. e Ehrenberg, B. (1992). "Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins." Photochemistry and Photobiology **55**(1): 89-96.

Nizet, V. (2006). "Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens." Current Issues in Molecular Biology **8**(1): 11-26.

Nordmann, P., Cuzon, G. e Naas, T. (2009). "The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria." The Lancet. Infectious Diseases **9**(4): 228-236.

Nordmann, P., Naas, T. e Poirel, L. (2011). "Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae." Emerging Infectious Diseases **17**(10): 1791-1798.

Nuri, R., Shprung, T. e Shai, Y. (2015). "Defensive remodeling: How bacterial surface properties and biofilm formation promote resistance to antimicrobial peptides." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1848**(11): 3089-3100.

O'Brien, R. W. e White, L. R. (1978). "Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle." Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics **74**(0): 1607-1626.

Oberley-Deegan, R. E., Lee, Y. M., Morey, G. E.*, et al.* (2009). "The antioxidant mimetic, MnTE-2-PyP, reduces intracellular growth of *Mycobacterium abscessus*." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **41**(2): 170-178.

Obonyo, M., Zhang, L., Thamphiwatana, S.*, et al.* (2012). "Antibacterial activities of liposomal linolenic acids against antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*." Molecular Pharmaceutics **9**(9): 2677-2685.

Olaitan, A. O., Morand, S. e Rolain, J. M. (2014). "Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria." Frontiers in Microbiology **5**.

Onyeji, C. O., Nightingale, C. H., Nicolau, D. P. e Quintiliani, R. (1994). "Efficacies of Liposome-Encapsulated Clarithromycin and Ofloxacin against *Mycobacterium-Avium Mycobacterium-Intracellulare* Complex in Human Macrophages." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **38**(3): 523-527.

Orme, I. M. e Ordway, D. J. (2014). "Host response to nontuberculous mycobacterial infections of current clinical importance." Infection and Immunity **82**(9): 3516-3522.

Otto, M. (2009). "*Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen." Nature Reviews. Microbiology **7**(8): 555-567.

Pacheco, L. F. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2003). "Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs." Journal of Colloid and Interface Science **258**(1): 146-154.

Pan-In, P., Banlunara, W., Chaichanawongsaroj, N. e Wanichwecharungruang, S. (2014). "Ethyl cellulose nanoparticles: clarithomycin encapsulation and eradication of *H. pylori*." Carbohydrate Polymers **109**: 22-27.

Pandey, R. e Khuller, G. K. (2004). "Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **54**(1): 266-268.

Pantosti, A. e Venditti, M. (2009). "What is MRSA?" European Respiratory Journal **34**(5): 1190-1196.

Park, S., Kim, S., Park, E. M., *et al.* (2008). "In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* in Korea." Journal of Korean Medical Science **23**(1): 49-52.

Parkins, M. D. e Floto, R. A. (2015). "Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis." Journal of Cystic Fibrosis **14**(3): 293-304.

Pasupuleti, M., Schmidtchen, A. e Malmsten, M. (2012). "Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system." Critical Reviews in Biotechnology **32**(2): 143-171.

Patil, P., Chavanke, D. e Wagh, M. (2012). "A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelispheres." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **4**(4): 27-32.

Patra, M., Salonen, E., Terama, E., *et al.* (2006). "Under the influence of alcohol: The effect of ethanol and methanol on lipid bilayers." Biophysical Journal **90**(4): 1121-1135.

Pecora, R. (2000). "Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids." Journal of Nanoparticle Research **2**(2): 123-131.

Peng, Y., Bi, J., Shi, J., *et al.* (2014). "Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections pose growing threat to health care-associated infection control in the hospitals of Southern China: a case-control surveillance study." American Journal of Infection Control **42**(12): 1308-1311.

Perea, S., Lopez-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., *et al.* (2001). "Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans*

strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**(10): 2676-2684.

Peschel, A. (2002). "How do bacteria resist human antimicrobial peptides?" Trends in Microbiology **10**(4): 179-186.

Petrini, B. (2006). "*Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen." APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica **114**(5): 319-328.

Pick, N., Cameron, S., Arad, D. e Av-Gay, Y. (2004). "Screening of Compounds Toxicity against Human Monocytic cell line-THP-1 by Flow Cytometry." Biological Procedures Online **6**: 220-225.

Pieters, J. (2001a). "Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages." Microbes and Infection **3**(3): 249-255.

Pieters, J. (2001b). "Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria." Current Opinion in Immunology **13**(1): 37-44.

Pinto-Alphandary, H., Andremont, A. e Couvreur, P. (2000). "Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications." International Journal of Antimicrobial Agents **13**(3): 155-168.

Potron, A., Poirel, L. e Nordmann, P. (2015). "Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology." International Journal of Antimicrobial Agents **45**(6): 568-585.

Prasad, R., Shah, A. H. e Rawal, M. K. (2016). "Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance." Adv Exp Med Biol **892**: 327-349.

Pumerantz, A., Muppidi, K., Agnihotri, S., *et al.* (2011). "Preparation of liposomal vancomycin and intracellular killing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." International Journal of Antimicrobial Agents **37**(2): 140-144.

Raja, M. e Vales, E. (2009). "Effects of sodium chloride on membrane fusion and on the formation of aggregates of potassium channel KcsA in *Escherichia coli* membrane." Biophysical Chemistry **142**(1-3): 46-54.

Raychaudhuri, S. e Rock, K. L. (1998). "Fully mobilizing host defense: building better vaccines." Nature Biotechnology **16**(11): 1025-1031.

Renner, L. D. e Weibel, D. B. (2011). "Physicochemical regulation of biofilm formation." MRS Bulletin/ Materials Research Society **36**(5): 347-355.

Richards, J. P. e Ojha, A. K. (2014). "Mycobacterial Biofilms." Microbiology Spectrum **2**(5).

Richardson, M. D. e Smith, H. (1983). "Ultrastructural features of phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by mouse polymorphonuclear phagocyte monolayers." Mycopathologia **83**(2): 97-102.

Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F. e Scheper, T. (2001). "Flow cytometry in biotechnology." Applied Microbiology and Biotechnology **56**(3-4): 350-360.

Rodriguez-Aller, M., Gurny, R., Veuthey, J. L. e Guillarme, D. (2013). "Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications." Journal of Chromatography. A **1292**: 2-18.

Rojanarat, W., Changsan, N., Tawithong, E., *et al.* (2011). "Isoniazid Proliposome Powders for Inhalation-Preparation, Characterization and Cell Culture Studies." International Journal of Molecular Sciences **12**(7): 4414-4434.

Rosenthal, V. D., Maki, D. G., Jamulitrat, S., *et al.* (2010). "International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009." American Journal of Infection Control **38**(2): 95-104 e102.

Russel, A. D. e Chopra, I. (1996). Understanding antibacterial action and resistance. London, Ellis Horwood Ltd.

Russel, A. D., Hugo, W. B. e Ayliffe, G. A. J. (2013). Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, Wiley-Blackwell.

Salem, II e Duzgunes, N. (2003). "Efficacies of cyclodextrin-complexed and liposome-encapsulated clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex infection in human macrophages." International Journal of Pharmaceutics **250**(2): 403-414.

Salem, II, Flasher, D. L. e Duzgunes, N. (2005). "Liposome-encapsulated antibiotics." Methods in Enzymology **391**: 261-291.

Salem, I. I. (1996). Claritrhomycin. Analytical profiles of drug substances and excipients. Brittain, H. G. San Diego, CA, Academic Press. **24:** 45-85.

Salton, M. R. (1968). "Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability." The Journal of General Physiology **52**(1): 227-252.

Sanches, L. M., Petri, D. F., de Melo Carrasco, L. D. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2015). "The antimicrobial activity of free and immobilized poly (diallyldimethylammonium) chloride in nanoparticles of poly (methylmethacrylate)." Journal of Nanobiotechnology **13**: 58.

Schales, O. e Schales, S. S. (1941). "A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids." Journal of Biological Chemistry **140**(3): 879-884.

Schiffelers, R., Storm, G. e Bakker-Woudenberg, I. (2001). "Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **48**(3): 333-344.

Sharma, A., Sharma, S. e Khuller, G. K. (2004). "Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **54**(4): 761-766.

Shaw, D. J. (1992). Introduction to Colloid & Surface Chemistry. Oxford, U. K., Butterworth-Heinemann.

Shin, J., Pauly, D. F., Johnson, J. A. e Frye, R. F. (2008). "Simplified method for determination of clarithromycin in human plasma using protein precipitation in a 96-well format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **871**(1): 130-134.

Sicchierolli, S. M., Mamizuka, E. M. e Carmona-Ribeiro, A. M. (1995). "Bacteria Flocculation and Death by Cationic Vesicles." Langmuir **11**(8): 2991-2995.

Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., *et al.* (2004). "Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **48**(12): 4673-4679.

Simon, S. A. e Mcintosh, T. J. (1984). "Interdigitated Hydrocarbon Chain Packing Causes the Biphasic Transition Behavior in Lipid Alcohol Suspensions." Biochimica Et Biophysica Acta **773**(1): 169-172.

Singh, S., Sobel, J. D., Bhargava, P., Boikov, D. e Vazquez, J. A. (2002). "Vaginitis due to *Candida krusei*: Epidemiology, clinical aspects, and therapy." Clinical Infectious Diseases **35**(9): 1066-1070.

Smith, J. K., Moshref, A. R., Jennings, J. A., Courtney, H. S. e Haggard, W. O. (2013). "Chitosan sponges for local synergistic infection therapy: a pilot study." Clinical Orthopaedics and Related Research **471**(10): 3158-3164.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J. e Dolan, J. W. (2009). Introduction to modern liquid chromatography.

Sobczak, M., Debek, C., Oledzka, E. e Kozlowski, R. (2013). "Polymeric systems of antimicrobial peptides--strategies and potential applications." Molecules **18**(11): 14122-14137.

Sobel, J. D., Faro, S., Force, R. W., *et al.* (1998). "Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations." American Journal of Obstetrics and Gynecology **178**(2): 203-211.

Sobel, J. D., Wiesenfeld, H. C., Martens, M., *et al.* (2004). "Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis." New England Journal of Medicine **351**(9): 876-883.

Sosunov, V., Mischenko, V., Eruslanov, B., *et al.* (2007). "Antimycobacterial activity of bacteriocins and their complexes with liposomes." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **59**(5): 919-925.

Staneva, D., Vasileva-Tonkova, E., Makki, M. S., *et al.* (2015). "Synthesis, photophysical and antimicrobial activity of new water soluble ammonium quaternary benzanthrone in solution and in polylactide film." Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology **143**: 44-51.

Stromstedt, A. A., Ringstad, L., Schmidtchen, A. e Malmsten, M. (2010). "Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes." Current Opinion in Colloid & Interface Science **15**(6): 467-478.

Takahashi, C., Akachi, Y., Ogawa, N., *et al.* (2016). "Morphological study of efficacy of clarithromycin-loaded nanocarriers for treatment of biofilm infection disease." Medical Molecular Morphology.

Tan, H., Ma, R., Lin, C., Liu, Z. e Tang, T. (2013). "Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics." International Journal of Molecular Sciences **14**(1): 1854-1869.

Tapias, G. N., Sicchierolli, S. M., Mamizuka, E. M. e Carmona-Ribeiro, A. M. (1994). "Interactions between *Cationic Vesicles* and *Escherichia coli*." Langmuir **10**(10): 3461-3465.

Tiller, J. C., Liao, C. J., Lewis, K. e Klibanov, A. M. (2001). "Designing surfaces that kill bacteria on contact." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(11): 5981-5985.

Timofeeva, L. e Kleshcheva, N. (2011). "Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications." Applied Microbiology and Biotechnology **89**(3): 475-492.

Timofeeva, L. M., Kleshcheva, N. A., Moroz, A. F. e Didenko, L. V. (2009). "Secondary and tertiary polydiallylammonium salts: novel polymers with high antimicrobial activity." Biomacromolecules **10**(11): 2976-2986.

Timofeeva, L. M., Kleshcheva, N. A., Shleeva, M. O., *et al.* (2015). "Nonquaternary poly(diallylammonium) polymers with different amine structure and their biocidal effect on *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*." Applied Microbiology and Biotechnology **99**(6): 2557-2571.

Tiwari, T. S., Ray, B., Jost, K. C., Jr., *et al.* (2003). "Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride." Clinical Infectious Diseases **36**(8): 954-962.

Tulkens, P. M. (1991). "Intracellular distribution and activity of antibiotics." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **10**(2): 100-106.

Varshey, D. B., Sander, J. R. G., Friscic, T. e MacGillivray, L. R. (2012). Supramolecular Interactions. Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials. Steed, J. W. e Gale, P. A. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA. **1:** 9-24.

Veiga, A. S., Sinthuvanich, C., Gaspar, D., *et al.* (2012). "Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels." Biomaterials **33**(35): 8907-8916.

Veldhuizen, E. J., Brouwer, E. C., Schneider, V. A. e Fluit, A. C. (2013). "Chicken cathelicidins display antimicrobial activity against multiresistant bacteria without inducing strong resistance." PLoS One **8**(4): e61964.

Vibe, C. B., Fenaroli, F., Pires, D., *et al.* (2016). "Thioridazine in PLGA nanoparticles reduces toxicity and improves rifampicin therapy against mycobacterial infection in zebrafish." Nanotoxicology **10**(6): 680-688.

Vieira, D. B. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2001). "Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B." Journal of Colloid and Interface Science **244**(2): 427-431.

Vieira, D. B., Pacheco, L. F. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2006). "Assembly of a model hydrophobic drug into cationic bilayer fragments." Journal of Colloid and Interface Science **293**(1): 240-247.

Vieira, D. B. e Carmona-Ribeiro, A. M. (2008). "Cationic nanoparticles for delivery of amphotericin B: preparation, characterization and activity in vitro." Journal of Nanobiotechnology **6**: 6.

Vierl, U., Lobbecke, L., Nagel, N. e Cevc, G. (1994). "Solute Effects on the Colloidal and Phase-Behavior of Lipid Bilayer-Membranes - Ethanol-Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures." Biophysical Journal **67**(3): 1067-1079.

Vyas, S. P., Kannan, M. E., Jain, S., Mishra, V. e Singh, P. (2004). "Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages." International Journal of Pharmaceutics **269**(1): 37-49.

Wallace, R. J., Jr., Brown, B. A. e Griffith, D. E. (1998). "Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria." Annual Review of Microbiology **52**: 453-490.

Wang, G., Wang, J. J., Wu, W., *et al.* (2015). "Advances in lipid-based drug delivery: enhancing efficiency for hydrophobic drugs." Expert Opinion on Drug Delivery **12**(9): 1475-1499.

Wang, Y., Zhou, Z. J., Zhu, J. S., *et al.* (2011). "Dark Antimicrobial Mechanisms of Cationic Phenylene Ethynylene Polymers and Oligomers against *Escherichia coli*." Polymers **3**(3): 1199-1214.

Warner, D. M., Shafer, W. M. e Jerse, A. E. (2008). "Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness." Molecular Microbiology **70**(2): 462-478.

Wierzbowski, A. K., Hoban, D. J., Hisanaga, T., DeCorby, M. e Zhanel, G. G. (2006). "The use of Macrolides in treatment of upper respiratory tract infections." Current Allergy and Asthma Reports **6**(2): 171-181.

Williams, M. M., Yakrus, M. A., Arduino, M. J., *et al.* (2009). "Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria." Applied and Environmental Microbiology **75**(7): 2091-2098.

Wu, G. Q., Fan, X. B., Li, L. X., *et al.* (2010). "Interaction of antimicrobial peptide s-thanatin with lipopolysaccharide in vitro and in an experimental mouse model of septic shock caused by a multidrug-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*." International Journal of Antimicrobial Agents **35**(3): 250-254.

Wu, Y. C., Koch, W. F., Feng, D., *et al.* (1994). "A Dc Method for the Absolute Determination of Conductivities of the Primary Standard Kcl Solutions from 0-Degrees-C to 50-Degrees-C." Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology **99**(3): 241-246.

Xue, Y., Xiao, H. e Zhang, Y. (2015). "Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts." International Journal of Molecular Sciences **16**(2): 3626-3655.

Zahoor, A., Sharma, S. e Khuller, G. K. (2005). "Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis." International Journal of Antimicrobial Agents **26**(4): 298-303.

Zaru, M., Sinico, C., De Logu, A., *et al.* (2009). "Rifampicin-loaded liposomes for the passive targeting to alveolar macrophages: in vitro and in vivo evaluation." Journal of Liposome Research **19**(1): 68-76.

Zhang, L., Pornpattananangku, D., Hu, C. M. e Huang, C. M. (2010). "Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery." Current Medicinal Chemistry **17**(6): 585-594.

Zhao, X. L. e Zhang, Y. J. (2013). "Bacteria-removing and Bactericidal Efficiencies of PDADMAC Composite Coagulants in Enhanced Coagulation Treatment." Clean-Soil Air Water **41**(1): 37-42.

Zhuo, F. L., Sun, Z. G., Li, C. Y., *et al.* (2013). "Clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* in Guangzhou area most possibly from the environmental infection showed variable susceptibility." Chinese Medical Journal (Engl) **126**(10): 1878-1883.

Zuckerman, J. B., Zuaro, D. E., Prato, B. S., *et al.* (2009). "Bacterial contamination of cystic fibrosis clinics." Journal of Cystic Fibrosis **8**(3): 186-192.

Zuckerman, J. M., Qamar, F. e Bono, B. R. (2011). "Review of Macrolides (Azithromycin, Clarithromycin), Ketolids (Telithromycin) and Glycylcyclines (Tigecycline)." Medical Clinics of North America **95**(4): 761-791.

8. SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi amparado pelos auxílios concedidos aos laboratórios de Biocolóides (FAPESP processo n° 2011/00046-5; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – processos n° 470105/2010-0 e 302352/2014-7) e de Microbiologia Clínica (FAPESP processo n° 2010/00807-3).