

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Instituto Politécnico do Porto

**Cátia Soraia Magalhães Magro**

---

# **Bioatividade de Líquidos Iónicos derivados do Ácido Valpróico em bactérias Gram-negativa.**

Mestrado em Bioquímica em Saúde

-

Biotecnologia

Setembro de 2014



ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO

INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

---

Cátia Soraia Magalhães Magro

---

**Bioatividade de Líquidos Iónicos derivados do Ácido Valpróico  
em bactérias Gram-negativa**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – Biotecnologia, realizada sob orientação científica do Professor Doutor Ricardo Ferraz e pelo Professor Doutor Rúben Fernandes (Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto).

Setembro 2014

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo” Albert Einstein

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao professor Ricardo Ferraz por todo o apoio, pelo tempo despendido, pelos conselhos, pela paciência e acima de tudo por ter aceitado o desafio de me orientar cientificamente.

Agradeço também aos professores, Joana Almeida, Rúben Fernandes e Cristina Prudêncio.

À Escola Superior de Tecnologia do Porto, agradeço pela cedência dos laboratórios e material fornecido.

O meu muito obrigado a todos os alunos de mestrado que me acompanharam nesta fase, ou não fossemos nós o grupo de pessoas extremamente fofinhas de MTBS.

Aos meus amigos de sempre, Ana Sofia Cardoso, Cátia Lima, José Vítor Gonçalves e Tatiana Monteiro, por todo o apoio que me deram e paciência. Não esquecendo aqueles, que embora nem sempre presentes, me incentivaram.

Ao Carlos, por tudo, desde aquela palavra no momento certo ao incentivo, sem nunca deixar de acreditar em mim e naquilo que sou capaz.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a toda a minha família, em especial aos meus pais. Sem eles nada disto seria possível. Um muito obrigado por tudo que têm feito por mim.

## **Objetivos**

Os objetivos deste trabalho são avaliar a influência que os LIs com o anião valproato podem exercer a nível do crescimento bacteriano, estudar a taxa de crescimento das bactérias na presença dos LIs e, por último, determinar se estes compostos podem ser utilizados como alternativas para combater a resistência bacteriana. Numa fase inicial realizaram-se testes para a avaliação da toxicidade de um composto – determinação da concentração mínima inibitória. Para completar os dados recolhidos, de forma a obter-se u estudo mais detalhado, procedeu-se à medição das taxas de crescimento dos microrganismos.

## Resumo

Os Líquidos Iônicos (LIs) são sais orgânicos constituídos exclusivamente por iões e possuem pontos de fusão inferiores a 100°C. As suas propriedades únicas e o facto de ser possível ajustar as suas propriedades físicas, químicas e biológicas, de acordo com o objetivo pretendido, tornam esta classe de compostos, um grande objeto de estudo de inúmeros investigadores. Desde os inícios da sua aplicação até à atualidade, a investigação nesta área expandiu o seu raio de ação, estando já descrito o seu potencial como agentes antimicrobianos e, mais recentemente, como compostos farmacêuticos ativos. Atualmente muitas das suas aplicações são baseadas nas suas propriedades biológicas.

Esta Tese teve como objetivo avaliar a influência que os LIs podem exercer a nível do crescimento bacteriano e estudar alternativas de combater a resistência bacteriana.

Todos os LIs utilizados neste trabalho tinham como anião o ácido valpróico, sendo utilizados catiões orgânicos de amónio e de imidazólio. Foram utilizadas 4 bactérias e avaliou-se a atividade biológica e a respetiva taxa de crescimento. O estudo da sua atividade biológica foi feito através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a análise das suas curvas de crescimentos na presença e ausência de composto.

Com este trabalho foi possível verificar que dentro dos compostos em estudo, LIs derivados do valproato, o Valproato com o cetilperidínio [valp] [cetylpir] foi o que influenciou o crescimento de todas as bactérias estudadas.

Este estudo demonstrou o potencial antibacteriano de alguns compostos, podendo desta forma vir a ser utilizados para fins farmacêuticos

**Palavras-chave:** Líquidos Iônicos; Ingredientes Farmacêuticos Ativos; Resistência Bacteriana; Valproato.

## **Abstract**

Ionic liquids (ILs) are organic salts composed, exclusively, of ions and they have melting points below 100°C. Their unique properties and the fact that it's possible to adjust its physical, chemical and biological properties, according to the intended purpose, make this class of compounds, a major object of study for many researchers. Since the beginning of their application until nowadays, the research in this area has expanded its range of action, being already described its potential as antimicrobial agents and, more recently, as active pharmaceutical compounds. Currently many of its applications are based on their biological properties.

This thesis aimed to evaluate the influence that ILs can exercise in the level of bacterial growth and bacterial resistance.

All the ILs used in this work had as anion the valproate anion, the organic cation were based on ammonium and imidazolium anions. Four bacteria were used and evaluated the biological activity and their growth rate. The biology activity studies were made by the determination of their Minimum Inhibitory Concentration and by the analysis of their growth curves in the presence and absence of the compound.

With this work we found out that within the compounds under study, ILs derived valproate, Valproate with the cetylpyridinium [Valp] [cetylpir] was the one that influenced the growth of all studied bacteria.

This study demonstrated antimicrobial activity of some compounds and can thus come to be used for pharmaceutical purposes

**Keywords:** Ionic liquids; Active Pharmaceutical Ingredients; Bacterial resistance; Valproate.

## Índice

Objetivos.....	<u>VI</u>
Índice Abreviaturas.....	<u>XI</u>
Índice Tabelas.....	<u>XII</u>
Índice Figuras .....	<u>XIII</u>
Capítulo I – Introdução.....	1
1.1. Líquidos Iônicos .....	2
1.1.1. Breve História dos Líquidos Iônicos .....	5
1.1.2. Aplicações de Líquidos Iônicos.....	6
1.2. Bactérias e Agentes Anti-bacterianos.....	7
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.2.2. Mecanismo de ação dos antimicrobianos .....	10
1.2.3. Mecanismo de resistência dos antimicrobianos.....	12
1.3. Ácido Valpróico .....	13
1.4. Líquidos Iônicos do Ácido Valpróico .....	14
Capítulo II – Materiais e Métodos.....	17
2.1. Materiais .....	18
2.2. Métodos .....	18
2.2.1. Preparação das Culturas.....	18
2.2.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) .....	19
2.2.3. Determinação das Taxas de Crescimento.....	19
2.2.4. Tratamento Estatístico .....	20
Capítulo III – Resultados.....	21
3.1. Concentração mínima inibitória (MIC) .....	22
3.2. Taxas de crescimento.....	24
Capítulo IV – Discussão e Conclusão .....	27
4. Discussão e Conclusão .....	28

4.1. Discussão dos resultados .....	28
4.2. Conclusão .....	30
Capítulo V – Referências Bibliográficas .....	31
5.1. Referências Bibliográficas.....	32

## Índice Abreviaturas

LIs	Líquidos Iônicos
IFA	Ingredientes Farmacêuticos ativos
RTILs	<i>Room Temperature Ionic Liquids</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
NAG	<i>N</i> -acetilglucosamina
NAM	<i>N</i> -acetil-murâmico
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
TSA	Tryptic Soy Agar
MIC	Concentração Mínima Inibitória
TSB	Tryptic Soy Broth
ATCC	American Type Culture Collection
LPS	Lipopolissacarídeos
SSJ	Síndrome de Stevens-Johnson
NET	Necrólise epidérmica tóxica
AINE	Anti-inflamatório não esteroide

## Índice Tabelas

Tabela 1 Concentração mínima inibitória (CMI) em mM dos LIs derivados do ácido valpróico .....	22
Tabela 2 - Taxas de crescimento dos diferentes microrganismos na presença e ausência de [valp] [cetylpir].....	24

## Índice Figuras

Figura 1. As 3 gerações de Líquidos Iônicos adaptado de Ferraz et al. (Ricardo Ferraz et al., 2011).....	3
Figura 2. Número de publicações com o termo “Ionic liquids” obtidos a partir da base de dados da Web of Science®.....	6
Figura 3 Esquema da estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (Figura adaptada de (Prescott, Harley, & Klein, 2005)).....	9
Figura 4 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos .....	11
Figura 5 - Estrutura dos principais grupos de antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	11
Figura 6 Mecanismos de resistência bacteriana .....	12
Figura 7. Estrutura do ácido valpróico .....	13
Figura 8. Líquidos Iônicos baseados no ácido valpróico utilizados neste trabalho.....	15
Figura 9 Exemplo da determinação da concentração mínima inibitória .....	23
Figura 10 Representação da curva de crescimento (Log (densidade ótica) vs Tempo (min)) da E. coli art 19B .....	24
Figura 11 Representação da curva de crescimento (Log (densidade ótica) vs Tempo (min)) da E. coli TEM 180 .....	25
Figura 12 Representação da curva de crescimento (Log (densidade ótica) vs Tempo (min)) da E. coli ATCC 25922 .....	25
Figura 13 Representação da curva de crescimento (Log (densidade ótica) vs Tempo (min)) da E. coli TEM 201 .....	26
Figura 14. Estrutura do catião cetilpiridínio [Cetylpir]. .....	28

## **Capítulo I – Introdução**

## 1.1. Líquidos Iônicos

Os Líquidos Iônicos (LIs) apresentam um grande potencial, quer a nível laboratorial, quer a nível industrial. São convencionalmente definidos como sais orgânicos que se caracterizam principalmente pelo seu baixo ponto de fusão (<100°C), e pela sua baixa pressão de vapor (Hough-Troutman et al., 2009; Hough et al., 2007). As propriedades deles torna-os diferentes dos sais inorgânicos e bastante atrativos em termos de aplicações, quer para a química verde (J. Pernak, Sobaszekiewicz, & Mirska, 2003), quer para as Ciências da Saúde (Ricardo Ferraz, Luis C. Branco, Cristina Prudencio, Joao Paulo Noronha, & Zeljko Petrovski, 2011). Outras propriedades importantes são: elevada estabilidade térmica e química, baixa inflamabilidade, a densidade e viscosidade, que podem ser seleccionadas através da correta escolha do catião e/ou anião (Cole et al., 2011; Ricardo Ferraz et al., 2011).

A densidade e a viscosidade influenciam a escolha de solventes para a síntese e purificação, assim como a sua solubilidade em água de uma forma geral e em fluídos biológicos de forma particular e ainda em solventes orgânicos ou lipossomas (Marsh, Boxall, & Lichtenthaler, 2004).

Como já foi referido os LIs são constituídos exclusivamente por iões - geralmente um catião orgânico de grandes dimensões, e um anião poliatômico orgânico ou inorgânico, logo é possível um grande número de combinações catião/anião. Isto faz com que as suas propriedades possam ser potenciadas e terem as possibilidades de serem aplicados em diversas áreas, quer na área da indústria, química, biotecnológica e farmacêutica (Hough-Troutman et al., 2009). Estas áreas relacionadas com as ciências da saúde demonstraram a importância de estudar outras propriedades, como a toxicidade e a biodegradação dos LIs. Antes da sua aceitação como alternativas “verdes” viáveis (MacFarlane, Pringle, Johansson, Forsyth, & Forsyth, 2006; Singh, Verma, Meshri, & Shreeve, 2006).

De entre as famílias de catiões orgânicos mais utilizados na constituição dos LIs encontramos os imidazólios, amónios, fosfónios, piridínios, pirrolidínios, sulfónios, pirazólios, tiazólios e guanidínios (R. Ferraz et al., 2012; Ricardo Ferraz et al., 2011; Singh et al., 2006) (9,11,14)

Relativamente aos aniões mais usados podem destacar-se exemplos de aniões inorgânicos como os halogenetos, cloroaluminatos, hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, e outros aniões orgânicos como bis(trifluorometilsulfonil)imida, dicianamida, p-toluenosulfonato e o trifluorometanosulfonato (R. Ferraz et al., 2012; Ricardo Ferraz et al., 2011; Singh et al., 2006).

Os chamados *Room Temperature Ionic Liquids (RTILs)* são uma subclasse de líquidos iônicos - são líquidos à temperatura ambiente. Apresentando um maior interesse dentro desta classe de sais (Hough-Troutman et al., 2009; MacFarlane et al., 2006; Singh et al., 2006).

A intensa investigação nesta área originou uma grande evolução nas últimas décadas, sendo já possível classificar três gerações distintas de LIs (Figura 1). Na primeira geração estão incluídos compostos que exibem propriedades físicas (viscosidade, pontos de fusão, densidade, estabilidade térmica) (Figura 1). A segunda geração é caracterizada pela possibilidade de se poder conjugar algumas das propriedades físicas com propriedades químicas. (Figura 1). A terceira e mais recente geração descrita utiliza princípios ativos farmacêuticos, para posterior utilização na produção de LIs com atividade biológica (Ricardo Ferraz et al., 2011; Hough et al., 2007) (Figura 1).

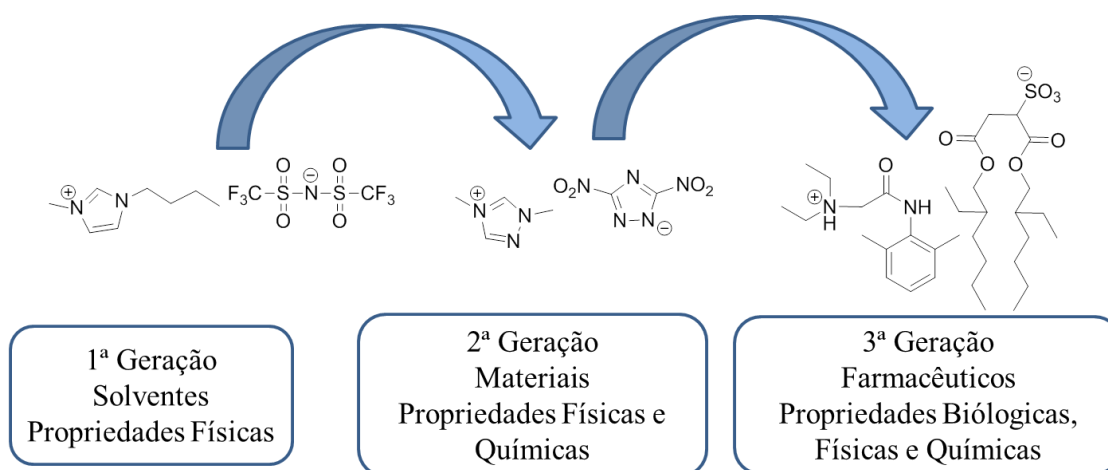


Figura 1. As 3 gerações de Líquidos Iônicos adaptado de Ferraz et al. (Ricardo Ferraz et al., 2011).

Uma das grandes potencialidades dos LIs, que pode ser aproveitado pela indústria farmacêutica, é que eles sendo líquidos podem eliminar os problemas causados pelo polimorfismo. A possibilidade de ajustar as suas propriedades faz com se possa melhorar a

sua solubilidade em água ou a sua permeabilidade pelas membranas (Cole et al., 2011; Ricardo Ferraz et al., 2011; Hough & Rogers, 2007).

Nos dias que correm, a indústria farmacêutica baseia-se em ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) na forma sólida, podendo estes ser obtidos através do controlo do tamanho do cristal e da solubilidade controlada do produto. (Cole et al., 2011; Ricardo Ferraz et al., 2011; Hough et al., 2007). Por volta de 2007, o interesse nesta área aumentou consideravelmente, tendo aparecido imensas publicações relacionadas com o desenvolvimento de LIs como ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) (Bica, Rijksen, Nieuwenhuyzen, & Rogers, 2010; Cojocararu et al., 2013; R. Ferraz et al., 2012; Ricardo Ferraz et al., 2011; Ricardo Ferraz et al., 2014; Florindo et al., 2013; Hough-Troutman et al., 2009; Hough & Rogers, 2007; Hough et al., 2007; McCrary et al., 2013; Juliusz Pernak, Niemczak, Materna, Marcinkowska, & Praczyk, 2013; Rodriguez, Bica, & Rogers, 2008; Rogers et al., 2007; Stoimenovski, MacFarlane, Bica, & Rogers, 2010)

Embora, se verifique que as formas sólidas de IFAs podem ser compostos neutros ou sais, estes apresentam frequentemente problemas relacionados com a formação de polimorfos e com a baixa solubilidade, o que pode influenciar de forma direta a biodisponibilidade (Kawakami, 2012; Soltanpour & Jouyban, 2010). Desta forma, estes são fatores essenciais para a efetividade de um determinado fármaco (Blagden, de Matas, Gavan, & York, 2007).

A última geração de LIs apresenta então como principal objetivo superar os obstáculos de formulação de IFAs no estado sólido.

Os LIs apresentam propriedades interessantes para a sua utilização biológica, como em processos de biomassa, entrega de fármacos, em produtos de higiene e cuidados pessoais, entre outros.

Na 3<sup>a</sup> geração de LIs, existem algumas propriedades que ganham especial relevo como por exemplo, a elevada estabilidade térmica, normalmente com temperaturas de decomposição superiores a 300 °C, o que é importante do ponto de vista da síntese química de um fármaco.

### 1.1.1. Breve História dos Líquidos Iônicos

O aumento de interesse manifestado nos LIs teve início nos anos 90, embora estes sais possam ser mais antigos do que pensamos.(Freemantle, 2010) O seu aparecimento teve origem no final do século XIX. Só no início do século XX, é que foi descrita a primeira síntese de líquido iónico por Walden. O resultado foi a síntese do nitrato de etilamónio cujo ponto de fusão é de 12,5°C. (Freemantle, 2010; John S. Wilkes, 2002).

Mais tarde, nos anos 50, surgiram os primeiros LIs baseados em aniões cloroaluminatos, a partir dos estudos realizados por Hurley e Wier(John S. Wilkes, 2002).

Numa fase posterior, início da década de 70, foi publicado o uso de LIs para catálise homogénea por Parshall. Seguidamente, Osteryoung desenvolveu o método de alquilação de Friedel-Crafts, tendo como meio reacional um sal fundido a baixa temperatura. (Freemantle, 2010; John S. Wilkes, 2002).Wilkes e Hussey apresentaram na década de 80, a descoberta de uma nova família de LIs, os cloroaluminatos de dialquilimidazólio (J. S. Wilkes, Levisky, Wilson, & Hussey, 1982). Na mesma altura, Poole e os seus colaboradores, anunciaram o uso de nitrato de etilamónio como fase estacionária em cromatografia(J. S. Wilkes et al., 1982). Este avanço tecnológico foi importante uma vez que abriu novas perspetivas para os sais orgânicos.

Na década de 90, foi descrito o uso de três tipos de famílias de LIs (dialquilimidazólio, alquilpiridínio e tetra-alquilfosfónio) como meio reacional para a dimerização catalítica de alcenos por complexos de níquel.(John S Wilkes, 2002) Mais tarde, foi publicada a síntese de LIs estáveis na presença de pequenas quantidades de água, por Wilkes e Zaworotko, baseados na família de catiões imidazólio. Estes sais orgânicos foram constituídos pelo catião 1-etil-3-metilimidazólio e por aniões inorgânicos, como o hexafluorofosfato  $[PF_6]^-$  e o tetrafluoroborato  $[BF_4]^-$  (John S Wilkes & Zaworotko, 1992). Posteriormente verificou-se que os LIs compostos pelos aniões  $[PF_6]^-$  ou  $[BF_4]^-$  poderiam sofrer um processo de hidrólise originando o ácido fluorídrico (Swatloski, Holbrey, & Rogers, 2003). No final desta década, iniciou-se então uma nova fase para estes sais, coincidindo com o início da química verde e com o aumento de interesse nos LIs.

Nos últimos anos, tem-se observado um grande crescimento na investigação científica de LIs. Muitas descobertas sobre este tema têm sido feitas, porém, os últimos 20 anos de investigação resultaram numa infinidade de potenciais aplicações.

Atualmente, este tema tem sido cada vez mais investigado e a cada dia que passa, se sabe mais sobre LIs. O número de artigos, publicações e citações sobre este tema aumentou exponencialmente, demonstrando desta forma o crescente aumento de interesse nestes compostos.

### 1.1.2. Aplicações de Líquidos Iônicos

Como foi referido anteriormente, os LIs têm vindo a apresentar um grande crescimento ao nível das suas aplicações bem como de citações e publicações (Figura 2.)

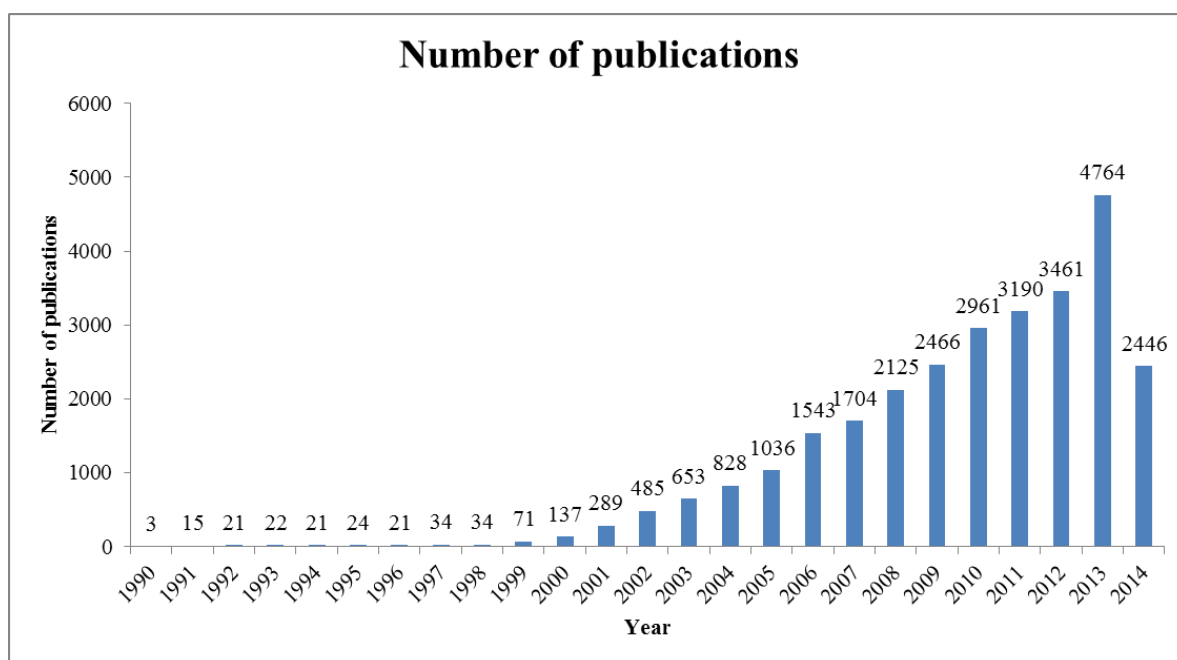


Figura 2. Número de publicações com o termo “Ionic liquids” obtidos a partir da base de dados da Web of Science®.

O aumento das publicações é devido à descoberta das propriedades únicas destes compostos e às possíveis combinações de catiões e aniões que permitem ajustar as propriedades físicas e químicas dos LIs (Lenardão, Freitag, Dabdoub, Batista, & Silveira, 2003).

Quando se fala nas suas aplicações, o primeiro lugar é ocupado pelo uso de solventes alternativos em síntese orgânica devido à sua estabilidade térmica e baixa volatilidade,

embora também sejam aplicados em catálise, como eletrólitos em baterias. (Gordon, 2001; Hofmann, Schulz, & Hanemann, 2013; Zhao, Wu, Kou, & Min, 2002)

Na indústria farmacêutica, mais recentemente, têm sido aplicados como solventes para síntese de fármacos ou intermediários na formação de LIs como princípios ativos (R. Ferraz, L. C. Branco, C. Prudencio, J. P. Noronha, & Z. Petrovski, 2011; Marrucho, Branco, & Rebelo, 2014). Trata-se então de LIs que possuem um íão farmacologicamente ativo, permitindo alterar certas características menos vantajosas dos fármacos atuais.

Na síntese de LIs como princípios ativos, devem ser garantidos três parâmetros, a elevada pureza do produto obtido, a permanência das propriedades farmacêuticas do fármaco inicial, e por último mas não menos importante, a sua biocompatibilidade associada à reduzida toxicidade.

Embora já se saiba bastante sobre este tema, ainda muito está para se descobrir, nomeadamente a nível da sua atividade biológica e toxicidade.

## **1.2. Bactérias e Agentes Anti-bacterianos**

A história dos agentes anti-bacterianos começa com Alexandre Fleming. Em 1928, Alexandre Fleming observou que o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* era inibido na área ao redor das colónias do fungo que tinham contaminado a placa de Petri. Fungo esse que mais tarde veio a ser identificado como *Penicilium notatum* (Ferreira & de Sousa).

Desde então designou-se como antibiótico toda a substância produzida por microrganismos que, em pequenas quantidades, pode inibir o crescimento ou matar outros microrganismos.

O termo “antibiótico” difere das mais variadas áreas de especialização, muitos são utilizados comercialmente para fins que não o tratamento de doenças, como por exemplo, o suplemento na alimentação de animais. Atualmente, considera-se também antimicrobiano

aquele cuja substâncias são produzidas sinteticamente (Joao Goncalves-Pereira & Pedro Pova, 2011).

As bactérias são dos microrganismos vivos mais antigos à face da Terra. Apresentam na sua constituição uma única célula (unicelulares) e podem apresentar diversos tamanhos, na ordem dos  $\mu\text{m}$ . Para além do tamanho apresentado, também podem adquirir diversas formas. As bactérias classificam-se de acordo com a sua estrutura. As que se encontram com mais regularidade são os cocos, de forma esférica, e os bacilos com forma em bastonete (Ferreira & de Sousa).

Na sua constituição, as bactérias possuem diversas estruturas importantes, de entre as quais é de salientar a parede celular que confere proteção à célula. A parede celular é composta por peptidoglicano (polímeros de polissacarídeos ligados a proteínas como mureína). O peptidoglicano é um heteropolímero composto por cadeias lineares de dois açúcares aminados, *N*-acetilglucosamina (NAG) e ácido *N*-acetil-murâmico (NAM), dispostos alternadamente e unidos por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). A cada molécula de NAM ligam-se cadeias peptídicas normalmente de 4 aminoácidos, através de uma ligação amida. Estas cadeias peptídicas estabelecem com as cadeias lineares vizinhas pontes interpeptídicas (*cross-linking*), geralmente entre o grupo  $-\text{NH}_2$  do 3º aminoácido e o grupo  $-\text{COOH}$  do 4º aminoácido da cadeia peptídica vizinha (Courvalin, 2005). O peptidoglicano é extremamente importante e a maneira como ele está presente nas bactérias ajuda a distinguir as bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-positivas possuem uma camada única e espessa de peptidoglicano e são desprovidas de lípidos. Esta camada espessa retém o corante azul utilizado na coloração. Nas bactérias Gram-negativas o peptidoglicano é pouco abundante e situa-se entre a membrana interna e a membrana externa da parede celular, enquanto nas bactérias Gram-positivas o peptidoglicano tem uma espessura superior, logo a parede celular destas bactérias não possui membrana externa (Figura 3). (Ferreira & de Sousa; J. Goncalves-Pereira & P. Pova, 2011).

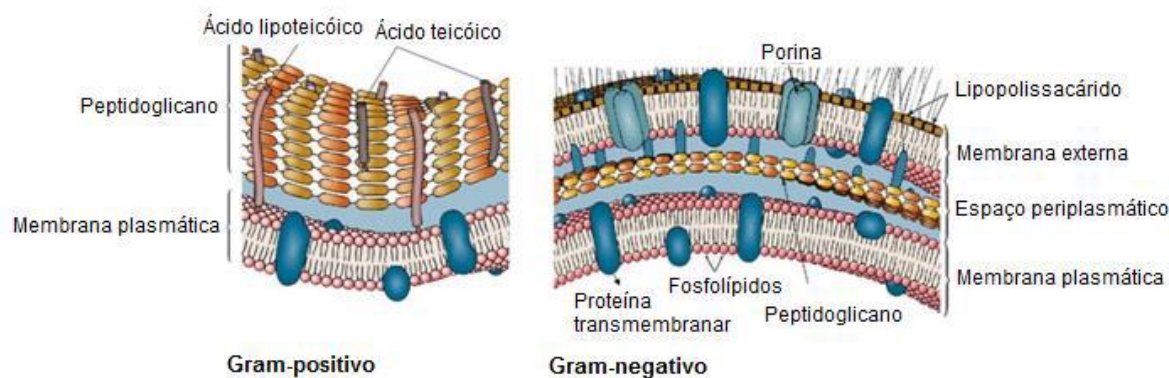


Figura 3 Esquema da estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (Figura adaptada de (Prescott, Harley, & Klein, 2005)).

Usualmente as bactérias apresentam um crescimento no qual se verifica o aumento de todos os seus constituintes celulares, culminado no crescimento da população bacteriana. Costuma ser dividido em quatro fases distintas:

Fase de latência (Lag): Verifica-se o ajuste ao novo ambiente;

Fase logarítmica (Log): Ocorre o crescimento e duplicação a um ritmo constante;

Fase estacionária: Dá-se a paragem da divisão celular.

Fase de declínio: Onde grande parte se encontra em processo de morte.

O estudo do crescimento das populações bacterianas torna-se útil na medida em que pode auxiliar na seleção de agentes antibacterianos e bactericidas.

### 1.2.1 *Escherichia coli*

Neste trabalho optou-se por estudar os efeitos da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*. Juntamente com o *Staphylococcus aureus* é uma das mais comuns e antigas bactérias simbiotes do ser humano (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2012). Para além disso é um bom modelo para estudos da viabilidade celular (Amador et al., 2009; Ricardo Ferraz et al., 2014; Murray et al., 2012). Normalmente, para além de fazer parte da flora normal como habitante comensal do intestino do ser humano também pode existir em animais. É uma bactéria aeróbia ou anaeróbia facultativa. Apresenta inúmeros flagelos em torno da célula, possui adesinas (fatores de colonização que incluem pili e fimbrias), que permitem a sua fixação,

cápsula (que protege a bactéria das defesas) e proteínas da membrana externa que ajudam o organismo na ligação à célula e início da endocitose. A *E. coli* está entre as principais causas de intoxicação alimentar; infecções do trato urinário; colecistite; apendicite; peritonite; meningite neonatal e septicémia. (Ferreira & de Sousa; Murray et al., 2012)

Relativamente a fatores de virulência, estas bactérias produzem vários tipos de toxinas. As enterotoxinas, tal como o nome indica, são produzidas por estirpes enterotoxigénicas de *E. coli* (ETEC). Esta toxina induz a saída de água e iões para o lúmen resultando em diarreia líquida. É conhecida como a diarreia do viajante. A toxina tipo Shiga ou verotoxina é produzida por estirpes de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC). É citotóxica, enterotóxica, neurotóxica, podendo provocar diarreia e ulceração do trato gastro intestinal. A toxina enteroagregativa termoestável é produzida por estirpes enteroagregativas de *E.coli* (EAEC) (Murray et al., 2012)

### **1.2.2. Mecanismo de ação dos antimicrobianos**

Os antimicrobianos podem ser de dois tipos, bactericidas (matam diretamente o microrganismo) ou bacteriostáticas (impedem o crescimento do microrganismo). Podem ainda ser divididos de acordo com o seu local alvo na célula bacteriana, não tendo praticamente efeitos deletérios para o Homem ou animal, quando usado nas doses terapêuticas adequadas (Ruben Fernandes, Amador, & Prudencio, 2013).Três dos princípios básicos da terapêutica antimicrobiana são (Pitout, Sanders, & Sanders, 1997):

- A sua toxicidade seletiva, tirar partido das diferenças de estrutura e do metabolismo dos patogénicos e das células hospedeiras (matar os organismos mas não o homem),
- Atingir o local de ação em concentrações suficientemente elevadas e penetrar, ligando-se ao alvo, evitando a inativação e extrusão
- Adaptação ao doente, a nível económico, na facilidade de administração, na quantidade das doses diárias e no efeito que poderá produzir.

Os principais mecanismos de ação dos antibióticos na célula bacteriana são 4: síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, inibição da síntese de ácidos nucleicos e inibição das vias metabólicas (Figura 4) (Fleming, 1980).

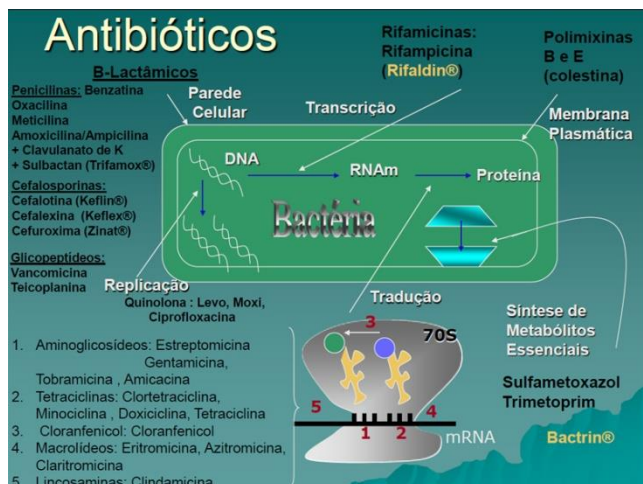


Figura 4 - Mecanismo de ação dos antimicrobianos

A utilização inadequada ou excessiva dos antibióticos em humanos e também nos animais acelerou o aparecimento e a propagação de bactérias resistentes aos antibióticos. (Costa, 2013)

Nos antibióticos inibidores da síntese da parede celular estão incluídos o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams (Figura 5) e os glicopéptidos (vancomicina e teicoplanina) (Bryskier, 2005; Courvalin, 2005). Estes atuam em fases distintas da biossíntese da camada do peptidoglicano, que tal como já foi referido anteriormente é o principal constituinte da parede celular das bactérias, alterando a integridade da parede celular, levando à lise celular.

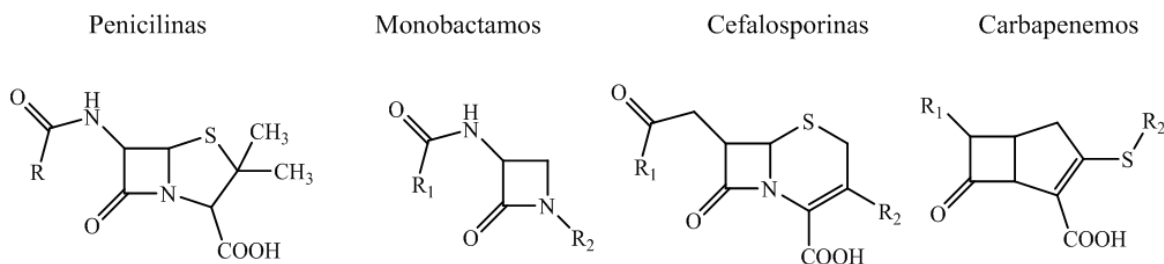


Figura 5 - Estrutura dos principais grupos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

### 1.2.3. Mecanismo de resistência dos antimicrobianos

Atualmente tem-se verificado que a evolução das bactérias tem conferido resistências aos antimicrobianos. Este efeito é atribuído a um uso excessivo de antibióticos na agricultura e medicina e numa má utilização dos antibióticos pelo utilizador (concentração/tempo de tratamento inadequado). Este tipo de resistência pode ser verificado através de quatro mecanismos de ação (Figura 6) (Bryskier, 2005; Ruben Fernandes et al., 2013):

- Destruição ou inativação da droga, por ação das  $\beta$ - lactamases;
- Prevenção da penetração no sítio alvo dentro do microrganismo;
- Alteração dos sítios alvo das drogas;
- Efluxo ativo, que vai bombear a droga para fora da célula antes que esta se possa tornar efetiva.

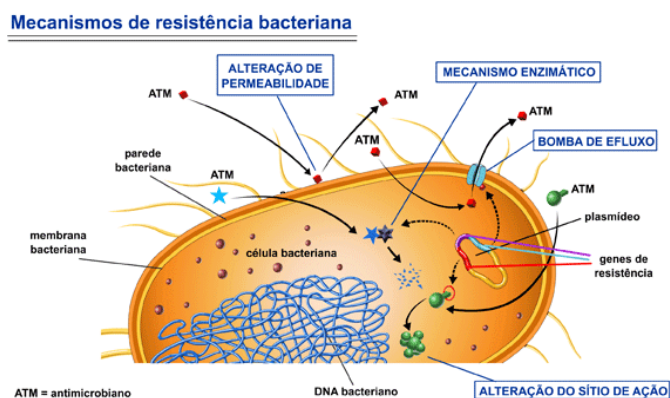


Figura 6 Mecanismos de resistência bacteriana

A hereditariedade de fatores de resistência a antibióticos pode ser de causa natural/intrínseca (depende das características da espécie) ou adquirida (através de modificações genéticas. Através da aquisição exógena de DNA (transformação, transdução e conjugação) os plasmídeos podem transportar mais do que uma resistência a um antibiótico uma vez que o gene codificador é transferido facilmente entre bactérias. A partir de rearranjos intramoleculares de DNA, os transposões, elementos genéticos móveis transportam um gene de resistência a um antimicrobiano (recombinação entre plasmídeos,

do cromossoma para o plasmídeo e vice-versa) e os integrões, grupos de genes móveis, com cassetes de resistência a antimicrobianos, responsável pela rápida dispersão nas bactérias Gram positivas (Courvalin, 2005).

Atualmente a resistência a antibióticos é um problema de saúde pública (Ruben Fernandes et al., 2013; R. Fernandes, Vieira, Ferraz, & Prudencio, 2008; R. Ferraz et al., 2012; Ricardo Ferraz et al., 2014), por isso é importante usar apenas antimicrobianos, quando é clinicamente indicado. De salientar que o organismo humano consegue gerir grande parte das infeções e que muitas vezes os antimicrobianos são administrados incorretamente para infeções virais. Deve procurar usar-se um espectro de ação reduzido, administrar por um período de tempo adequado sempre que possível, e utilizar a combinação de antibióticos. (Hoffman, Hardman, Limbird, & Goodman-Gilman, 2003; Jawetz et al., 1998)

Um dos grupos de antimicrobianos mais importantes são o grupo dos  $\beta$ - lactâmicos. Este grupo inibe a biossíntese do peptidoglicano das bactérias. Dentro deste grupo, as principais classes podem apresentar quatro estruturas diferentes de anéis, os penamos, cefemos, monobactamos e carbapenemos. Este grupo de antimicrobianos apresenta, no entanto, a desvantagem de poderem ser inativados pelas  $\beta$ -lactamases, que são hidrólases bacterianas (Walsh, 2000)

### 1.3. Ácido Valpróico

O ácido 2-propil pentanóico, também conhecido como ácido valpróico (Figura 7) é um fármaco utilizado na epilepsia em monoterapia ou como terapêutica adjuvante no tratamento de crises parciais ou completas, ausências ou crises do tipo misto. Apresenta também ação sobre o humor nas psicoses maníaco-depressivas e pode ser útil na profilaxia da enxaqueca (Kostrouchova & Kostrouch, 2007).

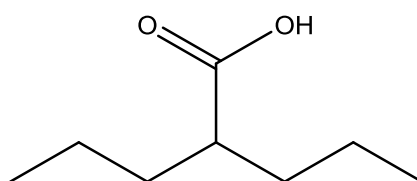


Figura 7. Estrutura do ácido valpróico

Apresenta baixa solubilidade em água e enquanto ingrediente farmacêutico ativo é usualmente utilizado sob a forma de sais de magnésio ou valproato de sódio.

Este composto foi sintetizado em 1882 e as suas propriedades antiepiléticas só se tornaram evidentes num ensaio experimental, em que o valproato de sódio se utilizava como solvente (Guimarães, Moura, & da Silva).

Tem como desvantagem o facto de a sua eficácia depender da administração prolongada. Desta forma, a lista de efeitos adversos é extensa, desde cansaço, trémulo, sedação e irritabilidade. De salientar ainda que induz alterações endócrinas, como por exemplo a resistência à insulina, e as mais graves de todas são a hepatotoxicidade e os distúrbios gastrointestinais (Guimarães et al.).

O ácido valpróico sendo utilizado há mais de 30 anos, é reconhecido como teratogénico. As mulheres que estejam expostas a este fármaco durante o 1º trimestre de gravidez apresentam um risco mais elevado de malformações no feto. (Jentink et al., 2010)

#### **1.4. Líquidos Iónicos do Ácido Valpróico**

Os LIs são compostos promissores como Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs) (Ricardo Ferraz et al., 2011). Como já foi referido é possível várias combinações do anião valproato com diversos catiões orgânicos, formando LIs e/ou sais são formados. Estes novos compostos podem alterar significativamente as propriedades físicas, químicas e térmicas do valproato (R. Ferraz et al., 2012; Ricardo Ferraz et al., 2011; Ricardo Ferraz et al., 2014; Florindo et al., 2013; Marrucho et al., 2014).

Esta nova metodologia pode ser utilizada para realizar modificações no fármaco eliminando desta forma alguns dos efeitos adversos relacionados com a sua toxicidade.

Neste trabalho pretendemos estudar as propriedades de LIs baseados no ácido valpróico (Figura 8) em bactérias Gram-negativas. Estes LIs foram preparados pelo método de neutralização com tampão otimizado por Ferraz et al (R. Ferraz et al., 2012). Os catiões

orgânicos utilizados neste trabalho como o catião cetilpiridínio, o catião colina e os catiões de imidazólio foram escolhidos com base na sua biocompatibilidade e com base nas mais recentes aplicações farmacêuticas (Ricardo Ferraz et al., 2011; Marrucho et al., 2014).

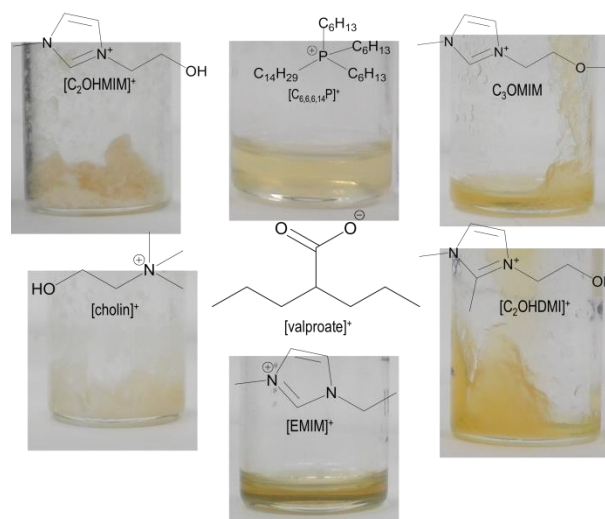


Figura 8. Líquidos Iônicos baseados no ácido valpróico utilizados neste trabalho.

O estudo destes LIs em bactérias é relevante, visto que as bactérias tornam-se importantes para o ser humano na medida em que ensinam o sistema imunitário no combate a agentes infecciosos e na prevenção de inúmeras patologias. Para além disso tem existido casos em que os ataques epiléticos estão associados a infeções bacterianas (I. Kanu, E. C. Anyanwu, N. C. Nwachukwu, J. E. Ehiri, & J. Merrick, 2005; Mylonas, Tzerbos, Mihalaki, Rologis, & Boutsikakis, 2007; K. W. Wang et al., 2005). Com este trabalho pretendemos explorar e estudar LIs com esta dupla função, neste caso em concreto, o uso de LIs com um IFA antiepilético que possa funcionar também como antibacteriano.

Os abscessos cerebrais são uma infeção rara e com grave risco de vida (Mylonas et al., 2007). Os microrganismos mais frequentemente identificados nestas situações são os *Streptococcus* (*Streptococcus viridans*) e as bactérias anaeróbias (*Bacteroides* sp., *Actinobacillus actinomycetem comitans*). Tendo em conta que os abscessos são frequentemente polimicrobianos, microrganismos tais como *Staphylococcus aureus* e

Gram-negativos anaeróbicos facultativos (*Enterobacteriaceae*) foram relatados também como possíveis causadores da infecção (Mylonas et al., 2007).

As convulsões podem ser uma consequência neurológica resultante de meningite bacteriana e usualmente associada a um mau prognóstico. (K.-W. Wang et al., 2005)

A exposição a certos contaminantes ambientais pode originar algumas crises epiléticas em crianças e adolescentes. Mais de 80% das crises epiléticas das crianças são causadas pela Malária e cerca de 12% nos adultos. Uma pequena percentagem é devido a vírus e bactérias, de entre das quais se salienta o *Staphylococcus aureus* (a mais comum) e a *Escherichia coli* (7,9%). A rápida identificação dos microrganismos envolvidos nas crises epiléticas pode ajudar na avaliação de estratégias de tratamento e planejar recursos para os infetados. (Ijeoma Kanu, Ebere C Anyanwu, Nkechi C Nwachukwu, John E Ehiri, & Joav Merrick, 2005)

Para além das situações acima referidas, existem casos em que o valproato de sódio está associado a reações adversas medicamentosas. A interação entre fármacos parece desempenhar um papel facilitador em alguns fenómenos de hipersensibilidade. Num estudo realizado por Rzany, foram identificados 352 casos de síndrome de Stevens-Johnson (SSJ) e necrólise epidérmica tóxica (NET), sendo que cerca de 21% foram atribuídos a antiepiléticos. A associação entre o valproato e SSJ/NET surge enviesada pela utilização em simultâneo de outros fármacos, nomeadamente os anti-inflamatórios não esteroides (AINE). Nos casos em que se verifique a hipersensibilidade ao valproato, devem procurar-se alternativas terapêuticas entre as classes com menor risco de reatividade. (Antunes et al., 2011).

## **Capítulo II – Materiais e Métodos**

## 2.1. Materiais

Todos os materiais utilizados foram fornecidos pela Escola Superior de Tecnologia do Porto.

Os LIs derivados do ácido valpróico foram sintetizados e purificados por Ricardo Ferraz e usados após confirmação das estruturas e da pureza por Ressonância Magnética Nuclear e espectrometria de massa.

Todas as células bacterianas estudadas foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em sistemas de criopreservação - Vibakstore. Este estudo foi desenvolvido em bactérias, nomeadamente a família das *Enterobacteriaceae*. As selecionadas para este estudo foram a *E. coli* ATCC 25922, a *E. coli* TEM 180, *E. coli* ART 19B e a *E. coli* TEM 201. A *Escherichia coli* ATCC 25922 foi obtida através da American Type Culture Collection (ATCC), enquanto as outras foram obtidas de isolados clínicos apresentando genes de resistência.

As bactérias utilizadas neste trabalho pertencem à coleção das Ciências Químicas e das Biomoléculas, da Escola Superior de Tecnologia do Porto.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Preparação das Culturas

As bactérias utilizadas foram cultivadas e mantidas em meio TSA (Tryptic Soy Agar). Foram incubadas em ambiente aeróbio durante 24 horas a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , antes de cada teste.

Sempre que necessário, os ensaios das bactérias foram feitos em TSB (Tryptic Soy Broth). As culturas foram repicadas, de forma a garantir que em todos os ensaios, as bactérias eram provenientes de culturas frescas.

### **2.2.2. 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 Laboratório Clínico Standard Institute (CLSI)

Com o objetivo de obter uma suspensão bacteriana de densidade igual à da solução padrão McFarland 0,5, foram selecionadas colônias de bactérias através da repicagem das culturas frescas. As colônias selecionadas eram transferidas para tubos de ensaio que continham meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth). 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.

Os LIs foram testados em 5 concentrações diferentes, 100 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM e 0,01 mM. Para além das concentrações já referidas, foram ainda incluídos, um controlo positivo (suspensão bacteriana e TSB) e um branco (apenas TSB).

O volume final em cada poço foi de 200µl. Em todos os ensaios, o volume de suspensão bacteriana e de composto foi constante, variando apenas o volume de meio a adicionar em cada poço.

O MIC é determinado como sendo a menor concentração que não apresenta turbidez após incubação (24h a 37°C).

### **2.2.3. Determinação das Taxas de Crescimento**

A fim de completar a caracterização da atividade antibacteriana, foi avaliada a taxa de crescimento.

As taxas de crescimento foram determinadas na presença dos LIs que apresentaram atividade biológica no teste da microdiluição. Foram testadas 3 concentrações dos LIs, a concentração correspondente ao MIC, a concentração inferior ao MIC e a concentração

superior ao MIC. Foram determinadas em triplicado pelo método de microdiluição, utilizando placas de Elisa (96 poços de fundo plano), utilizando o meio TSB.

A placa foi incubada a 37°C, procedendo-se a leituras periódicas do valor de absorvância, a 620 nm. Estas leituras periódicas serviram para estabelecer a curva de crescimento da população bacteriana e, em seguida, determinar a inclinação da curva. A taxa de crescimento foi determinada pelo ajuste da função linear para uma curva de fase exponencial (Log).

#### **2.2.4. Tratamento Estatístico**

Neste trabalho, para todas análises efetuadas fizeram sempre, no mínimo 3 repetições. Utilizou-se a estatística descritiva para analisar os resultados.

Para avaliar a significância estatística das curvas de crescimento com e sem composto, utilizou-se o software estatístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., EUA). As amostras não seguem uma distribuição normal, segundo o teste Kolmogorov-Smirnov, a sua variância foi feita pelo teste de Levene, por isso utilizou-se o teste Mann-Whitney U para amostras não paramétricas.

## **Capítulo III – Resultados**

### 3.1. Concentração mínima inibitória (MIC)

A atividade biológica dos LIs derivados do ácido valpróico encontram-se descritos na tabela

1. Do grupo de compostos apresentado, destaca-se a atividade do [valp] [cetylpir].

Tabela 1 Concentração mínima inibitória (CMI) em mM dos LIs derivados do ácido valpróico

Compostos	Microrganismos			
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> TEM 180	<i>E. coli</i> ART 19 B	<i>E. coli</i> TEM 201
[valp] [cetylpir]	0,1	0,1	0,01	0,01
[valp] [cholin]	>100	>100	>100	>100
[valp] [emim]	>100	>100	>100	>100
[valp] [C2OHMIM]	>100	>100	>100	>100
[valp] [P6,6,614]	>100	>100	>100	>100
[valp] [C3OMIM]	>100	>100	>100	>100
[valp] [C2OHDMIM]	>100	>100	>100	>100
[ácido valpróico]	>100	>100	>100	>100

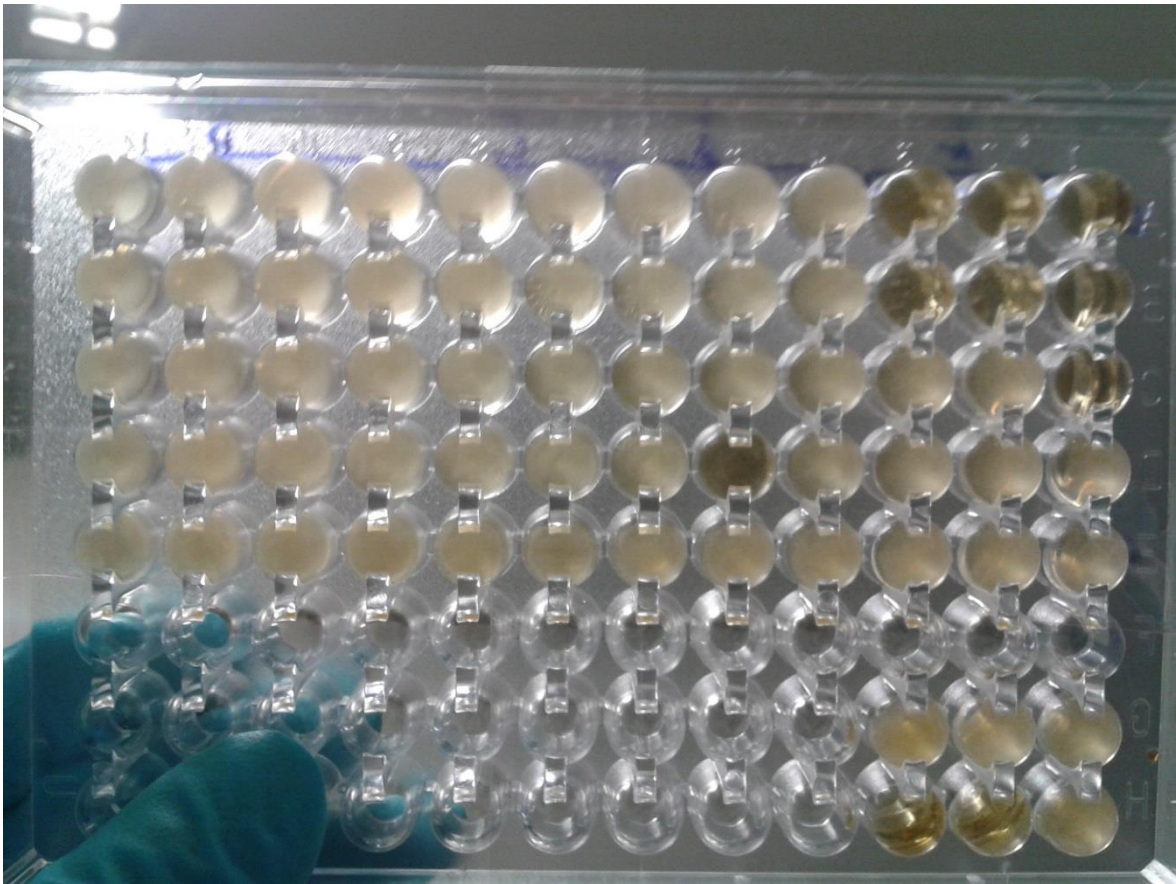


Figura 9 Exemplo da determinação da concentração mínima inibitória

### 3.2. Taxas de crescimento

O comportamento das bactérias estudadas, que apresentaram atividade biológica, na presença dos LIs, está descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Taxas de crescimento dos diferentes microrganismos na presença e ausência de [valp] [cetylpir]

Microrganismo	MIC/mM	Concentração Testada/mM	Taxa de Crescimento ( $\text{min}^{-1}$ )	
			Com [valp] [cetylpir]	Sem composto
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,1	0,01	0,0038	0,0040
<i>E. coli</i> TEM 180	0,1	0,01	0,0013	0,0019
<i>E. coli</i> ART 19 B	0,01	0,001	0,0020	0,0017
<i>E. coli</i> TEM 201	0,01	0,001	0,0024	0,0024

As figuras 10,11, 12 e 13 ilustram as curvas de crescimento para as bactérias estudadas na presença do [valp] [cetylpir] em diferentes concentrações (0,01 e 0,001 mM)

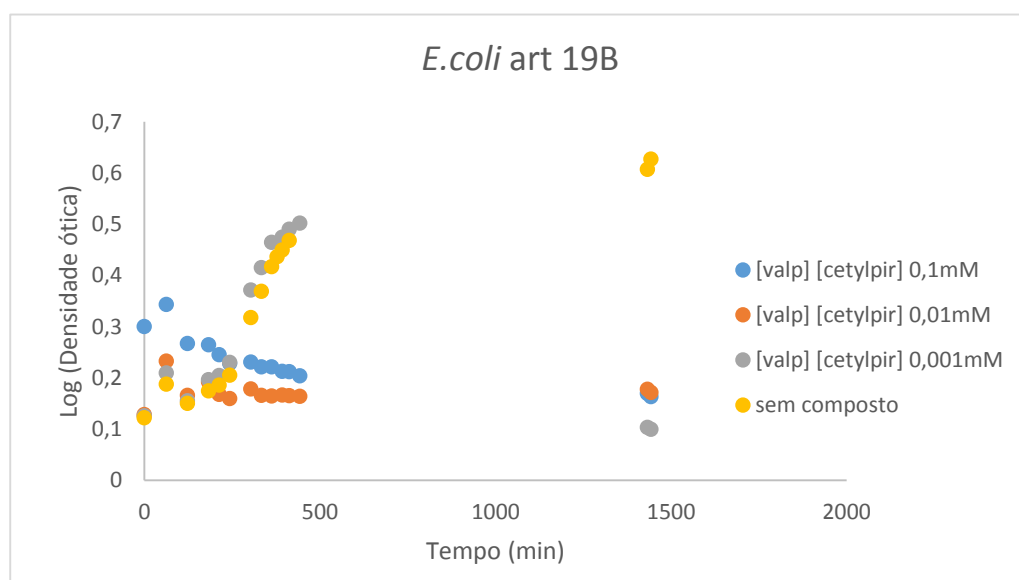


Figura 10 Representação da curva de crescimento (Log (densidade ótica) vs Tempo (min)) da *E. coli* art 19B

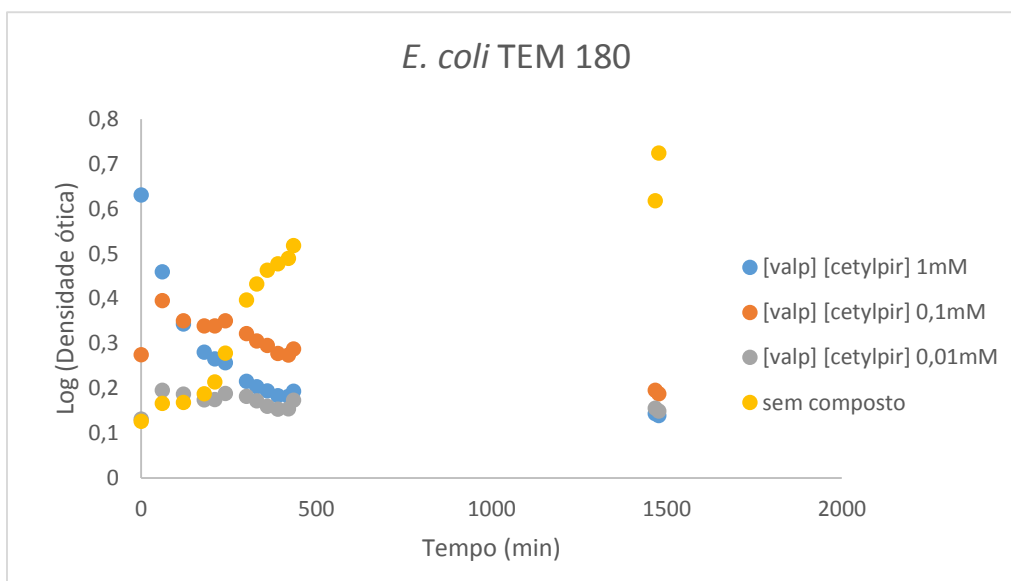


Figura 11 Representação da curva de crescimento (Log (densidade ótica) vs Tempo (min)) da *E. coli* TEM 180

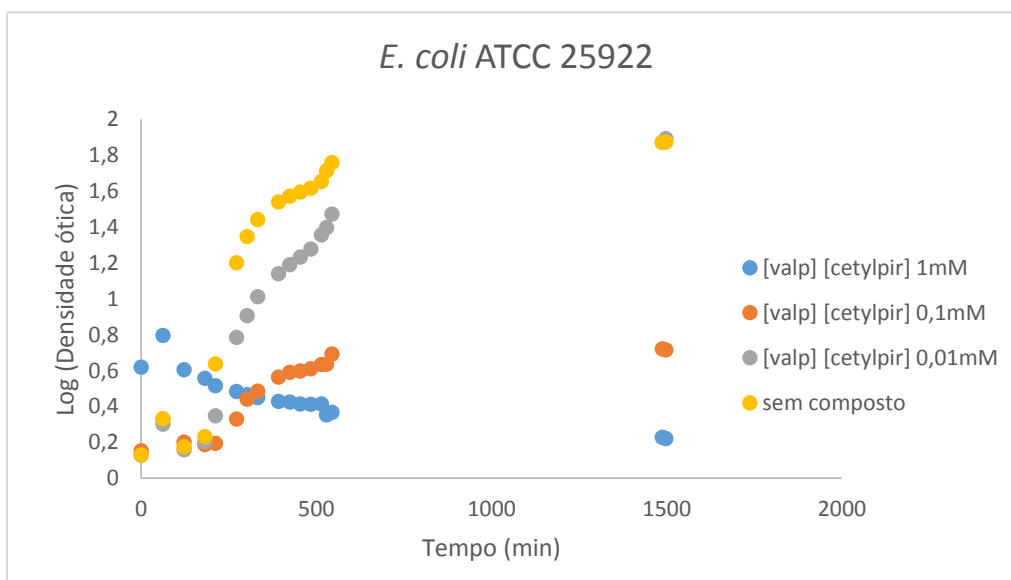


Figura 12 Representação da curva de crescimento (Log (densidade ótica) vs Tempo (min)) da *E. coli* ATCC 25922

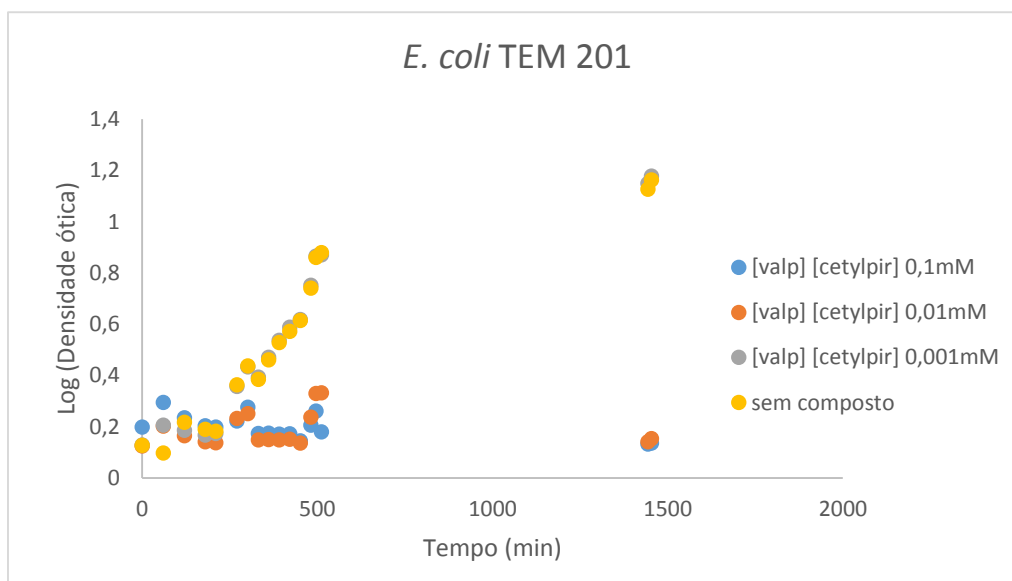


Figura 13 Representação da curva de crescimento (Log (densidade ótica) vs Tempo (min)) da E. coli TEM 201

## **Capítulo IV – Discussão e Conclusão**

## 4. Discussão e Conclusão

Neste capítulo irá ser apresentado uma breve discussão dos resultados e as respectivas conclusões.

### 4.1. Discussão dos resultados

Os LIs foram testados contra determinados microrganismos, de forma a avaliar a sua viabilidade enquanto alternativas aos fármacos atualmente disponíveis, para tratar infeções por eles provocadas e também outro tipo de patologias.

Para quantificar a atividade bacteriana de cada composto em estudo, procedeu-se à determinação da concentração mínima inibitória.

Dos compostos testados (tabela 1), o [valp][cetylpir] foi o que exibiu atividade bacteriana, apresentando atividade contra todos os microrganismos testados. Os valores de CMI obtidos foram idênticos para todas as bactérias testadas.

Uma das razões para não se ter observado atividade bacteriana em mais nenhum dos compostos, pode ser explicado pelo facto de as bactérias estudadas serem da família das *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *E. coli*. A presença da camada lipopolissacarídea (LPS) neste tipo de bactéria dificulta a permeabilização do composto. Como o catião cetilpiridínio tem uma cadeia hidrocarbonada de 16 carbonos (Figura 14), este catião pode ajudar a permeabilizar através das membranas (Ricardo Ferraz et al., 2014), no entanto é necessário mais estudos para compreender o mecanismo de ação deste composto.

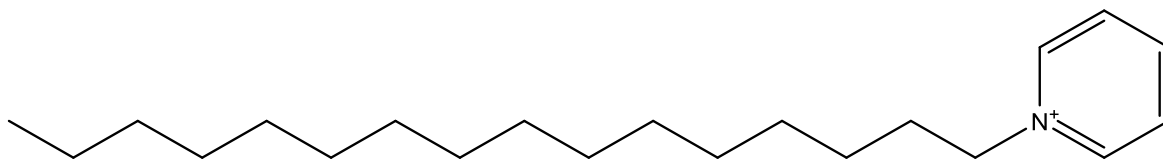


Figura 14. Estrutura do catião cetilpiridínio [Cetylpir].

De forma a completar a caracterização da atividade bacteriana, recorreu-se à determinação da taxa de crescimento. O grande objetivo é tentar compreender de que modo as concentrações dos LIs podem influenciar o crescimento das bactérias.

As retas de crescimento dos microrganismos (tabela 2) foram determinadas a partir dos valores de MIC obtidos, com o objetivo de se verificar como é que estes se comportavam em termos de crescimento na presença de três concentrações distintas (a concentração do MIC, a concentração superior ao MIC e a concentração inferior). A taxa de crescimento é dada pelo declive da reta (taxa de crescimento/minutos<sup>-1</sup>).

Tal como era de esperar, para a concentração correspondente ao valor do MIC e à concentração superior, não se registou crescimento de nenhum dos microrganismos testados.

Relativamente à concentração inferior ao MIC, apesar de não inibir o crescimento, verificou-se que em alguns dos casos é capaz de o influenciar, provocando um crescimento mais lento dos microrganismos. Apenas em um dos microrganismos testados, *E.coli* TEM 180, verificou-se que tal como no MIC e na concentração superior ao MIC, também na concentração inferior ao MIC, não se verificou crescimento.

Uma vez que o valproato é teratogénico, com os resultados obtidos, podemos tentar eliminar este fator, não tendo que eliminar o fármaco durante o 1º trimestre de gravidez. Posteriormente seria necessário realizar um estudo com linhas celulares, de forma a confirmar os resultados obtidos.

## 4.2. Conclusão

O trabalho desenvolvido permitiu demonstrar o potencial antibacteriano de LIs com o anião valproato, nomeadamente do [cetylpir][valp].

O trabalho é sugestivo de que os LIs com base no valproato podem ajudar a combater a resistência de algumas estirpes clínicas previamente isoladas. Com a seleção apropriada do catião orgânico, é possível provocar algumas variações biológicas nas propriedades antibacterianas do fármaco. Com os IFA-LIs podemos tentar combater algumas infeções de bactérias Gram-negativas, que já desenvolveram resistência contra os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Estes resultados são promissores uma vez que podem apresentar novas aplicações, especialmente a nível da resistência do fármaco, neste caso o valproato. São necessários ainda mais estudos, especialmente a nível do mecanismo de ação dos LIs. A compreensão do mecanismo em questão pode ser bastante importante para combater a resistência bacteriana. A procura do catião correto com determinadas propriedades para conjugar com um anti-bacteriano poderá ser a chave do sucesso para combater as bactérias resistentes.

A grande quantidade de microrganismos resistentes a múltiplos fármacos, tem limitado os clínicos quanto ao tratamento adequado e eficaz, aumentando o grave problema de saúde pública. Desta forma existe uma necessidade de encontrar novas soluções/aplicações para alguns fármacos. O uso de agentes antimicrobianos baseados em LIs poderá contribuir para a redução de infeções nosocomiais e os custos associados.

Futuramente, deverão ser realizados mais estudos, de forma a ser avaliada a toxicidade deste LI no ambiente e em linhas celulares humanas.

## **Capítulo V – Referências Bibliográficas**

## 5.1. Referências Bibliográficas

- Amador, P., Prudencio, C., Vieira, M., Ferraz, R., Fonte, R., Silva, N., . . . Fernandes, R. (2009). beta-Lactamases in the Biochemistry and Molecular Biology Laboratory. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 37(5), 301-306. doi: 10.1002/bmb.20324
- Antunes, J., Lestre, S., Gonçalves, A., Borges, A., Viseu, R., & Baptista, I. (2011). Necrólise Epidérmica Tóxica–Valproato de Sódio e Vancomicina?
- Bica, K., Rijkssen, C., Nieuwenhuyzen, M., & Rogers, R. D. (2010). In search of pure liquid salt forms of aspirin: ionic liquid approaches with acetylsalicylic acid and salicylic acid. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(8), 2011-2017.
- Blagden, N., de Matas, M., Gavan, P. T., & York, P. (2007). Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 617-630. doi: 10.1016/j.addr.2007.05.011
- Bryskier, A. (2005). *Antimicrobial agents: antibacterials and antifungals*: ASM press.
- Cojocar, O. A., Shamshina, J. L., Gurau, G., Syguda, A., Praczyk, T., Pernak, J., & Rogers, R. D. (2013). Ionic liquid forms of the herbicide dicamba with increased efficacy and reduced volatility. *Green Chemistry*, 15(8), 2110-2120. doi: 10.1039/c3gc37143c
- Cole, M. R., Li, M., El-Zahab, B., Janes, M. E., Hayes, D., & Warner, I. M. (2011). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of beta-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
- Costa, J. F. C. (2013). Disseminação de determinantes genéticos de resistência em isolados clínicos de três unidades hospitalares de Lisboa.
- Courvalin, P. (2005). Antimicrobial drug resistance: "Prediction is very difficult, especially about the future". *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), 1503-1506.
- Fernandes, R., Amador, P., & Prudencio, C. (2013). beta-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7-17. doi: 10.1097/MRM.0b013e3283587727
- Fernandes, R., Vieira, M., Ferraz, R., & Prudencio, C. (2008). Bloodstream infections caused by multidrugresistant Enterobacteriaceae: report from two Portuguese hospitals. *Journal of Hospital Infection*, 70(1), 93-95. doi: 10.1016/j.jhin.2008.05.007
- 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., Prudencio, C., Noronha, J. P., & Petrovski, Z. (2011). Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. *Chemmedchem*, 6(6), 975-985. doi: 10.1002/cmdc.201100082
- 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
- Ferreira, M. V. F. C., & de Sousa, J. C. F. *Microbiologia*: Lidel.
- Fleming, A. (1980). ON THE ANTI-BACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B-INFLUENZAE. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(1), 129-139.
- Florindo, C., Araujo, J. M. M., Alves, F., Matos, C., Ferraz, R., Prudencio, 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: 10.1016/j.ijpharm.2013.08.010
- Freemantle, M. (2010). *An Introduction to Ionic Liquids*: Royal Society of Chemistry.
- Goncalves-Pereira, J., & Pova, P. (2011). Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of beta-lactams. *Critical Care*, 15(5), R206.
- Gordon, C. M. (2001). New developments in catalysis using ionic liquids. *Applied Catalysis A: General*, 222(1), 101-117.
- Guimarães, S., Moura, D., & da Silva, P. S. *TERAPEUTICA MEDICAMENTOSA E SUAS BASES FARMACOLOGICAS*: PORTO EDITORA.
- Hoffman, B., Hardman, J., Limbird, L., & Goodman-Gilman, A. (2003). As bases farmacológicas da terapêutica. *As bases farmacológicas da terapêutica*.
- Hofmann, A., Schulz, M., & Hanemann, T. (2013). Gel electrolytes based on ionic liquids for advanced lithium polymer batteries. *Electrochimica Acta*, 89, 823-831.

- Hough-Troutman, W. L., Smiglak, M., Griffin, S., Reichert, W. M., Mirska, I., Jodynis-Liebert, J., . . . Pernak, J. (2009). Ionic liquids with dual biological function: sweet and anti-microbial, hydrophobic quaternary ammonium-based salts. *New Journal of Chemistry*, 33(1), 26-33. doi: 10.1039/b813213p
- Hough, W. L., & Rogers, R. D. (2007). Ionic liquids then and now: From solvents to materials to active pharmaceutical ingredients. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 80(12), 2262-2269. doi: 10.1246/bcsj.80.2262
- Hough, W. L., Smiglak, M., Rodriguez, H., Swatloski, R. P., Spear, S. K., Daly, D. T., . . . Rogers, R. D. (2007). The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry*, 31, 1429-1436. doi: 10.1039/b706677p
- Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, E., Brooks, G., Butel, J., & Ornston, L. (1998). Resistance to Antimicrobial drugs. *Medical Microbiology*, 148-150.
- Jentink, J., Loane, M. A., Dolk, H., Barisic, I., Garne, E., Morris, J. K., & de Jong-van den Berg, L. T. (2010). Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *New England Journal of Medicine*, 362(23), 2185-2193.
- Kanu, I., Anyanwu, E. C., Nwachukwu, N. C., Ehiri, J. E., & Merrick, J. (2005). Clinical microbiological aspects of epileptic seizures in the tropical countries with specific focus on Nigeria. *The Scientific World Journal*, 5, 401-409.
- Kawakami, K. (2012). Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(6), 480-495. doi: 10.1016/j.addr.2011.10.009
- Kostrouchova, M., & Kostrouch, Z. (2007). Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biologica*, 53(2), 37-49.
- Lenardão, E. J., Freitag, R. A., Dabdoub, M. J., Batista, A. C. F., & Silveira, C. d. C. (2003). Green chemistry: the 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities. *Química Nova*, 26(1), 123-129.
- MacFarlane, D. R., Pringle, J. M., Johansson, K. M., Forsyth, S. A., & Forsyth, M. (2006). Lewis base ionic liquids. *Chemical Communications*(18), 1905-1917. doi: 10.1039/b516961p
- Marrucho, I. M., Branco, L. C., & Rebelo, L. P. N. (2014). Ionic Liquids in Pharmaceutical Applications. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, Vol 5, 5, 527-546. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-060713-040024
- 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
- McCrary, P. D., Beasley, P. A., Gurau, G., Narita, A., Barber, P. S., Cojocar, O. A., & Rogers, R. D. (2013). Drug specific, tuning of an ionic liquid's hydrophilic-lipophilic balance to improve water solubility of poorly soluble active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry*, 37(7), 2196-2202. doi: 10.1039/c3nj00454f
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2012). *Medical Microbiology: with STUDENT CONSULT Online Access*: Elsevier Health Sciences.
- Mylonas, A. I., Tzerbos, F. H., Mihalaki, M., Rologis, D., & Boutsikakis, I. (2007). Cerebral abscess of odontogenic origin. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 35(1), 63-67. doi: 10.1016/j.jcms.2006.10.004
- Pernak, J., Niemczak, M., Materna, K., Marcinkowska, K., & Praczyk, T. (2013). Ionic liquids as herbicides and plant growth regulators. *Tetrahedron*, 69(23), 4665-4669. doi: 10.1016/j.tet.2013.03.097
- Pernak, J., Sobaszekiewicz, K., & Mirska, I. (2003). Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chemistry*, 5(1), 52-56. doi: 10.1039/b207543c
- Pitout, J. D. D., Sanders, C. C., & Sanders, W. E. (1997). Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *American Journal of Medicine*, 103(1), 51-59.
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, A. (2005). Drug Resistance, WCB McGraw-Hill. *Microbiology 6th International Edition*, 1212.
- Rodriguez, H., Bica, K., & Rogers, R. D. (2008). Ionic Liquid Technology: A Potential New Platform for the Pharmaceutical Industry. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1011-1012.
- Rogers, R., Daly, D. T., Swatloski, R. P., Hough, W. L., Davis, J. H., Smiglak, M., . . . Spear, S. K. (2007).
- Singh, R. P., Verma, R. D., Meshri, D. T., & Shreeve, J. M. (2006). Energetic nitrogen-rich salts and ionic liquids. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45(22), 3584-3601. doi: 10.1002/anie.200504236
- Soltanpour, S., & Jouyban, A. (2010). Solubility of acetaminophen and ibuprofen in polyethylene glycol 600, propylene glycol and water mixtures at 25 degrees C. *Journal of Molecular Liquids*, 155(2-3), 80-84. doi: 10.1016/j.molliq.2010.05.011

- Stoimenovski, J., MacFarlane, D. R., Bica, K., & Rogers, R. D. (2010). Crystalline vs. Ionic Liquid Salt Forms of Active Pharmaceutical Ingredients: A Position Paper. *Pharmaceutical Research*, 27(4), 521-526. doi: 10.1007/s11095-009-0030-0
- Swatloski, R. P., Holbrey, J. D., & Rogers, R. D. (2003). Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *Green Chemistry*, 5(4), 361-363. doi: 10.1039/b304400a
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775-781. doi: 10.1038/35021219
- Wang, K.-W., Chang, W.-N., Chang, H.-W., Chuang, Y.-C., Tsai, N.-W., Wang, H.-C., & Lu, C.-H. (2005). The significance of seizures and other predictive factors during the acute illness for the long-term outcome after bacterial meningitis. *Seizure*, 14(8), 586-592.
- Wilkes, J. S. (2002). A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. *Green Chemistry*, 4(2), 73-80.
- Wilkes, J. S., Levisky, J. A., Wilson, R. A., & Hussey, C. L. (1982). DIALKYLIMIDAZOLIUM CHLOROALUMINATE MELTS - A NEW CLASS OF ROOM-TEMPERATURE IONIC LIQUIDS FOR ELECTROCHEMISTRY, SPECTROSCOPY, AND SYNTHESIS. *Inorganic Chemistry*, 21(3), 1263-1264. doi: 10.1021/ic00133a078
- Wilkes, J. S., & Zaworotko, M. J. (1992). Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*(13), 965-967.
- Zhao, D., Wu, M., Kou, Y., & Min, E. (2002). Ionic liquids: applications in catalysis. *Catalysis today*, 74(1), 157-189.