

Carla Patrícia Morais Sequeira Gabriel

Atividade antimicrobiana de derivados da 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2014

Atividade antimicrobiana de derivados da 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona

Carla Patrícia Morais Sequeira Gabriel

Atividade antimicrobiana de derivados da 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona

Atividade antimicrobiana de derivados da 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2014

Carla Patrícia Morais Sequeira Gabriel

Atividade antimicrobiana de derivados da 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona

Assinatura:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Clínica sob a orientação da Professora Doutora Fátima Cerqueira da Faculdade ciências da saúde da Universidade Fernando Pessoa.

Porto 2014

Resumo

Nas últimas décadas as infecções fúngicas têm-se tornado uma das principais causas de infecções hospitalares nos países desenvolvidos. Vários fatores, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), a neutropenia associada à quimioterapia antitumoral ou a imunossupressão induzida por fármacos, têm contribuído para o aumento das infecções fúngicas sistêmicas oportunistas. Para além disso, as infecções fúngicas são um problema não apenas para indivíduos imunocomprometidos mas também para indivíduos saudáveis, devido ao aparecimento de estirpes multirresistentes. Por esta razão, as doenças fúngicas são actualmente consideradas um problema grave em todo o mundo. Neste sentido é importante a pesquisa e o desenvolvimento de novos antifúngicos de forma a melhorar a eficácia das terapias convencionais.

O objectivo deste trabalho consistiu na: (i) avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados da 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona, a sua relação estrutura actividade e elucidação do seu possível mecanismo de ação; (ii) determinação do efeito dos melhores compostos no sistema imune; (iii) avaliação da atividade destes sobre a formação de biofilme bem como contra biofilmes pré-estabelecidos, em substratos de nanohidroxiapatite.

Os resultados obtidos demonstraram que os compostos estudados têm uma atividade muito limitada em *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas são, no geral, providos de atividade antifúngica. Pela comparação das atividades em *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* foi possível, com base na relação estrutura/atividade, seleccionar três compostos líderes, as (Z)-5-amino-N'-aril-1-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazonamidas: [aril= fenil (**2h**), 4-fluorofenil (**2k**), 3-fluorofenil (**2l**)].

Os derivados de imidazol 2h, 2k e 2l inibiram fortemente o crescimento de *C. krusei* e *C. neoformans* embora a sua atividade em fungos filamentosos tivesse sido baixa quando comparado com a atividade em leveduras. Para além disso é de salientar a atividade fungicida dos compostos 2h e 2k contra *C. krusei*. No que se refere ainda ao mecanismo de ação antifúngica, 2h, 2k e 2l inibiram a atividade mitocondrial de *C. krusei* enquanto apenas o composto 2k foi capaz de o fazer quando se tratava de *C. albicans*.

O composto 2h foi ainda capaz de inibir significativamente a transição dimórfica sendo que a formação do tubo germinativo é um importante fator de virulência de *C. albicans*.

Relativamente à atividade no sistema imune, estes compostos apresentaram um efeito inibidor da proliferação de células mononucleares humanas estimuladas por fitohemaglutinina e da produção de óxido nítrico (NO) pela linha celular de macrófagos de ratinho RAW 264.7, após estimulação por Lipopolissacarídeo (LPS).

Para além disso verificou-se uma acentuada redução na formação do biofilme por *C. albicans* e *C. krusei* em nanohidroxiapatite (nanoHA) particularmente para o composto 2l.

Em conclusão estes compostos mostraram ter potencial para futura aplicação no tratamento de micoses provocadas por *Candida* sp e *C. neoformans* bem como no tratamento ou prevenção de infecções fúngicas associadas a dispositivos médicos. Além disso, podem permitir o desenho de novas estratégias para prevenção/tratamento de micoses oportunistas em doentes recetores de transplantes.

Abstract

In the last decades fungal infections have become one major cause of nosocomial infections in developed countries. Several factors, such as *Acquired* Immunodeficiency Syndrome (AIDS), neutropenia associated with anti-tumour chemotherapy or drug-induced immunosuppression have contributed to the increase in systemic fungal opportunists infections. Furthermore, fungal infections are a problem not only for immunocompromised patients but also for healthy individuals due to the appearance of multi-resistant strains. For this reason, fungal diseases are now considered a serious problem worldwide. In this regard it is important the research and development of new antifungal drugs to improve the effectiveness of conventional therapies.

The aim of this work consisted in the: (i) evaluation of the antibacterial and antifungal activity of 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives, the structure/activity relation and elucidation of its possible mechanism of action; (ii) determination of the effect of best compounds on the immune system; (iii) evaluation of the activity of these in biofilm formation as well as against pre-established biofilms in nanohydroxyapatite (nanoHA) substrates.

The results demonstrate that the studied compounds have very limited activity in *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, but in general are provided of antifungal activity. By comparing the activities in *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* was possible, based on the structure/activity relation, select three leader compounds, (Z)-5-amino-N'-aryl-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamides [aryl = phenyl (2h), 4-fluorophenyl (2k), 3-fluorophenyl (2l)]. The imidazole derivatives 2h, 2k 2l strongly inhibited the growth of *C. krusei* and *C. neoformans*, although their activity in filamentous fungi have been low when compared to the activity in yeasts. Moreover is to point out the fungicidal activity of the compounds 2h and 2k against *C. krusei*. As regards to the mechanism of antifungal action, 2h, 2k and 2l inhibited the mitochondrial activity of *C. krusei* while only 2k compound was able to do so when it came to *C. albicans*.

Compound 2h was able to significantly inhibit the dimorphic transition, being that the germ tube formation is an important virulence factor of *C. albicans*.

Regarding the activity on the immune system, these compounds had an inhibitory effect on human mononuclear cells proliferation stimulated by phytohemagglutinin and in the

nitric oxide (NO) production by the macrophage cell line RAW 264.7 mice after lipopolysaccharide stimulation.

Furthermore there was a marked reduction in biofilm formation by *C albicans* and *C krusei* in nanoHA particularly for compound 21.

In conclusion these compounds demonstrated to have potential for future application in the treatment of fungal infections caused by *C. neoformans* and *Candida* sp as well as in the treatment or prevention of fungal infections associated with medical devices. Moreover, may allow the development of new strategies for prevention / treatment of opportunistic mycoses in transplanted patients.

Agradecimentos

Nesta nova etapa da minha vida, quero dar o meu sincero agradecimento a todos que me incentivaram e me ajudaram na realização deste trabalho.

Em especial, agradeço à minha orientadora Professora Doutora Fátima Cerqueira, que deste o início me incentivou, na realização deste projeto. Agradeço-lhe por todo o conhecimento transmitido, pela disponibilidade, paciência, amizade, carinho e dedicação. Sem a sua orientação nada seria possível.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, meu co-orientador, pela sabedoria e conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Doutor João Carlos Sousa agradeço a oportunidade, o apoio e a constante motivação para o desenvolvimento deste trabalho

À Professora Doutora Eugénia Pinto, pelo conhecimento, pela disponibilidade e pelo carinho com que sempre me recebeu.

Ao Grupo da Professora Doutora Maria Pia Ferraz, pela oportunidade de parceria no projecto, um especial agradecimento à colega Liliana Grenho, por toda a amizade e apoio neste projecto.

Ao Grupo de Química da Universidade do Minho, nomeadamente à Professora Doutora Alice Dias e à Professora Doutora Maria Fernanda Proença, pela síntese e cedência dos compostos estudados nesta tese.

Um especial agradecimento às minhas colegas de laboratório, Nair Campos, Jani Silva e Viviana Silva, pela experiência partilhada, companheirismo e amizade.

A todas as outras investigadoras, nomeadamente de outras instituições, que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso dos trabalhos realizados.

Gostaria de agradecer aos técnicos da Universidade Fernando Pessoa, nomeadamente, ao Dr Ricardo, ao Dr Miguel e ao Eng. Pedro, pela disponibilidade e apoio técnico.

Gostaria ainda de agradecer, a todas a minhas colegas e gerente da Colchões & Companhia Lda, pela compreensão e apoio durante o meu projecto.

E por fim um agradecimento especial à minha família, nomeadamente, à minha Mãe, ao meu Pai, ao meu Irmão, à Luzinha e ao meu Namorado, pela paciência, força e auxílio em todos os momentos.

A todos o meu Muito Obrigada.

Abreviaturas

AI – Aspergilose invasiva

AINEs – Anti-inflamatórios não-esteróides (*Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)

AMD – Amiodarona

ATCC – American Type Culture Collection

Ca²⁺ – Ião cálcio

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI – Concentração mínima inibitória

CML – Concentração mínima letal

CNA – Calcineurina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMF – Dimetilformamida

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DO – Densidade ótica

HMDS – Hexametildissilazano

Hsp – Proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*)

IC₅₀ – *Inhibitory concentration of 50%*

IL-2 – Interleucina 2

iNOS – Inducible nitric oxide synthase

L-NAME – Ester metílico de N – nitro – L – arginina (*L-nitro-arginine-methylester*)

LPS – Lipopolissacarídeo

MEV – Microscopia eletrônica de varimento

MHII – Mueller Hinton II

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

nanoHA – nanohidroxiapatite (*nanohydroxyapatite*)

NO – Óxido nítrico (Nitric oxide)

NOS – Sintetase do óxido nítrico (*nitric oxide synthase*)

PHA – Fito-hemaglutinina (*Phytohemagglutinin*)

PVC – Cloreto de polivinil

RPMI – Roswell Park Memorial Intitute

ROS – Espécies reativas de oxigénio

SDA – Sabourand dextrose agar

SDS – Docecilsulfato de sódio (Sodium dodecilsulphate)

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

SNC – Sistema Nervoso central

UFC – Unidade formadora de colónia (*Colony-Forming Unit*)

VIH – Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

YNB – *Yeast nitrogen base*

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

Índice	
Resumo	8
Abstract	10
Agradecimentos	12
Abreviaturas	14
Índice	16
Índice de Figuras	17
Introdução	18
1.1 Infecções fúngicas	20
1.2 Terapia antifúngica	23
1.3 Infecções associadas a biomateriais	29
1.3.1 Produção de biofilme	29
Objetivos	32
Trabalho Experimental I	33
I.1. Material e Métodos	34
I.2 Resultados e discussão	39
I.3 Material suplementar	43
Trabalho Experimental II	49
II.1. Material e Métodos	50
II.2 Resultados e discussão	56
Trabalho Experimental III	71
III.1. Material e Métodos	72
III.2 Resultados e discussão	76
Conclusão geral	91
Bibliografia	93

Índice de Figuras

Figura 1 – Cronologia da introdução dos antifúngicos no mercado.....	23
Figura 2 – Mecanismo de acção dos principais grupos de antifúngicos.....	24
Figura 3 – Representação esquemática do, mecanismos de resistência e abordagens de resistência antifúngica	26
Figura 4 – Fases da formação do biofilme	30

INTRODUÇÃO GERAL

A era da antibioterapia estreou-se com a descoberta da penicilina no século XX (Sousa 2006). Iniciava-se assim a introdução dos antibióticos como a única arma capaz de eliminar as doenças infecciosas, levando muitos a acreditar que estas se tornariam um problema do passado. No entanto o uso indiscriminado e prolongado dos antibióticos levou rapidamente ao aparecimento de microrganismos capazes de resistir aos seus efeitos (Ferreira e Sousa 2000; Sousa 2006).

Atualmente as infeções continuam a ser uma das principais causas de morte em todo mundo. Nos casos particulares da União Europeia, Noruega e Islândia, 25 mil pessoas morrem anualmente de infeções bacterianas, que não respondem à terapia com os antibióticos atualmente disponíveis, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS).

A comunidade científica tem procurado desenvolver alternativas terapêuticas, muito devido ao número crescente de infeções acompanhado pelo aumento de resistência microbiana, como é disso exemplo as infeções por estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *S. aureus* resistentes à vancomicina, (VRSA) *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), entre outros (Sousa 2006).

Nos últimos 25 anos as infeções fúngicas têm aumentado drasticamente e tornaram-se uma das principais causas de infeções hospitalares nos países desenvolvidos (Ostrosky-Zeichner, Casadevall et al. 2010). Vários fatores, como a Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) causada pela infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), a neutropenia associada à quimioterapia anti-tumoral ou a imunossupressão induzida por fármacos (como no caso de transplantes), têm contribuído para o aumento das infeções fúngicas sistémicas oportunistas (Pinto, Pina-Vaz et al. 2006). A cada ano, aumenta o número de fungos oportunistas capazes de provocar infeções graves, associadas a elevadas taxas de mortalidade (Fridkin 2005),

As infeções fúngicas são um problema constante não apenas em indivíduos imunocomprometidos mas também em indivíduos saudáveis, nomeadamente devido ao aparecimento de estirpes multirresistentes (Denning and Perlin 2011). Por esta razão, as doenças fúngicas são presentemente considerados como um problema sério em todo o mundo. Atualmente, o número de antifúngicos eficazes no tratamento de infeções fúngicas sistémicas é muito limitado (Pfaller and Diekema 2007). Além disso, quase

todos os antifúngicos apresentam limitações terapêuticas, como espectro de ação reduzido e/ou elevada toxicidade, que fazem com que o tratamento de infecções fúngicas esteja longe de ser ideal (Picazo, Gonzalez-Romo et al. 2008). Neste sentido é importante a pesquisa e o desenvolvimento de novos antifúngicos de forma a melhorar a eficácia das terapias convencionais.

1.1. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas são também denominadas de micoses. As micoses de maior incidência são usualmente causadas por fungos que fazem parte da flora normal ou que estão altamente adaptados à sobrevivência no hospedeiro humano (Ferreira e Sousa 2000).

Os dermatófitos são a causa mais comum de infecções superficiais (Gupta and Cooper 2008) vulgarmente designadas por tinhas e, embora possam ser persistentes e incômodos, não são debilitantes nem potencialmente fatais (Ferreira e Sousa 2000).

A candidose é uma das infecções mais frequentes, provocadas por leveduras do género *Candida*, sendo que *C. albicans* é o agente responsável pelo maior número de infecções, não só superficiais como sistémicas.

Candida sp, *Cryptococcus* sp e *Aspergillus* sp são a causa mais comum de infecções oportunistas (Pfaller and Diekema 2004)

Candidose

As Candidoses ocorrem com maior frequência em unidades de terapia intensiva, onde a incidência pode atingir valores entre os 3-5% (Giri and Kindo 2012) (Pfaller and Diekema 2004). *C. albicans* é a causa mais comum de micoses oportunistas em pacientes hospitalizados (Pfaller and Diekema 2004). O fato deste fungo fazer parte da flora comensal humana e apresentar vários fatores de virulência, pode justificar o aumento crescente de candidoses em pacientes imunocomprometidos (Odds, Davidson et al. 2006).

No entanto, a taxa de infecção por *Candida não-albicans* tem vindo a aumentar (Tortorano, Kibbler et al. 2006) e algumas espécies, como *C. krusei* e *C. glabrata* parecem ocupar um lugar de destaque entre estas infeções. *C. krusei* é responsável por 1-5% das candidoses, principalmente em pacientes com cancro e em pacientes que receberam tratamento antifúngico profilático (Pfaller and Diekema 2004). *C. glabrata* é mais comum em pessoas idosas e em pacientes com doenças malignas hematológicas (Pfaller and Diekema 2007, Giri and Kindo 2012). As candidoses provocadas por *C. glabrata* e *C. krusei*, além de serem as mais comuns, como já referido, são as mais comuns e difíceis de tratar devido à reduzida sensibilidade das leveduras aos antifúngicos comuns, nomeadamente ao fluconazol, resultando em elevadas taxas de mortalidade (Tortorano, Biraghi et al. 2002). Aliás, uma das principais razões explicativas para o surgimento destas resistências é o aumento do uso de fluconazol, especialmente em pacientes internados em unidades de cuidados intensivos (Pfaller and Diekema 2007, Giri and Kindo 2012)

C. parapsilosis tem vindo a ser identificada em hospitais pediátricos como a segunda maior causa de candidose na Europa, Ásia e América do sul (Santolaya, Alvarado et al. 2014). Esta levedura tem uma melhor adesão a materiais como acrílicos em soluções contendo glucose (Horn, Ostrosky-Zeichner et al. 2010, Giri and Kindo 2012).

Criptocose

A Criptococose é uma infeção fúngica que pode ser provocada por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* (Espinel-Ingroff, Chowdhary et al. 2012). Ambos pertencem ao filo basidiomicota e podem ser rapidamente distinguidos de outras leveduras patogénicas tais como *Candida* sp pela presença de uma cápsula de polissacárido. A patogenicidade da criptococose depende do sistema imunitário do hospedeiro bem como dos vários fatores de virulência da estirpe tais como cápsula, produção de melanina e crescimento a 37°C (Casadevall, Rosas et al. 2000).

A infeção ocorre através da inalação dos esporos e posterior disseminação por via hematogénea, dando origem a lesões no sistema nervoso central (SNC) incluindo aumento da pressão intracraniana, sequelas neurológicas graves, entre outras. A

criptococose ocorre especialmente em pacientes com alterações imunológicas graves, afetando até 10% os pacientes com SIDA (Rodrigues, Alviano et al. 1999).

Na maioria dos casos é recomendado o tratamento inicial com anfotericina B e 5-flucitosina. Embora vários agentes antifúngicos mais recentes estejam disponíveis, a formulação convencional desoxicolato de anfotericina B (especialmente em contextos de recursos limitados) e as suas formulações lipídicas permanecem escolhas terapêuticas importantes para o tratamento sistêmico destas infecções (Espinel-Ingroff, Chowdhary et al. 2012, Perfect and Bicanic 2014).

Aspergilose

A inalação de conídios de *Aspergillus* sp por indivíduos imunocompetentes raramente tem efeitos graves para a saúde, já que os conídios são eficazmente eliminados por mecanismos imunológicos. Espécies de *Aspergillus* podem ser encontradas no ar, alimentos, água, solo e vegetação em decomposição, onde desempenham um papel essencial no ciclo do carbono e nitrogênio (Latge 2001). A problemática destes fungos surgiu com o aumento de transplantes de órgãos, medula óssea e o aumento da utilização de drogas imunossupressoras. Nas últimas décadas a Aspergilose invasiva (AI) tem surgido como uma das principais complicações infecciosas em pacientes imunocomprometidos sendo que 90% dessas são provocadas por *A. fumigatus* (Dagenais and Keller 2009, Sales-Campos, Tonani et al. 2013). Este fungo filamentosos causa infecções a nível respiratório, como pneumonia crônica e aguda, aspergilose broncopulmonar alérgica e aspergilose invasiva que estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (Latge 2001, Dagenais and Keller 2009).

A virulência de *A. fumigatus* pode ser provocada quer pela produção de proteínas fúngicas que promovem o crescimento do micélio no parênquima pulmonar quer pelas características estruturais dos conídios que conferem resistência aos antifúngicos (Latge 2001). Para o tratamento da AI provocada por este fungo são administrados azóis, no entanto resistências a estes agentes antifúngicos tem surgido (Snelders, van der Lee et al. 2008).

1.2. Terapia antifúngica

No início dos anos 50, surgiram os primeiros antifúngicos sistêmicos (Figura 1). A anfotericina B, um composto do grupo dos polienos, foi um dos primeiros a ser utilizado, permanecendo até aos nossos dias como o antifúngico de eleição para o tratamento de infeções fúngicas sistêmicas, devido ao seu largo espectro de ação. Atuando por ligação ao ergosterol da membrana, é utilizado no tratamento de infeções fúngicas invasivas frequentemente associadas a espécies de *Candida* sp e *Aspergillus* sp, mas apresenta diversas limitações na aplicação clínica, como a elevada toxicidade a nível renal e a necessidade de administração endovenosa contínua (Odds, Davidson et al. 2006).

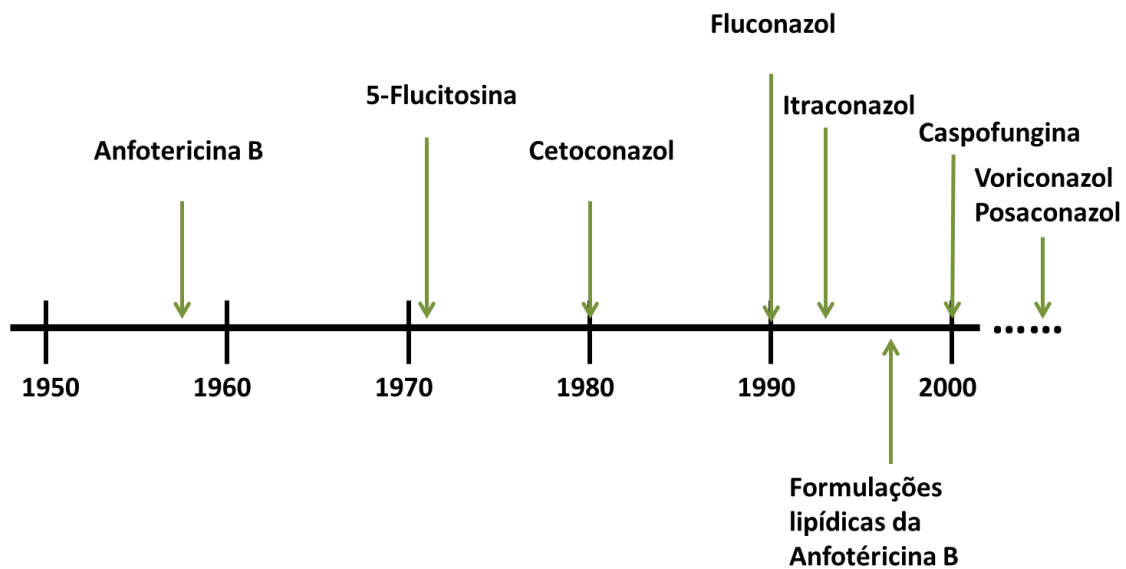


Figura 1 – Cronologia da introdução dos antifúngicos no mercado Adaptado de: McKinseym D. 2003)

O primeiro imidazol a ser introduzido na terapêutica foi o cetoconazol. Atuando por inibição da síntese do ergosterol, os imidazóis constituem um grupo de agentes fungistáticos com amplo espectro de ação. No entanto, muitos destes compostos apresentam elevada toxicidade, nomeadamente a nível hepático (Pfaller and Diekema 2007).

Na década de 90, foram identificadas as primeiras resistências aos antifúngicos, nomeadamente de espécies de *Candida não-albicans*, tais como *C. krusei* e *C. glabrata*, intrinsecamente resistentes ao fluconazol (Pfaller and Diekema 2007, Scodavolpe, Quaranta et al. 2014). Ao mesmo tempo, a introdução da primeira geração dos triazóis permitiu obviar alguns dos problemas associados ao imidazóis, como toxicidade e resistências.

Mas o progresso na área dos antifúngicos não se limitou à pesquisa de novas moléculas, mas também ao uso de formas farmacêuticas que pudessem melhorar a atividade terapêutica de alguns já existentes. Formulações novas de anfotericina B e com melhoria na toxicidade. Apesar da diminuição da toxicidade da anfotericina B, promovida pelas formações lipídica, o uso destas formulações não é generalizado devido ao seu elevado custo. Estas estratégias foram também já alargadas a antifúngicos de uso tópico como a terbinafina, com a sua associação a lipossomas (Ostrosky-Zeichner, Marr et al. 2003).

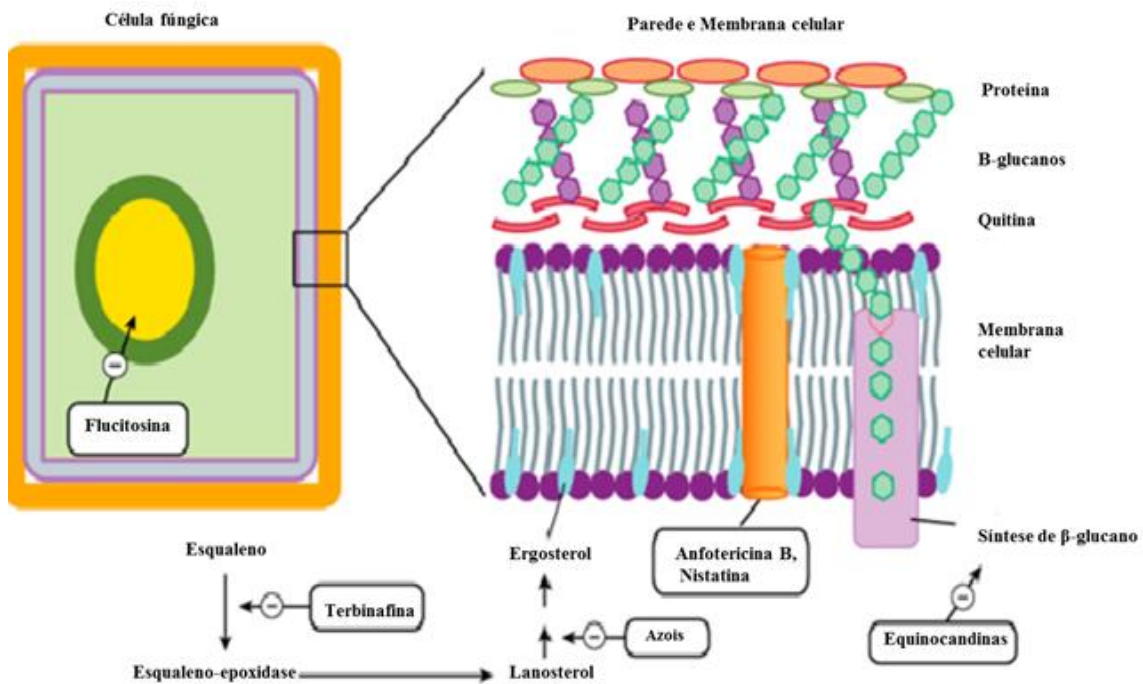


Figura 2 – Mecanismo de ação dos principais grupos de antifúngicos Adaptado de: www.accessmedicine.com

No ano 2000 foi introduzida uma nova classe de antifúngicos, as equinocandinas, que interferem com a síntese da parede do fungo. As três equinocandinas clinicamente importantes, caspofungina, micafungina e anidulafungina, apresentam boa atividade *in vitro* contra *Candida* sp e *Aspergillus* sp, mas não são ativas contra *C. neoformans* (Denning 2003, Boucher, Groll et al. 2004).

A caspofungina, o primeiro membro deste grupo a ser introduzido no mercado, apresenta baixa toxicidade, porque a sua ação é no complexo de proteínas responsáveis pela síntese de (1,3) - β -glucano componente específico da parede de celular fúngica. Apesar da sua eficácia ser comparável à da anfotericina B no tratamento de candidoses e aspergiloses, o seu reduzido espectro de ação limita o seu uso terapêutico (Denning 2003).

Voriconazol e posaconazol são compostos triazólicos de segunda geração com um amplo espectro de ação. O Voriconazole é ativo contra estipes de *Candida* sp resistentes ao fulconazol, embora a resistência cruzada já tivesse sido observada (Donnelly and De Pauw 2004). Posaconazole, é o azol com espectro de ação mais alargado desenvolvido até à data. A resistência cruzada com fluconazol é incomum, e o posaconazol é o único azol com atividade clínica demonstrada contra fungos do filo Zygomycota (Torres, Hachem et al. 2005).

Terapia antifúngica combinada

A terapia de combinação pode ser utilizada para o tratamento de infeções fúngicas, especialmente aquelas causadas por fungos resistentes a antifúngicos.

Recentemente estudos destacam que é possível obviar a resistência aos antifúngicos através da combinação de compostos não-antifúngicos tais como, antibacterianos, inibidores da calcineurina, inibidores das proteínas de choque térmico (Hsp) e reguladores da homeostasia do cálcio (Figura 3) (Cowen, Singh et al. 2009, Liu, Hou et al. 2014). Muitas destas combinações mostram ter um efeito sinérgico contra estirpes de *C. albicans* resistente ao fluconazol (Zhang, Liu et al. 2013). Os principais mecanismos destes efeitos parece ser o aumento da permeabilidade da membrana, reduzindo o efluxo de drogas antifúngicas, interferindo com a homeostasia intracelular de iões, inibição da atividade de proteínas e enzimas necessárias para a sobrevivência de

fungos e inibindo a formação de biofilme (Miceli, Bernardo et al. 2009, Liu, Hou et al. 2014).

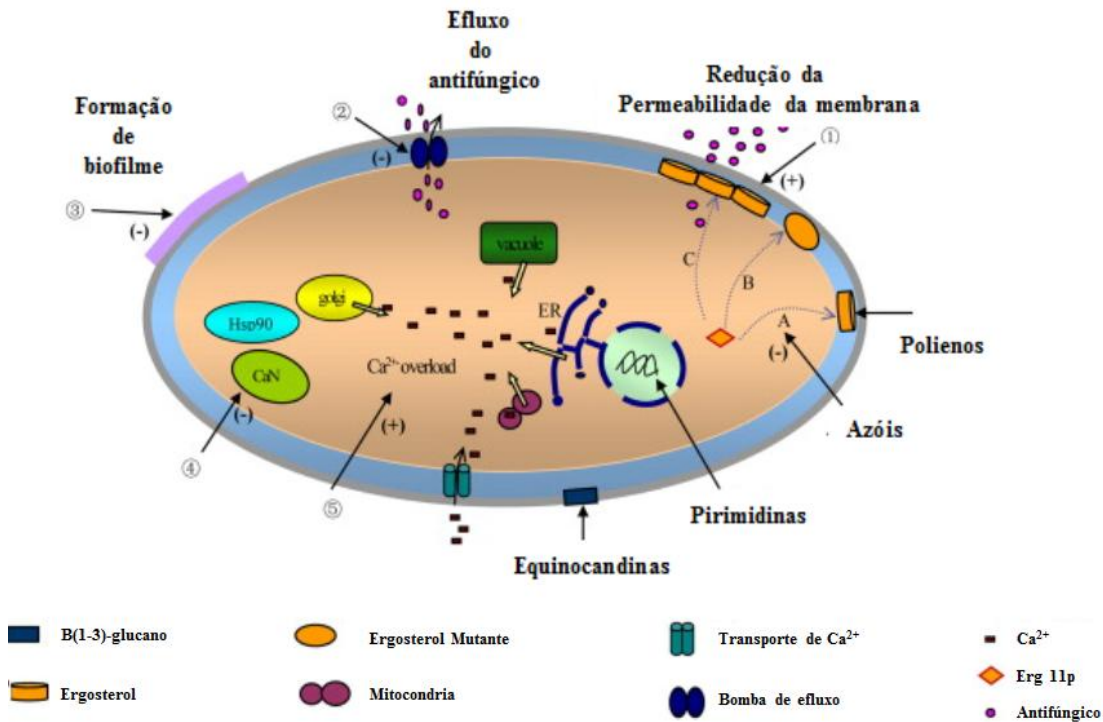


Figura 3 – Representação esquemática dos principais alvos dos agentes antifúngicos, mecanismos de resistência e abordagens de resistência antifúngica. A-C representam a via de síntese de ergosterol e mecanismos relacionados: (A) Gene normal *erg11p*; (B) Gene mutante *erg11p*; (C) Expressão do gene *erg11p*. 1-5 Representam as abordagens da resistência antifúngica e da resistência em combinação: (1) Aumento da permeabilidade da membrana; (2) Inibição do efluxo dos antifúngicos; (3) Inibição da formação de biofilme; (4) Inibição da calcineurina (CNA) e proteína de choque térmico 90 (Hsp90); (5) Perturbação da homeostasia do cálcio. ER, retículo endoplasmático. Adaptado (Liu, Hou et al. 2014).

Antifúngicos em combinação com agentes antibacterianos

Em pacientes com longos períodos de internamento, tratados com terapia imunossupressora é frequente encontrar infecções fúngicas profundas, acompanhadas com infecções bacterianas, aumentando a probabilidade dos antifúngicos serem utilizados em combinação com agentes antibacterianos (Liu, Hou et al. 2014).

Estudos mostraram que quando é administrado um antibacteriano em combinação com um antifúngico a que a estirpe causadora da infecção é resistente, um efeito sinérgico é

observado, exemplo disso é a combinação da minociclina com fluconazol no tratamento de infecções provocadas por *C.albicans* resistente aqueleazol (Shi, Chen et al. 2010).

Antifúngicos em combinação com inibidores da calcineurina

A calcineurina (CNA) é uma enzima responsável pela ativação da transcrição da interleucina – 2 (IL-2) que estimula o crescimento e diferenciação das células T. Os imunossuppressores, como a ciclosporina A ou o FK506, inibem a CNA, bloqueando a ativação das células T. Podem por isso ser usados para evitar a rejeição de transplantes em indivíduos recetores de órgãos (Cruz, Goldstein et al. 2002).

Recentemente foi revelado que a CNA é um fator de virulência de *C. albicans* bloqueando a capacidade dos azóis danificarem a membrana plasmática. Assim, ao administrar um imunossupressor este vai bloquear a CNA, permitindo uma melhor penetração do antifúngico azólico na célula (Sanglard, Ischer et al. 2003) . Por outro lado, a via da CNA está diretamente relacionada com o crescimento e patogenicidade de *C. neoformans*, *C. albicans* e *A. fumigatus*. Assim sendo, a exploração de vias CNA fúngicas é uma grande promessa para o futuro desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (Steinbach, Reedy et al. 2007).

Antifúngicos em combinação com inibidores Hsp90

A interferência com reguladores celulares envolvidos na resposta do fungo a condições de stress constitui uma estratégia atual para melhorar a eficácia dos antifúngicos.

A Hsp90 é um regulador celular, importante na resposta ao stresse de diversas espécies de fungos dado estar envolvida em variados processos como a formação de biofilme, apoptose da célula fúngica, ou resistência aos antifúngicos (Cowen, Singh et al. 2009).

A estratégia terapêutica baseada na inibição da Hsp90 pode permitir anular as respostas de stress fúngico fazendo com que o efeito dos compostos passe de fungistático a fungicida (Cowen, Singh et al. 2009, Liu, Hou et al. 2014).

Antifúngicos em combinação com reguladores da homeostasia do cálcio

O íon cálcio (Ca^{2+}) está envolvido numa série de processos biológicos incluindo o crescimento celular, proliferação, apoptose, entre outros (Courchesne and Ozturk 2003). O aumento contínuo da concentração de Ca^{2+} pode ser nocivo para as células, provocando morte celular (Liu, Hou et al. 2014). Nos últimos anos proteínas tais como a lactoferrina humana e proteínas derivadas da histamina, mostraram ter efeitos antifúngicos relacionados com a libertação de Ca^{2+} intracelular muito provavelmente através da mitocôndria (Courchesne and Ozturk 2003).

A amiodarona (AMD) é um composto que afeta a homeostasia do Ca^{2+} em leveduras e provoca a morte celular após exposição curta. Baixas concentrações de AMD pode provocar uma hiperpolaridade, o que faz com que o Ca^{2+} seja libertado de reservas internas incluindo o retículo endoplasmático, mitocondrial e vacúolos (Courchesne and Ozturk 2003).

Estudos recentes confirmam que apesar da AMD ter fraca actividade antifúngica, exibiu efeitos sinérgicos com o fluconazol. O tratamento com fluconazol combinado com AMD induz alterações na membrana citoplasmática e mitocondrial, aumentando os níveis de formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelularmente, provocando danos ao DNA e, conseqüentemente, conduzindo à morte celular por apoptose (Guo, Sun et al. 2008).

Antifúngicos em combinação com anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) são um grupo que inclui vários fármacos que têm a capacidade de controlar a inflamação através da inibição da síntese de prostaglandinas (Liu, Hou et al. 2014).

Alguns estudos referem que *C. albicans* produz prostaglandinas durante a formação do biofilme aumentando a formação dos tubos germinativos, sendo atualmente consideradas importantes factores de virulência na infeção por *C. albicans* (Alem and Douglas 2005). Vários autores reportaram o efeito dos anti-inflamatórios na multiplicação dos fungos (Liu, Hou et al. 2014). Exemplo disso é o efeito inibidor na produção de biofilmes do ácido salicílico (Alem and Douglas 2004) e o efeito sinérgico observado in vitro entre o ibuprofeno e o fluconazol contra estirpes resistentes a este antifúngico (Arai, Sugita et al. 2005).

1.3. Infecções associadas a biomateriais

Infecções relacionadas com dispositivos médicos estão na maioria das vezes associados a doenças nosocomiais. Os organismos que colonizam estes materiais são normalmente comensais oportunistas que mais facilmente acedem a esses materiais durante o procedimento clínico (Ramage, Martinez et al. 2006).

O processo de adesão destes microrganismos, entre eles *Candida* sp, é influenciado por propriedades físico-químicas dos materiais, nomeadamente a hidrofobicidade, rugosidade e composição química das superfícies, entre outros. Além disso, fatores ambientais como as características e fluxo dos fluidos corporais, tempo de exposição e/ou concentração dos microrganismos, pode condicionar o processo de adesão (An and Friedman 1998, Katsikogianni and Missirlis 2004)

1.3.1 Produção de biofilmes

Uma ampla variedade de biomateriais (cateteres, próteses) utilizados na prática clínica favorecem a adesão microbiana e formação de biofilme por um diverso número de microrganismos (Douglas 2003).

Candida sp com frequência forma biofilmes, um processo pelo qual as células de levedura aderem a uma superfície biótica ou abiótica, resultando na formação de um complexo de células, filamentos e matriz (Kojic and Darouiche 2004). O processo de formação do biofilme (Figura 4) inicia-se com a adesão de células de levedura à superfície do biomaterial, seguido de divisão celular, proliferação e desenvolvimento. O biofilme maduro contém microcolónias, que estão intercetadas por canais de água que permitem a circulação de nutrientes e remoção de metabolitos celulares. Uma característica particular dos biofilmes formados por *C albicans* é a sua estrutura tridimensional complexa que consiste numa rede densa de células sob a forma de leveduras, pseudo hifas e hifas, que estão unidas dentro de uma matriz exopolimérica (Blankenship and Mitchell 2006). No final do processo de maturação, o biofilme acaba por atingir uma massa crítica e é estabelecido um equilíbrio dinâmico no qual o crescimento de células é compensado pela libertação de células de levedura, ficando estas disponíveis para colonizar outros locais do biomaterial ou originar septicemia (Pfaller and Diekema 2007).

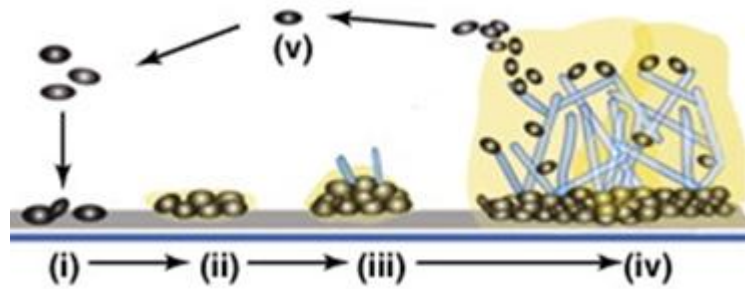


Figura 4 – Fases da formação do biofilme de *C. albicans*.

(i) Adesão de células de levedura à superfície do dispositivo (ii) Proliferação celular (iii) Produção de matriz e dimorfismo celular (levedura, pseudo hifas e hifas), (iv) Aumento da matriz com uma arquitetura tridimensional (v) Liberação de leveduras Adaptado de (Harding, Marques et al. 2009).

Uma das características mais importantes do crescimento em biofilme é a elevada resistência das leveduras aos agentes antifúngicos atualmente usados no combate às infecções fúngicas, podendo essa resistência ser até mil vezes maior do que a de células não aderidas (Tobudic, Kratzer et al. 2012).

Estudos revelaram que os agentes antifúngicos, 5-flucitosina, anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol foram muito menos ativos contra biofilmes de *C. albicans* em materiais de cloreto de polivinil (PVC) do que em células não aderidas (Kojic and Darouiche 2004). Da mesma forma, e em estudos *in vitro*, espécies de *Candida não-albicans* mostraram resistência aos triazóis mais recentes quando presentes em biofilmes (Kuhn, George et al. 2002). No entanto, a caspofungina demonstrou ser eficaz contra a formação de biofilme por *C. albicans* (Ramage, VandeWalle et al. 2002).

A resistência aos antifúngicos por parte dos fungos presentes num biofilme é um processo multifatorial que pode estar associado a vários fatores, nomeadamente a expressão de bombas de efluxo induzida pela superfície do material (Jabra-Rizk, Falkler et al. 2004), alteração na composição do esterol (Mukherjee and Chandra 2004), dificuldade na difusão dos agentes antifúngicos através da matriz extracelular e crescimento lento dos microrganismos no biofilme (Seneviratne, Jin et al. 2008, Inigo, Peman et al. 2012).

C. albicans mostrou formar biofilmes com diferentes morfologias dependendo do dispositivo médico usado (Kojic and Darouiche 2004, Sudbery, Gow et al. 2004).

A hidroxiapatite (HA) é um fosfato de cálcio sintético que se inclui no grupo dos biocerâmicos, tem sido amplamente usado na prática clínica devido à sua semelhança química com o componente inorgânico dos tecidos duros. A sua excelente biocompatibilidade faz com que seja utilizada numa variedade de aplicações incluindo o preenchimento de defeitos ósseos ou fraturas, reconstrução crânio maxilofacial e revestimento de implantes metálicos (Ferraz, Monteiro et al. 2004)

Nestas situações a HA atua como suporte promovendo a regeneração e osteointegração das cavidades ou dos defeitos com um novo tecido. (Christenson, Anseth et al. 2007, Mateus, Barrias et al. 2008). Comparativamente com a HA convencional, a nanoHA apresenta propriedade físico-químicas semelhantes à dos nano cristais do osso, resultando numa forte ligação na interfase osso/implante bem como na absorção de macromoléculas que podem atuar durante o processo de regeneração óssea (Ferraz, Monteiro et al. 2004).

Apesar de o risco de infeção por *Candida* sp em próteses do joelho ser inferior a 1%, o tratamento destas infeções está dificultado devido à formação do biofilme, estrutura esta que, como acima mencionado, confere resistência aos antifúngicos atualmente usados e, por consequência, o tratamento implica a remoção da prótese para erradicação da infeção (Kojic and Darouiche 2004, Inigo, Peman et al. 2012). Contudo esta abordagem acarreta elevadas implicações clínicas e económicas e, neste sentido, há uma necessidade de desenvolver novos agentes antifúngicos que possam atuar eficazmente nestas patologias clínicas

Objetivos:

A pesquisa de compostos antifúngicos que possam constituir alternativas à terapêutica atual, constitui uma importante área de investigação.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivos principais:

- i) Estudar a atividade antimicrobiana de derivados da 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona;
 - a) Avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana dos compostos
 - b) Estabelecer uma relação estrutura-atividade para o grupo de compostos estudados
 - c) Selecionar os compostos que, relativamente aos parâmetros da atividade antimicrobiana em estudo, permitam encontrar um (ou mais) composto(s) líder
- ii) Elucidar o mecanismo de ação antifúngica dos compostos mais potentes
 - a) Estudar o mecanismo de ação dos compostos na célula fúngica
 - b) Avaliar a interferência dos compostos no sistema imune
- iii) Avaliar a interferência dos compostos líder na formação de biofilmes por leveduras.

TRABALHO EXPERIMENTAL I

“Synthesis and antimicrobial activity of novel 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones”

I.1. Material e métodos

Reagentes

O Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Mueller Hinton Broth (MHII) e o Agar Bacteriológico foram adquiridos da Liofilchem. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Applichem. Todos os outros reagentes foram da Sigma-Aldrich..

Preparação dos compostos derivados da 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazonas

Os compostos foram sintetizados e fornecidos pelo Centro de química da Escola de Ciências da Universidade do Minho. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO para obter uma concentração de 10mg/ml, solução stock foram mantidas a -20°C até à realização dos ensaios.

Bactérias

As bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomona aeruginosa* ATCC.27853 fazem parte da coleção de microrganismos do CEBIMED da UFP. As bactérias foram guardadas a -70°C e antes de cada ensaio foram descongeladas e repicadas para o MHII agar, tendo-se sempre usado culturas com 24h de crescimento para cada ensaio.

Atividade antibacteriana

A concentração mínima inibitória (CMI) foi efetuada utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com a norma CLSI M7-A6. As soluções stock dos compostos foram diluídas em meio de MHII de modo a obter concentrações seriadas de (1:2;100µg/mL até 1,6µg/mL). A concentração das bactérias foi ajustada de forma a que cada poço tivesse 1×10^4 - 5×10^4 UFCs/mL de meio de cultura. Após a adição do composto ao microrganismo as placas foram incubadas a 37°C durante 24h, procedendo-se à leitura visual dos resultados. Foram ainda incluídos em todas as experiências os seguintes controlos: bactéria em meio de cultura (100% de crescimento), meio de cultura (0% de crescimento) e composto em meio de cultura (branco do composto). Como controlo de qualidade utilizou-se *E. coli* ATCC 25922 com CMI 0.25 a 2.0 µg/ml para gentamicina durante 24 h incubação.

A CMI foi definida como a concentração mais baixa em que não se obteve crescimento microbiano por detecção visual.

Avaliação do efeito bactericida/bacteriostático para as bactérias

A determinação da concentração mínima letal (CML) foi baseada na técnica descrita por Canto *et al*, 2003. Concisamente, após a leitura da CMI, o conteúdo dos poços, foi homogeneizado e retiraram-se 25µL da suspensão celular que foram inoculados numa placa de MHII agar. A placa foi incubada a 37°C durante 24h. A CML foi definida como a concentração em que não houve crescimento, por detecção visual.

Leveduras

As Leveduras *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 2209 fazem parte da coleção de microorganismos do CEBIMED da UFP. *Cryptococcus neoformans* e fungos filamentosos, foram gentilmente cedidos pela Professora Doutora Eugénia Pinto da FFUP. As leveduras foram guardadas a -70°C e antes de cada ensaio foram descongeladas e repicadas para os respectivos meios de cultura, tendo-se sempre usado culturas com 24h de crescimento para cada ensaio.

Avaliação da atividade antifúngica

A CMI foi efetuada utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com a norma CLSI M27-A3. As soluções stock dos compostos foram diluídas em RPMI de modo a obter concentrações seriadas (1:2;100µg/mL até 1,6µg/mL). A concentração dos microrganismos foi ajustada para que cada poço tivesse 5×10^2 - 2.5×10^3 UFCs/mL de meio de cultura. Após a adição do composto à suspensão da levedura as placas foram incubadas a 35°C durante 48h, *cryptococcus* procedendo-se a leitura visual dos resultados. Foram ainda incluídos em todas as experiências os seguintes controlos: levedura em meio de cultura (100% de crescimento), meio de cultura (0% de crescimento) e composto em meio de cultura (branco do composto). Como controlo de qualidade foram utilizadas, *C. parapsilosis* ATCC 90018 com CMI 1 a 4 µg/mL com fluconazol com 48 horas de incubação e *C. krusei* ATCC 6258 com um CMI 0,25 a 1 µg/mL cetoconazol para o com 48 horas de incubação. Em todos os ensaios foram ainda

incluídos diferentes concentrações de DMSO comparando o nível de toxicidade com o composto a avaliar.

A CMI foi definida como a concentração mais baixa em que não se obteve crescimento microbiano por deteção visual.

Avaliação do efeito fungicida / fungistático

A determinação da concentração mínima letal (CML) foi baseada na técnica descrita por Canton, Peman et al. 2003 . Concisamente, após a leitura da CMI, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e retiraram-se 25µL da suspensão celular que foram inoculados numa placa de SDA. Posteriormente incubou-se a 35°C durante 24h. A CML foi definida como a concentração em que não houve crescimento, por deteção visual.

Atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos compostos foi testada por recurso a uma versão modificada da técnica descrita por Ahmad *et al* (2009). O isolamento de eritrócitos proveniente de sangue periférico de voluntários saudáveis efetuou-se recorrendo ao histopaque - 1077 mediante as instruções do fabricante. Ao sedimento de eritrócitos adicionou-se PBS (10%; v/v) a que se seguiu uma diluição de 1:10. Para um volume final de 200µL foram adicionados 100µL de suspensão de eritrócitos e 100µL da concentração de composto a uma placa de fundo em “U”. Para controlo positivo usou-se 5µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio/dimetilformamida (SDS/DMF; 20% SDS numa solução de DMF a 50% em água desionizada, pH 4.7). A placa foi incubada durante 1h a 37°C seguindo-se uma centrifugação (labofugar 400R - Heraeus) a 2000rpm durante 10min. Foram retirados 150µL de sobrenadante para uma placa de fundo plano e efetuada a leitura da densidade ótica a 450nm num espectrofotómetro de placas (Stat Fax 3200 – Awareness technology INC) Foi ainda incluído um controlo de DMSO para excluir o possível efeito deste nos eritrócitos. A atividade hemolítica (%) foi calculada segundo a fórmula: % de atividade hemolítica = $100 \times (\text{média } DO_{450} \text{ dos eritrócitos tratados com o composto} - DO_{450} \text{ do composto em meio de cultura}) / (\text{média da } DO_{450} \text{ dos eritrócitos tratados com SDS/DMF} - \text{média da } DO_{450} \text{ do meio de cultura com SDS/DMF})$. Neste ensaio foram inseridos os controlos; eritrócitos tratados com SDS/DMF (100% de

hemólise), eritrócitos tratados com PBS (0% de hemólise), as várias diluições do composto em PBS (branco do composto) e PBS (branco de controlo).

I.2.Resultados e discussão

BMC Letters (2014), 24(19): 4699-4702



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and antimicrobial activity of novel 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones



Ana I. Ribeiro^{a,†}, Carla Gabriel^{b,†}, Fátima Cerqueira^{b,c,*}, Marta Maia^{c,d}, Eugénia Pinto^{c,d}, João Carlos Sousa^b, Rui Medeiros^{b,e}, M. Fernanda Proença^a, Alice M. Dias^{a,*}

^a Centre of Chemistry, Department of Chemistry, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

^b FP-ENAS/CEBIMED, University Fernando Pessoa, 4200-150 Porto, Portugal

^c CEQUIMED/Laboratory of Microbiology, Biological Sciences Department, Faculty of Pharmacy of University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal

^d Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research (CIIMAR/CIMAR), University of Porto, 4050-123 Porto, Portugal

^e Molecular Oncology GRP and Molecular Biology Laboratory–Virology Service, Portuguese Institute of Oncology (IPO), 4200-072 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2014

Revised 7 August 2014

Accepted 8 August 2014

Available online 17 August 2014

Keywords:

Imidazole

Amidrazone

Hydrazine

Antimicrobial

Antifungal

ABSTRACT

A mild and simple method was developed to prepare a series of fifteen 5-aminoimidazole 4-carboxamidrazones, starting from the easily accessible 5-amino-4-cyanoformimidoyl imidazoles. The antimicrobial activity of these novel amidrazones was screened against Gram positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria and *Candida* sp. (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*). Only a subset of compounds displayed fair-moderate activity against *S. aureus* and *E. coli* but all exhibited activity against *Candida* sp. The three most potent antifungal compounds were further tested against *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and three dermatophytes (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*). These three hit compounds strongly inhibited *C. krusei* and *C. neoformans* growth, although their activity on filamentous fungi was very weak when compared to the activity on yeasts.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The antimicrobial therapy has long been facing the problem of resistance of microorganisms. Multidrug resistance by bacterial strains, as MRSA, VRSA, ESBL or carbapenemases producing bacteria claims for the search of new antibacterial molecules.¹ Systemic mycosis, as those due to *Aspergillus* sp., *Cryptococcus neoformans* and *Candida* sp., are responsible for the growing morbidity and mortality rates, namely among immunocompromised individuals, and have important economic impacts in health care institutions.^{2,3} Although not so virulent, superficial mycosis, as mucocutaneous candidiasis or dermatophytosis, also have a great clinical relevance being responsible for the majority of ambulatory antifungal therapy.⁴

Nowadays, antifungal treatment is also facing new challenges with the development of resistance by fungi.⁴ Available antifungal compounds are scarce and even with the introduction of new molecules, as new triazoles and echinocandins, the restricted spectrum

of action, toxicity, extensive side effects and drug interactions, force the scientific community to search for new therapeutic options.^{2–5}

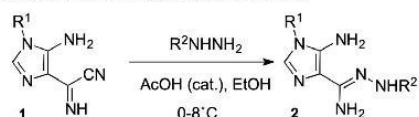
The imidazole nucleus is present in a significant number of biomolecules and the inclusion of this moiety in organic scaffolds is considered an important synthetic strategy in drug discovery.^{6,7} In the last decades, the wide pharmacological potential of the imidazole derivatives is well demonstrated by the increasing number of the reported bioactivities. In particular, potential therapeutic applications such as anti-fungal and anti-bacterial,^{8a,b} anti-inflammatory and analgesic,^{8c} anti-tubercular,^{8d} anti-depressant,^{8e} anti-cancer,^{8f} anti-viral,^{8g} anti-leishmanial,^{8h} and anti-epileptic,⁸ⁱ have been extensively reported.

Imidazoles, being a class ofazole antifungals, are excellent scaffolds for the development of new therapeutic antifungal alternatives.⁹ The first orally bioavailable and broad spectrum imidazole was Ketoconazole, but has been now replaced due to severe adverse side effects. From the search on 1-substituted imidazole analogues with lower toxicity and selectivity, several lead compounds were discovered and are under development.^{5,9} Recently, limited examples of C-linked imidazoles emerge as a novel class of antifungal imidazoles.¹⁰

* Corresponding authors. Tel.: +351 225074630 (F.C.); tel.: +351 253604371; fax: +351 253 604382 (A.M.D.).

E-mail addresses: fatimaf@ufp.edu.pt (F. Cerqueira), ad@quimica.uminho.pt (A.M. Dias).

[†] The two authors had the same contribution for the work.

Table 1
Synthesis of 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones **2**

Entry	R ¹	R ²	Method	Time	Product	Yield ^a
1	Ar(<i>p</i>)OMe	Ph	A	17h	2a	65
2	Ar(<i>p</i>)Me	Ph	A	6h	2b	80
3	Ar(<i>p</i>)F	Ph	A	6h	2c	48
4	Ar(<i>p</i>)Cl	Ph	A	6h	2d	74
5	Ar(<i>p</i>)Br	Ph	A	7h	2e	70
6	Ph	Ph	A	8h	2f	77
7	CH ₂ Ph	Ph	A	8h	2g	53
8	Me	Ph	A	5h	2h	71
9	(CH ₃) ₂ CH	Ph	A	6h	2i	37
10	Ar(<i>p</i>)OMe	Ar(<i>p</i>)F	B	3h	2j	45
11	Me	Ar(<i>p</i>)F	B	3h	2k	37
12	Me	Ar(<i>m</i>)F	B	2h	2l	23
13	Me	Ar(<i>p</i>)OMe	B	2h	2m	28
14	Me	Ar(<i>p</i>)CF ₃	A	6h	2n	53
15	Me	C ₅ H ₄ N	A	3h	2o	97

Method A: hydrazine (1.2–1.5 equiv), AcOH (cat.), EtOH, 0 °C to 8 °C.

Method B: (i) Na₂CO₃ (1.2–1.5 equiv), EtOH/H₂O; (ii) hydrazine (1.2–1.5 equiv), AcOH (cat.), EtOH, 0 °C to 8 °C.^a Isolated yield.

Moreover, amidrazones are important pharmacophoric fragments in fungistatic, bacteriostatic and antimycotic molecules.¹¹ These functional groups are traditionally obtained from nitriles and hydrazines, but the reaction suffers from several drawbacks and milder and more efficient synthetic routes are still needed.¹²

5-Aminoimidazoles are interesting building blocks in medicinal chemistry since they are key components in many bioactive molecules. Nevertheless few reports on the chemistry of these compounds have appeared in the literature.¹³ In particular, reports on the synthesis of 5-amino-4-substituted imidazoles are quite rare and involve multi-step low yield processes.¹⁴

In our research group, 5-aminoimidazoles **1** have been the subject of an extensive study as key precursors for the synthesis of new heterocyclic compounds.^{15–17} Here, a novel and mild preparation of 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones (**2**) is reported.

The in vitro antibacterial and antifungal profiles of these new prepared compounds were evaluated and will be described.

Imidazoles **1** were obtained in a three-step process starting from diaminomaleonitrile and accessible commercial reagents, according to a previously developed method.¹⁸ Reaction of imidazoles **1** with aryl hydrazines in acidic medium enabled the synthesis of amidrazones **2a–o** (Table 1), as an extension of a recently reported work.^{19,20}

The selective synthesis of the desired products **2a–i** from reaction of imidazoles **1** with phenyl hydrazine required the presence of a catalytic amount of acetic acid (AcOH) in ethanol (Table 1, method A).

These reactions were reproduced with different aryl hydrazines in order to introduce structural diversity at the hydrazone moiety. Reactions with 4-trifluoromethylhydrazine and 2-hydrazinopyridine could be achieved by the same method (Table 1, method A). Reactions with 4-methoxyphenylhydrazine, 4-fluorophenylhydrazine and 3-fluorophenylhydrazine required a previous neutralization in situ with sodium carbonate in a mixture of ethanol and water, as the reagents are commercially available as the hydrochloride salt (Table 1, method B).

All the products precipitated out of the reaction mixtures and were isolated by filtration in moderate–very good yields, with no need for further purification.

The assignment of structures **2a–o** to the isolated products was well established on the basis of elemental analysis or high-resolution mass spectrometry (HRMS), IR and NMR spectroscopy (including HMQC and HMBC techniques). The *Z* configuration of the amidrazone unity could be assigned by NOE NMR experiments.

Compounds **2a–o** were examined for their antimicrobial activities against Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC29213) and Gram negative (*Escherichia coli* ATCC25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) bacterial strains and three *Candida* strains (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC6258 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019) according to the reference method for susceptibility testing of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).^{21,22} Minimum inhibitory concentrations (MICs) obtained for the screened compounds **2a–o** are listed in Table 2.

Considering the antibacterial activity, the results demonstrate that compounds **2b**, **2d** and **2n** were slightly active against *E. coli* and *S. aureus*, with **2n** showing the higher antibacterial activity [MIC = 25.0 µg/mL (83.8 µM)]. The other tested compounds had

Table 2
Antibacterial and antifungal activity (MIC, minimal inhibitory concentration) of imidazoles **2**

Entry	Compd	MIC µg/mL (µM) ^a					
		<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>C. krusei</i> ATCC6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
1	2a	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	25.0 (77.6)	>100.0 (>269.4)
2	2b	50.0–100.0 (163.2–326.4)	100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	100.0 (>269.4)	25.0–50.0 (81.6–163.2)	100.0 (>269.4)
3	2c	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	25.0 (80.6)	≥ 100.0 (>269.4)
4	2d	50.0 (153.0)	100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	100.0 (>269.4)	25.0 (76.5)	100.0 (>269.4)
5	2e	100.0 (269.4)	≥ 100.0 (≥ 269.4)	>100.0 (>269.4)	100.0 (>269.4)	50.0–100.0 (134.7–269.4)	100.0 (269.4)
6	2f	≥ 100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	12.5–25.0 (42.8–85.5)	100.0 (>269.4)
7	2g	100.0 (>269.4)	≥ 100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	25.0–50.0 (81.6–163.2)	>100.0 (>269.4)
8	2h	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	25.0–50.0 (108.6–217.1)	6.3 (27.4)	25.0 (108.6)
9	2i	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	12.5–25.0 (48.4–96.8)	100.0 (>269.4)
10	2j	100.0 (>269.4)	50.0 (146.9)	>100.0 (>269.4)	100.0 (>269.4)	50.0 (146.9)	50.0 (146.9)
11	2k	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	50.0 (201.4)	6.3 (25.4)	50.0 (201.4)
12	2l	100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	25.0 (100.7)	3.1 (12.5)	12.5 (50.4)
13	2m	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	100.0 (>269.4)	25.0 (96.0)	100.0 (>269.4)
14	2n	25.0 (83.8)	25.0 (83.8)	>100.0 (>269.4)	100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	100.0 (>269.4)
15	2o	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)	>100.0 (>269.4)

^a Results are obtained from at least 2 to 3 independent experiments performed in duplicate.

Technology (FCT, Portugal) for financial support through the portuguese NMR network (PTNMR, Bruker Avance III 400-Univ. Minho) and FCT and European Fund for Regional Development (FEDER)-COMPETE-QREN-EU for financial support through the research projects PEst-C/QUI/UI0686/2013 and CEQUIMED-Pest-OE/SAU/UI4040/2014.

Supplementary data

Supplementary data (synthetic and biological methods and chemical characterization) associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.08.025>. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

References and notes

- Kunin, C. M.; Ellis, W. Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 848.
- Cannon, R. D.; Lamping, E.; Holmes, A. R.; Niimi, K.; Baret, P. V.; Keniya, M. V.; Tanabe, K.; Niimi, M.; Goffeau, A.; Monk, B. C. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 291.
- Pappas, P. G.; Kauffman, C. A.; Andes, D.; Benjamin, D. K., Jr.; Calandra, T. F.; Edwards, J. E., Jr.; Filler, S. G.; Fisher, J. F.; Kullberg, B.-J.; Zeichner, L. O.; Reboli, A. C.; Rex, J. H.; Walsh, T. J.; Sobe, J. D. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 503.
- Achkar, J. M.; Fries, B. C. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 253.
- Kathiravana, M. K.; Salake, A. B.; Chothe, A. S.; Dudhe, P. B.; Watodea, R. P.; Muktaa, M. S.; Gadhwea, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 5678.
- De Luca, L. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1.
- Zhang, L.; Peng, X.-M.; Damu, G. L. V.; Geng, R.-X.; Zhou, C.-H. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34*, 340.
- (a) La Regina, G.; D'Auria, F. D.; Tafi, A.; Piscitelli, F.; Olla, S.; Caporuscio, F.; Nencioni, L.; Cirilli, R.; La Torre, F.; De Melo, N. R.; Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Artico, M.; Botta, M.; Palamara, A. T.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3841; (b) Al-Qawasmeh, R. A.; Huesca, M.; Nedunuri, V.; Peralta, R.; Wright, J.; Lee, Y.; Young, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3518; (c) Zampieri, D.; Mamolo, M. G.; Vio, L.; Banfi, E.; Scialino, G.; Fermeglia, M.; Ferrone, M.; Pricl, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7444; (d) Gising, J.; Nilsson, M. T.; Odell, L. R.; Yahiaoui, S.; Lindh, M.; Iyer, H.; Sinha, A. M.; Srinivasa, B. R.; Larhed, M.; Mowbray, S. L.; Karlén, A. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2894; (e) Puratchikodya, A.; Doble, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *1083*, 15; (f) Selig, R.; Goettert, M.; Schattel, V.; Schollmeyer, D.; Albrecht, W.; Laufer, S. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8429; (g) Gupta, P.; Hameed, S.; Jain, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 805; (h) Pandey, J.; Tiwari, V. K.; Varma, S. S.; Chaturvedi, V.; Bhatnagar, S.; Sinha, S.; Gaiwad, A. N.; Tripathi, R. P. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3350; (i) Mishra, R.; Ganguly, S. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 3929.
- Peng, X. M.; Cai, G. X.; Zhou, C. H. *Curr. Top. Med. Chem.* **1963**, *2013*, 13.
- (a) Saha, A. K.; Liu, L.; Simoneaux, R. L.; Kukla, M. J.; Marichal, P.; Odds, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2175; (b) Dawane, B. S.; Konda, S. G.; Mandawad, G. G.; Shaikh, B. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 387; (c) Yang, W.-C.; Li, J.; Li, J.; Chen, Q.; Yang, G.-F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1455; (d) Yurttas, L.; Duran, M.; Demirayak, S.; Gencer, H. K.; Tunali, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6764.
- (a) Modzelewska-Banachiewicz, B.; Matysiak, J.; Niewiadomy, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 75; (b) Abdel-Aziz, H. A.; Mekawey, A. A. I. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4985.
- Katritzky, A. R.; Khashab, N. M.; Kirichenko, N.; Singh, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9051.
- Soh, C. H.; Chui, W. K.; Lam, Y. J. *Comb. Chem.* **2006**, *8*, 464.
- (a) Kadir, K.; Shaw, G.; Wright, D. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1980**, 2728; (b) McLaughlin, M.; Mohareb, R. M.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 50.
- Dias, A. M.; Cabral, I. M.; Proença, M. F.; Booth, B. L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5546.
- Dias, A. M.; Cabral, I. M.; Vila-Chã, A. S.; Cunha, D.; Senhorães, N.; Nobre, S.; Sousa, C.; Proença, M. F. *Synlett* **2010**, 2792.
- Senhorães, N.; Dias, A. M.; Conde, L. M.; Proença, M. F. *Synlett* **2011**, 181.
- Alves, M. J.; Booth, B. L.; Proença, M. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 1705.
- Dias, A. M.; Vila-Chã, A. S.; Costa, A. L.; Cunha, D. P.; Senhorães, N.; Proença, M. F. *Synlett* **2011**, 2675.
- Senhorães, N.; Costa, A. L.; Silva, D. I.; Proença, M. F.; Dias, A. M. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 10014.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard, 3rd ed; CLSI document M27-A3. CLSI: Wayne, PA, 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, 2nd ed. CLSI document M38-A2; CLSI: Wayne, PA, 2008.
- Ahmad, A.; Khan, A.; Manzoor, N.; Khan, L. A. *Microb. Pathog.* **2010**, *48*, 35.

I.3. Material suplementar

BMC Letters (2014), 24(19): 4699-4702

Synthesis and antimicrobial activity of novel 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones

Ana I. Ribeiro^a, Carla Gabriel^b, Fátima Cerqueira^{b,c*}, Marta Maia^{c,d}, Eugénia Pinto^{c,d}, João Carlos Sousa^b, Rui Medeiros^{b,e}, M. Fernanda Proença^a and Alice M. Dias^{a*}

^a Centre of Chemistry, Department of Chemistry, University of Minho, Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal

^b FP-ENAS/CEBIMED, University Fernando Pessoa, 4200-150 Porto, Portugal

^c CEQUIMED/Laboratory of Microbiology, Biological Sciences Department, Faculty of Pharmacy of University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal

^d Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research (CIIMAR/CIMAR), University of Porto, 4050-123 Porto, Portugal

^e Molecular Oncology GRP and Molecular Biology Laboratory –Virology Service, Portuguese Institute of Oncology (IPO), 4200-072 Porto, Portugal

ad@quimica.uminho.pt, fatimaf@ufp.edu.pt

Experimental section

1. Chemistry

1.1. General

All compounds were fully characterized by elemental analysis and spectroscopic data. The NMR spectra were recorded at room temperature, on a Varian Unity Plus (¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz) or Bruker Avance 3400 (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz), including the ¹H-¹³C correlation spectra (HMQC and HMBC) and deuterated DMSO was used as solvent. The coupling constants, *J*, are reported in hertz (Hz). IR spectra were recorded on a FT-IR Bomem MB 104 using Nujol mulls and NaCl cells. The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using silica gel 60 F254 (Merck). The melting points were determined on a Stuart SMP3 melting point apparatus and are uncorrected. Elemental analyses were performed on a LECO CHNS-932 instrument (University of Minho) or Carlo Erba EA 1108 instrument (C.A.C.T.I., University of Vigo). High resolution mass spectra were recorded on a Waters Micromass GC-TOF instrument (C.A.C.T.I., University of Vigo).

1.2. General procedure for the synthesis of imidazoles 2 from imidazoles 1

Method A: Hydrazine (1.2-1.5 molar equiv) and a catalytic amount of acetic acid (10 µL) were added to a suspension of 5-amino-4-(cyanoformimidoyl)-1*H*-imidazole **1** (1.4-2.0 mmol) in ethanol (0.5-2 mL) maintained 10 min. in an ice bath. The reaction suspension was stirred at 8 °C for 3 h-17 h. The solid was filtered and washed with ethanol and diethyl ether leading to the pure product **2**.

Method B: 5-Amino-4-(cyanoformimidoyl)-1*H*-imidazole **1** (1.0-2.0 mmol) and a catalytic amount of acetic acid (10 µL) were added to a suspension of the hydrochloride salt of hydrazine (1.2-1.5 molar equiv) and sodium carbonate (1.2-1.5 molar equiv) in a mixture of ethanol (0.5 mL) and water (0.5 mL) maintained 10 minutes in an ice bath. The reaction suspension was stirred at 8 °C for 2 h-3 h. The solid was filtered and washed with ethanol and diethyl ether leading to the pure product **2**.

1.2.1. (Z)-5-amino-1-(4-methoxyphenyl)-*N'*-phenyl-1*H*-imidazole-4-carbohydrazonamide (2a)

Method A: Phenylhydrazine was used. White solid (0.50 g, 65%), mp >193.3 °C (dec.). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.81 (s, 3H), 5.57 (brs, 2H), 5.77 (brs, 2H), 6.57 (t, *J*= 7.0 Hz, 1H), 6.83 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H), 7.11 (m, 4H), 7.31 (s, 1H), 7.44 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H), 7.92 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 55.50, 111.63, 113.47, 114.82, 116.57, 125.95, 127.92, 128.75, 129.04, 136.95, 145.15, 147.94, 158.74 ppm. IR (Nujol mull) : ν 3417, 3360, 3270, 3219, 1610, 1556, 1511 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₇H₁₈N₆O: C, 63.34; H, 5.63; N, 26.07; found: C, 63.41; H, 5.62; N, 25.94.

1.2.2. (Z)-5-amino-N'-phenyl-1-p-tolyl-1H-imidazole-4-carbohidrazonamide (2b)

Method A: Phenylhydrazine was used. White solid (0.55 g, 80%), mp >167.7 °C (dec.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.37 (s, 3H), 5.63 (brs, 2H), 5.78 (brs, 2H), 6.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.11 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.36 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20.59, 111.62, 113.68, 116.58, 124.08, 128.74, 128.89, 130.13, 132.64, 136.71, 137.29, 145.06, 147.91 ppm. IR (Nujol mull): ν 3420, 3370, 3206, 1827, 1634, 1611, 1556, 1515 1487 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₇H₁₈N₆·0.2H₂O: C, 65.92; H, 5.99; N, 27.13; found: C, 66.03; H, 5.90; N, 27.17.

1.2.3. (Z)-5-amino-1-(4-fluorophenyl)-N'-phenyl-1H-imidazole-4-carbohidrazonamide (2c)

Method A: Phenylhydrazine was used. White solid (0.21 g, 48%), mp >165.5 °C (dec.). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.66 (brs, 2H), 5.78 (brs, 2H), 6.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.11 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.40 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.58 (dd, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 111.63, 113.74, 116.49 (d, *J* = 23 Hz), 116.61, 126.67 (d, *J* = 9 Hz), 128.74, 129.01, 131.51 (d, *J* = 2 Hz), 136.81, 144.98, 147.90, 161.26 (d, *J* = 245 Hz) ppm. IR (Nujol mull): ν 3430, 3343, 3222, 3105, 1617, 1601, 1559, 1514, 1490 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₆H₁₅FN₆·0.2H₂O: C, 60.37; H, 4.84; N, 26.40; found: C, 60.91; H, 4.66; N, 26.46.

1.2.4. (Z)-5-amino-1-(4-chlorophenyl)-N'-phenyl-1H-imidazole-4-carbohidrazonamide (2d)

Method A: Phenylhydrazine was used. White solid (0.30 g, 74%), mp >185.3 °C (dec.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.71 (brs, 2H), 5.79 (brs, 2H), 6.58 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.11 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.61 (m, 4H), 7.95 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 111.65, 113.95, 116.68, 126.04, 128.80, 128.92, 129.69, 132.24, 134.08, 136.67, 144.90, 147.89 ppm. IR (Nujol mull): ν 3385, 3339, 3222, 3102, 1613, 1558, 1495 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₆H₁₅ClN₆: C, 58.81; H, 4.63; N, 25.72; found: C, 58.52; H, 4.62; N, 25.62.

1.2.5. (Z)-5-amino-1-(4-bromophenyl)-N'-phenyl-1H-imidazole-4-carbohidrazonamide (2e)

Method A: Phenylhydrazine was used. White solid (0.44 g, 70%), mp >175.6 °C (dec.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.72 (brs, 2H), 5.80 (brs, 2H), 6.58 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.12 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 111.62, 113.96, 116.64, 120.56, 126.27, 128.75, 128.81, 132.58, 134.48, 136.58, 144.86, 147.86 ppm. IR (Nujol mull): ν 3386, 3340, 3223, 3101, 1611, 1559, 1492 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₆H₁₅BrN₆: C, 51.77; H, 4.07; N, 22.64; found: C, 51.57; H, 4.14; N, 22.47.

1.2.6. (Z)-5-amino-N',1-diphenyl-1H-imidazole-4-carbohidrazonamide (2f)

Method A: The hydrazine used was phenylhydrazine. White solid (0.53 g, 77%), mp >152.6 °C (dec.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.68 (brs, 2H), 5.79 (brs, 2H), 6.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.12 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 7.5 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.48 (m, 5H), 7.94 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 111.63, 113.85, 116.61, 124.14, 127.75, 128.75, 128.93, 129.75, 135.19, 136.66, 145.01, 147.90 ppm. IR (Nujol mull): ν 3423, 3360, 3290, 3231, 3105, 1612, 1556, 1502 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₆H₁₆N₆·0.2H₂O: C, 64.94; H, 5.54; N, 28.40; found: C, 65.13; H, 5.40; N, 28.54.

1.2.7. (Z)-5-amino-1-benzyl-N'-phenyl-1H-imidazole-4-carbohidrazonamide (2g)

Method A: The hydrazine used was phenylhydrazine. White solid (0.20 g, 53%), mp >161.1 °C (dec.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.09 (s, 2H), 5.66 (brs, 2H), 5.70 (brs, 2H), 6.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.10 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.30 (m, 5H), 7.86 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 45.99, 111.64, 113.11, 116.49, 127.33, 127.50, 128.59, 128.73, 129.09, 137.13, 137.17, 145.35, 148.00 ppm. IR (Nujol mull): ν 3437, 3265, 1627, 1598, 1560 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₇H₁₈N₆: C, 66.65; H, 5.92; N, 27.43; found: C, 66.24; H, 5.76; N, 27.15.

1.2.8. (Z)-5-amino-1-methyl-N'-phenyl-1H-imidazole-4-carbohidrazonamide (2h)

Method A: Phenylhydrazine was used. Beige solid (0.56 g, 71%), mp >164.7 °C (dec.). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.42 (s, 3H), 5.57 (brs, 2H), 5.65 (brs, 2H), 6.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 7.11 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 2H), 7.82 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 29.69, 111.65, 113.15, 116.48, 128.76, 129.36, 137.59, 145.54, 148.07 ppm. IR (Nujol mull): ν 3432, 3362, 3276, 3107, 1652, 1618, 1595, 1530 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₁H₁₄N₆: C, 57.38; H, 6.13; N, 36.50; found: C, 57.16; H, 6.06; N, 36.14.

1.2.9. (Z)-5-amino-1-isopropyl-N'-phenyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamide (2i)

Method A: Phenylhydrazine was used. Bluish solid (0.16 g, 37%), mp >48.7 °C (dec.). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.38 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 4.25 (qui, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.61 (brs, 2H), 5.67 (brs, 2H), 6.56 (tt, *J*₁ = 7.2 Hz, *J*₂ = 1.2 Hz 1H), 6.82 (dt, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.2 Hz, 2H), 7.11 (ddt, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, *J*₃ = 1.2 Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.83 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 22.36, 45.02, 111.62, 113.21, 116.46, 125.83, 128.75, 136.46, 145.66, 148.06 ppm. IR (Nujol mull): ν 3360, 1617, 1552 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* for C₁₃H₁₉N₆ [M+H]⁺ calcd 259.16657, found 259.16640.

1.2.10. (Z)-5-amino-N'-(4-fluorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-1H-imidazole-4-carbohydrazonamide (2j)

Method B: 4-Fluorophenylhydrazine hydrochloride was used. White solid (0.13 g, 45%), mp >139.1 °C (dec.). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.81 (s, 3H), 5.54 (brs, 2H), 5.76 (brs, 2H), 6.83 (brs, 2H), 6.96 (brt, 2H), 7.09 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.84 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 55.49, 112.51 (d, *J* = 7 Hz), 113.30, 114.81, 115.11 (d, *J* = 22 Hz), 125.95, 127.86, 129.09, 137.01, 144.90, 145.94, 154.76 (d, *J* = 231 Hz), 158.74 ppm. IR (Nujol mull): ν 3413, 3354, 3275, 3210, 1614, 1559, 1517, 1503 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₇H₁₇FN₆O: C, 59.99; H, 5.03; N, 24.69; found: C, 59.94; H, 4.97; N, 24.33.

1.2.11. (Z)-5-amino-N'-(4-fluorophenyl)-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamide (2k)

Method B: 4-Fluorophenylhydrazine hydrochloride was used. Bluish solid (0.25 g, 37%), mp >157.0 °C (dec.). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.42 (s, 3H), 5.55 (brs, 2H), 5.64 (brs, 2H), 6.81 (dd, *J*₁ = 9.0 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz, 2H), 6.96 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 7.76 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 29.63, 112.49 (d, *J* = 7 Hz), 112.99, 115.07 (d, *J* = 22 Hz), 129.36, 137.60, 145.02 (d, *J* = 1 Hz), 146.26, 154.69 (d, *J* = 231 Hz) ppm. IR (Nujol mull): ν 3428, 3381, 3338, 3284, 3226, 3107, 1924, 1650, 1621, 1591, 1506 cm⁻¹; HRMS (ESI): *m/z* for C₁₁H₁₄FN₆ [M+H]⁺ calcd 249.12605, found 249.12554.

1.2.12. (Z)-5-amino-N'-(3-fluorophenyl)-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamide (2l)

Method B: 3-Fluorophenylhydrazine hydrochloride was used. Bluish solid (0.06 g, 23%), mp >174.5 °C (dec.). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.42 (s, 3H), 5.56 (brs, 2H), 5.72 (brs, 2H), 6.30 (td, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, 1H), 6.53 (dt, *J*₁ = 12.5 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, 1H), 6.61 (dd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J*₁ = 15.2 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 8.17 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 29.66, 97.40 (d, *J* = 26 Hz), 102.12 (d, *J* = 21 Hz), 107.79 (d, *J* = 2 Hz), 112.79, 129.48, 130.05 (d, *J* = 11 Hz), 137.82, 146.17, 149.85 (d, *J* = 11 Hz), 163.45 (d, *J* = 238 Hz) ppm. IR (Nujol mull): ν 3454, 3357, 1650, 1622, 1603, 1518, 1495 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₁H₁₃FN₆.0.2H₂O: C, 52.46; H, 5.32; N, 33.37; found: C, 52.55; H, 5.20; N, 32.85.

1.2.13. (Z)-5-amino-N'-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamide (2m)

Method B: 4-Methoxyphenylhydrazine hydrochloride was used. Bluish solid (0.10 g, 28%), mp >159.3 °C (dec.). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.42 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 5.55 (brs, 2H), 5.58 (brs, 2H), 6.75 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.08 (s, 1H), 7.44 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 29.63, 55.29, 112.96, 113.20, 114.38, 129.28, 137.47, 142.75, 145.85, 151.36 ppm. IR (Nujol mull): ν 3431, 3350, 3276, 1647, 1613, 1580, 1506, 1338 cm⁻¹; Anal. calcd. for C₁₂H₁₆N₆O.0.3H₂O: C, 54.25; H, 6.25; N, 31.63; found: C, 54.44; H, 6.12; N, 31.35.

1.2.14. (Z)-5-amino-1-methyl-N'-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-imidazole-4-carbohydrazonamide (2n)

Method A: 4-Trifluoromethylphenylhydrazine was used. Beige solid (0.21 g, 53%), mp >193.9 °C (dec.). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.43 (s, 3H), 5.58 (brs, 2H), 5.82 (brs, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.11 (s,

1H), 7.40 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.53 (1H, s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 29.71, 110.63, 112.65, 115.50 (q, $J = 31$ Hz), 125.44 (q, $J = 270$ Hz), 126.15 (q, $J = 4$ Hz), 129.65, 138.05, 146.64, 150.24 ppm. IR (Nujol mull): ν 3442, 3320, 3105, 1649, 1622, 1606, 1581, 1536 cm^{-1} ; Anal. calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_6$: C, 48.32; H, 4.39; N, 28.18; found: C, 48.25; H, 4.47; N, 27.71.

1.2.15. (Z)-5-amino-1-methyl-N'-(pyridin-2-yl)-1H-imidazole-4-carbohydrazonamide (2o)

Method A: 2-Hydrazinopyridine was used. Beige solid (0.30 g, 97%), mp >217.4 °C (dec.). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.42 (s, 3H), 5.55 (2H, brs, 2H), 5.90 (brs, 2H), 6.54 (ddd, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, $J_3 = 0.8$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.51 (ddd, $J = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.0$ Hz, $J_3 = 2.0$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.2$, 1H), 8.56 (brs, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 29.68, 105.07, 112.54, 112.92, 129.44, 137.49, 137.76, 145.44, 147.59, 158.47 ppm. IR (Nujol mull): ν 3411, 3348, 3264, 3194, 1625, 1594, 1495 cm^{-1} ; HRMS (ESI): m/z for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd 232.13052, found 232.13161.

2. Biology

Material and methods

Reagents: Mueller-Hinton II (MH II) broth and sabouraud dextrose agar (SDA) were from Liofilchem (Italy). Unless otherwise stated, all other reagents were from Sigma-Aldrich.

Microorganisms: Microorganisms stocks were kept at -20 °C and cultures at 4 °C. Bacteria (*E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853 and *S. aureus* ATCC29213) were cultured in MH II agar 24 h just prior the assays while fungus were cultured on SDA for 24 h (*Candida* sp.), 48 h (*Cryptococcus* and *Aspergillus* sp.) or 5 days (dermatophytes).

Antibacterial activity. Minimal inhibitory concentration (MIC) of compounds was determined using the CLSI Reference Microdilution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing for Aerobic Bacteria M7-A6 [Ref NCCLS]. Briefly, serial dilutions (1:2; ranging from 100 to 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of compounds on MH II broth were added to the test bacteria (5×10^5 CFU/mL) and were incubated for 24 h at 37°C . Positive controls (microorganism in culture media), negative controls (culture media), and compounds control (compound in culture media) were included in all the experiments. MIC was defined as the lowest concentration that completely inhibited bacterial growth by visual lecture.

Antifungal activity. Broth microdilution methods based on the CLSI reference documents M27-A3 and M38-A2 for yeasts and filamentous fungi, respectively, with minor modifications, were used to determine MIC. Briefly, serial dilutions (1:2; ranging from 100 to 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *Candida* sp. and from 256 to 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. neoformans* and filamentous fungi) of compounds on RPMI-1640 broth medium supplemented with MOPS were added to the test yeast (0.5 - 2.5×10^3 CFU/mL). For filamentous fungi the inoculum was adjusted to 0.4 - 5×10^4 CFU/mL for *Aspergillus* spp., and 1 - 3×10^3 CFU/mL for dermatophytes. Microplates were incubated aerobically at 37 °C for 48 h (yeasts and *Aspergillus* spp.) or at 30 °C for 5 days (dermatophytes). The fungal growth was indicated by the turbidity and MICs were defined as the lowest drug concentration that reduced growth in 100% in comparison to the compound-free controls.

All results are from three independent and concordant experiments, performed in duplicate. A range of values is presented when different results were obtained. Two growth controls, using test medium alone and with 1.0% (v/v) DMSO, and a sterility control (drug-free medium only) were included in all assays.

Quality Control. The quality controls used were: *C. parapsilosis* ATCC 90018 and Fluconazole - MIC range from 1 to 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (48 h incubation); *C. krusei* ATCC 6258 and Ketoconazole - MIC range from 0.25 to 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (48 h incubation) and *E. coli* ATCC 25922 and Gentamicin - MIC range from 0.25 to 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (24 h incubation). The obtained results were within the recommended limits (data not shown).

Minimal lethal dose. To evaluate the MLDs, 50 μL , aliquots were subcultured from each negative well (optically clear) and the last positive well, after MIC reading, onto SDA plates. The plates were then incubated at 35 °C (yeasts and *Aspergillus* spp.) or 30 °C (dermatophytes) until growth was seen in the last positive well subculture. MLD was the lowest concentration of compound yielding subcultures without any visible fungal

growth. Compounds that were not able to inhibit yeast growth on agar culture plates were defined as fungistatic and those that permanently inhibited yeast growth were defined as fungicidal and their MLD registered.

Hemolytic activity. Human red blood cells from healthy individuals were used to test the hemolytic activity of compounds, according to a modified version of that described by Ahmad *et al.*²³ Erythrocytes were isolated from heparinized peripheral blood by Histopaque-1077 density centrifugation, according to the manufacture instructions. A negative control, consisting of erythrocytes (0% hemolysis), and a positive control, consisting of erythrocytes and a dimethylformamide/sodium dodecylsulphate (50:50) solution (100% hemolysis), were used. Percentage of hemolysis was calculated comparing to the positive and negative controls.

Reference

23. Ahmad, A.; Khan, A.; Manzoor N.; Khan L. A. *Microb. Pathog.* **2010**, *48*, 35.

TRABALHO EXPERIMENTAL II

“Elucidation of the antifungal activity of (Z)-5-amino-N'-aryl-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamides derivatives and their effect on the immune response”

II.1. Material e métodos

Reagentes

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM + GlutaMAX) e o Roswell Park Memorial Institute RPMI-1640 foram da Gibco by life technologies. Todos os outros reagentes foram da Sigma-Aldrich.

Isolamento de células mononucleares humanas

As Células mononucleares humanas foram isoladas a partir de sangue periférico heparinizado de voluntários saudáveis por Histopaque -1077 de acordo com as instruções do fabricante. A concentração das células mononucleares humanas foi ajustada a $2-3 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF inativado pelo calor, 2 mM de glutamina e 50 mg/mL de gentamicina (Cerqueira, Cidade et al. 2008).

Efeito na proliferação de células mononucleares humanas

Para avaliar o efeito dos compostos sobre a resposta mitogénica de linfócitos humanos foi utilizada uma versão modificada do ensaio colorimétrico de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio(MTT) (Cerqueira, Cordeiro-da-Silva et al. 2003). Às células mononucleares (50 μ L), foram adicionados 50 μ L de diluições seriadas (1:2) do composto em estudo e 50 μ L de solução de fitohemaglutinina (PHA 10 μ g/mL). A placa de 96 poços foi incubada 4 dias a 37°C. Passado o período de incubação foram adicionados 25 μ L de solução de MTT (1 mg/ml) e 4h depois os cristais de formazano formado foram solubilizados com solução de SDS / DMF durante a noite. A densidade ótica foi medida a 550nm num espectrofotómetro de placas (Stat Fax 3200 – Awareness technology INC). A percentagem de inibição da proliferação para cada uma das concentrações dos compostos foi calculada segundo a seguinte equação: % de inibição = $100 - 100 \times (\text{média } DO_{550} \text{ dos linfócitos tratados com o composto} - DO_{550} \text{ do composto em meio de cultura com PHA}) / (\text{média da } DO_{550} \text{ dos linfócitos estimulados com PHA} - \text{média da } DO_{550} \text{ do meio de cultura com PHA})$. Para determinar as concentrações que originam uma inibição de 50% (IC₅₀) da proliferação dos linfócitos foi determinada a equação da recta (% de inibição *versus* concentração) para cada um dos compostos. Neste ensaio foram inseridos os controlos, linfócitos

estimulados com PHA (100% de estimulação), linfócitos não estimulados (0% de estimulação) e meio de cultura (branco de controlo). A ciclosporina A foi incluída como um controlo positivo.

Avaliação da toxicidade dos compostos nas células mononucleares humanas

À suspensão de células mononucleares (50 µL), foram adicionados 50µL de diluições seriadas (1:2) do composto em estudo. A placa de 96 poços foi incubada durante 24h a 37°C com 5% de CO₂. Ultrapassado o período de incubação foram adicionados 25µL de MTT (1mg/mL) e 4h depois o formazano formado foi solubilizado com solução de SDS/DMF, durante a noite. A densidade ótica foi determinada a 550nm num espectrofotómetro de placas (Stat Fax 3200 – Awareness technology INC). A toxicidade foi calculada segundo a seguinte equação: % de inibição = 100-100 x (média DO₅₅₀ dos linfócitos tratados com o composto – DO₅₅₀ do composto com meio) / (média da DO₅₅₀ dos linfócitos – média da DO₅₅₀ meio de cultura). Neste ensaio foram inseridos os controlos; linfócitos (produção basal) meio de cultura (branco do controlo) e composto em meio de cultura (branco do composto). Considerando que a viabilidade do controlo é de 100%, o composto é considerado tóxico quando a viabilidade dos macrófagos é inferior a 70%, comparativamente ao controlo (Cerqueira, Cidade et al. 2008).

Efeito dos compostos na produção de óxido nítrico (NO)

Para a produção de NO foi utilizado a linha celular de macrófagos RAW 264.7 (coleção de cultura do CEBIMED), mantida em meio DMEM com glutamina suplementado com 10% de SBF e 50µg/mL de gentamicina a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂. Após verificação da confluência celular incubaram-se 200µL de suspensão celular de macrófagos (0.5-1 x 10⁶ células/mL) em placas de 96 poços com fundo plano e deixaram-se aderir durante 2h a 37°C. A quantificação do NO formado foi realizado, por recurso à reação de Griess (Teixeira, Cerqueira et al. 2005). Resumidamente, aos macrófagos aderidos adicionaram-se 100µL das diluições seriadas (1:2) do composto em estudo e 100µL de meio de cultura contendo LPS de *E.coli*; 1,5 µg/mL⁻¹), de modo a induzir a síntese da iNOS pelos macrófagos. Após 24h de incubação a 37°C com 5% de CO₂ retiraram-se 100µL de sobrenadante para outra placa

de 96 poços a que se adicionaram-se 100µL de solução de Griess (iguais quantidades de uma solução a 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% e de uma solução a 0,1% de N-(1-naftil) etilenodiamina em água destilada) de preparação extemporânea. Após 10min de incubação à temperatura ambiente o NO gerado foi quantificado por leitura da densidade ótica a 550nm num espectrofotómetro de placas (Stat Fax 3200 – Awareness technology INC), tendo por base a reação do reagente de Griess com o nitrito presente nos sobrenadantes da cultura (Green, Wagner et al. 1982). Os controlos consistiram em macrófagos estimulados com LPS (0% de inibição), macrófagos não estimulados (produção basal), as várias diluições do composto adicionadas da solução de estímulo (branco do composto) e meio de cultura (branco do controlo). O Éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME) e a dexametasona foram utilizados como controlos.

Quantificação da viabilidade de Macrófagos RAW 264.7

O ensaio de viabilidade foi sempre realizado nas células a que foi retirado o sobrenadante para quantificação da produção de NO. Às células foram adicionados 25µL de solução de MTT (1mg/mL) procedendo-se à incubação a 37°C, com 5% de CO₂ durante 4h. Após a incubação adicionaram-se 50µL de solução de SDS/DMF, incubando-se durante a noite a 37°C. A leitura da placa foi efetuada a 550nm num espectrofotómetro de placas (Stat Fax 3200 – Awareness technology INC). A viabilidade dos macrófagos foi calculada segundo a seguinte formula: % de viabilidade = 100 x (média DO₅₅₀ dos macrófagos estimulados e tratados com composto – DO₅₅₀ do composto em meio de cultura com LPS) / (média DO₅₅₀ dos macrófagos estimulados com LPS – média DO₅₅₀ do meio de cultura com LPS). Considerando que a viabilidade do controlo é de 100%, o composto é considerado tóxico quando a viabilidade dos macrófagos é inferior a 70%, comparativamente ao controlo (Cerqueira, Cidade et al. 2008).

Avaliação da atividade *scavenger* dos compostos sobre o NO

O efeito do *scavenger* dos compostos sobre o NO foi determinado como descritos em De las Heras *et al.*, 1999. Assim, cada composto foi colocado em três poços da primeira linha de uma placa de 96 poços (fundo plano) e submetido a sete diluições sucessivas

(1:2; 50 μ L), tendo as diluições sido realizadas numa mistura etanol/PBS (1:9). Aos poços das duas primeiras colunas foram adicionados 50 μ L de nitroprussiato de sódio (5mM) dissolvido em PBS. No poço da terceira coluna a solução de nitroprussiato de sódio foi substituída por PBS. Após incubação de 150 min a 25°C, foram adicionados 100 μ L de reagente de Griess a todos os poços e depois de uma incubação de 10 min a 25°C, a DO₅₅₀ foi lida num espectrofotómetro de placas (Stat Fax 3200 – Awareness technology INC). Os controlos da experiência consistiram em solução de nitroprussiato de sódio (100% de produção), PBS (0% de produção) e as várias diluições dos compostos em etanol/PBS (branco do composto). O efeito *scavenger* (%) foi calculado segundo a fórmula: % de efeito *scavenger* = 100 – 100 x (média DO₅₅₀ do composto com nitroprussiato de sódio - DO₅₅₀ do composto em etanol/PBS) / (média DO₅₅₀ do composto com nitroprussiato de sódio – média DO₅₅₀ do PBS) com a produção de NO pelo nitroprussiato em meio aquoso a pH 7.0 a ser considerada com 100%. A contribuição da atividade *scavenger* dos compostos no efeito inibidor da produção de NO foi considerada significativa sempre que a quantidade de NO detetado, comparativamente ao controlo, foi inferior a 70% (De las Heras *et al.* 1997).

Ensaio da inibição da transição dimórfica

A inibição da transição dimórfica foi determinada de acordo com a versão descrita por Pinto *et al.* (2013). Resumidamente, as suspensões *C. albicans* e H37 foram obtidas a partir de culturas frescas com 24h de crescimento em placas de SDA e preparadas em meio NYP (N-acetil-glucosamina [Sigma; 10⁻³ mol / L], Yeast Nitrogen Base de Dados [Difco; 3,35 g / L], prolina [Fluka, 10⁻³ mole / L], NaCl [4,5 g / l], e de pH 6,7 \pm 0,1; Marichal *et al.*, 1986) de forma a obter uma densidade 1,0 \pm 0,2 x 10⁶ CFU / mL. Todas as diluições dos compostos foram realizadas em DMSO, preparando-se diluições cem vezes superiores às pretendidas. Em tubos de vidro foram colocados 495 μ L de suspensão de levedura e 5 μ L do composto, nas diferentes concentrações testadas. Foi ainda incluído um controlo de filamentação de cada estirpe com DMSO e um controlo de inibição da filamentação com fluconazol. Todos os tubos foram incubados em banho sem agitação a 37°C durante 3h. Concluído o tempo de incubação, procedeu-se à contagem das células em Camara de Neubauer. Em 100 células foram contados os tubos germinativos, quando o tubo de germinação era, pelo menos, tão longo quanto o diâmetro do blastósporo (Pinto, Hrimpeng *et al.* 2013).

Efeito dos compostos na função mitocondrial das leveduras (ensaio MTT)

Efeito dos compostos na atividade da redução mitocondrial em *C. albicans* ATCC 10231 e *C. krusei* ATCC 6258 foi determinado através de uma versão modificada do ensaio colorimétrico de MTT (Lopes *et al.* 2012). Resumidamente, a suspensão de células de levedura foi preparada e ajustada em meio RPMI 1640 de forma a obter uma densidade de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFCs / mL. Todas as diluições dos compostos foram realizadas em RPMI 1640. Num eppendorf colocou-se 1 mL da suspensão de levedura que foi incubada num banho de água (GFL 1083), sem agitação a 37°C. Após 24h de incubação, as células foram cuidadosamente homogeneizadas, recolhidas e centrifugadas (5417R) a 10.000 rpm durante 5 min. Removido o sobrenadante adicionaram-se às células diferentes concentrações de composto a testar (1mL). Após 2h e 30min de incubação num banho com água (GFL 1083), sem agitação a 37°C, as amostras foram centrifugadas (5417R) a 10.000 rpm durante 5 min. Ao pellet foram adicionados 500 mL de uma solução de MTT (0,5 mg / ml de MTT em RPMI) e procedeu-se a uma nova incubação a 37°C durante 30 min. Após o tempo de incubação realizou-se uma nova centrifugação (5417R) a 10.000rpm durante 5 min e as amostras foram solubilizadas com 300µL de DMSO. Numa placa de 96 poços, foram colocados em duplicado 125µL de cada amostra e a leitura da placa foi efetuada por espectrofotometria a 510 nm utilizando um leitor de placas (Synergy Mx, BioTek)

Estatística

Os dados foram analisados usando o software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). (versão 21 para o Windows). Realizou-se uma análise de variância (one-way ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de trukey, com um nível de significância estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

Ética

Ética aprovada, foi obtida pelo Comité de Ética da Universidade Fernando Pessoa.

II.2.Resultados e discussão

“Artigo em preparação”

Elucidation of the antifungal activity of (Z)-5-amino-N'-aryl-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamides derivatives and their effect on the immune response

Abstract

The incidence of invasive opportunistic fungal infections have increased dramatically during the past two decades as a consequence of the rising number of immunocompromised patients such as HIV-infected individuals, transplant recipients and patients with immunosuppressive therapy or broad-spectrum antibiotics. *Candida* sp. especially *C. albicans*, contributes for a large number of invasive fungal infections. Most therapies designed to treat these infections interfere with biosynthesis of ergosterol. In addition to their effect on fungal cells, others mechanisms of action can increase the antifungal activity of drugs as their immunomodulatory effect, the ability to inhibit fungal virulence factors or the interference with mitochondria activity. Therefore, the aim of the present work were to evaluate the antifungal activity of three (Z)-5-amino-N'-aryl-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamides [aryl=phenyl (2h), 4-fluorophenyl (2k), 3-fluorophenyl (2l)] against two strains of *C. albicans* and one strain of *C. krusei*. Additionally the mechanisms of action of these antifungal agents were elucidated and their interference with immune system responses was also assessed through NO production by macrophages and through lymphocytes proliferation. Regarding the results, the three tested compounds had shown a good antifungal activity against *Candida* sp specifically to *C. kusei*. Only compound 2h was able to inhibit *C. albicans* dimorphic transition, and this outcome can potentiate the compound effect against this yeast. At concentration two fold superior of MIC values, all the compounds significantly reduced *C. krusei* mitochondrial function. However, only compound 2k was able to achieve the same effect on *C. albicans* mitochondrial function. The compound inhibitory effect can be in part due to this interaction. All the compounds showed to be potent inhibitors of NO production by macrophages, and their effect was not associated neither to a cytotoxic nor a NO scavenger effect. Concerning the imune system response, all compounds exhibited an inhibitory effect of the mitogenic response by human lymphocytes and a potent inhibitory effect in the NO production by macrophages. Together these results pointed out that imidazole derivatives 2h, 2k and 2l are promising antifungal drugs as well as immunomodulatory agents and therefore, such

features validate further investigation for the development of new clinical therapeutic approaches.

Introduction

Systemic mycosis are a major cause of morbidity and mortality among immunocompromised (HIV infection, neutropenic and transplanted) and debilitated individuals attending health care institutions (intensive care units, eg) (Nicod, Pache et al. 2001, Reichenberger, Habicht et al. 2002, Bulpa, Dive et al. 2007).

Candida sp. and *Cryptococcus* sp. are responsible for the majority of the yeast-like systemic mycosis in severely debilitated and immunocompromised patients (Nicod, Pache et al. 2001, Jean, Fang et al. 2002, Datta, Jain et al. 2003, Wingard 2004).

The main mechanisms of action of antifungal drugs are the synthesis inhibition or interference with membrane ergosterol and cell wall synthesis inhibition. Besides the main effect on fungal cells, additional mechanisms of action can increase the antifungal activity of drugs as their immunomodulatory effect, the ability to inhibit fungal virulence factors (as dimorphic transition, adhesion to host cells or biofilm formation) or the interference with mitochondria activity (White and Elliott 1980, Lopes, Pinto et al. 2013).

Anphotericin B, one of the older antifungal agents, is the drug of choice for treating systemic mycosis, with low rates of resistance among fungi but related to high kidney associated toxicity (Jean, Fang et al. 2002, Saliba and Dupont 2008). The immunomodulatory activity of Anphotericin B is being extensively reported, and its association with corticosteroids to prevent undesirable side effects is a common association therapeutic strategy (Stewart, Spagnuolo et al. 1981, Goodwin, Cleary et al. 1995).

Many reports describe the antifungal properties of immunomodulatory drugs, as cyclosporine A or FK-506 (Singh and Heitman 2004). The synergistic effect of immunomodulators with antifungal agents was also observed namely for azole resistant *C. albicans* isolates (Shuyuan et al., 2014).

In conclusion an antifungal agent capable of interfering with the immune system could enable to design novel strategies for opportunistic mycosis in transplant recipients (Singh and Heitman 2004).

Our group had previously identified three (*Z*)-5-amino-*N'*-aryl-1-methyl-1*H*-imidazole-4-carbohydrazonamides **2** [aryl= phenyl (**2h**), 4-fluorophenyl (**2k**), 3-fluorophenyl (**2l**)]

5- as lead antifungal compounds (Figure 1) for *Candida* sp and *C. neoformans* infections (Ribeiro, Gabriel et al. 2014). The goal of the present work is to elucidate the mechanism of action underline their antifungal activity and to get an insight on their interference with immune system responses.

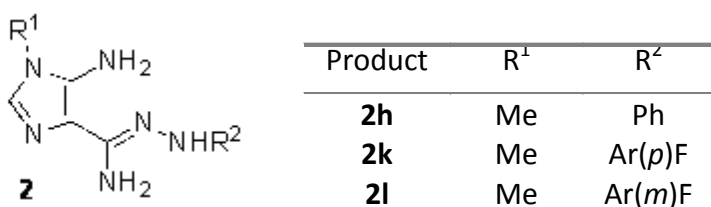


Figure 1. Lead antifungal (*Z*)-5-amino-*N'*-aryl-1-methyl-1*H*-imidazole-4-carbohydrazonamides derivatives (**2**).

Material and Methods

Chemicals and reagents

Reagents used in cell culture, including RPMI-1640, DMEM medium, and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco® Invitrogen Co. (Barcelona, Spain) and Glutamine cell culture grade and Dimethyl sulfoxide (DMSO) from Applichem (Darmstadt, Germany). N,N-Dimetilformamida (DMF) was acquiring from Spectramol Science Incorporated. Except otherwise stated all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

Microorganisms

Candida sp. stocks were kept at -20°C and were cultured in SDA 24 h just prior the assays.

Compounds

5-Aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives were synthesized by us as previously described (Ribeiro, Gabriel et al. 2014). Stock solutions in DMSO were kept at -20 and diluted in fresh culture medium just prior the assays.

Antifungal activity

Broth microdilution method based on the CLSI reference documents M27-A3 for yeasts, with minor modifications, were used to determine MIC (Ribeiro, Gabriel et al. 2014). Briefly, serial dilutions (1:2; ranging from 256 to 1 µg/mL) of compounds on RPMI-1640 broth medium supplemented with MOPS were added to the test yeast ($0.5\text{--}2.5 \times 10^3$ CFU/mL). Microplates were incubated aerobically at 37°C for 48 h and growth was indicated by the turbidity and MICs were defined as the lowest drug concentration that reduced growth in 100% in comparison to the compound-free controls.

Quality control determinations of the MIC of fluconazole were ensured by testing *C. parapsilosis* ATCC 90018. The results obtained were within the recommended limits (data not shown). All results are from three independent and concordant experiments, performed in duplicate. A range of values is presented when different results were obtained. Two growth controls, using test medium alone and with 1.0% (v/v) DMSO, and a sterility control (drug-free medium only) were included in all assays.

Germ tube/dimorphic transition inhibition assay

In order to determine the effect of the 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives on the yeast-mycelium transition, the suspensions of *C. albicans* strains ATCC 10231 and clinical isolate D5 from overnight cultures in SDA were prepared in NYP medium (N-acetylglucosamine [Sigma; $10\text{--}3$ mol/L], Yeast Nitrogen Base [Difco; 3.35 g/L], proline [Fluka; $10\text{--}3$ mol/L], NaCl [4.5 g/L], and pH 6.7 ± 0.1 ; Marichal et al., 1986). The suspensions were adjusted to obtain a density of yeast cell suspensions at $1.0 \pm 0.2 \times 10^6$ CFU/mL and distributed into glass test tubes in a volume of 990 µL. Each dilution (1:2) of the imidazole derivative was added into the cell suspension tubes, in 10 µL volumes, to obtain appropriate inhibitory concentrations. After incubation at 37 °C without agitation for 3 h, the treated and untreated yeast cells were counted for germ tube formation under light microscope and the percentage of germinating cells was calculated. A cell was considered positive for germ tube formation when the germinating tube was at least as long as the diameter of the blastospore. The results are presented as average \pm standard error of the mean (SEM) of three independent experiments.

Mitochondrial dehydrogenases activity inhibition

Effect of the 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives on mitochondrial reductase activity in *C. albicans* ATCC 10231 and *C. krusei* ATCC 6258 was determined through MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay based on the method of Lopes et al. (2012) with some modifications. Briefly, yeast cell suspension was prepared and adjusted in RPMI 1640 medium to obtain the final required cell density of $0.5\text{--}2.5 \times 10^3$ CFU/mL. The suspension was then distributed (1 mL) into eppendorf tubes, and incubated, without agitation, at 37 °C. After 18–24 h of incubation, the cells were carefully homogenized and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The various concentrations of the imidazole derivative solutions were added to each sample of the cell pellet in volume of 1 mL. After exposure to the compound at 37 °C for 1 h, the treated cells were harvested by centrifugation at 10,000 rpm for 5 min and 500 µL of 0.5 mg/mL of MTT (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) in RPMI were added into each treated sample. Then the mixtures were further incubated at 37 °C for 30 min and a water-insoluble purple formazan product occurring in mitochondria of viable cells was solubilized with 300 µL of DMSO. The intensity of the solubilized purple color was measured spectrophotometrically at 510 nm using a Multiskan Ascent plate reader (Thermo Electron Corporation).

Human mononuclear cells MTT-proliferation assay

Human mononuclear cells were isolated from peripheral blood of human health volunteers and were plated ($2\text{--}3 \times 10^6$ cell/mL) in 96-flat bottom plates. Cells were treated with serial dilutions of the test compounds, stimulated with phytohemagglutinin (PHA; 10 µg/mL) and incubated for 96h. After incubation, the MTT-proliferation assay was performed and absorbance measured at 550 nm (Pedro, Cerqueira et al. 2002, Cerqueira, Cordeiro-da-Silva et al. 2003, Teixeira, Cerqueira et al. 2005). Cyclosporin A was used as positive control.

MTT-viability assay

Toxicity of the compounds against human mononuclear cells and RAW 254.7 cell line was evaluated by MTT-viability assay (Pedro, Cerqueira et al. 2002, Cerqueira, Cordeiro-da-Silva et al. 2003, Teixeira, Cerqueira et al. 2005).

NO production assay

Nitric oxide (NO) production by LPS stimulated (1.5 µg/mL) RAW 264.7 (1 X 10⁶ cells/mL) murine macrophages was quantified by the Griess assay, as previously described by our group (Teixeira, Cerqueira et al. 2005, Cerqueira, Cidade et al. 2008). *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of inductive nitric oxide synthase (iNOS) activity and dexamethasone, an inhibitor of iNOS expression, were used as positive controls.

Since inhibition of NO production could be a consequence of an inhibition of iNOS expression and/or activity, it was necessary to investigate 5-Aminoimidazole-4-carboxamidrazones mechanism of NO synthesis inhibition. Briefly, the compound was added 6h and 14h after RAW 264.7 macrophages stimulation with LPS and NO production quantified (Cerqueira, Cidade et al. 2008).

NO Scavenging assay

To discard NO scavenging effect of the azoles, nitrite was chemically generated using sodium nitroprusside as previously described. Nitrite was quantified by Griess assay (Teixeira, Cerqueira et al. 2005, Cerqueira, Cidade et al. 2008).

Ethics

Ethics approval was obtained by the Ethic Comity of University Fernando Pessoa.

Results

The minimal inhibitory concentrations (MIC) of imidazole derivatives 2h, 2l and 2k against *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* D5 and *C. Krusei* ATCC 6258 were calculated and are represented in Table 1.

Table 1. Activity (MIC) of (Z)-5-amino-*N*'-aryl-1-methyl-1*H*-imidazole-4-carbohydrazonamides derivatives (**2**) against *Candida* spp.

Compound	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> D5	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
2h	64.0	64.0	8.0
2k	32.0	32.0	8.0
2l	16.0	16.0	4.0

C. albicans D5 is a resistant to fluconazole strain but was inhibited for all the compounds with equal concentrations as those necessary to inhibit *C. albicans* ATCC 10231. The inhibitory activity of all the compounds was stronger against *C. krusei* growth, when compared to that of *C. albicans* strains.

To study of the influence of imidazole derivatives on virulence factors of *C. albicans* the effect of the compounds on *C. albicans* dimorphic transition was studied (Figure 2). Two strains of *C. albicans* were used: the ATCC 10231 and the D5 (resistant to fluconazole) strains.

The imidazole 2h significantly inhibited the dimorphic transition of both strains, even for concentrations of MIC/2 (32 $\mu\text{g/ml}$). Compounds 2k and 2l were not able to inhibit the dimorphic transition, independently of the strain tested, and even at concentrations of 2 times MIC values.

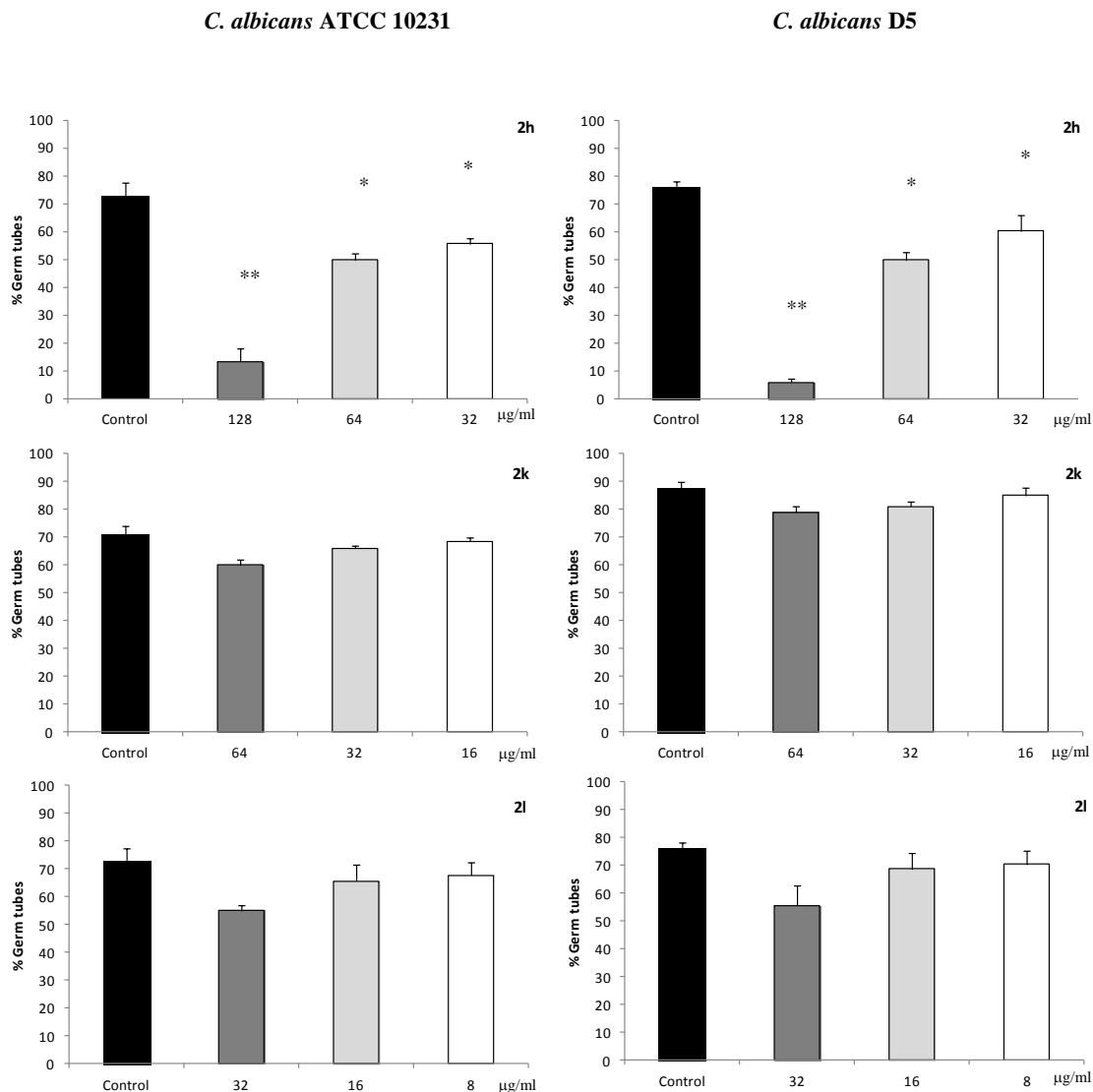


Figure 1. Percentage of germ tube formation by two *C. albicans* strains (ATCC 10231 and D5) treated with (Z)-5-amino-N'-aryl-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamides derivatives. Results show means \pm SEM of three independent experiments. Controls included 1% of DMSO. MIC, minimal inhibitory concentration. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

To investigate a possible interference of the imidazole compounds with the mitochondrial function of *Candida* sp, the MTT reduction assay was performed.

Figure 2 shows that compound 2h significantly inhibited the respiratory chain function of *C. krusei* for concentrations of MIC/2 (4 µg/ml), but no effect was observed for *C. albicans* mitochondrial activity even for concentration of 2 times MIC (128 µg/ml). For compound 2k the inhibition was only achieved when concentrations were as high as two times MIC values for *C. albicans* (64 µg/ml) and *C. krusei* (16 µg/ml). Compound 2l

was only efficient on inhibiting the mitochondrial activity of *C. krusei* for concentration of two times MIC values (8 µg/ml).

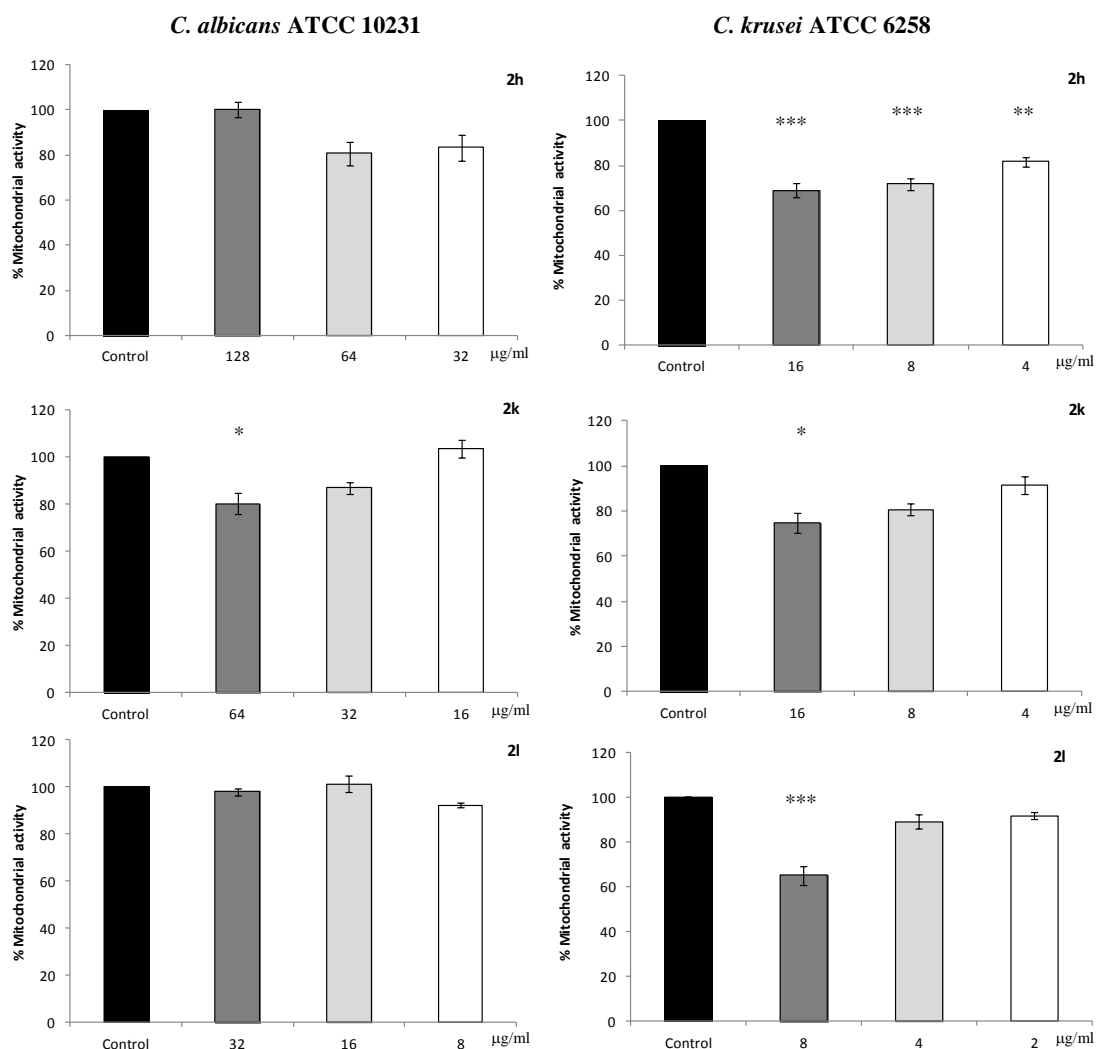


Figure 2. Mitochondrial activity of *C. albicans* ATCC 10231 and *C. krusei* ATCC 6258 cells treated with different concentration of (Z)-5-amino-N'-aryl-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamides derivatives. Results how means \pm SEM of three independent experiments. Controls included 1% of DMSO. MIC, minimal inhibitory concentration. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

To evaluate the immunomodulatory activity of the imidazole derivatives their effect against NO production by macrophages and on lymphocyte proliferation was investigated.

All the compounds showed to be potent inhibitors of NO production by RAW 264.7 LPS-stimulated macrophages (Table 3). However, the most potent inhibitors were 2h and 2l.

Cell toxicity was excluded since the viability of macrophages exposed to IC₅₀ values of the imidazole derivatives was always $\geq 70\%$, as determined for the MTT cytotoxicity assay (data not shown).

To exclude NO scavenging activity the imidazoles were tested in a cell-free system in which NO was spontaneously generated by sodium nitroprusside. No scavenger activity was observed (detection of NO $\geq 70\%$) for any of the compounds tested (data not shown).

Table 3: Effect of (Z)-5-amino-*N'*-aryl-1-methyl-1*H*-imidazole-4-carbohydrazonamides derivatives on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

Compound	IC ₅₀ (µg/ml)		
	0h	6h	14h
2h	5.6 ± 0.2	20.6 ± 1.0	17.2 ± 1.6
2k	16.6 ± 0.4	17.7 ± 0.8	35.9 ± 0.4
2l	4.9 ± 0.3	≥ 50.0	≥ 50.0
L-Name	16.8 ± 2.1	13.6 ± 1.6	35.8 ± 1.7
Dexamethasone	1.6 ± 0.2	18.9 ± 1.3	51.8 ± 2.4

Macrophages were exposed to LPS and treated with the 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones at different times after stimulation: 0 h (simultaneously with the stimulus), 6 h and 14 h after stimulation. Results are the mean ± SEM (n = 3). n.i.= no inhibition. L-NAME and Dexamethasone was used as positive controls.

Since inhibition of NO production can be due to a inhibition of iNOS expression and/or activity, it was necessary to investigate the imidazole mechanism of action. For that the compounds were added 6 and 14 h after RAW 264.7 stimulation with LPS, since NO

production is detected 8h after macrophages stimulation and remains constant for 24 h (Cerqueira et al 2008).

When compound 2h was added 6h after LPS stimulation its inhibitory activity significantly decreased ($p<0.001$) when compared to that of simultaneous addition of compound and LPS. When addition was performed 6h after LPS-macrophages stimulation, the compound was able to interfere either with synthesis and activity of iNOS (Cerqueira et al., 2008). Even when compound was added 14h, a strong inhibitory effect is also observed. When the addition of the compound is made 14h after stimulation, it can only interfere with the activity of iNOS (Cerqueira et al., 2008). By all these results, we can infer that 2h acts on both synthesis and activity of iNOS.

The inhibitory effect of compound 2k on NO production, either when added simultaneously or 6h after LPS stimulation, is equivalent. However, when compound is added 14h after stimulation, a significant decrease of activity, represented by a significant ($p<0.001$) increase of IC_{50} values, was observed. These results indicate a possible interference of 2k with iNOS activity rather than an inhibition of its expression. This hypothesis is also fundamented in the comparison of the profile of inhibition of 2k and L-NAME, a known inhibitor of iNOS activity.

Compound 2l strongly inhibits NO production when the addition is performed at the same time of LPS stimulation. When 2l is added 6h after stimulation the inhibitory effect of the compound is totally lost, even for concentration as high as 50 $\mu\text{g/ml}$ (ten fold higher than IC_{50} concentration). Dexamethasone, a known inhibitor of iNOS synthesis has a comparable inhibitory profile. These results lead to the conclusion that 2l inhibits iNOS synthesis rather than enzyme activity.

The effect of compounds 2h, 2k and 2l on the mitogenic response of peripheral human lymphocytes to PHA was evaluated and the results, given in concentration that cause 50% inhibition (IC_{50}) are summarized in Table 4.

Table 4: Effect of (Z)-5-amino-N'-aryl-1-methyl-1H-imidazole-4-carbohydrazonamides derivatives on the PHA-induced proliferation on human lymphocytes

Compound	IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	Viability (% of control)
2h	8.7 \pm 0.9	\geq 95
2k	29.2 \pm 5.0	\geq 70
2l	13.8 \pm 2.3	\geq 95
Cyclosporin A	0.24 \pm 0.1	nd

Cyclosporin A was used as positive control. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments in duplicate. Nd, not determined

All the imidazoles inhibited the PHA-induced proliferation of human lymphocytes in a dose-dependent manner (Data not shown). Compound 2h was the most potent compound tested exhibiting a strong inhibitory effect. The antiproliferative effect of these imidazoles was not due to a toxic effect on lymphocytes since non-stimulated mononuclear cells exposed to IC₅₀ concentrations consistently had viabilities \geq 70%, when compared to control cells.

Discussion

Antifungal compounds with different mechanisms of action are currently used in therapeutics. But the final antifungal activity of a molecule can be the result of several effects in the fungal cell.

C. albicans is the most pathogenic species of *Candida* sp due to its several virulence factors, which include the production of germ tubes, proteases, biofilms and prostaglandins, among others (Liu et al., 2014; Lopes et al., 2013).

Both *C. albicans* and *C. dubliniensis* are able to produce germ tubes *in vivo*. The formation of the germ tube is an important factor for the virulence of *C. albicans* and the inhibition of dimorphic transition is one of the mechanisms by which antifungal agents reduce the yeast virulence (Lopes et al., 2013). Some authors also refer to the possibility

of treating systemic mycosis only by inhibiting *C. albicans* germ tube production (Saville et al., 2006).

Only compound 2h was able to inhibit *C. albicans* dimorphic transition, and this effect can potentiate the compound effect against this yeast.

Besides the main mechanism of antifungal action, many antifungal drugs interferes with other targets on fungi cell. Mitochondria is an intracellular organel that contain the respiratory chain and participates in several processes as ATP production, oxidative burst, apoptosis, among others (Droge et al., 2002). Compounds can interact with mitochondrial functions and inhibit its growth and/or induce their dead by apoptosis (Ruy, Vercesi et al. 2006, Martins Vde, Dinamarco et al. 2011, Lopes, Pinto et al. 2013). At concentration two fold superior of MIC values, all the compounds significantly reduced *C. krusei* mitochondrial function, and their inhibitory effect can be in part due to this interaction. However, only compound 2k was able to achieve the same effect on mitochondrial *C. albicans* function.

Apart from the inhibition of fungi growth, many of the antifungal agents used in therapeutics also interferes with the immune system. Amphotericin B, one of the older antifungal drugs, is known to inhibit NO production by macrophages, PHA-induced T lymphocytes proliferation and cytokines production (Stewart, Spagnuolo et al. 1981, Chia and Pollack 1989, Cleary, Chapman et al. 1992, Rogers, Jenkins et al. 1998).

Besides that, the immunosuppressants cyclosporine A and FK506 are antifungal drugs due to their inhibition of calcineurin (Cruz, Goldstein et al. 2002). The effect of 2h, 2k and 2l on NO production by macrophages and Lymphocytes proliferation was evaluated.

The study of the immunomodulatory effect of compounds can include either the innate or adaptive immune responses (Fearon and Locksley, 1996). For this study the interference with NO production was selected as the model for interference with the innate cellular immune response. To evaluate the activity of the compounds on the adaptive specific immune responses the interference with lymphocytes proliferation was selected. (Cerqueira, 2004)

The inhibition of NO detection could be due to a real inhibition of NO by iNOS, a direct toxic effect on macrophages or a scavenger activity of the NO produced (Cerqueira et al., 2008). For those reasons, when a decrease of NO production is detected, the

cytotoxic and scavenger effect of compounds should be excluded. The evaluation of the NO scavenger effect of compounds should be performed in a cell-free system, where NO is spontaneously generated by sodium nitroprusside in water, at pH 7.0 (Cerqueira et al., 2008; De las Heras et al., 1997, 1999). All the compounds showed to be potent inhibitors of NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, and their effect was not associated neither to a cytotoxic nor a NO scavenger effect.

In the present work it was also showed that all the imidazole derivatives are good inhibitors of the mitogenic response of human lymphocytes to PHA, being 2h the most potent inhibitor. The antiproliferative effect was not due to a direct cytotoxic effect of the compounds.

For all these results it can be concluded that the imidazole derivatives 2h, 2k and 2l are promising antifungal drugs, combining an important immunomodulatory effect. These compounds could allow the design of new strategies for the treatment of disseminated *C. albicans* due to the interference with the germ tube formation, an important virulence factor, or the antifungal treatment of transplant recipients.

TRABALHO EXPERIMENTAL III

Inhibitory effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives on
Candida sp biofilm on a nanohydroxyapatite substrate

III.1. Material e métodos

Reagentes

A Hidroxiapatite nanométrica (nanoHA) foi fornecida pela empresa Fluidinova S.A., Portugal. O Sabouraud Dextrose Agar (SDA), foi adquirido da Liofilchem. O Yeast Nitrogen Base (YNB) foi adquirido pela BD Difco. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Applichem. O cacodilato de sódio foi adquirido pela Fluka e a solução salina pela JT Baker. Todos os outros reagentes foram da Sigma-Aldrich.

Síntese dos materiais de nanohidroxyapatite (nanoHA)

Discos de (nanoHA) com aproximadamente 21 mm² foram sintetizados pela investigadora Liliana Grenho do Instituto de Engenharia Biomédica (INEB).

Leveduras e condições de crescimento

As leveduras *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram obtidas a partir de culturas frescas com 24h de crescimento em placas de SDA e preparadas em meio YNB suplementado com glucose de forma a obter uma densidade 5×10^2 e 1×10^6 UFC/mL.

Efeito dos compostos sobre a formação de biofilme de *Candida* sp

A avaliação do efeito dos compostos sobre a formação de biofilme de *Candida* sp na superfície dos discos de nanoHA foi baseada na técnica descrita por Bachamann *et al* (2002) e Balestrino *et al* (2009). Resumidamente, inocularam-se numa placa de 96 poços, contendo discos de nanoHA, 50 µL das suspensões das leveduras anteriormente preparadas e 50 µL dos compostos previamente diluídos em meio YNB suplementado com glucose. Após 24h de incubação num banho de água (GFL 1083) com agitação moderada a 37°C, efetuaram-se duas lavagens cuidadosas das amostras com solução salina de forma a remover as células não aderidas. Três réplicas foram utilizadas para quantificar o número de células aderidas pela contagem das UFC enquanto duas réplicas foram tratadas para visualização através de microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Foram ainda incluídos em todas as experiências os seguintes controlos: levedura em meio de cultura (100% de crescimento), meio de cultura (0% de crescimento).

Efeito dos compostos sobre biofilmes pré-formados de *Candida* sp

A avaliação do efeito dos compostos sobre biofilmes de *Candida* sp pré-formados na superfície dos discos de nanoHA foi baseada na técnica descrita por Bachamann *et al* (2002) e Balestrino *et al* (2009) inocularam-se 100 µL das suspensões das leveduras inicialmente preparadas numa placa de 96 poços, de fundo plano, contendo os discos de nanoHA. Após 24h de incubação num banho com agitação moderada a 37°C, efetuou-se uma lavagem cuidadosa das amostras com solução salina de forma a remover as células não aderidas e adicionaram-se 100 µL dos compostos previamente diluídos em meio YNB suplementado com glucose. As placas foram novamente colocadas a incubar durante 24h num banho com agitação moderada a 37°C. Após incubação efetuaram-se duas lavagens das amostras com solução salina e três réplicas foram utilizadas para quantificar o número de células aderidas pela contagem das UFC enquanto duas réplicas foram tratadas para visualização através de MEV. Foram ainda incluídos em todas as experiências os seguintes controlos: levedura em meio de cultura (100% de crescimento), meio de cultura (0% de crescimento).

Contagem das unidades formadoras de colónias (UFCs)

Após as lavagens, as amostras de nanoHA foram transferidas para eppendorfs contendo 1mL de solução salina e foram colocados durante 5 min num banho de ultra-sons (35 kHz, Bandelin-RK 156) De seguida, efetuaram-se diluições decimais a partir da solução sonicada em solução salina e procedeu-se ao respetivo plaqueamento pelo método da gota em meio SDA. Os números de colónias formadas após 24h de incubação a 37°C foram expressas em UFCs/mL, calculado segundo a equação: $\text{UFCs/mL} = \text{número de colónias} \times \text{fator de diluição} / \text{volume inoculado}$.

De seguida, os valores de UFCs/mL foram ajustados à área dos discos de forma a serem expressos em UFCs/mm²

Visualização das amostras por microscopia eletrónica de varrimento (MEV)

Após as lavagens, as células foram fixadas com glutaraldeído a 3% (diluído em tampão cacodilato de sódio 0.14M) durante 30 minutos. De seguida, o fixador foi rejeitado e as amostras foram desidratadas com soluções graduais de etanol (50, 60, 70, 80, 90 e

100% (v/v) em água destilada) durante 10 minutos em cada concentração. Finalmente, o etanol absoluto foi removido e as amostras foram expostas a soluções de HMDS de concentrações graduais (50, 60, 70, 80, 90 e 100% (v/v) em etanol absoluto) durante 10 min em cada concentração. A solução 100% de Hexamethildizilazano (HMDS) foi deixada a evaporar, na hotte, durante a noite. Posteriormente, as amostras foram coladas em suportes de alumínio com o auxílio de fita de carbono e revestidas com um filme fino de ouro/paládio, por pulverização catódica, utilizando o equipamento SPI Module Sputter Coater e, finalmente, observadas ao microscópio (FEI Quanta 400 FEG/ESEM) com o auxílio da técnica Dra. Daniela Silva no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP)

Estatística

Os dados foram analisados usando o software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). (versão 21 para o Windows). Realizou-se uma análise de variância (one-way ANOVA), utilizando o teste de comparação múltipla de Tukey, com um nível de significância estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

III.2.Resultados e discussão

“Artigo em preparação”

Inhibitory effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives on *Candida* sp biofilm on a nanohydroxyapatite substrate

Abstract

Most manifestations of candidiasis are associated with biofilm formation on biological or synthetic surfaces and given that *Candida* biofilms are intrinsically resistant to treatment with conventional antifungal therapies there is a strong medical but also economical motivation for the development of novel antifungal biofilm agents. In the present work the activity of three novel imidazole derivatives, 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones, to prevent *C. albicans* and *C. krusei* biofilm formation as well as to eradicate preformed *Candida* sp biofilms on nanohydroxyapatite (nanoHA) substrate was investigated. To address these goals, both quantitative methods by cultivable cell numbers and qualitative evaluation by scanning electron microscopy were used. The three tested antifungal agents displayed strong inhibitory effect on biofilm development by both *Candida* species as potent *in vitro* activity against sessile *C. albicans* cells within biofilms. Moreover, morphological changes following treatment with the imidazole derivatives were observed. Together these findings indicated that the potent activity of 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives on *Candida* sp biofilms is worthy to further investigation for the development of preventive approaches as for the treatment of biofilm-associated infections involving biomaterials.

Keywords: 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones, nanohydroxyapatite, *Candida* biofilm.

Introduction

Yeast cells have a high potential to adhere and colonize surfaces of a wide range of synthetic materials of polymeric, ceramic, and metallic compositions in almost the same manner as to host mucosal surfaces (Douglas 2003, Blankenship and Mitchell 2006, Coad, Kidd et al. 2014) . In particular, *Candida* organisms are normal commensals of humans, which facilitates their encounter with most implanted biomaterials and this eventually leads to the formation and establishment of proliferating biofilms (Ramage, Martinez et al. 2006, Coad, Kidd et al. 2014). Biofilms are structured microbial

communities attached to surfaces and encapsulated within a protective extracellular matrix that provides survival advantage to the cells under unfavorable environmental conditions (Costerton, Lewandowski et al. 1995). Mature *C. albicans* biofilms have a complex three-dimensional architecture with wide spatial heterogeneity, and consist of a mixture of morphological forms namely yeast, pseudohyphae and hyphae, encased within a matrix of polysaccharides, carbohydrate, protein, and unknown components (Kojic and Darouiche 2004, Inigo, Peman et al. 2012). Not only *Candida* colonization of biomaterials precedes infection, but it can also adversely affect the function of the implanted device. Once *Candida* biofilms is formed *in vivo*, removal of the substrate that is supporting the biofilm growth is almost always required to eliminate the infection and to avoid potentially fatal consequences, such as life-threatening systemic infections and device malfunction (Douglas 2003, Kojic and Darouiche 2004). From the clinical perspective, the most important feature of *Candida* biofilms is their resistance to host defence mechanisms and to antifungal agents, often resulting in serious and persistent infections (Blankenship and Mitchell 2006, Ramage, Mowat et al. 2009). Several groups have demonstrated the intrinsic resistance of *Candida* biofilms to the most commonly used antifungal agents (Bachmann, VandeWalle et al. 2002). Moreover, with the increasing incidence of drug-resistant pathogens, there is a continuous need for the development of newer and more potent antimicrobial agents that are effective against *Candida* biofilm (Al-Bakri, Othman et al. 2009, Lee, Ng et al. 2013). In a previous work, our group reported the synthesis and antifungal activity of a series of novel 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones. These new imidazole derivatives exhibited promising antifungal activity and three of them, (*Z*)-5-amino-*N'*-aryl-1-methyl-1*H*-imidazole-4-carbohydrazonamides **1** [aryl=phenyl (**2h**), 4-fluorophenyl (**2k**), 3-fluorophenyl (**2l**)], have proven to be very effective against the different clinically important yeasts *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* (Ribeiro, Gabriel et al. 2014).

Therefore, the aims of this study were: (i) evaluate the *in vitro* effectiveness of these three novel lead antifungal agents on *C. albicans* and *C. krusei* biofilm formation on nanohydroxyapatite substrate; (ii) determine the interference of the compounds with a preformed *Candida* sp biofilm. To achieve our goals, both quantitative assay using cultivable cell numbers and qualitative evaluation using scanning electron microscopy were used.

Material and methods

Preparation of nanohydroxyapatite materials

Nanohydroxyapatite (nanoHA; nanoXIM·HAp202; Fluidinova S.A.) powder, uniaxially pressed as a cylindrical disc sample, was heat-treated at 830°C during 15 min using a heat rate of 20°C/min, as described herein (Barros, Grenho et al. 2014). Prior to biological experiments, the biomaterials were sterilized by dry heat (180°C, 2 hours).

Compounds

The stock solutions of 2h, 2k and 2l imidazole derivatives were prepared as described elsewhere (Ribeiro, Gabriel et al. 2014) and were freshly solubilised in dimethyl sulfoxide (DMSO, Applichem) at 10 mg/mL. Subsequent dilutions of these compounds were made in 1x solution of yeast nitrogen base (YNB, Fluka) supplemented with glucose to obtain the desired concentrations, just prior the assays.

Strains and growth conditions

Candida albicans and *C. krusei* reference ATCC strains 10231 and 6258, respectively, were subcultured and grown in Sabouraud dextrose agar plates (SDA, Liofilchem,) at 37°C for 24 hours. After cultured, cells were harvested and diluted to the desired concentrations with supplemented YNB medium.

Effect of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives on *Candida* spp biofilm formation

The compounds were tested to evaluate their potential to prevent biofilm formation of *C. albicans* and *C. Krusei* on nanoHA surface, as previously described with some adaptations (Bachmann, VandeWalle et al. 2002, Balestrino, Souweine et al. 2009). Briefly, 50 µL of yeast suspension (final concentration of 5×10^2 or 1×10^6 cells/mL) were added to equal volume of compounds concentrations (1:2 dilutions) into a well of a 96-flat bottom plate, containing nanoHA discs. The cells were allowed to adhere on the disc surface for 24 hours at 37°C with moderate shaking. Discs of nanoHA incubated only with yeast suspension were used as the non-treated control. After

incubation the medium was removed and the materials were gently rinsed twice with saline solution (0.9% NaCl, JT Baker) to remove non-adherent cells. The anti-biofilm effect was determined by colony-forming units (CFU) and scanning electron microscopy (SEM), as described below.

Effect of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives on preformed *Candida* sp biofilm

The ability of imidazole derivatives to eradicate established *C. albicans* and *C. Krusei* biofilms was assessed, as previously described with some adaptations (Bachmann, VandeWalle et al. 2002, Balestrino, Souweine et al. 2009). Briefly, 100 µL of standardized cell suspension (final concentration of 5×10^2 or 1×10^6 cells/mL) were added into every well of a 96-flat bottom plate, containing nanoHA discs, and the plates were kept at 37°C for 24 hours, with moderate shaking, to allow biofilm formation on nanoHA surface. After incubation, the medium was discarded and each biomaterial sample harbouring biofilm was rinsed once with saline solution to eliminate non-adherent cells. The compounds (100 µL per well), at different concentrations, were added into the wells and the plates were incubated for an additional 24 hours period at 37°C, with moderate shaking. The non-treated *Candida* cells were incubated with supplemented YNB. Following incubation, the medium was removed and the materials were gently rinsed twice with saline solution. The antifungal effect of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives against sessile cells was assessed by CFU and SEM, as described below.

Cultivable cell number

To quantify the number of viable cells on material surface, nanoHA discs were transferred to an Eppendorf with 1 mL of saline solution and shaken for 5 min in an ultrasonic bath (35 kHz, Bandelin-RK 156). Then, the solution containing the dispersed cells was diluted and spread on SDA plates. After inoculation, the plates were incubated at 37°C for 24 h. *Candida* colony numbers were counted and expressed as CFU/mm².

Scanning electron microscopy

The 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones morphological effect on *C. albicans* and *C. krusei* biofilm formation and against preformed biofilms was observed under SEM. Initially, the cells on nanoHA surface were fixed with 3% (v/v) glutaraldehyde (Sigma–Aldrich) for 30 minutes at room temperature and, subsequently, dehydrated in a series of ethanol-water solutions followed by a series of hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma–Aldrich)-ethanol solutions from 50% to 100%, for 10 min each, and finally air dried overnight. The samples were attached on aluminum stubs with carbon tape, sputter-coated (SPI-Module) with a thin conductive film of Au-Pd alloy and then imaged by SEM using a FEI Quanta 400 FEG/ESEM microscope, under 500x and 5000x magnification in the high-vacuum mode at 15.00 kV accelerating voltage.

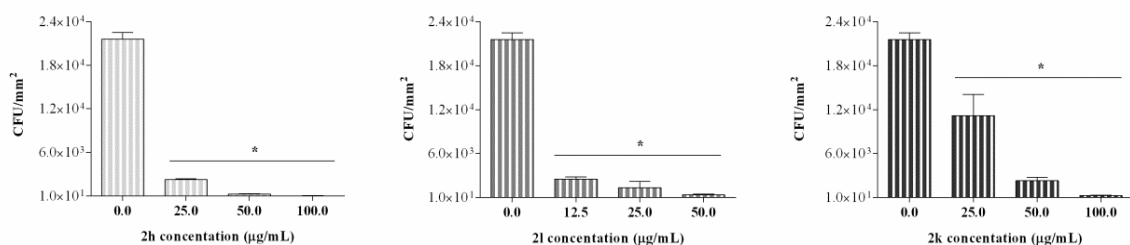
Statistical analysis

Each condition was tested in triplicate and two independent experiments were performed. The experimental data were expressed as the mean \pm standard deviation and analyzed using IBM® SPSS® Statistics (vs. 19.0, SPSS, USA). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the *post hoc* Tukey HSD multiple comparison test was used to denote the significance level ($p < 0.05$).

Results

Ability of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives to prevent *Candida* spp biofilm formation

Candida albicans



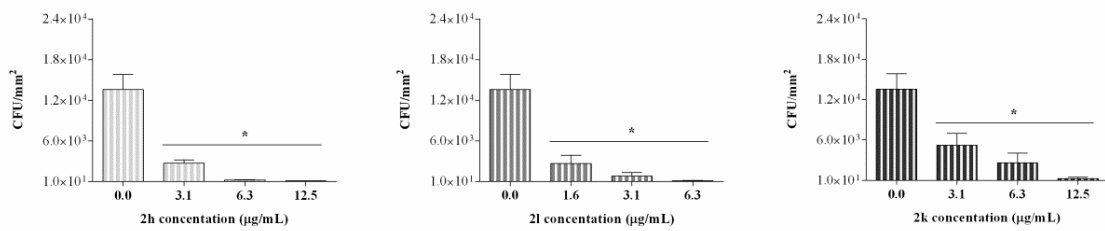
Candida krusei

Figure 1. Effect of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives on *C. albicans* and *C. krusei* biofilm formation on nanoHA surface. Biofilms were formed in the presence of different concentrations of antifungal agents and the number of adherent viable cells was determined by cultivable cell number (CFU/mm²) after 24 hours incubation. *Significant difference between antifungal treatment and the control (p<0.05).

Based on a previous work by (Ribeiro, Gabriel et al. 2014) where the minimal inhibitory concentration (MIC) of 2h, 2k and 2l compounds against *C. albicans* and *C. Krusei* was determined, the concentrations tested in the current study were established and they were the MIC, 2-fold increase or 2-fold decrease in MIC, for each *Candida* species.

The best approach to control biofilm formation is to prevent colonization by exposing simultaneously the biomaterials with antifungal agents to the yeast cells. Thus, these different concentrations of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives were used and the effect on subsequent biofilm formation was assessed by cultivable cell number assay, using different initial inoculums. For the lowest inoculum tested (5x10² CFU/mL) no viable adherent cells were detected on material surface when incubated for 24 hours with the antifungal agents, for all the concentrations tested (data not shown). For higher initial inoculum (1x10⁶ CFU/mL), a significant reduction in the number of adherent cells for the three antifungal agents was observed compared to that on non-treated (control) materials (Fig. 1). Noteworthy results were observed for the two highest concentrations tested, of the three components, with a reduction higher than 80%, for both *Candida* species.

Effect of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives on preformed *Candida* spp biofilm

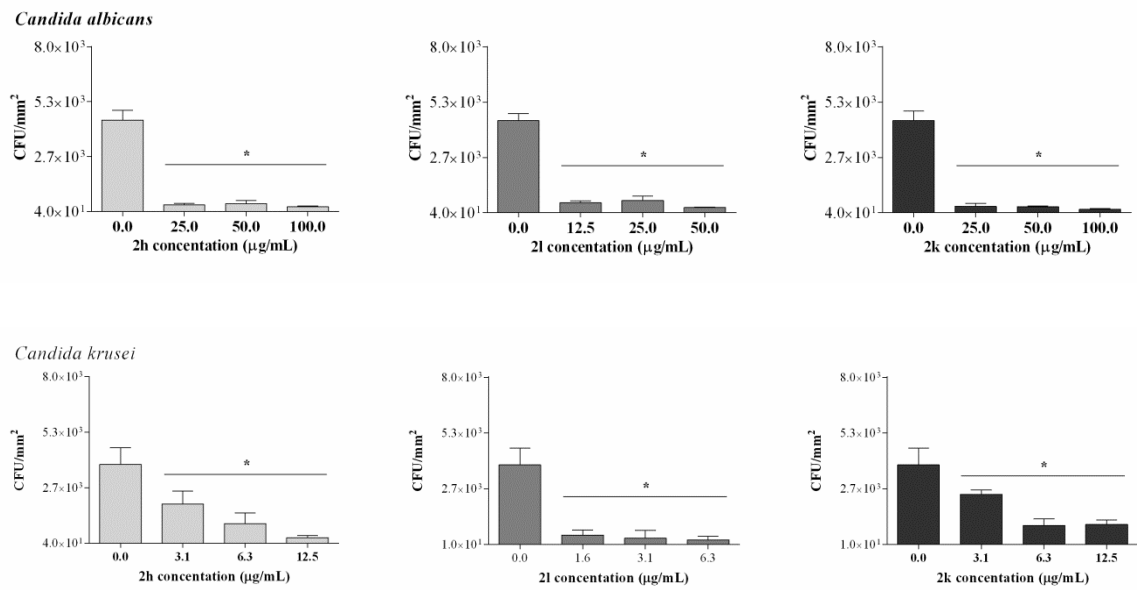


Figure 2. Number of remaining viable cells on nanoHA surface after treatment of a 24-hours biofilm of *C. albicans* and *C. krusei* with different concentrations of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives (µg/mL). Initial yeast inoculum of 5×10^2 CFU/mL. * $p < 0.05$, statistically significant differences compared to control (non-treated cells).

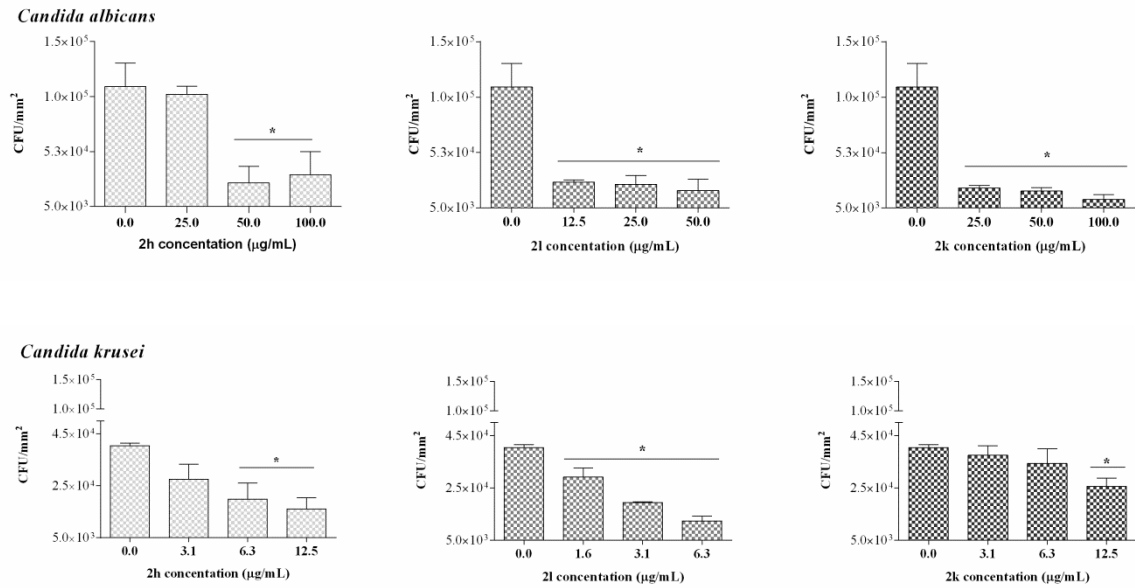


Figure 3. Number of remaining viable cells on nanoHA surface after treatment of a 24-hours biofilm of *C. albicans* and *C. krusei* with different concentrations of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives (µg/mL). Initial yeast inoculum of 1×10^6 CFU/mL. * $p < 0.05$, statistically significant differences compared to control (non-treated cells).

To explore the efficacy of imidazole derivatives in biofilm elimination, *C. albicans* and *C. krusei* were cultured, at different initial inoculums, for 24 hours on nanoHA discs to develop biofilms prior to the treatment. The preformed biofilms were then exposed to the antifungal agents and after 24 hours, the number of viable adherent cells was analyzed by cultivable cell number assay.

For the treatment of a biofilm formed with an initial inoculum of 5×10^2 CFU/mL, a reduction higher than 90% in the number of remaining viable *C. albicans* cells was observed, comparatively to non-treated biofilms, for the three tested concentration, as depicted in fig. 2. Similar profiles were observed for the three compounds. For *C. krusei*, 2l compound exhibited the highest anti-biofilm effect with an 88% reduction with concentration as low as 1.6 µg/mL. Nevertheless, for the three compounds and for their three concentrations tested a significant reduction was observed in the sessile cell number. Moreover, for the highest concentrations tested a sharp reduction, up to 95% was confirmed.

A second set of experiments were performed with higher initial inoculum (1×10^6 CFU/mL) (Fig. 3). Interestingly, for *C. albicans*, despite the increase of initial inoculum, and consequently dense biofilm, similar profiles of compounds effect was observed for the two highest concentrations tested comparatively to the previous results (Fig. 2). On the other hand, for *C. krusei* a concentration-dependent effect was observed in the adherent cells however the reduction observed never reach values higher than 61%, 70% and 38% for 2h, 2l and 2k compounds, respectively (Fig. 3).

Direct visualization of 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives effect on *Candida* sp biofilm

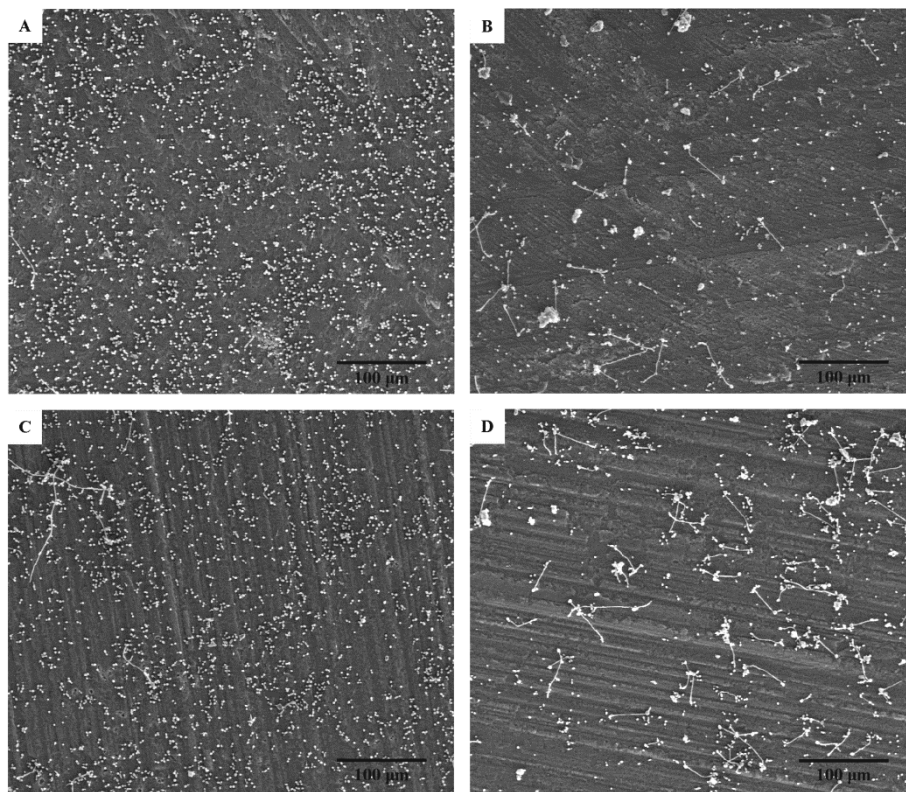


Figure 4. Morphology and spatial distribution of *C. albicans* cells on nanoHA surface after 24 hours exposure to 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives under SEM observation. (A) no compound (control); (B) 2l; (C) 2k and (D) 2h derivatives at 0 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25.0 µg/mL respectively. Scale bar 100 µm.

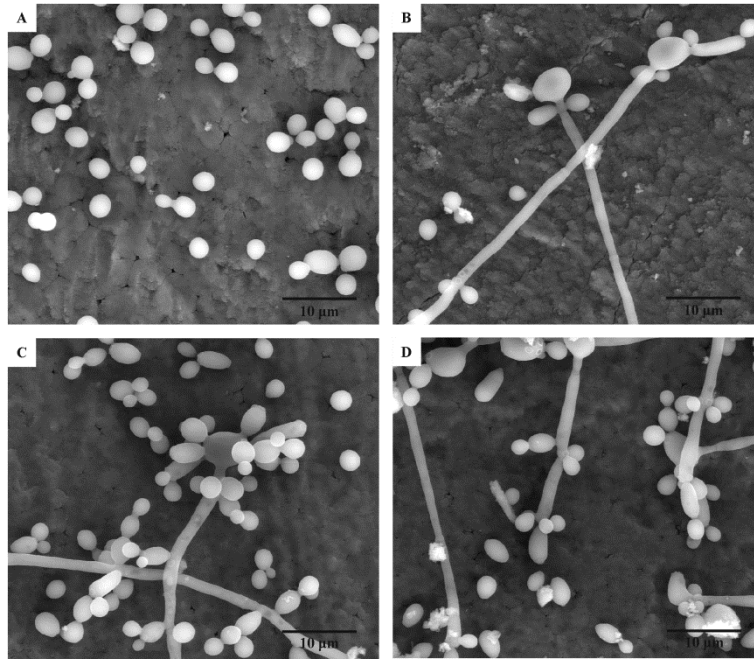


Figure 5. Morphology of *C. albicans* cells on nanoHA surface after 24 hours exposure to 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives under SEM observation. (A) no compound (control); (B) 2l; (C) 2k and (D) 2h derivatives at 0 μ g/mL, 12.5 μ g/mL, 25.0 μ g/mL respectively. Scale bar 10 μ m.

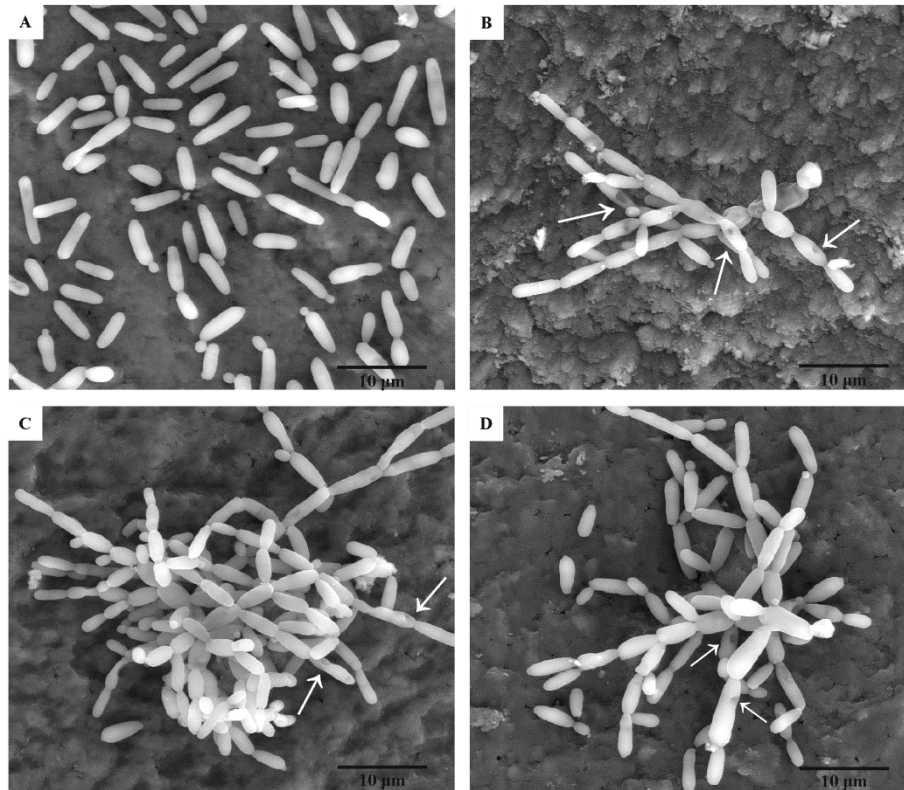


Figure 6. Morphology of *C. krusei* cells on nanoHA surface after 24 hours exposure to 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives under SEM observation. (A) no compound (control); (B) 2l; (C) 2k and (D) 2h derivatives at 0 µg/mL, 1.6 µg/mL, 3.1 µg/mL respectively. Scale bar 10 µm.

SEM analysis, as exemplified in figure 4, had shown a reduction in the number of adherent cells on nanoHA surface for both *Candida* species, for all three components tested, either for biofilm prevention or biofilm elimination experimental approaches, confirming the data from CFU assays. For *C. albicans*, a dimorphic transition was noted when the cells were exposed to the compounds, more evident to 2h compound, while non-treated cells exhibited a predominately yeast morphology (Fig. 5). Higher amplification enables the visualization of round or oval blastospores aggregated either in pairs or clumps for both *Candida* species with some budding yeasts (Fig. 5 and 6). However, while *C. albicans* structures had a full shape and smooth surface (Fig. 5), some *C. krusei* cells treated with 5-aminoimidazol-4-carboxamidrazones derivatives appeared shrunken, wrinkled and disc-like depressions, with different depths, were present in the cell surface, as indicated in Fig. 6.

Discussion

The infection rate of *Candida* has increased greatly with the extensive use of antibiotics, hormones and immune agents. In particular, nosocomial infections with any *Candida* species are becoming increasingly important. More than 90% of invasive infections are caused by *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. krusei* (Pfaller and Diekema 2007). Whereas the rate of successful treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis remains high, foreign-body infections with *Candida* spp can be a therapeutic challenge. One major reason for the low success rate in treating these infections is that a majority of them are caused by pathogenic biofilms on the surface of implants (Bachmann, VandeWalle et al. 2002, Burgers, Hahnel et al. 2010). Biofilm formation is a survival strategy, since biofilm yeasts are more resistant to antifungal agents and environmental stress. The antifungal resistance is a multifactorial process that may include multidrug efflux pumps or target proteins of the ergosterol biosynthetic pathway (Inigo, Peman et al. 2012). Therefore, there is a continuous need for the discovery and development of new antifungal therapeutic agents, which are not subject to these resistance mechanisms that result in treatment failure.

The main goal of this study was to evaluate the effect of three novel 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives either to prevent or eliminate *C. albicans* and *C. krusei* biofilms. Both yeast species are pivotal causative agents of biomedical devices infections (Pfaller and Diekema 2007). Moreover, *C. krusei* has emerged as a resistant strain to fluconazole and other clinically available azoles (Ribeiro, Gabriel et al. 2014). The biofilm studies were performed on nanoHA substrate which is the most frequently used ceramic material for coating metallic implants or filling small bone defects in the orthopaedic and dental field, due to its high biocompatibility and bioactivity (Ferraz, Monteiro et al. 2004, Burgers, Hahnel et al. 2010).

The results obtained indicate that 2h, 2l e 2k compounds were highly efficacious on *Candida* spp biofilm prevention at concentrations similar or lower to their MICs. Concerning *Candida* spp biofilm elimination, different effects were observed depending on the initial inoculum used. For less dense biofilms, the tested compounds showed to be very effective for both *Candida* species however, for denser biofilms a noteworthy difference was observed among the two species, in which *C. albicans* was very sensitive to 2l and 2k compounds. Thus, the initial inoculum and species used for biofilm studies

on biomaterials *in vitro* play an important role on the subsequent compounds effect results.

Furthermore, to investigate whether the inhibitory mechanism of 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives on *C. albicans* and *C. krusei* was consistent with the mechanism of typical antifungal drugs, mainly through the inhibition of ergosterol biosynthesis, in the present study, the derivatives effects on the morphology of *Candida* spp cells were analyzed by SEM. As expected, morphology predominantly yeast on non-treated samples was observed for *C. albicans* and such behavior is related with the hydrophilic nature of nanoHA (Barros, Grenho et al. 2014). As pointed out by other authors, the adherence of the yeast form is increased by hydrophilic coatings (Yoshijima, Murakami et al. 2010). However, after exposure to the imidazol derivatives, a dimorphic transition was observed, more evident to 2h compound, even so the cellular structures remain with a full shape and smooth surface. The observed transition from the yeast to the hyphal form is a common behavior during biofilm formation yet, it is a sign of cell virulence, once hyphal formation is essential for tissue invasion (Sudbery, Gow et al. 2004, Seneviratne, Jin et al. 2008, Yoshijima, Murakami et al. 2010). Concerning *C. krusei*, the majority of cell surfaces were smooth and free of wrinkles, although some of them display disc-like depressions in the surfaces, in accordance to that recently reported by Ma *et al* (2014). And, as suggested by this author, these morphological changes may indicate that the antifungal effect was the consequence of a loss of integrity of the cell surface and changes in cell membrane permeability (Ma, Li et al. 2014). These different morphological changes according *Candida* species may underline that different effects are occurring.

Overall, the 2h compound had shown the less appealing results once the majority of *C. albicans* cells showed dimorphic transition and significant reduction in the number of remaining viable cells were only observed to concentrations as high as the MIC (50 µg/mL) for the preformed biofilm experiment with the higher inoculum tested (Fig. 3). On the other side, 2l proved to be the most effective compound for both *C. albicans* and *C. krusei* for the lowest concentration tested 12.5 and 1.6 µg/mL, respectively. In general, better results were achieved for an initial phase of cell adhesion or for less dense biofilm therefore, the administration of this novel agents in the early stages of yeast adhesion either as preventive measure or treatment procedure are interesting feature for further formulations.

Conclusion

In conclusion, the three tested 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones derivatives have promising therapeutic potential since they display potent *in vitro* activity against *C. albicans* and *C. krusei* biofilm formation and preformed biofilms, which have been shown to be otherwise refractory to treatment with the most commonly used antifungal agents. The morphology of *C. albicans* and *C. krusei* was also affected by the compounds. Therefore, the present findings highlight the relevance of using these novel agents in the early stages of yeast adhesion either as preventive measure or treatment procedure of biomaterial-associated infections.

CONCLUSÕES GERAIS

Nos nossos dias há uma maior consciência da morbidade e mortalidade associadas a infecções fúngicas causadas por fungos resistentes em diversos grupos de pacientes, nomeadamente os imunocomprometidos. A pressão seletiva exercida pela exposição contínua aos antifúngicos parece ter um papel essencial no desenvolvimento de resistências, sendo urgente o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, para melhorar as estratégias terapêuticas atuais.

Os compostos derivados de 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona mostraram ter forte actividade contra leveduras que causam infecções sistémicas como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*. De realçar a forte actividade fungicida dos compostos 2h e 2k contra *C. krusei*, levedura que é intrinsecamente resistente ao fluconazol.

O mecanismo de ação dos compostos pode ser em parte devido à interação com a mitocôndria. Além disso o composto 2h inibe a formação do tubo germinativo para *Candida* sp e portanto o efeito inibidor do composto pode ser em parte devido a esta interação.

Adicionalmente, três derivados de 5-amino-imidazol-4-carboxamidrazona exibiram atividade imunossupressora na proliferação de linfócitos e produção de NO por macrófagos estimulados, sugerindo um forte potencial para utilização terapêutica em situações de transplante.

Finalmente, estes mesmos compostos revelaram ter uma forte actividade contra a formação de biofilme por *C.albicans* e *C.krusei*, bem como contra biofilmes pré-estabelecidos destas mesmas leveduras, em substratos de nanoHA, mostrando mais uma vez serem agentes promissores para a prevenção ou tratamento de infecções associadas a dispositivos médicos.

Referências bibliográficas:

Al-Bakri, A. G., G. Othman and Y. Bustanji (2009). "The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents." *J Appl Microbiol* **107**(1): 280-286.

Alem, M. A. and L. J. Douglas (2004). "Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(1): 41-47.

Alem, M. A. and L. J. Douglas (2005). "Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms." *J Med Microbiol* **54**(Pt 11): 1001-1005.

An, Y. H. and R. J. Friedman (1998). "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces." *J Biomed Mater Res* **43**(3): 338-348.

Arai, R., T. Sugita and A. Nishikawa (2005). "Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*." *Mycoses* **48**(1): 38-41.

Bachmann, S. P., K. VandeWalle, G. Ramage, T. F. Patterson, B. L. Wickes, J. R. Graybill and J. L. Lopez-Ribot (2002). "In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(11): 3591-3596.

Balestrino, D., B. Souweine, N. Charbonnel, A. Lautrette, C. Aumeran, O. Traore and C. Forestier (2009). "Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution." *Nephrol Dial Transplant* **24**(10): 3204-3209.

Barros, J., L. Grenho, C. M. Manuel, C. Ferreira, L. Melo, O. C. Nunes, F. J. Monteiro and M. P. Ferraz (2014). "Influence of nanohydroxyapatite surface properties on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation." *J Biomater Appl* **28**(9): 1325-1335.

Blankenship, J. R. and A. P. Mitchell (2006). "How to build a biofilm: a fungal perspective." *Curr Opin Microbiol* **9**(6): 588-594.

Boucher, H. W., A. H. Groll, C. C. Chiou and T. J. Walsh (2004). "Newer systemic antifungal agents : pharmacokinetics, safety and efficacy." *Drugs* **64**(18): 1997-2020.

Bulpa, P., A. Dive and Y. Sibille (2007). "Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J* **30**(4): 782-800.

Burgers, R., S. Hahnel, T. E. Reichert, M. Rosentritt, M. Behr, T. Gerlach, G. Handel and M. Gosau (2010). "Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins." *Acta Biomater* **6**(6): 2307-2313.

Canton, E., J. Peman, A. Viudes, G. Quindos, M. Gobernado and A. Espinel-Ingroff (2003). "Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species." *Diagn Microbiol Infect Dis* **45**(3): 203-206.

Casadevall, A., A. L. Rosas and J. D. Nosanchuk (2000). "Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*." *Curr Opin Microbiol* **3**(4): 354-358.

- Cerqueira, F., H. Cidade, L. van Ufford, C. Beukelman, A. Kijjoa and M. S. Nascimento (2008). "The natural prenylated flavone artelastin is an inhibitor of ROS and NO production." *Int Immunopharmacol* **8**(4): 597-602.
- Cerqueira, F., A. Cordeiro-da-Silva, N. Araujo, H. Cidade, A. Kijjoa and M. S. Nascimento (2003). "Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones: artelastin as a potent inhibitor." *Life Sci* **73**(18): 2321-2334.
- Chia, J. K. and M. Pollack (1989). "Amphotericin B induces tumor necrosis factor production by murine macrophages." *J Infect Dis* **159**(1): 113-116.
- Christenson, E. M., K. S. Anseth, J. J. van den Beucken, C. K. Chan, B. Ercan, J. A. Jansen, C. T. Laurencin, W. J. Li, R. Murugan, L. S. Nair, S. Ramakrishna, R. S. Tuan, T. J. Webster and A. G. Mikos (2007). "Nanobiomaterial applications in orthopedics." *J Orthop Res* **25**(1): 11-22.
- Cleary, J. D., S. W. Chapman and R. L. Nolan (1992). "Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells." *Antimicrob Agents Chemother* **36**(5): 977-981.
- Coad, B. R., S. E. Kidd, D. H. Ellis and H. J. Griesser (2014). "Biomaterials surfaces capable of resisting fungal attachment and biofilm formation." *Biotechnol Adv* **32**(2): 296-307.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber and H. M. Lappin-Scott (1995). "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Courchesne, W. E. and S. Ozturk (2003). "Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* **47**(1): 223-234.
- Cowen, L. E., S. D. Singh, J. R. Kohler, C. Collins, A. K. Zaas, W. A. Schell, H. Aziz, E. Mylonakis, J. R. Perfect, L. Whitesell and S. Lindquist (2009). "Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2818-2823.
- Cruz, M. C., A. L. Goldstein, J. R. Blankenship, M. Del Poeta, D. Davis, M. E. Cardenas, J. R. Perfect, J. H. McCusker and J. Heitman (2002). "Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*." *EMBO J* **21**(4): 546-559.
- Dagenais, T. R. and N. P. Keller (2009). "Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis." *Clin Microbiol Rev* **22**(3): 447-465.
- Datta, K., N. Jain, S. Sethi, A. Rattan, A. Casadevall and U. Banerjee (2003). "Fluconazole and itraconazole susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* at a tertiary care centre in India: a need for care." *J Antimicrob Chemother* **52**(4): 683-686.
- Denning, D. W. (2003). "Echinocandin antifungal drugs." *Lancet* **362**(9390): 1142-1151.

- Denning, D. W. and D. S. Perlin (2011). "Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace." *Future Microbiol* **6**(11): 1229-1232.
- De las Heras, B.; Navarro, A.; Dias-Guerra (1999) Inhibition of NOS-2 Expression in Macrophages through the inactivation of NF-KB by Andalusol.
- Donnelly, J. P. and B. E. De Pauw (2004). "Voriconazole-a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity." *Clin Microbiol Infect* **10 Suppl 1**: 107-117.
- Douglas, L. J. (2003). "Candida biofilms and their role in infection." *Trends Microbiol* **11**(1): 30-36.
- Espinel-Ingroff, A., A. Chowdhary, M. Cuenca-Estrella, A. Fothergill, J. Fuller, F. Hagen, N. Govender, J. Guarro, E. Johnson, C. Lass-Flörl, S. R. Lockhart, M. A. Martins, J. F. Meis, M. S. Melhem, L. Ostrosky-Zeichner, T. Pelaez, M. A. Pfaller, W. A. Schell, L. Trilles, S. Kidd and J. Turnidge (2012). "Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(6): 3107-3113.
- Ferraz, M. P., F. J. Monteiro and C. M. Manuel (2004). "Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies." *J Appl Biomater Biomech* **2**(2): 74-80.
- Ferreira, W., Sousa, J.C. (2000). *Microbiologia*, Volume 1. Lisboa. Lidel
- Fridkin, S. K. (2005). "The changing face of fungal infections in health care settings." *Clin Infect Dis* **41**(10): 1455-1460.
- Giri, S. and A. J. Kindo (2012). "A review of Candida species causing blood stream infection." *Indian J Med Microbiol* **30**(3): 270-278.
- Goodwin, S. D., J. D. Cleary, C. A. Walawander, J. W. Taylor and T. H. Grasela, Jr. (1995). "Pretreatment regimens for adverse events related to infusion of amphotericin B." *Clin Infect Dis* **20**(4): 755-761.
- Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." *Anal Biochem* **126**(1): 131-138.
- Guo, Q., S. Sun, J. Yu, Y. Li and L. Cao (2008). "Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods." *J Med Microbiol* **57**(Pt 4): 457-462.
- Gupta, A. K. and E. A. Cooper (2008). "Update in antifungal therapy of dermatophytosis." *Mycopathologia* **166**(5-6): 353-367.
- Harding, M. W., L. L. Marques, R. J. Howard and M. E. Olson (2009). "Can filamentous fungi form biofilms?" *Trends Microbiol* **17**(11): 475-480.
- Horn, D. L., L. Ostrosky-Zeichner, M. I. Morris, A. J. Ullmann, C. Wu, D. N. Buell, L. L. Kovanda and O. A. Cornely (2010). "Factors related to survival and treatment

success in invasive candidiasis or candidemia: a pooled analysis of two large, prospective, micafungin trials." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**(2): 223-229.

Inigo, M., J. Peman and J. L. Del Pozo (2012). "Antifungal activity against Candida biofilms." *Int J Artif Organs* **35**(10): 780-791.

Jabra-Rizk, M. A., W. A. Falkler and T. F. Meiller (2004). "Fungal biofilms and drug resistance." *Emerg Infect Dis* **10**(1): 14-19.

Jean, S. S., C. T. Fang, W. Y. Shau, Y. C. Chen, S. C. Chang, P. R. Hsueh, C. C. Hung and K. T. Luh (2002). "Cryptococcaemia: clinical features and prognostic factors." *QJM* **95**(8): 511-518.

Katsikogianni, M. and Y. F. Missirlis (2004). "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions." *Eur Cell Mater* **8**: 37-57.

Kojic, E. M. and R. O. Darouiche (2004). "Candida infections of medical devices." *Clin Microbiol Rev* **17**(2): 255-267.

Kuhn, D. M., T. George, J. Chandra, P. K. Mukherjee and M. A. Ghannoum (2002). "Antifungal susceptibility of Candida biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(6): 1773-1780.

Latge, J. P. (2001). "The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*." *Trends Microbiol* **9**(8): 382-389.

Lee, A. L., V. W. Ng, W. Wang, J. L. Hedrick and Y. Y. Yang (2013). "Block copolymer mixtures as antimicrobial hydrogels for biofilm eradication." *Biomaterials* **34**(38): 10278-10286.

Liu, S., Y. Hou, X. Chen, Y. Gao, H. Li and S. Sun (2014). "Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery." *Int J Antimicrob Agents* **43**(5): 395-402.

Lopes, G., E. Pinto, P. B. Andrade and P. Valentao (2013). "Antifungal activity of phlorotannins against dermatophytes and yeasts: approaches to the mechanism of action and influence on *Candida albicans* virulence factor." *PLoS One* **8**(8): e72203.

Ma, S., H. Li, C. Yan, D. Wang, H. Li, X. Xia, X. Dong, Y. Zhao, T. Sun, P. Hu and W. Guan (2014). "Antagonistic effect of protein extracts from on pathogenic bacteria and fungi of the oral cavity." *Exp Ther Med* **7**(6): 1486-1494.

Martins Vde, P., T. M. Dinamarco, C. Curti and S. A. Uyemura (2011). "Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets." *J Bioenerg Biomembr* **43**(1): 81-88.

Mateus, A. Y., C. C. Barrias, C. Ribeiro, M. P. Ferraz and F. J. Monteiro (2008). "Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications." *J Biomed Mater Res A* **86**(2): 483-493.

McKinsey, D. (2003). Making Best Use of the Newer Antifungal Drugs. *Cligot Publishing, Division of CMP Healthcare Media*.

Miceli, M. H., S. M. Bernardo and S. A. Lee (2009). "In vitro analyses of the combination of high-dose doxycycline and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms." *Int J Antimicrob Agents* **34**(4): 326-332.

Mukherjee, P. K. and J. Chandra (2004). "Candida biofilm resistance." *Drug Resist Updat* **7**(4-5): 301-309.

Nicod, L. P., J. C. Pache and N. Howarth (2001). "Fungal infections in transplant recipients." *Eur Respir J* **17**(1): 133-140.

Odds, F. C., A. D. Davidson, M. D. Jacobsen, A. Tavanti, J. A. Whyte, C. C. Kibbler, D. H. Ellis, M. C. Maiden, D. J. Shaw and N. A. Gow (2006). "Candida albicans strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing." *J Clin Microbiol* **44**(10): 3647-3658.

Ostrosky-Zeichner, L., A. Casadevall, J. N. Galgiani, F. C. Odds and J. H. Rex (2010). "An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond." *Nat Rev Drug Discov* **9**(9): 719-727.

Ostrosky-Zeichner, L., K. A. Marr, J. H. Rex and S. H. Cohen (2003). "Amphotericin B: time for a new "gold standard"." *Clin Infect Dis* **37**(3): 415-425.

Organização Mundial de Saúde. disponível em www.oms.org. consultado em Outubro de 2014

Pedro, M., F. Cerqueira, M. E. Sousa, M. S. J. Nascimento and M. Pinto (2002). "Xanthones as inhibitors of growth of human cancer cell lines and their effects on the proliferation of human lymphocytes in vitro." *Bioorganic & medicinal chemistry* **10**(12): 3725-3730.

Perfect, J. R. and T. Bicanic (2014). "Cryptococcosis Diagnosis and Treatment: What Do We Know Now." *Fungal Genet Biol*.

Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2004). "Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*." *J Clin Microbiol* **42**(10): 4419-4431.

Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." *Clin Microbiol Rev* **20**(1): 133-163.

Picazo, J. J., F. Gonzalez-Romo and F. J. Candel (2008). "Candidemia in the critically ill patient." *Int J Antimicrob Agents* **32 Suppl 2**: S83-85.

Pinto, E., K. Hrimpeng, G. Lopes, S. Vaz, M. J. Goncalves, C. Cavaleiro and L. Salgueiro (2013). "Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**(10): 1311-1320.

- Pinto, E., C. Pina-Vaz, L. Salgueiro, M. J. Goncalves, S. Costa-de-Oliveira, C. Cavaleiro, A. Palmeira, A. Rodrigues and J. Martinez-de-Oliveira (2006). "Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species." *J Med Microbiol* **55**(Pt 10): 1367-1373.
- Ramage, G., J. P. Martinez and J. L. Lopez-Ribot (2006). "Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem." *FEMS Yeast Res* **6**(7): 979-986.
- Ramage, G., E. Mowat, B. Jones, C. Williams and J. Lopez-Ribot (2009). "Our current understanding of fungal biofilms." *Crit Rev Microbiol* **35**(4): 340-355.
- Ramage, G., K. VandeWalle, S. P. Bachmann, B. L. Wickes and J. L. Lopez-Ribot (2002). "In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(11): 3634-3636.
- Reichenberger, F., J. M. Habicht, A. Gratwohl and M. Tamm (2002). "Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients." *Eur Respir J* **19**(4): 743-755.
- Ribeiro, A. I., C. Gabriel, F. Cerqueira, M. Maia, E. Pinto, J. C. Sousa, R. Medeiros, M. F. Proenca and A. M. Dias (2014). "Synthesis and antimicrobial activity of novel 5-aminoimidazole-4-carboxamidrazones." *Bioorg Med Chem Lett* **24**(19): 4699-4702.
- Rodrigues, M. L., C. S. Alviano and L. R. Travassos (1999). "Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms." *Microbes Infect* **1**(4): 293-301.
- Rogers, P. D., J. K. Jenkins, S. W. Chapman, K. Ndebele, B. A. Chapman and J. D. Cleary (1998). "Amphotericin B activation of human genes encoding for cytokines." *J Infect Dis* **178**(6): 1726-1733.
- Ruy, F., A. E. Vercesi and A. J. Kowaltowski (2006). "Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation." *J Bioenerg Biomembr* **38**(2): 129-135.
- Sales-Campos, H., L. Tonani, C. R. Cardoso and M. R. Kress (2013). "The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection." *Biomed Res Int* **2013**: 693023.
- Saliba, F. and B. Dupont (2008). "Renal impairment and amphotericin B formulations in patients with invasive fungal infections." *Med Mycol* **46**(2): 97-112.
- Sanglard, D., F. Ischer, O. Marchetti, J. Entenza and J. Bille (2003). "Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence." *Mol Microbiol* **48**(4): 959-976.
- Santolaya, M. E., T. Alvarado, F. Queiroz-Telles, A. L. Colombo, J. Zurita, I. N. Tiraboschi, J. A. Cortes, L. Thompson, M. Guzman, J. Sifuentes, J. I. Echevarria, M. Nucci and N. Latin American Invasive Mycosis (2014). "Active surveillance of

candidemia in children from Latin America: a key requirement for improving disease outcome." *Pediatr Infect Dis J* **33**(2): e40-44.

Scodavolpe, S., S. Quaranta, B. Lacarelle and C. Solas (2014). "Triazole antifungal agents: practice guidelines of therapeutic drug monitoring and perspectives in treatment optimization." *Ann Biol Clin (Paris)* **72**(4): 391-404.

Seneviratne, C. J., L. Jin and L. P. Samaranayake (2008). "Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review." *Oral Dis* **14**(7): 582-590.

Shi, W., Z. Chen, X. Chen, L. Cao, P. Liu and S. Sun (2010). "The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: an in vitro interaction of antifungal and antibacterial agents." *FEMS Yeast Res* **10**(7): 885-893.

Singh, N. and J. Heitman (2004). "Antifungal attributes of immunosuppressive agents: new paradigms in management and elucidating the pathophysiologic basis of opportunistic mycoses in organ transplant recipients." *Transplantation* **77**(6): 795-800.

Snelders, E., H. A. van der Lee, J. Kuijpers, A. J. Rijs, J. Varga, R. A. Samson, E. Mellado, A. R. Donders, W. J. Melchers and P. E. Verweij (2008). "Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism." *PLoS Med* **5**(11): e219.

Sousa, J. C. d. (2006). Manual de Antibióticos Antibacterianos. Porto.

Steinbach, W. J., J. L. Reedy, R. A. Cramer, Jr., J. R. Perfect and J. Heitman (2007). "Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections." *Nat Rev Microbiol* **5**(6): 418-430.

Stewart, S. J., P. J. Spagnuolo and J. J. Ellner (1981). "Generation of suppressor T lymphocytes and monocytes by amphotericin B." *J Immunol* **127**(1): 135-139.

Sudbery, P., N. Gow and J. Berman (2004). "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." *Trends Microbiol* **12**(7): 317-324.

Teixeira, M., F. Cerqueira, C. M. Barbosa, M. S. Nascimento and M. Pinto (2005). "Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules." *J Drug Target* **13**(2): 129-135.

Tobudic, S., C. Kratzer, A. Lassnigg and E. Presterl (2012). "Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms." *Mycoses* **55**(3): 199-204.

Torres, H. A., R. Y. Hachem, R. F. Chemaly, D. P. Kontoyiannis and Raad, II (2005). "Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal." *Lancet Infect Dis* **5**(12): 775-785.

Tortorano, A. M., E. Biraghi, A. Astolfi, C. Ossi, M. Tejada, C. Farina, S. Perin, C. Bonaccorso, C. Cavanna, A. Raballo, A. Grossi and F. C. S. Group (2002). "European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region." *J Hosp Infect* **51**(4): 297-304.

Tortorano, A. M., C. Kibbler, J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor and R. Grillot (2006). "Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance." *Int J Antimicrob Agents* **27**(5): 359-366.

White, G. A. and W. B. Elliott (1980). "Inhibition of electron transport and oxidative phosphorylation in plant mitochondria by gladiolic acid and structurally-related aromatic ortho dialdehydes." *Can J Biochem* **58**(1): 9-22.

Wingard, J. R. (2004). "Empirical antifungal therapy in treating febrile neutropenic patients." *Clin Infect Dis* **39 Suppl 1**: S38-43.

www.accessmedicine.com. consultado em Outubro de 2014

Yoshijima, Y., K. Murakami, S. Kayama, D. Liu, K. Hirota, T. Ichikawa and Y. Miyake (2010). "Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*." *Mycoses* **53**(3): 221-226.

Zhang, J., W. Liu, J. Tan, Y. Sun, Z. Wan and R. Li (2013). "Antifungal activity of geldanamycin alone or in combination with fluconazole against *Candida* species." *Mycopathologia* **175**(3-4): 273-279.