

MICROCALORIMETRIA BIOLÓGICA COMO MÉTODO DE INVESTIGAÇÃO DE NOVOS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

C. A. Montanari, M. L. C. Montanari

Depto. de Química - ICEB - UFOP - C. P. 21 - 35400 - Ouro Preto - MG

and Chemistry Department, Royal Holloway and Bedford New College - University of London - UK

A. E. Beezer

Chemical Laboratory, The University, Canterbury - Kent - UK

A. M. Giesbrecht

Instituto de Ciências Biomédicas - USP - SP

Recebido em 10/2/92; cópia revisada em 13/10/92.

It has been estimated that in order to produce a single antifungal compound by the "hit or miss" approach at least one to twelve thousand of newly synthesized drugs must be tested. Biological microcalorimetry is shown to be a method that is capable in performing the assay, as well as an alternative method for the classical agar plate diffusion technique, for instance. This bioassay system relies upon the inhibition of the microcalorimetrically observed respiration of *Saccharomyces cerevisiae* in buffered glucose, by mesoionic compounds of types 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide and 1,3,4-triazolium-2-thiolate.

Keywords: Biological microcalorimetry; agar plate diffusion; mesoionic compounds.

INTRODUÇÃO

Métodos microcalorimétricos de análise têm sido extensivamente revisados¹⁻⁶. A microcalorimetria biológica tem-se mostrado como uma técnica microbiológica com um futuro promissor, particularmente em áreas onde os métodos analíticos clássicos são consumidores de tempo, laboriosos e de baixa precisão. Ainda existem poucos artigos sobre o efeito de drogas e microorganismos avaliado pelo método microcalorimétrico. Entretanto, os resultados têm apresentado como características fundamentais: melhor reprodutibilidade (ca. de 2% quando comparada com ca. de 5-10% no método clássico de difusão em ágar); melhor sensibilidade; maior rapidez (ca. 1 hora quando comparado a 24-48 horas na técnica clássica); uso de inóculo armazenado em condições padronizadas em nitrogênio líquido; além da simplicidade do experimento. No entanto, para ser uma verdadeira substituta da técnica clássica de difusão em ágar, a técnica microcalorimétrica deve ser capaz de operar com uma variedade significativa de microorganismos tal como na primeira, o que, até o presente, ainda não está garantido.

Em contraste com métodos espectrofotométricos as investigações em sistemas bioquímicos e biológicos usando métodos calorimétricos não requerem soluções opticamente límpidas, mas podem ser usados sistemas não transparentes tais como misturas ou suspensões de tecidos e células e outros materiais particulados.

Calorímetros foram, na realidade, ferramentas muito importantes para os cientistas durante final do século 18 e século 19, quando desenvolveram a presente teoria e conhecimento sobre a natureza do fenômeno de calor. Os desenvolvimentos recentes foram revisados por Armstrong⁷. Calorímetros têm sido usados em ciências biológicas, principalmente, para a investigação de propriedades termodinâmicas de materiais, metabolismo completo e balanço de energia em animais (Lavoisier e colaboradores, por exemplo, no final do século 18 mediram a potência total de calor de pequenos animais e correlacionaram isto com suas velocidades de respiração e os pesos de seus corpos usando um calorímetro de gelo).

Entre os procedimentos clássicos de testes microbiológicos, tais como métodos de difusão em ágar, respirométrico e diluição em série, o primeiro é o mais amplamente estudado em testes de antibióticos. Embora os ensaios microbiológicos clássicos continuem sendo utilizados, outros métodos para biotestes de antibióticos têm sido investigados. *Microcalorimetria biológica* é uma técnica analítica não seletiva na qual se registra o efeito de calor produzido por um processo metabólico microbiano que acontece numa cultura. Este efeito pode ser registrado continuamente sem perturbar o processo.

Microcalorimetria biológica aplicada ao estudo de processos microbianos pode ser dividida em três principais campos: (i) a identificação do microorganismo; (ii) estudos metabólicos; (iii) efeitos de modificadores do processo metabólico, como, por exemplo, antibióticos.

Os calorímetros mais amplamente usados em aplicação analítica microbiológica são os microcalorímetros isotérmicos de condução de calor. A capacidade para operar isotermicamente é importante porque os microorganismos podem ser monitorados a diferentes temperaturas, para condições ótimas de respiração e crescimento, e a natureza da interação antibiótico-microorganismo como função da temperatura é uma consideração importante. Além disso, é importante ter condições isotérmicas porque o microorganismo cresce a temperatura constante e seu metabolismo e subsequente inibição são melhor compreendidos como função da temperatura.

Há diferentes espécies de calorímetros para o que Calvet⁸, Benzinger⁹ e Wadsö¹⁰ podem ser consultados, por exemplo. Os experimentos descritos neste trabalho foram realizados utilizando-se um microcalorímetro de fluxo¹¹.

É sabido que culturas de microorganismos que crescem/metabolizam produzem perfis gráficos que são frequentemente conhecidos como curvas potência-tempo (dQ/dt versus tempo). Muitos estudos do calor produzido por microorganismos em crescimento como função do tempo originam curvas simétricas ou hiperbólicas na forma de sinos. O crescimento de uma população homogênea de células dispersa em um meio líquido apropriado para o crescimento, é descrito por um aumento exponencial da densidade celular. A velocidade da

produção de calor será, então, descrita pela mesma função exponencial. Quando o crescimento exponencial é limitado pela fonte de energia, a velocidade de produção de calor declina quando o substrato é exaurido e retorna para um valor básico. Esta curva clássica de potência-tempo é mostrada na Figura 1^{4a}. A linha reta mostrada corresponde à transformação semilog da curva experimental. Da mesma maneira, antibióticos podem ser adicionados a microorganismos metabolizando sob condições de não-crescimento, por exemplo em tampão glicose. Em tais situações, entretanto, uma curva dQ/dt mais simples do que aquela devida ao crescimento é obtida (Figura 2^{4a, 5a, 5b}).

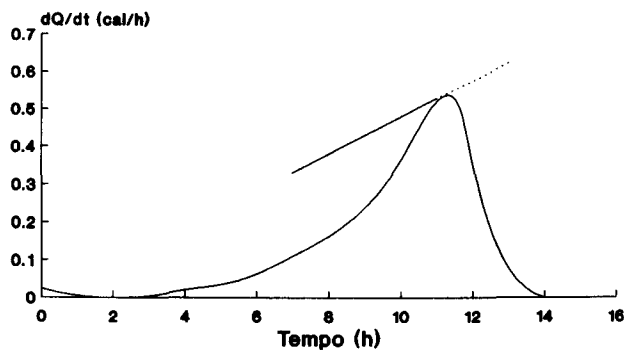


Figura 1. Curva dQ/dt para *Saccharomyces cerevisiae* crescendo anaerobicamente em glicose.

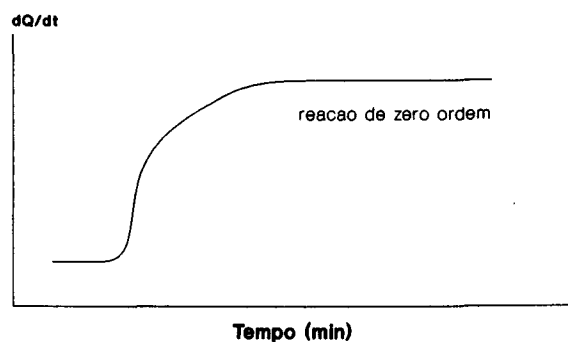


Figura 2. Curva dQ/dt para *Saccharomyces cerevisiae* respirando em tampão ftalato a pH 4,5 contendo glicose.

A Farmacopéia Britânica¹² estabelece que os testes devam ser confiáveis e que haja no máximo uma variação de 5%. O desvio padrão dos experimentos microcalorimétricos é da ordem de 2%, contra 5-10% nos experimentos clássicos.

A interação de antibióticos poliênicos (nistatina, filipina, pimarcina, anfotericina-B, candidina e lucensomicina) e outras drogas antifúngicas sintéticas (clotrimazol e 5-fluorocitosina) com *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 239 - National Collection of Yeast Cultures), foi estudada por Beezer e colaboradores¹³⁻²⁵. Essa série de estudos constitui o primeiro exemplo de experimentos microcalorimétricos quantitativos conduzidos em condições padronizadas. Isso inclui a armazenagem do inóculo em nitrogênio líquido e o controle analítico do tempo para assegurar a adição dos antibióticos no mesmo ponto do metabolismo celular. Também, as interações foram estudadas sob condições de crescimento e não-crescimento. Um microcalorímetro biológico de fluxo foi usado nos estudos de metabolização de culturas de leveduras em tampão glicose-ftalato.

Como exemplo, a adição de nistatina a células da levedura metabolizando a 25 °C, resultou em curvas dQ/dt versus tempo que são mostradas na Figura 3^{5a}. A resposta biológica depende da concentração do agente. A resposta também depende da natureza da droga e sua concentração. As curvas dQ/dt

versus tempo obtidas nos ensaios realizados para pimarcina, lucendomicina (em concentrações menores do que 5.10^{-6} M) e clotrimazol, mostradas nas Figuras 4(c), são bastante diferentes daquela mostrada na curva (b), para nistatina. Os pontos de interesse são: primeiro, há um "kick-up" acima do nível de controle com o polieno nistatina (curva (b), Figura 4^{5a}); segundo, com pimarcina ou clotrimazol ((c), na Figura 4), a reação lembra aquela entre uma enzima e um inibidor. No caso da lucensomicina a curva dQ/dt versus tempo pode ter ambos os perfis, dependendo da concentração do antibiótico. Em baixa concentração, a resposta é semelhante àquela mostrada em (c) e o antibiótico está atuando como fungistático¹⁷. Em alta concentração, a curva dQ/dt é similar àquela obtida para nistatina, por exemplo, (b), e sua ação é fungicida.

Neste trabalho a atividade biológica de compostos mesoiônicos dos tipos 1, 3, 4-tiadiazólio-2-aminida e 1, 3, 4-triazólio-2-tiolato (Figura 8) contra *Saccharomyces cerevisiae* é reportada e os resultados corroboram a aplicabilidade da microcalorimetria biológica como método de investigação de novos fármacos.

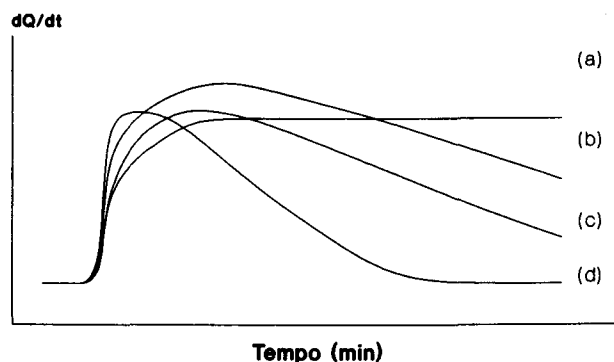


Figura 3. Curva dQ/dt versus tempo: efeito de nistatina sobre *S. cerevisiae*. (a) controle (b) 5 unidades nistatina cm^{-3} (c) 10 unidades cm^{-3} (d) 20 unidades cm^{-3}

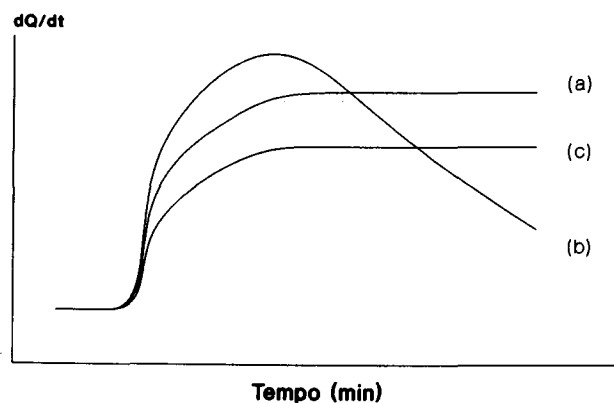


Figura 4. Curvas dQ/dt : efeito de alguns agentes antifúngicos (a) controle (b) nistatina, leucensomicina (alta concentração) (c) pimarcina, leucensomicina (baixa concentração), clotrimazol.

ARMAZENAGEM POR CONGELAMENTO^{20, 26}

Um método de diminuir a atividade metabólica celular é o de armazenagem por diminuição da temperatura. Congelar e armazenar células em nitrogênio líquido é uma técnica útil para manter o inóculo estável. Uma vez padronizado o mesmo não requer ulteriores padronizações.

Essa técnica é utilizada para a armazenagem em nitrogênio líquido de *S. cerevisiae*. Um recipiente para nitrogênio líquido, com 35 litros, mantendo aproximadamente 900 ampolas de 2 ml foi usado para armazenar a levedura. A reposição de nitrogênio líquido é feita de tempos em tempos.

Para o armazenamento em nitrogênio líquido as células

suspensas no inóculo são colocadas rapidamente em ampolas (Sterilin Ltd), de 2 ml, carregadas com 1,8 ml da suspensão. As células no reservatório são agitadas continuamente para ajudar na distribuição uniforme do inóculo. As ampolas carregadas são mantidas em barras de resfriamento, em um tanque isolado de alumínio contendo nitrogênio líquido, uniformemente espaçadas com clips (1,2 cm de diâmetro). As barras estão dentro do tanque a uma altura de 8,5 cm acima do nitrogênio líquido, a partir das quais as ampolas são liberadas para imersão em nitrogênio líquido. A velocidade de resfriamento foi de 9 °C/min, que é tida como ótima para fungos²⁷.

MATERIAIS E MÉTODOS

O problema de se obter um inóculo reproduzível foi considerado por Beezer e colaboradores¹⁵. Eles desenvolveram uma técnica simples para a preparação, armazenagem em nitrogênio líquido, e ensaio de *S. Cerevisiae*. As células recém-preparadas e as congeladas foram incubadas em condições aeróbica e anaeróbica, cujo diagrama dQ/dt versus tempo pode ser encontrado na Figura 5¹⁵. Foi estabelecido que a área sob a curva dQ/dt versus tempo de T_0 até T_1 , onde T_1 é um tempo definido após T_0 , de células recém-preparadas e congeladas era proporcional ao número de células viáveis. A porcentagem de recuperação foi determinada comparando-se as áreas das respectivas curvas de células recém-preparadas e recuperadas da armazenagem: células armazenadas por 500 dias foram recuperadas em 93%.

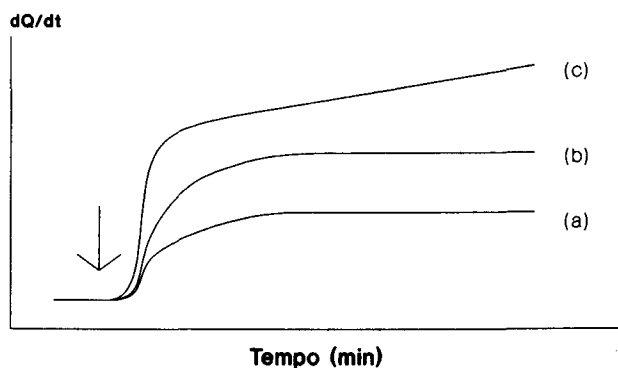


Figura 5. dQ/dt versus tempo: levedura metabolizando em tampão contendo glicose (a) incubação anaeróbica, reação de zero ordem (b) incubação agitada em ar (c) incubação oxigenada. A seta indica o ponto no qual a incubação foi apresentada ao calorímetro.

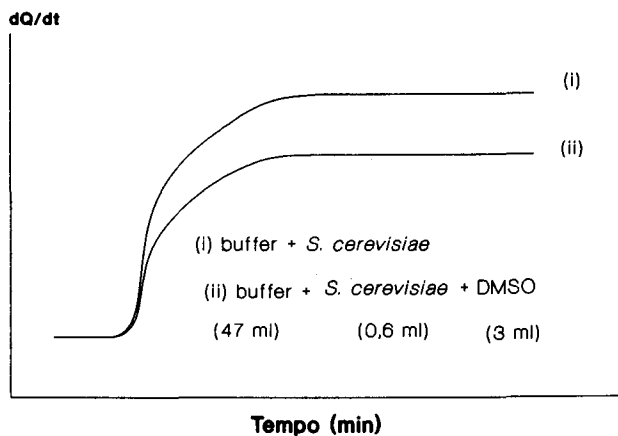


Figura 6. Curva dQ/dt versus tempo para controle.

O calorímetro usado neste trabalho foi o LKB Flow Microcalorimeter (LKB tipo 10700; LKB Produkter AB, S-161 25 Bromma, Sweden). Esse instrumento emprega duas células calorimétricas operando a temperatura constante em banho de ar. O calorímetro é operado no modo de fluxo a 30 °C numa sala mantida a 20 °C \pm 0,2 °C. A reação, usando o método de fluxo, objeto deste trabalho, é iniciada fora do calorímetro em um vaso reacional e o meio reagente bombeado a velocidade constante através das unidades de troca de calor dentro do calorímetro via tubo de teflon. O efluente do calorímetro pode ser desprezado ou reciclado para dentro do vaso de reação, como foi feito nestes estudos.

A mistura reacional passa através do calorímetro por uma bomba peristáltica que utiliza tubos de teflon de diferentes diâmetros, os quais servem para o transporte do meio reacional. Diferentes velocidades de bombeamento podem ser obtidas e, neste trabalho, foi adaptada para ca. de 1/4 ciclo/min (tempo necessário para que a mistura retorne ao vaso reacional). A voltagem foi amplificada por um microvoltímetro Keithley 150B/nanovoltímetro Tinsley 6050.

Para um experimento típico de microcalorimetria envolvendo o uso de leveduras respirando em meio contendo glicose, tampão ftalato (50 ml) contendo diferentes volumes de inóculo é passado pelo microcalorímetro até estabelecer-se uma linha base constante usando a sensibilidade do amplificador equivalente a 10 μ V. Uma vez estabelecido o volume correto de suspensão de levedura a ser usado (0,6 ml em nossos trabalhos), curva (i) na Figura 6, o experimento é repetido com o solvente (3 ml, DMSO) a fim de obter-se a curva padrão mostrada na Figura 6(ii). Estas curvas (dQ/dt versus tempo) não apresentam o retorno do termograma para o nível da linha base constante devido à continuação da respiração das células da levedura. Mesmo assim, é possível observar que a curva controle, Figura 6(ii), mostra uma pequena diminuição da produção do calor devido ao efeito do solvente, o que significa uma pequena redução da atividade metabólica da levedura.

Durante o estabelecimento da linha base (tampão + solvente + droga), as ampolas armazenadas em nitrogênio líquido são descongeladas usando um banho de água, por 3 minutos. A suspensão do microorganismo (0,6 ml) é agitada por um minuto e então inoculada no vaso de reação (a 30 °C), que já contém o tampão e a droga. Este procedimento deve ser feito dentro de 5 minutos. A mistura incubada alcança o calorímetro 3 minutos após a adição do microorganismo; nesse instante o primeiro sinal do conteúdo do vaso de incubação é detectado. O ciclo se dá via calorímetro e termina no próprio incubador ca. de 4 minutos após a incubação, constituindo-se, desta forma, em um sistema fechado. Depois de cada incubação os tubos do calorímetro são lavados com água desionizada. De vez em quando os tubos são lavados com NaOH 0,1 M (15 min), água desionizada (10 min), HCl 0,1 M (15 min), água desionizada (10 min), EtOH (95%) (15 min) e, finalmente, água desionizada (10 min).

O pH (4,5) do tampão foi medido num pHmetro (Radiometer Copenhagen) à temperatura ambiente.

O vaso de incubação usado para todos os experimentos envolvendo a respiração da levedura é um vaso de vidro com três tampas removíveis. Duas são usadas para os tubos de entrada e saída para o calorímetro (avaliação reciclada), e a terceira para adição dos materiais. Homogeneidade do conteúdo do vaso é alcançada usando uma pequena barra magnética.

O meio reacional, agitado continuamente, flui através do calorímetro por ca. de 20 minutos e um gráfico dQ/dt versus tempo devido à entalpia do metabolismo da glicose é registrado (Figura 9).

As leveduras foram obtidas do National Collection of Yeast Cultures (NCYC), e a preparação do inóculo foi feita de acordo com Beezer e colaboradores^{15, 19, 20}. *Saccharomyces*

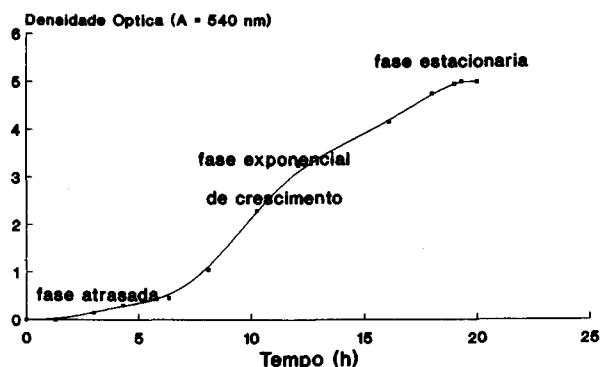
cerevisiae foi selecionado devido a suas características não-agregantes que são apropriadas para a microcalorimetria biológica de fluxo.

A curva de crescimento de *S. cerevisiae* (NCYC 239) em fermentador Biotec de 1 litro é mostrada na Figura 7^{5a, 6}.

A curva de densidade óptica versus tempo mostra duas séries de fases estacionárias (plateau)^{20, 28-30}. A primeira, ocorrendo ca. de 1h30 depois de iniciado o "regime de crescimento", refere-se à fase retardada (ou atrasada), onde nenhum crescimento é observado.

A Figura 7 mostra que a velocidade de crescimento primeiro é diminuída até, finalmente, permanecer constante, originando, dessa forma, a segunda fase estacionária. Esta tem sido considerada como uma *real* fase estacionária. A segunda fase ocorreu a aproximadamente 20 horas depois de inoculação e o inóculo desta fase estacionária foi congelado para ser, posteriormente, analisado frente às drogas.

Os compostos mesoiônicos (Figura 8) foram sintetizados de acordo com procedimentos já descritos na literatura⁶ e foram escolhidos em função da existência de um programa de síntese de compostos orgânicos com atividade biológica útil, em desenvolvimento pelo grupo.



Melo definido

Figura 7. Curva de crescimento para *S. cerevisiae* NCYC 239 em cultura agitada aeróbica.

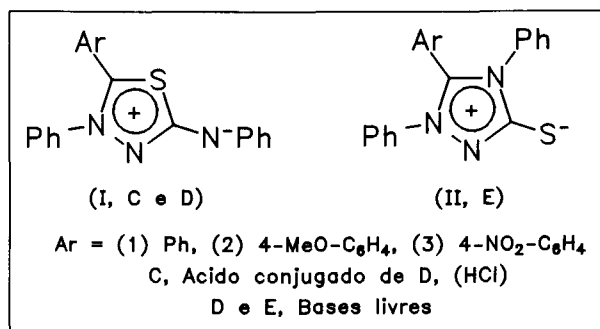


Figura 8. Compostos mesoiônicos em estudo.

MICROCALORIMETRIA BIOLÓGICA DE FLUXO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS MESOIÔNICOS

S. cerevisiae examinado frente aos compostos mesoiônicos em estudo, mostrados na Figura 8, por microcalorimetria, originou os diagramas da Figura 9, que mostra o tipo de curva obtido quando o microorganismo em tampão contendo glicose a pH 4,5 foi colocado na presença de compostos mesoiônicos.

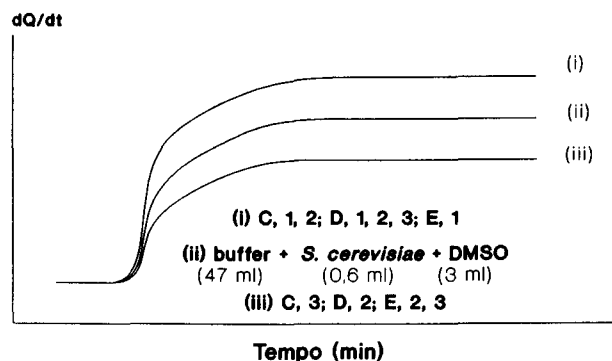


Figura 9. Curvas dQ/dt versus tempo mostrando a tendência geral dos compostos mesoiônicos sobre *S. cerevisiae*.

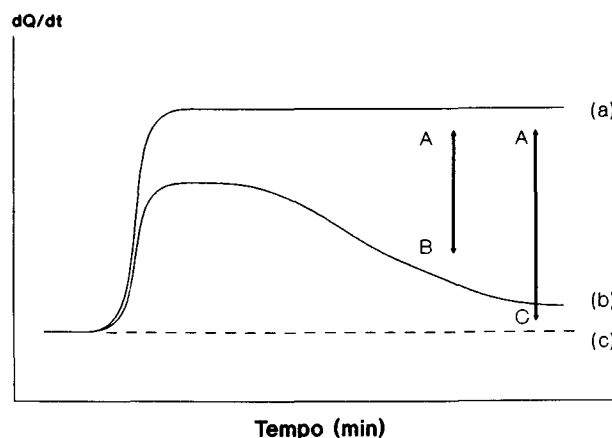


Figura 10. Curva dQ/dt versus tempo: (a) Controle (b) Curva modificada pela ação da droga (CMD) (c) linha base.

Basicamente, as curvas representam respostas biológicas não muito efetivas, entretanto, duas características importantes podem ser consideradas. A primeira delas refere-se ao fato de ter sido possível identificar dois comportamentos distintos: a curva modificada pela ação da droga está abaixo ou acima da curva controle (Figura 9). A curva (iii) representa, efetivamente, um resultado positivo da ação da droga enquanto que a curva (i) pode representar maior consumo da fonte de energia. Outro aspecto refere-se ao fato de serem curvas estacionárias, ou seja paralelas à curva padrão (ii) que poderiam, no caso da curva (iii), representar uma atividade fungistática dos compostos mesoiônicos referidos sob as curvas. Vale ressaltar, entretanto, que em nenhum dos casos analisados houve retorno do termograma para nível da linha base devido à cessação da respiração do microorganismo. Por outro lado, à parte da mudança da curva, alguns compostos usados em diferentes concentrações podem estar representados tanto pela curva (i) quanto (iii); é o caso, por exemplo, do composto (D, 2).

O desvio padrão médio obtido nos experimentos realizados neste trabalho é de 1,55%, que representa cinco medidas a fixadas concentrações para cada droga estudada. Este valor mostra a excelente reprodutibilidade do experimento biológico e está dentro do erro normalmente aceito¹².

O método de medir o parâmetro da resposta biológica é a porcentagem de deflexão observada a partir da curva controle (Figura 9-ii), quando o composto mesoiônico é adicionado. Essa deflexão foi medida 15 minutos depois da observação da primeira resposta microcalorimétrica. Isso é chamado de *porcentagem de inibição da atividade respiratória*. A Figura 10 mostra como a resposta biológica é calculada. A porcentagem

gem de inibição da atividade respiratória das células de *S. cerevisiae* na presença dos compostos mesoiônicos é tomada como a razão AB/AC x 100. Em outras palavras, a resposta pode ser expressa como $(dQ/dt_{\text{células não tratadas}} - dQ/dt_{\text{células tratadas}}) / dQ/dt_{\text{células não tratadas}} \times 100$.

CONCLUSÃO

Vários são os mecanismos utilizados na identificação de um novo fármaco: acaso, triagem empírica, extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação molecular de medicamentos conhecidos e planejamento racional. A gênese planejada de medicamentos leva, necessariamente, em conta esse aspecto quando da programação da pesquisa que compreende os planejamentos químicos e biológicos. Estes incluem os métodos de síntese e de avaliação biológica (técnicas de ensaios). Como resultado da triagem preliminar das substâncias, uma seleção dos compostos mais promissores deve ser realizada e, estes, submetidos às competentes pesquisas bioquímicas. Uma vez definidos esses parâmetros, os estudos detalhados em animais podem ser realizados. Até este patamar, tem sido estimado um consumo de tempo de 3 a 10 anos.

É estimado que no intuito de se produzir um único agente antifúngico pelo método "hit or miss", de 1 a 12.000 novas drogas devem ser sintetizadas e testadas. A microcalorimetria biológica, que ainda não é aplicada no Brasil como método de avaliação da atividade biológica de novas substâncias dentro da gênese planejada de fármacos³¹, é uma técnica microbiológica *in vitro* à semelhança da técnica clássica de difusão em ágar que, certamente, será capaz de estabelecer novos horizontes na busca de novos métodos de testes biológicos.

Como primeiro objetivo existe a possibilidade de viabilizar o ensaio biológico preliminar dentro da gênese planejada de fármacos. Este aspecto é bastante importante quando se leva em consideração que no Brasil ca. de 90% das plantas (produtos naturais) ainda não foram estudadas. Pode, ainda, minimizar a dificuldade em se encontrar um centro que realize os ensaios biológicos, já que a técnica de microcalorimetria biológica pode apresentar os resultados de uma análise em menos do que uma hora. Em princípio, num estudo preliminar qualitativo, poderiam ser realizadas ca. de 7.680 análises por ano. Utilizando-se a mesma base de cálculo, apenas 960 análises seriam realizadas pela técnica de difusão em ágar.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS E NOTAS

1. Beezer, A. E. in "MTP International Reviews of Science", Physical Chemistry Series 1, T. S. West, Ed, Vol. 13, Butterworths, London, (1973).
2. Tyrrel, H. J. V. and Beezer, A. E., "Thermometric Titrimetry", Chapman and Hall, London, (1968).
3. Perry, B. F.; *Comprehensive Analytical Chemistry*, Ed. G. Svehla, (1982), 12, Thermal Analysis, Part B, Biochemical and clinical application of thermometric thermal analysis, 176.
4. Beezer, A. E. and Chowdhry, B. Z.; *Biological Microcalorimetry*, Ed. Beezer, A. E.; Academic Press, London, (1980), pp. 195.
5. (a) Montanari, M. L. C.; Dissertação de Mestrado, Synthesis and Bioactivity of a Series of Substituted N-(3-phenyl-2-propenylidene)-benzenamines, Royal Holloway and Bedford New College, University of London, 1991. (b) Os perfis apresentados neste trabalho são qualitativos. Representam termogramas (curvas dQ/dt versus tempo) típicos, cuja sensibilidade é < 1 mW. A sensibilidade para uma troca de calor constante varia com o tempo: para microorganismos em condições de crescimento o tempo é medido em horas, enquanto que em condições de não-crescimento (metabolismo) em minutos.
6. Montanari, C. A.; Tese de Doutorado, Propriedades espectroscópicas e atividade biológica de algumas betaínas heterocíclicas, p. 160, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1991.
7. Armstrong, G. T., *J. Chem. Educ.* 1964, 41, 297.
8. (a) Calvet, E.; *Experimental Thermochemistry*, Ed. Rossini, F. D.; Interscience, New York, 1956, p. 237; (b) Calvet, E. and Prat, H.; *Recent Progress in Microcalorimetry*, Ed. and Trans. H. A. Skinner, Pergamon Press, Oxford, 1963.
9. Benzinger T. H.; and Kitzinger, C.; *Temperature, its measurement and control in science and industry*, Ed. Hardy, J. D.; vol. 3, Reihold, New York, 1963.
10. (a) Wadsö, I.; *Acta Chem. Scand.* 1968, 22, 927; (b) Wadsö, I.; *Sci. Tools*, 1974, 21, 18; (c) Monk P.; and Wadsö, I.; *Acta Chem. Scand.* 1968, 22, 1842.
11. Spink, C. H. e Wadsö, I.; *Meth. Biochem. Analysis*, 1976, 23, 1.
12. *British Pharmacopoeia* 1973, Appendix XIVB, A102-A104, HMSO, London.
13. Perry, B. F.; *Comprehensive Analytical Chemistry*, Ed. G. Svehla; 1982, 12, Thermal Analysis, Part B, Biochemical and clinical applications of thermometric and thermal analysis, 176.
14. Beezer, A. E.; and Chowdhry, B. Z.; *Biological Microcalorimetry*, Ed. Beezer, A. E.; Academic Press, London, 1980, p. 195.
15. Beezer, A. E.; Newell, R. D.; and Tyrrel, H. J. V.; *Anal. Chem.* 1976, 48, 197.
16. Beezer, A. E.; Chowdhry, B. Z.; Newell, R. D. and Tyrrel, H. J. V.; *Anal. Chem.* 1977, 49, 134.
17. Beezer, A. E.; Chowdhry, B. Z.; Newell, R. D. and Tyrrel, H. J. V.; *Anal. Chem.* 1977, 49, 1781.
18. Beezer A. E.; and Chowdhry, B. Z.; *Talanta*, 1979, 27, 1
19. Chowdhry, B. Z.; Ph. D. Thesis, 1980, University of London.
20. Preey, B., Ph. D. Thesis, 1980, University of London.
21. Beezer, A. E.; and Stubbs, C. D.; *Talanta* 1973, 20, 27.
22. Beezer, A. E.; and Chowdhry, B. Z.; *Microbios* 1980, 28, 107.
23. Perry, B. F. e al; *Microbios* 1986, 45, 181.
24. Beezer, A. E. et al; *J. Pharm. Pharmacol.* 1987, 39, 774.
25. Beezer, A. E. et al; *J. Pharm. Pharmacol.* 1983 35, 406-407.
26. Chapman, D.; and Wallach, D. F. H.; *Biological Membranes, Physical Fact and Function*, 1968, p.125, Ed. D. Chapman, Academic Press.
27. Mazur, P. e Schmidt, J. J.; *Cryobiol.*, 1968, 5, 1.
28. Pirt, S. J.; *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, 1975, Oxford, Blackwell Sci. Pub.
29. Pamment, N. B. and Hall, R. J. J.; *Gen. Microbiol.* 1978, 105, 297.
30. (a) Campbel, A.; *Bact. Rev.*, 1957, 21, 263 (b) Painter, P. R. e Marr, A. G.; *Ann. Rev. Microbiol.*, 1968, 22, 519.
31. Entretanto, veja: (a) Chaves, M.M.; Lima-e-Silva, F. C.; Pinto, L. W.; Mares-Guia, M. L. e Nogueira-Machado, J.A.; *Brazilian J. Med. Biol. Res.* (1991), 24, 929 (b) Mares-Guia, M.; Vilhena do Nascimento, V.; Lovrien, R. e Melo, M. N.; *Thermochimica Acta* (1990), 172, 203 (c) Volpe, P. L. O.; *Química Nova* (1987), 10, 122 (d) Volpe, P. L. O.; *Química Nova* (1988), 11, 435, (e) Montanari, C. A.; Beezer, A. E.; Giesbrecht, A. M. e Miller, J.; *Química Nova* (1991), 14 (2-Supl.), QB-10 (f) Montanari, M. L. C.; Sandall, J. P. B. e Beezer, A. E.; *Química Nova* (1991), 14 (2-Supl.), QB-11 (g) Montanari, M. L. C.; Montanari, C. A. e Beezer, A. E.; *Química Nova* (1992), 15 (2-Supl.), QB-05.