

# Biguanida Polimérica Versatilidade e Diversificação em um só Produto

Autor: Mauricio Franzin<sup>1</sup>

Empresa : Arch Química Brasil Ltda.  
Av. Brasília, 1500 – 13327-901  
Salto – São Paulo  
Fone: (11) 4028-8118

## **ABSTRACT**

### **1. Introdução**

A utilização de antimicrobianos nas formulações de sanitizantes e desinfetantes é essencial para a manutenção de altos níveis de padrões de higiene e limpeza. Tais produtos, quando usados como parte de um programa de limpeza e sanitização alinhados com princípios de HACCP, ajudam a manter os microrganismos patogênicos sob controle evitando o aparecimento de infecções. Estes antimicrobianos são particularmente importantes em ambientes de alto risco de contaminação, tais como indústrias de processamento de alimentos e hospitais.

Nos últimos anos a necessidade de um antimicrobiano efetivo para ser utilizado nestes ambientes tem sido altamente importante e extensivamente estudado. O aparecimento de normas e critérios de controles mais rígidos tem levado o consumidor a exigir uma demanda de produtos sanitizantes e desinfetantes de alta performance fazendo com os profissionais envolvidos no controle microbiológico sejam capazes de responder rápida e efetivamente às novas necessidades de suas aplicações, tendo como critério básico o uso de um antimicrobiano de amplo espectro de ação com baixa toxicidade para o homem e o meio ambiente, além de atender às Legislações vigentes em diferentes partes do mundo globalizado.

Seguindo esta linha, o grupo das biguanidas vem sendo estudado como um potencial e versátil antimicrobiano desde 1879 na preservação de cosméticos, produtos farmacêuticos e principalmente como princípio ativo em formulações de desinfetantes e sanitizantes para diversas áreas de aplicação. Como exemplos primários destas biguanidas temos Clorexidina (fig.2) – biguanida monomérica e a bis(biguanida) ou biguanida polimérica (fig.1).

Fig. 1 – PHMB – Cloridrato de Polihexametileno Biguanida

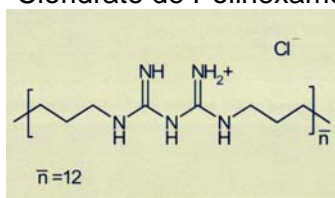
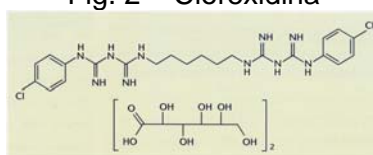
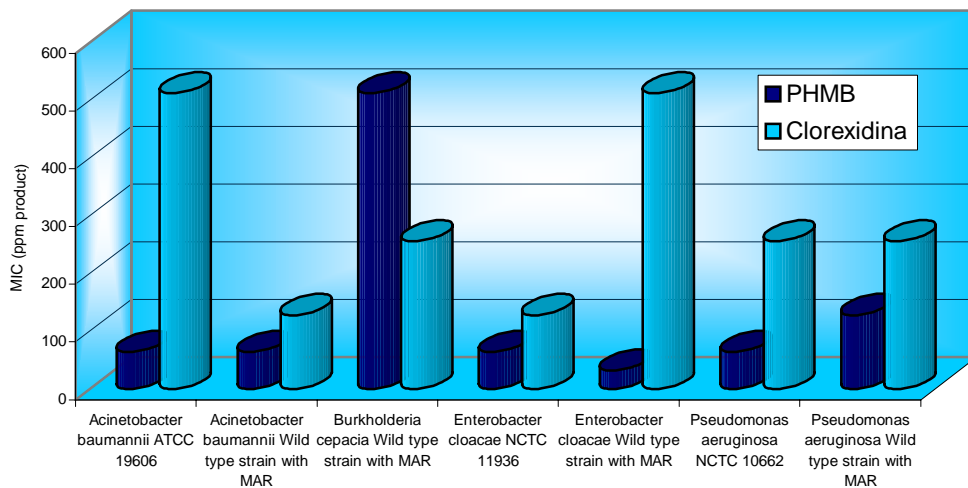


Fig. 2 – Clorexidina

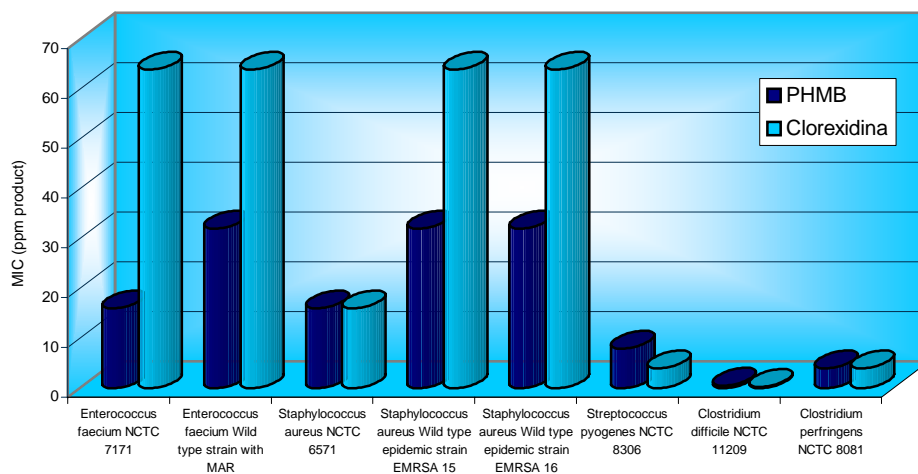


Quando se constatou que esta bis(biguanida) tinha atividade bactericida muito superior às biguanidas monoméricas, os cientistas mostraram-se interessados em desenvolver as biguanidas poliméricas como agentes antimicrobianos, especialmente o Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) que atualmente é utilizado em diversas aplicações antimicrobianas devido ao seu amplo espectro de atuação no controle de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, vírus, microrganismos resistentes à antibióticos (Gráficos 1 e 2), mesmo em condições adversas como: presença de matéria orgânica e água dura. O amplo espectro de ação do PHMB aliado à sua boa estabilidade térmica, baixa formação de espuma, alta solubilidade em água, baixa volatilidade e corrosividade somados aos estudos de toxicidade em mamíferos e ao meio ambiente, caracterizam o PHMB como um antimicrobiano de última geração, seguro, eficiente e versátil para formulação de desinfetantes de uso industrial, institucional e doméstico tornando-o uma opção de melhor custo benefício aos tradicionais antimicrobianos.

**Gráfico 01 - Atividade Antimicrobiana do PHMB no controle de bactérias Gram negativas resistentes à antibióticos**



**Gráfico 2 - Atividade Antimicrobiana o PHMB no controle de bactérias Gram positivas resistentes a antibióticos**



\* Os dados mencionados nos gráficos 1 e 2 foram cedidos pela Avecia Protection & Hygiene - UK

## 2. PHMB – Mecanismo de Ação

Para um melhor entendimento do mecanismo de ação do PHMB faremos uma breve revisão sobre a estrutura celular de bactérias Gram-negativas, associando os vários componentes bioquímicos que as compõem.

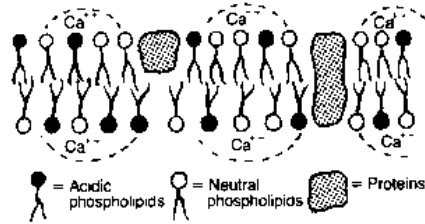
A membrana externa ocorre somente nas espécies Gram-negativas, tais como, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* servindo como uma proteção extra da membrana citoplasmática contra o ataque de toxinas, tornando mais difícil a ação de antimicrobianos dificultando a sua penetração na célula bacteriana. Abaixo desta “capa” e ligada a ela, esta a parede celular responsável por garantir a integridade da estrutura celular evitando que a alta pressão osmótica interna provoque danos a célula.

Seguindo mais para o interior da célula, temos a membrana citoplasmática ligada a parede celular e totalmente em contato com o citoplasma. A membrana citoplasmática possui diferentes propriedades, tais como, permeabilidade seletiva que garante a presença de diversos tipos de proteínas, as quais estão embebidas em fosfolipídeos que formam a membrana. Além disso a membrana citoplasmática é responsável em manter as concentrações citoplasmáticas dos íons que são transportados eletronicamente para dentro da célula devido as diferenças de pH e potencial das diferentes “capas” ou “membranas”. (fig. 4)

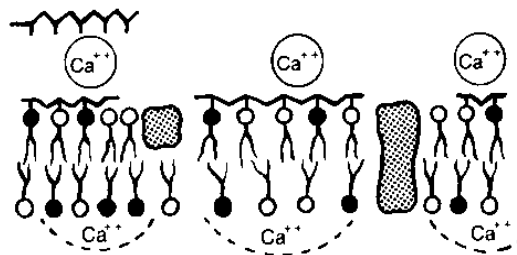
O mecanismo de ação do PHMB vem sendo estudado por vários cientistas ao longo de décadas. Baseado no trabalho destes cientistas, a sequência bactericida proposta pela (ICI, 1986) começa com uma rápida atração do PHMB catiônico na superfície bacteriana negativamente carregada provocando uma falha no mecanismo de defesa da célula e a ruptura da parede da célula. O PHMB então é atraído para a membrana citoplasmática, onde causa a perda de substâncias de baixo peso molecular, tais como íons de Potássio, Cálcio e a inibição de enzimas responsáveis pela união da membrana, tais como o ATPase. A grande ruptura subsequente da membrana citoplasmática pode então levar à perda de substâncias macromoleculares (ex. Nucleotídeos) e à precipitação das substâncias celulares.

Figura 4: Mecanismo de ação do polihexametileno biguanida (PHMB).

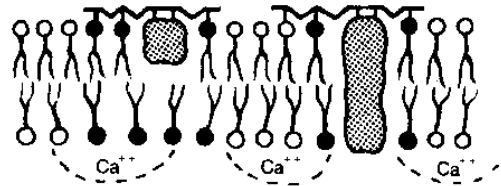
(Polyhexanide is represented by  $\sim\sim\sim\sim\sim\sim$ )



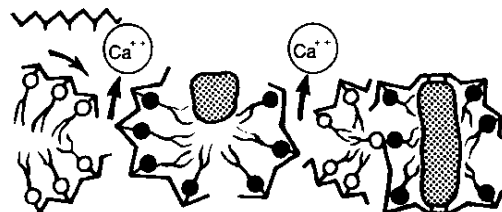
a) membrana citoplasmática bacteriana conforme modelo do "Mosaico fluido" estabilizado por íons de Ca e mistura de fosfolídeos



b) o PHMB sobre a superfície de cátions, ligada aos fosfolídeos, causa mudança na estrutura



c) o PHMB induz a separação da camada de fosfolídeos, efeitos concentrados na área da proteína integral ; causa aumento da permeabilidade da membrana, fluxo de  $K^+$  e perda da função da membrana



d) Ruptura extensiva da membrana citoplasmática com vazamento dos componentes macromoleculares e precipitação do conteúdo celular

### 3. PHMB – Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Nas tabelas abaixo poderemos verificar a atividade antimicrobiana do PHMB no controle de diversos microrganismos

**Tabela 1. MIC – Bactérias Gram Negativas**

<b>Microrganismos</b>	<b>Referência</b>	<b>PHMB (ppm)</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	8
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	20
<i>Edwardsella tarda</i>	NCTC 11934	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCIB 8271	8
<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC 11936	16
<i>Escherichia coli</i>	NCIB 9132	32
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	16
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	NCTC 12900	2
<i>Klebsiella aerogenes</i>	NCTC 9528	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCIB 11467	16
<i>Legionella pneumophila</i>	-	1
<i>Proteus mirabilis</i>	NCTC 10975	32
<i>Proteus vulgaris</i>	NCTC 4175	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25668	62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 10662	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCIB 6750	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 13388	12
<i>Pseudomonas cepacia</i>	NCTC 10661	31
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525	8
<i>Pseudomonas putida</i>	-	5
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 13311	24
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	32
<i>Salmonella Poona</i>	NCTC 4840	8
<i>Serratia marcescens</i>	NCIB 9523	32
<i>Serratia marcescens</i>	NCTC 11935	6
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	1
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	0,5
<i>Vibrio cholerae</i> Non 0:1	NCTC 11348	1

**Tabela 2. MIC – Fungos e Leveduras**

<b>Microrganismos</b>	<b>Referência</b>	<b>PHMB (ppm)</b>
<i>Aspergillus niger</i>	-	150
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	62
<i>Rhodotorula rubra</i>	NCYC 1659	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	62
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCPF 3178	32
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-	5

Tabela 3. MIC – Bactérias Gram Positivas e Bacillus (esporos)

Microrganismos	Referência	PHMB (ppm)
<i>Bacillus megaterium</i>	-	2
<i>Bacillus polymyxa</i>	-	2
<i>Clostridium welchii</i>	-	12
<i>Corynebacterium acnes</i>	-	3
<i>Enterococcus faecium</i>	NCIB 11508	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 775	4
<i>Enterococcus faecium</i>	NCIB 13192	0,2
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313	6
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 11994	4
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	NCIB 8548	2
<i>Staphylococcus albus</i>	-	0,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 6571	1
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	NCTC 11940	0,5
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	NCTC 12493	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 1803	4
<i>Streptococcus epidermis</i>	ATCC 14990	2
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	1
<i>Streptococcus lactis</i>	NCTC 7944	4
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	6
<i>Bacillus subtilis</i>	-	1,6
<i>Bacillus cereus</i>	-	12,5
<i>Bacillus cereus var. mycoides</i>	-	12,5
<i>Bacillus circulans</i>	-	2,5
<i>Bacillus lichenformis</i>	-	3,1
<i>Bacillus pumilus</i>	-	1,6
<i>Bacillus coagulans</i>	-	2,5

O PHMB também tem demonstrado uma boa atividade virucida. Testes foram conduzidos com suspensões de vírus inoculadas em células animais, as quais foram tratadas com diferentes concentrações de PHMB visando definir o tempo de contato necessário para reduzir 50% da infecção inicial (Tissue Culture Infecting Dose at 50% or TCID<sub>50</sub>) ou controlar totalmente a infecção.

A atividade virucida do PHMB foi determinada utilizando-se algumas espécies de vírus reconhecidamente problemática na área médica (Tabela 4), tais como “Vaccinia [Poxviridae]”, “Influenza Hong Kong” [Orthomyxoviridae] e “Herpes Simplex” [Herpesviridae], além de espécies importantes para área veterinária como, “Avian Infectious Laryngotracheitis” [ILT] (Tabela 5) , “Marek Virus [Herpesviridae]” (tabela 6) e “Herpes virus” (Tabela 7), “Swine virus” [Coronaviridae] (Tabela 8) e “Fowlpox virus” [ Poxviridae] (Tabela 9).

Tabela 4. Atividade virucida no controle de vírus problema para área médica<sup>(1)</sup>

Concentração de PHMB (%)	TCID <sub>50</sub> – tempo de contato de 10 minutos			
	Polio 1	Vaccinia (Poxviridae)	Influenza A Hong Kong (Orthomyxoviridae)	Herpes Simplex 1 (Herpesviridae)
0	10 <sup>5.1</sup>	10 <sup>4.5</sup>	10 <sup>5.1</sup>	10 <sup>4.7</sup>
0,001	10 <sup>6.6</sup>	10 <sup>4.5</sup>	10 <sup>4.6</sup>	10 <sup>4.9</sup>
0,005	10 <sup>5.6</sup>	10 <sup>3.5</sup>	10 <sup>3.6</sup>	10 <sup>2</sup>
0,03	10 <sup>5.9</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>

Tabela 5. Atividade virucida no controle de “Avian Infectious Laryngotracheitis Virus” (ILT)<sup>(2)</sup>

Concentração de PHMB (%)	TCID <sub>50</sub> – tempo de contato					
	0	5	15	30	60	120
0	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>0.7</sup>	10 <sup>2.7</sup>	10 <sup>2.5</sup>
0,0005	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1.5</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.5</sup>	10 <sup>0.5</sup>	10 <sup>0.5</sup>
0,001	10 <sup>3</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>0.5</sup>	10 <sup>0.5</sup>	10 <sup>0.3</sup>	<10
0,002	10 <sup>3</sup>	10 <sup>0.5</sup>	<10	<10	<10	<10

Tabela 6. Atividade virucida no controle de “Marek Virus (Herpesviridae)”<sup>(2)</sup>

Concentração de PHMB (%)	TCID <sub>50</sub> – tempo de contato	
	15 minutos	60 minutos
0	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2.7</sup>
0,002	10 <sup>2.3</sup>	10 <sup>1.6</sup>
0,004	10 <sup>0.6</sup>	10 <sup>0.6</sup>
0,008	<1	<1
0,016	<1	<1

Tabela 7. Atividade virucida no controle de “Herpes virus” (HVT)<sup>(2)</sup>

Concentração de PHMB (%)	Redução de virus viáveis (%) x tempo de contato			
	15 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
0	13.9	11.1	11.1	33.3
0,00025	52.8	72.2	78.6	78.1
0,005	55.6	78.9	83.6	85.6
0,01	78.3	80.8	87.2	88.8
0,02	72.2	85.0	92.0	93.3

Tabela 8. Atividade virucida no controle de “Swine Virus” [ Coronaviridae] (TGE)<sup>(2)</sup>

Concentração de PHMB (%)	Efeito Citopático Observado
0	Sim
0,02	Nenhum
0,04	Nenhum

Tabela 9. Atividade virucida no controle de “Fowlpox Virus” [Poxviridae]<sup>(2)</sup>

Concentração de PHMB (%)	Efeito Citopático Observado
0	Sim
0,02	Nenhum

(1) Test Report Evaluation of Antiviral Activity of Vantocil IB (PHMB 20% em solução aquosa), ICI Chemical Industries Virology Unit, 1977

(2) Patent #63-183502, Publication date: 28, July, 1988, Applicant: Ueno Pharmaceuticals Co. Ltd. Research Labs.

#### 4. Aplicações

O PHMB vem sendo estudado a décadas (Rosenthal e outros, 1982) como ingrediente ativo em formulações de desinfetantes para indústrias alimentícias, possuindo uma excelente atividade no controle de microrganismos patogênicos, tais como, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas* bem como endoesporos de bactérias termoresistentes (*Bacillus sp.*). Seu amplo espectro de ação na presença de matéria orgânica (leite, sangue, albumina, etc) aliado a baixa toxicidade em mamíferos, baixa corrosividade e formação de espuma garantem ao PHMB um melhor custo benefício quando comparado aos tradicionais desinfetantes à base de quaternário de amônio.

Desinfetantes contendo PHMB podem ser utilizados na desinfecção de equipamentos, pisos, paredes em sistemas abertos ou CIP (clean-in-place) através de aplicação manual, imersão ou recirculação seguida de enxague com água potável conforme “Resolução 211/MS/ANVS, de 18 de Junho de 1999 publicada no D. O. U em 26 de Junho de 1999”.

A boa performance do PHMB como ingrediente ativo em desinfetantes para indústrias alimentícias quando comparado com outros ativos, pode ser evidenciado através dos resultados obtidos em testes realizados com base em protocolos aceitos pela Comunidade Européia sobre condições de uso específico (Tabela 10) e nos gráficos comparativos a seguir:

Tabela 10. PHMB – Resumo da Atividade Antibacteriana “Standard European Tests Under Conditions Representative of Practical Use”

<b>“European Test”</b>	<b>Condições</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>% de PHMB necessária para aprovação</b>
EN 1040	Água Leve	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	0,0005
EN 1040	Água Dura	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	0,005
EN 1276 <sup>1</sup>	Água Dura/superfícies limpas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus hirae</i>	0,01
EN 1276 <sup>1</sup>	Água Dura/superfícies sujas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus hirae</i>	0,02
AFNOR T72-171	Água Dura	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	0,003
AFNOR T72-171	Albumina e extrato de levedura	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	0,04
WI 216028	Superfície suja	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	0,008
BS 6471	Soro de Cavalo	<i>Escherichia coli</i>	0,008
Suspensão	Superfície limpa a 0°C e 20°C	<i>Lactobacillus sp.</i>	0,016
Suspensão	Com e sem leite desnatado	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus agalactiae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Aeromonas aerogenes</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Oidium lactis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,02 a 0,01

(1) ver gráficos 3 e 4



Gráfico 3 – EN 1276 – Efeito de Interferentes presentes em cervejarias na ação do PHMB no controle de *Pseudomonas aeruginosa* (água dura/matéria orgânica/1% de extrato de levedura)

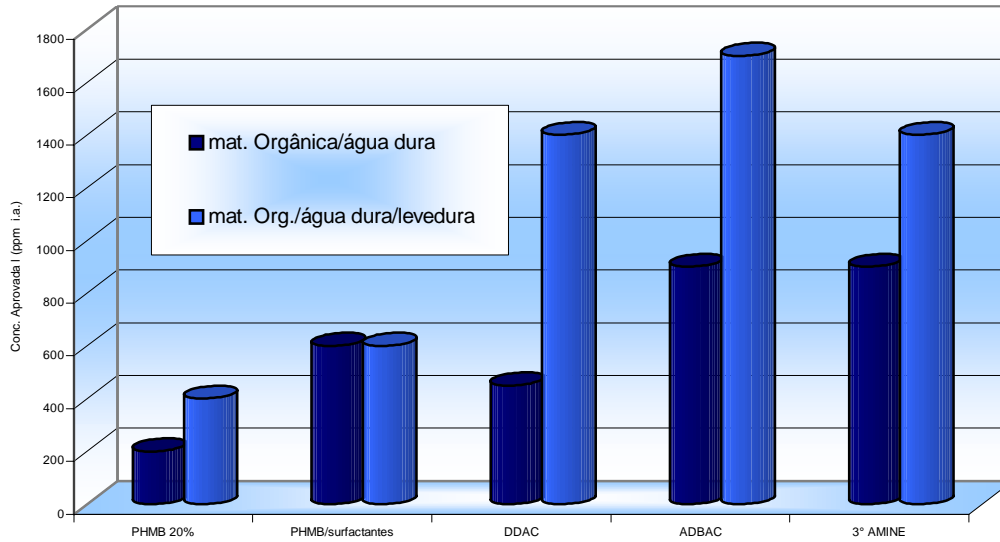
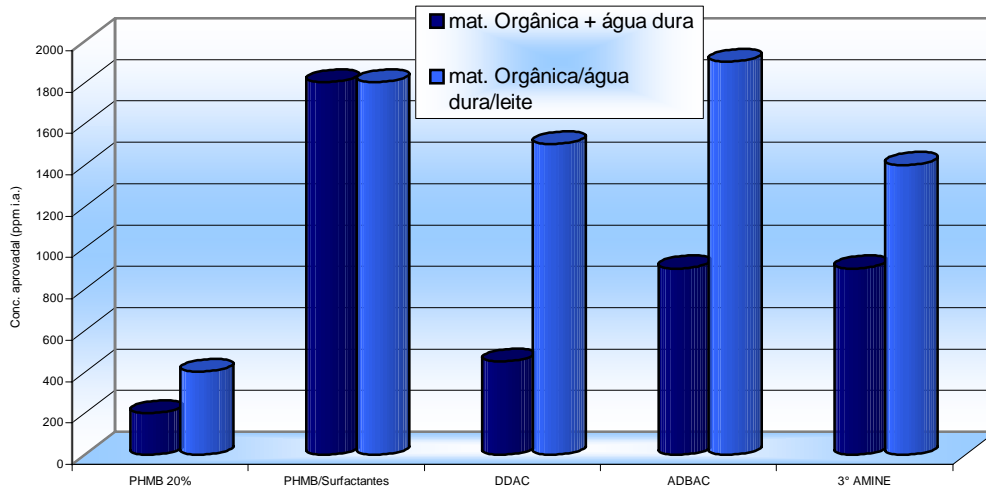


Gráfico 4 – EN 1276 – Efeito de Interferentes presentes em laticínios na ação do PHMB no controle de *Pseudomonas aeruginosa* (água dura/matéria orgânica/1% de leite desnatado)



O PHMB também pode ser utilizado como ingrediente ativo em desinfetantes para uso exclusivo em hospitais e estabelecimentos relacionados com o atendimento à saúde; na desinfecção de pisos, paredes, mobiliários e artigos semi-críticos conforme “Ofício 278/89 da Secretária de Vigilância Sanitária de 14 de Novembro de 1989” incluindo na Portaria 15 de 23 de Agosto de 1988 – Produtos Saneantes domissanitários, sub anexo 1, alínea H do grupo químico das biguanidas, o princípio ativo Cloridrato de Polihexametileno Biguanida.

A sua eficácia no controle de bactérias resistentes a antibióticos, conforme mencionado no início deste trabalho transformou o PHMB numa grande arma no controle de infecções hospitalares (Hospital Acquired Infections – HAIs).

No Brasil, o uso de Cloridrato de polihexametileno biguanida em desinfetantes de uso doméstico, ambientes públicos ou privados; sobre superfícies; em aparelhos sanitários, ralos e fossas foi autorizado conforme “Ofício 278/89 da Secretária de Vigilância Sanitária de 14 de Novembro de 1989” incluindo na Portaria 15 de 23 de Agosto de 1988 – Produtos Saneantes domissanitários, sub anexo 1, alínea H do grupo químico das biguanidas, o princípio ativo Cloridrato de Polihexametileno Biguanida.

## 5 – PHMB – Formulando Desinfetantes

Como o PHMB possui um caráter catiônico, as formulações de desinfetantes devem seguir as mesmas orientações utilizadas quando do uso de quaternários de amônio. No entanto dependo da aplicação final, uma grande variedade de surfactantes não-iônicos, co-solventes, espessantes e agentes sequestrantes, poderão ser utilizados garantindo um sinergismo da formulação contendo baixas concentrações de PHMB e conseqüentemente obtendo-se um melhor custo benefício.

A alta solubilidade do PHMB em água permite formulações límpidas e transparentes mesmo em condições extremamente alcalinas ou ácidas desde que observadas algumas orientações básicas. Desinfetantes ácidos e alcalinos (pH entre 4 a 13) transparentes podem ser obtidos com a utilização de diversos tipos de ácidos e bases desde que respeitando alguns procedimentos de adição.

Em situações onde a aparência da superfície após a desinfecção é um fator determinante e importante (catering, restaurantes, banheiros, cozinhas, etc) as formulações contendo PHMB são reconhecidas como sendo as ideais, uma vez que após a sua secagem não deixam manchas na superfície não alterando o brilho das mesmas. Tal característica não ocorre com os QAC devido à presença de cadeias de ácidos graxos.

### Conclusão

A versatilidade do PHMB também garante ao usuário final propriedades diferenciadas dos tradicionais quaternário de amônio, tais como:

- Baixa formação de espuma
- Baixa corrosividade
- Alto poder de detergência
- Efetividade em sistemas ácidos, neutros e alcalinos
- Excelente performance em diferentes dureza de água e tipos de sujidade
- Não mancha as superfícies após a secagem do desinfetante
- Disponibilidade de “Test Strips” que garantem a concentração de uso
- Não altera as propriedades organolépticas dos alimentos

Os extensivos estudos de toxicologia em mamíferos, meio ambiente somados aos dados de performance em diferentes tipos de aplicações fazem do PHMB uma molécula versátil para uso em formulações de:

- Desinfetantes para indústrias alimentícias
- Desinfetantes para uso geral
- Desinfetantes hospitalares para superfícies fixas e semi-críticas

- Sabonetes antisépticos para lavagem das mãos antes de cirurgias ou em processos onde os procedimentos de boas práticas de manufaturas são exigidos
- Detergentes sanitizantes
- Pastilhas efervescente de desinfetantes para sistemas de ar condicionado

A necessidade de atender padrões internacionais de garantia de qualidade, definidas por sistemas como HACCP garantem o reconhecimento do PHMB em diversas partes do mundo (EPA/Estados Unidos, EINECS/Europa, ACOIN/AICS/Australia, ENCS/Japão, DSL/Canada, "Korean Inventory" e ANVISA/Brasil) como a mais nova tecnologia para controle de contaminações em diferentes aplicações

## REFERÊNCIAS

- Rathke, B., *Berichte Der Deutschen Keramische Gesselshaft*, **12**, 776 (1879).
- Curd, F.H.S., and Rose, F.L., *Journal of the Chemical Society*, Part II, 729 (1946).
- *British Pharmaceutical Codex*, The Pharmaceutical Press, London (1973).
- Rose, F.L., and Swain, G., *Journal of the Chemical Society*, Part IV, 4422 (1956).
- ICI Specialty Chemicals Technical Literature Ref. 30-15: *Products for the formulation of solid surface disinfectants and detergent sanitizers*.
- Davies, A., Bentley, M., and Field, B.S., *Journal of Applied Bacteriology*, **31**, 448 (1968).
- Cutler, R. A., Diana, D., and Schalit, S., *Soap and Chemical Specialties*, **42**, 45 (1966).
- Broxton, P., Woodcock, P.M., and Gilbert, P., *Microbios*, **41**, 15-22 (1984).
- Broxton, P., Woodcock, P.M., Gilbert, P., *Microbios*, **40**, 187-193 (1984)
- Broxton, P., Woodcock, P.M, Gilbert, P., and Heatley, G., *Journal of Applied Bacteriology*, **57**, 115-125 (1984).
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L., *Science*, **175**, 720 (1972).
- Ikeda, T., Ledwith, A. Bamford, C.H., and Hann, R.A., *Biochem-Biophys. Acta.*, **769**, 57-66 (1984).