

Escola Superior de Saúde – Politécnico do Porto

Maria João Amorim Cerqueira

**Estudo da atividade biológica de sais orgânicos
baseados no ácido betulínico e em antimaláricos e
sais orgânicos de beta-lactâmicos**

Dissertação submetida à Escola Superior de Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Costa-Rodrigues, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, do Professor Doutor Ricardo Ferraz, Escola Superior de Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, e da Professora Doutora Cristina Prudêncio, Escola Superior de Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto.

Novembro de 2017

“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes.

Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objecto singular, um amigo – é fundamental.

Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda.”

Antoine de Saint-Ex

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Doutor João Rodrigues pela sua presença, apoio, disponibilidade, dedicação e por todo o conhecimento que me transmitiu. Obrigada pela confiança e por ter sempre acreditado comigo que chegar até aqui era possível.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Ricardo Ferraz pelo apoio, orientação e paciência. Também pelo espírito relaxado e descontraído que me foi transmitindo ao longo dos tempos. Todas as suas opiniões e críticas foram importantes na realização desta dissertação.

À Professora Doutora Cristina Prudência por todo o carinho e apoio. É sempre tão bom ouvir a positividade inerente às suas palavras.

Aos colegas que conheci neste mestrado, em especial à Maria, por esta caminhada juntas nas horas boas e naquelas mais difíceis.

Aos meus de sempre, Alexandra, Ana, Diogo, Flávio, Joana, Marisa, Ricardo e Sofia por me desculparem as ausências, por me ouvirem sempre e por estarem sempre lá, todos os dias.

À Marta, pela paciência, pelo conhecimento que me transmitiu, por todas as conversas. Uma parte também importante desta dissertação.

Por fim, àqueles que são os alicerces da minha vida, a minha família. Aos meus pais um especial obrigada por tornarem tudo isto possível. Obrigada por todo o amor, por toda a compreensão, todos os conselhos, apoio incondicional e orgulho que temos uns nos outros. Serão sempre o meu exemplo.

A todos, muito obrigada.

Resumo

O interesse acerca dos líquidos iônicos (LIs) tem crescido muito nos últimos anos e as suas áreas de aplicação têm vindo a ser alargadas, nomeadamente ao nível das ciências biológicas. A introdução de LIs nas áreas próximas da saúde ainda é recente e por isso há poucos estudos sobre a toxicidade e segurança dos LIs, o que causa alguma dificuldade da aplicação dos LIs nestas mesmas áreas. Os LIs são formados por um catião orgânico e um anião orgânico ou inorgânico e são estáveis acima do seu ponto de fusão. As suas estruturas e interações conferem-lhes propriedades únicas, potencialmente úteis em áreas como a indústria química, biotecnológica e farmacêutica.

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito de alguns LIs baseados em fármacos (LIs acoplados a Ingredientes Farmacêuticos Ativos) em diversos tipos de células, com complexidade crescente, nomeadamente, bactérias Gram-Positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-Negativas (*Escherichia coli*) - células procariontes, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (células eucariontes) e linhas tumorais humanas (HepG2 – cancro do fígado, MG63 – osteossarcoma, T47D – cancro da mama, A459 – cancro do pulmão e RKO – cancro do cólon).

Os compostos testados foram o ampicilinato de cetilpiridínio, o betulinato da primaquina, o betulinato da quinacrina, o betulinato do catião tri-hexiltetradecilfosfónio e o betulinato da cloroquina. Usaram-se sempre os fármacos para perceber em que medida os novos compostos melhoravam os existentes. Os compostos já existentes utilizados foram a ampicilina de sódio, o fosfato da primaquina, o fosfato de cloroquina, o cloreto de quinacrina e o cloreto de tri-hexil tetradecil fosfónio.

Para tal, foram utilizados métodos de caracterização da viabilidade celular adequados a cada modelo celular.

Os resultados deste estudo mostraram que dentro desta gama de líquidos iônicos se poderão encontrar compostos com potencial interesse no combate a infeções bacterianas e no combate ao cancro.

Palavras-chave: Líquidos Iónicos, Ingrediente Farmacêutico Ativo, Atividade Anti-tumoral

Abstract

The interest in ionic liquids (LIs) has been increasing in the last years and their areas of application have been extended, especially in the biological sciences. Still, there are few studies on the toxicity and safety of ILs, which causes some difficulty in the application of these in the areas closer to health. LIs are formed by an organic cation and an organic or inorganic anion and are stable above their melting point. Their structures and interactions give them unique properties, potentially useful in areas such as the chemical, biotechnology and pharmaceutical industry.

The aim of this work was to study the effect of some drug-based Ionic Liquids on several cell types, with increasing complexity, namely Gram-Positive – *Staphylococcus aureus* and Gram-Negative bacteria – *Escherichia coli* (prokaryotic cells), yeast - *Saccharomyces cerevisiae* (eukaryotic cells) and tumor lines (HepG2 (liver), MG63 (osteosarcoma), T47D (Breast), A459 (lung) and RKO (colon)).

The compounds tested were cetylpyridinium ampicillinate, primaquine betulinate, quinacrine betulinate, betulinate of the cation trihexyltetradecylphosphonium and betulinate of chloroquine. The active pharmaceutical ingredients were always used to understand how the new compound improve their characteristics. The compounds were sodium ampicillin, primaquine phosphate, chloroquine phosphate, quinacrine chloride and trihexyl tetradecyl phosphonium chloride

For this, methods of characterization of cell viability suitable for each cellular model were used.

The results of this study showed that within this range of ionic liquids, compounds with potential interest in combating bacterial infections and fighting cancer can be found.

Keywords: Ionic Liquids, Active Pharmaceutical Ingredients, Antitumor activity

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Lista de Abreviaturas.....	VII
Índice de Tabelas.....	VIII
Índice de Figuras.....	X

Parte I - Introdução

1.1.Enquadramento Temático.....	2
1.2.Líquidos Iônicos.....	2
1.3.Líquidos Iônicos como Ingredientes Farmacêuticos Ativos.....	5
1.4.Novos Agentes Antitumorais.....	6
1.4.1.Atividade Antitumoral dos Líquidos Iônicos.....	7
1.5.Antimaláricos.....	7
1.6.Antibacterianos – β -lactâmicos.....	8
1.7.Ácido Betulínico.....	9
1.8.Modelos de Estudo	
1.8.1.Bactérias.....	10
a. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
b. <i>Escherichia coli</i>	12
1.8.2. Levedura – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.8.3. Linhas tumorais humanas.....	13

Parte II – Objetivos

2.1.Objetivos.....	16
--------------------	----

Parte III – Materiais e Métodos

3.1.Materiais.....	18
3.1.1.Líquidos Iônicos.....	18

3.2.Métodos	
3.2.1.Estudo de bactérias e leveduras.....	22
3.2.1.1.Preparação das culturas.....	22
3.2.1.2. Preparação de soluções.....	23
3.2.1.3.Determinação da Concentração Mínima Inibitória(MIC).....	23
3.2.2.Estudo em linhas tumorais humanas.....	24
3.2.2.1.Viabilidade/proliferação celular.....	24
3.2.2.2.Determinação dos valores de concentração mínima inibitória.....	25
3.2.2.3.Caraterização do envolvimento de diferentes vias de sinalização na resposta celular.....	25
3.2.3.Análise Estatística.....	25

Parte IV – Resultados

4.1.Avaliação da citotoxicidade dos LIs derivados da cefuroxima em bactérias....	27
4.2.Avaliação da citotoxicidade dos LIs derivados de antimaláricos baseados no ácido betulínico em leveduras.....	27
4.3.Atividade Antitumoral dos LIs derivados de antimaláricos provenientes do ácido betulínico em culturas celular humanas.....	28
4.3.1.Determinação das curvas dose-efeito para diferentes LIs.....	28
4.3.2.Envolvimento das vias de sinalização celular importantes no comportamento celular.....	30

Parte V – Discussão

5.1. Avaliação da citotoxicidade dos LIs derivados da cefuroxima em bactérias....	50
5.2. Avaliação da citotoxicidade dos LIs derivados de β -lactâmicos e antimaláricos baseados no ácido betulínico na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50

5.3. Atividade antitumoral dos LIs derivados de antimaláricos provenientes do ácido betulínico em culturas celulares humanas.....	50
5.3.1. Bioatividade dos LIs das diversas linhas tumorais.....	51
5.3.2. Estrutura química dos compostos e relação com a sua bioatividade.....	51
5.3.3. Envolvimento das vias de sinalização importantes no comportamento celular das várias linhas estudadas.....	52
Parte VI – Conclusões e Perspetivas futuras.....	54
Parte VII – Referências Bibliográficas.....	56

Lista de Abreviaturas

A549	Linha celular humana de carcinoma do pulmão
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	Soro Bovino Fetal
IC50	Concentração máxima inibitória média
HepG2	Linha celular humana de carcinoma do fígado
IFAs	Ingredientes Farmacêuticos Ativos
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
LI-IFA	Líquido Iônico-Ingrediente Farmacêutico Ativo
LIs	Líquidos Iônicos
MEK	Metil-etil-cetona
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (concentração mínima inibitória)
MG63	Linha celular humana de osteossarcoma
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NFkB	Fator Nuclear Kappa B
RKO	Linha celular humana de carcinoma do cólon
RTILs	<i>Room Temperatura Ionic Liquids</i> (líquidos iônicos à temperatura ambiente)
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TSA	<i>Tryptic soy agar</i> , meio de cultura das bactérias
TSB	<i>Tryptic soy broth</i> , meio de cultura das bactérias
T47D	Linha celular humana de carcinoma da mama
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i> , meio de cultura da levedura

Índice de Tabelas

Tabela I	Propriedades físico-químicas dos LIs.....	4
Tabela II	LIs derivados da cefuroxima.....	18
Tabela III	LIs derivados de antimaláricos baseados no ácido betulínico.....	19
Tabela IV	LIs derivados da ampicilina.....	21
Tabela V	Estirpes bacterianas utilizadas no estudo.....	21
Tabela VI	Linhas tumorais testadas.....	22
Tabela VII	Inibidores utilizados e respetiva via de sinalização envolvida.....	25
Tabela VIII	Concentração Mínima Inibitória de cada composto para o <i>S.aureus</i>	27
Tabela IX	Concentração Mínima Inibitória de cada composto para a <i>E.coli</i>	27
Tabela X	Concentração Mínima Inibitória da <i>S.cerevisiae</i>	28
Tabela XI	Atividade Antitumoral (IC50), em μM , dos LIs nas diferentes linhas celulares no dia 1.....	28
Tabela XII	Atividade Antitumoral (IC50), em μM , dos LIs nas diferentes linhas celulares no dia 3.....	29
Tabela XIII	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de fibroblastos suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	32
Tabela XIV	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de RKO suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	35
Tabela XV	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de T47D suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	38
Tabela XVI	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de MG63 suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	41

Tabela XVII Viabilidade Celular (%) em culturas de células de A549 suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura44

Tabela XVIII Viabilidade Celular (%) em culturas de células de HepG2 suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....47

Índice de Figuras

Figura I	Aplicabilidade dos LIs.....	3
Figura II	Evolução dos LIs.....	5
Figura III	Estrutura da ampicilina.....	9
Figura IV	Estrutura da cefuroxima.....	9
Figura V	Estrutura do ácido betulínico.....	9
Figura VI	Procedimento das diluições.....	23
Figura VII	Resultados IC50 experimentais para o composto mais promissor no dia 3 do tratamento.....	29
Figura VIII	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de fibroblastos suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	31
Figura IX	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de RKO suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	34
Figura X	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de T47D suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	37
Figura XI	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de MG63 suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	40
Figura XII	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de A549 suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	43
Figura XIII	Viabilidade Celular (%) em culturas de células de HepG2 suplementados com diferentes inibidores de vias de sinalização e suplementados com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura.....	46

Parte I

Introdução

1.1. Enquadramento Temático

Os Líquidos Iônicos (LIs), são sais que são estáveis acima da sua temperatura de fusão. Uma definição mais restrita diz que os LIs são sais orgânicos que têm uma temperatura de fusão abaixo de 100°C (Dias, Costa-Rodrigues, Fernandes, Ferraz, & Prudêncio, 2017). Apesar de esta classe ter sido descoberta em 1914, só nas últimas décadas é que os mesmos têm merecido uma maior atenção por parte da comunidade científica (Hartmann, Petkovic, & Silva Pereira, 2016). As combinações possíveis entre aniões e catiões formam diferentes organizações estruturais com diferentes propriedades químicas. Uma das primeiras aplicações dos LIs foi a sua utilização como solventes onde demonstraram ser uma excelente alternativa aos solventes orgânicos mais tóxicos e perigosos, como os solventes halogenados (Hartmann et al., 2016). Neste momento estão a ser aplicados em diversas áreas, tais como a indústria química, farmacêutica e biotecnológica (Dias et al., 2017; Ferraz R, 2015).

Os LIs à medida que foram aparecendo e que foram encontrando novas aplicações foram agrupados em 3 gerações diferentes, sendo que a terceira geração é a mais recente e utiliza os Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs) na produção de LIs com a finalidade de terem atividade biológica (Dias et al., 2017; Ferraz et al., 2011). Estes LIs de terceira geração poderão ser uma mais valia para a indústria farmacêutica, nomeadamente devido à necessidade de terapias eficientes e inovadoras em várias áreas de intervenção clínica, nomeadamente em oncologia (Ferraz et al., 2011). Existem já na literatura alguns estudos que mostram que os LIs podem atuar como possíveis agentes terapêuticos nesse contexto (Kumar & Malhotra, 2009; Malhotra & Kumar, 2010).

Em suma, este projeto visou caracterizar a bioatividade de LIs derivados do ácido betulínico, antimaláricos e beta-lactâmicos em modelos procariotas (bactérias), modelos eucariotas simples (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) e em eucariotas superiores (linhas celulares tumorais humanas).

1.2. Líquidos Iônicos

Em relação à sua composição química, os LIs são formados por um catião orgânico e um anião orgânico ou inorgânico, cujas estruturas e interações lhes conferem propriedades únicas que são potencialmente úteis em áreas como a química orgânica, engenharia química, ciência dos materiais, biotecnologia, química analítica, eletroquímica e indústrias química e farmacêutica (figura I) (Cvjetko Bubalo et al., 2014; Florindo et al., 2013).



Figura 1 - Aplicabilidade dos LIs (adaptado de (Cvjetko Bubalo, Radošević, Radojčić Redovniković, Halambek, & Gaurina Srček, 2014)

Alguns LIs são líquidos à temperatura ambiente, sendo designados por Room Temperature Ionic Liquids (RTLIs), enquanto outros são designados por designer solvents, visto que podem ser produzidos de forma a serem solventes com algumas características pretendidas. Devido a esta propriedade podem funcionar como alternativas verdes ao uso de solventes orgânicos tóxicos (Ferraz et al., 2011; Ferraz R, 2015; Marsh, Boxall, & Lichtenthaler, 2004).

Inicialmente os LIs mereceram um destaque especial como uma possível alternativa ambiental aos clássicos solventes orgânicos, devido à sua baixa pressão de vapor, alta estabilidade térmica e condutividade iônica, e dissolução de uma grande gama de moléculas orgânicas e complexos de metais de transição (A. Costa et al., 2015).

São inúmeras as possibilidades de combinação de catião-anião, sendo assim possível ajustar as diferentes propriedades dos compostos projetando o LI ideal de acordo com os objetivos desejados (“designer solvents”) (Cvjetko Bubalo et al., 2014). Assim, os catiões são geralmente moléculas orgânicas constituídas por átomos carregados positivamente de nitrogênio, enxofre ou fósforo, enquanto que os aniões são espécies orgânicas ou

inorgânicas tais como halogenetos (Br^- , Cl^-), tetrafluoroborato (BF_4^-), hexafluorofosfato (PF_6^-), bis(trifluorometilsulfonil)imida ($(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$), acetato (CH_3CO_2^-) e dicianamida ($\text{N}(\text{CN})_2^-$) (Cyjetko Bubalo et al., 2014; Fan, Li, & Chen, 2014; Luís C. Branco, 2011).

Tabela I - Propriedades físico-químicas dos LIs (adaptado de (Gilmore, 2011))

Propriedade Físico-Química Líquidos Iônicos

Condutividade	Boa condutividade iónica em comparação com solventes orgânicos / sistemas de eletrólitos. Esta propriedade está inversamente relacionada com a viscosidade.
Viscosidade	Normalmente mais viscosa que os solventes moleculares comuns. A viscosidade é determinada pelas forças de van der Waals, pelas pontes de hidrogénio e pelo comprimento de cadeia de alquila no catião.
Densidade	Geralmente mais densos que a água
Ponto de Fusão	<100°C (numa definição mais restrita)
Solubilidade	Os LIs podem atuar tanto como aceitadores de ligação de hidrogénio (anião) como para dadores (catiões) e, portanto, interagem com substâncias com sítios de aceitação e de doação. Os LIs podem ser divididos em dois grupos (miscíveis em água e não miscíveis em água) de acordo com a sua solubilidade em água. A miscibilidade do LI em água é dependente da estrutura do catião.
Estabilidade Térmica	Elevada estabilidade térmica (alguns até temperaturas de 450°C).
Estabilidade Química	A maioria é estável em relação a substâncias orgânicas e inorgânicas.

Como já foi referido, desde que o primeiro LI foi sintetizado em 1914, houve vários desenvolvimentos nesta área o que levou à sua evolução, sendo agora possível enquadrá-los em três gerações distintas, de acordo com as suas propriedades e características e aplicações (figura II) (Ferraz et al., 2011; Hartmann et al., 2016).

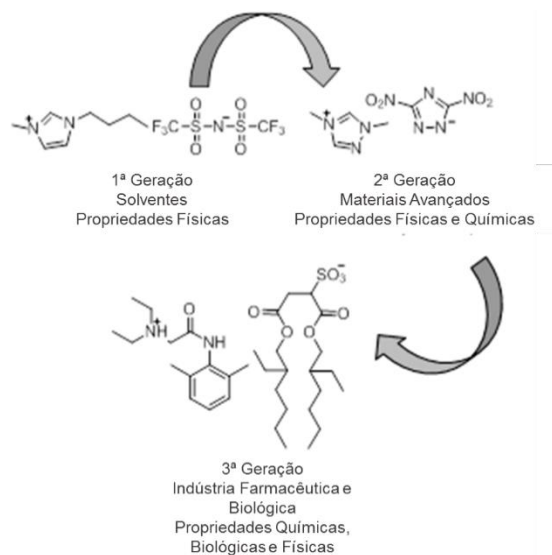


Figura II - Evolução dos LIs (Ferraz, Branco, Prudêncio, Noronha, & Petrovski, 2011)

A primeira geração de LIs baseia-se nas suas propriedades físicas, sendo que os LIs são agrupados de acordo com o ponto de fusão, densidade, viscosidade, estabilidade térmica, condutividade e hidrofobicidade e foram utilizados como solventes.

A segunda geração de LIs tem vindo a ser utilizada como materiais funcionais e tem em consideração as propriedades físicas e químicas. Assim sendo, existem LIs que funcionam como materiais energéticos, lubrificantes e agentes de complexação de iões metálicos. As suas características assentam na possibilidade de ajustar algumas das suas propriedades físicas e químicas através da modificação independente tanto do catião como do anião, sendo desenhados de modo a permitir a produção de novos materiais enquanto mantêm as principais propriedades do LI.

A terceira geração de LIs é a mais recente e baseia-se na utilização de IFAs para produzir LIs com atividade biológica, baseando-se por isso em propriedades físicas, químicas e biológicas (Ferraz et al., 2011).

1.3. Líquidos Iônicos como Ingredientes Farmacêuticos Ativos

Atualmente, a indústria farmacêutica está a enfrentar uma série de desafios, e o mais preocupante é a necessidade urgente de novos avanços científicos que visem a produção de medicamentos e terapias inovadoras e eficazes (Ferraz et al., 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, um IFA é definido como “qualquer substância ou combinação de substâncias num produto farmacêutico final, destinado a fornecer atividade farmacológica ou de outra forma ter efeito direto no diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção da doença, ou para ter um efeito direto na restauração, correção ou modificação das funções fisiológicas no ser humano” (Health, 2011). Os IFAs são atualmente utilizados maioritariamente na sua forma sólida, a qual está associada a diversos problemas, nomeadamente a sua conversão polimórfica, baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade para sólidos cristalinos, e a tendência para as formas amorfas cristalizarem espontaneamente (Dias et al., 2017).

A partir de 2007 começaram-se a utilizar diversas abordagens para produzir LIs contendo IFAs, sendo que posteriormente vários grupos de investigadores passaram a dedicar-se ao estudo desta classe de compostos (Florindo et al., 2013).

Neste contexto, os LIs são uma classe de compostos promissora que podem ajudar a enfrentar alguns dos problemas enfrentados pela indústria farmacêutica. Os LIs podem ajudar a melhorar algumas propriedades, como, a solubilidade, a biodisponibilidade, a estabilidade, ou a eliminação de polimorfismos. No contexto metabólico, os LIs têm várias características importantes: podem atuar como antioxidantes, proteger macromoléculas, regular o volume celular e modular diversas funções celulares (Dias et al., 2017).

Assim, do ponto de vista farmacêutico, os LIs com IFAs apresentam um elevado potencial de aplicabilidade, dado que poderão minimizar alguns dos efeitos relacionados com os IFAs no estado sólido.

1.4. Novos Agentes Anti tumorais

Atualmente a ocorrência de cancro está a aumentar devido a vários fatores, tais como o crescimento e envelhecimento populacional, bem como a crescente prevalência de fatores de risco como o tabagismo, o excesso de peso e a inatividade física. Como base nas estimativas da GLOBOCAN, em 2012 existiram em todo o mundo cerca de 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de óbitos (Torre et al., 2015).

Sendo um problema de saúde pública à escala global, com um impacto cada vez mais acentuado, é necessário investir no desenvolvimento de novos agentes anti-tumorais, que tenham como característica reduzir a toxicidade associada à quimioterapia e os mecanismos de resistência do tumor (Kumar & Malhotra, 2009).

1.4.1. Atividade Anti tumoral dos Líquidos Iônicos

O interesse global acerca dos LIs tem crescido muito nos últimos anos, resultando em alguns milhares de publicações que se baseiam neste tipo de compostos. Como os estudos são recentes ainda há pouca confiança na toxicidade e segurança dos LIs, o que dificulta a sua aplicabilidade na área da saúde. Quanto melhor entendermos a sua toxicidade melhor poderemos utilizar esse conhecimento a nosso favor. Assim, a toxicidade poderá ser essencial no desenvolvimento de novos fármacos (Kumar & Malhotra, 2009). No entanto, para que tal aconteça é crucial haver estudos detalhados sobre os efeitos concretos dessas substâncias nas células alvo.

Apenas cerca de 10% dos fármacos testados em ensaios clínicos conseguem chegar ao mercado, o que se traduz numa taxa de sucesso muito baixa. Estudos sobre os efeitos de LIs como agentes anti tumorais trouxeram novas perspectivas para o uso desta classe de compostos na oncologia. Vários estudos têm-se focado na atividade anti tumoral dos LIs: análise da sua toxicidade em relação às linhas celulares tumorais humanas e a comparação desses dados com linhas celulares humanas saudáveis (Dias et al., 2017; Ferraz et al., 2014; Kumar & Malhotra, 2009; Malhotra & Kumar, 2010). Os resultados obtidos têm sido promissores, mas atualmente são ainda muito escassos, pelo que se trata de uma área que necessita de mais estudos para poder ter uma aplicabilidade significativa no contexto clínico.

1.5. Antimaláricos

A malária tem sido uma preocupação para a saúde desde o início da Humanidade. Apesar de se terem feito grandes esforços para erradicar esta doença, em 2012 mais de meio milhão de pessoas morreram e um quarto de bilião foi infetada (Teixeira et al., 2014).

De modo a que novos fármacos antimaláricos chegassem a um maior número de pacientes, a solução encontrada foi reutilizar fármacos já conhecidos. Apesar de esta ser uma solução mais económica, existem outras, nomeadamente o resgate de moléculas bioativas conhecidas mas que não têm aplicação clínica e a reutilização de fármacos que estão a ser estudados noutra tipo de doenças (Teixeira et al., 2014).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo incorporar fármacos antimaláricos em LIs. Os compostos antimaláricos que foram utilizados neste estudo são derivados das famílias 4-aminoquinolina e 8-aminoquinolina.

1.6. Antibacterianos – β -Lactâmicos

De entre todas as classes de antibióticos, os β -lactâmicos são os mais utilizados em todo o Mundo. São constituídos por um anel β -lactâmico e inibem a síntese do peptidoglicano por ligação a um resíduo de serina existente no local ativo das proteínas de ligação covalente à penicilina (PBPs) (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015). Todas as espécies bacterianas têm o seu próprio conjunto distinto de PBPs cuja produção e montagem pode envolver de três a oito enzimas diferentes por espécie (Bradford, 2016).

A ampicilina (figura III), uma aminopenicilina derivada do ácido 6-aminopenicilânico, foi a primeira penicilina semi-sintética ativa contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Este composto foi isolado em 1957 e aprovado pela FDA na década de 1960 (Kaushik, Mohan, Borade, & Swami, 2014; Suleyman & Zervos, 2016). Tal como outros β -lactâmicos, a ampicilina atua na inibição de enzimas envolvidas na síntese da parede celular. A integridade da parede celular bacteriana é essencial para manter a forma da célula, bem como para garantir resistência a potenciais alterações ao potencial osmótico intra- e extracelular (Bonomo, 2017; Suleyman & Zervos, 2016).

A cefuroxima (figura IV) é uma cefalosporina de segunda geração com uma extensa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Este composto tem um efeito bactericida nas células por inibição das enzimas transpeptidase e carboxitranspeptidase que são importantes na biossíntese da parede celular (Gold & Rodriguez, 1983)

A síntese de LIs contendo β -lactâmicos antibacterianos é um processo bem caracterizado e simples, o que faz com que estes compostos sejam boas alternativas para a conceção de novos antibióticos. Já foram realizados vários estudos baseados nestes LIs, nomeadamente, LIs compostos por catiões nitrogenados heterocíclicos e aniões halogenados (Cole et al., 2011). Ferraz et al. também estudou o potencial de LIs baseados na ampicilina, nomeadamente o seu efeito anti-proliferativo em algumas linhas celulares tumorais (Ferraz et al., 2015), bem como a possibilidade de se utilizar contra bactérias resistentes (Ferraz et al., 2014) e a sua utilidade no desenvolvimento de novos materiais bioativos (Ferraz et al., 2012).

Em suma, a incorporação de antibacterianos em LIs apresenta potencial para melhorar o tempo de meia-vida, reduzir as taxas de dosagem, adaptar a biodisponibilidade e reduzir os custos associados à formulação e testes de novos fármacos (Cole et al., 2011).

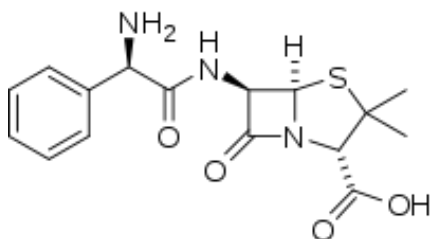


Figura IV - Estrutura da Ampicilina

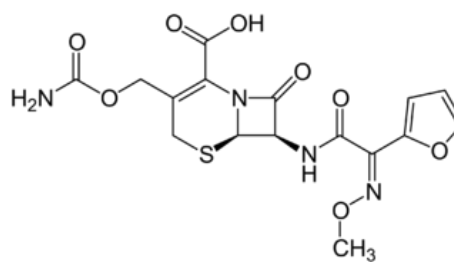


Figura III - Estrutura da Cefuxorima

1.7. Ácido Betulínico

O ácido betulínico (figura V) é um triterpenóide que pode ser obtido a partir de fontes renováveis. Este composto é citotóxico para várias linhas celulares tumorais humanas, principalmente através da ativação da apoptose, sendo que também pode desencadear a morte celular por vias não-apoptóticas. Como o ácido betulínico é pouco hidrossolúvel têm sido sintetizados derivados deste para melhorar a solubilidade e aumentar a sua citotoxicidade, assim como a seletividade para as células tumorais.

Globalmente, este composto tem variadas propriedades biológicas interessantes, nomeadamente o facto de ser anti-inflamatório, anti-HIV, anti-malárico, imunomodulador, anti-angiogénico, anti-fibrótico e hepatoprotetor. Adicionalmente, é citotóxico para algumas linhas tumorais como a do pulmão, ovário, neuroblastoma e glioblastoma. Do ponto de vista de mecanismo de atuação, ele induz a apoptose através de efeitos diretos na mitocôndria, levando à libertação do citocromo -c, o qual regula a ativação das caspases iniciadoras da via intrínseca da apoptose (Chakraborty et al., 2015; Csuk, 2014).

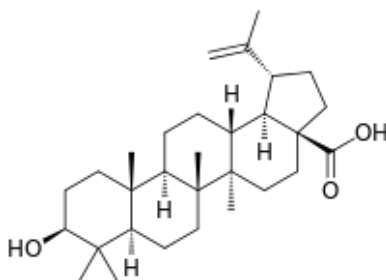


Figura V - Estrutura do Ácido Betulínico

1.8. Modelos de Estudo

1.8.1. Bactérias

As bactérias são seres procariotas. São unicelulares, isto é, são constituídas por uma única célula, porém podem apresentar diversos tamanhos e formas. Podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura, que pode variar desde cocos (esféricos) a bacilos (forma cilíndrica). Possuem, na sua constituição, ribossomas, citoplasma, nucleóide, flagelos, membrana celular e parede celular que é um componente muito relevante, uma vez que confere forma e proteção à bactéria. É através da parede celular que se faz a distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-negativas apresentam uma fina camada de peptidoglicano que se encontra entre a membrana interna e externa da parede celular, por sua vez, as bactérias Gram-positivas contêm uma camada espessa de peptidoglicano não possuindo assim membrana externa.

O crescimento bacteriano divide-se em quatro fases: fase de latência, em que há uma adaptação da bactéria ao meio; fase logarítmica, em que há um crescimento exponencial; fase estacionária, em que há paragem da divisão celular e conseqüentemente do crescimento bacteriano; fase de declínio em que as bactérias se encontram em processo de morte celular. O estudo do crescimento bacteriano, bem como da composição das bactérias, é importante pois auxilia na seleção do antibacteriano ou bactericida a utilizar/desenvolver (Gonçalves-Pereira & Póvoa, 2011; Kong, Schneper, & Mathee, 2010; Silhavy, Kahne, & Walker, 2010).

Os antibióticos, qualquer substância capaz de combater uma infecção causada por microrganismos que causam infecções a outro organismo, foram descobertos em 1928 por Alexander Fleming (Gonçalves-Pereira & Póvoa, 2011; Kong et al., 2010; Silhavy et al., 2010). O antibiótico pode ser bactericida ou bacteriostático, dependendo do seu modo de atuação, isto é, se causa a morte das bactérias ou se inibe a sua proliferação, respetivamente (Gonçalves-Pereira & Póvoa, 2011). Os antibióticos exploram as diferenças que existem na estrutura celular entre as células bacterianas (procariotas) e células animais e vegetais (eucariotas). Para tal, maioritariamente os antibióticos têm como alvo as paredes celulares bacterianas, o metabolismo dos ácidos nucleicos ou os ribossomas (KJ, 2007).

Na luta contra doenças bacterianas infecciosas, os antibióticos representam a classe de medicação mais eficaz que se encontra disponível. Contudo, a sua recorrente e, muitas vezes, incorreta utilização, levou ao desenvolvimento de resistências bacterianas o que

limita, consideravelmente a eficácia dos antibióticos assim como as opções terapêuticas disponíveis (Rasamiravaka & El Jaziri, 2016).

A resistência aos antibióticos é inevitável, no entanto, a velocidade à qual ocorre pode ser retardada. Esta resistência é um exemplo de micro-evolução, em que variações aleatórias no código genético de bactérias produzem uma vantagem evolutiva (KJ, 2007). De facto, as bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibióticos, mas também podem adquirir resistência através de mutações nos genes ou transferência horizontal de genes. A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana a um antibiótico particular é a capacidade de resistir à ação do antibiótico prescrito como resultado das características estruturais ou funcionais inerentes (Blair et al., 2015). Para além da resistência intrínseca, as bactérias podem adquirir ou desenvolver resistência, e esta pode ser mediada por vários mecanismos que podem ser classificados em três grupos principais: em primeiro lugar, aqueles que minimizam as concentrações intracelulares do antibiótico como um resultado de uma fraca penetração na bactéria ou de efluxo de antibiótico; em segundo lugar, aqueles que modificam o alvo do antibiótico por mutação genética ou modificação pós-translacional do alvo; e em terceiro lugar, aqueles que inativam o antibiótico por hidrólise ou modificação (Blair et al., 2015).

a. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que coloniza a pele, narinas e o trato gastrointestinal de seres humanos. É um agente patogénico que causa doenças invasivas, tais como, infeções cutâneas e de tecidos moles, pneumonia, osteomielite e endocardite (Kim, Missiakas, & Schneewind, 2014). A patogenicidade associada a esta bactéria é atribuída ao efeito combinado de fatores extracelulares e toxinas, em conjunto com as propriedades invasoras da estirpe, tais como a aderência, a formação do biofilme, e a resistência à fagocitose (Chessa, Ganau, & Mazzarello, 2015).

A resistência aos antibióticos desenvolvida pela *S. aureus* é mais notável em dois fármacos específicos, a vancomicina e a meticilina. A resistência à meticilina foi conseguida através da aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie. No caso da vancomicina, a resistência foi obtida através da transferência horizontal de um transposão do gene de resistência. O outro tipo de resistência à vancomicina é expresso pelo VISA, que é adquirido por mutações adaptativas incorporadas nos genes que codificam a regulação da fisiologia das células bacterianas (Hiramatsu et al., 2014).

b. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa e em forma de bastão pertencente à família Enterobacteriaceae que foi descrita em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich (Mainil, 2013). Esta bactéria é normalmente uma inofensiva bactéria comensal do intestino do ser humano e de outros animais. Apesar da sua inofensividade, também pode ser patogénica para os mesmos hospedeiros e causar doenças intestinais ou extra-intestinais.

Devido à sua dualidade de atuação e aos seus fenótipos, a *E.coli* é um modelo de organismo adequado para estudar a evolução e adaptação bacteriana a diferentes condições de crescimento (Leimbach, Hacker, & Dobrindt, 2013). A *E. coli* coloniza o intestino do bebé logo desde o nascimento e estabelece-se como o anaeróbio facultativo mais abundante da microbiota intestinal humana para o resto da vida (Leimbach et al., 2013).

De acordo com a síndrome clínica que estas bactérias podem causar, tem sido agrupadas em classes: *E. coli* enterotoxigénica, *E.coli* uropatogénica (UPEC), *E.coli* septicémica (SePEC), *E.coli* associada à meningite neonatal (NMEC), entre outros (Mainil, 2013).

As características peculiares da *E. coli*, como a facilidade de manipulação, a disponibilidade da sequência completa do genoma e sua capacidade de crescer sob condições aeróbicas e anaeróbicas, tornam-na num importante organismo hospedeiro na área da biotecnologia. É utilizada numa grande variedade de aplicações, tanto na área industrial como na área médica, sendo o microorganismo mais usado no campo da tecnologia de DNA recombinante (Allocati, Masulli, Alexeyev, & Di Ilio, 2013).

1.8.2. Levedura – *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é um microrganismo eucariota simples, geralmente utilizado como fermento no pão e na cerveja. É muito importante e utilizado em vários estudos científicos pois, para além de ser eucarionte, é de fácil cultivo e manipulação no laboratório (Grunstein & Gasser, 2013; Voordeckers & Verstrepen, 2015). Este foi o primeiro eucariota a ter o seu genoma completamente sequenciado e tem sido usado como modelo no estudo do controlo do ciclo celular, reparação de ADN, envelhecimento, expressão génica, autofagia, e vias moleculares e celulares relacionadas com diversas doenças humanas.

Os estudos com este microrganismo têm ajudado a revelar aspetos importantes de doenças como diabetes tipo 2 e síndrome de Werner's. Além disso, pode ser utilizado para

estudar características importantes do desenvolvimento de neoplasias, como a instabilidade cromossômica, aneuploidias e genes envolvidos na suscetibilidade ao cancro (Matuo et al., 2012).

1.8.3. Linhas Tumorais Humanas

O cancro é uma doença que atualmente afeta milhões de pessoas. A formação de cada tumor começa com a transformação de uma única célula saudável em maligna através de um processo carcinogénico complexo (Csuk, 2014).

O desenvolvimento tumoral compreende duas fases – a primeira é a fase de iniciação, caracterizada por alterações genéticas, ou seja mutações, no ADN das células em causa. A segunda fase é a etapa de progressão, na qual as células mutadas se começam a dividir descontroladamente no local de origem (tumor primário), a invadir os tecidos adjacentes (tumor invasivo), e a metastizar por via sanguínea ou linfática (tumores secundários ou metástases) (Peter Turnpenny). As mutações que conduzem à transformação neoplásica podem ser germinativas, ocorrem na meiose ao nível dos gâmetas e são transmitidas à descendência (cancro hereditário), ou podem ser somáticas, ocorrem na mitose ao nível das células somáticas e são transmitidas às células filhas (cancro esporádico) (Chen).

Relativamente aos fatores associados à tumorigénese, podem classificar-se em genéticos e não genéticos. Relativamente aos não genéticos, dá-se relevância para os carcinogénios químicos, tais como o tabaco, associado ao cancro do pulmão, cavidade oral, faringe, laringe e esófago, dado potenciar de forma direta e indireta a génese de mutações no ADN desses tecidos. Por outro lado, de entre os fatores genéticos associados ao desenvolvimento de tumores, um especial destaque deve ser dado para mutações em proto-oncogenes, que se transformam em oncogenes, para as mutações em genes supressores tumorais e para os tumores associados a fatores genéticos extrínsecos (vírus e bactérias) (Peter Turnpenny). Para ocorrer uma transformação maligna é necessário um conjunto de alterações profundas no fenótipo da célula, tais como, a auto-suficiência em estímulos de crescimento, insensibilidade aos estímulos inibidores, escape à apoptose, imortalização (devido à reativação da telomerase), promoção de neo-angiogénese e invasão e metastização (Peter Turnpenny).

Sendo um processo tão complexo, o conhecimento cada vez mais profundo sobre as vias de sinalização intracelulares envolvidas nas transformações neoplásicas tem facilitado a percepção dos fenómenos biológicos subjacentes ao aparecimento e desenvolvimento de

diversos tumores. As vias de sinalização, moduladas como resposta a um determinado estímulo, permitem a transdução de sinal de informações sobre o exterior da célula em informações de adaptação intracelular, onde, em última instância, se dá a regulação do material genético (Blüthgen & Legewie, 2013; Peter Turnpenny). São múltiplas as vias de sinalização que são importantes para a o comportamento tumoral. Nesse sentido, no presente trabalho foram estudadas algumas dessas vias de sinalização, nomeadamente as vias MEK, NFkB e JNK.

Parte II

Objetivos

2.1. Objetivos

Os objetivos estabelecidos para este estudo foram a caracterização da citotoxicidade dos LIs derivados do ácido betulínico, antimaláricos e β -lactâmicos em bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o estudo da atividade anti-tumoral dos LIs derivados dos mesmos compostos em culturas celulares humanas. Neste último objetivo, além da caracterização das curvas dose-efeito para os diferentes LIs, foi também analisado o envolvimento de algumas vias de sinalização intracelular importantes no crescimento e desenvolvimento tumoral.

Parte III

Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Todos os materiais utilizados foram fornecidos pela Escola Superior de Saúde do Porto e pela Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Todos os reagentes químicos usados no decorrer do trabalho laboratorial foram obtidos comercialmente, com exceção dos LIs analisados.

3.1.1. Líquidos Iônicos

Os LIs baseados no ácido betulínico e antimaláricos foram produzidos e purificados por Ricardo Ferraz e Ana Teresa Silva no grupo da Professora Paula Gomes do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (tabela III).

Os LIs baseados em antibióticos β -lactâmicos, foram produzidos e purificados pelo grupo do Luís C. Branco no Departamento de Química, Requitme – Centro de Química Fina e Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (tabela II e IV).

Tabela II - LIs derivados da cefuroxima (estudo realizado em bactérias)

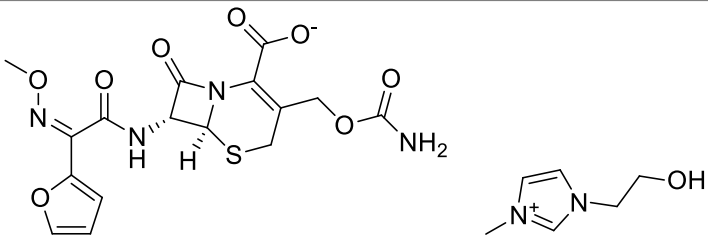
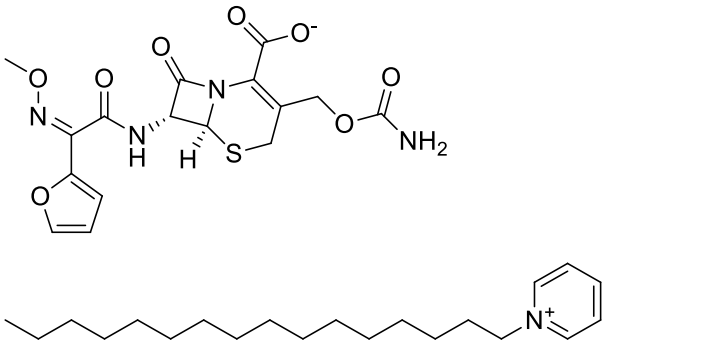
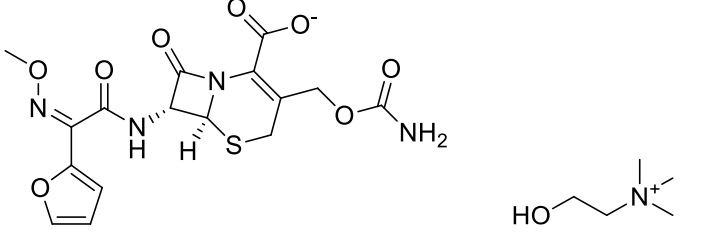
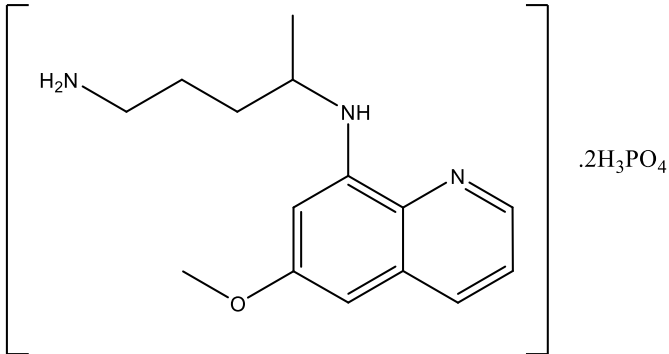
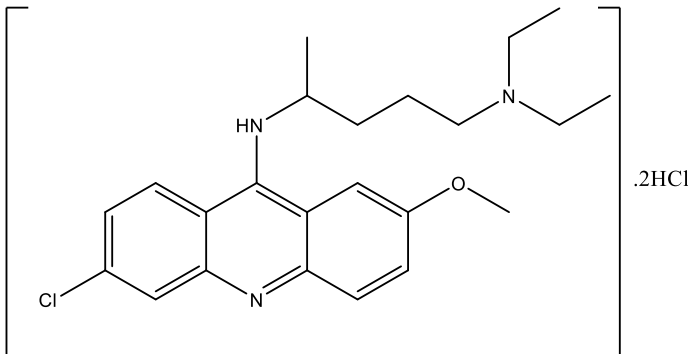
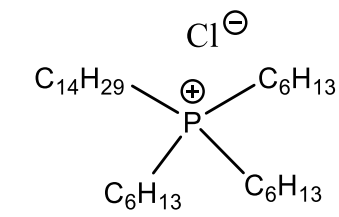
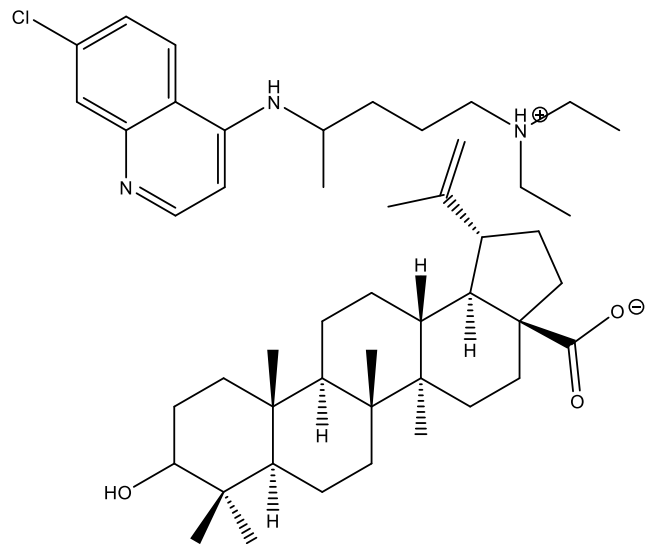
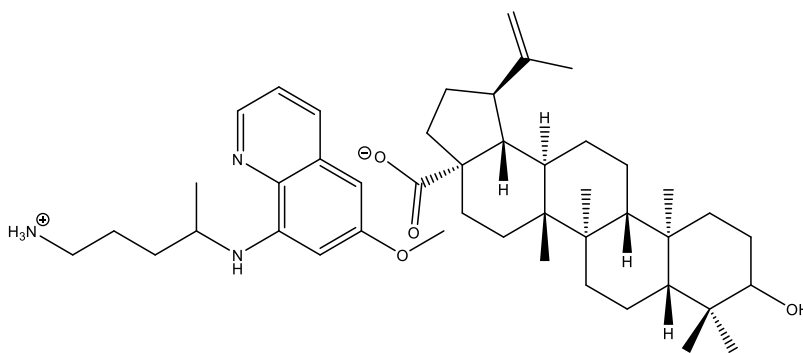
Compostos	Estrutura química
$[C_2OHMIM][CFX]$ $MM = 550,54 \text{ g.mol}^{-1}$	
$[C_{16}Pyr][CFX]$ $MM = 727,91 \text{ g.mol}^{-1}$	
$[Ch][CFX]$ $MM = 527,55 \text{ g.mol}^{-1}$	

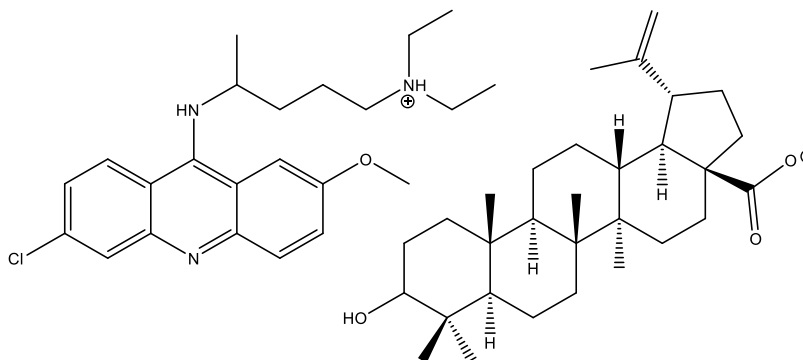
Tabela III - Lis derivados de antimetabólitos e derivados do ácido betulínico (estudo realizado em leveduras e células humanas)

Compostos	Estrutura química
<p>PQF $C_{15}H_{21}N_3O$ $MM = 259,35 \text{ g.mol}^{-1}$</p>	
<p>QCQ $C_{23}H_{31}Cl_2N_3O$ $MM = 436,42 \text{ g.mol}^{-1}$</p>	
<p>P₆₆₆₁₄Cl $C_{32}H_{68}ClP$ $MM = 519,320 \text{ g.mol}^{-1}$</p>	
<p>CQAB $C_{48}H_{74}ClN_3O_3$ $MM = 776,588 \text{ g.mol}^{-1}$</p>	

PQAB
 $C_{45}H_{69}N_3O_4$
 $MM = 716,06 \text{ g.mol}^{-1}$



QRAB
 $C_{53}H_{78}ClN_3O_4$
 $MM = 856,674 \text{ g.mol}^{-1}$



P₆₆₆₁₄AB
 $C_{62}H_{115}O_3P$
 $MM = 939,573 \text{ g.mol}^{-1}$

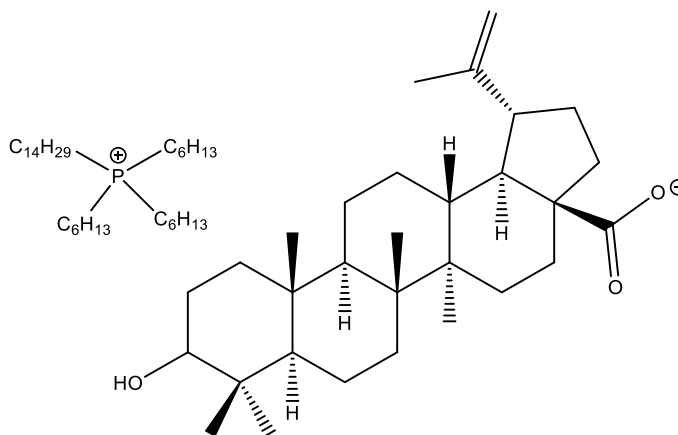
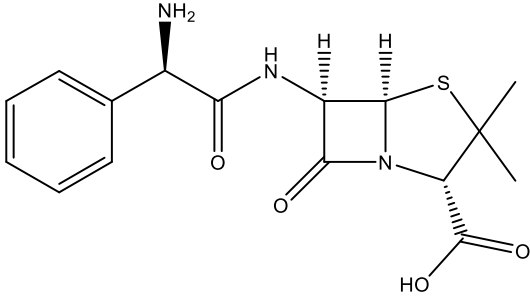
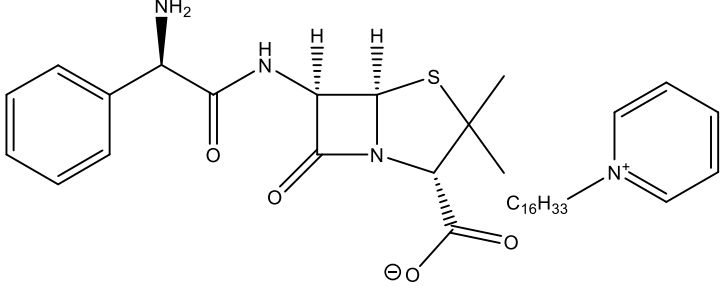


Tabela IV – Estrutura da ampicilina e LI derivado da ampicilina (estudo realizado em leveduras e células humanas)

Compostos	Estrutura química
<p>Amp $C_{16}H_{21}N_3O_2S$ $MM = 349,40 \text{ g.mol}^{-1}$</p>	
<p>AmpCetyl $C_{37}H_{56}N_4O_2S$ $MM = 652,94 \text{ g.mol}^{-1}$</p>	

As bactérias (tabela V) e a levedura utilizadas neste estudo pertencem à coleção das Ciências Químicas e das Biomoléculas da ESS. As linhas celulares (tabela VI) pertencem ao Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea – Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Tabela V - Estirpes bacterianas utilizadas no estudo

<i>Bactérias</i>	
Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Escherichia coli</i> CTX M2
	<i>Escherichia coli</i> CTX M9
Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA

Tabela VI - Linhas tumorais testadas

<i>Linhas tumoral</i>	<i>Neoplasia</i>
<i>RKO</i>	Carcinoma do Cólon
<i>HepG2</i>	Carcinoma hepatocelular
<i>MG63</i>	Osteossarcoma
<i>T47D</i>	Cancro da Mama
<i>A549</i>	Carcinoma pulmonar

3.2. Métodos

3.2.1. Estudo em bactérias e leveduras

Todo estudo em bactérias e leveduras foi baseado na NCCLS, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, com ligeiras alterações quando necessário (NCCLS, 2012).

3.2.1.1. Preparação das culturas

As bactérias foram cultivadas e mantidas em meio Tryptic Soy Agar (TSA -VWR®). Foram incubadas em ambiente aeróbio durante 24 horas a uma temperatura de 37° C, antes de cada teste (Estufa Binder®).

Sempre que necessário, o crescimento das bactérias foi feito em Tryptic Soy Broth (TSB - VWR®) a 37° C em estufas Incubating Orbital Shaker VWR®. As culturas foram sempre repicadas, de forma a garantir que, em todos os ensaios, as bactérias são provenientes de culturas frescas. De salientar que a manipulação das culturas foi sempre realizado sob a metodologia da técnica asséptica (W.B. Hugo, 1998).

As leveduras foram cultivadas em meio YEPD a 37°C em estufas Incubating Orbital Shaker VWR®. As culturas foram sempre repicadas, de forma a garantir que, em todos os ensaios, as leveduras sejam provenientes de culturas frescas. De salientar que a manipulação das culturas foi sempre realizada sob a metodologia da técnica asséptica. Foram incubadas em ambiente aeróbio durante 24 horas a uma temperatura de 37°C, antes de cada teste (Estufa Binder®). Quando necessário, o crescimento das leveduras foi realizado em meio YEPD sem agar.

3.2.1.2. Preparação de soluções

Foram preparadas soluções iniciais de 50 mM de cada um dos compostos em estudo. Devido às suas características químicas nem todos os LI são solúveis em água, assim sendo utilizou-se o dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente de todos os compostos. Após esterilização da solução pelo filtro de seringa de porosidade 0,2 μ m - VWR® e recorrendo sempre à técnica asséptica, prepararam-se concentrações consecutivamente 10x mais diluídas tal como representado na figura VI. As concentrações finais foram 50 mM, 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM. As soluções foram armazenadas no congelador a -20°C, sendo descongeladas à temperatura ambiente sempre que necessárias.

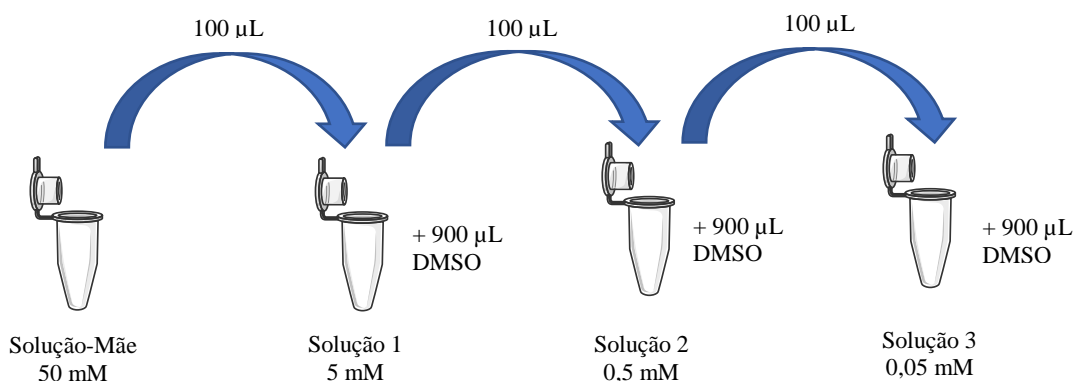


Figura VI - Procedimento das diluições

3.2.1.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Os valores de MIC foram determinados em triplicado, pelo método de microdiluição, utilizando placas de Elisa (96 poços de fundo plano), de acordo com a metodologia do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Seter, 2013).

Com o objetivo de obter uma suspensão de bactéria ou de levedura de densidade igual à da solução padrão McFarland 0,5, foram selecionadas colónias de leveduras ou bactérias através da repicagem das culturas frescas. As colónias selecionadas foram transferidas para tubos de ensaio que continham meio de cultura. O ajuste da densidade foi obtido por espectrofotometria, sendo que a absorvância para uma solução padrão McFarland 0,5, se encontra entre 0,08 e 0,10, a um comprimento de onda de 625 nm (Seter, 2013).

As suspensões resultantes deveriam ter entre 1×10^8 a 2×10^8 unidades formadoras de colónias (UFC) ml⁻¹. Aproximadamente 5000 a 25 000 UFC de bactérias é exposto ao composto (Ferraz et al., 2014).

Os LIs foram testados em 4 concentrações diferentes, 50 mM, 5 mM, 0,5 mM e 0,05 mM. Para além das concentrações já referidas, foram ainda incluídos, um controlo negativo

(suspensão de bactéria ou levedura e meio de cultura) e um branco (apenas meio de cultura).

O volume final em cada poço foi de 200µL. Em todos os ensaios, o volume de suspensão de bactéria ou de levedura (2µl) e de composto (2µl) manteve-se.

O MIC foi determinado como sendo a menor concentração que não apresentou turbidez após incubação (24h a 37°C) (Seter, 2013). A presença de turbidez dará indicação de crescimento da bactéria ou levedura e a correspondente concentração de LI-IFA é considerado ineficaz.

3.2.2. Estudo em linhas celulares humanas

A atividade anti-proliferativa dos LIs sintetizados foi estudada nas linhas celulares humanas de fibroblastos de gengiva, RKO, T47D, MG63, A549 e HepG2. Os diferentes tipos celulares foram mantidos em meio Eagle com modificação α (α -MEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), penicilina-estreptomicina (100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente) e anfotericina B (2,5 µg/mL). As células foram mantidas a 37°C numa incubadora com atmosfera humidificada com 5% de CO₂, sendo o meio de cultura renovado duas vezes por semana. Quando se atingiu um valor de confluência celular entre 70-80%, as células aderentes foram libertadas enzimaticamente com uma solução de tripsina 0,05%. Seguidamente, as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, a uma densidade de 10⁴ células/cm², e mantidas no mesmo meio de cultura descrito em cima. No dia seguinte, o meio de cultura foi renovado e suplementado com diferentes concentrações dos LIs (0,5 µM, 5 µM, 50 µM e 500 µM), e as células foram mantidas durante 3 dias. O comportamento celular foi caracterizado aos dias 0, 1 e 3 através da quantificação da viabilidade/proliferação celular.

3.2.2.1. Viabilidade/proliferação celular

Este parâmetro foi avaliado pelo ensaio colorimétrico com MTT aos dias 0, 1 e 3. Este ensaio baseia-se na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio num produto roxo, o formazano, em células viáveis. Para tal, as culturas foram incubadas a 37°C com 0,5 mg/mL de MTT durante 3 horas. Após isso, o meio de cultura foi removido; o produto da reação foi dissolvido com 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a determinação da absorvância foi feita a 550nm num leitor de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek). Os resultados foram expressos em absorvância.

3.2.2.2. Determinação dos valores de concentração mínima inibitória

Os valores da concentração mínima inibitória média (IC50) foram obtidos pela análise da regressão não linear das curvas de concentração-efeito. O valor de IC50 é a resposta correspondente a 50% do controlo, sendo utilizado para medir a eficácia do composto na inibição de qualquer função bioquímica ou biológica (S. P. F. Costa et al., 2014; Ferraz et al., 2015; R. F. M. Frade, Matias, Branco, Afonso, & Duarte, 2007; Sebaugh, 2011).

3.2.2.3. Caracterização do envolvimento de diferentes vias de sinalização na resposta celular

Após terem sido caracterizadas as curvas dose-efeito para cada LI, foi selecionada a concentração mínima de cada um que provocou um efeito significativo no comportamento celular. Foram efetuadas culturas celulares tratadas com os LIs nessas concentrações; adicionalmente, foram também adicionados ao meio de cultura diferentes inibidores de vias de sinalização (tabela VII) importantes para o comportamento neoplásico, de forma a caracterizar de que forma os LIs testados poderiam modular as mesmas. O comportamento celular foi avaliado aos dias 0, 1 e 3, através do ensaio da quantificação da viabilidade/proliferação celular descrito acima.

Tabela VII - Inibidores utilizados e respetiva via de sinalização envolvida

Inibidores	Via de Sinalização
<i>U0126</i>	MEK (Cinase ativada por mitogénicos)
<i>PDTC</i>	NFkB (Fator Nuclear Kappa B)
<i>SP600125</i>	JNK (Cinase c-Jun N-terminal)

3.2.3. Análise Estatística

Neste trabalho foram efetuadas 3 réplicas de cada análise e utilizou-se a estatística descritiva para analisar os resultados.

Parte IV

Resultados

4.1. Avaliação da citotoxicidade dos LIs derivados da cefuroxima em bactérias

No presente estudo foram avaliados, quanto à bioatividade em bactérias, 3 LIs baseados na cefuroxima, tal como apresentado na tabela II. Neste estudo determinaram-se os MICs de cada LI para cada uma das bactérias (tabela V). O resumo dos resultados é apresentado nas tabelas VIII e IX. As concentrações estudadas foram de 0,5 µM, 5 µM, 50 µM e 500 µM. Dos 3 LIs em estudo, o [C₁₆Pyr][CFX] não apresentou qualquer MIC dentro das concentrações e bactérias estudadas. Também se verificou que estes LIs apresentaram bioatividade tanto na bactéria Gram-positiva como na Gram-negativa.

Tabela VIII – Concentração Mínima Inibitória de cada composto para o *S.aureus*

<i>S.aureus</i>	[C ₂ OHMIM][CFX]	[C ₁₆ Pyr][CFX]	[Ch][CFX]
ATCC 6593	5 µM	Inconclusivo	5 µM
MRSA	50 µM	Inconclusivo	500 µM

Tabela IX - Concentração Mínima Inibitória de cada composto para a *E.coli*

<i>E.coli</i>	[C ₂ OHMIM][CFX]	[C ₁₆ Pyr][CFX]	[Ch][CFX]
ATCC 25922	50 µM	> 500 µM	5 µM
CTX M2	> 500 µM	> 500 µM	> 500 µM
CTX M9	500 µM	> 500 µM	> 500 µM

4.2. Avaliação da citotoxicidade de LIs derivados de antimetabólitos baseados no ácido betulínico em leveduras

Neste estudo foram avaliados, quanto à sua bioatividade na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, 10 LIs baseados na ampicilina (Amp e AmpCetyl – tabela IV) e em antimetabólitos derivados do ácido betulínico (tabela III). Foram determinados os MICs de cada LI, em que as concentrações variaram de forma igual às bactérias. Os resultados estão apresentados abaixo na tabela X.

De todos os LIs em estudo, apenas o P₆₆₆₁₄AB demonstrou ter bioatividade dentro das concentrações e na levedura estudada.

Tabela X - Concentração Mínima Inibitória da *S.cerevisiae*

<i>S. cerevisiae</i>	Concentração Mínima Inibitória
Amp	> 500 μ M
Amp Cetyl	> 500 μ M
PQF	> 500 μ M
QCQ	> 500 μ M
P ₆₆₆₁₄ Cl	> 500 μ M
CQAB	> 500 μ M
PQAB	> 500 μ M
QRAB	> 500 μ M
P ₆₆₆₁₄ AB	50 μ M

4.3. Atividade antitumoral dos LIs derivados de antimaláricos provenientes do ácido betulínico em culturas celulares humanas

4.3.1. Determinação das curvas dose-efeito para os diferentes LIs

As tabela XI e XII apresentam os resultados da atividade antitumoral (IC₅₀) dos LIs nas diferentes linhas celulares entre os dias 1 e 3 do estudo.

Tabela XI - Atividade antitumoral (IC₅₀), em μ M, dos LIs nas diferentes linhas celulares no dia 1

	Fibroblastos	RKO	T47D	MG63	A549	HepG2
Ác. Betulínico	51,49	11,31	12,83	6,667	nd	8,509
PQF	362,5	326,5	172,9	745,5	745,5	170,3
QCQ	14,91	10,90	16,15	17,43	16,14	16,10
P ₆₆₆₁₄ Cl	0,2312	2,729	nd	nd	nd	2,767
CQAB	10,76	13,67	18,4	18,2	15,86	14,4
PQAB	11,86	13,41	12,64	11,6	11,61	13,53
QRAB	13,19	15,97	13,17	15,81	nd	nd
P ₆₆₆₁₄ AB	125,3	60,71	95,02	149,0	132,5	45,37

IC₅₀ é a resposta correspondente a 50% do controlo. nd: IC₅₀ não detetado na gama de concentrações testadas.

^(a)Ácido betulínico foi utilizado como controlo

Tabela XII - Atividade antitumoral (IC50), em μM , dos LIs nas diferentes linhas celulares no dia 3

	Fibroblastos	RKO	T47D	MG63	A549	HepG2
Ác. Betulínico	24,38	17,70	11,74	11,74	6,242	16,02
PQF	145,3	118,1	22,82	48,33	215,3	106,7
QCQ	16,03	14,81	15,35	7,594	15,12	16,89
P ₆₆₆₁₄ Cl	nd	511,3	nd	nd	nd	nd
CQAB	11,9	15,33	14,59	11,64	10,11	12,34
PQAB	10,54	13,28	11,62	6,099	10,28	12,99
QRAB	nd	nd	11,41	5,302	nd	4,062
P ₆₆₆₁₄ AB	101,2	60,49	68,11	nd	18,78	16,78

IC50 é a resposta correspondente a 50% do controlo. nd: IC50 não detetado na gama de concentrações testadas.

^(a)Ácido betulínico foi utilizado como controlo

Analisando os valores para o dia 1, verifica-se que o ácido betulínico, utilizado como composto base para os restantes LIs, tem um comportamento mais antitumoral e, por isso, ideal, do que os restantes LIs, na medida em que apresenta um valor de IC50 mais elevado para os fibroblastos do que para as restantes linha celulares.

No dia 3 do estudo, o LI P₆₆₆₁₄AB apresenta maior toxicidade para as linhas celulares tumorais, em particular para a A549 e HepG2, pois genericamente o valor de IC50 aumentou no caso dos fibroblastos e diminuiu nas linhas celulares referidas.

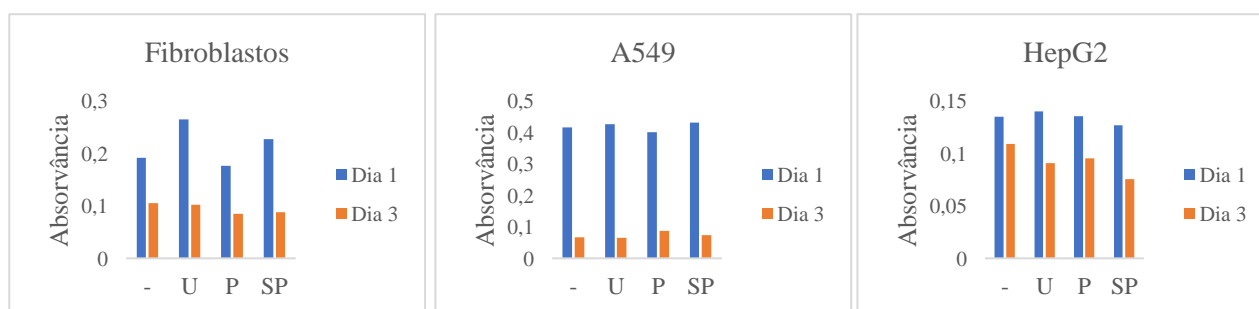


Figura VII - Resultados IC50 experimentais para o composto mais representativo, no dia 3 do tratamento. Os resultados foram obtidos a partir de três experiências em separado e cada ensaio foi realizado em triplicado. Os resultados são expressos em função da absorbância..

Na figura VII encontram-se apresentados os gráficos representativos do efeito do LI P₆₆₆₁₄Ab em culturas de fibroblastos, e nas linhas celulares A549 e HepG2.

4.3.2. Envolvimento das Vias de Sinalização Celular importantes no comportamento celular

Após terem sido determinados os valores de IC₅₀ para cada LI, procedeu-se a uma análise da capacidade que os mesmos têm de modular várias vias de sinalização importantes para o desenvolvimento neoplásico. Para tal, as culturas celulares foram simultaneamente tratadas com os LIs e com inibidores das vias de sinalização em estudo, e o comportamento celular foi avaliado através da análise da viabilidade/proliferação celular. As figuras VIII, IX, X, XI, XII e XIII, e as tabelas XIII, XIV, XV, XVI, XVII e XVIII apresentam os resultados dos três inibidores, no dia 1 e no dia 3, nas culturas celulares suplementadas com os LIs nas diferentes linhas celulares.

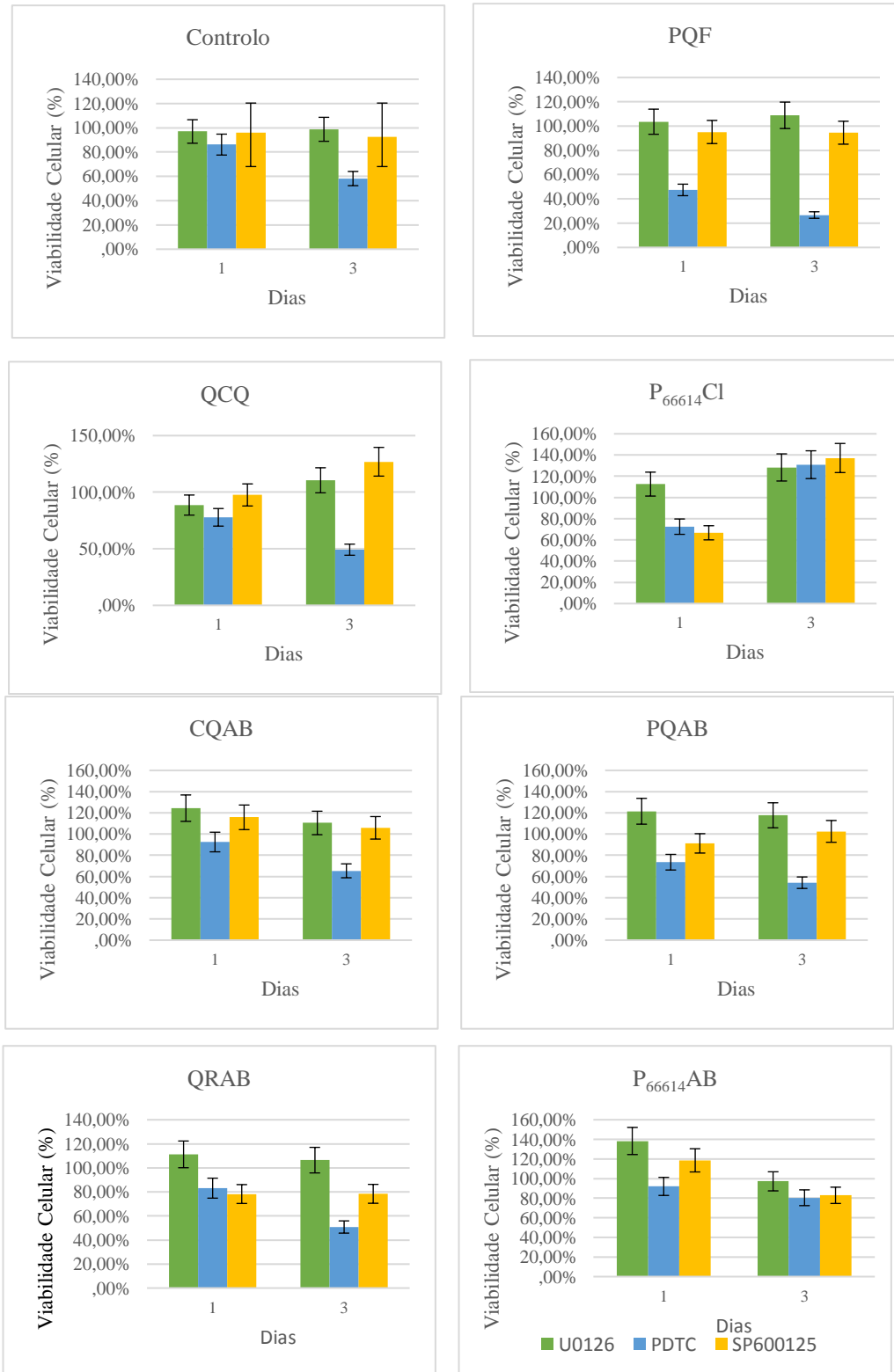


Figura VIII - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de fibroblastos suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

Tabela XIII - Viabilidade Celular (% em relação ao controlo) em culturas de células de fibroblastos suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

Fibroblastos			
Compostos	Vias	Dia 1	Dia 3
Controlo	U0126	97,0 %	98,8 %
	PDTC	86,2 %	58,2 %
	SP600125	96,1 %	92,4 %
PQF 50 µM	U0126	103,6 %	108,9 %
	PDTC	47,4%	26,7 %
	SP600125	95,1 %	94,5 %
QCQ 5 µM	U0126	88,6 %	110,5 %
	PDTC	77,8 %	49,2 %
	SP600125	97,6 %	126,9 %
P₆₆₆₁₄Cl 5 µM	U0126	112,6 %	128,3 %
	PDTC	72,5 %	130,9 %
	SP600125	66,7 %	137,2 %
CQAB 5 µM	U0126	124,4 %	110,5
	PDTC	92,5 %	65,4 %
	SP600125	115,8 %	105,9 %
PQAB 5 µM	U0126	121,5 %	117,7 %
	PDTC	73,5 %	54,2 %
	SP600125	91,2 %	102,5 %
QRAB 5 µM	U0126	111,2 %	106,4 %
	PDTC	83,1 %	50,8 %
	SP600125	78,2 %	78,4 %
P₆₆₆₁₄AB 50 µM	U0126	138,3 %	97,2 %
	PDTC	92,0 %	80,4 %
	SP600125	118,6 %	82,9 %

Relativamente à ausência de LI-IFA (controlo negativo), no dia 1 os valores de resposta para os 3 inibidores são muito próximos, com percentagens de inibição baixas. No dia 3 a resposta para os os inibidores U0126 e SP600125 não sofreu alterações significativas. A presença de PDTC promoveu uma diminuição significativa da viabilidade/proliferação celular do dia 1 para o dia 3.

Quando suplementadas as culturas com os compostos PQF e QCQ verificou-se que na presença dos inibidores U0126 e SP600125 a resposta celular dos fibroblastos não se

alterava significativamente. Por outro lado, a presença de PDTC levou a uma diminuição significativa da viabilidade/proliferação celular do dia 1 para o 3.

Com o composto P₆₆₆₁₄Cl, no dia 1 a resposta celular não foi afetada pelo inibidor U0126. Já com os inibidores PDTC e SP600125 verificou-se uma diminuição da viabilidade/proliferação celular. No dia 3 a resposta celular não foi inibida por nenhum dos três inibidores.

No caso do CQAB foi possível ter percepção que em ambos os dias a resposta celular não foi afetada pelos inibidores exceto pelo inibidor PDTC.

Quando as culturas foram suplementadas com o composto PQAB, apenas o inibidor PDTC afetou a resposta celular, tendo esta diminuído, no dia 1. Quando ao dia 3, o comportamento é similar ao controlo.

A presença de SP600125 promoveu uma diminuição significativa da viabilidade/proliferação celular no composto QRAB, no dia 1. No dia 3 a presença deste inibidor e do PDTC promoveu igual resposta celular.

O composto P₆₆₆₁₄AB promoveu uma resposta semelhante ao controlo.

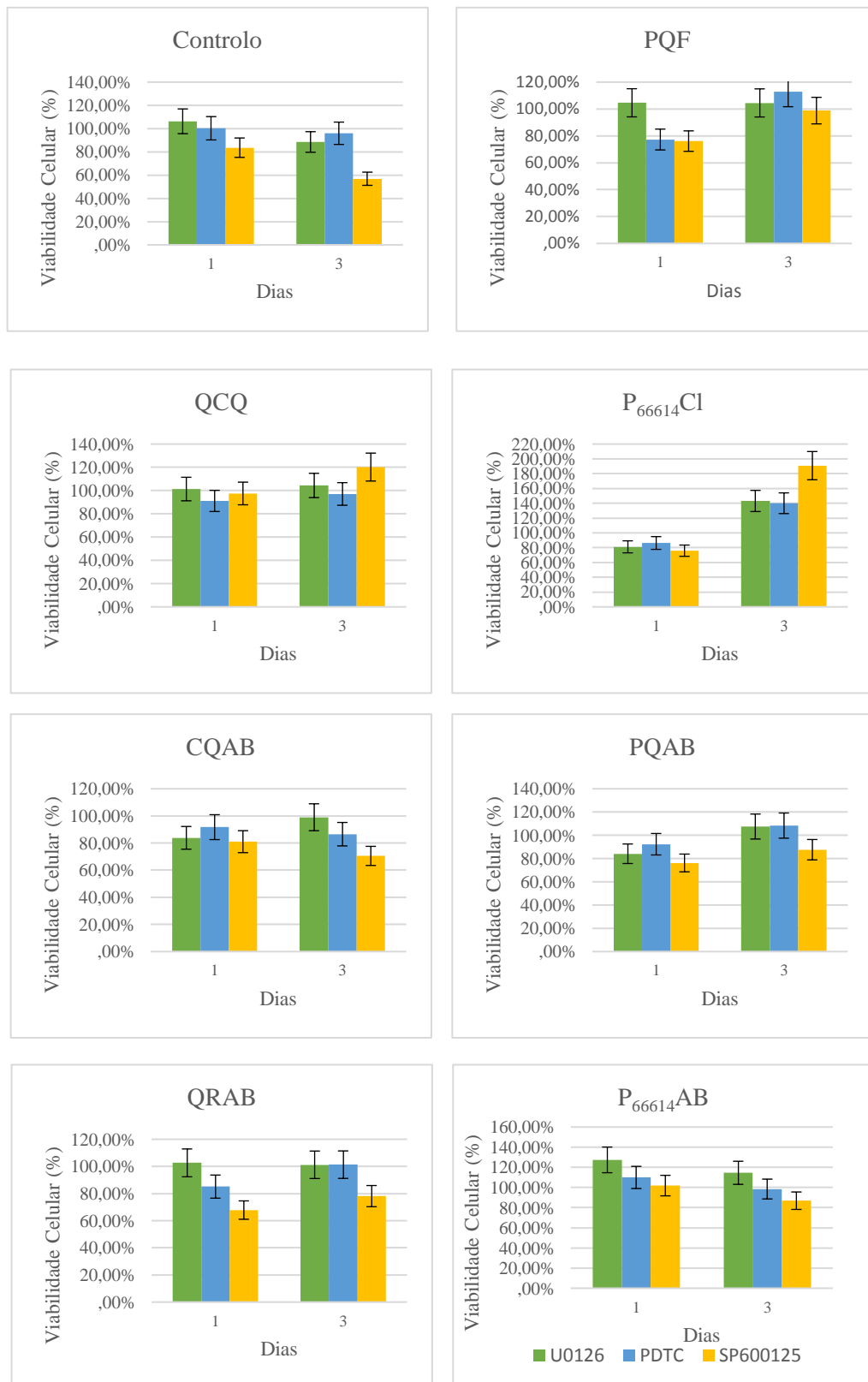


Figura IX - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de RKO suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

Tabela XIV - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de RKO suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

RKO			
Compostos	Vias	Dia 1	Dia 3
Controlo	U0126	106,3 %	88,5 %
	PDTC	100,3 %	96,0 %
	SP600125	83,6 %	56,9 %
PQF 50 µM	U0126	104,6 %	104,5 %
	PDTC	77,3 %	113,0 %
	SP600125	76,1 %	98,8 %
QCQ 5 µM	U0126	101,3 %	104,4 %
	PDTC	91,1 %	97,1 %
	SP600125	97,5 %	120,2 %
P₆₆₆₁₄Cl 5 µM	U0126	81,1 %	143,1 %
	PDTC	86,3 %	140,0 %
	SP600125	75,9 %	190,8 %
CQAB 5 µM	U0126	83,8 %	99,0 %
	PDTC	91,7 %	86,5 %
	SP600125	81,0 %	70,5 %
PQAB 5 µM	U0126	84,1 %	107,5 %
	PDTC	92,3 %	108,3 %
	SP600125	76,2 %	87,6 %
QRAB 5 µM	U0126	102,6 %	101,2 %
	PDTC	85,1 %	101,3 %
	SP600125	67,8 %	78,1 %
P₆₆₆₁₄AB 50 µM	U0126	127,4 %	114,6 %
	PDTC	110,0 %	98,5 %
	SP600125	101,9 %	86,9 %

Relativamente ao controlo verificou-se que os inibidores U0126 e PDTC não interferiam na resposta celular, ao contrário do inibidor SP600125 que provocou uma diminuição da viabilidade/proliferação celular do dia 1 para o dia 3.

Quando as culturas foram suplementadas com PQF logo no dia 1, os inibidores PDTC e SP600125 diminuíram a viabilidade/proliferação celular. No dia 3 não se verificou qualquer efeito inibitório.

Na presença do composto QCQ o comportamento celular foi semelhante ao controlo.

Com o composto P₆₆₆₁₄Cl, no dia 1 a resposta celular foi afetada pelos três inibidores, principalmente pelo SP600125. No dia 3 a resposta celular não foi afetada por nenhum dos três inibidores.

Com o CQAB verificou-se que, do dia 1 para o dia 3, houve uma diminuição da viabilidade/proliferação celular com os inibidores PDTC e SP600125.

O composto PQAB apresentou resultados inibitórios para os 3 inibidores no dia 1. No dia 3 a resposta celular não foi afetada por nenhum dos inibidores.

Quando as culturas foram suplementadas com o LI-IFA QRAB verificou-se que o inibidor SP600125 foi o que provocou maior inibição da viabilidade/proliferação celular.

Por último, o composto P₆₆₆₁₄AB não foi relevante neste estudo pois não apresentou uma resposta inibitória significativa.

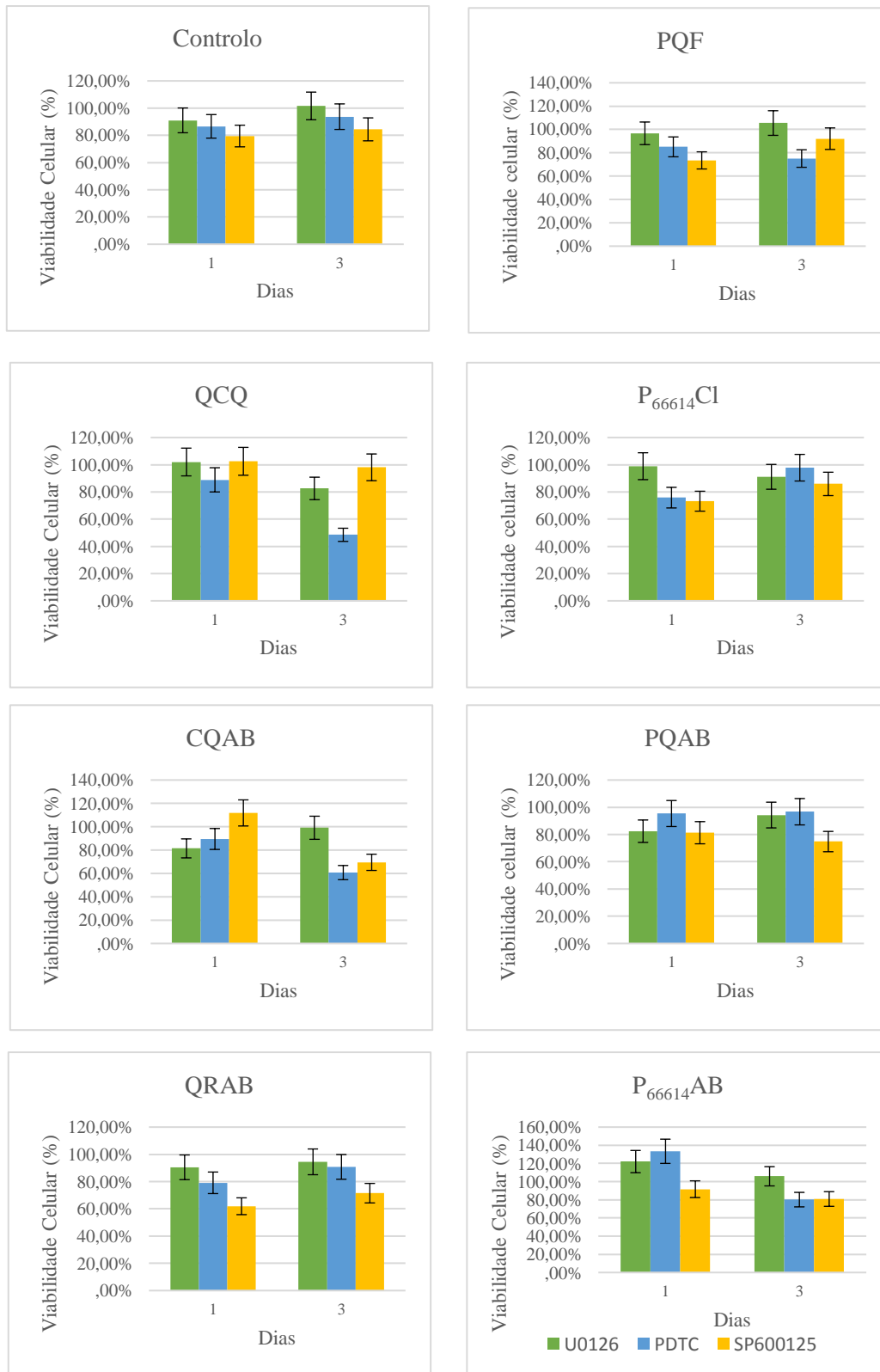


Figura X - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de T47D suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

Tabela XV - - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de T47D suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

T47D			
Compostos	Vias	Dia 1	Dia 3
Controlo	U0126	91,0 %	101,6 %
	PDTC	86,6 %	93,7 %
	SP600125	79,5 %	84,4 %
PQF 50 µM	U0126	96,7 %	105,5 %
	PDTC	85,1 %	75,1 %
	SP600125	73,5 %	92,1 %
QCQ 5 µM	U0126	102,0 %	82,6 %
	PDTC	88,9 %	48,5 %
	SP600125	102,5 %	98,1 %
P₆₆₆₁₄Cl 5 µM	U0126	98,9 %	91,1 %
	PDTC	75,8 %	97,8 %
	SP600125	73,2 %	85,9 %
CQAB 5 µM	U0126	81,4 %	99,1 %
	PDTC	89,5 %	60,7 %
	SP600125	111,8 %	69,5 %
PQAB 5 µM	U0126	82,4 %	94,3 %
	PDTC	95,4 %	96,7 %
	SP600125	81,3 %	74,8 %
QRAB 5 µM	U0126	90,5 %	94,5 %
	PDTC	79,1 %	90,8 %
	SP600125	61,9 %	71,5 %
P₆₆₆₁₄AB 50 µM	U0126	122,1 %	105,9 %
	PDTC	133,4 %	80,2 %
	SP600125	91,7 %	80,9 %

Relativamente ao controlo verificou-se que os três inibidores promoveram uma maior resposta inibitória no dia 1.

O composto PQF promoveu uma diminuição da viabilidade/proliferação na presença do inibidor PDTC, do dia 1 para o dia 3.

Quando as culturas foram suplementadas com QCQ, os inibidores PDTC e SP600125 diminuíram a viabilidade/proliferação celular do dia 1 para o dia 3.

Com os compostos P₆₆₆₁₄Cl e QRAB, em ambos os dias, o inibidor que mostrou uma resposta inibitória foi o SP600125.

Com o CQAB e o P₆₆₆₁₄AB verificou-se que, do dia 1 para o dia 3, houve uma diminuição da viabilidade/proliferação celular com os inibidores PDTC e SP600125.

As culturas celulares tratadas com o composto PQAB apresentou resultados inibitórios para o inibidor SP600125.

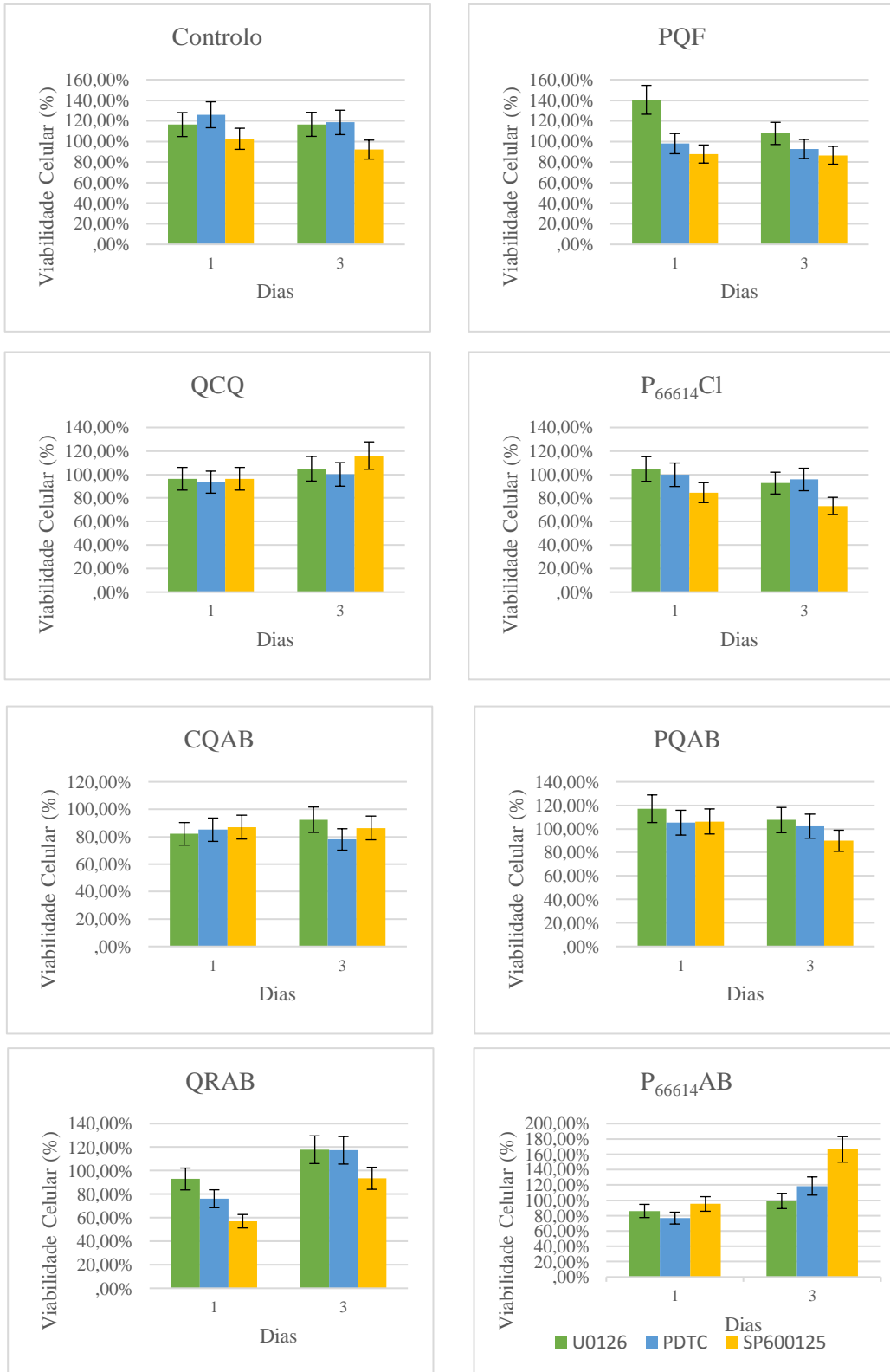


Figura XI - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de MG63 suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

Tabela XVI - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de MG63 suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

MG63			
Compostos	Vias	Dia 1	Dia 3
Controlo	U0126	116,4 %	116,6 %
	PDTC	125,9 %	118,5 %
	SP600125	102,6 %	92,1 %
PQF 50 µM	U0126	140,4 %	107,8 %
	PDTC	97,9 %	92,7 %
	SP600125	87,8 %	86,6 %
QCQ 5 µM	U0126	96,4 %	104,9 %
	PDTC	93,5 %	100,1 %
	SP600125	96,4 %	116,1 %
P₆₆₆₁₄Cl 5 µM	U0126	104,7 %	92,7 %
	PDTC	99,8 %	95,8 %
	SP600125	84,6 %	73,3 %
CQAB 5 µM	U0126	82,1 %	92,4 %
	PDTC	85,1 %	78,0 %
	SP600125	87,0 %	86,4 %
PQAB 5 µM	U0126	117,1 %	107,5 %
	PDTC	105,3 %	102,3 %
	SP600125	106,3 %	89,9 %
QRAB 5 µM	U0126	92,9 %	117,8 %
	PDTC	76,1 %	117,3 %
	SP600125	57,0 %	93,5 %
P₆₆₆₁₄AB 50 µM	U0126	86,1 %	99,1 %
	PDTC	76,8 %	118,6 %
	SP600125	95,2 %	166,4 %

Relativamente à ausência de LI-IFA (controlo negativo) e ao composto QCQ, no dia 1 e no dia 3 os valores de resposta para os 3 inibidores são muito próximos, sendo que nenhum apresenta uma resposta inibitória em qualquer um dos dias.

Quando suplementadas as culturas com os compostos PQF verificou-se que na presença dos inibidores PDTC e SP600125 a resposta celular do MG63 contribuiu significativamente para a diminuição da viabilidade/proliferação celular em ambos os dias.

Com o composto P₆₆₆₁₄Cl, houve uma diminuição da viabilidade/proliferação celular, com o inibidor SP600125, do dia 1 para o dia 3.

No caso do CQAB foi possível verificar que em ambos os dias a resposta celular é afetada pelos 3 inibidores,

Quando as culturas foram suplementadas com o composto PQAB, apenas o inibidor SP600125 afetou a resposta celular, tendo esta diminuído do dia 1 para o dia 3.

No composto QRAB, no dia 1, as culturas com os inibidores PDTC e SP600125 obtiveram resposta celular no sentido da diminuição da viabilidade celular. Já no composto P₆₆₁₄AB, obteve-se a mesma resposta, para o mesmo dia, mas com os inibidores U0126 e PDTC.

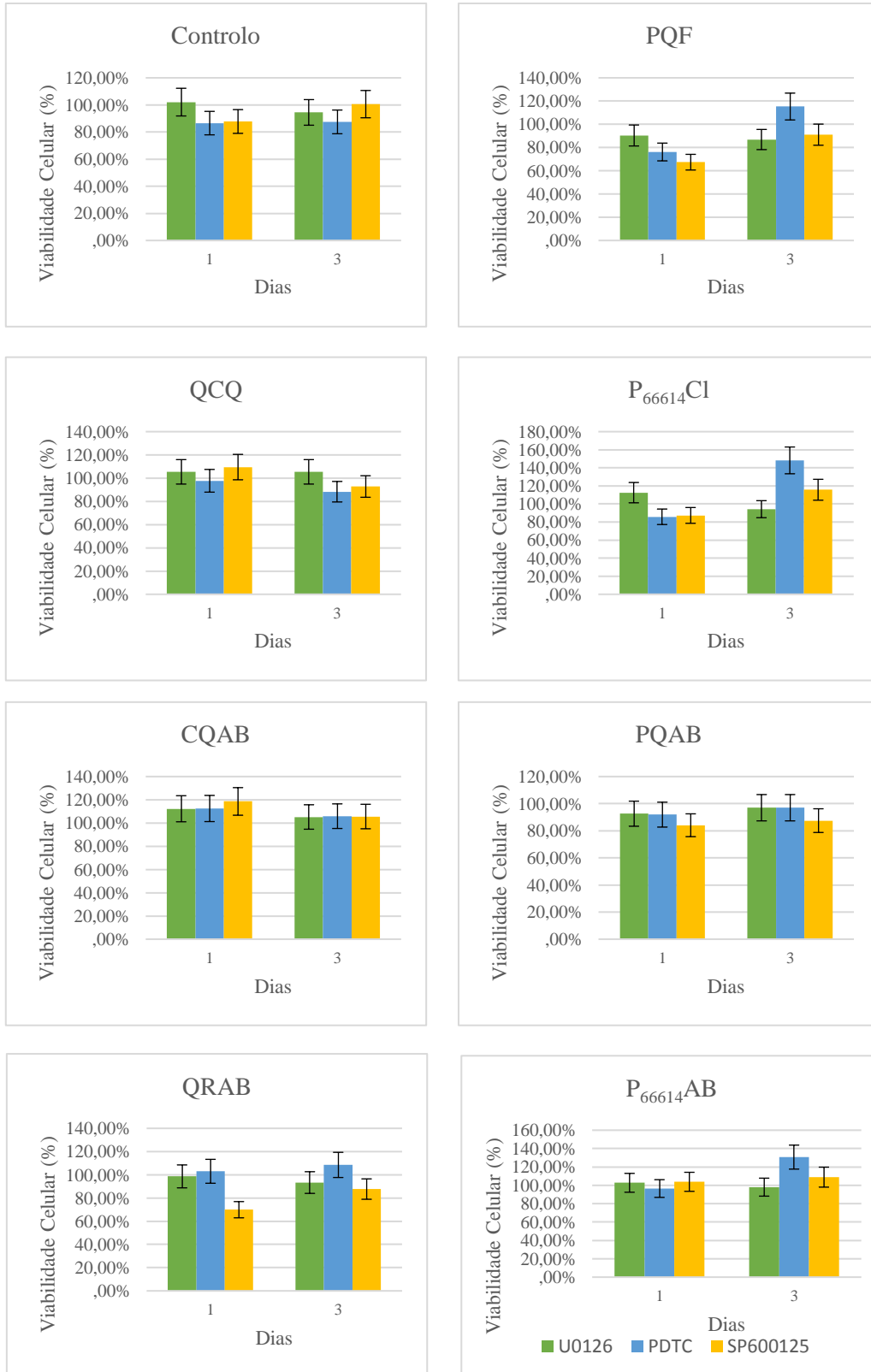


Figura XII - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de A549 suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

Tabela XVII - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de A549 suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

A549			
Compostos	Vias	Dia 1	Dia 3
Controlo	U0126	102,1 %	94,5 %
	PDTC	86,6 %	87,5 %
	SP600125	87,8 %	100,6 %
PQF 50 µM	U0126	90,4 %	86,9 %
	PDTC	76,2 %	115,3 %
	SP600125	67,4 %	91,1 %
QCQ 5 µM	U0126	105,4 %	105,4 %
	PDTC	97,7 %	88,3 %
	SP600125	109,5 %	92,8 %
P₆₆₆₁₄Cl 5 µM	U0126	112,5 %	94,2 %
	PDTC	85,8 %	148,2 %
	SP600125	87,3 %	115,7 %
CQAB 5 µM	U0126	112,3 %	105,2 %
	PDTC	112,5 %	105,9 %
	SP600125	118,6 %	105,6 %
PQAB 5 µM	U0126	92,6 %	97,0 %
	PDTC	91,9 %	97,0 %
	SP600125	84,1 %	87,5 %
QRAB 5 µM	U0126	98,6 %	93,3 %
	PDTC	103,0 %	108,5 %
	SP600125	69,9 %	87,7 %
P₆₆₆₁₄AB 50 µM	U0126	102,7 %	98,0 %
	PDTC	96,5 %	130,7 %
	SP600125	103,8 %	108,9 %

Relativamente à ausência de LI-IFA (controlo negativo) e as compostos CQAB e P₆₆₆₁₄AB, no dia 1 e no dia 3 os valores de resposta para os 3 inibidores são muito próximos, sendo que nenhum apresenta uma resposta inibitória em qualquer um dos dias.

Quando suplementadas as culturas com os compostos PQF verificou-se que na presença dos inibidores PDTC e SP600125 a resposta celular do A549 contribuiu significativamente

para a diminuição da viabilidade/proliferação celular no dia 1. Sendo que no dia 3, o inibidor mais importante foi o U0126.

Com o composto P₆₆₆₁₄Cl, houve baixa viabilidade/proliferação celular, com os inibidores PDTC e SP600125, no dia 1.

No caso do CQAB foi possível verificar que em ambos os dias a resposta celular é afetada pelos 3 inibidores,

Quando as culturas foram suplementadas com o composto PQAB, apenas o inibidor SP600125 afetou a resposta celular, sendo esta diminuída tanto no dia 1 e no dia 3 comparativamente ao controlo e aos outros inibidores.

No composto QRAB, no dia 1, as culturas com o inibidor SP600125 obteve resposta celular no sentido da diminuição da viabilidade celular, no dia 1.

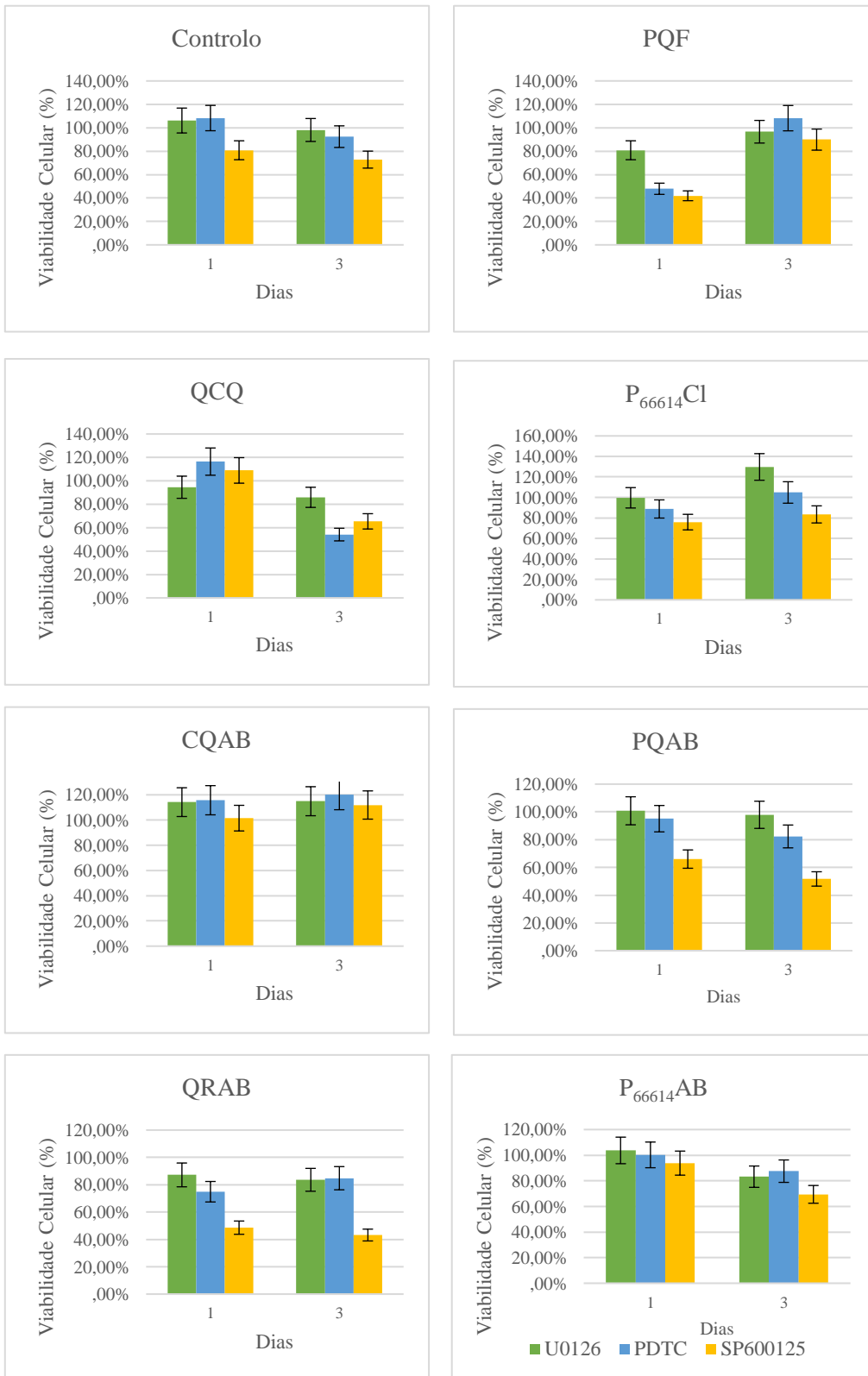


Figura XIII - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de HepG2 suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

Tabela XVIII - Viabilidade Celular (%) em culturas de células de HepG2 suplementadas com diferentes inibidores de vias de sinalização celular e suplementadas com diferentes LIs, durante 3 dias de cultura

HepG2			
Compostos	Vias	Dia 1	Dia 3
Controlo	U0126	106,2 %	98,1 %
	PDTC	108,3 %	92,4 %
	SP600125	80,8 %	72,8 %
PQF 50 µM	U0126	80,8 %	96,6 %
	PDTC	47,9 %	108,2 %
	SP600125	41,9 %	89,9 %
QCQ 5 µM	U0126	94,5 %	85,9 %
	PDTC	116,4 %	54,1 %
	SP600125	108,9 %	65,4 %
P₆₆₆₁₄Cl 5 µM	U0126	99,6 %	129,7 %
	PDTC	88,7 %	104,8 %
	SP600125	75,9 %	83,4 %
CQAB 5 µM	U0126	114,2 %	114,9 %
	PDTC	115,7 %	120,2 %
	SP600125	101,5 %	111,9 %
PQAB 5 µM	U0126	100,8 %	97,9 %
	PDTC	95,1 %	82,3 %
	SP600125	66,0 %	51,7 %
QRAB 5 µM	U0126	87,2 %	83,6 %
	PDTC	74,9 %	84,8 %
	SP600125	48,6 %	43,2 %
P₆₆₆₁₄AB 50 µM	U0126	103,7 %	83,2 %
	PDTC	100,2 %	87,5 %
	SP600125	93,8 %	69,4 %

Relativamente ao controlo verificou-se que os inibidores U0126 e PDTC não interferiam na resposta celular, ao contrário do inibidor SP600125 que provocou uma diminuição da viabilidade/proliferação celular do dia 1 para o dia 3.

Quando as culturas foram suplementadas com PQF logo no dia 1, os inibidores PDTC e SP600125 diminuíram a viabilidade/proliferação celular. No dia 3 não se verificou qualquer efeito inibitório.

O composto QCQ teve um comportamento similar ao PQF, mas no dia 3.

Com o composto P₆₆₆₁₄Cl, no dia 1 a resposta celular foi afetada pelo inibidor SP600125.

O composto CQAB não se mostrou relevante neste estudo.

Com o PQAB verificou-se que, do dia 1 para o dia 3, houve uma diminuição da viabilidade/proliferação celular com o inibidor SP600125.

Quando as culturas foram suplementadas com o LI-IFA QRAB verificou-se que o inibidor SP600125 foi o que provocou maior inibição da viabilidade/proliferação celular.

Por último, o composto P₆₆₆₁₄AB promoveu uma diminuição da viabilidade/proliferação celular no dia 3, na presença dos inibidores U0126 e SP600125.

Parte V

Discussão

5.1. Avaliação da citotoxicidade dos LIs derivados da cefuroxima em bactérias

A escolha das bactérias para este estudo não foi aleatória, foi realizada uma pesquisa bibliográfica que indicou que as estirpes resistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são as que causam mais preocupação na comunidade médica e científica (Control., 2015).

No fim deste estudo, analisando os resultados obtidos, verificou-se que no *S.aureus* os compostos [C₂OHMIM][CFX] e [Ch][CFX] tinham atividade pois foi possível determinar o seu MIC. Já na bactéria *E.coli* o composto [C₂CHMIM][CFX] foi ativo na estirpe sensível e na resistente CTX M9, por sua vez o composto [Ch][CFX] foi ativo apenas na estirpe sensível. Conclui-se então que o composto [C₁₆Pyr][CFX] não tem atividade em ambas as bactérias, em todas as suas estirpes estudadas.

A atividade antimicrobiana dos LIs encontrou-se quando, a determinada concentração, a presença dos compostos inibiram o crescimento, que se traduziu na ausência de turbidez no ensaio de microdiluição após 24 h a 37 °C.

5.2. Avaliação da citotoxicidade de LIs derivados de β-lactâmicos e de antimaláricos baseados no ácido betulínico na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O interesse em estudar a levedura surgiu do facto de esta ser um modelo eucarionte mais simples que o ser humano e assim ter uns resultados preliminares daquilo que se poderia esperar no estudo com linhas celulares.

O resultado obtido foi de que o único composto com atividade foi o P₆₆₆₁₄AB. Todos os outros tiveram um MIC superior ao intervalo de concentrações estudado.

A atividade dos LIs determinou-se de igual modo das bactérias.

5.3. Atividade antitumoral dos LIs derivados de antimaláricos provenientes do ácido betulínico em culturas celulares humanas

Neste estudo foram utilizadas cinco linhas celulares tumorais (RKO, T47D, MG63, A549 e HepG2), como modelos de estudo in vitro para se poder caracterizar o efeito de vários compostos no metabolismo celular, e avaliar a importância de três vias de sinalização celular relevantes no comportamento das células tumorais. As vias de sinalização foram selecionadas de acordo com o que se encontra descrito relativamente às principais vias envolvidas na tumorigénese. Para se poder entender qual o efeito dos LIs em células

tumorais, a linha celular de fibroblastos (não neoplásica) foi utilizada como um modelo in vitro de controlo, sendo assim possível a comparação entre células neoplásicas e não-neoplásicas.

5.3.1. Bioatividade dos LIs nas diversas linhas tumorais

No presente trabalho foi analisado o efeito inibitório dos LIs nas cinco linhas tumorais, tendo sido os resultados expressos em termos de atividade antitumoral – IC50.

No dia 1 de tratamento das culturas, o composto base apresentou uma melhor relação entre maior toxicidade nas linhas tumorais (< IC50) e menor toxicidade na linha controlo de fibroblastos (> IC50). No último dia, a presença do composto P₆₆₆₁₄AB promoveu uma melhoria na relação enunciada anteriormente, tendo este um comportamento antitumoral superior, quantitativamente, relativamente ao composto base. As linhas onde foi possível observar uma maior atividade antitumoral foram a A549 e a HepG2. Assim, verificou-se que com uma mesma dose de LI-IFA conseguiu-se eliminar mais facilmente as células neoplásicas do que as saudáveis.

Este resultado está em linha com resultados publicados anteriormente, pois compostos que apresentam na sua estrutura o catião [C₆₆₆₁₄P]⁺ caracterizam-se por uma potencial citotoxicidade, o que já foi demonstrado por Frade et al. (R. F. M. Frade et al., 2009). Não obstante, a citotoxicidade observada não foi generalizada, uma vez que foi muito mais evidente nas linhas celulares A549 e HepG2 do que nas restantes, ou do que no caso dos fibroblastos.

5.3.2. Estrutura química dos compostos e a relação com a sua bioatividade

Analisando os resultados e fazendo o paralelismo entre os diferentes catiões, é possível entender que existem estruturas mais tóxicas do que outras. O catião [C₆₆₆₁₄P]⁺ tem uma cadeia alquilo com 14 carbonos na sua estrutura e vários estudos mostram que o aumento da cadeia alquilo favorece o aumento da toxicidade, sendo estes catiões mais tóxicos para as células (Amde, Liu, & Pang, 2015; R. F. Frade & Afonso, 2010; Thuy Pham, Cho, & Yun, 2010). Alguns autores referem que a elevada toxicidade dos LIs com cadeia lateral longa pode ser responsável pela elevada permeabilidade da membrana o que pode levar à desregulação das funções fisiológicas da membrana conduzindo à morte celular (Cvjetko Bubalo et al., 2014). Este resultado só foi observado no dia 3, sendo por isso importante realizar mais estudos que permitam compreender as diferenças de toxicidade destes compostos nos diferentes dias de estudo nas linhas celulares estudadas.

5.3.3. Envolvimento de Vias de Sinalização importantes no comportamento celular nas várias linhas estudadas

As culturas de células neoplásicas e não-neoplásica foram testadas para verificar o seu comportamento na presença de diversas vias de sinalização celular (MEK, NFkB e JNK), onde se observaram resultados relevantes sobre a contribuição destas vias na resposta celular.

Globalmente a via MEK não aparentou estar envolvida na resposta celular, em qualquer um dos compostos, independentemente da linha celular, sendo assim possível concluir que a presença de LIs-IFAs não afeta significativamente o envolvimento da via de sinalização MEK no comportamento das diferentes linhas celulares.

Por sua vez, a via NFkB mostrou-se relevante em alguns casos, entre os quais, na linha celular não-neoplásica, no composto PQF, QCQ, CQAB, PQAB e QRAB. Nas linhas celulares RKO, MG63 e A549 não foi relevante. Por sua vez, na linha celular T47D, mostrou relevância nos compostos PQF, QCQ, CQAB e P₆₆₆₁₄AB e na linha celular HepG2, no composto QCQ. Assim, os resultados indicam que a via NFkB está bastante envolvida na diminuição da viabilidade celular.

A via JNK mostrou também contribuir para a resposta celular nomeadamente no composto P₆₆₆₁₄AB na linha celular dos fibroblastos, nos compostos CQAB, PQAB e P₆₆₆₁₄AB na linha tumoral T47D. Na linha tumoral MG63, no dia 1, foi importante no composto QRAB e no dia 3 essencialmente no composto P₆₆₆₁₄Cl. Os compostos PQF e QRAB tiveram uma diminuição da resposta celular, no dia 1, na linha celular A549. Já no dia 3 não foi relevante. Por último, na linha celular HepG2, em ambos os dias, esta via foi relevante nos compostos PQAB e QRAB. Esta via não foi relevante na linha tumoral RKO.

Globalmente, os resultados obtidos demonstram que os diferentes LIs-IFAs apresentam efeitos diferenciais na modulação das vias de sinalização intracelulares estudadas, sendo que esses efeitos parecem estar dependentes não apenas da sua composição química mas também das características biológicas de cada linha celular testada.

Parte VI

Conclusões e

Perspetivas Futuras

Este trabalho demonstrou que, de forma geral, os LIs baseados na cefuroxima têm propriedades antimicrobianas. Neste trabalho observamos inibição de crescimento bacteriano, inclusive inibição de crescimento de bactérias resistentes. Esta conclusão permite-nos visualizar os LIs como potenciais antibióticos.

Este trabalho elucidou sobre o potencial antimicrobiano dos LIs baseados na cefuroxima. Contudo ainda é necessário muito trabalho, nomeadamente na compreensão do mecanismo de ação destes compostos. É importante submetê-los a estudos com outras estirpes bacterianas e/ou outros microrganismos, efetuar estudos de toxicidade com linhas celulares humanas e muitos outros até se chegar à viabilização destes compostos para uso, ou não, em seres humanos.

Noutra área não muito distante, é de supremo interesse o desenvolvimento de novos agentes antitumorais que diminuam a toxicidade associada à quimioterapia. A indústria farmacêutica anda numa busca incessante por novas opções terapêuticas, sendo que os LIs podem vir a ter um papel preponderante nesta área. Vários estudos já demonstraram que os LIs podem representar uma alternativa viável às terapias tradicionais atualmente praticadas no cancro.

Este estudo mostrou a importância de se compreender a potencial atividade antitumoral dos LIs derivados de antimaláricos baseados no ácido betulínico. Um composto apresentou propriedades antitumorais superiores ao composto base (ácido betulínico), sendo que com modificações nas propriedades do LI poderá ser possível controlar a sua bioatividade e citotoxicidade, melhorando o seu efeito e seletividade contra diferentes tipos de células neoplásicas.

Os compostos em estudo mostraram-se também importantes de modulação de certas vias de sinalização importantes no comportamento celular das células, revelando a sua elevada potencialidade como agentes antitumorais na manipulação das vias de sinalização, um possível caminho para o desenvolvimento de novas terapias.

Apesar das investigações desenvolvidas são necessários mais estudos que permitam compreender os mecanismos de ação dos LIs-IFAs, visto que a compreensão do mecanismo em questão poderá ser importante no uso destes enquanto possíveis agentes anti-tumorais.

Em especial aumentar o número de análises para podermos ter uma melhor relação estatística e completar os ensaios com os outros fármacos.

Parte VII
Referências
Bibliográficas

- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235-6254. doi:10.3390/ijerph10126235
- Amde, M., Liu, J.-F., & Pang, L. (2015). Environmental Application, Fate, Effects, and Concerns of Ionic Liquids: A Review. *Environmental Science & Technology*, 49(21), 12611-12627. doi:10.1021/acs.est.5b03123
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51. doi:10.1038/nrmicro3380
- Blüthgen, N., & Legewie, S. (2013). Robustness of signal transduction pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(13), 2259-2269. doi:10.1007/s00018-012-1162-7
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1). doi:10.1101/cshperspect.a025239
- Bradford, K. B. a. P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamases Inhibitors: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Chakraborty, B., Dutta, D., Mukherjee, S., Das, S., Maiti, N. C., Das, P., & Chowdhury, C. (2015). Synthesis and biological evaluation of a novel betulonic acid derivative as an inducer of apoptosis in human colon carcinoma cells (HT-29). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 102, 93-105. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.035
- Chen, H. Atlas of Genetic Diagnosis and Counseling. 3rd edition.
- Chessa, D., Ganau, G., & Mazzarello, V. (2015). An overview of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus with a focus on developing countries. *The Journal Of Infection In Developing Countries*, 9 (06), 547-550.
- Cole, M. R., Li, M., El-Zahab, B., Janes, M. E., Hayes, D., & Warner, I. M. (2011). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of β -Lactam Antibiotic-Based Imidazolium- and Pyridinium-Type Ionic Liquids. *Chemical Biology & Drug Design*, 78(1), 33-41. doi:10.1111/j.1747-0285.2011.01114.x
- Control., E. C. f. D. P. a. (2015). Annual epidemiological report 2014. Stockholm: ECDC.
- Costa, A., Forte, A., Zalewska, K., Tiago, G., Petrovski, Z., & Branco, L. C. (2015). Novel biocompatible ionic liquids based on gluconate anion. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(1), 8-12. doi:10.1080/17518253.2014.951695
- Costa, S. P. F., Justina, V. D., Bica, K., Vasiloiu, M., Pinto, P. C. A. G., & Saraiva, M. L. M. F. S. (2014). Automated evaluation of pharmaceutically active ionic liquids'

- (eco)toxicity through the inhibition of human carboxylesterase and *Vibrio fischeri*. *Journal of Hazardous Materials*, 265, 133-141. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.052
- Csuk, R. (2014). Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008 – 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(8), 913-923. doi:10.1517/13543776.2014.927441
- Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., & Gaurina Srček, V. (2014). A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 99, 1-12. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.019
- Dias, A. R., Costa-Rodrigues, J., Fernandes, M. H., Ferraz, R., & Prudêncio, C. (2017). The Anticancer Potential of Ionic Liquids. *ChemMedChem*, 12(1), 11-18. doi:10.1002/cmdc.201600480
- Fan, L.-L., Li, H.-J., & Chen, Q.-H. (2014). Applications and Mechanisms of Ionic Liquids in Whole-Cell Biotransformation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12196-12216. doi:10.3390/ijms150712196
- Ferraz, R., Branco, L. C., Marrucho, I. M., Araujo, J. M. M., Rebelo, L. P. N., da Ponte, M. N., Petrovski, Z. (2012). Development of novel ionic liquids based on ampicillin. *MedChemComm*, 3(4), 494-497. doi:10.1039/C2MD00269H
- Ferraz, R., Branco, L. C., Prudêncio, C., Noronha, J. P., & Petrovski, Ž. (2011). Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. *ChemMedChem*, 6(6), 975-985. doi:10.1002/cmdc.201100082
- Ferraz, R., Costa-Rodrigues, J., Fernandes, M. H., Santos, M. M., Marrucho, I. M., Rebelo, L. P. N., Branco, L. C. (2015). Antitumor Activity of Ionic Liquids Based on Ampicillin. *ChemMedChem*, 10(9), 1480-1483. doi:10.1002/cmdc.201500142
- Ferraz R, P. C., Vieira M, Fernandes R, Noronha JP, et al. . (2015). Ionic Liquids Synthesis – Methodologies. *Organic Chemistry Current Research*. doi: 10.4172/2161-0401.1000e139
- Ferraz, R., Teixeira, V., Rodrigues, D., Fernandes, R., Prudencio, C., Noronha, J. P., Branco, L. C. (2014). Antibacterial activity of Ionic Liquids based on ampicillin against resistant bacteria. *RSC Advances*, 4(9), 4301-4307. doi:10.1039/C3RA44286A
- Florindo, C., Araújo, J. M. M., Alves, F., Matos, C., Ferraz, R., Prudêncio, C., Marrucho, I. M. (2013). Evaluation of solubility and partition properties of ampicillin-based

- ionic liquids. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(2), 553-559.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.010
- Frade, R. F., & Afonso, C. A. (2010). Impact of ionic liquids in environment and humans: An overview. *Human & Experimental Toxicology*, 29(12), 1038-1054.
doi:10.1177/0960327110371259
- Frade, R. F. M., Matias, A., Branco, L. C., Afonso, C. A. M., & Duarte, C. M. M. (2007). Effect of ionic liquids on human colon carcinoma HT-29 and CaCo-2 cell lines. *Green Chemistry*, 9(8), 873-877. doi:10.1039/B617526K
- Frade, R. F. M., Rosatella, A. A., Marques, C. S., Branco, L. C., Kulkarni, P. S., Mateus, N. M. M., Duarte, C. M. M. (2009). Toxicological evaluation on human colon carcinoma cell line (CaCo-2) of ionic liquids based on imidazolium, guanidinium, ammonium, phosphonium, pyridinium and pyrrolidinium cations. *Green Chemistry*, 11(10), 1660-1665. doi:10.1039/B914284N
- Gilmore, B. F. (2011). Ionic Liquids: Applications and Perspectives. doi:10.5772/13861
- Gold, B., & Rodriguez, W. J. (1983). Cefuroxime: Mechanisms of Action, Antimicrobial Activity, Pharmacokinetics, Clinical Applications, Adverse Reactions and Therapeutic Indications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 3(2P1), 82-100. doi:10.1002/j.1875-9114.1983.tb03228.x
- Gonçalves-Pereira, J., & Póvoa, P. (2011). Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of β -lactams. *Critical Care*, 15(5), R206-R206. doi:10.1186/cc10441
- Grunstein, M., & Gasser, S. M. (2013). Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), a017491. doi:10.1101/cshperspect.a017491
- Hartmann, D. O., Petkovic, M., & Silva Pereira, C. (2016). Ionic Liquids as Unforeseen Assets to Fight Life-Threatening Mycotic Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 7, 111. doi:10.3389/fmicb.2016.00111
- Health. (2011). Definition of active pharmaceutical ingredient. *World Health Organization*.
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., & Baba, T. (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10), 593-601. doi:10.1016/j.jiac.2014.08.001

- Kaushik, D., Mohan, M., Borade, D. M., & Swami, O. C. (2014). Ampicillin: Rise Fall and Resurgence. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8(5), ME01-ME03. doi:10.7860/JCDR/2014/8777.4356
- Kim, H. K., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2014). Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunological Methods*, 410, 88-99. doi: 10.1016/j.jim.2014.04.007
- KJ, F. (2007). An overview of antibiotic therapy. *Nursing Standard*, 22, 51-57.
- Kong, K.-F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*, 118(1), 1-36. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x
- Kumar, V., & Malhotra, S. V. (2009). Study on the potential anti-cancer activity of phosphonium and ammonium-based ionic liquids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(16), 4643-4646. doi:10.1016/j.bmcl.2009.06.086
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. In U. Dobrindt, J. H. Hacker, & C. Svanborg (Eds.), *Between Pathogenicity and Commensalism* (pp. 3-32). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Luís C. Branco, G. V. S. M. C., João Aires-de-Sousa, Ignacio Lopez Martin, Raquel Frade and Carlos A.M. Afonso. (2011). Physico-Chemical Properties of Task-Specific Ionic Liquids, *Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches*. doi:10.5772/15560
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1), 2-12. doi:10.1016/j.vetimm.2012.09.032
- Malhotra, S. V., & Kumar, V. (2010). A profile of the in vitro anti-tumor activity of imidazolium-based ionic liquids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(2), 581-585. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.085
- Marsh, K. N., Boxall, J. A., & Lichtenthaler, R. (2004). Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review. *Fluid Phase Equilibria*, 219(1), 93-98. doi:10.1016/j.fluid.2004.02.003
- Matuo, R., Sousa, F. G., Soares, D. G., Bonatto, D., Saffi, J., Escargueil, A. E., . . . Henriques, J. A. P. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 70(4), 491-502. doi:10.1007/s00280-012-1937-4

- NCCLS. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.
- Peter Turnpenny, S. E. Emery's Elements Of Medical Genetics (14th ed.).
- Rasamiravaka, T., & El Jaziri, M. (2016). Quorum-Sensing Mechanisms and Bacterial Response to Antibiotics in *P. aeruginosa*. *Current Microbiology*, 1-7. doi:10.1007/s00284-016-1101-1
- Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2), 128-134. doi:10.1002/pst.426
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- Suleyman, G., & Zervos, M. J. (2016). Safety and efficacy of commonly used antimicrobial agents in the treatment of enterococcal infections: a review. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(2), 153-167. doi:10.1517/14740338.2016.1127349
- Teixeira, C., Vale, N., Pérez, B., Gomes, A., Gomes, J. R. B., & Gomes, P. (2014). “Recycling” Classical Drugs for Malaria. *Chemical Reviews*, 114(22), 11164-11220. doi:10.1021/cr500123g
- Thuy Pham, T. P., Cho, C.-W., & Yun, Y.-S. (2010). Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Research*, 44(2), 352-372. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.030
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108. doi:10.3322/caac.21262
- Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2015). Experimental evolution of the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* yields insight into the molecular mechanisms underlying adaptation. *Current Opinion in Microbiology*, 28, 1-9. doi:10.1016/j.mib.2015.06.018
- W.B. Hugo, R., A.D. (1998). *Pharmaceutical microbiology : blackwell science*.