

Ana Beatriz da Costa Reis

# Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados do imidazol

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015



Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados do imidazol

Ana Beatriz da Costa Reis

# Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados do imidazol

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015

Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados do imidazol

Ana Beatriz da Costa Reis

Avaliação da atividade antimicrobiana de derivados do imidazol

---

(Ana Beatriz da Costa Reis)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas sob orientação da Professora  
Doutora Fátima Cerqueira.

## SUMÁRIO

A resistência aos agentes antimicrobianos é um problema crescente e representa um dos maiores desafios na área da saúde, pelo que é essencial a pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas que possam constituir alternativas eficazes contra o tratamento de infecções, nomeadamente as provocadas por bactérias e por fungos.

Os imidazóis pertencem ao grupo dos azóis e detêm um elevado potencial terapêutico, dada a presença do anel imidazólico na sua estrutura. Exibem propriedades anticancerígenas, antifúngicas, antiparasitárias, antihistamínicas, antihipertensoras e antineuropáticas.

Neste trabalho foram estudadas as atividades antibacterianas e antifúngicas de diferentes séries de derivados do núcleo imidazólico estruturalmente relacionadas. As bactérias e fungos selecionados para a realização do estudo foram *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.

Apenas uma das séries de compostos estudadas revelou atividade antifúngica. A série A exibiu 3 compostos ativos contra *C. krusei*. Os compostos 4 e 5 conseguiram inibir o crescimento de *C. krusei* a 50 µg/ml. O composto 7 conseguiu inibir o crescimento a uma concentração  $\geq 100$  µg/ml. Nenhuma outra série apresentou atividade antibacteriana ou antifúngica contra as bactérias e leveduras testadas.

Em conclusão, os derivados do anel imidazólico estudados revelaram potencial terapêutico. Contudo, serão necessárias alterações estruturais de modo a potenciar a sua eficácia terapêutica.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a growing problem and represents one of the biggest challenges in healthcare, which is why it is so important to research and develop new molecules that could be effective alternatives to treat infections, particularly those caused by bacteria and fungi.

Imidazoles belong to the class of azoles and retain a high therapeutic potential given the presence of the imidazole ring in its composition. They have anticancer properties, antifungal, antiparasitic, anti and antihypertensive and antineuropathic.

The antibacterial and antifungal activities of the imidazole derivatives were screened against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.

Only a subset of compounds displayed fair activity against *C. krusei*. Compounds 4, 5 and 7 from the A series were able to inhibit the growth of *C. krusei*. No other series presented antibacterial or antifungal activity against bacteria and fungi tested.

In conclusion, the imidazole derivatives screened in this study revealed fair therapeutic potential. However, structural changes are necessary in order to maximize its therapeutic efficacy.

## **AGRADECIMENTOS**

Este espaço é dedicado àqueles que contribuíram para a realização desta dissertação. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Fátima Cerqueira a forma como orientou o meu trabalho. Estou grata pela cordialidade com que sempre me recebeu, pelas recomendações que me deu e pela liberdade de trabalho que me proporcionou.

Quero agradecer também à Professora Doutora Alice Dias e seus colaboradores do Departamento de Química da Universidade do Minho pela síntese e cedência dos compostos estudados.

Um muito obrigado às colegas de laboratório Carla Gabriel, Katy Dias e Jani Silva que me acompanharam e ajudaram durante a realização deste trabalho.

Por fim, uma palavra aos meus pais, irmão, namorado e amigos por todo o apoio, carinho e ajuda prestados durante todo o meu percurso académico.

A todos, um sincero obrigado.

## ÍNDICE

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| Índice de imagens                                        | i   |
| Índice de tabelas                                        | ii  |
| Abreviaturas                                             | iii |
| <br>                                                     |     |
| I. Introdução                                            | 1   |
| 1.1 Resistência aos antibacterianos                      | 2   |
| 1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>                       | 5   |
| 1.1.2 <i>Escherichia coli</i>                            | 7   |
| 1.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                      | 8   |
| 1.2 Resistência aos antifúngicos                         | 10  |
| 1.2.1 <i>Candida albicans</i>                            | 11  |
| 1.2.2 <i>Candida krusei</i>                              | 13  |
| 1.2.3 <i>Candida parapsilosis</i>                        | 13  |
| 1.3 Imidazóis                                            | 15  |
| II. Objetivos                                            | 17  |
| III. Materiais e métodos                                 | 18  |
| 3.1 Compostos a testar                                   | 18  |
| 3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) | 18  |
| 3.2.1 Avaliação da atividade antibacteriana              | 18  |
| 3.2.2 Avaliação da atividade antifúngica                 | 19  |
| 3.3 Determinação da Concentração Mínima Letal (CML)      | 21  |
| 3.3.1 Avaliação do efeito bactericida/bacteriostático    | 21  |
| 3.3.2 Avaliação do efeito fungicida/fungistático         | 21  |



|       |                                            |    |
|-------|--------------------------------------------|----|
| IV.   | Resultados                                 | 22 |
| 4.1   | Determinação da CMI                        | 22 |
| 4.1.1 | Avaliação da atividade antibacteriana      | 22 |
| 4.1.2 | Avaliação da atividade antifúngica         | 25 |
| 4.2   | Determinação da CML                        | 28 |
| 4.2.1 | Avaliação do efeito fungicida/fungistático | 28 |
| V.    | Discussão                                  | 29 |
| VI.   | Conclusão                                  | 30 |
| VII.  | Bibliografia                               | 31 |

## ÍNDICE DE IMAGENS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Figura 1</b> Sequência de descobertas e desenvolvimento de resistências de antibióticos (adaptado de (Brooks e Brooks, 2014)).                                                                                                                                                               | 4 |
| <b>Figura 2</b> Staphylococcus aureus. Percentagem (%) de isolados resistentes à meticilina (MRSA) por país, 2013. (Adaptado de (ECDC, 2014)).                                                                                                                                                  | 6 |
| <b>Figura 3</b> Escherichia coli. Percentagem (%) de isolados resistentes a cefalosporinas de terceira geração por país, 2013. (Adaptado de (ECDC, 2014)).                                                                                                                                      | 8 |
| <b>Figura 4</b> Pseudomonas aeruginosa. Percentagem (%) de isolados resistentes com resistência combinada (resistência a 3 ou mais antibióticos incluindo piperacilina+tazobactano, ceftazidina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenemos) por país, 2013. (Adaptado de (ECDC, 2014)). | 9 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> Características gerais das principais classes de antibióticos.....                                                                                      | 3  |
| <b>Tabela 2</b> Características gerais das principais classes de antifúngicos.....                                                                                      | 11 |
| <b>Tabela 3</b> Atividade antibacteriana, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol A. ....                             | 22 |
| <b>Tabela 4</b> Atividade antibacteriana, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol B.....                              | 23 |
| <b>Tabela 5</b> Atividade antibacteriana, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol C.....                              | 24 |
| <b>Tabela 6</b> Atividade antifúngica, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol A.....                                 | 25 |
| <b>Tabela 7</b> Atividade antifúngica, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol B.....                                 | 26 |
| <b>Tabela 8</b> Atividade antifúngica, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol C.....                                 | 27 |
| <b>Tabela 9</b> Atividade antifúngica, definida como concentração mínima inibitória e concentração mínima letal, para os compostos A4, 5 e 7 em <i>C. krusei</i> . .... | 28 |

## ABREVIATURAS

|                      |                                                          |
|----------------------|----------------------------------------------------------|
| ATCC                 | <i>American Type Culture Collection</i>                  |
| CDC                  | <i>Centers for Disease Control</i>                       |
| CLSI                 | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>       |
| CMI                  | Concentração Mínima Inibitória                           |
| CML                  | Concentração Mínima Letal                                |
| DMSO                 | Dimetilsulfóxido                                         |
| DNA                  | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico) |
| <i>E. coli</i>       | <i>Escherichia coli</i>                                  |
| ESBL                 | <i>Extended-Spectrum <math>\beta</math>-Lactamases</i>   |
| MH II                | Mueller-Hinton II                                        |
| MRSA                 | <i>Staphylococcus aureus</i> metilicilino-resistentes    |
| MOPS                 | <i>3-(N-morpholino)propansulfonic acid</i>               |
| OMS                  | Organização Mundial da Saúde                             |
| PABA                 | Ácido para-aminobenzóico                                 |
| PBPs                 | <i>Penicillin-binding proteins</i>                       |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                            |
| RNA                  | <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)             |
| RPMI                 | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                   |
| <i>S. aureus</i>     | <i>Staphylococcus aureus</i>                             |
| SIDA                 | Síndrome da Imunodeficiência Humana                      |
| VIH                  | Vírus da Imunodeficiência Humana                         |
| VRSA                 | <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à vancomicina   |

Para algumas abreviaturas foi mantida a notação anglo-saxónica dado o seu carácter universal, facilitando o seu reconhecimento.

## **I. INTRODUÇÃO**

Ao longo das últimas décadas, a resistência antimicrobiana converteu-se numa ameaça crescente contra o tratamento de infecções causadas por agentes microbianos, tornando o tratamento dos pacientes difícil, dispendioso e por vezes, impossível (WHO, 2014). O desenvolvimento de mecanismos de resistência é um processo dinâmico e inerente a todos os microrganismos. No entanto, tem vindo a ser acelerado pelo uso abusivo e inapropriado de antimicrobianos, induzindo a emergência de estirpes resistentes (D'Costa *et al.*, 2011).

Esta problemática é ainda agravada pela lacuna na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Ng *et al.*, 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou a resistência antimicrobiana como um dos principais problemas para a saúde pública (Brooks e Brooks, 2014).

## 1.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIBACTERIANOS

A descoberta da penicilina pelo Prémio Nobel Alexander Fleming (Fleming, 1929) iniciou um período de inovação e implementação de fármacos na saúde humana (D'Costa *et al.*, 2011), representando o primeiro agente terapêutico com atividade antibacteriana *in vivo* (Kardos e Demain, 2011).

No entanto, o desenvolvimento da penicilina não foi fácil. A instabilidade química tornou difícil o isolamento e caracterização desta molécula e por esta razão, o seu estudo foi abandonado durante uma década. Foi um grupo de cientistas da Universidade de Oxford composto por Howard W. Florey, Ernst B. Chain, Norman Heatley, Edward Abraham e seus colegas que conseguiu isolar, caracterizar e comprovar a atividade antibacteriana da penicilina em ratos. O desenvolvimento e produção da penicilina desempenhou um papel decisivo para as tropas aliadas durante a II Guerra Mundial uma vez que as taxas de mortalidade reduziram drasticamente após a sua introdução (Kardos e Demain, 2011).

Esta descoberta abriu as portas para uma era dourada no desenvolvimento de agentes antimicrobianos e revolucionou a prática médica, salvando milhões de vidas. Pela primeira vez, infeções fatais podiam ser tratadas com recurso a antibióticos (Cole, 2014; Laxminarayan, 2014). O reconhecimento da importância da penicilina impulsionou a descoberta de novos  $\beta$ -lactâmicos e de outras classes de antibióticos. Foi durante o período de 1945 a 1960 que a maioria das classes antibacterianas (tabela 1) usadas atualmente na prática clínica foram descobertas, sendo que a partir da década de 60 o ritmo de descoberta de novas classes abrandou drasticamente (Wright, 2007).

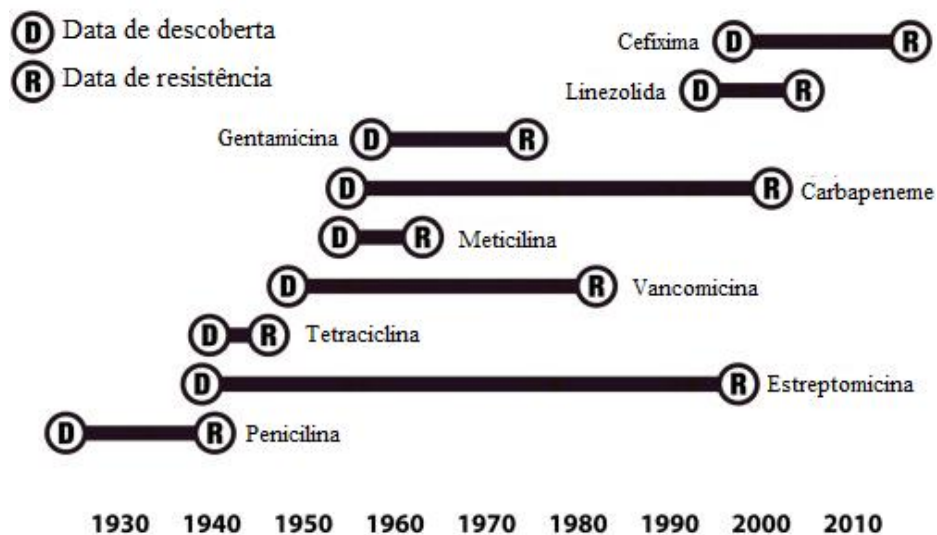
A penicilina provocou um grande impacto na saúde pública e desenvolvimento económico global, iniciando o uso generalizado de antibióticos na terapêutica. Antes da descoberta da penicilina, a principal causa de morte em todo mundo era atribuída a doenças infecciosas (Kardos e Demain, 2011).

**Tabela 1** Características gerais das principais classes de antibióticos.

| Classe                  | Subclasse        | Mecanismo de ação                                                                                    | Exemplos                        | Referências                                                                    |
|-------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B-Lactâmicos</b>     | Penicilinas      | Inibição da biossíntese do peptidoglicano na fase parietal                                           | Penicilina G                    | (Lederberg, 1957)                                                              |
|                         |                  |                                                                                                      | Amoxicilina                     |                                                                                |
|                         | Cefalosporinas   |                                                                                                      | Cefoxitina                      |                                                                                |
|                         |                  |                                                                                                      | Cefotaxima                      |                                                                                |
|                         | Monobactams      |                                                                                                      | Aztreonam                       |                                                                                |
|                         | Carbapenems      |                                                                                                      | Imipenem                        |                                                                                |
| <b>Aminoglicosídeos</b> |                  | Ligação à subunidade 30S dos ribossomos provocando uma leitura errada da mensagem codificada no mRNA | Estreptomicina<br>Gentamicina   | (Davis, 1987; Shakil <i>et al.</i> , 2008)                                     |
| <b>Quinolonas</b>       |                  | Inibição da transcrição e replicação do DNA bacteriano                                               | Ciprofloxacina                  | (Hooper, 2000; Drlica e Zhao, 1997; Drlica, 1999; Drlica <i>et al.</i> , 2008) |
|                         | Fluoroquinolonas |                                                                                                      |                                 |                                                                                |
| <b>Tetraciclinas</b>    |                  | Inibição da síntese proteica por ligação à subunidade 30S dos ribossomos                             | Doxiciclina<br>Tigeciclina      | (Schnappinger e Hillen, 1996; Roberts, 1996; Chopra e Roberts, 2001)           |
| <b>Macrólidos</b>       |                  | Inibição da síntese proteica por ligação à subunidade 50S dos ribossomos                             | Eritromicina<br>Clarithromicina | (Tenson <i>et al.</i> , 2003)                                                  |
| <b>Lincosamidas</b>     |                  | Inibição da síntese proteica por ligação à subunidade 50S dos ribossomos                             | Clindamicina                    | (Tenson <i>et al.</i> , 2003)                                                  |
| <b>Oxazolidinonas</b>   |                  | Inibição da síntese proteica por ligação à subunidade 50S dos ribossomos                             | Linezolid                       | (Leach <i>et al.</i> , 2011; Long e Vester, 2012)                              |
| <b>Sulfonamidas</b>     |                  | Inibição competitiva do PABA na síntese do ácido fólico bacteriano                                   | Sulfadiazina<br>Sulfametoxazol  |                                                                                |
| <b>Glicopéptidos</b>    |                  | Inibição da síntese da parede celular                                                                | Vancomicina<br>Teicoplanina     | (Dougherty <i>et al.</i> , 2012)                                               |
| <b>Lipopéptidos</b>     |                  | Inibição da síntese proteica através da despolarização da membrana celular                           | Daptomicina                     | (Rybak <i>et al.</i> , 2000)                                                   |



Contudo, desde a descoberta dos primeiros antibióticos que estes têm sido considerados a panaceia no tratamento de infecções (WHO, 2014; Alanis, 2005) e o seu uso abusivo e inapropriado acelerou a emergência de resistências (Michael *et al.*, 2014; D'Costa *et al.*, 2011; Bartlett, 2011). O desenvolvimento de resistências limita o tempo de vida útil dos antibióticos (figura 1), resultando na necessidade constante de introdução de novos compostos no mercado. No entanto, o desenvolvimento de novos antibacterianos é particularmente difícil e atualmente, a resistência antibacteriana está a propagar-se mais rápido do que a introdução de novos antibióticos na prática clínica (Ling *et al.*, 2015). Em 2013, o *Centers for Disease Control* (CDC) declarou que a raça humana está perante uma “era pós-antibiótico”, era na qual uma infecção comum pode levar à morte (CDC, 2013).



**Figura 1** Sequência de descobertas e desenvolvimento de resistências de antibióticos (adaptado de (Brooks e Brooks, 2014)).

Apesar do reconhecimento desta crise atual, são poucos os antibióticos que têm sido lançados no mercado (Wright, 2015). Uma lacuna na inovação é a expressão mais usada para descrever a falta de antibióticos introduzidos na prática clínica desde meados dos anos 60 (Bassetti *et al.*, 2013).

Os principais microrganismos envolvidos no processo de resistência são *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*,

*Pseudomonas aeruginosa*, e algumas espécies da família *Enterobacteriaceae* (Bassetti *et al.*, 2013).

### 1.1.1 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positivo (Kuroda *et al.*, 2001) identificada como um importante agente patogénico humano (Kluytmans *et al.*, 1997). *S. aureus* pode causar uma grande variedade de infeções, sendo as mais comuns as da pele, tecidos moles e bacteriemias. É a causa mais comum de infeções em feridas pós-operatórias (WHO, 2014; Naber, 2009).

Embora considerada patogénica, podem existir indivíduos portadores assintomáticos uma vez que *S. aureus* pode, por vezes, fazer parte da flora comensal humana (Chambers e DeLeo, 2009; Williams, 1963; Wertheim *et al.*, 2005; van Belkum *et al.*, 2009). As narinas e a garganta são os locais mais frequentes de colonização (Esposito *et al.*, 2014). Os portadores de *S. aureus* funcionam como reservatórios, promovendo uma ampla disseminação da bactéria dado que a transmissão se dá principalmente por contacto direto (Moellering, 2011; Sivaraman *et al.*, 2009).

A primeira resistência foi identificada em meados dos anos 40 com o aparecimento de *S. aureus* resistentes à penicilina em ambiente hospitalar. A introdução de metilina na prática médica marcou uma segunda onda de resistências (Chambers e DeLeo, 2009), sendo que os primeiros relatos de *S. aureus* metilino-resistentes (MRSA) foram publicados em 1961 (Jevons, 1961). Desde o seu aparecimento que têm sido associadas a infeções nosocomiais (DeLeo *et al.*, 2010). No entanto, a emergência de estirpes MRSA adquiridas na comunidade tem aumentado significativamente ao longo da última década (WHO, 2014; ECDC, 2014).

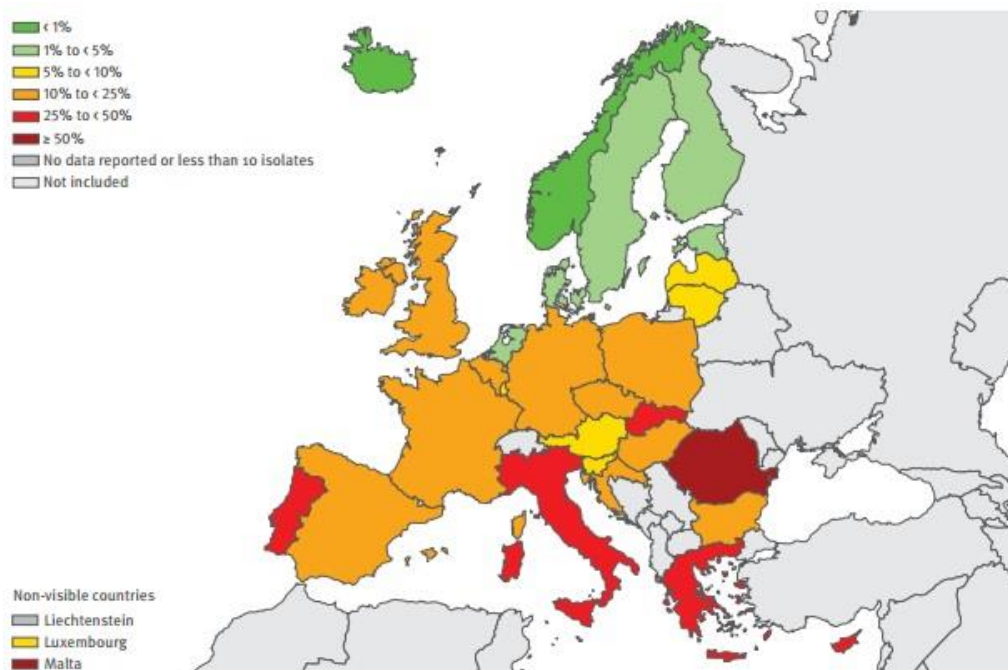
O mecanismo de resistência nas estirpes MRSA está associado à aquisição de uma *penicillin-binding protein* (PBP) alterada - PBP<sub>2a</sub> - capaz de tornar estas estirpes resistentes a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Georgopapadakou *et al.*, 1982; Hartman e Tomasz, 1984).

Elevadas taxas de MRSA implicam o uso de fármacos de segunda linha no seu tratamento e profilaxia. Estes são mais dispendiosos e possuem efeitos adversos mais severos (WHO, 2014). Por esta razão, MRSA continua a ser um grande problema para a

saúde pública em todo o mundo (Rodvold e McConeghy, 2014). A vancomicina passou, deste modo, a ser o fármaco de eleição no tratamento de infeções causadas por estirpes MRSA (Maple *et al.*, 1989). O seu uso contínuo conduziu, mais uma vez, à emergência de resistências (Gardete e Tomasz, 2014). As primeiras estirpes *S. aureus* com baixa suscetibilidade à vancomicina foram descritas no Japão em 1997 (Hiramatsu *et al.*, 1997), consequência do uso prolongado de vancomicina em pacientes com infeções causadas por estirpes MRSA (Gardete e Tomasz, 2014). Em 2002, foram descritas pela primeira vez estirpes resistentes à vancomicina (*Vancomycin-Resistant S. aureus*, VRSA) (Chang *et al.*, 2003).

Embora se tenha verificado uma diminuição das taxas de MRSA de origem nosocomial em vários países europeus, Portugal apresenta uma taxa de 46,8%, sendo o terceiro país com a taxa mais elevada em 2013 (figura 3) (ECDC, 2014). Portugal apresenta também uma elevada prevalência de estirpes MRSA adquiridas em ambiente comunitário (21,6%) (ECDC, 2014; Conceição *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2013).

Apesar de serem raras as infeções causadas por estirpes VRSA, com apenas alguns casos confirmados em todo o mundo, o primeiro caso relatado na Europa foi em Portugal (Melo-Cristino *et al.*, 2013).



**Figura 2** *Staphylococcus aureus*. Percentagem (%) de isolados resistentes à meticilina (MRSA) por país, 2013. (Adaptado de (ECDC, 2014)).

### 1.1.2 *Escherichia coli*

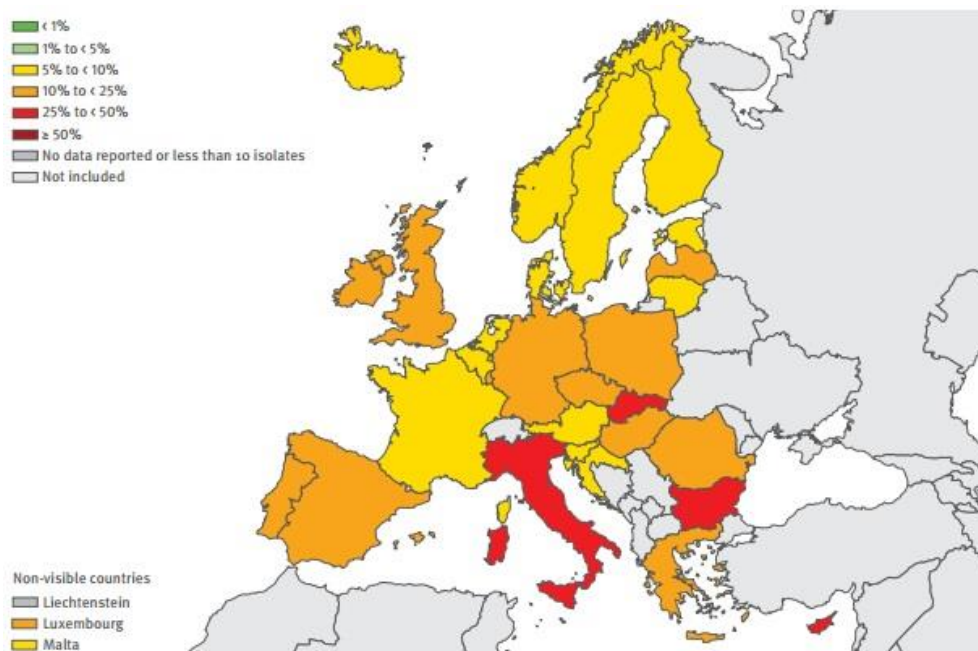
*E. coli* é uma bactéria Gram-negativo que pertence à flora comensal do intestino humano (Ibrahim *et al.*, 2014). No entanto, pode causar infecção, uma vez que existem estirpes patogénicas (Kaper *et al.*, 2004) capazes de causar uma grande variedade de infeções (Croxen *et al.*, 2013). *E. coli* é a causa mais comum de infeções do trato gastrointestinal, urinário e de bacteriemias. Pode também originar meningite em neonatos, infeções intra-abdominais e infeções da pele e tecidos moles (WHO, 2014).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos integram uma das principais escolhas terapêuticas no tratamento de infeções por *E. coli* (Allocati *et al.*, 2013). A produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico, constitui o principal mecanismo de resistência de *E. coli* a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Pitout, 2012; Allocati *et al.*, 2013), sendo que os genes que codificam estas enzimas se encontram em plasmídeos, importantes mediadores na transferência de resistências (Allocati *et al.*, 2013). Existem diversos tipos de  $\beta$ -lactamases (Poirel *et al.*, 2012), destacando-se as  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (*Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases*; ESBLs), descritas pela primeira vez em 1983 (Knothe *et al.*, 1983). São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos mas não os carbapenemos (Pitout, 2012), e são inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases como o ácido clavulânico, sulbactamo e tazobactano (Pitout, 2010). As famílias de ESBLs mais prevalentes são do tipo TEV, SHV e CTX, sendo que as enzimas CTX-M são as ESBLs mais prevalentes em *E. coli*. Estas novas enzimas vieram depor as cefalosporinas de terceira geração, que haviam sido desenvolvidas com o intuito de ultrapassar resistências causadas pelas  $\beta$ -lactamases. Não só eram eficazes contra a maioria dos microrganismos produtores de  $\beta$ -lactamases como possuíam menos efeitos adversos (Paterson e Bonomo, 2005; van der Bij e Pitout, 2012).

A disseminação de estirpes de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração limita as opções de tratamento. Os carbapenemos constituem o tratamento de escolha em infeções provocadas por bactérias produtoras de ESBLs (WHO, 2014). No entanto, o uso deste antibiótico com largo espectro de ação aumenta os custos de tratamento e estimula a disseminação de estirpes produtoras de carbapenemases, uma família de  $\beta$ -lactamases muito versátil, capaz de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas,

monobactams e carbapenems, ou seja, conferindo resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos atualmente disponíveis (Queenan e Bush, 2007).

Na Europa existe uma elevada prevalência de ESBLs desde que estas foram descritas em 1983. Portugal possui uma taxa de 14,9% de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração (figura 3), sendo um dos países europeus com taxas mais elevadas de ESBLs (92,1%) (Machado *et al.*, 2013; ECDC, 2014).



**Figura 3** *Escherichia coli*. Percentagem (%) de isolados resistentes a cefalosporinas de terceira geração por país, 2013. (Adaptado de (ECDC, 2014)).

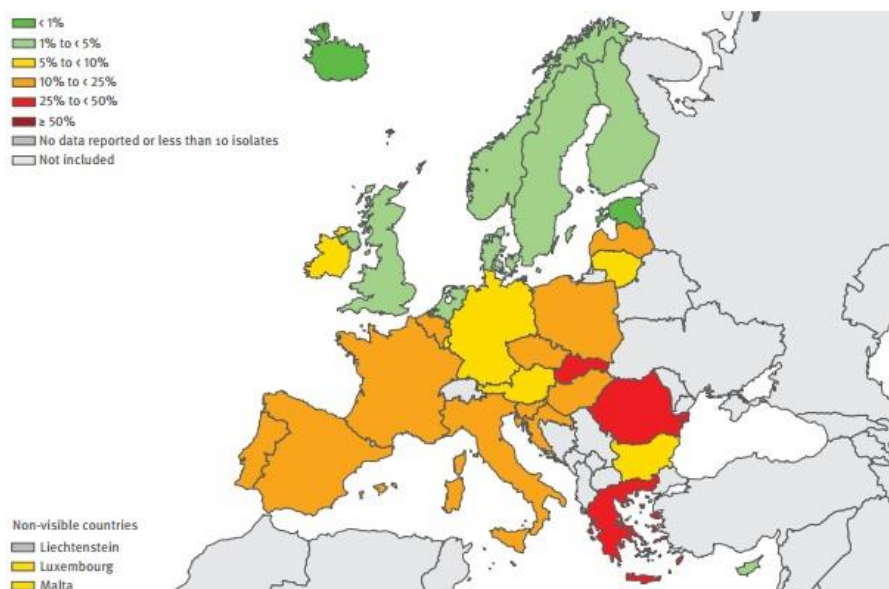
### 1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativo (Stover *et al.*, 2000) de natureza ubíqua, estando presente no solo, água, plantas e animais (Andonova e Urumova, 2013). Este fator determina em grande parte o sucesso desta bactéria como patogénica oportunista. *P. aeruginosa* tem preferência por ambientes húmidos (Kerr e Snelling, 2009) e pode causar uma grande variedade de infeções, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Balasubramanian *et al.*, 2013). Por conseguinte, as infeções mais graves são registadas principalmente em ambiente hospitalar e incluem bacteriemia, pneumonia, infeções do trato urinário e infeções da pele (Kerr e Snelling, 2009; Lister *et*

*al.*, 2009). *P. aeruginosa* é também a principal causa de infecções respiratórias em indivíduos hospitalizados (Gellatly e Hancock, 2013), sendo a principal responsável por infecções crônicas e mortalidade em pacientes com fibrose cística (Sharma *et al.*, 2014; Valderrey *et al.*, 2010).

*P. aeruginosa* possui múltiplos mecanismos de resistência intrínsecos que determinam a sua patogenicidade. A presença de bombas de efluxo, baixa permeabilidade da membrana, versatilidade metabólica, produção de múltiplos fatores de virulência e capacidade de formação de biofilmes são alguns desses mecanismos (Balasubramanian *et al.*, 2013; Nadal Jimenez *et al.*, 2012). Deste modo, *P. aeruginosa* representa um grande desafio terapêutico, sendo que a seleção do antibiótico mais apropriado é essencial para o sucesso da terapêutica (Kang *et al.*, 2005; Lodise *et al.*, 2007). Infelizmente, a seleção da terapêutica mais adequada é difícil, dada a resistência intrínseca que esta bactéria possui a vários antibióticos (Lister *et al.*, 2009).

Elevadas percentagens de estirpes resistentes têm sido verificadas nos últimos anos em vários países europeus (figura 4), um facto preocupante uma vez que *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a vários antibióticos e qualquer resistência adquirida limita gravemente as opções terapêuticas (ECDC, 2014).



**Figura 4** *Pseudomonas aeruginosa*. Percentagem (%) de isolados resistentes com resistência combinada (resistência a 3 ou mais antibióticos incluindo piperacilina+tazobactano, ceftazidina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenemos) por país, 2013. (Adaptado de (ECDC, 2014))

## 1.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

No início do século XX as infecções, uma importante causa de mortalidade em todo o mundo, eram maioritariamente atribuídas às bactérias (Srinivasan *et al.*, 2014). Em contraste, as infecções fúngicas eram muito pouco comuns. Foi desde a introdução dos antibióticos na prática médica que se começou a observar um drástico aumento de infecções fúngicas. Atualmente representam uma ameaça global para a saúde pública. O aumento da incidência de infecções fúngicas foi influenciado pelo número crescente de casos de imunodeficiência relacionados com a infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), cancro, transplantes de órgãos, procedimentos cirúrgicos invasivos, diabetes, fibrose cística, entre muitos outros (Srinivasan *et al.*, 2014; Eliopoulos *et al.*, 2002; Maertens, 2004).

Até aos anos 40, eram poucos os fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistémicas (Maertens, 2004). O desenvolvimento dos polienos representou uma grande evolução terapêutica. A anfotericina B, embora sendo o fármaco de primeira linha no tratamento de infecções graves, estava associada a muitos efeitos secundários e a nefrotoxicidade (Maertens, 2004). A procura de novos compostos com atividade antifúngica com menor toxicidade levou à descoberta de novas classes de antifúngicos (tabela 2). Os azóis representaram um novo avanço na terapêutica, uma vez que o desenvolvimento do cetoconazol permitiu, pela primeira vez, o tratamento de infecções sistémicas por via oral (Maertens, 2004). As equinocandinas também assumiram um papel importante uma vez que surgiram como o primeiro composto a inibir a síntese da parede celular fúngica. (Lee *et al.*, 2012).

Infelizmente, o uso massivo de antifúngicos na profilaxia e tratamento de infecções conduziu à emergência de resistências. O desenvolvimento de novos compostos é, deste modo, essencial para a gestão da resistência associada à terapêutica antifúngica (Alexander e Perfect, 1997).

Embora *Candida albicans* continue a ser a causa mais comum de infecções fúngicas, desde os anos 80 que outras espécies não-*albicans* como *C. krusei* e *C. parapsilosis* têm sido cada vez mais associadas a infeções (Hof, 2008; Trofa *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2008a).

**Tabela 2** Características gerais das principais classes de antifúngicos.

| Classe                 | Subclasse | Mecanismo de ação                                                                                                  | Exemplos                 | Referências                                               |
|------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>Alilaminas</b>      |           | Inibição da síntese do ergosterol através da enzima esqualeno epoxidase                                            | Naftifina<br>Terbinafina | (Sakai <i>et al.</i> , 2011; Odds <i>et al.</i> , 2003)   |
| <b>Antimetabolitos</b> |           | Inibição da síntese do DNA e RNA                                                                                   | Flucitosina              | (Vermees <i>et al.</i> , 2000; Odds <i>et al.</i> , 2003) |
| <b>Azóis</b>           | Imidazóis | Inibição da enzima 14 $\alpha$ -desmetilase dependente do citocromo P450, com supressão da síntese do ergosterol   | Cetoconazol              | (Hof, 2008; Odds <i>et al.</i> , 2003)                    |
|                        | Triazóis  |                                                                                                                    | Fluconazol               |                                                           |
| <b>Equinocandinas</b>  |           | Inibição da síntese do $\beta$ -1,3-D-glucano, impedindo a síntese da parede e conduzindo à lise da célula fúngica | Caspofungina             | (Hakki <i>et al.</i> , 2006)                              |
| <b>Polienos</b>        |           | Ligação ao ergosterol e consequente alteração das funções da membrana citoplasmática                               | Anfotericina B           | (Odds <i>et al.</i> , 2003)                               |

### 1.2.1 *Candida albicans*

*C. albicans* é um fungo colonizador do trato gastrointestinal, da pele e do trato geniturinário (Rosenbach *et al.*, 2010). A maior parte das infecções causadas por *C. albicans* surge em indivíduos previamente colonizados e com um sistema imune comprometido. Deste modo, a colonização é geralmente aceita como um fator de risco (Rosenbach *et al.*, 2010; Wiesner *et al.*, 2001). *C. albicans* pode causar infecções superficiais como candidíase oral ou vaginal e infecções sistêmicas, como candidemia (Mathé e Van Dijck, 2013; WHO, 2014). As infecções sistêmicas causadas por este



fungo estão, normalmente, associadas a elevadas taxas de mortalidade mesmo nos casos em que são usados fármacos de primeira linha no seu tratamento (Mayer *et al.*, 2013).

São vários os fatores de virulência associados a *C. albicans*. A formação de biofilmes é um desses mecanismos, conferindo resistência a antifúngicos e a desinfetantes. A formação de biofilmes por *C. albicans* ocorre em diversas fases. A primeira fase envolve a adesão do microrganismo a uma superfície. Esta fase é seguida de um período de crescimento celular, onde há a formação do biofilme. A última fase consiste na produção de hifas, sendo que as células ficam contidas numa matriz extracelular (Holland *et al.*, 2014). A sua capacidade de dimorfismo é outro importante fator de virulência. Este fungo pode crescer na sua forma filamentosa ou em levedura consoante o ambiente a que está exposto. Possui ainda uma grande capacidade de adesão a outros microrganismos, superfícies ou hospedeiros através da produção de adesinas e hidrolases. É resistente a variações de pH, conseguindo colonizar vários locais do organismo humano onde o pH varia deste o alcalino até ao ácido. O conjunto de todos estes fatores contribui para a patogenicidade deste fungo (Mayer *et al.*, 2013; Calderone e Fonzi, 2001).

Os fármacos mais usados no tratamento de infeções sistémicas por *C. albicans* eram normalmente os azóis e os polienos (Song *et al.*, 2004). Atualmente, o tratamento de infeções por *C. albicans* é feito, preferencialmente, com recurso aos azóis e equinocandinas (Neves *et al.*, 2014; WHO, 2014). A administração contínua destes fármacos no tratamento e profilaxia de infeções exerceu um impacto muito negativo no panorama terapêutico atual dada a emergência de resistências, um problema grave e crescente. Os azóis atuam na enzima 14  $\alpha$ -desmetilase (Erg11p), produto do gene ERG11. Os mecanismos de resistência aos azóis identificados incluem alterações no gene ERG11 e a expressão de genes (CDR1, CDR2 e MDR1) que codificam bombas de efluxo, conferindo resistência a este grupo terapêutico (Song *et al.*, 2004; White *et al.*, 2002). *C. albicans* é também resistente a polienos, nomeadamente a anfotericina B (Costa *et al.*, 2014; Vale-Silva *et al.*, 2012).

Em Portugal são poucos os dados existentes sobre a epidemiologia de *C. albicans*. Contudo, é sabido que é a espécie mais frequentemente identificada (Correia *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2014).

### 1.2.2 *Candida krusei*

Durante os últimos anos, tem-se vindo a observar um aumento significativo de espécies não-*albicans* patogénicas. *C. krusei* é patogénica, causando infeção especialmente em indivíduos com neoplasias hematológicas (Ricardo *et al.*, 2014). As taxas de mortalidade associadas a *C. krusei* são muito elevadas uma vez que este fungo é intrinsecamente resistente ao fluconazol, exibindo também baixas suscetibilidades a anfotericina B, cetoconazol e flucitosina (Pfaller *et al.*, 2008a). Esta característica é preocupante dado que o fluconazol é um dos antifúngicos mais usados, sendo geralmente bem tolerado e exibindo poucos efeitos adversos (Ricardo *et al.*, 2014; Lamping *et al.*, 2009).

Os mecanismos que conferem resistência intrínseca ao fluconazol resultam da combinação de dois fatores: a baixa sensibilidade que a enzima Erg11p, o alvo terapêutico dos azóis, apresenta em *C. krusei* ao fluconazol e a contínua expressão de genes que codificam a bomba de efluxo Abc1p. A atividade das bombas de efluxo influencia significativamente a acumulação de fármaco intracelular, contribuindo para a resistência ao fluconazol (Fukuoka *et al.*, 2003; Orozco *et al.*, 1998).

Estas características representam um verdadeiro dilema terapêutico, reduzindo as opções terapêuticas disponíveis. Novas moléculas como o voriconazol foram desenvolvidas, exibindo características farmacocinéticas mais eficazes e amplos espectros de ação. No entanto, já foram observadas estirpes resistentes a estes fármacos (Ricardo *et al.*, 2014; Lamping *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2008a).

### 1.2.3 *Candida parapsilosis*

*C. parapsilosis* é um fungo que faz parte da flora comensal da pele humana. Tem vindo a ganhar cada vez mais atenção por parte da comunidade científica dado o aumento da sua incidência como agente patogénico (Pfaller *et al.*, 2008b). As taxas de mortalidade associadas a *C. parapsilosis* são elevadas, causando infeções principalmente em neonatos e jovens adultos (Pfaller *et al.*, 2008b). As espécies de *Candida* responsáveis por candidemias passaram a ser também associadas a *C. parapsilosis*, chegando a tomar

a vez de *C. albicans* em vários países europeus (Sarvikivi *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 2001). Este fungo está normalmente relacionado com a utilização de cateteres uma vez que possui uma grande capacidade em formar biofilmes (Růžička *et al.*, 2007). Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas estruturadas que se ligam a uma superfície através da produção de uma matriz extracelular. Este mecanismo permite, desta forma, resistência a agentes terapêuticos uma vez que impede a penetração dos mesmos (Mathé e Van Dijck, 2013; Flevari *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015). Os fatores de risco estão, deste modo, associados ao nascimento prematuro de bebés, intubação, nutrição parentérica, hospitalização prolongada e uso de antibióticos de espectro alargado (Sarvikivi *et al.*, 2005).

Ao contrário das infeções causadas por *C. albicans*, infeções por *C. parapsilosis* podem ocorrer sem colonização prévia e são frequentemente transmitidas horizontalmente. As mãos dos profissionais de saúde são os principais “meios” na transmissão deste fungo (Trofa *et al.*, 2008).

Embora *C. parapsilosis* não seja particularmente propensa ao desenvolvimento de resistências, já foram identificadas diminuições na suscetibilidade no grupo dos azóis e das equinocandinas (Silva *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2008b). Dado que o fluconazol é o agente terapêutico mais frequentemente administrado, a emergência de resistências a este fármaco é um fator de grande preocupação (Grossman *et al.*, 2015).

Em Portugal, a incidência de infeções por *C. parapsilosis* é muito elevada (Silva *et al.*, 2009; Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008). Portugal apresenta também baixas suscetibilidades ao fluconazol e a equinocandinas. A combinação da diminuição de suscetibilidades com a capacidade de formação de biofilmes de *C. parapsilosis* é preocupante. Em 50% das infeções detetadas, a causa mais comum foi atribuída ao uso de cateteres (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009).

### 1.3 IMIDAZÓIS

Os azóis são os antifúngicos mais usados na prática clínica e, consequentemente, os mais estudados pela comunidade científica desde a sua descoberta em 1840. O primeiro imidazol foi sintetizado em 1944 por Wooley mas só em 1958 é que esta classe de antifúngicos começou a gerar interesse na comunidade científica. No final dos anos 60, três novos imidazóis foram desenvolvidos (clotrimazol, econazol e miconazol) e introduzidos na prática clínica. Contudo, eram restritos a uso externo dada a sua elevada toxicidade quando administrados oralmente. Em 1968 foi desenvolvido o miconazol, o primeiro antifúngico administrado por via parental. Dada a sua elevada toxicidade, o seu uso foi descontinuado. Em 1981 surgiu o cetoconazol, sendo durante uma década o fármaco de primeira linha no tratamento de infeções sistémicas (Maertens, 2004).

Os azóis são moléculas orgânicas cíclicas, estando divididas em dois grupos distintos com base no número de nitrogénios presentes no anel azólico – os imidazóis possuem dois átomos de nitrogénio, enquanto que os triazóis possuem três (Fromtling, 1988).

O anel imidazólico é um heterociclo anfotérico altamente polar contendo dois átomos de hidrogénio. Existe em duas formas isoméricas (tautómeros), nas quais o hidrogénio pode ligar-se a qualquer um dos nitrogénios. Estas características estruturais são muito benéficas uma vez que permitem a ligação dos imidazóis a uma grande variedade de enzimas e recetores biológicos. Para além disso, o anel imidazólico está presente num grande número de biomoléculas do organismo humano como a histamina, vitamina B12, ácido desoxirribonucleico e a hemoglobina, revelando o seu papel vital em várias atividades biológicas. A presença deste anel noutras moléculas permite ainda o aumento da sua solubilidade graças à presença dos dois átomos de nitrogénio. Deste modo, a incorporação deste anel representa uma estratégia importante no que diz respeito à descoberta de novos compostos (Ribeiro *et al.*, 2014). As propriedades dos derivados do imidazol são muito variadas, desde anticancerígenas, antifúngicas, antiparasitárias, antihistaminicas, antihipertensoras e antineuropáticas (Zhang *et al.*, 2014).

Todas estas características demonstram o enorme potencial terapêutico dos derivados do imidazol, encorajando a pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas (Zhang *et al.*, 2014).

Os imidazóis inibem a síntese do ergosterol através da inibição da Erg11p. Esta enzima faz parte do citocromo P450 e está envolvida na síntese da membrana celular fúngica. Os azóis ligam-se ao grupo heme desta enzima e inibem a oxidação do lanosterol em ergosterol, resultando na redução da estabilidade da membrana, afetando a sua integridade. Este mecanismo interfere com o transporte de nutrientes, impedindo a replicação das células fúngicas (Hof, 2008).

## **II. OBJETIVOS**

O estudo realizado teve como principal objetivo testar a atividade antimicrobiana de novos compostos derivados do imidazol, uma vez que a pesquisa de compostos que possam constituir alternativas à terapêutica atual é considerada um dos eventos mais significativos relacionados com a saúde nos tempos modernos.

Nesse sentido, este estudo teve como principais objetivos:

- Estudo da atividade antimicrobiana de derivados do imidazol
  - a) Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos
  - b) Seleção do(s) composto(s) líder

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 COMPOSTOS A TESTAR

Os compostos testados foram sintetizados, identificados e cedidos pela Professora Doutora Alice Dias do Centro de Química da Escola de Ciências da Universidade do Minho.

Dado que a síntese dos compostos ainda não foi publicada, por uma questão de confidencialidade, a sua estrutura não será apresentada.

Todos os compostos testados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (*AppliChem*, Darmstadt, Alemanha) de forma a obter uma solução *stock* com uma concentração de 10 mg/ml, sendo mantidos a -20°C até a realização dos ensaios.

#### 3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

##### 3.2.1 Avaliação da atividade antibacteriana

As bactérias testadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) pertencentes à coleção do CEBIMED da Universidade Fernando Pessoa. Foram mantidas a -70°C e repicadas em meio Mueller-Hinton agar (MH II) (*Liofilchem*, Itália) usando-se sempre culturas com 24h de crescimento para cada ensaio.

A avaliação da CMI foi efetuada através do método de microdiluição em caldo de acordo com a norma do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M7-A6 (CLSI, 2008a).

As soluções *stock* foram diluídas em meio MH II de modo a obter concentrações seriadas de 1:2 dos compostos de 100 µg/ml a 1,6 µg/ml.

A concentração das suspensões de bactérias foi ajustada de modo a que cada poço contivesse  $1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  UFCs/ml de meio de cultura.

Foram ainda incluídos os controlos: positivo (meio de cultura inoculado), negativo (meio de cultura) e controlo do composto (meio de cultura com composto).

Após a adição do microrganismo ao composto, as placas de 96 poços de fundo plano (*Orange Scientific*) foram incubadas a 37°C procedendo-se à leitura visual dos resultados após 24h, sendo avaliada a presença de turvação (crescimento) ou ausência total desta.

A CMI foi definida como a concentração mais baixa a que não se verificou crescimento bacteriano, por deteção visual.

Como controlo de qualidade foi usada *E. coli* ATCC 25922 e a gentamicina, de acordo com as normas.

### 3.2.2 Avaliação da atividade antifúngica

As leveduras testadas foram *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 2209) pertencentes à coleção do CEBIMED da Universidade Fernando Pessoa. Foram mantidas a - 70°C e repicadas em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (*Liofilchem*) usando-se sempre culturas com 24h de crescimento para cada ensaio.

A avaliação da CMI foi efetuada através do método de microdiluição em caldo de acordo com a norma do CLSI M27-A3 (CLSI, 2008b).

As soluções *stock* dos compostos foram diluídas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (*Sigma-Aldrich*, Estados Unidos da América) suplementado com 3-(*N-morpholino*)propansulfonic acid (MOPS) (*Sigma-Aldrich*, Bélgica) de modo a obter concentrações seriadas de 1:2 dos 100 µg/ml até aos 1,6 µg/ml.

A concentração das suspensões de leveduras foi ajustada de modo a que cada poço contivesse  $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$  UFCs/ml de meio de cultura.

Foram ainda incluídos os controlos: positivo (meio de cultura inoculado), negativo (meio de cultura) e controlo do composto (meio de cultura com composto).



Após a adição do microrganismo ao composto as placas de 96 poços de fundo plano foram incubadas a 37°C procedendo-se à leitura visual dos resultados após 48h, sendo avaliada a presença de turvação (crescimento) ou ausência total desta.

A CMI foi definida como a concentração mais baixa a que não se verificou crescimento das leveduras, por detecção visual.

Como controlo de qualidade foram usadas *C. parapsilosis* ATCC 90018 e fluconazol, e *C. krusei* ATCC 6258 e cetoconazol, de acordo com as normas.

### **3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA LETAL (CML)**

#### **3.3.1 Avaliação do efeito bactericida/bacteriostático**

A determinação da concentração mínima letal foi baseada na técnica descrita por (Cantón *et al.*, 2003) e (Cavaleiro *et al.*, 2015).

Após a leitura da CMI, foram retirados 25 µl do conteúdo de cada poço depois da sua homogeneização e inoculou-se em placa de MH II agar. A microplaca foi incubada a 37°C durante 24h.

Os compostos que não foram capazes de inibir o crescimento das bactérias foram definidos como bacteriostáticos e aqueles capazes de inibir o seu crescimento por detecção visual foram definidos como bactericidas.

#### **3.3.2 Avaliação do efeito fungicida/fungistático**

A determinação da concentração mínima letal foi baseada na técnica descrita por (Cantón *et al.*, 2003) e (Cavaleiro *et al.*, 2015).

Após a leitura da CMI, retirou-se 25 µl do conteúdo de cada poço depois da sua homogeneização e inoculou-se em placa de SDA. A microplaca foi incubada a 37°C durante 24h.

Os compostos que não foram capazes de inibir o crescimento das leveduras foram definidos como fungistáticos e aqueles capazes de inibir o seu crescimento por detecção visual foram definidos como fungicidas.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DA CMI

#### 4.1.1 Avaliação da atividade antibacteriana

Foi avaliada a atividade antibacteriana de 3 séries de compostos estruturalmente relacionados (Tabela 3, 4 e 5), no crescimento de uma bactéria de Gram-positivo (*S. aureus*) e duas bactérias Gram-negativo (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

#### SÉRIE A

**Tabela 3** Atividade antibacteriana, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol A.

| Composto | CMI µg/ml                      |                              |                                   |
|----------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|          | <i>S. aureus</i><br>ATCC 29213 | <i>E. coli</i><br>ATCC 25922 | <i>P.aeruginosa</i><br>ATCC 27853 |
| 1        | >100                           | >100                         | >100                              |
| 2        | >100                           | >100                         | >100                              |
| 3        | >100                           | >100                         | >100                              |
| 4        | >100                           | >100                         | >100                              |
| 5        | >100                           | >100                         | >100                              |
| 6        | >100                           | >100                         | >100                              |
| 7        | >100                           | >100                         | >100                              |

Resultados obtidos a partir de pelo menos 2 ensaios independentes realizados em duplicado.

Nenhum dos compostos da série A testados foi capaz de inibir o crescimento das bactérias selecionadas, mesmo quando testados a concentrações de 100 µg/ml.

SÉRIE B**Tabela 4** Atividade antibacteriana, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol B.

| Composto  | CMI µg/ml                      |                              |                                   |
|-----------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|           | <i>S. aureus</i><br>ATCC 29213 | <i>E. coli</i><br>ATCC 25922 | <i>P.aeruginosa</i><br>ATCC 27853 |
| <b>1</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>2</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>3</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>4</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>5</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>6</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>7</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>8</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>9</b>  | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>10</b> | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>11</b> | >100                           | >100                         | >100                              |

Resultados obtidos a partir de pelo menos 2 ensaios independentes realizados em duplicado.

Nenhum dos compostos da série B testados foi capaz de inibir o crescimento das bactérias selecionadas, mesmo quando testados a concentrações de 100 µg/ml.

SÉRIE C**Tabela 5** Atividade antibacteriana, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol C.

| Composto | CMI µg/ml                      |                              |                                   |
|----------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|          | <i>S. aureus</i><br>ATCC 29213 | <i>E. coli</i><br>ATCC 25922 | <i>P.aeruginosa</i><br>ATCC 27853 |
| <b>1</b> | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>2</b> | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>3</b> | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>4</b> | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>5</b> | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>6</b> | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>7</b> | >100                           | >100                         | >100                              |
| <b>8</b> | >100                           | >100                         | >100                              |

Resultados obtidos a partir de pelo menos 2 ensaios independentes realizados em duplicado.

Nenhum dos compostos da série C testados foi capaz de inibir o crescimento das bactérias selecionadas, mesmo quando testados a concentrações de 100 µg/ml.

#### 4.1.2 Avaliação da atividade antifúngica

Foi avaliada a atividade antifúngica de 3 séries de compostos estruturalmente relacionados (Tabela 6, 7 e 8), no crescimento de 3 leveduras do género *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*).

##### SÉRIE A

**Tabela 6** Atividade antifúngica, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol A.

| Composto | CMI µg/ml                        |                               |                                      |
|----------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
|          | <i>C. albicans</i><br>ATCC 10231 | <i>C. krusei</i><br>ATCC 6258 | <i>C. parapsilosis</i><br>ATCC 22019 |
| 1        | >100                             | >100                          | >100                                 |
| 2        | >100                             | >100                          | >100                                 |
| 3        | >100                             | >100                          | >100                                 |
| 4        | >100                             | 50                            | >100                                 |
| 5        | >100                             | 50                            | >100                                 |
| 6        | >100                             | >100                          | >100                                 |
| 7        | >100                             | ≥100                          | >100                                 |

Resultados obtidos a partir de pelo menos 2 a 3 ensaios independentes realizados em duplicado.

Dos compostos testados da série A, 3 exibiram atividade antifúngica, sendo *C. krusei* a espécie a apresentar maior sensibilidade a esta série. Os compostos 4 e 5 inibiram o crescimento de *C. krusei* a 50 µg/ml e o composto 7 inibiu o crescimento a uma concentração de 100 µg/ml. Todos os outros compostos não foram capazes de inibir o crescimento das leveduras selecionadas, mesmo quando testados a concentrações de 100 µg/ml.

SÉRIE B**Tabela 7** Atividade antifúngica, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol B.

| Composto  | CMI µg/ml                        |                               |                                      |
|-----------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
|           | <i>C. albicans</i><br>ATCC 10231 | <i>C. krusei</i><br>ATCC 6258 | <i>C. parapsilosis</i><br>ATCC 22019 |
| <b>1</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>2</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>3</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>4</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>5</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>6</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>7</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>8</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>9</b>  | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>10</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>11</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |

Resultados obtidos a partir de pelo menos 2 ensaios independentes realizados em duplicado.

Nenhum dos compostos da série B testados foi capaz de inibir o crescimento das leveduras selecionadas, mesmo quando testados a concentrações de 100 µg/ml.

SÉRIE C**Tabela 8** Atividade antifúngica, definida como concentração mínima inibitória (CMI), para a série de derivados do imidazol C.

| Composto | CMI µg/ml                        |                               |                                      |
|----------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
|          | <i>C. albicans</i><br>ATCC 10231 | <i>C. krusei</i><br>ATCC 6258 | <i>C. parapsilosis</i><br>ATCC 22019 |
| <b>1</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>2</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>3</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>4</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>5</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>6</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>7</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |
| <b>8</b> | >100                             | >100                          | >100                                 |

Resultados obtidos a partir de pelo menos 2 ensaios independentes realizados em duplicado.

Nenhum dos compostos da série C testados foi capaz de inibir o crescimento das leveduras selecionadas, mesmo quando testados a concentrações de 100 µg/ml.



## 4.2 DETERMINAÇÃO DA CML

### 4.2.1 Avaliação do efeito fungicida/fungistático

A atividade fungicida/fungistática foi avaliada nos compostos que demonstraram atividade antifúngica (Tabela 9).

**Tabela 9** Atividade antifúngica, definida como concentração mínima inibitória e concentração mínima letal, para os compostos A4, 5 e 7 em *C. krusei*.

| Composto | Espécie          | CMI µg/ml | CML µg/ml |
|----------|------------------|-----------|-----------|
| A4       | <i>C. krusei</i> | 50        | ND        |
| A5       |                  | 50        | 100       |
| A7       |                  | ≥100      | 100       |

ND – Não Determinado

Resultados obtidos a partir de pelo menos 2 a 3 ensaios independentes realizados em duplicado.

Os compostos A5 e A7 revelaram atividade fungicida a uma concentração de 100 µg/ml.

## V. DISCUSSÃO

A emergência de resistências aos agentes antimicrobianos está a propagar-se mais rápido do que a introdução de novos compostos na prática clínica, expondo deste modo, uma crise de saúde pública (Brooks e Brooks, 2014; Iscla *et al.*, 2015).

A pesquisa de novos compostos com atividade antibacteriana e antifúngica é essencial e tem como principal objetivo desenvolver terapias alternativas, que demonstrem segurança para o organismo humano e eficácia terapêutica.

Neste estudo pretendeu-se determinar a atividade antimicrobiana de 3 séries de compostos derivados do imidazol estruturalmente relacionados, dado o elevado potencial terapêutico que esta classe de azóis apresenta. O método usado para proceder à avaliação da atividade antimicrobiana foi o método de microdiluição em caldo de acordo com as normas do CLSI.

A atividade antibacteriana foi testada em *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, 3 das principais bactérias envolvidas no panorama de resistências atual. A atividade antifúngica foi testada em *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, 3 leveduras com grande relevância clínica e que apresentam também resistências à terapia antifúngica atual.

A série A apresentou 3 compostos ativos contra *C. krusei*. Os compostos 4 e 5 conseguiram inibir o crescimento do fungo a 50 µg/ml (CMI 50 µg/ml). Para o composto A7, na maioria das experiências realizadas a CMI foi definida a 100 µg/ml. No entanto, em algumas experiências houve um ligeiro crescimento detetável por leitura visual a 100 µg/ml, pelo que a CMI foi definida como  $\geq 100$  µg/ml.

Todos os outros compostos testados foram incapazes de inibir tanto o crescimento dos fungos como o das bactérias, revelando que são necessárias alterações nas suas estruturas de modo a potenciar as suas atividades.

Dado que a CML do composto A5 foi definida a 100 µg/ml e a CMI é 50 µg/ml, isso significa que na CMI o efeito foi fungistático. No caso do composto A7, o efeito da CMI é fungicida.

## **VI. CONCLUSÃO**

No presente estudo verificou-se atividade antifúngica por parte de uma das séries de compostos testadas, evidenciando o potencial terapêutico que esta classe de antifúngicos apresenta. Modificações nas estruturas são necessárias, com o fim de melhorar os perfis terapêuticos dos compostos, de modo a potenciar a sua eficácia.

Em conclusão, o desenvolvimento de moléculas derivadas do imidazol representa uma estratégia importante na criação de terapias alternativas à terapêutica atual. Os derivados do imidazol apresentam propriedades variadas, nomeadamente propriedades anticancerígenas, antifúngicas, antiparasitárias, antihistamínicas, entre outras, sendo o seu estudo não só importante para a descoberta de alternativas à terapia antimicrobiana como para a criação de novos compostos com novas atividades terapêuticas.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Alanis, A. J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?, *Archives of Medical Research*, 36, pp, 697-705.
- Alexander, B. D. & Perfect, J. R. (1997). Antifungal Resistance Trends Towards the Year 2000, *Drugs*, 54, pp, 657-678.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F. & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, pp, 6235-6254.
- Alves, C. T., Wei, X.-Q., Silva, S., Azeredo, J., Henriques, M. & Williams, D. W. (2014). Candida albicans promotes invasion and colonisation of Candida glabrata in a reconstituted human vaginal epithelium, *Journal of Infection*, 69, pp, 396-407.
- Andonova, M. & Urumova, V. (2013). Immune surveillance mechanisms of the skin against the stealth infection strategy of Pseudomonas aeruginosa-Review, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36, pp, 433-448.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H. & Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines Pseudomonas aeruginosa virulence, *Nucleic Acids Research*, 41, pp, 1-20.
- Bartlett, J. G. (2011). A Call to Arms: The Imperative for Antimicrobial Stewardship, *Clinical Infectious Diseases*, 53, pp, S4-S7.
- Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C. & Astilean, A. (2013). New antibiotics for bad bugs: where are we?, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12, pp, 22.
- Brooks, B. D. & Brooks, A. E. (2014). Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, pp, 14-27.
- Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of Candida albicans, *Trends in Microbiology*, 9, pp, 327-335.
- Cantón, E., Pemán, J., Viudes, A., Quindós, G., Gobernado, M. & Espinel-Ingroff, A. (2003). Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream Candida species, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45, pp, 203-206.
- Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.-J., Hrimpeng, K., Pinto, J. & Pinto, E. (2015). Antifungal activity of the essential oil of Angelica major against Candida, Cryptococcus, Aspergillus and dermatophyte species, *Journal of Natural Medicines*, 69, pp, 241-248.
- Cdc 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States.
- Chambers, H. F. & Deleo, F. R. (2009). Waves of Resistance: Staphylococcus aureus in the Antibiotic Era, *Nature reviews. Microbiology*, 7, pp, 629-641.
- Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. L., Tenover, F. C., Downes, F. P., Shah, S., Rudrik, J. T., Pupp, G. R., Brown, W. J., Cardo, D. & Fridkin, S. K. (2003). Infection with Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Containing the vanA Resistance Gene, *New England Journal of Medicine*, 348, pp, 1342-1347.

- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, pp, 232-260.
- Clsi 2008a. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. . *Approved standard*, 5th ed.
- Clsi 2008b. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. *CLSI Document M27-S3 Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Cole, S. T. (2014). Who will develop new antibacterial agents?, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 369, pp,
- Conceição, T., Diamantino, F., Coelho, C., De Lencastre, H. & Aires-De-Sousa, M. (2013). Contamination of Public Buses with MRSA in Lisbon, Portugal: A Possible Transmission Route of Major MRSA Clones within the Community, *PLoS One*, 8, pp, e77812.
- Correia, A., Sampaio, P., Almeida, J. & Pais, C. (2004). Study of Molecular Epidemiology of Candidiasis in Portugal by PCR Fingerprinting of Candida Clinical Isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp, 5899-5903.
- Costa-De-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonça, D. & Gonçalves Rodrigues, A. (2008). A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27, pp, 365-374.
- Costa, E., Silva, S., Tavaría, F. & Pintado, M. (2014). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Chitosan on the Oral Pathogen Candida albicans, *Pathogens*, 3, pp, 908-919.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. & Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli, *Clinical Microbiology Reviews*, 26, pp, 822-880.
- D'costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N. & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient, *Nature*, 477, pp, 457-461.
- Davis, B. D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides, *Microbiological Reviews*, 51, pp, 341-350.
- Deleo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N. & Chambers, H. F. (2010). Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *Lancet*, 375, pp, 1557-1568.
- Dougherty, T. J., Pucci, M. J., Périchon, B. & Courvalin, P. (2012). Glycopeptide Resistance. In: Dougherty, T. J., Pucci, M. J., Périchon, B. & Courvalin, P. *Antibiotic Discovery and Development*. 1 ed. Place, Springer US, pp. 515-542.
- Drlica, K. (1999). Mechanism of fluoroquinolone action, *Current Opinion in Microbiology*, 2, pp, 504-508.
- Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J. & Zhao, X. (2008). Quinolone-Mediated Bacterial Death, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, pp, 385-392.
- Drlica, K. & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, pp, 377-92.
- Ecdc 2014. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm.
- Eliopoulos, G. M., Perea, S. & Patterson, T. F. (2002). Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi, *Clinical Infectious Diseases*, 35, pp, 1073-1080.

- Esposito, S., Terranova, L., Zampiero, A., Ierardi, V., Rios, W. P., Pelucchi, C. & Principi, N. (2014). Oropharyngeal and nasal Staphylococcus aureus carriage by healthy children, *BMC Infectious Diseases*, 14, pp, 723.
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae, *British journal of experimental pathology*, 10, pp, 226-236.
- Flevvari, A., Theodorakopoulou, M., Velegraki, A., Armaganidis, A. & Dimopoulos, G. (2013). Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review, *Clinical Interventions in Aging*, 8, pp, 1199-1208.
- Fromtling, R. A. (1988). Overview of medically important antifungal azole derivatives, *Clinical Microbiology Reviews*, 1, pp, 187-217.
- Fukuoka, T., Johnston, D. A., Winslow, C. A., De Groot, M. J., Burt, C., Hitchcock, C. A. & Filler, S. G. (2003). Genetic Basis for Differential Activities of Fluconazole and Voriconazole against Candida krusei, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, pp, 1213-1219.
- Gardete, S. & Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus, *The Journal of Clinical Investigation*, 124, pp, 2836-2840.
- Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. (2013). Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses, *Pathogens and Disease*, 67, pp, 159-173.
- Georgopapadakou, N. H., Smith, S. A. & Bonner, D. P. (1982). Penicillin-binding proteins in a Staphylococcus aureus strain resistant to specific beta-lactam antibiotics, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22, pp, 172-175.
- Grossman, N. T., Pham, C. D., Cleveland, A. A. & Lockhart, S. R. (2015). Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in Candida parapsilosis Isolates from a U.S. Surveillance System, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, pp, 1030-1037.
- Hakki, M., Staab, J. F. & Marr, K. A. (2006). Emergence of a Candida krusei Isolate with Reduced Susceptibility to Caspofungin during Therapy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, pp, 2522-2524.
- Hartman, B. J. & Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus, *Journal of Bacteriology*, 158, pp, 513-516.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T. & Tenover, F. C. (1997). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40, pp, 135-136.
- Hof, H. (2008). Will resistance in fungi emerge on a scale similar to that seen in bacteria?, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27, pp, 327-334.
- Holland, L. M., Schröder, M. S., Turner, S. A., Taff, H., Andes, D., Grózer, Z., Gácsér, A., Ames, L., Haynes, K., Higgins, D. G. & Butler, G. (2014). Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens Candida parapsilosis and Candida albicans, *PLoS Pathogens*, 10, pp, e1004365.
- Hooper, D. C. (2000). Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones, *Clinical Infectious Diseases*, 31, pp, S24-S28.
- Ibrahim, I. a. J., Al-Shwaikh, R. M. & Ismaeil, M. I. (2014). Virulence and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from Tigris River and children diarrhea, *Infection and Drug Resistance*, 7, pp, 317-322.

- Iscla, I., Wray, R., Blount, P., Larkins-Ford, J., Conery, A. L., Ausubel, F. M., Ramu, S., Kavanagh, A., Huang, J. X., Blaskovich, M. A., Cooper, M. A., Obregon-Henao, A., Orme, I., Tjandra, E. S., Stroehrer, U. H., Brown, M. H., Macardle, C., Van Holst, N., Ling Tong, C., Slattey, A. D., Gibson, C. T., Raston, C. L. & Boulous, R. A. (2015). A new antibiotic with potent activity targets MscL, *The Journal of Antibiotics* 68, pp, 453-462.
- Jevons, M. P. (1961). "Celbenin" - resistant Staphylococci, *British Medical Journal*, 1, pp, 124-125.
- Kang, C.-I., Kim, S.-H., Park, W. B., Lee, K.-D., Kim, H.-B., Kim, E.-C., Oh, M.-D. & Choe, K.-W. (2005). Bloodstream Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli: Risk Factors for Mortality and Impact of Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy on Outcome, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, pp, 760-766.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli, *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp, 123-140.
- Kardos, N. & Demain, A. (2011). Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, pp, 677-687.
- Kerr, K. G. & Snelling, A. M. (2009). Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary, *Journal of Hospital Infection*, 73, pp, 338-344.
- Kluytmans, J., Van Belkum, A. & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks, *Clinical Microbiology Reviews*, 10, pp, 505-520.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M. & Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens, *Infection*, 11, pp, 315-317.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K.-I., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R.-I., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. & Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *The Lancet*, 357, pp, 1225-1240.
- Lamping, E., Ranchod, A., Nakamura, K., Tyndall, J. D. A., Niimi, K., Holmes, A. R., Niimi, M. & Cannon, R. D. (2009). Abc1p Is a Multidrug Efflux Transporter That Tips the Balance in Favor of Innate Azole Resistance in Candida krusei, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, pp, 354-369.
- Laxminarayan, R. (2014). Antibiotic effectiveness: Balancing conservation against innovation, *Science*, 345, pp, 1299-1301.
- Leach, K. L., Brickner, S. J., Noe, M. C. & Miller, P. F. (2011). Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1222, pp, 49-54.
- Lederberg, J. (1957). MECHANISM OF ACTION OF PENICILLIN, *Journal of Bacteriology*, 73, pp, 144.
- Lee, K. K., Maccallum, D. M., Jacobsen, M. D., Walker, L. A., Odds, F. C., Gow, N. a. R. & Munro, C. A. (2012). Elevated Cell Wall Chitin in Candida albicans Confers Echinocandin Resistance In Vivo, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, pp, 208-217.

- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., Mueller, A., Schaberle, T. F., Hughes, D. E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V. A., Cohen, D. R., Felix, C. R., Fetterman, K. A., Millett, W. P., Nitti, A. G., Zullo, A. M., Chen, C. & Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance, *Nature*, 517, pp, 455-459.
- Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 22, pp, 582-610.
- Lodise, T. P., Patel, N., Kwa, A., Graves, J., Furuno, J. P., Graffunder, E., Lomaestro, B. & McGregor, J. C. (2007). Predictors of 30-Day Mortality among Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: Impact of Delayed Appropriate Antibiotic Selection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, pp, 3510-3515.
- Long, K. S. & Vester, B. (2012). Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, pp, 603-612.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Sousa, J. C. & Peixe, L. (2013). Commensal Enterobacteriaceae as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal, *Frontiers in Microbiology*, 4, pp, 80.
- Maertens, J. A. (2004). History of the development of azole derivatives, *Clinical Microbiology and Infection*, 10, pp, 1-10.
- Maple, P. a. C., Hamilton-Miller, J. M. T. & Brumfitt, W. (1989). WORLD-WIDE ANTIBIOTIC RESISTANCE IN METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS, *The Lancet*, 333, pp, 537-540.
- Mathé, L. & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms, *Current Genetics*, 59, pp, 251-264.
- Mayer, F. L., Wilson, D. & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms, *Virulence*, 4, pp, 119-128.
- Melo-Cristino, J., Resina, C., Manuel, V., Lito, L. & Ramirez, M. (2013). First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, *The Lancet*, 382, pp, 205.
- Michael, C. A., Dominey-Howes, D. & Labbate, M. (2014). The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management, *Frontiers in Public Health*, 2, pp, 145.
- Moellering, R. C. (2011). MRSA: the first half century, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, pp, 4-11.
- Naber, C. K. (2009). *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies, *Clinical Infectious Diseases*, 48, pp, S231-S237.
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76, pp, 46-65.
- Neves, N., Santos, L., Reis, C. & Sarmiento, A. (2014). *Candida albicans* brain abscesses in an injection drug user patient: a case report, *BMC Research Notes*, 7, pp, 837.
- Ng, V. W. L., Chan, J. M. W., Sardon, H., Ono, R. J., García, J. M., Yang, Y. Y. & Hedrick, J. L. (2014). Antimicrobial hydrogels: A new weapon in the arsenal



- against multidrug-resistant infections, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, pp, 46-62.
- Odds, F. C., Brown, A. J. P. & Gow, N. a. R. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action, *Trends in Microbiology*, 11, pp, 272-279.
- Orozco, A. S., Higginbotham, L. M., Hitchcock, C. A., Parkinson, T., Falconer, D., Ibrahim, A. S., Ghannoum, M. A. & Filler, S. G. (1998). Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, pp, 2645-2649.
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update, *Clinical Microbiology Reviews*, 18, pp, 657-686.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E., Dobiasova, S., Rinaldi, M., Barton, R., Veselov, A. & The Global Antifungal Surveillance, G. (2008a). *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005, *Journal of Clinical Microbiology*, 46, pp, 515-521.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ng, K. P., Colombo, A., Finkelievich, J., Barnes, R., Wadula, J. & Group, T. G. a. S. (2008b). Geographic and Temporal Trends in Isolation and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*: a Global Assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005, *Journal of Clinical Microbiology*, 46, pp, 842-849.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Jones, R. N., Sader, H. S., Fluit, A. C., Hollis, R. J., Messer, S. A. & The, S. P. G. (2001). International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, pp, 3254-3259.
- Pitout, J. D. D. (2010). Infections with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae, *Drugs*, 70, pp, 313-321.
- Pitout, J. D. D. (2012). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance, *Frontiers in Microbiology*, 3, pp, 9.
- Poirel, L., Bonnin, R. A. & Nordmann, P. (2012). Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative rods, *Infection, Genetics and Evolution*, 12, pp, 883-893.
- Queenan, A. M. & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases, *Clinical Microbiology Reviews*, 20, pp, 440-458.
- Ribeiro, A. I., Gabriel, C., Cerqueira, F., Maia, M., Pinto, E., Sousa, J. C., Medeiros, R., Proença, M. F. & Dias, A. M. (2014). Synthesis and antimicrobial activity of novel 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, pp, 4699-4702.
- Ricardo, E., Miranda, I. M., Faria-Ramos, I., Silva, R. M., Rodrigues, A. G. & Pina-Vaz, C. (2014). In Vivo and In Vitro Acquisition of Resistance to Voriconazole by *Candida krusei*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, pp, 4604-4611.
- Roberts, M. C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution, *FEMS Microbiology Reviews*, 19, pp, 1-24.
- Rodvold, K. A. & McConeghy, K. W. (2014). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Therapy: Past, Present, and Future, *Clinical Infectious Diseases*, 58, pp, S20-S27.

- Rosenbach, A., Dignard, D., Pierce, J. V., Whiteway, M. & Kumamoto, C. A. (2010). Adaptations of *Candida albicans* for Growth in the Mammalian Intestinal Tract, *Eukaryotic Cell*, 9, pp, 1075-1086.
- Růžička, F., Holá, V., Votava, M. & Tejkalová, R. (2007). Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method, *Folia Microbiologica*, 52, pp, 209-214.
- Rybak, M. J., Hersherberger, E., Moldovan, T. & Grucz, R. G. (2000). In Vitro Activities of Daptomycin, Vancomycin, Linezolid, and Quinupristin-Dalfopristin against *Staphylococci* and *Enterococci*, Including Vancomycin- Intermediate and - Resistant Strains, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, pp, 1062-1066.
- Sakai, M. R., May, E. R., Imerman, P. M., Felz, C., Day, T. A., Carlson, S. A. & Noxon, J. O. (2011). Terbinafine pharmacokinetics after single dose oral administration in the dog, *Veterinary Dermatology*, 22, pp, 528-534.
- Sarvikivi, E., Lyytikäinen, O., Soll, D. R., Pujol, C., Pfaller, M. A., Richardson, M., Koukila-Kähkölä, P., Luukkainen, P. & Saxén, H. (2005). Emergence of Fluconazole Resistance in a *Candida parapsilosis* Strain That Caused Infections in a Neonatal Intensive Care Unit, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, pp, 2729-2735.
- Schnappinger, D. & Hillen, W. (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms, *Archives of Microbiology*, 165, pp, 359-369.
- Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R. & Khan, A. U. (2008). Aminoglycosides versus bacteria - a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground, *Journal of Biomedical Science*, 15, pp, 5-14.
- Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S. & Gabrani, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets, *Biologicals*, 42, pp, 1-7.
- Silva, A. P., Miranda, I. M., Lisboa, C., Pina-Vaz, C. & Rodrigues, A. G. (2009). Prevalence, Distribution, and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a Tertiary Care Hospital, *Journal of Clinical Microbiology*, 47, pp, 2392-2397.
- Sivaraman, K., Venkataraman, N. & Cole, A. M. (2009). *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage and its Contributing Factors, *Future Microbiology*, 4, pp, 999-1008.
- Song, J. L., Beth Harry, J., Eastman, R. T., Oliver, B. G. & White, T. C. (2004). The *Candida albicans* Lanosterol 14- $\alpha$ -Demethylase (ERG11) Gene Promoter Is Maximally Induced after Prolonged Growth with Antifungal Drugs, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, pp, 1136-1144.
- Srinivasan, A., Lopez-Ribot, J. L. & Ramasubramanian, A. K. (2014). Overcoming antifungal resistance, *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, pp, 65-71.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K. S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406, pp, 959-964.
- Tavares, A., Miragaia, M., Rolo, J., Coelho, C. & De Lencastre, H. (2013). High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community-hospital

- boundaries, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32, pp, 1269-1283.
- Tenson, T., Lovmar, M. & Ehrenberg, M. (2003). The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome, *Journal of Molecular Biology*, 330, pp, 1005-1014.
- Trofa, D., Gácsér, A. & Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen, *Clinical Microbiology Reviews*, 21, pp, 606-625.
- Valderrey, A. D., Pozuelo, M. J., Jiménez, P. A., Maciá, M. D., Oliver, A. & Rotger, R. (2010). Chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* of patients with obstructive lung diseases: cystic fibrosis, bronchiectasis, and chronic obstructive pulmonary disease, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68, pp, 20-27.
- Vale-Silva, L. A., Coste, A. T., Ischer, F., Parker, J. E., Kelly, S. L., Pinto, E. & Sanglard, D. (2012). Azole Resistance by Loss of Function of the Sterol  $\Delta 5,6$ -Desaturase Gene (ERG3) in *Candida albicans* Does Not Necessarily Decrease Virulence, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, pp, 1960-1968.
- Van Belkum, A., Melles, D. C., Nouwen, J., Van Leeuwen, W. B., Van Wamel, W., Vos, M. C., Wertheim, H. F. L. & Verbrugh, H. A. (2009). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*, *Infection, Genetics and Evolution*, 9, pp, 32-47.
- Van Der Bij, A. K. & Pitout, J. D. D. (2012). The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, pp, 2090-2100.
- Vermes, A., Guchelaar, H.-J. & Dankert, J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, pp, 171-179.
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H. A. & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections, *The Lancet Infectious Diseases*, 5, pp, 751-762.
- White, T. C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L. F. & Stevens, D. A. (2002). Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida albicans*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, pp, 1704-1713.
- Who 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.
- Wiesner, S. M., Jechorek, R. P., Garni, R. M., Bendel, C. M. & Wells, C. L. (2001). Gastrointestinal Colonization by *Candida albicans* Mutant Strains in Antibiotic-Treated Mice, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, pp, 192-195.
- Williams, R. E. O. (1963). HEALTHY CARRIAGE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS: ITS PREVALENCE AND IMPORTANCE, *Bacteriological Reviews*, 27, pp, 56-71.
- Wright, G. (2015). Antibiotics: An irresistible newcomer, *Nature*, advance online publication, pp, 442-444.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity, *Nature Reviews Microbiology*, 5, pp, 175-186.
- Wu, Y. E., Min, F., Pan, J., Wang, J., Yuan, W., Zhang, Y., Huang, R. & Zhang, L. (2015). Systemic *Candida parapsilosis* Infection Model in Immunosuppressed ICR Mice and Assessing the Antifungal Efficiency of Fluconazole, *Veterinary Medicine International*, 2015, pp, 370641.

Zhang, L., Peng, X.-M., Damu, G. L. V., Geng, R.-X. & Zhou, C.-H. (2014). Comprehensive Review in Current Developments of Imidazole-Based Medicinal Chemistry, *Medicinal Research Reviews*, 34, pp, 340-437.