

CAPÍTULO 8

AUMENTO DA ATIVIDADE CONTRA *Candida* spp. POR NITRAÇÃO DE BENZOFENONAS E XANTONAS

Data de aceite: 10/01/2022

Data de submissão: 15/12/2021

Júlio Gonçalves da Silva

Departamento de Química, Universidade
Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte-MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-3714-3633>

Bianca Lana de Sousa

Departamento de Química, Universidade
Federal de Viçosa
Viçosa-MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-7801-490X>

Liseth Suárez Osorio

Departamento de Química, Universidade
Federal de Viçosa
Viçosa-MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-7589-7567>

Dayana Alves Rodrigues

Departamento de Química, Universidade
Federal de Viçosa
Viçosa-MG, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9589147578848483>

Maria Cecília Fernandes Dias

Departamento de Química, Universidade
Federal de Viçosa
Viçosa-MG, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2228288647207275>

Gabriela Milane Furlani

Departamento de Química, Universidade
Federal de Viçosa
Viçosa-MG, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3911500941572096>

Naiara Chaves Silva

Departamento de de Microbiologia e
Imunologia, Universidade Federal de Alfenas
Alfenas-MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0001-7731-7493>

Amanda Latércia Tranches Dias

Departamento de de Microbiologia e
Imunologia, Universidade Federal de Alfenas
Alfenas-MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0002-5359-4450>

Marcelo Henrique dos Santos

Departamento de Química, Universidade
Federal de Viçosa
Viçosa-MG, Brasil
<https://orcid.org/0000-0003-1440-4340>

RESUMO: A modificação química de compostos orgânicos, incluindo nitração, pode modular suas propriedades físico-químicas, como a solubilidade, estabilidade e toxicidade. Neste trabalho, foi proposta a nitração de benzofenonas e xantonas e avaliação de seus efeitos contra leveduras do gênero *Candida*, baseado nas atividades antimicrobianas previamente reportadas para essas classes de moléculas. Houve ganho de atividade em todos os seis derivados em relação aos precursores (não ativos contra nenhum fungo nas concentrações testadas). As benzofenonas nitradas e a xantona 1,3-dihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (**7**) exibiram elevada seletividade. A xantona 1,3-dihidroxi-4-nitro-9*H*-xanten-9-ona (**8**) foi: i) menos ativa contra *Candida krusei* ATCC 6258 do que seu precursor (**7**); ii) ativa contra quatro das cinco

leveduras testadas; iii) mais ativa contra *Candida glabrata* ATCC 90030 do que o fluconazol, usado como controle positivo. Assim, os derivados de benzofenonas e xantonas merecem ser estudados na síntese dirigida de inibidores de microrganismos.

PALAVRAS-CHAVE: Benzofenonas; Xantonas; Nitração; Atividade antifúngica.

INCREASE IN ACTIVITY AGAINST *Candida* spp. BY NITRATION OF BENZOPHENONES AND XANTHONES

ABSTRACT: Chemical modification of organic compounds, including nitration, can modulate their physicochemical properties, such as solubility, stability and toxicity. In this work, the nitration of benzophenones and xanthenes and evaluation of their effects against *Candida* genus yeasts were proposed, based on the antimicrobial activities previously reported for these classes of molecules. There was activity gain in all six derivatives in relation to precursors (not active against any fungus at the concentrations tested). Nitrated benzophenones and 1,3-dihydroxy-9*H*-xanthen-9-one xanthone (**7**) exhibited high selectivity. The 1,3-dihydroxy-4-nitro-9*H*-xanthen-9-one xanthone (**8**) was: i) less active against *Candida krusei* ATCC 6258 than its precursor (**7**); ii) active against four of the five yeasts tested; iii) more active against *Candida glabrata* ATCC 90030 than fluconazole, used as a positive control. Thus, benzophenone and xanthenes derivatives deserve to be studied in the directed synthesis of microorganism inhibitors.

KEYWORDS: Benzophenones; Xanthenes; Nitration; Antifungal activity.

1 | INTRODUÇÃO

Antifúngicos são as principais moléculas de ação contra fungos utilizadas em aplicações clínicas em humanos e animais (AWAD et al., 2018; RODRIGUES; RODRIGUES; HENRIQUES, 2019). Azóis, polienos, alenosamina e equinocandinas são os agentes antifúngicos mais utilizados no tratamento de infecções por *Candida* (AWAD et al., 2018; BROWN et al., 2012). Tais infecções podem ser graves e estão associadas aos altos períodos de internação e custos, além de elevadas taxas de mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos (BROWN et al., 2012). Por isso, antifúngicos são atualmente recomendados como medida profilática em indivíduos de alto risco (CANNON et al., 2009).

Apesar dos antimicrobianos serem eficazes e possuírem grande espectro de ação, o uso excessivo pode representar problemas graves. Dentre eles, efeitos colaterais, toxicidade e o desenvolvimento de resistência, intrínseca ou adquirida (BROWN et al., 2012; RODRIGUES; RODRIGUES; HENRIQUES, 2019). O uso indiscriminado de antimicrobianos tem sido associado à crescente incidência de infecções antifúngicas causadas por *Candida*, tais como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, além da *C. albicans* (AWAD et al., 2018; YANG et al., 2003).

O surgimento de linhagens resistentes e de resistência cruzada tem recebido grande atenção, uma vez que pode comprometer o uso de inibidores como agentes terapêuticos.

Diante disso, estratégias alternativas para combater microrganismos patogênicos têm sido pesquisadas, tais como modificações químicas de núcleos biologicamente ativos (DIAS et al., 2012). Como muitos medicamentos comerciais são derivados de produtos naturais, o estudo desses compostos é promissor para a descoberta de agentes antimicrobianos (LIN et al., 2018). Neste contexto, benzofenonas foram relatadas por apresentar atividade antimicrobiana contra o fungo *Sporothrix schenckii* e contra bactérias de campo que afetam aves, como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* (ARANDA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2017; SURANA et al., 2018). Alterações na lipofilicidade da guttiferona-A, derivado de benzofenona poliisoprenilada naturalmente encontrado em plantas da espécie *Garcinia brasiliensis*, demonstraram atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias patogênicos, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (DIAS et al., 2012).

Tendo conhecimento das atividades antimicrobianas atribuídas às benzofenonas, este trabalho objetivou a síntese de novas benzofenonas e xantonas nitradas e avaliação do potencial fungicida contra *C. albicans* SC5314, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

2 | METODOLOGIA

2.1 Síntese das benzofenonas e xantonas nitradas

A 2-hidróxibenzofenona (**1**) e a 2,4-dihidróxibenzofenona (**2**) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e foram utilizadas como materiais de partida para as demais benzofenonas.

A nitração das benzofenonas e xantonas (**3-6**; **8**) foi feita em um balão sob agitação e à temperatura ambiente, sendo adicionados 150 mg (1 equiv.) da benzofenona ou xantona precursora, 4,0 mL de ácido acético glacial e, lentamente, 6 equivalentes de ácido nítrico 65%. Após adição, a reação foi mantida em agitação até observação do consumo do material de partida por cromatografia em camada delgada (CCD). Após o término, a reação foi vertida em um funil de extração líquido-líquido contendo água e acetato de etila gelados. A fase orgânica foi separada e lavada 2 vezes com água fria, seca com sulfato de magnésio anidro e concentrada em evaporador rotatório de pressão reduzida. O material obtido da evaporação dos voláteis foi cromatografado, utilizando sílica gel como fase estacionária e diferentes misturas de acetato de etila, hexano e metanol como fase móvel, a depender do produto.

A síntese da 1,3-dihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (**7**) foi realizada em um balão contendo 500 mg de floroglucinol (1 equiv.), 547 mg de ácido salicílico (1 equiv.), 540 mg de ZnCl₂ anidro (1 equiv.) e POCl₃ como solvente (6 mL). A mistura reacional permaneceu sob agitação, atmosfera de nitrogênio e refluxo por 8 horas. Posteriormente, a solução foi transferida para um bquer contendo gelo, o material foi extraído com acetato de etila e

a fase orgânica foi lavada 2 vezes com água fria, seca com sulfato de magnésio anidro e concentrada em evaporador rotatório de pressão reduzida. O material obtido da evaporação dos voláteis foi cromatografado, utilizando sílica gel como fase estacionária e acetato de etila:hexano 2:1 (v/v) como fase móvel.

2.2 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi realizada segundo metodologia de microdiluição em caldo, conforme as normas estabelecidas pelo CLSI (2008; 2012) para leveduras, com modificações sugeridas pelo EDef 7.2 (EUCAST, 2008).

Os fungos utilizados foram leveduras do gênero *Candida* spp.: *C. albicans* SC5314, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. O cultivo dos fungos foi realizado a 30 °C, overnight, em meio Mueller-Hinton (MH, HIMEDIA, Mumbai, Índia).

As substâncias foram avaliadas nas concentrações de 100; 60; 30; 15; 7,5; 3,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as determinações das concentrações inibitórias mínimas de 50% do crescimento (IC_{50}) foram realizadas segundo critérios interpretativos dos mesmos documentos citados acima e baseadas no valor máximo de crescimento, conforme observado na coluna da microplaca reservada para o controle positivo do crescimento fúngico. Além do controle positivo de crescimento, composto por meio de cultura e microrganismo, o ensaio também envolveu controle de esterilidade do meio e controle interno do ensaio, com a utilização do antifúngico fluconazol. O experimento foi realizado em duas repetições biológicas, com triplicatas técnicas, em placa de microdiluição contendo 96 poços. A incubação foi realizada a 30 °C durante 48 h e a inibição do crescimento do microrganismo foi determinada por leitura de absorvância a 530 nm. Destaca-se que, conforme as especificações nos documentos padrões, é proposta e aceita variação na escala de concentrações inibitórias, desde que as concentrações estejam compreendidas em um valor correspondente a +/- 2log2 diluição. Segundo esse conceito, concentrações em valores absolutos diferentes, desde que compreendidos dentro da faixa descrita anteriormente, são consideradas semelhantes e coincidentes e, assim, a classificação do perfil de sensibilidade versus resistência não será alterada. Assim, médias ou desvios não foram aplicáveis aos resultados e, dessa forma, os mesmos foram apresentados em valores absolutos.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As moléculas orgânicas apresentam uma diversidade de aplicações na medicina, na agricultura e na indústria, com destaque na formulação de medicamentos, agroquímicos e cosméticos. Após a obtenção destes compostos, de forma natural, sintética ou semi-sintética, uma das maiores dificuldades para a utilização dos mesmos é modular sua solubilidade em meios biológicos, facilitando o acesso ao alvo. Uma alternativa para contornar este problema é a modificação estrutural destes compostos.

As benzofenonas foram escolhidas devido à gama de atividades atribuídas a elas, incluindo efeitos antimicrobianos (SURANA et al., 2018). Somado a isso, compostos contendo grupo nitro tem demonstrado potencial aplicação no controle de fungos patogênicos oportunistas humanos, como *C. albicans* e *Candida* spp. não *albicans* (OLEA et al., 2019a; OLEA et al., 2019b; CARRASCO et al., 2012). De fato, Olea et al. (2019a) demonstraram que a inserção do grupo NO₂ diminui o valor de IC₅₀ em um fator de 2,5–4,5 ppm e a substituição deste grupamento por grupos amina ou acetamida causa perda de efeito antifúngico. Tais autores ainda indicaram que, devido a polaridade dos nitrocompostos, o mecanismo de ação de substâncias nitradas não deve ser associado em grande parte à membrana plasmática. Naquele trabalho foi sugerido que a ação antifúngica está relacionada ao potencial efeito retirador de elétrons do NO₂, que contribui para reações com ligações duplas substituídas por outros grupos retiradores de elétrons, e produção de espécies reativas de oxigênio catalisada por enzimas.

A nitração foi feita visando: i) modular as propriedades físico-químicas, tais como estabilidade, solubilidade e toxicidade; ii) produzir derivados biologicamente mais ativos do que seus precursores; iii) adicionar bioatividades previamente não descritas para as benzofenonas de partida.

3.1 Síntese

As benzofenonas disponíveis comercialmente foram submetidas à substituição eletrofílica aromática, obtendo os produtos **3-6** com rendimentos entre 15 a 41% (Figura 1). Posteriormente, a xantona **7** foi obtida do ácido salicílico e sua nitração gerou o produto **8**. A Figura 2 mostra a estrutura química de todos os compostos orgânicos, sintéticos ou não, alvos de estudo do presente trabalho.

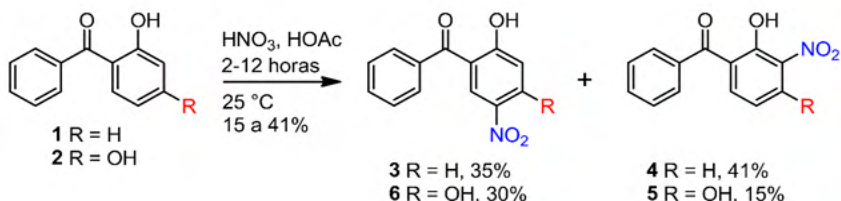


Figura 1 - Condições reacionais e rendimentos para nitração das benzofenonas **1** e **2**.

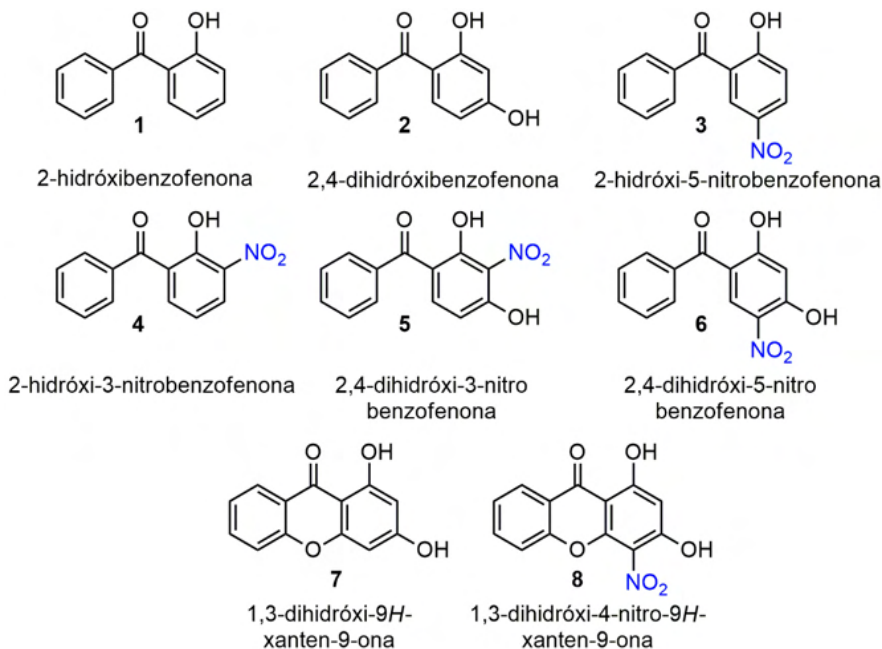


Figura 2 - Estrutura química das benzofenonas (1 a 6) e xantonas (7 e 8) avaliadas frente a ação fungicida.

3.2 Atividade antifúngica

As atividades antifúngicas dos compostos 1-8 foram avaliadas contra leveduras do gênero *Candida* spp., em concentrações entre 100 e 3,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de IC_{50} são apresentados na Tabela 1.

Código	<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	100	-	-	-
4	-	-	100	-	-
5	-	-	-	100	100
6	100	-	-	-	-
7	-	-	-	60	-
8	60	60	30	100	-
Fluconazol	1	1	32	16	2

Tabela 1 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para a atividade fungicida. (-) indica ausência de atividade nas concentrações avaliadas. Fluconazol é o controle positivo.

Os precursores 2-hidróxibenzofenona e 2,4'-di-hidróxibenzofenona não apresentaram inibição contra nenhum fungo, nas concentrações testadas.

As benzofenonas nitradas (**3-6**) foram ativas contra pelo menos uma levedura testada, indicando que a modificação estrutural com substituição de um hidrogênio por um NO₂ favoreceu a atividade antifúngica. Os compostos **3-6** inibiram 50% do crescimento de *Candida* spp. na concentração de 100 µg mL⁻¹.

A benzofenona **5** apresentou o maior espectro de ação, sendo ativa contra *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Interessantemente, nenhuma outra substância pertencente à essa classe apresentou atividade contra estes fungos. De fato, parece haver uma elevada seletividade entre benzofenona e *Candida*-alvo, ou seja, cada benzofenona, à exceção da **5**, inibiu apenas um gênero de *Candida*, e tal gênero foi inibido apenas por uma benzofenona. Assim, embora nenhuma benzofenona tenha tido atividade elevada como o fluconazol, usado como controle positivo, todas foram mais seletivas, uma grande vantagem no contexto de resistência antimicrobiana.

A xantona **7**, além de ter apresentado seletividade contra *C. krusei* ATCC 6258, foi 1,66 vezes mais ativa contra esta levedura do que o composto **5**. A nitração de **7** gerou perda de atividade contra *C. krusei* ATCC 6258. Em contrapartida, **8** foi capaz de inibir quatro das cinco leveduras testadas, sendo, inclusive, mais ativa contra *C. glabrata* ATCC 90030 do que o controle positivo.

Oya et al. (2015) isolaram benzofenonas preniladas de *Triadenum japonicum* e avaliaram suas atividades antibacterianas e antifúngicas. O (-)-Nemorosonol apresentou valores de IC₅₀ iguais a 8, 16 e 32 µg mL⁻¹ contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger* e *C. albicans*, respectivamente. Os valores de IC₅₀ foram inferiores aos apresentados no presente trabalho.

O estudo de benzofenonas como agentes antifúngicos são escassos e poucos gêneros de fungos são utilizados nesses trabalhos. Entretanto, os produtos naturais, bem como seus derivados, são candidatos em potencial como fungicidas e não devem ser descartados na síntese dirigida de novos antimicrobianos.

4 | CONCLUSÃO

Embora os derivados tenham apresentado, no geral, moderada atividade antifúngica, a pesquisa mostra-se interessante porque aponta novos modelos estruturais, que necessitam ser aprimorados e podem ser ferramentas úteis no combate a cepas resistentes aos fungicidas já utilizados comercialmente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior),

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

ARANDA, Martha Isabel Realpe et al. Antimicrobial and Synergistic Activity of 2,2',4-Trihydroxybenzophenone Against Bacterial Pathogens of Poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 490, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00490

AWAD, Lyn et al. Correlation between antifungal consumption and distribution of *Candida* spp. in different departments of a Lebanese hospital. **Journal of infection in developing countries**, v. 18, n. 1, p. 589, 2018. DOI: 10.1186/s12879-018-3512-z.

BROWN, Gordon D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012. DOI:10.1126/scitranslmed.3004404

CARRASCO, Héctor et al. Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1002–1024, 2012. DOI: 10.3390/molecules17011002.

CANNON, Richard D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, 2009. DOI:10.1128/CMR.00051-08

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - **Norma aprovada: CLSI documento M27-A3**. 3. ed. (ISBN 1-56238-666-2). Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts - **Norma aprovada: CLSI documento M27-S4**. 3. ed. (ISBN 1-56238-000). Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2012.

DIAS, Kris S.T. et al. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2713–2720, 2012. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.02.023

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST); Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts - **Norma aprovada: EUCAST documento E.Def. 7.2**. Taufkirchen, Alemanha: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008.

LIN, Zihua et al. Total synthesis and antimicrobial evaluation of natural albomycins against clinical pathogens. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3445, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-05821-1.

OLEA, Andrés F. et al. Antifungal activity of eugenol derivatives against *Botrytis cinerea*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1239, 2019a. DOI: 10.3390/molecules24071239

OLEA, Andrés F. et al. Synthesis and *in vitro* growth inhibition of 2-allylphenol derivatives against *Phytophthora cinnamomi* Rands. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4196, 2019b. DOI: 10.3390/molecules24224196.

OLIVEIRA, Adam H. et al. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 266–274, 2017. DOI: 10.1016/j.jep.2016.11.030.

OYA, Atsushi et al. Prenylated Benzophenones from *Triadenum japonicum*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 2, p. 258–264, 2015. DOI: 10.1021/np500827h

RODRIGUES, Célia F.; RODRIGUES, Maria Elisa; HENRIQUES, Mariana. *Candida* sp. Infections in Patients with Diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 1, p. 76, 2019. DOI: 10.3390/jcm8010076.

SURANA, Khemchand et al. Benzophenone: A ubiquitous scaffold in medicinal chemistry. **MedChemComm**, v. 9, n. 11, p. 1803–1817, 2018. DOI: 10.1039/c8md00300a

YANG, C W et al. Prevalence of *Candida* Species, Including *Candida dubliniensis*, in Singapore. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 472–474, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.1.472-474.2003.