

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DO PORTO

INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Joana Alexandra Gomes Ferreira

**Estudo da atividade biológica de líquidos iónicos
baseados em bis-piridínios em bactérias
Gram-positivas e Gram-negativas.**

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, realizado sob a orientação científica do Professor Doutor Ricardo Ferraz* e coorientação da Professora Doutora Cristina Prudêncio*.

* Ciências Químicas e das Biomoléculas, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto.

Setembro, 2015

Dedicatória

“Há tanta suavidade em nada dizer e tudo se entender”

Fernando Pessoa

Quero dedicar este trabalho a quem compreendeu as minhas ausências e as minhas presenças ausentes.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os meus familiares e amigos por todo o apoio, incentivo, motivação e força que me transmitiram ao longo deste percurso e por me fazerem perceber o quanto valia a pena.

Aos meus colegas de laboratório, Liliana Teixeira e Sofia Oliveira, pelo companheirismo, ajuda e compreensão nos momentos mais complicados.

À Farmácia Central da Liga A.S.M. do Porto, por toda a compreensão demonstrada, e aos meus colegas, pelo aumento de trabalho que a minha ausência provocou.

À Professora Cristina Prudêncio e a todos os professores, que ao longo dos últimos 2 anos tive o prazer de conhecer, pela orientação e disponibilidade sempre que necessário.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Professor Ricardo Ferraz, pela total disponibilidade demonstrada, pela orientação e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Resumo

As resistências aos antibióticos estão a tornar-se um problema de saúde pública, estando a preocupar as várias entidades mundiais. Assim sendo, a descoberta de novas alternativas para combater infeções microbianas é crítica.

Os líquidos iónicos (LIs) surgem, neste contexto, como um recurso a ser utilizado na indústria farmacêutica, nomeadamente na síntese de novos antibióticos. LIs demonstram a capacidade de melhorar as características dos ingredientes farmacêuticos ativos (API). No entanto, esta não é apenas a relevância destes compostos: propriedades antimicrobianas também têm sido descritas. LIs combinados com APIs ou LI como um API estão a dar uma nova perspetiva aos antibióticos. Os bis-piridínios estão, agora, a ser alvo de estudos também nesta área. Propriedades antimicrobianas de bis-piridínio têm sido descritas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de seis bis-piridínios como antimicrobianos.

Os LIs derivados de bis-piridínio foram sintetizados e purificados pelo grupo Luís C. Branco da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, e usado após a confirmação das estruturas e pureza por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. As bactérias utilizadas pertencem à coleção de Química e Biomoléculas da ESTSP.

Para avaliar a atividade biológica dos compostos foram determinados os valores de concentração mínima inibitória (MIC), pelo método de microdiluição, de acordo com a metodologia do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). A determinação das taxas de crescimento também foi feita pelo método de microdiluição.

Foram estudados 12 LIs contra 9 estirpes bacterianas, muitas das quais resistentes aos antibióticos. Apenas três dos compostos não mostraram nenhuma atividade antimicrobiana para as concentrações estudadas (<5 mM). Dois LIs mostraram atividade biológica contra todas as bactérias estudadas, incluindo o *S.aureaus* MRSA ATCC 43300. Seis dos sete restantes compostos demonstraram atividade biológica contra a maioria das bactérias estudadas. Só um composto mostrou atividade contra uma única bactéria. Os LIs bis-piridínios têm atividade biológica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias resistentes. Assim, estes compostos devem ser tidos em conta na busca de novas moléculas antibacterianas (síntese de novos antibióticos ou desinfetantes).

Palavras-chave: Líquidos Iónicos; Antibióticos; Resistências bacterianas; Bis-piridínios; Bactérias Gram-positivas; Bactérias Gram-negativas

Abstract

Resistance to antibiotics is becoming a public health problem and is the subject of concern from various global entities. In this context, finding new alternatives to combat microbial infections is critical.

Ionic liquids (IL) come up as a resource to be used in the pharmaceutical industry, especially in the synthesis of new antibiotics. The ILs has shown the ability to improve the characteristics of active pharmaceutical ingredients (APIs). However this is not only the relevance of these compounds, antimicrobial properties also have been described. ILs combined with APIs or ILs as an API is to give a new perspective to antibiotics. The bis-pyridinium is now being targeted also of the studies of this area. Antimicrobial properties of bis-pyridinium have been described.

The purpose of this study is to evaluate the activity of bis-pyridinium salts as antimicrobial.

The ILs derived from bis-pyridinium were synthesized and purified by Luís C. Branco Group, Faculty of Science and Technology, New University of Lisbon, and used after confirmation of the structures and purity by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. The bacteria used belong to the collection of Chemistry and Biomolecules of ESTSP.

To evaluate biological activity of the compounds were determined the Minimum Inhibitory Concentration values by the microdilution method according to the methodology of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Determination of growth rates was also made by microdilution method.

We studied 12 ILs against 9 different bacterial strains, many of which are resistant to antibiotics. Only 3 of the compounds showed no antimicrobial activity for the studied concentrations (<5 mM). Two ILs showed biological activity against all studied bacteria, including *S.aureaus* MRSA ATCC 43300. Six of seven remaining compounds demonstrated activity biological against most studied bacteria. Only one compound showed activity against a single bacterium.

The bis-pyridinium IL has biological activity against gram positive and gram negative bacteria including resistant bacteria. So these compounds must be taking into account in the search for new antibacterial molecules (synthesis of new antibiotics or disinfectants).

Keywords: Ionic Liquids; Antibiotics; Bacterial resistance; Bis-pyridinium; Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria

Índice

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Índice Abreviaturas.....	vii
Índice de Tabelas	viii
Índice de Figuras.....	x
Âmbito do Trabalho	1
Capítulo I - Líquidos Iônicos: Nova classe de Antibióticos?	2
1. Resistências aos Antibióticos.....	2
2. Novos Antibióticos.....	4
3. Líquidos Iônicos (LIs)	7
4. Líquidos Iônicos na indústria farmacêutica	10
5. Líquidos Iônicos com propriedades antimicrobianas	13
i. API-LIs antimicrobianos.....	13
ii. Líquidos Iônicos como APIs antimicrobianos	14
6. Bis-piridínios como antimicrobianos.....	17
7. Toxicidade dos Líquidos Iônicos: estruturas químicas.....	18
8. Objetivo do estudo	22
Capítulo II - Materiais e métodos	24
1. Materiais	24
2. Métodos	26
i. Preparação das Culturas.....	26
ii. Preparação das Soluções	27
iii. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	28
iv. Determinação das Taxas de Crescimento.....	29
3. Análise Estatística	30
Capítulo III - Resultados	31
Capítulo IV - Discussão	56
Conclusão.....	63
Referências Bibliográficas	64
Anexos	68

Índice Abreviaturas

AOT - Docusato ou dioctil sulfosuccinato

API- Ingrediente Farmacêutico ativo

CDC - Centro para Controlo e Prevenção de Doenças

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute

DGS - Direção Geral de Saúde

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO - Densidade óptica

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças

LI - Líquido Iónico

MIC - Concentração Mínima Inibitória

OMS - Organização Mundial de Saúde

QSAR - Quantitative structure–activity relationship

TSA - Tryptic Soy Agar

TSB - Tryptic Soy Broth

Índice de Tabelas

Tabela I - Quadro síntese de algumas aplicações dos Lis	9
Tabela II - Lis derivados de bis-piridínios estudados.	24
Tabela III - Estirpes bacterianas utilizadas no estudo.....	26
Tabela IV -Tabela resumo das informações necessárias para a preparação das soluções de cada LI.	27
Tabela V - Esquema do processo de preparação das soluções dos LI. Por exemplo: preparação da solução BA recorrendo à tabela IV, esterilização recorrendo ao filtro de seringa de porosidade 0,2µm e consecutivas diluições utilizando 100 µl da solução anterior e 900 µl de solvente, tal como descrito pelo esquema.	28
Tabela VI - Concentração Mínima Inibitória de cada composto para cada estirpe bacteriana	33
Tabela VII - Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do 4,4'-bpy (BA) para cada estirpe bacteriana estudada	35
Tabela VIII – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [C1bpy]I (BC) para cada estirpe bacteriana estudada.	39
Tabela IX – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [C3Obpy][AOT] (BE) para cada estirpe bacteriana estudada.....	40
Tabela X – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [C3H4bpy][AOT] (BG) para cada estirpe bacteriana estudada.....	44
Tabela XI – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [C2OHbpy]I (BH) para cada estirpe bacteriana estudada.	46
Tabela XII – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [Hbpy]Cl (BI) para cada estirpe bacteriana estudada.	50
Tabela XIII – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [Hbpy]Me (BJ) para cada estirpe bacteriana estudada	51
Tabela XIV – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [H2bpy]Cl2 (BK) para cada estirpe bacteriana estudada.	52
Tabela XV – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [H2bpy][Me]2 (BL) para cada estirpe bacteriana estudada.....	53
Tabela XVI – Analisando a Tabela VI e XVII obtemos esta tabela, que nos indica, por ordem decrescente, os compostos com maior inibição do crescimento bacteriano, tendo em consideração as concentrações mínimas inibitórias e os fatores decrescentes.	54

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela XVII - Resumo dos fatores decrescentes dos LIs, com bioatividade, para cada estirpe bacteriana estudada. Os valores que apresentam a mesma cor de sombreado indicam, para a respectiva estirpe bacteriana, concentrações de MIC iguais, permitindo, assim, comparar os efeitos das estruturas químicas dos LIs na inibição do crescimento bacteriano.55

Tabela XVIII - LIs derivados de bis-piridínios estudados.59

Índice de Figuras

Figura I - O gráfico representa as classes de antibióticos que foram surgindo ao longo do tempo. Verifica-se que os compostos sintetizados recentemente são uma 2ª ou até mesmo 3ª geração das classes iniciais (Bush, 2012).....	5
Figura II - Resumo dos resultados do estudo desenvolvido por Roy <i>et al.</i> que avaliou a toxicidade de Lis para <i>Daphnia magna</i> através de modelos estatísticos (Roy et al., 2014).	21
Figura III - - Suscetibilidade das bactérias Gram-positivas aos 12 Lis estudados. Verifica-se que em 36% dos ensaios existe inibição do crescimento bacteriano (bactérias suscetíveis).	31
Figura IV - Suscetibilidade das bactérias Gram-negativas aos 12 Lis estudados. Verifica-se que em 55% dos ensaios existe inibição do crescimento bacteriano (bactérias suscetíveis).	32
Figura V - Quadro síntese das médias das concentrações mínima inibitória por grupo quanto à coloração de Gram. Para os compostos BC, BE e BG verifica-se que são necessárias maiores concentrações de composto para inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas em comparação com as concentrações necessárias para a inibição das Gram-positivas. As bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis do que as Gram-negativas aos compostos BC, BE e BG.....	32
Figura VI - Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> Oxa-1-Like na presença/ausência do LI BA. .	34
Figura VII - Curvas de crescimento da <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300 na presença/ausência do LI BC.....	36
Figura VIII - Resultado do teste de microdiluição após 24h a 37°C do <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300 na presença do LI BA e BC.....	36
Figura IX - Curvas de crescimento da <i>Enterococcus faecalis</i> na presença/ausência do LI BC.....	37
Figura X – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180 na presença/ausência do LI BC. .	37
Figura XI - Resultado do teste de microdiluição após 24h a 37°C do <i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180 na presença do LI BA e BC.....	38
Figura XII – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 na presença/ausência do LI BC.	38
Figura XIII - Curvas de crescimento da <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 na presença/ausência do LI BE.....	41
Figura XIV – Curvas de crescimento da <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300 na presença/ausência do LI BE.....	41
Figura XV – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209 na presença/ausência do LI BE.	42

Figura XVI – Curvas de crescimento da <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 na presença/ausência do LI BG	42
Figura XVII – Curvas de crescimento da <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300 na presença/ausência do LI BG.	43
Figura XVIII – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180 na presença/ausência do LI BH.....	45
Figura XIX – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> ART 19B na presença/ausência do LI BH. .	45
Figura XX – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180 na presença/ausência do LI BJ.	47
Figura XXI - Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like na presença/ausência do LI BJ.	48
Figura XXII – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209 na presença/ausência do LI BK.	48
Figura XXIII – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 na presença/ausência do LI BL.	49
Figura XXIV – Curvas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180 na presença/ausência do LI BL.	49

Âmbito do Trabalho

Nos Estados Unidos, segundo o CDC (Centro para Controlo e Prevenção de Doenças), estima-se que, em 2013, as ameaças de resistência a antibióticos causaram mais de 2 milhões de doenças e 23.000 mortes e que, em 2011, essas ameaças foram responsáveis por cerca de mais 18 milhões de euros gastos em cuidados de saúde, de 8 milhões adicionais de dias de internamento hospitalar e de 32 milhões de euros em custos sociais (Breedlove & Cohen, 2014).

Na Europa, o ECDC (Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças) estimou que o número de mortos resultantes de infeções hospitalares com bactérias resistentes excede os 25.000 pacientes por ano (Stedt et al., 2014).

Em Portugal, segundo a DGS (Direção Geral de Saúde), existe uma elevada taxa de resistência bacteriana aos antimicrobianos, o consumo hospitalar de antimicrobianos é superior à média europeia e a taxa global de infeção hospitalar é mais elevada do que a média europeia (Portugal, 2014).

Infeções graves, causadas por bactérias que se tornaram resistentes aos antibióticos comumente utilizados, tornaram-se um grande problema de saúde pública mundial no século XXI (Alanis, 2005; Plachouras et al., 2014; van Bijnen et al., 2014). As resistências aos antibióticos tornaram-se uma preocupação tão global que foi o foco do Dia Mundial da Saúde em 2011 patrocinado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) (Vernet et al., 2014).

Desde 1980, cerca de 40 novos agentes patogénicos foram identificados como ameaças ao Homem, e 12% desses patogénicos foram classificados como emergentes ou re-emergentes (Breedlove & Cohen, 2014).

Neste contexto, faz todo o sentido a preocupação da comunidade científica em controlar o aumento das resistências bacterianas aos antibióticos, bem como em encontrar alternativas eficazes e viáveis de tratamento. Assim sendo, ao longo do primeiro capítulo deste trabalho, serão abordados alguns dos estudos, baseados em líquidos iónicos (LIs), cujo objetivo foi encontrar novos ou melhorados compostos contra as resistências bacterianas. Neste sentido, será feito, inicialmente, um enquadramento da problemática resistências aos antibióticos vs novos antibióticos.

Capítulo I - Líquidos Iônicos: Nova classe de Antibióticos?

1. Resistências aos Antibióticos

As causas das resistências aos antibióticos são complexas e incluem o comportamento humano a muitos níveis da sociedade (Laxminarayan et al., 2013); as escolhas individuais a longo prazo traduzem-se em consequências que afetam a globalidade da população.

Os antibióticos permitiram desenvolvimentos médicos e sociais sem precedentes, e são indispensáveis em todos os sistemas de saúde. Conquistas na medicina moderna, como grandes cirurgias, transplante de órgãos, quimioterapia, entre outros, que hoje tomamos como adquiridos, não seriam possíveis sem o acesso ao tratamento eficaz para infecções bacterianas. Dentro de poucos anos podemos ser confrontados com reveses terríveis a nível médico, social e económico (Cars, Hedin, & Heddini, 2011; Laxminarayan et al., 2013).

A eficácia dos antibióticos no tratamento de infecções comuns tem sofrido grandes danos nos últimos anos; estamos a entrar numa era pós-antibiótico, semelhante à era pré-antibiótico, o que é um cenário verdadeiramente alarmante (Breedlove & Cohen, 2014; Laxminarayan et al., 2013).

As resistências surgem como consequência de mutações em bactérias e da seleção destas pelo meio ambiente e pelo uso dos antibióticos, que proporciona uma vantagem competitiva para as estirpes mutantes (Laxminarayan et al., 2013; Wellington et al., 2013).

As resistências antimicrobianas não são novas, mas o número de organismos resistentes, as localizações geográficas afetadas, e a amplitude das resistências em organismos individuais não têm precedentes (Levy & Marshall, 2004).

Muitos fatores são responsáveis por esta crise que aumenta a nossa vulnerabilidade, nomeadamente: o uso intensivo, prolongado e em alguns casos até indevido de antibióticos na medicina humana, veterinária e na agricultura; as mudanças climáticas globais; as modernas práticas agrícolas, da indústria e da produção alimentar; bem como a rápida e acessível mobilidade global (Andersson, 2003; Breedlove & Cohen, 2014).

Como se pode verificar, são várias as causas que podem desencadear a seleção de bactérias resistentes. No entanto, a mais frequentemente investigada, é o uso excessivo e inadequado dos antibióticos (Plachouras et al., 2014). A resistência aos antibióticos tem sido associada

ao consumo de antibióticos (Plachouras et al., 2014). Vários estudos publicados expressam esta correlação.

Mais de 90% dos antibióticos para uso humano na Europa, são prescritos nos cuidados primários (van Bijnen et al., 2014). Assim sendo, vários estudos defendem a prescrição cautelosa e adequada de antibióticos para controlar o aparecimento de resistências (van Bijnen et al., 2014). Um tratamento, por antibióticos, inadequado terá vários efeitos indesejáveis a vários níveis. Para o utente, uma vez que a eficácia do tratamento será limitada; para o sistema de saúde, com o aumento dos custos e para a saúde pública. A exposição a antibióticos pode levar a um aumento da resistência aos antimicrobianos (van Bijnen et al., 2014).

O problema das resistências aos medicamentos antimicrobianos é generalizado. Os doentes estão a adquirir infeções resistentes a fármacos para os quais pode não haver nenhuma terapêutica ativa (Drlica & Perlin, 2010). Infeções resistentes aos medicamentos antimicrobianos, tais como *Staphylococcus aureus* MRSA, espalharam-se para além dos cuidados de saúde e agora causam doença em contextos comunitários (Alanis, 2005; Drlica & Perlin, 2010).

O *Staphylococcus aureus* faz parte da flora comensal. Manifesta-se principalmente em infeções da pele e dos tecidos moles (Rodriguez, Hogan, Burnham, & Fritz, 2014). A incidência destas infeções nos cuidados primários é relativamente alto, tornando-se uma causa significativa para as prescrições de antibióticos (van Bijnen et al., 2014). Tradicionalmente, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) limitou-se a hospitais e instalações de cuidados prolongados, mas, na última década, infeções por MRSA também apareceram em indivíduos residentes na comunidade saudáveis (Tattevin, 2011). Diversos estudos demonstram a importância da flora comensal como um reservatório de resistências bacterianas, a partir do qual a resistência pode ser adquirida pelos agentes patogénicos (van Bijnen et al., 2014).

Um estudo retrospectivo de bactérias *Escherichia coli* recuperadas a partir de amostras humanas e de alimentos de origem animal durante 1950-2002 foi realizado para avaliar as mudanças históricas na resistência aos medicamentos antimicrobianos (Tadesse et al., 2012). Um total de 1729 isolados de *E. coli* (983 a partir de seres humanos, 323 do gado, 138 a partir de galinhas e 285 a partir de suínos) foram testados quanto à sua

susceptibilidade a 15 antimicrobianos (Tadesse et al., 2012). Numa tendência significativamente crescente, foram observadas resistências para ampicilina, sulfonamidas e tetraciclina (Tadesse et al., 2012). Linhagens provenientes de animais mostraram um aumento da resistência a 11 dos 15 agentes antimicrobianos, incluindo ampicilina, sulfonamida, e gentamicina (Tadesse et al., 2012). A multirresistência (3 classes de fármacos antimicrobianos) nas *E. coli* aumentou de 7,2% na década de 1950 para 63,6% durante os anos 2000 (Tadesse et al., 2012). Esses dados descrevem a evolução da resistência após a introdução de novos agentes antimicrobianos na medicina clínica e ajuda a explicar a gama de resistência nos atuais isolados de *E. coli* (Tadesse et al., 2012).

A resistência aos antibióticos tem emergido como um dos maiores desafios da saúde global a ser abordada no século XXI (Cars et al., 2011). O risco de resistência aos antibióticos generalizada ameaça mitigar as mudanças positivas feitas na modernização dos sistemas de cuidados de saúde (Cars et al., 2011). Num mundo globalizado, um espectro de diferentes intervenções e tecnologias da saúde deve ser empregado para conter a resistência aos antibióticos (Cars et al., 2011).

A falência dos antibióticos parece, neste cenário, iminente. Novas moléculas antimicrobianas são urgentes.

2. Novos Antibióticos

Os antibióticos estão a tornar-se obsoletos e a descoberta de novos antibióticos estagnou (Alanis, 2005; Laxminarayan et al., 2013).

Entre 1929 e 1970 mais de 20 novas classes de antibióticos surgiram no mercado. Desde então pouco de novo tem surgido (Laxminarayan et al., 2013). Depois de 2000 surgiu a linezolida (Zappia et al., 2007) e a daptomicina (Fenton, Keating, & Curran, 2004), novas classes com bioatividade contra as Gram-positivas.

A multirresistência aos antibióticos está a tornar-se comum no ambiente hospitalar, com poucos antibióticos disponíveis para tratamento, e, ainda, menos fármacos em preparação (Bush, 2012). Algumas bactérias Gram-negativas, tais como *K. pneumoniae* NDM-1, já são resistentes a quase todos os antibióticos, incluindo os carbapenemos. Os investigadores procuram encontrar tratamentos para bactérias altamente resistentes com a gama de classes disponíveis (Laxminarayan et al., 2013).

Muitos microbiologistas, médicos e organizações de saúde estão a repreender as empresas farmacêuticas por terem os programas de investigação e desenvolvimento de anti-infecciosos abandonados (Bush, 2012). Em muitos casos, as grandes empresas farmacêuticas, têm terminado os programas de investigação anti-infecciosos por completo, devido a razões económicas (Alanis, 2005). Não é vantajoso investir milhões na descoberta de medicamentos que rapidamente vão deixar de ser eficazes.

Há uma falha massiva da indústria farmacêutica para identificar novas classes de antibióticos ao longo dos últimos 20 anos (Bush, 2012; Laxminarayan et al., 2013). O termo "défice de inovação" tem sido usado para descrever a escassez de novas classes estruturais introduzidas no arsenal antibacteriano desde 1962 (Bush, 2012). Isto foi devido, em parte, à falta de sucesso dos programas de descoberta de fármacos que incidiu sobre compostos de triagem para atividade contra enzimas isoladas ou a alvos genómicos inexplorados (Bush, 2012).

Os poucos compostos antibacterianos que inibiram novos alvos (não utilizadas por antibióticos atualmente aprovadas para comercialização) raramente progrediram na Fase II de ensaios clínicos (Bush, 2012). Historicamente, há maior probabilidade de sucesso nos compostos melhorados das velhas classes de antibióticos - Figura 1 (Bush, 2012).

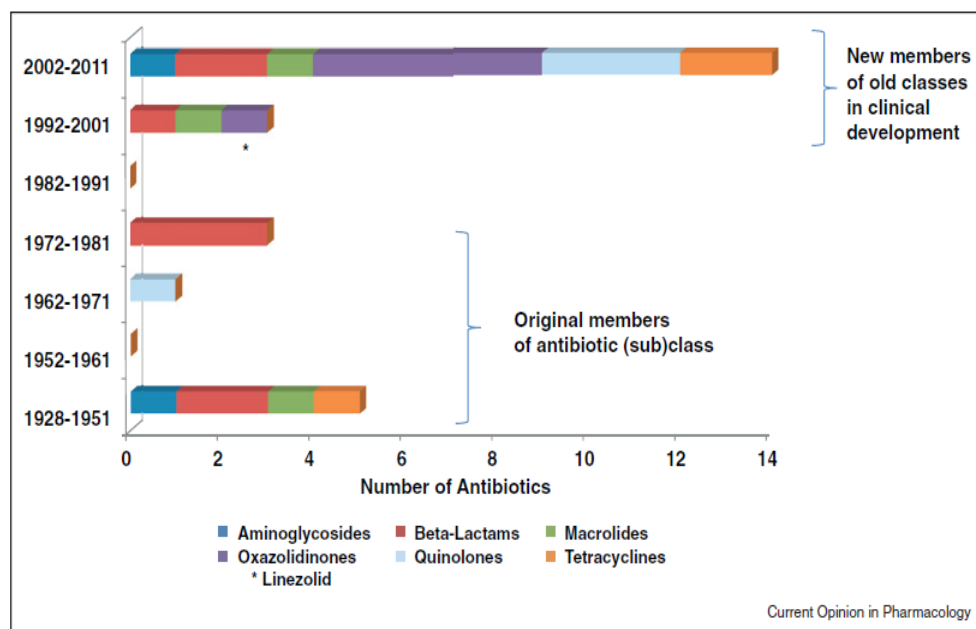


Figura I - O gráfico representa as classes de antibióticos que foram surgindo ao longo do tempo. Verifica-se que os compostos sintetizados recentemente são uma 2ª ou até mesmo 3ª geração das classes iniciais (Bush, 2012).

Outra razão para a escassez de novas moléculas antimicrobianas é comercial. Os antibióticos, em particular, têm um pobre retorno do investimento pois são utilizados por um curto período de tempo em comparação com os fármacos de tratamento de doenças crônicas (Spellberg, 2011) . "As empresas descobriram que fazem mais dinheiro a vender os fármacos para doenças crônicas do que a vender antibióticos", diz Spellberg, destacando a falta de incentivo para as empresas para desenvolver antibióticos (Spellberg, 2011).

Freire-Moran fez um estudo de revisão com o objetivo de encontrar agentes antibacterianos em desenvolvimento (Freire-Moran et al., 2011). De entre 90 compostos que cumpriam os critérios de inclusão, só 66 foram novas substâncias ativas (Freire-Moran et al., 2011). Quinze destes podem ser administrados sistemicamente e foram avaliados como atuando através de um novo ou possivelmente novo mecanismo de ação ou sobre um novo ou possivelmente novo alvo (Freire-Moran et al., 2011). Destes, 12 apresentaram atividade *in vitro* contra bactérias Gram-positivas resistentes e apenas quatro apresentaram atividade *in vitro* contra bactérias Gram-negativas resistentes (Freire-Moran et al., 2011). Desses quatro, dois atuaram em novos alvos, mas nenhum atuou através de novos mecanismos de ação (Freire-Moran et al., 2011).

Há uma necessidade urgente em combater a falta de tratamentos eficazes para atender à crescente problemática de saúde pública causado por bactérias multirresistentes (Freire-Moran et al., 2011).

Encontrar maneiras de acelerar o desenvolvimento de novos medicamentos e ferramentas de diagnóstico juntamente com o uso adequado dos mesmos é uma estratégia (Cars et al., 2011).

Existem várias possibilidades de proteção contra microrganismos patogênicos, como, por exemplo, a preparação de novas vacinas contra estirpes bacterianas resistentes, o uso de bacteriófagos específicos e a procura de novos antibióticos (Spížek, Novotná, Řezanka, & Demain, 2010).

Segundo Spížek et al a pesquisa de novos antibióticos pode incluir:

- A procura de novos antibióticos a partir de fontes tradicionais ou menos tradicionais;

- O sequenciamento de genomas microbianos com o objetivo de encontrar genes para a biossíntese específica de antibióticos;
- Análise do DNA ambiental (metagenômica);
- Reexaminar compostos e produtos esquecidos;
- Investigar novos alvos para os antibióticos.

Idealmente novas moléculas devem ser descobertas, mas, paralelamente, têm que ser protegidas com políticas melhores e mais eficazes de administração.

Neste contexto, de urgente necessidade de novos agentes antibacterianos, surge os LIs com potencial antimicrobiano. Os LIs são alvo de inúmeros estudos e suscitam cada vez mais interesse.

3. Líquidos Iônicos (LIs)

Os LIs são definidos como sais cujas temperaturas de fusão estão abaixo dos 100 ° C (Kurnia et al., 2014; Nishimura & Ohno, 2014; Stoimenovski, MacFarlane, Bica, & Rogers, 2010). Os LIs são sais orgânicos compostos, geralmente, por um catião orgânico volumoso e um anião, que pode ser orgânico ou inorgânico (Kurnia et al., 2014).

Os LIs são constituídos inteiramente por iões e são líquidos á temperatura ambiente ou abaixo desta (Moniruzzaman & Goto, 2011; Pinto et al., 2013). Em função da sua solubilidade em água, que deriva quase sempre do anião, são classificados em duas categorias: hidrofóbicos ou hidrofílicos (Moniruzzaman & Goto, 2011).

LIs possuem diversas características físico-químicas de interesse, nomeadamente pressão de vapor negligenciável, múltiplas interações de solvatação com componentes orgânicos e inorgânicos, excelente estabilidade química e térmica, elevada condutividade iónica e amplas faixas de temperaturas (Moniruzzaman & Goto, 2011; Pinto et al., 2013).

Os LIs são compostos especiais porque propriedades como a densidade, viscosidade, solubilidade na água, bem como a toxicidade são facilmente alterados (Kurnia et al., 2014; Pinto et al., 2013). Tanto o catião como o anião dos LIs podem ser molecularmente manipulados para adquirirem propriedades físico-químicas específicas de forma a satisfazer a exigência de determinada aplicação pelo que são “personalizáveis” (Kurnia et al., 2014; Wang, Chi, & Mu, 2014).

Todas estas características levam ao crescente aumento do interesse quer da indústria quer dos académicos neste tipo de compostos (Moniruzzaman & Goto, 2011; X. Wang et al., 2014). Apesar de todas estas características excelentes, a que mais se destaca é a capacidade de ajustar as propriedades químicas e físicas em função do objetivo, selecionando diferentes combinações de catiões e aniões. (Moniruzzaman & Goto, 2011)

Durante a última década, o interesse nos LIs aumentou significativamente, devido ao seu potencial como solvente ou reagente num largo leque de aplicações (Moniruzzaman & Goto, 2011). Os LIs podem ser utilizados em vários campos, nomeadamente extração, separação, como catalisador, na produção de matérias, na tecnologia de análise bem como na energia (X. Wang et al., 2014).

As propriedades de transporte (taxas de difusão, condutividade térmica bem como viscosidade) dos LIs desempenham um papel fundamental nos processos químicos e de engenharia (X. Wang et al., 2014).

O uso dos LIs nas aplicações farmacêuticas, principalmente na área médica é muito limitado, isto devido à falta de informação sobre a toxicidade, pureza, biodegradação, bem como aprovação regulamentar (Moniruzzaman & Goto, 2011). No entanto parece ter um futuro promissor nesta área, dado que diversos estudos de toxicidade não excluem os LIs como possíveis solventes (Moniruzzaman & Goto, 2011).

Há cerca de 100 anos atrás, Paul Walden informou que o ponto de fusão do nitrato etilamónio é de 12° C, sendo este, provavelmente o primeiro relato dos LIs. Em 1992 LIs estáveis no ar e na água foram relatados. Mas só a partir do ano 2000 é que a bibliografia sobre este tipo de composto foi explosivamente crescente, muito devido á possibilidade de manipulação dos iões constituintes dos LIs (Nishimura & Ohno, 2014).

A possibilidade de sintetizar compostos com propriedades físico-químicas pré-selecionadas permitiu a exploração destes compostos em diversas áreas (Pinto et al., 2013) -Tabela 1.

Tabela I - Quadro síntese de algumas aplicações dos LIs

Algumas Aplicações LIs	
Indústria Energética	<ul style="list-style-type: none">• Electrólitos para baterias, células de sensibilidade solar e células termoelectroquímicas (MacFarlane et al., 2014).• Separação da água para produção de hidrogénio (utilizados para sintetizar um dos catalisadores da oxidação da água com melhor desempenho) (MacFarlane et al., 2014).• Eletrólitos de células de combustível (devido á elevada condutividade permite ás células de combustível operarem na região de temperatura ótima - acima dos 100° C) (van de Ven et al., 2013).• Captura e separação de CO₂ e SO₂ - Uma abordagem para controlar as emissões de gases ácidos provenientes da queima de combustíveis fósseis e a captura da pós-combustão. A absorção seletiva num líquido é a opção mais atraente para a separação de gases (Anderson, Dixon, Maginn, & Brennecke, 2006; MacFarlane et al., 2014).
Indústria dos Materiais	<ul style="list-style-type: none">• LIs com um papel importante nos materiais de armazenamento de energia térmica (Pinto et al., 2013) .• Embora o número de exemplos seja ainda bastante limitado, a utilidade de líquidos iónicos para síntese inorgânica e a preparação de novos compostos inorgânicos é aparente. Síntese de catiões de baixa valência, novos compostos com ligações metal - metal e clusters, a preparação de compostos ricos em calcogénios e ricos em halogénio, e a criação de ligações inusitadas bem como novos compostos de rede (Freudenmann, Wolf, Wolff, & Feldmann, 2011).
Indústria Farmacêutica	<ul style="list-style-type: none">• APIs ácidos e básicos em misturas eutéticas (mistura de compostos ou elementos químicos na qual o ponto de fusão é o mais baixo possível) sob a forma de “líquido co-cristal” são mantidos firmemente juntos, mesmo em solução, através de fortes ligações de hidrogénio ou interações parcialmente ionizados, que asseguram o transporte simultâneo com taxas

	muito mais elevadas do que as soluções dos seus sais cristalinos correspondentes (H. Wang et al., 2014).
Outros	<ul style="list-style-type: none">• O armazenamento de amostras de DNA é de grande importância para a biotecnologia e para as ciências forenses. Recentemente, os LIs hidratados foram identificados como um meio ideal para conservar DNA a longo prazo (Chandran, Ghoshdastidar, & Senapati, 2012).

Recentemente surgiram LIs com actividade biológica, esta propriedade somada às anteriores ampliou a aplicabilidade destes compostos, nomeadamente na indústria farmacêutica (Pinto et al., 2013).

4. Líquidos Iónicos na indústria farmacêutica

Atualmente, os custos associados com a distribuição para o mercado de novos produtos biologicamente ativos (farmacêuticos, herbicidas, biocidas) são elevados (Smiglak et al., 2014). Temos (Smiglak et al., 2014) :

- Custos associados à proteção das patentes das moléculas;
- Custos de aprovação para entrar no mercado;
- Custos pelas exigências de testar os compostos novos por muitos anos antes da aprovação;
- Custos de desenvolver os procedimentos sintéticos e construir novas plantas de produção;
- Custos associados às experiências fracassadas, falhas nos ensaios e outros prejuízos associados a todo este procedimento.

Como se pode verificar, muito dinheiro e tempo é investido na procura de novos compostos biologicamente ativos e novas tecnologias de entrega do princípio ativo, bem como novos métodos de libertação das moléculas ativas (Smiglak et al., 2014) . Neste cenário os LIs podem ter muito potencial.

São muitos os estudos que mencionam o impacto positivo que os LIs podem dar á indústria de compostos biologicamente activos, por exemplo nos produtos farmacêuticos, nutracêuticos e nos agrotóxicos (Smiglak et al., 2014) .

Do ponto de vista farmacêutico, uma abordagem com LIs na concepção de novos APIs faz todo o sentido, dado que permite a manipulação química dos compostos com objetivos específicos, nomeadamente com o processo de fabrico, a estabilidade das formulações, a biodisponibilidade bem como os eventuais efeitos adversos (Pinto et al., 2013).

Os LIs podem ser uma mais-valia na **distribuição de moléculas** biologicamente ativas.

Um dos obstáculos mais comuns que muitos produtos farmacêuticos encontram é a falta de solubilidade (Smiglak et al., 2014). Os LIs, com os seus perfis de solubilidades únicas, foram estudados como solventes para ingredientes farmacêuticos ativos (API) e outras substâncias biologicamente ativas, tais como proteínas e aminoácidos (Smiglak et al., 2014).

São vários os estudos que demonstram que os LIs efetivamente dissolvem muitos produtos farmacêuticos.

Catarina I. Melo et al. demonstrou as perspetivas promissoras que os LIs dão no processamento de moléculas biologicamente ativas (Melo, Bogel-Łukasik, da Ponte, & Bogel-Łukasik, 2013). Neste estudo foi analisada a solubilidade de antibióticos antituberculose em LIs, concluindo-se que estes compostos são altamente solúveis em LIs sendo este um excelente solvente para a manipulação de produtos farmacêuticos (Melo et al., 2013).

Uzagare et al., comparou a solubilidade da adenosina, citosina e guanosina em LIs em relação aos solventes orgânicos comuns (Uzagare, Sanghvi, & Salunkhe, 2003). O estudo concluiu que a formação de ligações de hidrogénio entre o anião do LI e o API melhorou a solubilidade do ribonucleósidos em LIs em comparação com solventes comuns (Uzagare et al., 2003).

A anfotericina B e o itraconazol foram utilizados para demonstrar que os líquidos iónicos podem ser concebidos ou escolhidos para proporcionar, de forma ajustável, hidrofília num ião e lipofília no outro permitindo solubilizar APIs pouco solúveis em água (McCrary et al., 2013). Estes excipientes líquidos anfílicos podem ser usados como sistemas de entrega de fármacos e agentes de solubilização para melhorar a solubilidade aquosa dos fármacos (McCrary et al., 2013). O estudo demonstrou que a solubilidade em água desionizada, em fluido gástrico simulado, fluido intestinal simulado, e solução tampão de fosfato foi muito

melhorada em relação aos métodos atuais de entrega de fármacos através da utilização de LIs concebidos como excipientes (McCrary et al., 2013).

Um outro estudo analisou a solubilidade do albendazol e do danazol (fármaco pouco solúveis em água), em sais alquil-imidazólio com o objetivo de avaliar a aplicação potencial como solventes farmacêuticos / co-solventes (Mizuuchi, Jaitely, Murdan, & Florence, 2008). A solubilidade do albendazol, por exemplo, é aumentada em mais de 10.000 vezes com o 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato. Esta capacidade de modular a miscibilidade aquosa aumenta a utilidade do LIs como solventes farmacêuticos (Mizuuchi et al., 2008).

As solubilidades do paracetamol e do ibuprofeno foram determinadas em dois LIs diferentes a diferentes temperaturas. Os LIs selecionados foram de 1-butil-3-metilimidazólio e 1-hexil-3-metilimidazólio (Smith, Bridson, & Leeke, 2011). Ambos os LIs mostraram uma solubilidade suficiente para os fármacos para os tornar adequados para estudos de cristalização (Smith et al., 2011).

Um estudo relatou a primeira aplicação com êxito de uma microemulsão não aquosa com a ajuda de um LI e estabilizada por uma mistura de dois agentes tensioativos não tóxicos, para a entrega transdérmica de aciclovir, que é insolúvel ou fracamente solúvel em água e líquidos orgânicos mais comuns (Moniruzzaman, Tahara, Tamura, Kamiya, & Goto, 2010; Moniruzzaman, Tamura, Tahara, Kamiya, & Goto, 2010). Como resultado, o aciclovir foi entregue por via tópica nas concentrações necessárias para o sucesso do tratamento (Moniruzzaman, Tamura, et al., 2010).

Na **extração de ingredientes** medicinais naturais, os LIs também apresentam vantagens (Smiglak et al., 2014). A extração em meio LI de produtos naturais a partir de plantas está a ser investigada como uma alternativa à extração por solventes convencionais, extração com fluido supercrítico e à extração de ponto de nuvem, em que o custo, energia e impacto ambiental pode ser melhorados (Smiglak et al., 2014).

Extratos de tecido da planta são uma rica fonte de compostos de chumbo para aplicações nutracêuticas ou farmacêuticas. No entanto, a concentração de compostos de valor acrescentado nos extratos de plantas é geralmente menor do que 1-2% (Ribeiro, Coelho, Rebelo, & Marrucho, 2013) . Como consequência, a procura de novas tecnologias melhoradas e mais eficientes surgiram. Num estudo desenvolvido por Bernardo D. Ribeiro

et al, foi avaliado o desempenho dos LIs como aditivos na extração de saponinas e polifenóis do chá (Ribeiro et al., 2013). Duas famílias de LIs, à base de catião colina e catião imidazólio combinados com uma ampla variedade de aniões hidrofílicos, foram testados (Ribeiro et al., 2013). Os resultados obtidos indicam que é possível ajustar a afinidade do LI por um solvente específico e aumentar consideravelmente a eficiência da extração de saponinas e fenóis (Ribeiro et al., 2013). LIs baseados em colina, foram favorecidos em vez de líquidos iônicos à base de imidazólio, uma vez que os primeiros têm a vantagem de ser biocompatíveis, biodegradáveis, menos tóxicos e, pelo menos, 10 vezes mais baratos (Ribeiro et al., 2013) . Os resultados obtidos indicam que a elevada concentração de saponinas, pode ser conseguida utilizando [Ch]Cl (cloreto de colina) e K_3PO_4 em pequenas quantidade (Ribeiro et al., 2013). Em conclusão, LI são alternativas claras para solventes orgânicos em extração de metabólitos de plantas, tais como saponinas (Ribeiro et al., 2013).

Este foi um dos muitos exemplos existentes na bibliografia. Outras técnicas têm usufruído das propriedades únicas dos LIs, nomeadamente a extração assistida por ultra-som e por microondas (Smiglak et al., 2014).

5. Líquidos Iônicos com propriedades antimicrobianas

São vários os estudos que atribuem propriedades antimicrobianas aos LIs. Alguns desses estudos relatam ligações API-LIs, outros descrevem o LI como um API antimicrobiano. A abordagem LI como um API foi baseada no facto de alguns LIs serem ativos contra fungos e bactérias podendo também apresentar atividade anti-cancerígena (Pinto et al., 2013). Serão descritos neste trabalho alguns desses estudos.

i. API-LIs antimicrobianos

Cole et al. relataram a investigação da atividade antibacteriana de LIs com o catião baseado em imidazólio ou em piridínio e o anião num antibiótico β -lactâmico (Cole et al., 2011) . As propriedades antibacterianas foram quantificadas através da medição da concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima contra a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* (Cole et al., 2011) . De um modo geral, os LIs melhoraram a atividade antibacteriana em comparação com os materiais de origem. Em 92% das experiências, a Amp-LIs superou o

sal de sódio de ampicilina disponível comercialmente (Cole et al., 2011). A Amp-LI teve até 43 vezes melhor atividade antibacteriana do que a ampicilina sódica (Cole et al., 2011).

Novos LIs contendo ampicilina (API) como anião foram sintetizados com bons rendimentos num outro estudo (Ferraz et al., 2012). A atividade antibacteriana de novos API-ILs baseados no anião ampicilina foi avaliada (Ferraz et al., 2014). O estudo mostrou a inibição do crescimento e propriedades bactericidas para algumas bactérias sensíveis e resistentes, especialmente algumas bactérias Gram-negativas, quando comparados com a ampicilina sódica e os sais de brometo e cloreto iniciais (Ferraz et al., 2014). Os resultados obtidos especialmente contra duas estirpes Gram-negativas resistentes apontam claramente para um papel promissor de API- LIs como fármacos antimicrobianos, em particular, contra estirpes bacterianas resistentes (Ferraz et al., 2014).

Os resultados do estudo sugerem que os API-LIs ajudam na entrega do composto antibacteriano ampicilina para algumas bactérias Gram-negativas com resistência contra os antibióticos β -lactâmicos, muito provavelmente, na função de agente de transferência de fase lipofílica através da membrana exterior das bactérias. (Ferraz et al., 2014)

ii. Líquidos Iônicos como APIs antimicrobianos

Um estudo com o objetivo de investigar a eco-toxicidade dos LIs com um anião de halogéneo analisou o crescimento de três tipos de bactérias na presença destes compostos (Yu & Nie, 2011). Os resultados indicaram que o crescimento de todas as bactérias foi inibido na presença dos LIs. Todos os LIs mostraram alguma toxicidade para a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Yu & Nie, 2011). A atividade antimicrobiana dos LIs com anião halogéneo está fortemente relacionada com a estrutura dos LIs. Um aumento no comprimento da cadeia do grupo alquila corresponde a um aumento da toxicidade (Yu & Nie, 2011).

Um outro estudo, baseado num novo grupo de brometos de amónio quaternário foi testado como possíveis agentes antimicrobianos e antifúngicos. Após análise dos resultados concluiu-se que exibiam uma forte atividade antimicrobiana e antifúngica (Mikláš et al., 2014).

Os derivados de quinolina são conhecidos por possuírem atividades biológicas e medicinais e têm sido explorados na conceção de agentes antibacterianos, antifúngicos e

compostos anti-maláricos (Buseti et al., 2010). Um estudo realizado por Buseti et al, relatou a toxicidade microbiológica de uma série de brometos 1-alquil-quinolínio contra uma série de microrganismos clinicamente relevantes (Buseti et al., 2010). O estudo concluiu que em geral, os LIs 1-alquil-quinolínio possuem atividade antimicrobiana de largo espectro contra os microrganismos (Buseti et al., 2010). Estes compostos foram ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bem como fungos (Buseti et al., 2010). Neste estudo foram utilizadas entre outras bactérias o *Staphylococcus epidermidis*, o *Staphylococcus aureus*, o *Staphylococcus aureus MRSA* e a *Escherichia coli* (Buseti et al., 2010).

Carson et al desenvolveram um estudo para avaliar a atividade antibiofilme *in vitro* de uma variedade de LIs baseados em cloretos 1-alquil-3-metilimidazólio contra um conjunto de bactérias clinicamente relevantes (incluindo MRSA) e fungos. O objetivo do estudo foi testar a aplicabilidade geral dos LIs como agentes de erradicação de biofilmes (Carson et al., 2009). Neste estudo demonstrou-se que estes compostos possuem uma ação antimicrobiana de largo espectro e atividade antibiofilme contra vários microrganismos patogênicos, incluindo isolados clínicos de MRSA e outros agentes patogênicos associados a infecções nosocomiais (Carson et al., 2009). Os autores defendem que a aplicação dos LIs no desenvolvimento de novos desinfetantes / antissépticos, para controlar as infecções no ambiente hospitalar, merece maior exploração. Este estudo destaca o potencial dos LIs como agentes antibiofilmes, podendo assim ter aplicações na medicina, mas também na indústria (Carson et al., 2009).

Ainda no combate aos biofilmes, surge outro estudo.

As infecções microbianas protegidas por biofilmes na pele são um sério risco à saúde que continuam a ser tratadas de forma inadequada (Zakrewsky et al., 2014). A falta de eficácia dos tratamentos é, em grande parte, devido à barreira que o estrato córneo e o biofilme fazem ao transporte do fármaco antimicrobiano (Zakrewsky et al., 2014). No estudo efetuado por Zakrewsky et al. foi analisado o uso de LIs no rompimento do biofilme e na entrega do antibiótico (Zakrewsky et al., 2014). Foram estudados dois formadores de biofilme patogênicos: *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella entérica* (Zakrewsky et al., 2014). A avaliação da citotoxicidade, da irritação causada na pele, da biodisponibilidade do antibiótico bem como do tratamento do biofilme pelos LIs, foram outros objetivos do estudo (Zakrewsky et al., 2014). Dos compostos estudados a colina-geranate surgiu como

LI com excelente atividade antimicrobiana, o mínimo de toxicidade para as células epiteliais, e aumento da permeabilidade para os fármacos (Zakrewsky et al., 2014). A colina-geranate foi comparável ou mais eficaz do que o tratamento com lixívia contra biofilmes de *S. entérica* e *P. aeruginosa*, respetivamente (Zakrewsky et al., 2014). Além disso, a colina-geranate permitiu que o cefadroxil (antibiótico) tivesse uma entrega aumentada em cerca de 16 vezes nas camadas profundas do tecido da pele, sem induzir irritação na mesma (Zakrewsky et al., 2014). A eficácia *in vivo* de colina-geranate foi validada utilizando um modelo de ferida infetada-biofilme. O resultado foi mais de 95% de morte bacteriana após 2 h de tratamento (Zakrewsky et al., 2014).

Contaminações microbianas das superfícies e a formação de biofilmes são um problema generalizado. Não é só a área da saúde que se debate com este problema, a indústria e as estruturas físicas também lidam com esta adversidade. A corrosão influenciada microbiologicamente é omnipresente em todas as áreas de deterioração das infra-estruturas marinhas (Seter, Thomson, Chong, MacFarlane, & Forsyth, 2013). Neste tipo de corrosão as bactérias colonizam sobre a superfície formando biofilmes que devido ao metabolismo corroem as estruturas (Seter et al., 2013). O custo deste tipo de corrosão é estimado em cerca de 1% do PIB em países mais desenvolvidos (Seter et al., 2013). A questão do casco bio-incrustante também é uma consideração crítica para os armadores, em particular organizações, tais como a marinha, uma vez que provoca um aumento da rugosidade da superfície e uma maior resistência ao atrito (Seter et al., 2013). Estima-se que grandes incrustações de cascos de navios podem causar um aumento até 45% em consumo de combustível (Seter et al., 2013).

Num estudo desenvolvido por Seter et al. foi demonstrado, pela primeira vez, os efeitos inibidores do biofilme de um sal orgânico ambientalmente amigável, nalidixate cetrimónio (um composto baseado em conceitos dos líquidos iónicos) (Seter et al., 2013). Este sal quando incorporado num revestimento de poliuretano leva à completa inibição da corrosão influenciada microbiologicamente, na presença de várias estirpes de bactérias vulgarmente encontradas em ambientes marinhos (Seter et al., 2013).

Como se pode verificar a toxicidade, propriedade manipulável, pode vir a ser uma das propriedades mais desejáveis dos LIs, na conceção de novos e melhorados antissépticos, desinfetantes e reagentes anti-incrustantes (Carson et al., 2009). São várias as publicações que descrevem a atividade antimicrobiana de LIs imidazólios, piridínios e quaternários de

amónio (Carson et al., 2009). Os LIs que apresentam actividade antimicrobiana são predominantemente não voláteis, não inflamáveis, com baixos pontos de fusão e viscosidade e ampla estabilidade térmica (Carson et al., 2009). Estas propriedades físicas podem, em teoria pelo menos, facilitar a sua utilização como biocidas de superfície (Carson et al., 2009).

6. Bis-piridínios como antimicrobianos

Uma série de sais de amónio quaternário de bis-piridínio com diferentes porções arilo e heteroarilo foram sintetizados e a sua atividade antimicrobiana investigada (Furdui et al., 2014). O efeito de inibição dos compostos foi avaliado em bactérias, fungos e leveduras (Furdui et al., 2014). Todos os novos compostos demonstraram atividade antibacteriana *in vitro* significativa. Estudos preliminares mostraram que alguns destes sais também são capazes de impedir ou destruir a formação de biofilme de microrganismos da indústria alimentar (Furdui et al., 2014).

Compostos dialquílicos 4,4-bis-piridínio, comumente conhecidos como viologenos devido à sua coloração intensa após redução (Grenier et al., 2012), têm uma longa história como herbicidas, como indicadores redox, e mais recentemente como potentes agentes antibacterianos (Ator et al., 2014). Devido às características estruturais, um grupo de cabeça polar carregada e cadeias alquilo não polares, estes compostos podem funcionar como anfílicos (Ator et al., 2014). Anfílicos catiónicos são uma classe de agentes antimicrobianos cada vez mais proeminente cujo mecanismo de ação conhecido envolve a ruptura da membrana bacteriana por interações electrostáticas com os fosfolípidos carregado negativamente (Ator et al., 2014).

Grenier et al preparou uma série de análogos mono- e bis-alquilados de 4,4-bis-piridínio com o objetivo de investigar as relações estrutura-atividade na inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Grenier et al., 2012).

Compostos anfílicos serviram, durante muito tempo, como uma plataforma privilegiada de agentes antimicrobianos (Grenier et al., 2012). A interrupção de processos intracelulares é a chave para a bioatividade de algumas moléculas anfílicas. No entanto a rutura da membrana é muitas vezes a principal via que conduz à morte microbiana (Grenier et al., 2012). Os compostos bis-piridínios emergiram recentemente como um grupo particularmente eficaz na perturbação de membranas, matando as bactérias em

concentrações baixas através de um mecanismo de ação que pode depender da sua estrutura em forma de cone (Grenier et al., 2012). Foram feitas correlações entre a atividade antimicrobiana e características estruturais; mais cadeias alquilo corresponderam a valores mais baixos de MIC e menor tempo requerido para matar as bactérias (Grenier et al., 2012).

Uma nova classe de piridínio e cloreto de benzimidazólio foi obtida com um rendimento elevado por Pernak et al. As atividades antimicrobianas contra bactérias e fungos foram estudadas. Os compostos exibiram atividade antimicrobiana de amplo espectro semelhante ao da atividade de cloreto de benzalcónio (Pernak, Rogoza, & Mirska, 2001).

Lad et al desenharam e sintetizaram uma série de novas piridinas modificadas e bis-piridina com diferentes substitutos cumarínicos com o objetivo de encontrarem novos agentes antimicrobianos. Todos os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* contra estirpes bacterianas (Gram-positivas e Gram-negativas) e fúngicas. Apesar de alguns compostos apresentarem atividade comparável aos fármacos padrão, utilizados como referência, outros demonstraram atividade antibacteriana promissora (Lad, Giri, Chovatiya, & Brahmabhatt, 2015)

Apesar de não serem muitos os estudos que relatam as propriedades antimicrobianas dos bis-piridínios, eles existem e apontam nesse sentido. Se a esta informação adicionarmos as potencialidades dos LIs temos aqui um estudo promissor e inovador.

7. Toxicidade dos Líquidos Iônicos: estruturas químicas

Os LIs devido ao elevado interesse e à diversidade de aplicações têm sido alvos de vários estudos de avaliação toxicológica (Sónia PM Ventura et al., 2014). Existem estudos de diversos LIs e sobre vários organismos, os de avaliação ecotoxicológica são os mais frequentes. Neste capítulo tentar-se-á relacionar a toxicidade dos LIs com a estrutura química dos mesmos, através da análise de diferentes estudos.

Os LIs são sintetizados pela combinação de diferentes aniões e catiões e a variação do comprimento das cadeias alquilo ou a introdução de oxigénios, por exemplo, permitem manipular as características físico-químicas destes compostos. Propriedades como viscosidade, densidade, ou solubilidade podem influenciar a biodegradação ou as características toxicológicas destes compostos (Sonia PM Ventura, Marques, et al., 2012).

A relação do comprimento das cadeias alquilo com a toxicidade é uma constatação transversal a vários estudos (Ferraz et al., 2014; Luis, Garea, & Irabien, 2010). Um estudo QSAR (Quantitative structure–activity relationship) relata que, quanto maior for a cadeia alquilo, mais elevada a toxicidade. Esta afirmação só é válida até cadeias com 14 carbonos; de acordo com dados experimentais, o aumento da toxicidade a partir de 14 carbonos, para LIs baseados em imidazólio, diminui - "efeito de cut-off" (Luis et al., 2010; Sonia PM Ventura, de Barros, et al., 2012; Sonia PM Ventura, Marques, et al., 2012). Segundo este estudo existe uma relação entre a toxicidade dos LIs e seu carácter hidrofóbico. As cadeias alquilo longas implicam uma maior reatividade com as membranas biológicas e com as proteínas incorporadas; estes compostos são capazes de se incorporar na bicamada fosfolipídica facilitando a entrada das moléculas através das membranas (Luis et al., 2010; Santos et al., 2015). A relação entre lipofilia e toxicidade de um composto é bem conhecido na toxicologia (Matzke et al., 2007).

Num outro estudo realizado por Ventura et al, também foi demonstrada a correlação entre a toxicidade e o número de átomos de carbono nas cadeias alquilo. No entanto, quando comparadas a toxicidade para LIs cuja diferença eram o número de carbonos (um LI com 7 e outro com 12 carbonos) verificou-se que o alongamento da cadeia de alquilo conduziu à diminuição da toxicidade do LI. Tal como já mencionado, a toxicidade dos LIs nem sempre aumenta com o aumento das cadeias alquilo (Sonia PM Ventura, Marques, et al., 2012).

Carson et al estudaram *in vitro* as propriedades antibiofilme de LIs contra microrganismos clinicamente relevantes. Verificaram que a concentração mínima de erradicação do biofilme diminuiu (aumento da atividade antibiofilme) com o aumento no comprimento da cadeia alquilo da cadeia lateral do LI (Carson et al., 2009).

A estrutura dos catiões dos LIs também confere propriedades tóxicas aos compostos. Catiões aromáticos (imidazólio e piridínio) são, em geral, mais tóxicos do que os alifáticos (Sonia PM Ventura, Marques, et al., 2012).

O estudo realizado por Ferraz *et al* concluiu que os valores de MIC de LIs baseados na ampicilina contendo catiões altamente polares são mais elevados do que ampicilina sódica (fármaco comercializado) utilizado como padrão neste trabalho. Por sua vez os LIs baseados em ampicilina contendo catiões apolares apresentaram valores de MIC menor do

que ampicilina sódica (Ferraz et al., 2014). Os catiões altamente polares são mais propensos a ficar em solução aquosa em vez das membranas celulares hidrofóbicas (Ferraz et al., 2014)

Como se pode verificar são inúmeros os estudos cujo objetivo é avaliar a toxicidade das estruturas dos LIs. Este tipo de investigação fornece pontos de referência para a síntese de novos LIs. Assim sendo, iremos enumerar algumas das principais conclusões da relação estrutura química - toxicidade.

- Alguns estudos indicam que os aniões menos tóxicos são Cl^- e BF_4^- (Ferraz et al., 2014; Matzke et al., 2007);
- Outros estudos sugerem que existe uma relação inversa entre o número relativo de átomos de oxigénio e a toxicidade (Zhao et al., 2014);
- LIs contendo azoto são mais tóxicos do que os não azotados (Roy, Das, & Popelier, 2014);
- Catiões funcionalizados originam LIs menos tóxicos, quando comparados com catiões não funcionalizados (Santos et al., 2015);
- Muitos estudos atribuem aos catiões a toxicidade dos compostos, no entanto muitos outros tem demonstrado que o anião também pode ser responsável pela toxicidade (Santos et al., 2015) (Docherty & Kulpa Jr, 2005);
- O aumento do número de grupos hidroxilo aumenta a polaridade dos LIs, conseqüentemente, os compostos são mais reativos contra as membranas biológicas (Santos et al., 2015);
- Estudos demonstram que compostos de amónio quaternário e piridínios têm efeitos tóxicos significativos sobre diversas bactérias e fungos (Docherty & Kulpa Jr, 2005);
- O aumento no número de grupos alquilo substituídos no anel catião correspondeu a um aumento da toxicidade (Docherty & Kulpa Jr, 2005);
- A incorporação de grupos éter na cadeia lateral éster reduz significativamente a toxicidade em comparação com os derivados de éster de alquilo dos LI baseados em imidazólio (Morrissey et al., 2009).
- A introdução de oxigénio nas cadeias laterais dos catiões de bis-piridínio, bem como a combinação com aniões alternativos, tais como docusato podem contribuir

para uma redução da toxicidade do sal (Jordão, Cruz, Branco, Pina, & Branco, 2015).

O estudo desenvolvido por Roy et al. avaliou a toxicidade de um conjunto de LIs para *Daphnia magna* (organismo modelo amplamente aceite para os testes de toxicidade) através de modelos estatísticos. A figura 2 resume as conclusões do estudo. LIs mais lipofílicos com menos toxicidade podem ser sintetizados, evitando a aromaticidade, os átomos de azoto e o aumento da ramificação na estrutura do catião (Roy et al., 2014).



Figura II - Resumo dos resultados do estudo desenvolvido por Roy *et al.* que avaliou a toxicidade de LIs para *Daphnia magna* através de modelos estatísticos (Roy et al., 2014).

O mecanismo de toxicidade dos LIs ainda não é totalmente compreendido, mas tem sido proposto que o mecanismo de toxicidade ocorre através da ruptura da membrana devido às semelhanças estruturais dos LIs com os detergentes, pesticidas e antibióticos (Docherty & Kulpa Jr, 2005) . Acredita-se que as interações dos LIs com a membrana celular são a principal causa da toxicidade (Gal et al., 2012). As cadeias alquila longas presentes no catião aumentam a natureza lipofílica destes compostos e a possibilidade de interação com as bicamadas de fosfolípidos da membrana celular e com os domínios hidrófobos das proteínas da membrana, conduzindo à rutura das funções fisiológicas da membrana e, conseqüentemente, a morte celular (Bernot, Kennedy, & Lamberti, 2005; Bubalo, Radošević, Redovniković, Halambek, & Srček, 2014; Morrissey et al., 2009).

Foi realizado um estudo biofísico e microscópico para avaliar as interações de vários LIs (com diferentes composições e comprimentos da cadeia lateral e com diferentes estruturas e orientações dos grupos ligados ao catião) com as membranas. Os dados experimentais do

estudo revelam que os LIs apresentam distintos mecanismos de ligação, inserção e perturbação da membrana (Gal et al., 2012).

O mecanismo de toxicidade da parte aniônica é menos compreendido, embora vários autores expliquem a maior toxicidade dos aniões fluorados, devido à hidrólise e formação de fluoretos que atuam como potenciais inibidores do Na⁺, do K⁺ e da ATPase, elementos envolvidos na manutenção do potencial elétrico, no transporte e na regulação do volume celular (Bubalo et al., 2014).

Concluindo a lipofilicidade contribui para a toxicidade dos LIs devido ao aumento da capacidade dos compostos para atravessar membranas biológicas (Bubalo et al., 2014; Roy et al., 2014; Zhao et al., 2014). No entanto é importante realçar, tal como mencionado em muitos estudos, que a toxicidade dos LIs varia com os organismos e entre os diferentes níveis tróficos (Sónia PM Ventura et al., 2014) .

8. Objetivo do estudo

No fim deste capítulo é evidente a urgência de novas moléculas antibióticas. As resistências bacterianas aos antibióticos estão a aumentar de forma galopante, existindo mesmo estirpes sem tratamento eficaz de momento. Estamos a entrar numa era em que a modernização e a evolução da medicina deixarão de fazer sentido quando a mortalidade se dever a infeções bacterianas resistentes.

Os LIs surgem, neste contexto, com o potencial antimicrobiano tão desejado. LIs conjugados com APIs ou LIs como um API estão a dar uma nova perspectiva aos antibióticos.

Os bis-piridínios estão agora a ser alvo de estudos também neste âmbito. As suas propriedades antimicrobianas á muito estão descritas, o futuro agora é avalia-los como potenciais desinfetantes/antibióticos contra estirpes resistentes.

Neste trabalho agruparam-se as características de LIs e bis-piridíneos num só composto na expectativa de resultados promissores.

O principal objetivo do estudo foi avaliar a atividade de sais bis-piridínios como antibacterianos. Como objetivos específicos avaliou-se a atividade antimicrobiana destes sais orgânicos em bactérias Gram-Positivas e Gram-negativas; comparou-se os efeitos que

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

diferentes concentrações poderiam ter no crescimento de bactérias e verificou-se quais os LIs com potencial para combater bactérias resistentes.

Capítulo II - Materiais e métodos

1. Materiais

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

Os LIs derivados de bis-piridínios (tabela II) foram sintetizados e purificados pelo grupo de Luís C. Branco, da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, e usados após confirmação das estruturas e da pureza por Ressonância Magnética Nuclear e espectrometria de massa (Jordão, Cabrita, Pina, & Branco, 2014; Jordão, Cruz, Branco, Pina, et al., 2015; Jordão, Cruz, Branco, Pinheiro, et al., 2015).

Tabela II - LIs derivados de bis-piridínios estudados.

Sal	MM
BA - 4,4'-bpy	156.19
BB - [C1bpy]I	298.13
BC - [C10bpy]I	424.37
BD - [C3Obpy]I	342.18

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

BE [C3Obpy][AOT]	636.58
BF - [C3H4bpy]I	324.17
BG [C3H4bpy][AOT]	618.83
BH - [C2OHbpy]I	328.15
BI - [Hbpy]Cl	192.65
BJ - [Hbpy]Me	252.29
BK - [H2bpy]Cl ₂	229.10
BL [H2bpy][Me] ₂	348.39

Todas as células bacterianas estudadas foram armazenadas a -80 ° C em sistemas de criopreservação - Vibakstore®. O estudo foi desenvolvido em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (tabela III). As bactérias utilizadas neste estudo pertencem à coleção das Ciências Químicas e das Biomoléculas da ESTSP.

Tabela III - Estirpes bacterianas utilizadas no estudo.

Bactérias	
Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180
	<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209
	<i>Escherichia coli</i> ART 19B
	<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like
Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300
	<i>Enterococcus faecalis</i>

As bactérias ATCC foram obtidas através da American Type Culture Collection (ATCC®), as restantes de isolados clínicos.

2. Métodos

i. 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 (Hugo & Russell, 1998).

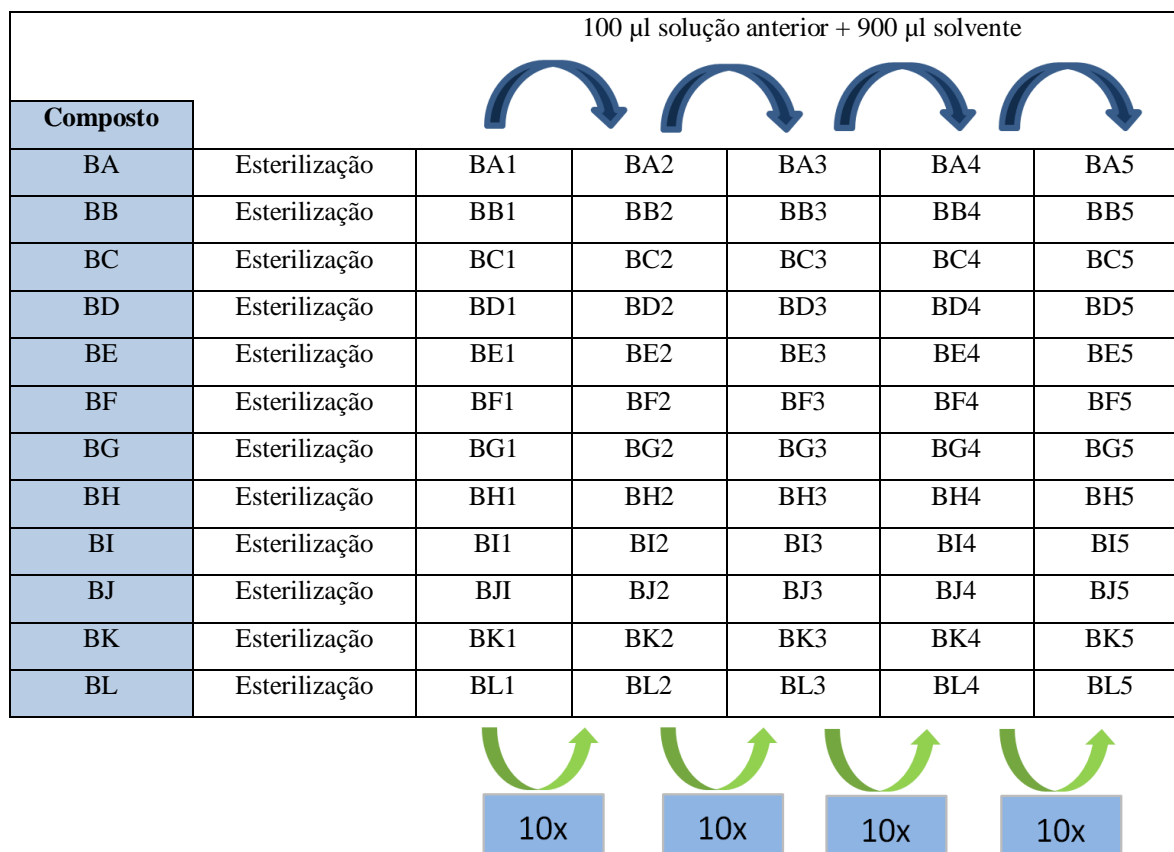
ii. Preparação das Soluções

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 alguns dos composto, tal como descrito na tabela IV. Após esterilização da solução pelo filtro de seringa de porosidade 0,2µm - VWR® e recorrendo sempre à técnica asséptica, prepararam-se concentrações consecutivamente 10x mais diluídas tal como representado pelo tabela V. As concentrações finais foram 50 mM, 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM. As soluções foram armazenadas no frigorífico a -20°C, sendo descongeladas à temperatura ambiente sempre que necessárias.

Tabela IV -Tabela resumo das informações necessárias para a preparação das soluções de cada LI.

Compostos	Sigla	Mr	Volume da solução/mL	Conc. mM	Massa/mg	Solvente
4,4'-bpy	BA	156,19	1	50	7,8095	DMSO
[C1bpy]I	BB	298,13	1	50	14,9065	H2O
[C10bpy]I	BC	424,37	1	50	21,2185	DMSO
[C3Obpy]I	BD	342,18	1	50	17,109	H2O
[C3Obpy][AOT]	BE	636,58	1	50	31,829	DMSO
[C3H4bpy]I	BF	324,17	1	50	16,2085	H2O
[C3H4bpy][AOT]	BG	618,83	1	50	30,9415	DMSO
[C2OHbpy]I	BH	328,15	1	50	16,4075	DMSO
[Hbpy]Cl	BI	192,65	1	50	9,6325	H2O
[Hbpy]Me	BJ	252,29	1	50	12,6145	H2O
[H2bpy]Cl2	BK	229,1	1	50	11,455	H2O
[H2bpy][Me]2	BL	348,39	1	50	17,4195	H2O

Tabela V - Esquema do processo de preparação das soluções dos LI. Por exemplo: preparação da solução BA recorrendo à tabela IV, esterilização recorrendo ao filtro de seringa de porosidade 0,2µm e consecutivas diluições utilizando 100 µl da solução anterior e 900 µl de solvente, tal como descrito pelo esquema.



iii. 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 (Laboratório Clínico Standard Institute)(CLSI, 2015). Segundo a bibliografia os MIC são mais baixo pela técnica de diluição em tubo do que pela técnica de difusão em ágar (Vieira, Pereira, & Chavasco, 2011).

Com o objetivo de obter uma suspensão bacteriana de densidade igual à da solução padrão McFarland 0,5, selecionaram-se colónias de bactérias através da repicagem das culturas frescas. As colónias selecionadas foram transferidas para tubos de ensaio que continham meio de cultura TSB. 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 (CLSI, 2015).

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

As suspensões resultantes deveram 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 5 concentrações diferentes, 50 mM, 5 mM, 0,5 mM, 0,05 mM e 0,005 mM. Quando foi necessário testaram-se concentrações superiores. Para além das concentrações já referidas, foram ainda incluídos, um controlo positivo (suspensão bacteriana e TSB) e um branco (apenas TSB).

Em todos os ensaios o volume final em cada poço foi de 200 μl (2 μl de suspensão bacteriana, 2 μl de composto e o 196 μl de meio de cultura).

O MIC foi determinado como sendo a menor concentração que não apresentou turbidez após incubação (24h a 37°C) (CLSI, 2015). A presença de turbidez é uma indicação do crescimento microbiano e a correspondente concentração de agente antibacteriano é considerado ineficaz.

iv. Determinação das Taxas de Crescimento

Com o objetivo de caracterizar a atividade antibacteriana, foram avaliadas as taxas de crescimento.

As taxas de crescimento são determinadas na presença dos LIs que apresentem 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. Os testes foram efetuados em sextuplicado pelo método de microdiluição, utilizando placas de Elisa (96 poços de fundo plano) e o meio TSB (CLSI, 2015).

A placa foi incubada a 37°C, procedendo-se a leituras periódicas do valor da densidade óptica (DO), a 620 nm no Multiskan FC Microplate Photometer - Thermo Scientific®. 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).

3. Análise Estatística

Neste trabalho foram efetuadas, no mínimo, 3 repetições para determinar o MIC e 6 repetições para determinar as taxas de crescimento. 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 22 (SPSS Inc., EUA). As amostras não seguirão uma distribuição normal, segundo o teste Kolmogorov-Smirnov. Utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney U para amostras independentes, uma vez que se tratam de amostras reduzidas. Nível de significância do teste foi de 0,05.

Capítulo III - Resultados

No presente estudo foram avaliados, quanto à bioatividade em bactérias, 12 LIs baseados em bis-piridínios, tal como apresentado na tabela II. No primeiro estudo determinaram-se os MICs de cada LI para cada uma das bactérias (Tabela III). O resumo dos resultados é apresentado na tabela VI. As concentrações máximas estudadas foram de 5 mM.

Dos 12 LIs em estudo, 3 não apresentaram qualquer MIC dentro das concentrações e bactérias estudadas (BB, BD e BF). Dos que se identificaram bioatividade, 4 só a apresentavam contra bactérias Gram-negativas (BI, BJ, BK e BL). Apenas 2 dos compostos, ainda que em diferentes concentrações, apresentaram bioatividade contra todas as bactérias em estudo (BA e BC). Os compostos BE e BG apresentam bioatividade contra todas as Gram-positivas e em concentrações inferiores às necessárias para inibirem o crescimento das Gram-negativas suscetíveis.

Analisando a Figura III, IV e V verifica-se que as bactérias Gram-negativas são suscetíveis a um maior número de LI baseados em Bis-piridínios do que as Gram-positivas.

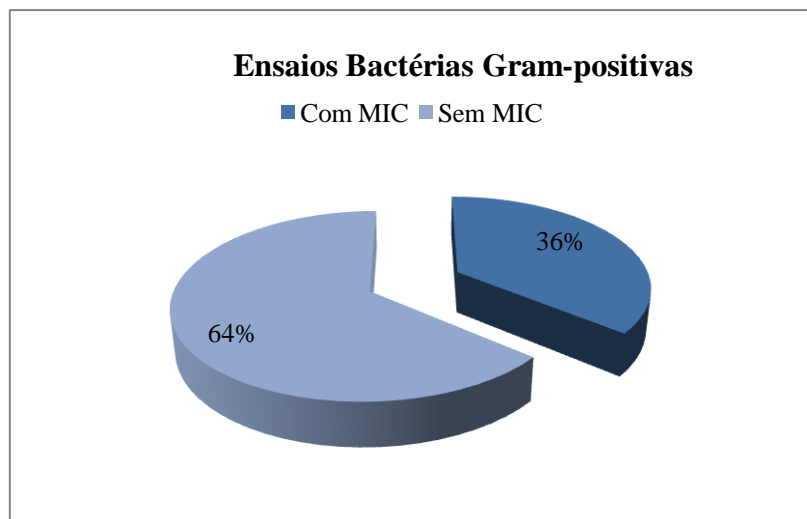


Figura III - - Suscetibilidade das bactérias Gram-positivas aos 12 LIs estudados. Verifica-se que em 36% dos ensaios existe inibição do crescimento bacteriano (bactérias suscetíveis).

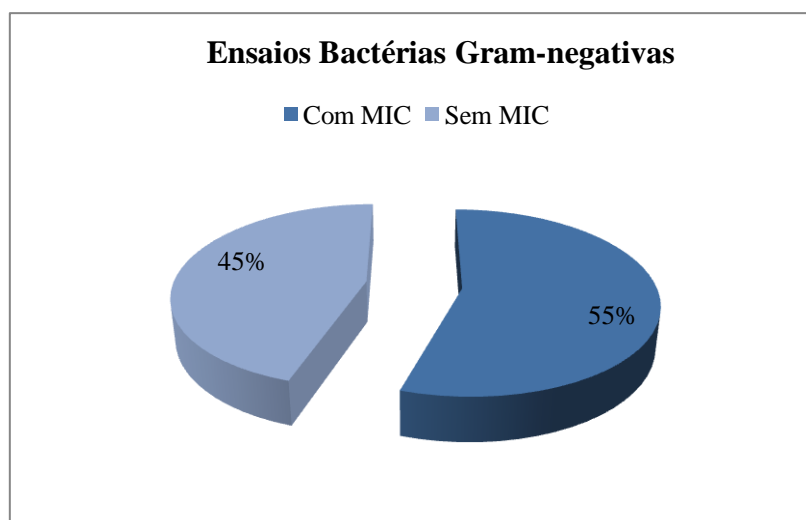


Figura IV - Suscetibilidade das bactérias Gram-negativas aos 12 LIs estudados. Verifica-se que em 55% dos ensaios existe inibição do crescimento bacteriano (bactérias suscetíveis).

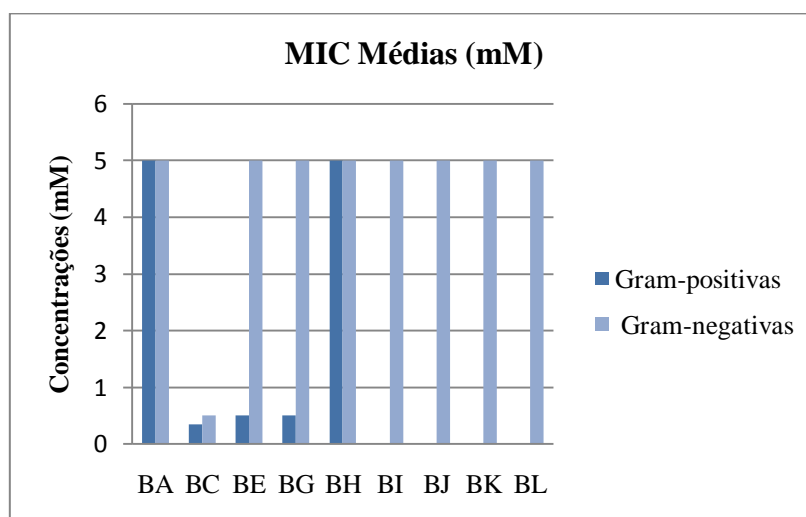


Figura V - Quadro síntese das médias das concentrações mínima inibitória por grupo quanto à coloração de Gram. Para os compostos BC, BE e BG verifica-se que são necessárias maiores concentrações de composto para inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas em comparação com as concentrações necessárias para a inibição das Gram-positivas. As bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis do que as Gram-negativas aos compostos BC, BE e BG.

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela VI - Concentração Mínima Inibitória de cada composto para cada estirpe bacteriana

	MIC (mM)											
	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BG	BH	BI	BJ	BK	BL
Gram-Positivas												
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	>5	0,05	>5	0,5	>5	0,5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	5	>5	0,5	>5	0,5	>5	0,5	5	>5	>5	>5	>5
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	>5	0,5	>5	0,5	>5	0,5	>5	>5	>5	>5	>5
Gram-Negativas												
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5	>5	0,5	>5	>5	>5	>5	5	>5	>5	5	5
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	5	>5	0,5	>5	>5	>5	5	5	>5	5	5	5
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	5	>5	0,5	>5	5	>5	5	5	*	5	5	5
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	5	>5	0,5	>5	>5	>5	5	5	5	5	5	5
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	5	>5	0,5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	5	5	5

* Resultados inconclusivos

Na segunda fase do estudo determinaram-se as taxas de crescimento das bactérias na presença da concentração logo abaixo da que provoca a inibição do crescimento. Estes valores permitem, em comparação com a taxa de crescimento das bactérias só em meio de cultura, inferir se há decréscimo no crescimento bacteriano na presença dos LIs estudados.

As tabelas que resumem os dados obtidos para cada composto apresentam as médias dos declives, enquanto os gráficos de comparação das curvas de crescimento indicam as médias das densidades óticas registadas. Os declives de cada ensaio, para cada composto bioativo e para cada bactéria são apresentados em anexo.

A Tabela VII apresenta os resultados para o LI BA. Este composto apresentou bioatividade contra todas as bactérias estudadas. Para o estudo das taxas de crescimento utilizou-se a concentração de 1mM para todas as bactérias. Os fatores decrescentes encontrados denotam uma diminuição da taxa de crescimento para todas as bactérias exceto para a *Escherichia coli* bla_{TEM} 180 que não apresentou alteração na taxa de crescimento na presença do LI. As diferenças no crescimento bacteriano só foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para a *Escherichia coli* OXA-1-Like - Anexo 16. A Figura V esquematiza em gráfico as curvas de crescimento da bactéria com diferenças estatisticamente significativas para o composto BA.

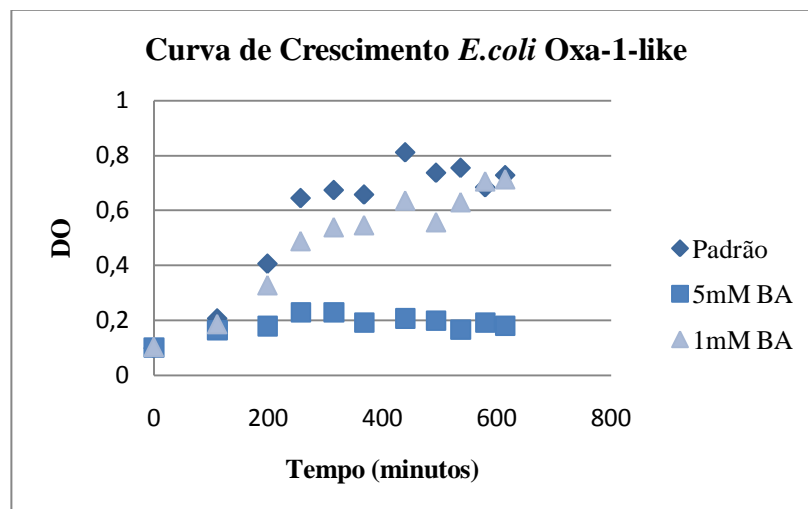


Figura VI - Curvas de crescimento da *Escherichia coli* Oxa-1-Like na presença/ausência do LI BA.

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela VII - Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do **4,4'-bpy (BA)** para cada estirpe bacteriana estudada

Gram-Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BA	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	1	0,00187±0,00082	0,00140±0,00009	0,75
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	5	1	0,00258±0,00068	0,00210±0,00015	0,81
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	1	0,00152±0,00012	0,00123±0,00061	0,81
Gram-Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5	1	0,00265±0,00013	0,00223±0,00043	0,84
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	5	1	0,00098±0,00010	0,00105±0,00022	1,07
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	5	1	0,00112±0,00004	0,00107±0,00019	0,96
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	5	1	0,0011±0,00032	0,00092±0,00026	0,83
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	5	1	0,00263±0,00051	0,00197±0,00025	0,75*

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

A Tabela VIII resume as taxas de crescimento e fatores decrescentes do composto BC. Realça-se, mais uma vez, que este LI possui bioatividade contra todas as bactérias estudadas. Todas, sem exceção, sofreram diminuição de crescimento na presença do composto, no entanto só 4 das 8 (*Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 - Figura VI e VII, *Enterococcus faecalis* - Figura VIII, *Escherichia coli* bla_{TEM} 180 - Figura IX e *Escherichia coli* ATCC 25922 - Figura X e XI) bactérias apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) - Anexo 4,6,8 e 10.

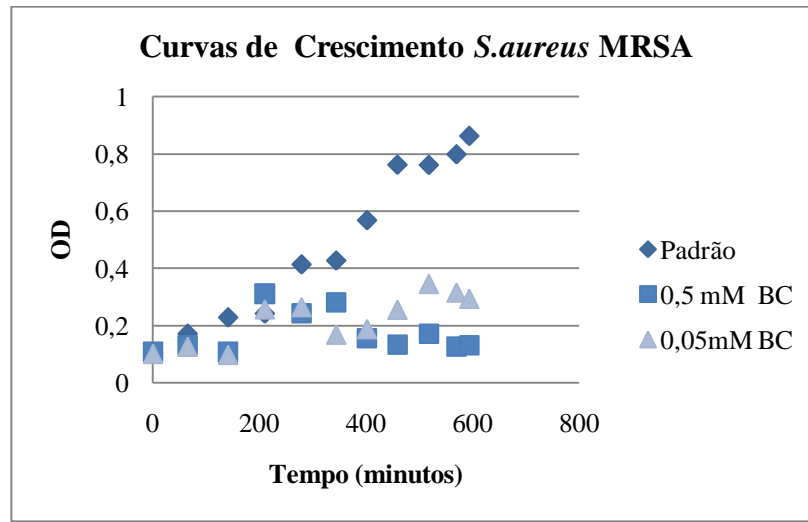


Figura VII - Curvas de crescimento da *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 na presença/ausência do LI BC.

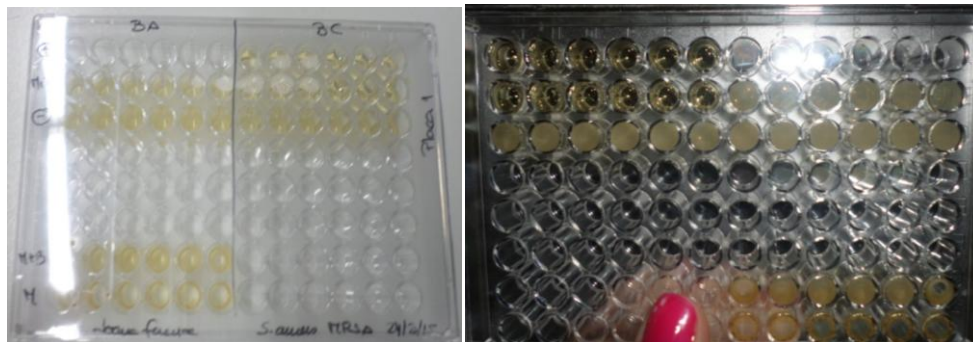


Figura VIII - Resultado do teste de microdiluição após 24h a 37°C do *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 na presença do LI BA e BC.

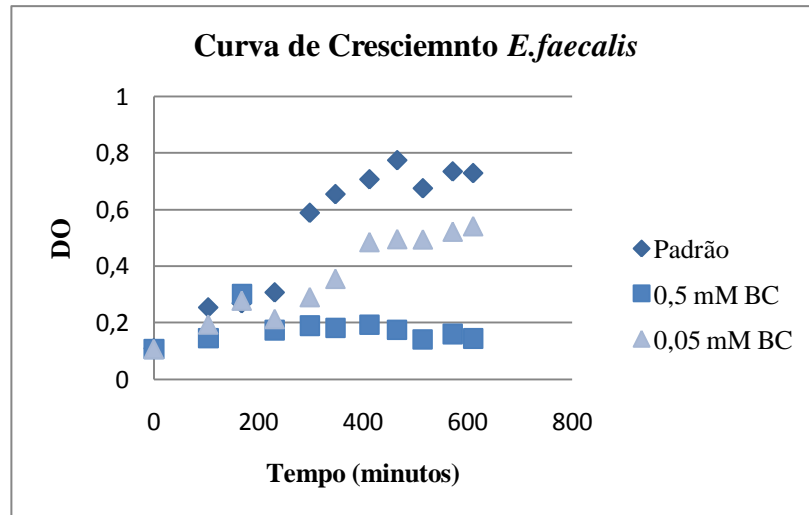


Figura IX - Curvas de crescimento da *Enterococcus faecalis* na presença/ausência do LI BC.

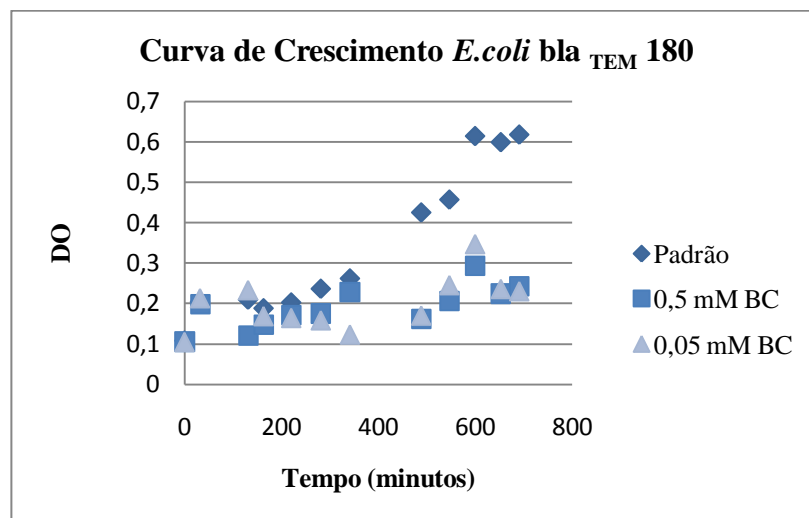


Figura X – Curvas de crescimento da *Escherichia coli bla*_{TEM 180} na presença/ausência do LI BC.

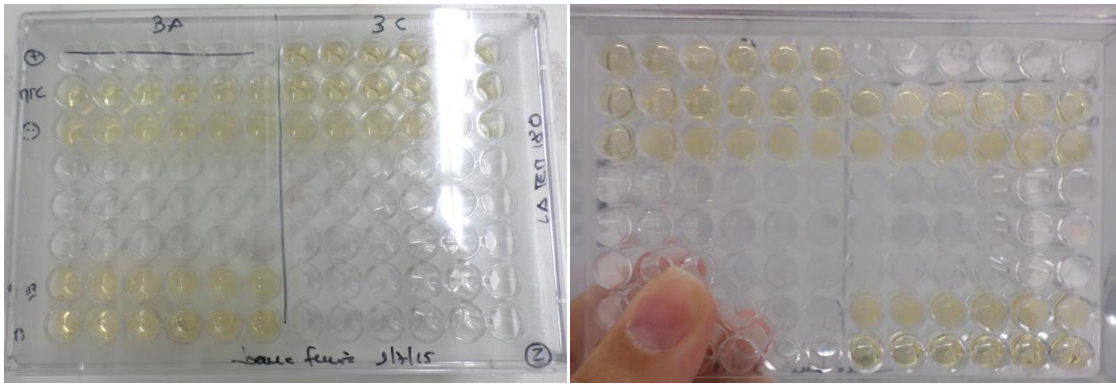


Figura XI - Resultado do teste de microdiluição após 24h a 37°C do *Escherichia coli* bla_{TEM 180} na presença do LI BA e BC.

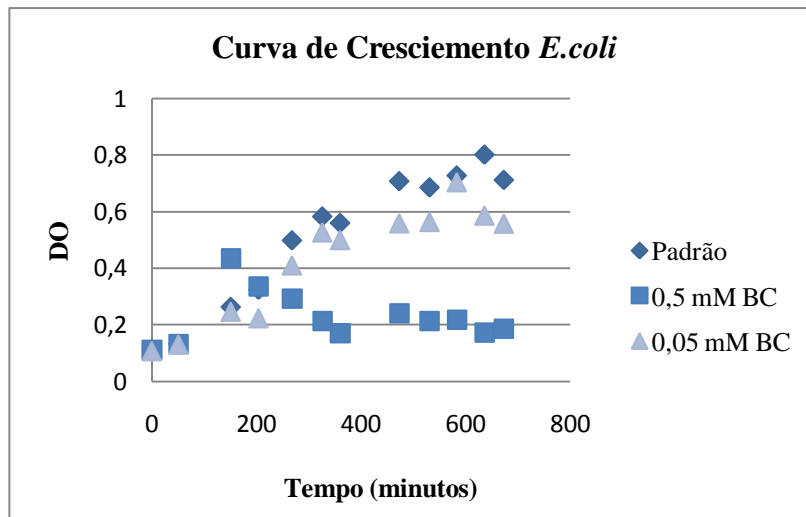


Figura XII – Curvas de crescimento da *Escherichia coli* ATCC 25922 na presença/ausência do LI BC.

Relativamente ao composto BE, apresentado na Tabela IX, todas as bactérias Gram-positivas são inibidas dentro das concentrações estudadas. Das Gram-negativas só a *Escherichia coli* bla_{TEM 209} apresentou MIC, mas também só nesta a presença do composto em concentrações abaixo de MIC originou um aumento significativo ($p > 0,05$) da taxa de crescimento - Anexo 12. Só o *Enterococcus faecalis* não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nas taxas de crescimento Anexo 2 e 4. O composto BE é biologicamente ativo contra as Gram-positivas em concentrações muito abaixo das necessárias para a bioatividade contra a Gram-negativa (Figura V).

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela VIII – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [C1bpy]I (BC) para cada estirpe bacteriana estudada.

Gram-Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BC	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,05	0,005	0,00187±0,00082	0,00128±0,00020	0,68
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	0,5	0,05	0,00258±0,00068	0,00113±0,00085	0,44*
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,5	0,05	0,00152±0,00012	0,00098±0,00053	0,64*
Gram-Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,50	0,05	0,00147±0,00028	0,00105±0,00008	0,71*
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	0,50	0,05	0,00098±0,00010	0,00047±0,00030	0,48*
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	0,50	0,05	0,00112±0,00004	0,00092±0,00034	0,82
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	0,50	0,05	0,0011±0,00032	0,0007±0,00047	0,64
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	0,50	0,05	0,00208±0,00024	0,00187±0,00023	0,90

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela IX – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [C3Obpy][AOT] (BE) para cada estirpe bacteriana estudada

Gram-Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BE	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,50	0,05	0,0015±0,00035	0,00087±0,00015	0,58*
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	0,50	0,05	0,00207±0,00023	0,00052±0,00037	0,25*
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,50	0,05	0,00245±0,00071	0,00190±0,00009	0,78
Gram-Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>5				
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	>5				
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	5	1	0,0009±0,00021	0,00132±0,00015	1,47*
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	>5				
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	>5				

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

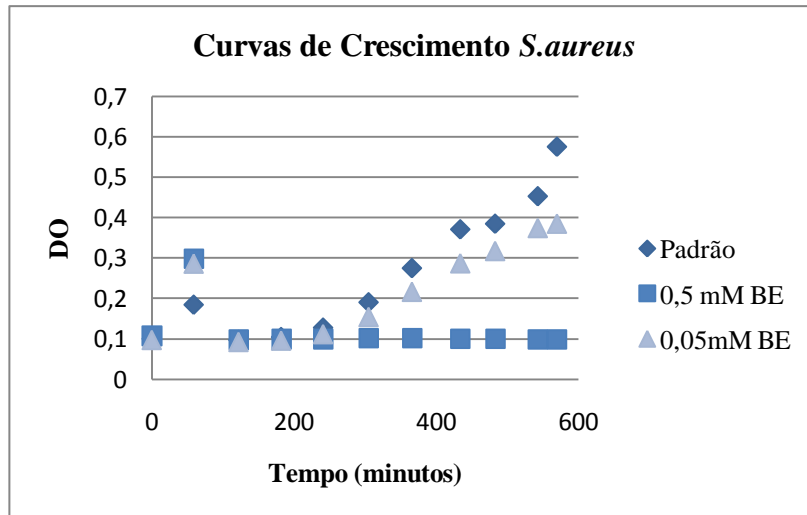


Figura XIII - Curvas de crescimento da *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na presença/ausência do LI BE.

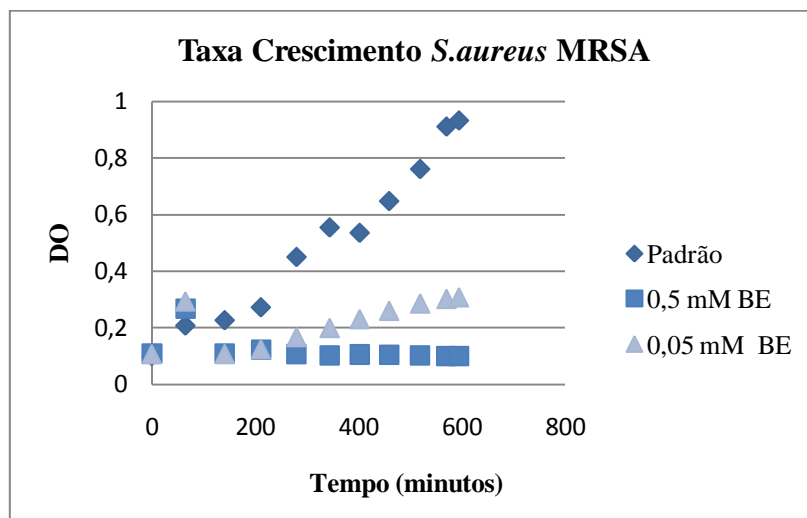


Figura XIV – Curvas de crescimento da *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 na presença/ausência do LI BE.

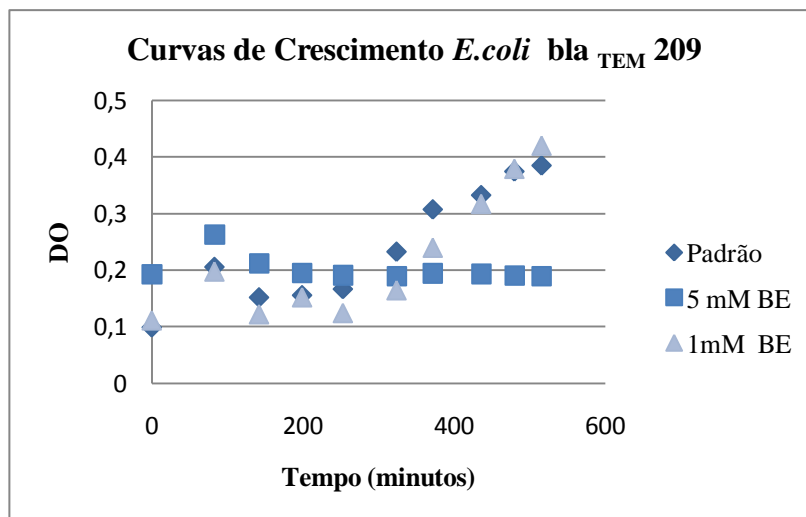


Figura XV – Curvas de crescimento da *Escherichia coli* bla_{TEM} 209 na presença/ausência do LI BE.

Na Tabela X o LI BG apresenta 2 concentrações mínimas inibitórias. As Gram-negativas apresentam concentrações 10x mais elevadas (5mM) do que as Gram-positivas (0,5mM) (figura XXI). O *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 e o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 são os únicos a apresentarem diferenças significativas ($p > 0,05$) nas taxas de crescimento - Anexo 2 e 4.

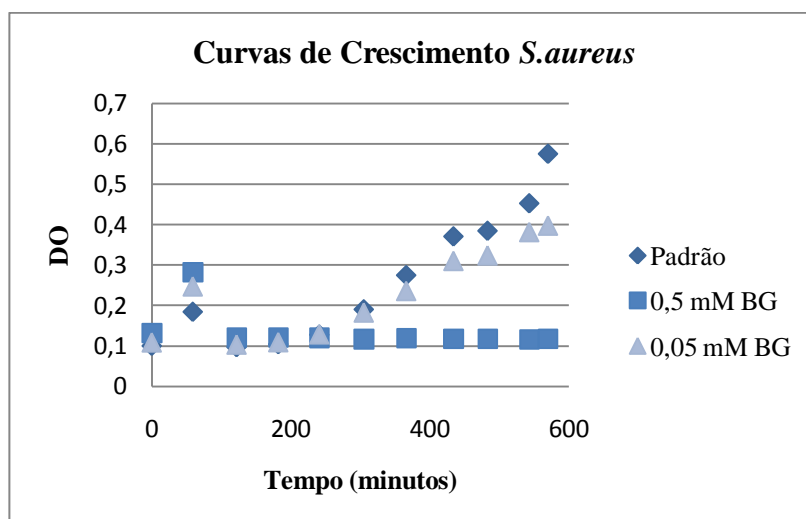


Figura XVI – Curvas de crescimento da *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na presença/ausência do LI BG

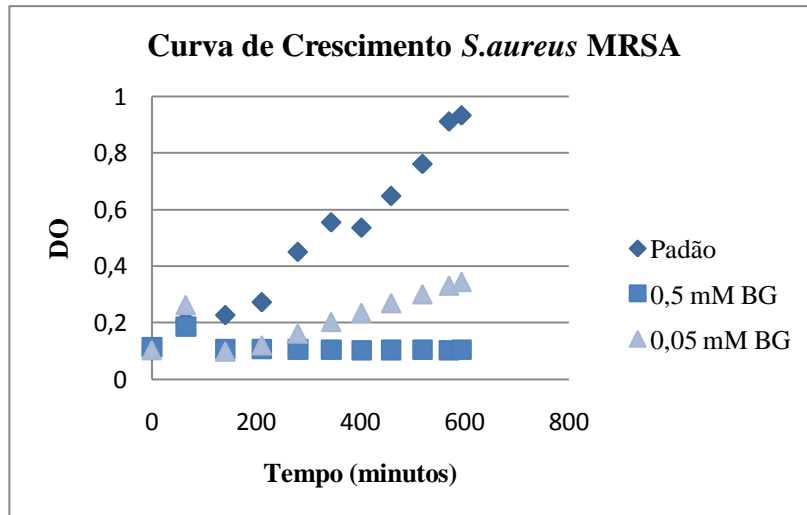


Figura XVII – Curvas de crescimento da *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 na presença/ausência do LI BG.

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela X – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [C3H4bpy][AOT] (BG) para cada estirpe bacteriana estudada.

Gram-Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BG	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,5	0,05	0,0015±0,00035	0,00088±0,00022	0,59*
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	0,5	0,05	0,00207±0,00023	0,00067±0,00025	0,32*
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,5	0,05	0,00245±0,00071	0,00197±0,00036	0,80
Gram-Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>5				
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	5	1	0,00112±0,00008	0,001±0,0001	0,89
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	5	1	0,0009±0,00021	0,00103±0,00023	1,14
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	5	1	0,00088±0,00015	0,00093±0,00014	1,06
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	>5				

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

A Tabela XI apresenta os resultados do composto BH. Este LI apresenta inibição de crescimento bacteriano para concentrações de 5mM e só para 3 das 8 bactérias. Estatisticamente, só a *Escherichia coli* bla_{TEM} 180 e a *Escherichia coli* ART 19B apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) - Anexo 10 e 14.

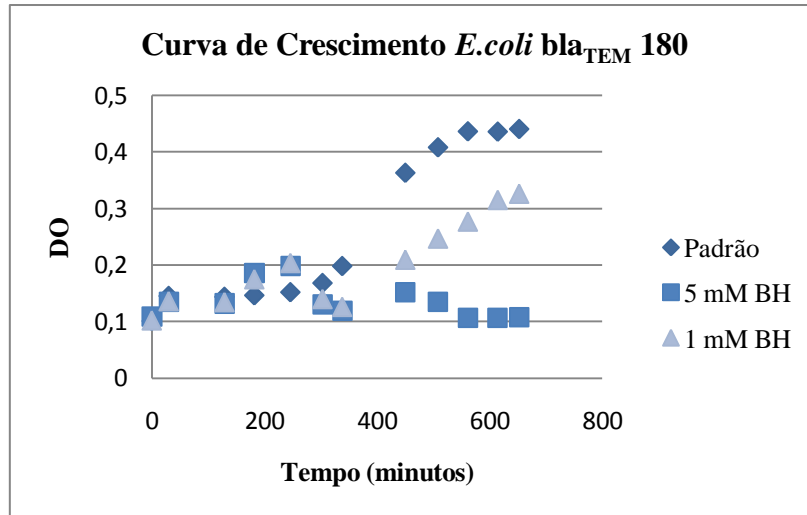


Figura XVIII – Curvas de crescimento da *Escherichia coli* bla_{TEM} 180 na presença/ausência do LI BH.

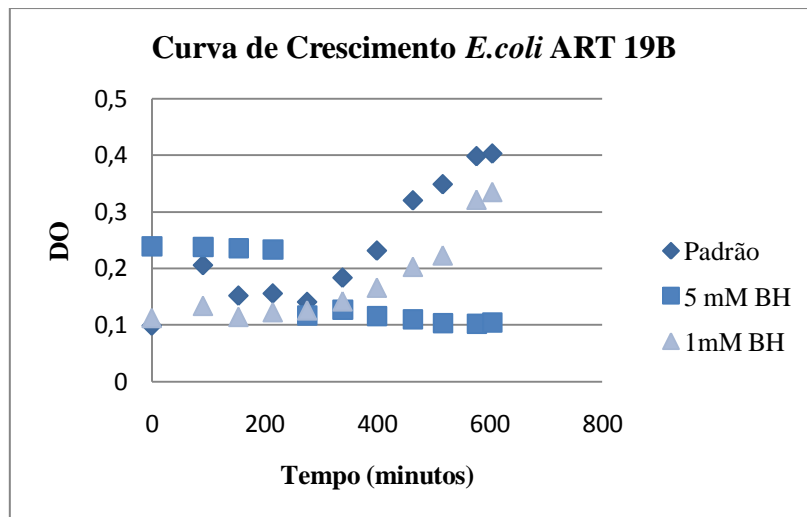


Figura XIX – Curvas de crescimento da *Escherichia coli* ART 19B na presença/ausência do LI BH.

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela XI – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [C2OHbpy]I (BH) para cada estirpe bacteriana estudada.

Gram Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BH	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>5				
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	5	1	0,00280±0,00027	0,00247±0,00036	0,88
<i>Enterococcus faecalis</i>	>5				
Gram Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5	1	0,00265±0,00025	0,00247±0,00008	0,93
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	5	1	0,00112±0,00008	0,00078±0,00017	0,70*
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	5	1	0,00180±0,00038	0,00168±0,00050	0,93
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	5	1	0,00102±0,00013	0,00073±0,00022	0,71*
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	>5				

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Na Tabela XII, XIII, XIV e XV os LIs estudados (BI, BJ, BK e BL) só apresentam bioatividade contra bactérias Gram-negativa. O composto BI só revela bioatividade contra a *Escherichia coli* ART 19B e na concentração mais alta estudada. Apesar de apresentar decréscimo da taxa de crescimento, em comparação à bactéria só em meio de cultura, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

O composto BJ inibiu o crescimento de 4 das 5 bactérias Gram-negativas. A *Escherichia coli* ATCC 25922 não revelou MIC para este composto. À exceção da *Escherichia coli* bla_{TEM} 209 (Fator decrescente=1,03) todas as Gram-negativas resistentes foram inibidas pelo LI BJ e 2 com diferenças, nas taxas de crescimento a 1 mM, estatisticamente significativas - Anexo 10 e 16.

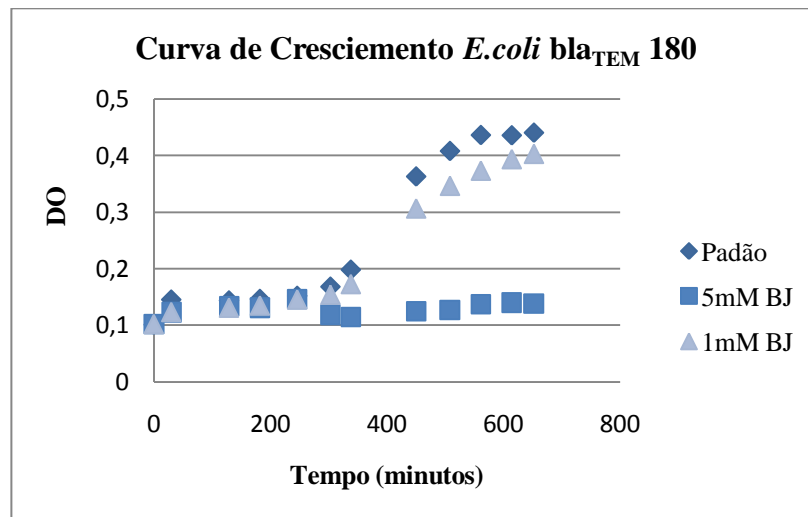


Figura XX – Curvas de crescimento da *Escherichia coli* bla_{TEM} 180 na presença/ausência do LI BJ.

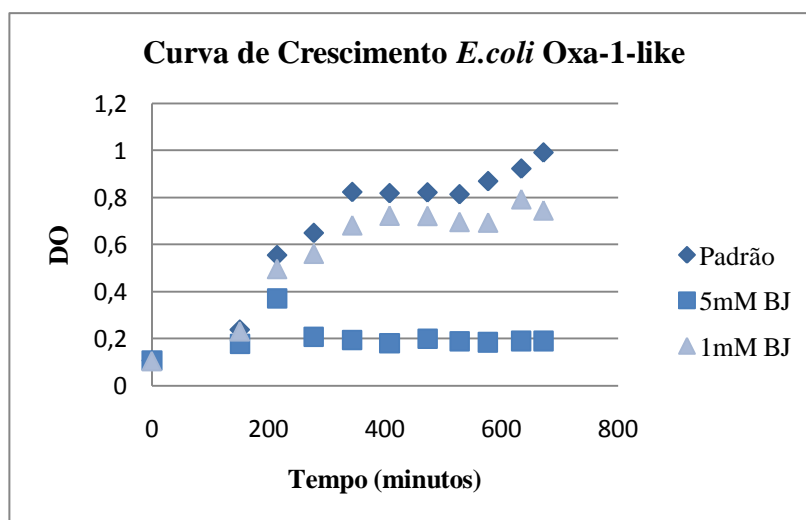


Figura XXI - Curvas de crescimento da *Escherichia coli* OXA-1-Like na presença/ausência do LI BJ.

Os LI BK e BL são bioativos contra todas as Gram-negativas nas concentrações máximas estudadas. O BK apresenta mais ou menos o mesmo fator decrescente para todas, no entanto só para a *Escherichia coli* bla_{TEM} 209 as diferenças são significativas - Anexo 12. O BL apresentou diferenças estatísticas para a *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* bla_{TEM} 180 - Anexo 8 e 10. Os fatores decrescentes são, no entanto, similares, exceto para a *Escherichia coli* ART 19B cuja taxa de crescimento foi maior do que o padrão.

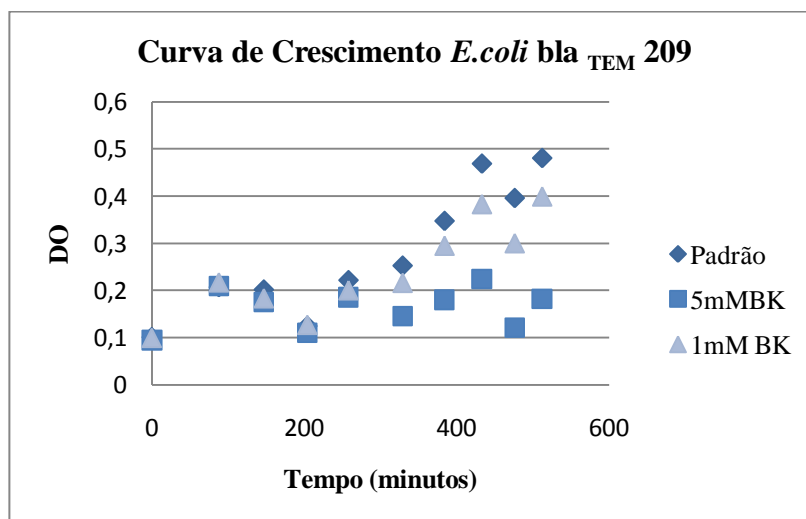


Figura XXII - Curvas de crescimento da *Escherichia coli* bla_{TEM} 209 na presença/ausência do LI BK.

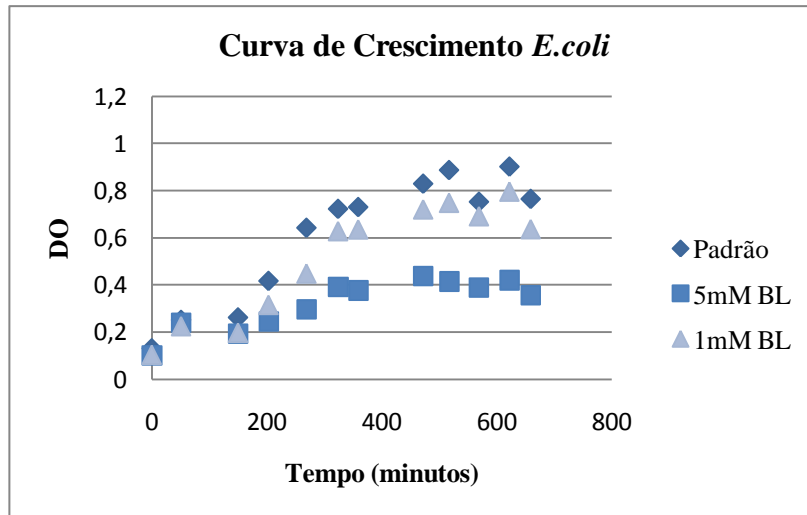


Figura XXIII – Curvas de crescimento da *Escherichia coli* ATCC 25922 na presença/ausência do LI BL.

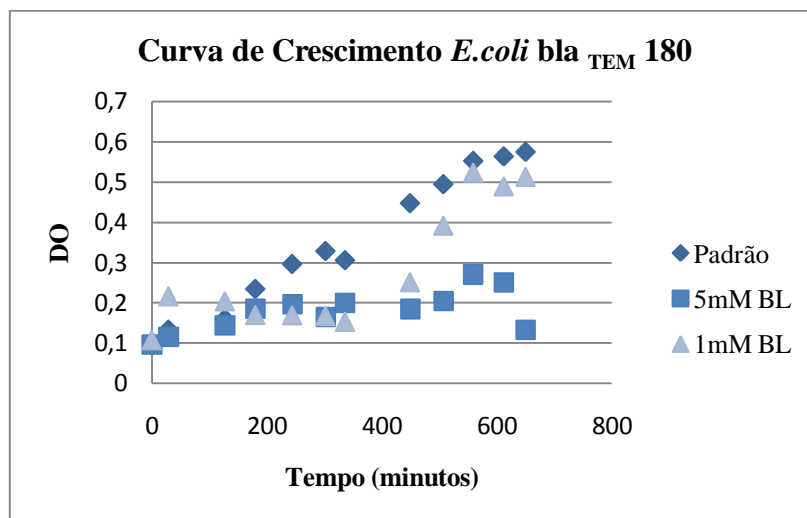


Figura XXIV – Curvas de crescimento da *Escherichia coli* bla_{TEM} 180 na presença/ausência do LI BL.

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela XII – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [Hbpy]Cl (BI) para cada estirpe bacteriana estudada.

Gram Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BI	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>5				
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	>5				
<i>Enterococcus faecalis</i>	>5				
Gram Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>5				
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	>5				
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	>5				
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	5	1	0,00122±0,00041	0,00095±0,00028	0,78
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	>5				

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela XIII – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [Hbpy]Me (BJ) para cada estirpe bacteriana estudada

Gram Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BJ	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>5				
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	>5				
<i>Enterococcus faecalis</i>	>5				
Gram Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>5				
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	5	1	0,00112±0,00008	0,00085±0,00015	0,76*
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	5	1	0,00112±0,00004	0,00115±0,00005	1,03
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	5	1	0,00122±0,00041	0,00092±0,00026	0,75
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	5	1	0,00250±0,00052	0,00177±0,00042	0,71*

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela XIV – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [H2bpy]Cl2 (BK) para cada estirpe bacteriana estudada.

Gram Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BK	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>5				
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	>5				
<i>Enterococcus faecalis</i>	>5				
Gram Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5	1	0,00265±0,00025	0,00235±0,00031	0,89
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	5	1	0,00112±0,00008	0,00093±0,00034	0,83
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	5	1	0,00112±0,00004	0,00092±0,00018	0,82*
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	5	1	0,00110±0,00025	0,00103±0,00008	0,94
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	5	1	0,00250±0,00052	0,00205±0,00018	0,82

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela XV – Taxas de crescimentos e Fatores decrescentes do [H2bpy][Me]2 (BL) para cada estirpe bacteriana estudada.

Gram Positivas	MIC (mM)	Concentração Testada (mM)	Taxa de Crescimento		Fator Decrescente
			Sem Composto	Com Composto BL	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>5				
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	>5				
<i>Enterococcus faecalis</i>	>5				
Gram Negativas					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5	1	0,00265±0,00025	0,00220±0,00023	0,83*
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	5	1	0,00120±0,00014	0,00092±0,00016	0,77*
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	5	1	0,00160±0,00047	0,00137±0,00034	0,86
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	5	1	0,00093±0,00010	0,00113±0,00031	1,22
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	5	1	0,00220±0,00040	0,00188±0,00029	0,85

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Uma vez que os LIs são estruturalmente diferentes, será conveniente verificar se há influência da estrutura/constituição química na ação antimicrobiana. Assim sendo, comparou-se, para cada bactéria, os LI biologicamente ativos com o mesmo MIC (concentração). As alterações, se presentes, estão relacionadas com a constituição do LI e não com a concentração em que este está presente. A Tabela XVII resume os fatores decrescentes de cada composto contra cada bactéria biologicamente ativo e a Tabela XVI ordena de forma decrescente, em função dos MIC e fatores decrescentes, a toxicidade de cada LI para cada estirpe bacteriana.

Analisando a Tabela XVI verifica-se que o LI BC é o composto com maior toxicidade contra as bactérias estudadas, só sendo ultrapassado pelo BE no que diz respeito ao *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300. O LI BE é para as bactérias Gram-positivas o segundo composto mais tóxico, quase não constando como antimicrobiano para as Gram-negativas (só apresenta bioatividade contra a *Escherichia coli* bla_{TEM} 209). Para os restantes compostos não se consegue encontrar um padrão de toxicidade. É de salientar, que apesar da ordenação da tabela XV, as taxas decrescentes são muito próximas umas das outras.

Tabela XVI – Analisando a Tabela VI e XVII obtemos esta tabela, que nos indica, por ordem decrescente, os compostos com maior inibição do crescimento bacteriano, tendo em consideração as concentrações mínimas inibitórias e os fatores decrescentes.

Gram Positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	BC> BE> BG> BA
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	BE> BG> BC> BA> BH
<i>Enterococcus faecalis</i>	BC> BE> BG> BA
Gram Negativas	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	BC> BL> BA> BK> BH
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	BC> BH> BJ> BL> BK> BG> BA
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	BC> BK> BL> BH> BA> BJ> BG> BE
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	BC> BH> BJ> BI> BA> BK> BG> BL
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	BC> BJ> BA> BK> BL

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela XVII - Resumo dos fatores decrescentes dos LIs, com bioatividade, para cada estirpe bacteriana estudada. Os valores que apresentam a mesma cor de sombreado indicam, para a respectiva estirpe bacteriana, concentrações de MIC iguais, permitindo, assim, comparar os efeitos das estruturas químicas dos LIs na inibição do crescimento bacteriano.

	Fatores Decrescentes								
	BA	BC	BE	BG	BH	BI	BJ	BK	BL
Gram-Positivas									
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,75	0,68	0,58*	0,59*					
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	0,81	0,44*	0,25*	0,32*	0,88				
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,81	0,64*	0,78	0,80					
Gram-Negativas									
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,84	0,71*			0,93			0,89	0,83*
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180	1,07	0,48*		0,89	0,70*		0,76*	0,83	0,77*
<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209	0,96	0,82	1,47*	1,14	0,93		1,03	0,82*	0,86
<i>Escherichia coli</i> ART 19B	0,83	0,64		1,06	0,71*	0,78	0,75	0,94	1,22
<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like	0,75*	0,90					0,71*	0,82	0,85

*Taxas de crescimento estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Capítulo IV - Discussão

Os compostos estudados surgem no seguimento dos estudos que indicam as propriedades antimicrobianas dos bis-piridínios, tal como descrito na introdução deste trabalho. Assim sendo, juntaram-se as propriedades antimicrobianas dos bis-piridínios com as propriedades únicas dos LIs e sintetizaram-se 12 LIs baseados em bis-piridínios. Tal como seria esperado, os resultados do nosso estudo demonstram as propriedades antimicrobianas dos compostos.

A escolha das bactérias para o estudo não foi aleatória, a pesquisa bibliográfica indica as estirpes resistentes de *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus* como as bactérias que mais preocupam a comunidade médica e científica, com incidências e prevalências elevadas (ECDPC, 2015). As *Escherichia coli* são, também, utilizadas como indicadores de contaminação fecal do ambiente e como organismos-modelo para detetar a ocorrência de resistências aos antibióticos em animais e humanos (Helt, Weber, Legge, & Slawson, 2012). O *Enterococcus faecalis* foi escolhido para obtermos resultados de pelo menos mais uma Gram-positiva.

As concentrações escolhidas para o estudo estão dentro dos intervalos observados na bibliografia. (Morrissey et al., 2009).

No fim deste estudo, e analisando os resultados obtidos, várias conclusões foram obtidas e muitas questões levantadas.

Bioatividade dos LIs baseados em bis-piridíneos contra bactérias.

Dos 12 LI estudados só 3 não apresentaram atividade microbiana contra as bactérias estudadas, o composto BB, BD e BF. Estes 3 LIs, constituídos pelo anião iodeto e solúveis em água, requerem de mais pesquisa para serem eliminados por completo dos compostos com potencial antimicrobiano. Nomeadamente estudos com concentrações superiores a 5mM, estudos com outras estirpes bacterianas ou mesmo contra outro tipo de microrganismos.

Os restantes LIs apresentaram propriedades antimicrobianas pelo menos contra uma estirpe bacteriana. O LI BI só inibiu o crescimento da *Escherichia coli* ART 19B.

A atividade antimicrobiana dos LIs foi encontrada 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. A ausência de bactéria no poço é traduzida no mesmo resultado, assim sendo efetuaram-se os estudos em triplicado e, posteriormente, em sextuplicado, para garantir a veracidade dos resultados.

Numa fase inicial do estudo só se determinaram os MIC, em triplicado. Na segunda fase do estudo realizou-se o mesmo procedimento, em sextuplicado, para confirmar os MICs obtidos no ensaio anterior e para verificar o comportamento de crescimento das bactérias na presença de concentrações mais baixas do que o MIC. Em todos os estudos verificou-se a inibição do crescimento na presença de concentrações iguais e superiores a MIC. Na presença de valores inferiores ao MIC observou-se uma diminuição na taxa de crescimento, na maioria dos casos, em comparação ao crescimento da bactéria só em meio de cultura. As concentrações inferiores em estudo eram 5x ou 10x inferior à concentração de MIC, o que nos dá um intervalo, para futuros estudos, para ajustes, se necessário, nas concentrações de inibição.

Neste estudo não foi possível determinar se os compostos são bacteriostáticos ou bactericidas. Novos estudos, com a inoculação das bactérias dos poços onde não ocorreu crescimento bacteriano, deverão ser executados com o este objetivo. Os resultados trarão mais luzes aos mecanismos de ação destes LIs.

Os fatores decrescentes foram obtidos pela média dos declives das curvas de crescimento bacteriano na presença do LI (seis ensaios) sobre a média dos declives das curvas de crescimento bacteriano só em meio de cultura (seis ensaios). A significância estatística das taxas foi obtida recorrendo ao programa SPSS e ao teste Mann-Whitney U que comparou os 12 ensaios e estabeleceu se as diferenças eram significativas ou não. Neste ponto de discussão é importante realçar que, nem sempre, as curvas permitem a clara determinação do declive e que dois observadores diferentes podem obter declives diferentes e com igual R^2 (este valor indica-nos com que precisão os valores estimados para a linha de tendência correspondem aos dados reais). Para minimizar a influencia do observador, escolheram-se sempre que possível os mesmos pontos do gráfico para determinar os declives. Os gráficos de dispersão aqui apresentados reflectem as médias das DO recolhidas no leitor a 620 nm. Nestes gráficos não existe a influência do observador, são os dados obtidos em bruto.

As bactérias Gram-negativas são suscetíveis a um maior número de LI baseados em bis-piridínios (55% dos estudos apresenta MICs) do que as Gram-positivas (36% estudos com MICs), isto é, existem mais LIs a inibirem o crescimento das bactérias Gram-negativas do que das Gram-positivas. Este resultado poderá estar relacionado com a estrutura da parede bacteriana, alguns LIs parecem ter mais dificuldade em penetrar a camada de peptidoglicano das Gram-positivas. Esta observação carece, no entanto, de mais investigação.

Os LI BI, BJ, BK e BL só são activos contra as Gram-negativas, já os LI BA e BC são bioativos contra todas as bactérias estudadas. O LI BG é bioativo contra todas as Gram-positivas e em concentrações inferiores (10x menor) às necessárias para inibir o crescimento da Gram-negativas suscetíveis. BG é estruturalmente parecido a BE que apresenta o mesmo padrão de bioatividade, inibe todas as Gram-positivas e em concentrações 10x inferiores à necessária para inibir a *Escherichia coli* bla_{TEM} 209 (única Gram-negativa susceptível).

Ainda na análise individual dos compostos é relevante discutir alguns pontos, nomeadamente no LI BC, para o *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300. No gráfico de dispersão parece não existir diferenças entre a concentração 0,5mM (MIC) e a concentração 0,05mM, dando a entender que ambas inibem o crescimento bacteriano, no entanto, observando a Figura VIII, percebe-se que um provoca turbidez (0,05mM) e o outro não (0,5mM). Apesar do observado durante o tempo da análise espectrofotométrica (até aos 600 minutos), ocorre crescimento na presença de BC na concentração 0,05 mM, mas fora do tempo da análise, antes de decorridas as 24h. Igual comportamento é observado na *Escherichia coli* bla_{TEM} 180 (Figura XI).

O composto BE apresenta um comportamento digno de nota para a *Escherichia coli* bla_{TEM} 209. Na presença deste composto a taxa de crescimento da bactéria sofre um aumento, apesar de não ser um caso isolado neste estudo, é o único com diferenças estatisticamente significativas. É importante relembrar que esta bactéria foi a única Gram-negativa a ser inibida com 5mM de BE. Estudar de futuro o comportamento de crescimento das outras Gram-negativas na presença deste composto poderia trazer alguma informação a este resultado.

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tal como já mencionado para o LI BG, também o LI BE inibe o crescimento bacteriano das Gram-positivas em concentrações médias inferiores às necessárias para obter a mesma inibição nas Gram-negativas. Esta afirmação é contrária ao pressuposto enunciado anteriormente em que se afirmou que os LI baseados em bis-piridínios teriam mais dificuldade em penetrar a parede celular. Esta afirmação só poderá ser válida para os compostos BI, BJ, BK e BL.

Estrutura química dos compostos e a bioatividade dos compostos.

Tabela XVIII - LIs derivados de bis-piridínios estudados.

Sal	MM
BA - 4,4'-bpy	156.19
BB - [C1bpy]I	298.13
BC - [C10bpy]I	424.37
BD - [C3Obpy]I	342.18
BE [C3Obpy][AOT]	636.58

BF - [C3H4bpy]I	324.17
BG [C3H4bpy][AOT]	618.83
BH - [C2OHbpy]I	328.15
BI - [Hbpy]Cl	192.65
BJ - [Hbpy]Me	252.29
BK - [H2bpy]Cl ₂	229.10
BL [H2bpy][Me] ₂	348.39

O LI BA, que é considerado a estrutura base dos restantes LI, apresentou bioatividade contra todas as bactérias e nas mesmas concentrações. Este resultado era esperado, uma vez que esta estrutura em outros estudos já tinha demonstrado propriedades antimicrobianas (Grenier et al., 2012).

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Os LI BB não produziram qualquer inibição. Este resultado leva a concluir que, o acréscimo isolado do iodeto, não cria um LI bioativo contra bactérias e neutraliza a ação do 4,4'-bpy. No entanto se a esta molécula se adicionar uma cadeia de 10 carbonos obtemos o LI BC, que apresenta bioatividade contra todas as bactérias e em concentrações mais baixas que BA, ou seja o composto BC é mais tóxico que o composto base.

O LI BD também não apresenta bioatividade contra bactérias, no entanto a troca do anião iodeto pelo anião docusato (AOT) origina um LI bioativo (BE) e para as Gram-positivas em concentrações inferiores (10x menos) ao LI BA, ou seja mais tóxico que estrutura base.

O LI BF é outro composto sem atividade antibacteriana cuja substituição do anião iodeto pelo AOT origina um composto bioativo (BG), que inibe o crescimento de todas as Gram-positivas em concentrações 10x inferiores ao LI BA. BG é mais tóxico para as Gram-positivas que BA.

Com 8 LI analisados já se consegue afirmar que, cadeias longas de carbono (10 C) tornam os LIs mais tóxico e que o anião AOT concede propriedades antibacterianas aos LI baseados em bis-piridínios.

O composto BH possui um anião iodeto e no catião uma cadeia de 2 carbono e um grupo hidróxido. Este LI possui bioatividade contra algumas bactérias e nas concentrações máximas estudadas.

Os compostos BI, BJ, BK e BL diferem substancialmente no anião, nenhum destes LI atuou contra as bactérias Gram-positivas. BI e BK possuem 1 ou 2 cloretos respetivamente, BJ e BL 1 ou 2 sulfitos. O LI BI só inibiu o crescimento de uma bactéria Gram-negativa ao contrário de BK que inibiu todas as Gram-negativas. A presença de 2 cloreto confere mais toxicidade ao composto.

BJ e BL só diferem para a *Escherichia coli* ATCC 25922, BJ não inibe o crescimento desta estirpe, não se tornando a presença de mais um sulfito relevante.

Estrutura química dos compostos e a bioatividade contra bactéria Gram-positiva e Gram-negativas.

A análise dos resultados permite-nos perceber que determinadas estruturas química são mais tóxicas do que outras para os dois grupos de bactérias estudadas. Os LIs BI, BJ, BK e

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

BL não têm qualquer capacidade de inibição contra as Gram-positivas. Os bis-piridínios com os aniões cloreto e sulfito não são uma boa estrutura contra as Gram-positivas, no entanto são tóxicos contra as Gram-negativas. Tendo em consideração que a principal diferença entre Gram-positivas/Gram-negativas se prende com a parede celular, leva-nos a supor que estes compostos terão mais dificuldade em penetrar as camadas de peptidoglicano.

Os LIs BE e BG, por sua vez, são mais tóxicos para as Gram-positivas. Precisamos de concentrações superiores para inibir o crescimento das Gram-negativas. Mais estudos são necessários para podermos perceber se aniões volumosos tornam os LIs mais tóxicos para as Gram-positivas.

Uma estrutura que é tóxica para os dois grupos de bactérias é o bis-piridínio (BA) e o bis-piridínio com uma longa cadeia de carbonos (BC). Estas estruturas têm um comportamento que já era esperado dado que muitos outros estudos relatam que a toxicidade aumenta com o número de carbonos e que os bis-piridínios apresentavam propriedades antimicrobianas.

Estrutura química dos compostos e bioatividade contra bactérias resistentes.

Os resultados obtidos não indicam diferenças na inibição bacteriana entre estirpes resistentes aos antibióticos e suscetíveis. Tudo indica que o mecanismo de ação destes compostos é diferente dos antibióticos β -lactâmicos ou pelo menos que as ESBLs (β -lactamases de largo espectro) ainda não tem capacidade de degradar estes LIs.

Os LIs baseados em bis-piridínios inibem o crescimento bacteriano de bactérias resistentes aos antibióticos, incluindo estirpes multirresistentes como o *Staphylococcus aureus* MRSA.

Considerando o objetivo deste estudo, e à luz da problemática em encontrar alternativas ao aumento das resistências bacterianas, os LIs baseados em bis-piridínios poderão ser um fármaco antibacteriano ou a etapa inicial de um. Os resultados obtidos levam-nos a pensar que os LIs são uma real possibilidade no combate às resistências bacterianas, bem como uma excelente base para novos fármacos e para novos processos farmacêuticos.

Os LIs baseados em bis-piridínios têm muito potencial como fármacos antibacterianos, principalmente contra estirpes resistentes e em baixas concentrações.

Conclusão

Este trabalho demonstrou que, de uma forma geral, os LIs baseados em bis-piridínios tem propriedades antimicrobianas. Os LIs já tinham, em outros estudos, demonstrado o seu potencial no combate às resistências aos antibióticos, mas quase sempre conjugados com APIs antibacterianos. Neste trabalho observamos inibição de crescimento bacteriano, inclusive inibição de crescimento de bactérias resistentes, somente com os LIs baseados em bis-piridínios, ou seja, os nossos LIs são por si só um API. Esta conclusão permite-nos visualizar os LIs, principalmente os baseados em bis-piridínios, como potenciais antibióticos ou desinfetantes.

Este trabalho elucidou sobre o potencial antimicrobianos dos LIs baseados em bis-piridínios. Contudo muito trabalho é ainda necessário, nomeadamente compreender o mecanismo de ação destes compostos; submetê-los a estudos com outras estirpes bacterianas e/ou outros microrganismos; efetuar estudos de toxicidade com linhas celulares humanas; e muitos outros no decorrer da viabilização destes compostos para uso, ou não, em seres humanos.

Este trabalho deu um contributo importante para demonstrar a importância dos LIs como antibacterianos, no entanto muito trabalho é ainda necessário efetuar para perceber completamente os seus mecanismos de ação.

Na luta contra as resistências bacterianas e na dificuldade em encontrar novos antibióticos, os LIs apresentam-se com elevado potencial para combater este problema.

Referências Bibliográficas

- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of medical research*, 36(6), 697-705.
- Anderson, J. L., Dixon, J. K., Maginn, E. J., & Brennecke, J. F. (2006). Measurement of SO₂ solubility in ionic liquids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(31), 15059-15062.
- Andersson, D. I. (2003). Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current opinion in microbiology*, 6(5), 452-456.
- Ator, L. E., Jennings, M. C., McGettigan, A. R., Paul, J. J., Wuest, W. M., & Minbirole, K. P. (2014). Beyond paraquats: Dialkyl 3, 3'-and 3, 4'-bipyridinium amphiphiles as antibacterial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(16), 3706-3709.
- Bernot, R. J., Kennedy, E. E., & Lamberti, G. A. (2005). Effects of ionic liquids on the survival, movement, and feeding behavior of the freshwater snail, *Physa acuta*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1759-1765.
- Breedlove, B., & Cohen, M. L. (2014). After the Resistance: The Alamo Today. *Emerging infectious diseases*, 20(7), 1268.
- Bubalo, M. C., Radošević, K., Redovniković, I. R., Halambek, J., & Srček, V. G. (2014). A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicology and environmental safety*, 99, 1-12.
- Buseti, A., Crawford, D. E., Earle, M. J., Gilea, M. A., Gilmore, B. F., Gorman, S. P., . . . Seddon, K. R. (2010). Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids. *Green Chemistry*, 12(3), 420-425.
- Bush, K. (2012). Improving known classes of antibiotics: an optimistic approach for the future. *Current opinion in pharmacology*, 12(5), 527-534.
- Cars, O., Hedin, A., & Heddini, A. (2011). The global need for effective antibiotics—moving towards concerted action. *Drug Resistance Updates*, 14(2), 68-69.
- Carson, L., Chau, P. K., Earle, M. J., Gilea, M. A., Gilmore, B. F., Gorman, S. P., . . . Seddon, K. R. (2009). Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chemistry*, 11(4), 492-497.
- Chandran, A., Ghoshdastidar, D., & Senapati, S. (2012). Groove binding mechanism of ionic liquids: a key factor in long-term stability of DNA in hydrated ionic liquids? *Journal of the American Chemical Society*, 134(50), 20330-20339.
- CLSI. (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard (Tenth Edition ed.). CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 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.
- Docherty, K. M., & Kulpa Jr, C. F. (2005). Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chemistry*, 7(4), 185-189.
- Drlica, K. S., & Perlin, D. S. (2010). *Antibiotic resistance: Understanding and responding to an emerging crisis*: FT Press.
- ECDPC. (2015). *Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Annual epidemiological report 2014* (Stockholm: ECDC; ed.).
- Fenton, C., Keating, G. M., & Curran, M. P. (2004). Daptomycin. *Drugs*, 64(4), 445-455.
- Ferraz, R., Branco, L. C., Marrucho, I. M., Araújo, J. M., Rebelo, L. P. N., da Ponte, M. N., . . . Petrovski, Ž. (2012). Development of novel ionic liquids based on ampicillin. *MedChemComm*, 3(4), 494-497.
- Ferraz, R., Teixeira, V., Rodrigues, D., Fernandes, R., Prudêncio, 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.
- Freire-Moran, L., Aronsson, B., Manz, C., Gyssens, I. C., So, A. D., Monnet, D. L., . . . Group, E.-E. W. (2011). Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria—time to react is now. *Drug resistance updates*, 14(2), 118-124.
- Freudenmann, D., Wolf, S., Wolff, M., & Feldmann, C. (2011). Ionic liquids: new perspectives for inorganic synthesis? *Angewandte Chemie International Edition*, 50(47), 11050-11060.
- Furdui, B., Parfene, G., Ghinea, I. O., Dinica, R. M., Bahrim, G., & Demeunynck, M. (2014). Synthesis and in Vitro Antimicrobial Evaluation of New N-Heterocyclic Diquaternary Pyridinium Compounds. *Molecules*, 19(8), 11572-11585.

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

- Gal, N., Malferri, D., Kolusheva, S., Galletti, P., Tagliavini, E., & Jelinek, R. (2012). Membrane interactions of ionic liquids: Possible determinants for biological activity and toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(12), 2967-2974.
- Grenier, M. C., Davis, R. W., Wilson-Henjum, K. L., LaDow, J. E., Black, J. W., Caran, K. L., . . . Minbiole, K. P. (2012). The antibacterial activity of 4, 4'-bipyridinium amphiphiles with conventional, bicephalic and gemini architectures. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(12), 4055-4058.
- Helt, C. D., Weber, K. P., Legge, R. L., & Slawson, R. M. (2012). Antibiotic resistance profiles of representative wetland bacteria and faecal indicators following ciprofloxacin exposure in lab-scale constructed mesocosms. *Ecological Engineering*, 39, 113-122.
- Hugo, W. B., & Russell, A. D. (1998). *Pharmaceutical microbiology*: Blackwell science.
- Jordão, N., Cabrita, L., Pina, F., & Branco, L. C. (2014). Novel Bipyridinium Ionic Liquids as Liquid Electrochromic Devices. *Chemistry-A European Journal*, 20(14), 3982-3988.
- Jordão, N., Cruz, H., Branco, A., Pina, F., & Branco, L. C. (2015). Electrochromic Devices Based on Disubstituted Oxo-Bipyridinium Ionic Liquids. *ChemPlusChem*, 80(1), 202-208.
- Jordão, N., Cruz, H., Branco, A., Pinheiro, C., Pina, F., & Branco, L. C. (2015). Switchable electrochromic devices based on disubstituted bipyridinium derivatives. *RSC Advances*, 5(35), 27867-27873.
- Kurnia, K. A., Sintra, T. E., Neves, C. M., Shimizu, K., Lopes, J. N. C., Gonçalves, F., . . . Coutinho, J. A. (2014). The effect of the cation alkyl chain branching on mutual solubilities with water and toxicities. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(37), 19952-19963.
- Lad, H. B., Giri, R. R., Chovatiya, Y. L., & Brahmabhatt, D. I. (2015). Synthesis of modified pyridine and bipyridine substituted coumarins as potent antimicrobial agents. *Journal of the Serbian Chemical Society*(00), 4-4.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., . . . Goossens, H. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet infectious diseases*, 13(12), 1057-1098.
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10, S122-S129.
- Luis, P., Garea, A., & Irabien, A. (2010). Quantitative structure–activity relationships (QSARs) to estimate ionic liquids ecotoxicity EC 50 (*Vibrio fischeri*). *Journal of Molecular Liquids*, 152(1), 28-33.
- MacFarlane, D. R., Tachikawa, N., Forsyth, M., Pringle, J. M., Howlett, P. C., Elliott, G. D., . . . Angell, C. A. (2014). Energy applications of ionic liquids. *Energy & Environmental Science*, 7(1), 232-250.
- Matzke, M., Stolte, S., Thiele, K., Juffernholz, T., Arning, J., Ranke, J., . . . Jastorff, B. (2007). The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco) toxicological test battery. *Green Chemistry*, 9(11), 1198-1207.
- McCrary, P. D., Beasley, P. A., Gurau, G., Narita, A., Barber, P. S., Cojocaru, 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.
- Melo, C. I., Bogel-Lukasik, R., da Ponte, M. N., & Bogel-Lukasik, E. (2013). Ammonium ionic liquids as green solvents for drugs. *Fluid Phase Equilibria*, 338, 209-216.
- Mikláš, R., Miklášová, N., Bukovský, M., Horváth, B., Kubincová, J., & Devínsky, F. (2014). Synthesis, surface and antimicrobial properties of some quaternary ammonium homochiral camphor sulfonamides. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 29-37.
- Mizuuchi, H., Jaitely, V., Murdan, S., & Florence, A. (2008). Room temperature ionic liquids and their mixtures: Potential pharmaceutical solvents. *European journal of pharmaceutical sciences*, 33(4), 326-331.
- Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2011). Ionic liquids: future solvents and reagents for pharmaceuticals. *Journal of chemical engineering of Japan*, 44(6), 370-381.
- Moniruzzaman, M., Tahara, Y., Tamura, M., Kamiya, N., & Goto, M. (2010). Ionic liquid-assisted transdermal delivery of sparingly soluble drugs. *Chem. Commun.*, 46(9), 1452-1454.
- Moniruzzaman, M., Tamura, M., Tahara, Y., Kamiya, N., & Goto, M. (2010). Ionic liquid-in-oil microemulsion as a potential carrier of sparingly soluble drug: Characterization and cytotoxicity evaluation. *International journal of pharmaceuticals*, 400(1), 243-250.
- Morrissey, S., Pegot, B., Coleman, D., Garcia, M. T., Ferguson, D., Quilty, B., & Gathergood, N. (2009). Biodegradable, non-bactericidal oxygen-functionalised imidazolium esters: A step towards 'greener' ionic liquids. *Green Chemistry*, 11(4), 475-483.
- Nishimura, N., & Ohno, H. (2014). 15th anniversary of polymerised ionic liquids. *Polymer*, 55(16), 3289-3297.
- Pernak, J., Rogoza, J., & Mirska, I. (2001). Synthesis and antimicrobial activities of new pyridinium and benzimidazolium chlorides. *European journal of medicinal chemistry*, 36(4), 313-320.

- Pinto, P. C., Ribeiro, D. M., Azevedo, A. M., Justina, V. D., Cunha, E., Bica, K., . . . Saraiva, M. L. M. (2013). Active pharmaceutical ingredients based on salicylate ionic liquids: insights into the evaluation of pharmaceutical profiles. *New Journal of Chemistry*, 37(12), 4095-4102.
- Plachouras, D., Antoniadou, A., Giannitsioti, E., Galani, L., Katsarolis, I., Kavatha, D., . . . Poulakou, G. (2014). Promoting prudent use of antibiotics: the experience from a multifaceted regional campaign in Greece. *BMC public health*, 14(1), 866.
- Portugal, D. G. d. S. (2014). Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números – 2014. <http://www.dgs.pt/?cr=24903>
- Ribeiro, B. D., Coelho, M. A. Z., Rebelo, L. P. N., & Marrucho, I. M. (2013). Ionic liquids as additives for extraction of saponins and polyphenols from mate (*Ilex paraguariensis*) and tea (*Camellia sinensis*). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(34), 12146-12153.
- Rodriguez, M., Hogan, P. G., Burnham, C.-A. D., & Fritz, S. A. (2014). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in households of children with community-associated *S aureus* skin and soft tissue infections. *The Journal of pediatrics*, 164(1), 105-111.
- Roy, K., Das, R. N., & Popelier, P. L. (2014). Quantitative structure–activity relationship for toxicity of ionic liquids to *Daphnia magna*: Aromaticity vs. lipophilicity. *Chemosphere*, 112, 120-127.
- Santos, J. I., Gonçalves, A. M., Pereira, J., Figueiredo, B., e Silva, F., Coutinho, J. A., . . . Gonçalves, F. (2015). Environmental safety of cholinium-based ionic liquids: assessing structure–ecotoxicity relationships. *Green Chemistry*, 17(9), 4657-4668.
- Seter, M., Thomson, M. J., Chong, A., MacFarlane, D. R., & Forsyth, M. (2013). Cetrimonium naldixate as a multifunctional inhibitor to combat biofilm formation and microbiologically influenced corrosion. *Australian Journal of Chemistry*, 66(8), 921-929.
- Smiglak, M., Pringle, J., Lu, X., Han, L., Zhang, S., Gao, H., . . . Rogers, R. (2014). Ionic liquids for energy, materials, and medicine. *Chemical Communications*, 50(66), 9228-9250.
- Smith, K., Bridson, R., & Leeke, G. (2011). Solubilities of pharmaceutical compounds in ionic liquids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 56(5), 2039-2043.
- Spellberg, B. (2011). Race against time to develop new antibiotics. *Bull World Health Organ*, 89, 88-89.
- Spížek, J., Novotná, J., Řezanka, T., & Demain, A. L. (2010). Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(12), 1241-1248.
- Stedt, J., Bonnedahl, J., Hernandez, J., McMahon, B. J., Hasan, B., Olsen, B., . . . Waldenström, J. (2014). Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. *Infection ecology & epidemiology*, 4.
- 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.
- Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J., & McDermott, P. F. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950–2002. *Emerg Infect Dis*, 18(5), 741-749.
- Tattevin, P. (2011). Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) d’acquisition communautaire. *Médecine et maladies infectieuses*, 41(4), 167-175.
- Uzagare, M. C., Sanghvi, Y. S., & Salunkhe, M. M. (2003). Application of ionic liquid 1-methoxyethyl-3-methyl imidazolium methanesulfonate in nucleoside chemistry. *Green Chemistry*, 5(4), 370-372.
- van Bijnen, E. M., Paget, W. J., den Heijer, C. D., Stobberingh, E. E., Bruggeman, C. A., & Schellevis, F. G. (2014). Primary care treatment guidelines for skin infections in Europe: congruence with antimicrobial resistance found in commensal *Staphylococcus aureus* in the community. *BMC family practice*, 15(1), 175.
- van de Ven, E., Chairuna, A., Merle, G., Benito, S. P., Borneman, Z., & Nijmeijer, K. (2013). Ionic liquid doped polybenzimidazole membranes for high temperature proton exchange membrane fuel cell applications. *Journal of power sources*, 222, 202-209.
- Ventura, S. P., de Barros, R. L., Sintra, T., Soares, C. M., Lima, A. S., & Coutinho, J. A. (2012). Simple screening method to identify toxic/non-toxic ionic liquids: Agar diffusion test adaptation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 83, 55-62.
- Ventura, S. P., e Silva, F. A., Gonçalves, A. M., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Coutinho, J. A. (2014). Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicology and environmental safety*, 102, 48-54.
- Ventura, S. P., Marques, C. S., Rosatella, A. A., Afonso, C. A., Gonçalves, F., & Coutinho, J. A. (2012). Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76, 162-168.

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

- Vernet, G., Mary, C., Altmann, D. M., Doumbo, O., Morpeth, S., Bhutta, Z. A., & Klugman, K. P. (2014). Surveillance for antimicrobial drug resistance in under-resourced countries. *Emerging infectious diseases*, 20(3), 434.
- Vieira, R. C., Pereira, I. O., & Chavasco, J. K. (2011). AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA BENZIDAMINA [http://dx. doi. org/10.5892/ruvrv. 2011.92. 171181](http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.171181). *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 9(2), 171-181.
- Wang, H., Gurau, G., Shamshina, J., Cojocar, O. A., Janikowski, J., MacFarlane, D. R., . . . Rogers, R. D. (2014). Simultaneous membrane transport of two active pharmaceutical ingredients by charge assisted hydrogen bond complex formation. *Chemical Science*, 5(9), 3449-3456.
- Wang, X., Chi, Y., & Mu, T. (2014). A review on the transport properties of ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 193, 262-266.
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., . . . Otten, W. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 13(2), 155-165.
- Yu, Y., & Nie, Y. (2011). Toxicity and Antimicrobial Activities of Ionic Liquids with Halogen Anion. *Journal of Environmental Protection*, 2(03), 298.
- Zakrewsky, M., Lovejoy, K. S., Kern, T. L., Miller, T. E., Le, V., Nagy, A., . . . Koppisch, A. T. (2014). Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), 13313-13318.
- Zappia, G., Menendez, P., Delle Monache, G., Misiti, D., Nevola, L., & Botta, B. (2007). The contribution of oxazolidinone frame to the biological activity of pharmaceutical drugs and natural products. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 7(4), 389-409.
- Zhao, Y., Zhao, J., Huang, Y., Zhou, Q., Zhang, X., & Zhang, S. (2014). Toxicity of ionic liquids: database and prediction via quantitative structure–activity relationship method. *Journal of hazardous materials*, 278, 320-329.

Anexos

Anexo 1 - Declives *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Declives <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923								
	BA		BC		BE		BG	
	Declives		Declives		Declives		Declives	
	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI
	0,00300	0,00150	0,00300	0,00130	0,00180	0,00060	0,00180	0,00080
	0,00250	0,00130	0,00250	0,00120	0,00200	0,00090	0,00200	0,00060
	0,00220	0,00130	0,00220	0,00100	0,00160	0,00100	0,00160	0,00080
	0,00090	0,00140	0,00090	0,00140	0,00120	0,00100	0,00120	0,00080
	0,00130	0,00140	0,00130	0,00120	0,00120	0,00080	0,00120	0,00110
	0,00130	0,00150	0,00130	0,00160	0,00120	0,00090	0,00120	0,00120
Média	0,00187	0,00140	0,00187	0,00128	0,00150	0,00087	0,00150	0,00088
Desvio Padrão	0,00082	0,00009	0,00082	0,00020	0,00035	0,00015	0,00035	0,00022
Razão	0,75000		0,68000		0,58000		0,59000	
Significância	0,74352		0,25800		0,00358		0,00674	
	Não significativo		Não significativo		Significativo		Significativo	

Anexo 2 - Layout Teste Mann-Whitney e Gráfico de ramo-e-folhas para os declives dos LIs BE e BG contra o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

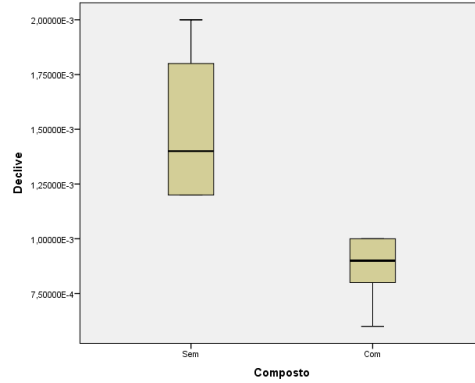
Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Declive	Composto	N	Postos de média
	Sem	6	9,50
	Com	6	3,50
	Total	12	
			Soma de Classificações
			57,00
			21,00

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		,000
Wilcoxon W		21,000
Z		-2,913
Significância Sig. (2 extremidades)		,004
Sig exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]		,002 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 1 - LI BE contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

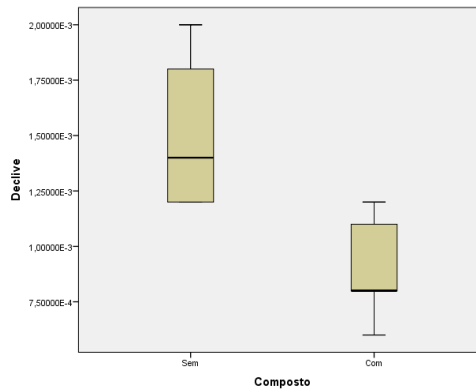
► **Testes de NPar**

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Declive	Composto	N	Postos de média
	Sem	6	9,25
	Com	6	3,75
	Total	12	
			Soma de Classificações
			55,50
			22,50

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		1,500
Wilcoxon W		22,500
Z		-2,709
Significância Sig. (2 extremidades)		,007
Sig exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]		,004 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 2 - LI BG contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Anexo 3 - Declives *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300

Staphylococcus aureus MRSA ATCC 43300										
	BA Declives		BC Declives		BE Declives		BG Declives		BH Declives	
	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI
	0,00170	0,00190	0,00170	0,00080	0,00190	0,00110	0,00190	0,00080	0,00240	0,00240
	0,00300	0,00200	0,00300	0,00060	0,00210	0,00070	0,00210	0,00060	0,00310	0,00240
	0,00260	0,00210	0,00260	0,00270	0,00220	0,00040	0,00220	0,00060	0,00280	0,00240
	0,00350	0,00210	0,00350	0,00080	0,00220	0,00060	0,00220	0,00050	0,00260	0,00200
	0,00280	0,00230	0,00280	0,00040	0,00230	0,00020	0,00230	0,00110	0,00290	0,00250
	0,00190	0,00220	0,00190	0,00150	0,00170	0,00010	0,00170	0,00040	0,00300	0,00310
Média	0,00258	0,00210	0,00258	0,00113	0,00207	0,00052	0,00207	0,00067	0,00280	0,00247
Desvio Padrão	0,00068	0,00015	0,00068	0,00085	0,00023	0,00037	0,00023	0,00025	0,00027	0,00036
Razão	0,81000		0,44000		0,25000		0,32000		0,88000	
Significância	0,29600		0,01600		0,00370		0,00364		0,10200	
	Não significativo		Significativo		Significativo		Significativo		Não significativo	

Anexo 4 - Layout Teste Mann-Whitney e Gráfico de ramo-e-folhas para os declives dos LIs BC, BE e BG contra o *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300

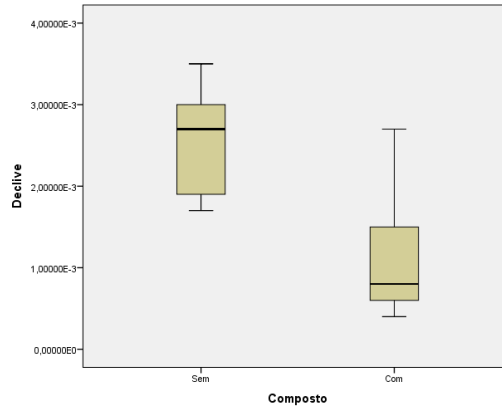
→ Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Composto	N	Postos de média	Soma de Classificações
Declive Sem	6	9,00	54,00
Com	6	4,00	24,00
Total	12		

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		3,000
Wilcoxon W		24,000
Z		-2,406
Significância Sig. (2 extremidades)		,016
Sig exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]		,015 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 3 - LI BC contra *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300

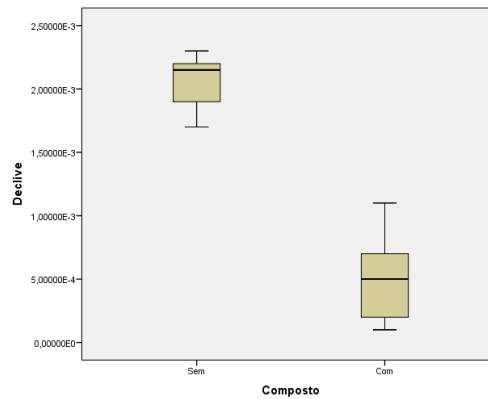
→ Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Composto	N	Postos de média	Soma de Classificações
Declive Sem	6	9,50	57,00
Com	6	3,50	21,00
Total	12		

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		,000
Wilcoxon W		21,000
Z		-2,887
Significância Sig. (2 extremidades)		,004
Sig exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]		,002 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 4 - LI BE contra *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300

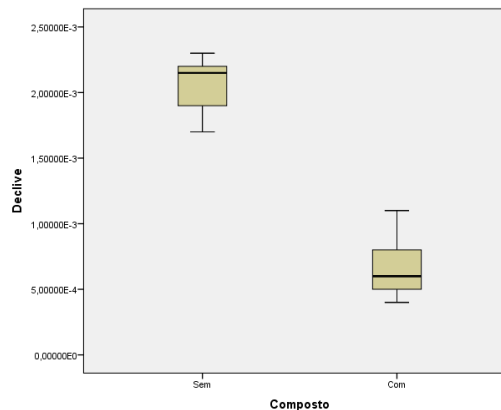
→ Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Composto	N	Postos de média	Soma de Classificações
Declive Sem	6	9,50	57,00
Com	6	3,50	21,00
Total	12		

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		,000
Wilcoxon W		21,000
Z		-2,892
Significância Sig. (2 extremidades)		,004
Sig exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]		,002 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 5 - LI BG contra *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Anexo 5 - Declives *Enterococcus faecalis*

<i>Enterococcus faecalis</i>								
	BA Declives		BC Declives		BE Declives		BG Declives	
	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI
	0,00150	0,00140	0,00150	0,00140	0,00270	0,00190	0,00270	0,00260
	0,00160	0,00140	0,00160	0,00080	0,00200	0,00190	0,00200	0,00210
	0,00150	0,00000	0,00150	0,00120	0,00280	0,00200	0,00280	0,00180
	0,00140	0,00150	0,00140	0,00110	0,00300	0,00200	0,00300	0,00170
	0,00170	0,00160	0,00170	0,00000	0,00120	0,00180	0,00120	0,00200
	0,00140	0,00150	0,00140	0,00140	0,00300	0,00180	0,00300	0,00160
Média	0,00152	0,00123	0,00152	0,00098	0,00245	0,00190	0,00245	0,00197
Desvio Padrão	0,00012	0,00061	0,00012	0,00053	0,00071	0,00009	0,00071	0,00036
Razão	0,81000		0,64000		0,78000		0,80000	
Significância	0,36023		0,00898		0,07453		0,12687	
	Não significativo		Significativo		Não significativo		Não significativo	

Anexo 6 - Layout Teste Mann-Whitney e Gráfico de ramo-e-folhas para os declives do LI BC contra o *Enterococcus faecalis*

Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

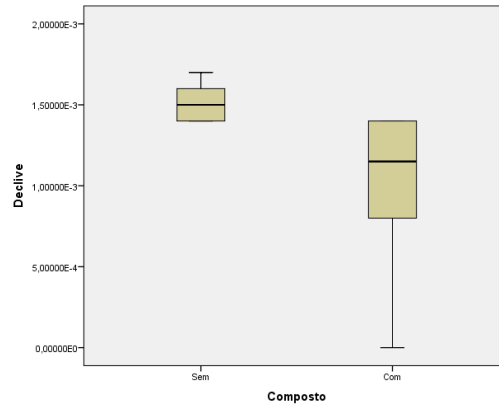
Classificações

Declive	Composto	N	Postos de média	Soma de Classificações
Sem		6	9,17	55,00
Com		6	3,83	23,00
Total		12		

Estadísticas de teste^a

	Declive
U de Mann-Whitney	2,000
Wilcoxon W	23,000
Z	-2,613
Significância Sig. (2 extremidades)	,009
Sig exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]	,009 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 6 - LI BC contra *Enterococcus faecalis*

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Anexo 7 - Declives *Escherichia coli* ATCC 25922

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922										
BA		BC		BH		BK		BL		
Declives		Declives		Declives		Declives		Declives		
Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	
0,00240	0,00220	0,00140	0,00100	0,00240	0,00250	0,00240	0,00180	0,00240	0,00240	
0,00270	0,00230	0,00120	0,00100	0,00270	0,00250	0,00270	0,00220	0,00270	0,00180	
0,00270	0,00220	0,00130	0,00100	0,00270	0,00240	0,00270	0,00250	0,00270	0,00220	
0,00250	0,00150	0,00140	0,00120	0,00250	0,00260	0,00250	0,00240	0,00250	0,00210	
0,00250	0,00270	0,00150	0,00110	0,00250	0,00240	0,00250	0,00270	0,00250	0,00240	
0,00310	0,00250	0,00200	0,00100	0,00310	0,00240	0,00310	0,00250	0,00310	0,00230	
Média	0,00265	0,00223	0,00147	0,00105	0,00265	0,00247	0,00265	0,00235	0,00265	0,00220
Desvio Padrão	0,00013	0,00043	0,00028	0,00008	0,00025	0,00008	0,00025	0,00031	0,00025	0,00023
Razão	0,84000		0,71000		0,93000		0,89000		0,83000	
Significância	0,05088		0,00420		0,11403		0,11811		0,00594	
	Não significativo		Significativo		Não significativo		Não significativo		Significativo	

Anexo 8 - Layout Teste Mann-Whitney e Gráfico de ramo-e-folhas para os declives do LI BC contra o *Escherichia coli* ATCC 25922

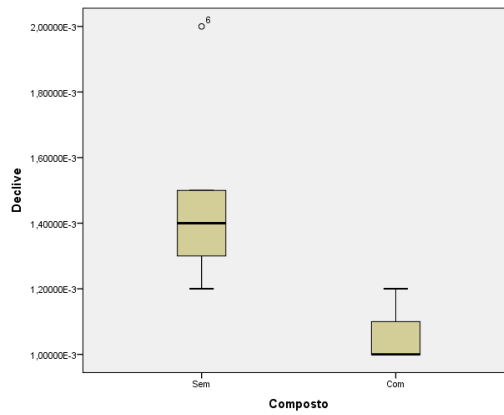
→ Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Declive	Composto	N	Postos de média
	Sem	6	9,42
	Com	6	3,58
	Total	12	

Estatísticas de teste ^a	
	Declive
U de Mann-Whitney	,500
Wilcoxon W	21,500
Z	-2,863
Significância Sig. (2 extremidades)	,004
Sig. exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]	,002 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 7 - LI BC contra *Escherichia coli* ATCC 25922

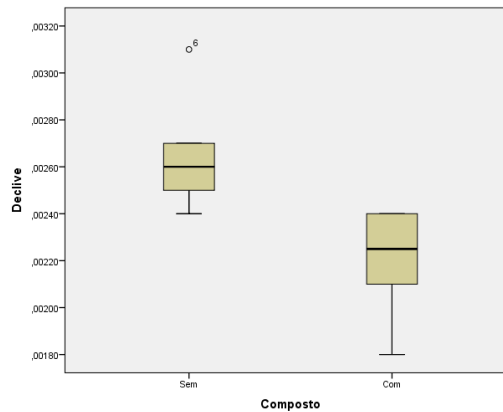
Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Declive	Composto	N	Postos de média
	Sem	6	9,33
	Com	6	3,67
	Total	12	

Estatísticas de teste ^a	
	Declive
U de Mann-Whitney	1,000
Wilcoxon W	22,000
Z	-2,751
Significância Sig. (2 extremidades)	,006
Sig. exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]	,004 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 8 - LI BL contra *Escherichia coli* ATCC 25922

Anexo 9 - Declives *Escherichia coli* bla_{TEM} 180

<i>Escherichia coli</i> bla_{TEM} 180								
	BA		BC		BG		BH	
	Declives		Declives		Declives		Declives	
	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI
	0,00080	0,00080	0,00080	0,00020	0,00120	0,00110	0,00120	0,00080
	0,00100	0,00110	0,00100	0,00070	0,00120	0,00100	0,00120	0,00070
	0,00100	0,00130	0,00100	0,00070	0,00110	0,00090	0,00110	0,00080
	0,00100	0,00130	0,00100	0,00050	0,00110		0,00110	0,00060
	0,00100	0,00090	0,00100	0,00070	0,00110		0,00110	0,00110
	0,00110	0,00090	0,00110	0,00000	0,00100		0,00100	0,00070
Média	0,00098	0,00105	0,00098	0,00047	0,00112	0,00100	0,00112	0,00078
Desvio Padrão	0,00010	0,00022	0,00010	0,00030	0,00008	0,00010	0,00008	0,00017
Razão	1,07000		0,48000		0,89000		0,70000	
Significância	0,74261		0,00312		0,10247		0,01107	
	Não significativo		Significativo		Não significativo		Significativo	

<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 180						
	BJ		BK		BL	
	Declives		Declives		Declives	
	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI
	0,00120	0,00090	0,00120	0,00060	0,00120	0,00070
	0,00120	0,00110	0,00120	0,00060	0,00100	0,00080
	0,00110	0,00090	0,00110	0,00060	0,00110	0,00110
	0,00110	0,00080	0,00110	0,00120	0,00120	0,00110
	0,00110	0,00070	0,00110	0,00130	0,00140	0,00090
	0,00100	0,00070	0,00100	0,00060	0,00130	0,00090
Média	0,00112	0,00085	0,00112	0,00093	0,00120	0,00092
Desvio Padrão	0,00008	0,00015	0,00008	0,00034	0,00014	0,00016
Razão	0,76000		0,83000		0,77000	
Significância	0,01107		0,24689		0,01520	
	Significativo		Não significativo		Significativo	

Anexo 10 - Layout Teste Mann-Whitney e Gráfico de ramo-e-folhas para os declives dos LIs BC, BH, BJ e BL contra o *Escherichia coli* bla_{TEM} 180

Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

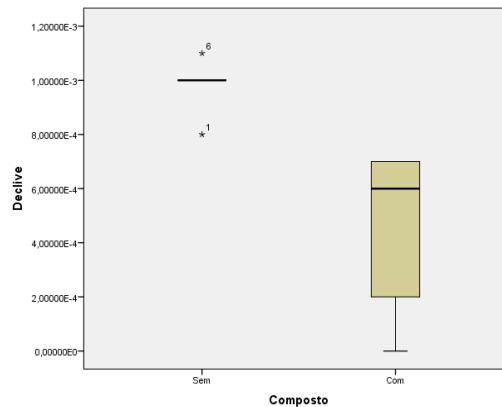
Classificações				
	Composto	N	Postos de média	Soma de Classificações
Declive	Sem	6	9,50	57,00
	Com	6	3,50	21,00
	Total	12		

Estadísticas de teste^a

	Declive
U de Mann-Whitney	,000
Wilcoxon W	21,000
Z	-2,956
Significância Sig. (2 extremidades)	,003
Sig. exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]	,002 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto

b. Não corrigido para vínculos.



Layout 9 - LI BC contra *Escherichia coli* bla_{TEM} 180

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

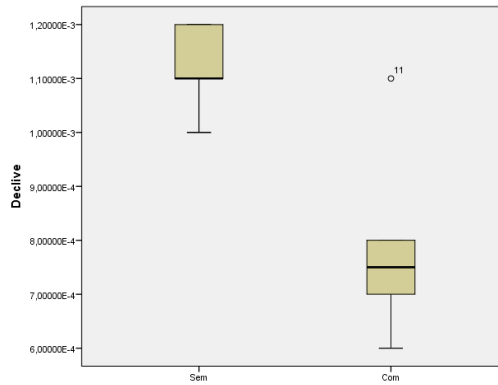
Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações				
Composto		N	Postos de média	Soma de Classificações
Declive	Sem	6	9,08	54,50
	Com	6	3,92	23,50
Total		12		

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		2,500
Wilcoxon W		23,500
Z		-2,540
Significância Sig. (2 extremidades)		,011
Sig. exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]		,009 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 10 - LI BH contra *Escherichia coli* bla_{TEM} 180

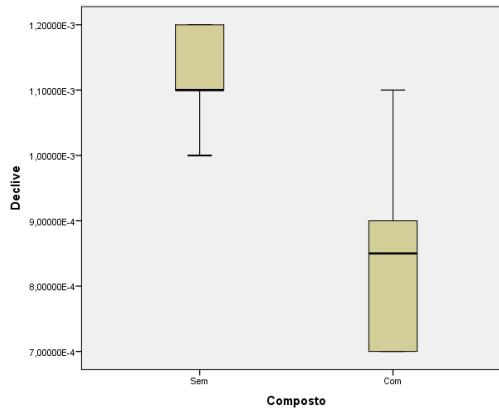
Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações				
Composto		N	Postos de média	Soma de Classificações
Declive	Sem	6	9,08	54,50
	Com	6	3,92	23,50
Total		12		

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		2,500
Wilcoxon W		23,500
Z		-2,540
Significância Sig. (2 extremidades)		,011
Sig. exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]		,009 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 11- LI BJ contra *Escherichia coli* bla_{TEM} 180

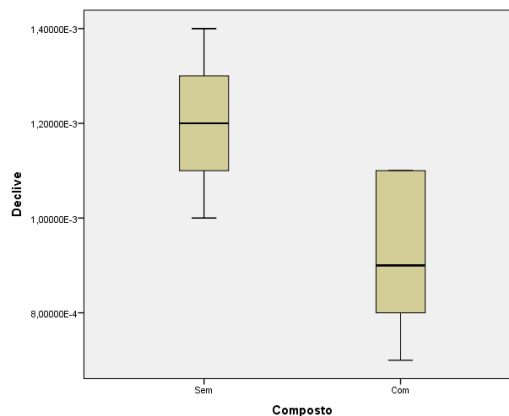
Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações				
Composto		N	Postos de média	Soma de Classificações
Declive	Sem	6	9,00	54,00
	Com	6	4,00	24,00
Total		12		

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		3,000
Wilcoxon W		24,000
Z		-2,428
Significância Sig. (2 extremidades)		,015
Sig. exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]		,015 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 12- LI BL contra *Escherichia coli* bla_{TEM} 180

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Anexo 11 - Declives *Escherichia coli* bla_{TEM} 209

<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209								
BA		BC		BE		BG		
Declives		Declives		Declives		Declives		
Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	
0,00110	0,00070	0,00110	0,00080	0,00070	0,00160	0,00070	0,00070	
0,00110	0,00110	0,00110	0,00110	0,00060	0,00130	0,00060	0,00110	
0,00110	0,00110	0,00110	0,00120	0,00090	0,00130	0,00090	0,00120	
0,00120	0,00110	0,00120	0,00120	0,00100	0,00130	0,00100	0,00110	
0,00110	0,00120	0,00110	0,00090	0,00110	0,00120	0,00110	0,00130	
0,00110	0,00120	0,00110	0,00030	0,00110	0,00120	0,00110	0,00080	
Média	0,00112	0,00107	0,00112	0,00092	0,00090	0,00132	0,00090	0,00103
Desvio Padrão	0,00004	0,00019	0,00004	0,00034	0,00021	0,00015	0,00021	0,00023
Razão	0,96000		0,82000		1,47000		1,14000	
Significância	0,92334		0,43811		0,00358		0,22067	
	Não significativo		Não significativo		Significativo		Não significativo	

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

<i>Escherichia coli</i> bla _{TEM} 209								
	BH		BJ		BK		BL	
	Declives		Declives		Declives		Declives	
	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI
	0,00180	0,00200	0,00120	0,00120	0,00120	0,00070	0,00130	0,00110
	0,00180	0,00200	0,00110	0,00110	0,00110	0,00070	0,00240	0,00110
	0,00140	0,00210	0,00110	0,00110	0,00110	0,00090	0,00120	0,00180
	0,00150	0,00080	0,00110	0,00110	0,00110	0,00110	0,00120	0,00170
	0,00250	0,00180	0,00110	0,00120	0,00110	0,00110	0,00170	0,00150
	0,00180	0,00140	0,00110	0,00120	0,00110	0,00100	0,00180	0,00100
Média	0,00180	0,00168	0,00112	0,00115	0,00112	0,00092	0,00160	0,00137
Desvio Padrão	0,00038	0,00050	0,00004	0,00005	0,00004	0,00018	0,00047	0,00034
Razão	0,93000		1,03000		0,82000		0,86000	
Significância	0,87005		0,24095		0,02000		0,25897	
	Não significativo		Não significativo		Significativo		Não significativo	

Anexo 12 - Layout Teste Mann-Whitney e Gráfico de ramo-e-folhas para os declives do LIs BE e BK contra o *Escherichia coli* bla_{TEM 209}

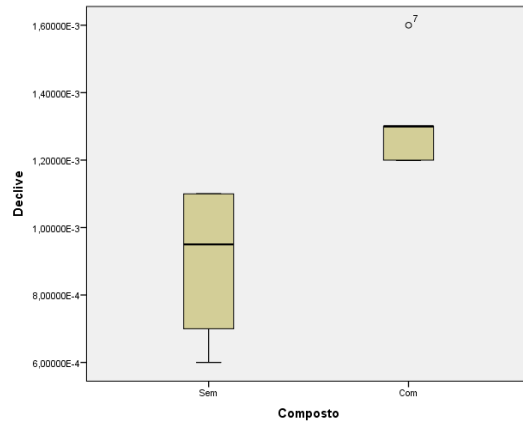
Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Declive	Composto	N	Soma de Classificações
	Sem	6	3,50
	Com	6	9,50
	Total	12	21,00

Estatísticas de teste ^a	
	Declive
U de Mann-Whitney	,000
Wilcoxon W	21,000
Z	-2,913
Significância Sig. (2 extremidades)	,004
Sig exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]	,002 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 13 - LI BE contra *Escherichia coli* bla_{TEM 209}

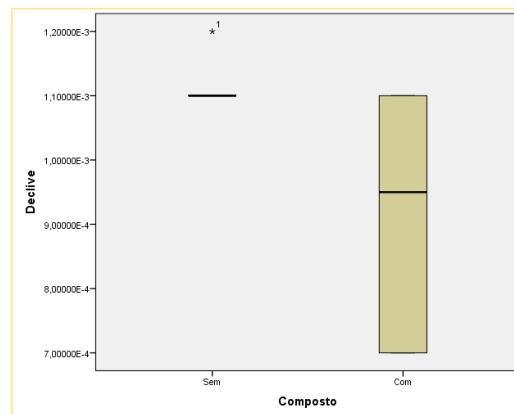
Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações			
Declive	Composto	N	Soma de Classificações
	Sem	6	8,67
	Com	6	4,33
	Total	12	52,00

Estatísticas de teste ^a	
	Declive
U de Mann-Whitney	5,000
Wilcoxon W	26,000
Z	-2,326
Significância Sig. (2 extremidades)	,020
Sig exata [2*(Sig. de 1 extremidade)]	,041 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



Layout 14 - LI BK contra *Escherichia coli* bla_{TEM 209}

Anexo 13 - Declives *Escherichia coli* ART 19B

<i>Escherichia coli</i> ART 19B								
BA		BC		BG		BH		
Declives		Declives		Declives		Declives		
Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	
0,00080	0,00090	0,00080	0,00110	0,00090	0,00110	0,00100	0,00060	
0,00170	0,00060	0,00170	0,00050	0,00100	0,00110	0,00100	0,00100	
0,00090	0,00080	0,00090	0,00040	0,00100	0,00080	0,00120	0,00080	
0,00100	0,00090	0,00100	0,00110	0,00100	0,00090	0,00110	0,00090	
0,00100	0,00090	0,00100	0,00000	0,00070	0,00090	0,00080	0,00070	
0,00120	0,00140	0,00120	0,00110	0,00070	0,00080	0,00100	0,00040	
Média	0,00110	0,00092	0,00110	0,00070	0,00088	0,00093	0,00102	0,00073
Desvio Padrão	0,00032	0,00026	0,00032	0,00047	0,00015	0,00014	0,00013	0,00022
Razão	0,83000		0,64000		1,06000		0,71000	
Significância	0,19061		0,33241		0,62421		0,022	
	Não significativo		Não significativo		Não significativo		Significativo	

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

<i>Escherichia coli</i> ART 19B								
	BI		BJ		BK		BL	
	Declives		Declives		Declives		Declives	
	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI
	0,00110	0,00080	0,00110	0,00070	0,00090	0,00110	0,00080	0,00070
	0,00150	0,00050	0,00150	0,00100	0,00100	0,00110	0,00080	0,00120
	0,00100	0,00110	0,00100	0,00120	0,00100	0,00110	0,00100	0,00140
	0,00080	0,00120	0,00080	0,00120	0,00110	0,00100	0,00100	0,00140
	0,00190	0,00090	0,00190	0,00060	0,00100	0,00090	0,00100	0,00130
	0,00100	0,00120	0,00100	0,00080	0,00160	0,00100	0,00100	0,00080
Média	0,00122	0,00095	0,00122	0,00092	0,00110	0,00103	0,00093	0,00113
Desvio Padrão	0,00041	0,00027	0,00041	0,00026	0,00025	0,00008	0,00010	0,00031
Razão	0,78000		0,75000		0,94000		1,22000	
Significância	0,42007		0,22484		0,86534		0,24953	
	Não significativo		Não significativo		Não significativo		Não significativo	

Anexo 14 - Layout Teste Mann-Whitney e Gráfico de ramo-e-folhas para os declives do LIs BH contra o *Escherichia coli* ART 19B

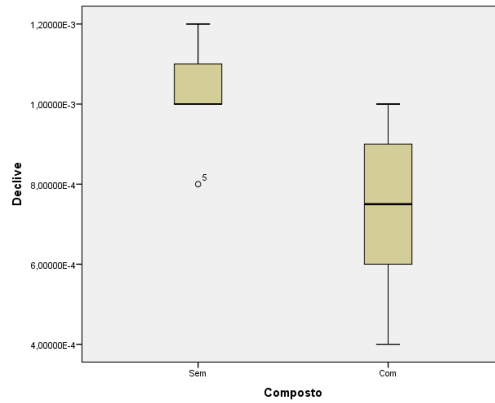
► Testes de NPar

Teste Mann-Whitney

Classificações				
Composto		N	Postos de média	Soma de Classificações
Declive	Sem	6	8,83	53,00
	Com	6	4,17	25,00
	Total	12		

Estatísticas de teste ^a		Declive
U de Mann-Whitney		4,000
Wilcoxon W		25,000
Z		-2,286
Significância Sig. (2 extremidades)		,022
Sig. exata (2*(Sig. de 1 extremidade))		,026 ^b

a. Variável de Agrupamento: Composto
b. Não corrigido para vínculos.



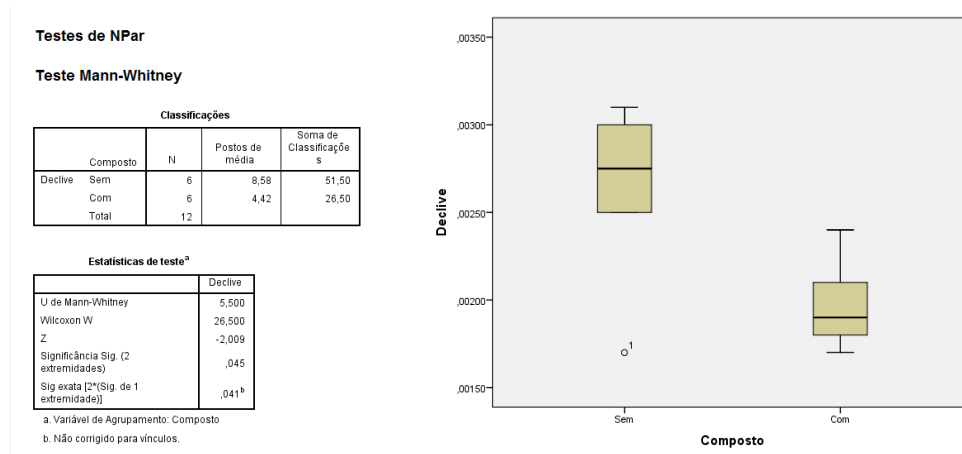
Layout 15 - LI BH contra *Escherichia coli* ART 19B

Estudo da atividade biológica de LI baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

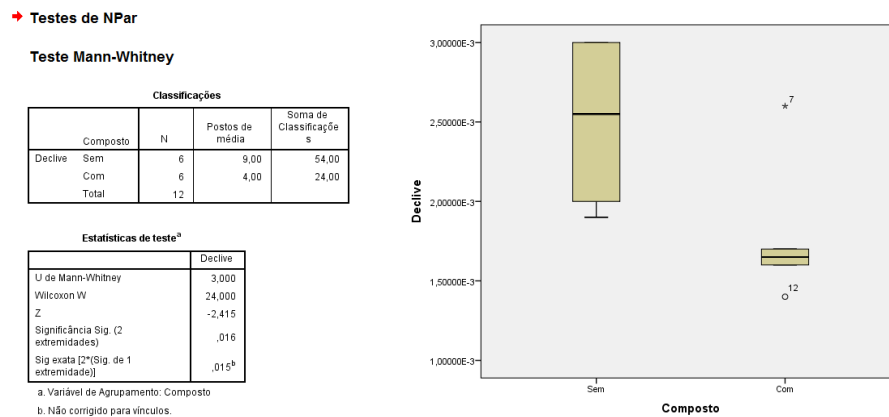
Anexo 15 - Declives *Escherichia coli* OXA-1-Like

<i>Escherichia coli</i> OXA-1-Like										
BA		BC		BJ		BK		BL		
Declives		Declives		Declives		Declives		Declives		
Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	Sem LI	Com LI	
0,00170	0,00190	0,00200	0,00180	0,00190	0,00260	0,00190	0,00210	0,00190	0,00210	
0,00300	0,00240	0,00200	0,00160	0,00220	0,00170	0,00220	0,00230	0,00220	0,00170	
0,00290	0,00180	0,00200	0,00180	0,00200	0,00160	0,00200	0,00220	0,00200	0,00190	
0,00260	0,00170	0,00180	0,00180	0,00290	0,00170	0,00290	0,00190	0,00200	0,00220	
0,00250	0,00190	0,00250	0,00230	0,00300	0,00160	0,00300	0,00190	0,00210	0,00200	
0,00310	0,00210	0,00220	0,00190	0,00300	0,00140	0,00300	0,00190	0,00300	0,00140	
Média	0,00263	0,00197	0,00208	0,00187	0,00250	0,00177	0,00250	0,00205	0,00220	0,00188
Desvio Padrão	0,00051	0,00025	0,00024	0,00023	0,00052	0,00042	0,00052	0,00018	0,00040	0,00029
Razão	0,75000		0,90000		0,71000		0,82000		0,85000	
Significância	0,04500		0,08500		0,01575		0,14092		0,22401	
	Significativo		Não significativo		Significativo		Não significativo		Não significativo	

Anexo 16 - Layout Teste Mann-Whitney e Gráfico de ramo-e-folhas para os declives do LIs BA e BJ contra o *Escherichia coli* OXA-1-Like



Layout 16 - LI BA contra *Escherichia coli* OXA-1-Like



Layout 17 - LI BJ contra *Escherichia coli* OXA-1-Like