

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUACAO EM BIOTECNOLOGIA

SIMONE MACHADO DE SOUZA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CUMARINAS NATURAIS E DERIVADOS

FLORIANÓPOLIS
2005

SIMONE MACHADO DE SOUZA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CUMARINAS
NATURAIS E DERIVADOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia, Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Departamento de Microbiologia
e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa Catarina.
Orientador: **Prof. Dr. Artur Smânia Júnior**

FLORIANÓPOLIS

2005

SIMONE MACHADO DE SOUZA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS CUMARÍNICOS
NATURAIS E DERIVADOS.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Artur Smânia Júnior
Orientador (MIP/UFSC)

Prof^a. Dr^a. Lorena Benathar Ballod Tavares
(Eng QMC/FURB)

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
(QMC/UFSC)

Prof^a. Dr^a. Iraci Tosin
(MIP/UFSC)

Ao Paulo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Paulo Eduardo pela compreensão, apoio e amor em tempo integral.

Ao Prof. Artur Smânia Jr. pela orientação, pela ética, pelo bom humor, apoio e amizade sincera.

Ao Prof. Franco Delle Monache pela provisão do material assunto desse trabalho.

Ao Prof. Moacir Geraldo Pizzolatti pelos esclarecimentos em Química.

Aos colegas do Laboratório de Antibióticos da UFSC: Prof^{ta} Elza Albino Smânia, Marcelo Quint, Aline Nazaré, Gladys Vieira e Roberta Paulert, pela troca de experiências e conhecimentos, pelo apoio mútuo e gargalhadas.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia ano 2002, pelo companheirismo.

A todos os Professores, secretários e funcionários do curso de Pós-graduação em Biotecnologia pela atenciosidade e disposição de ajudar sempre.

A meu pai e meu irmão pelo suporte carinhoso na área de Informática, e a minha mãe pelo apoio, palavras de estímulo e amor.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Cumarinas.....	03
1.1.1. Aspectos botânicos.....	06
1.1.2. Biogênese.....	06
1.1.3. Classificação química das cumarinas.....	10
1.1.3.1. Simples.....	10
1.1.3.2. Furanocumarinas.....	10
1.1.3.3. Piranocumarinas.....	10
1.1.3.4. Cumarinas com substituintes no anel pirona.....	11
1.1.3.5. Cumarinas miscelâneas.....	11
1.1.4. Propriedades, extração e caracterização.....	13
1.1.5. Importância comercial das cumarinas.....	13
1.1.6. Cumarinas na dieta.....	14
1.1.7. Farmacocinética.....	15
1.1.7.1. Toxicidade em modelo animal e fototoxicidade.....	18
1.1.8. Efeitos biológicos das cumarinas.....	21
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Cumarinas.....	32
3.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	39

3.2.1. Dissolução e diluição das cumarinas.....	39
3.2.2. Microrganismos-teste.....	39
3.2.3. Preparo do inóculo.....	39
3.2.4. Determinação da concentração mínima inibitória.....	40
3.2.5. Determinação da concentração mínima bactericida.....	41
3.2.6. Análise dos resultados.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Atividade biológica atribuída as cumarinas.....	22
Tabela II. Atividade bacteriostática e fungistática de diferentes cumarinas.....	30
Tabela III. Origem das 46 cumarinas investigadas neste estudo.....	33
Tabela IV. Estruturas químicas de derivados cumarínicos simples estudados neste trabalho.....	34
Tabela V. Estruturas químicas de derivados cumarínicos complexos estudados neste trabalho.....	35
Tabela VI. Concentração mínima inibitória e mínima bactericida de cumarinas monossubstituídas.....	44
Tabela VII. Concentração mínima inibitória e mínima bactericida de cumarinas dissubstituídas.....	46
Tabela VIII. Concentração mínima inibitória e mínima bactericida de cumarinas trissubstituídas.....	47
Tabela IX. Concentração mínima inibitória e mínima bactericida de furano e dihidrofurancumarinas.....	49
Tabela X. Concentração mínima inibitória e mínima bactericida de piranocumarinas.....	50
Tabela XI. Concentração mínima inibitória e mínima bactericida de cumarinas preniladas.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração da planta <i>Coumarona odorata</i> . Estrutura química da cumarina <i>per se</i> . Fonte: http://www.pl.barc.usda.gov	04
Figura 2.	Ilustração d planta <i>Mellilotus officinalis</i> . Fonte: http://www.ibiblio.org/herbmed	04
Figura 3.	Estruturas químicas das cumarinas. Fonte: http://www.chemsoc.org	04
Figura 4.	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. Fonte: SANTOS (1999)...	07
Figura 5.	Origem biossintética de cumarinas e derivados. Fonte: KUSTER & ROCHA (1999).....	09
Figura 6.	Cumarinas em suas diferentes estruturas.....	12
Figura 7.	Vias propostas do metabolismo das cumarinas em roedores humanos. Fonte: BORN <i>et al.</i> (2000).....	17
Figura 8.	Bergapten e a formação de fotoadutos com DNA. Fonte: LAPRONTI <i>et al.</i> (2003).....	20
Figura 9.	Microdiluição em placa. Determinação da concentração mínima inibitória do <i>osthenol</i> (composto 25) e do <i>alloxanthoxyletin</i> (composto 26) contra <i>Bacillus cereus</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – Coleção de Cultura Tipo Americana (*American Type Culture Collection*)

BHI – Infusão Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion*)

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Performance

DMAPP – Pirofosfato Dimetilalil (*Dimethylallyl pyrophosphate*)

DMSO – Dimetil Sulfóxido

ELISA – Enzima Imunoensaio (*Enzyme-linked Immunoassay*)

FDA – *Food and Drug Administration*

INT – *p-iodoNitroTetrazolium Violet*

MMPs – metalloproteinases de matriz (*matrix metalloproteinases*)

pH – potencial hidrogeniônico

PUVA – psoralenos + UVA

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UV – Ultravioleta

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein

RESUMO

A atividade antibacteriana da cumarina *per se* e de 45 derivados desta foram avaliados contra linhagens bacterianas de *Escherishia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entre os análogos estudados estão as cumarinas simples (monossubstituídas, bissubstituídas e trissubstituídas), as furano e dihidrofuranocumarinas, as piranocumarinas e as cumarinas preniladas. Para cada uma dessas cumarinas foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) pelo método de microdiluição. As CIMs e CBMs foram consideradas as menores concentrações das substâncias-teste necessárias para inibir o crescimento ou provocar a morte bacteriana e foram expressas em $\mu\text{g/ml}$. Cumarina *per se* apresentou atividade antibacteriana contra todas as estirpes bacterianas. Entre os análogos monossubstituídos, somente derivados com substituintes mais polares apresentaram atividade antibacteriana, principalmente, contra cepas Gram-negativas. Com relação as cumarinas bissubstituídas, a esculetina apresentou melhor atividade antibacteriana, especialmente, contra cepas Gram-positivas. A fraxetina um derivado trissubstituído não apresentou atividade antibacteriana contra todas as linhagens testadas. Da classe dos furano e dihidrofuranocumarinas, apenas o (-) heraclenol, xantotoxina e oroselona demonstraram atividade contra bactérias Gram-positivas e angelicina contra bactérias Gram-negativas. Entretanto, piranocumarinas mostraram-se completamente inativas contra o painel bacteriano. Com relação as cumarinas preniladas, apenas o ostenol se mostrou ativo com CMI de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ contra cepas Gram-positivas. Esses resultados sugerem que o efeito inibitório desses compostos esteja diretamente relacionado com determinados padrões de substituição.

PALAVRAS CHAVE

Cumarinas, relação estrutura-atividade, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The antibacterial activity of coumarin *per se* and other 45 coumarin derivatives were tested against bacterial stains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. In the present study on antibacterial activities of coumarins, a series of simple coumarins (monosubstituted, disubstituted and trisubstituted coumarins), furanocoumarins and dihydrofuranocoumarins, piranocoumarins and prenylated coumarins were evaluated. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined for each of the coumarin analogs against the bacteria strains mentioned above using the microdilution method. MIC and MBC values were considered as the lowest concentration of samples completely inhibiting growth of microorganisms or leading to bacterial death and were expressed in $\mu\text{g/mL}$. The parent coumarins itself was found to exhibit fairly high activity against the panel of bacteria tested. Among its monosubstituted derivatives, only those with polar substituents showed good antibacterial activity mainly against Gram-negative bacteria. Within the group of disubstituted coumarins, esculetin displayed enhanced antibacterial activity against Gram-positive strains. However, trisubstituted coumarin fraxetin showed to be less effective on all Gram-negative and Gram-positive bacteria. Within the group of furanocoumarins and dihydrofuranocoumarins, (-) heraclenol, xanthotoxin and oroselone were active on gram-positive bacteria while angelicin was most effective on Gram-negative bacteria. Piranocoumarins did not show any antibacterial activity against all bacteria tested. Among the prenylated coumarins, osthonol displayed enhanced antibacterial activity against Gram-positive bacteria (MIC=62.5 $\mu\text{g/mL}$). These findings imply that the inhibitory effect of coumarins is related to the substitution patterns.

Keywords:

Coumarins, structure-activity relationship, antibacterial activity.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma característica territorial muito diferente dos países industrializados, que é a sua biodiversidade, (55 mil espécies vegetais, 22% do total registrado no planeta) sendo, portanto, um celeiro para pesquisa de substâncias novas, de interesse biológico ou não (PINTO *et al.*, 2002, p. 48).

O arsenal terapêutico do reino vegetal é incalculável e, no momento, uma pequena porcentagem dos compostos naturais é conhecida. Estas substâncias podem ser utilizadas diretamente ou como modelos para a síntese de novos princípios úteis no tratamento de infecções (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003, p. 392).

Tradicionalmente, os produtos naturais de plantas têm provido à indústria farmacêutica uma de suas mais importantes fontes de compostos “modelos” e acima de 40% das drogas modernas são derivadas de fontes naturais usando a própria substância natural ou a versão sintetizada (JASSIM; NAJI, 2003, p. 413). Além do mais, produtos naturais são reconhecidos amplamente na indústria farmacêutica não só por sua diversidade estrutural como também, seu largo espectro de atividades farmacológicas (OJALA, 2001, p. 11).

O potencial dos produtos naturais tem sido reconhecido desde a Antiguidade. A elucidação estrutural bem como o papel desses compostos de ocorrência natural nas interações biológicas dos organismos e nos seus ecossistemas está sendo entendido apenas recentemente (BANERJI, 1992, p. 105).

Devido às capacidades bioquímicas especializadas, as plantas são capazes de sintetizar e acumular uma vasta linha de metabólitos primários e secundários (OJALA, 2001, p. 12) a maioria relacionada com o fenol e seus derivados (DOMINGO; LÓPEZ-

BREA, 2003, p. 386), úteis na defesa da própria planta contra fatores de estresse. Esses compostos tornam muitas plantas úteis para seres-humanos, tanto na dieta como em medicamentos (OJALA, 2001, p. 12).

Embora os compostos de origem vegetal representem quase a metade de todos os medicamentos dispensados nos Estados Unidos, muito poucos são usados como antimicrobianos, já que para essa categoria de fármacos, são exploradas, principalmente, fontes bacterianas e fúngicas. Desde o advento dos antibióticos na década de 50, o uso de antimicrobianos de origem vegetal tem sido virtualmente inexistente (COWAN, 1999, p. 564).

Entretanto, as plantas possuem uma grande quantidade de compostos químicos com potencialidade para uso como antimicrobiano alguns dos quais, com atividade *in vitro* comparável àquele dos antimicrobianos utilizados na clínica (DOMINGO & LÓPEZ-BREA, 2003, p. 392).

Um grupo de substâncias promissoras para o estudo de novos antimicrobianos é o das fitoalexinas. Esses compostos são dotados de propriedades antimicrobianas e são produzidas pelas plantas quando estas são infectadas por microorganismos fitopatogênicos (vírus, bactérias e fungos) ou quando estão sob ação de fatores causadores de estresse, como por exemplo, o frio, clima árido, ação da luz ultravioleta, entre outros. As fitoalexinas aparecem, geralmente, em altas concentrações em resposta à infecção, desempenhando nas plantas um papel semelhante ao dos anticorpos nos animais (PINTO *et al.*, 2002, p. 54). Dentre as fitoalexinas, o grupo das cumarinas (da família dos compostos fenólicos) vem despertando grande interesse biotecnológico em função das diferentes bioatividades atribuídas a alguns de seus membros como propriedades antiinflamatórias, antitrombóticas e vasodilatadoras (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003, p. 387).

A resistência antibacteriana global está se tornando um problema de saúde pública crescente, sendo citada para quase todos os antibacterianos disponíveis. A indústria farmacêutica e as companhias de biotecnologia estão respondendo à ameaça da resistência antibiótica com renovados esforços na descoberta de novos antibacterianos. Estratégias em curto prazo estão focadas na bioprospecção de novos agentes antibacterianos ativos contra microrganismos multiresistentes específicos e, em longo prazo, o uso de técnicas de sequenciamento genômico microbial direcionado para a descoberta de novos agentes ativos contra alvos bacterianos (BAX; MULLAN; VERHOEF, 2000, p. 51) pré-determinados.

O interesse por protótipos farmacêuticos úteis oriundos de plantas usadas na medicina popular tem levado ao ressurgimento de interesse nas cumarinas e produtos naturais fenólicos relacionados como os flavonóides. Isto porque, substâncias purificadas, exibem atividades farmacológicas potentes e relevantes e que são estrutura-dependente, além de apresentarem baixa toxicidade em mamíferos. Essa combinação de propriedades mantém as cumarinas como alvo de interesse farmacêutico (HOULT; PAYÁ, 1996, p. 714).

1.1. Cumarinas

Desde 1820 quando Vogel isolou pela primeira vez a 1,2-benzopirona (cumarina) da planta *Coumarouna odorata* (*Dipteryx odorata*, Willd, Fabaceae) popularmente conhecida como fava tonca, as cumarinas vêm sendo reconhecidas como produtos naturais amplamente distribuídos nas plantas (MURRAY, 1978, p. 200) (Fig. 1).

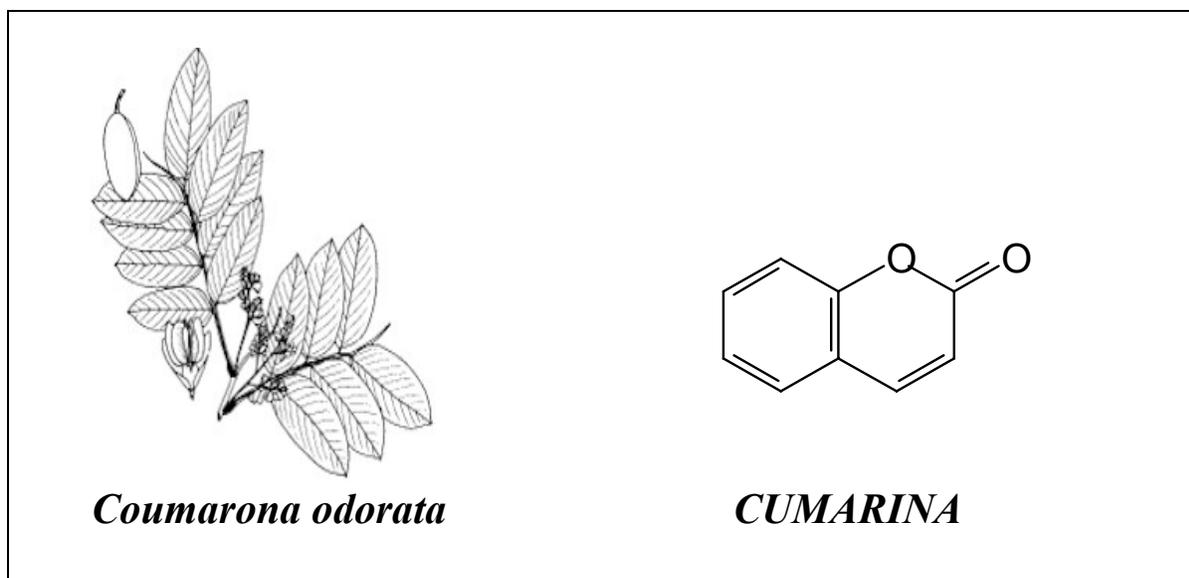


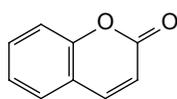
Figura 1- Ilustração da planta *Coumarona odorata*. Estrutura química da cumarina *per se* Fonte: <http://www.pl.barc.usda.gov>

Em 1940, Link e colaboradores isolaram uma cumarina dimérica, o dicumarol (bis-4-hidroxicumarina) de folhas em decomposição de *Melilotus officinalis* (Linné) Pall. (Fam. Lamiaceae) (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996, p. 135) popularmente conhecida como trevo-doce (Fig. 2) a qual foi identificada como o agente causador da doença hemorrágica fatal do gado (ROJAHN, 1956, p. 1754; HEGELAND, 1980, p. 66). Desde então, um número grande de 4-hidroxicumarinas substituídas tem sido sintetizado, entre elas a Warfarina (Fig. 3) que vem sendo empregada com sucesso na terapia anticoagulante (HEGELAND, 1980, p. 66).

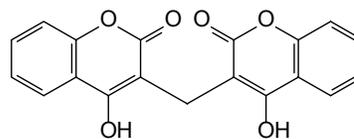
Atualmente, mais de 1.300 cumarinas já foram identificadas de fontes naturais, especialmente de plantas verdes. As propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas de cumarinas simples dependem de seus padrões de substituição (HOULT; PAYÁ, 1996, p. 713).



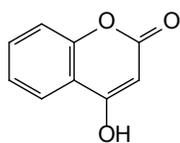
Figura 2-Ilustração da planta *Melilotus officinalis*. Fonte: <http://www.ibiblio.org/herbmed>.



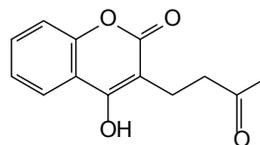
(I)



(II)



(III)



(IV)

Figura 3 - Estruturas químicas das cumarinas (I) coumarina, (II) 4-hidróxicoumarina, (III) dicoumarol (melotxin) e do análogo sintético Warfarina (IV) Fonte: <http://www.chemsoc.org>

1.1.1. Aspectos botânicos

As cumarinas estão presentes em diferentes partes das plantas* como nas raízes, nas flores e frutos de algumas famílias de *Angiospermae* como *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Graminae* e *Orquidaceae* (monocotiledônias) bem como em *Fabaceae*, *Oleaceae*, *Moraceae* e *Thymeleaceae*, entre outras. Dentre os táxons que biossintetizam cumarinas existem espécies bastante diversificadas, como árvores, arbustos e ervas (RIBEIRO; KAPLAN, 2002, p. 533).

Embora sintetizadas, principalmente, nas folhas cumarinas ocorrem em níveis mais altos nas frutas, seguido pelas raízes e caule. Além disso, mudanças sazonais e condições ambientais podem afetar a ocorrência em várias partes da planta (OJALA, 2001, p. 16).

Furanocumarinas que ocorrem, particularmente, nas famílias *Rutaceae* e *Umbeliferae* (TREASE; EVANS, 1983, p. 384) inibem o crescimento da extremidade da raiz e sua excreção na superfície das sementes pode ser um meio de retardar a germinação (OJALA, 2001, p. 16).

1.1.2. Biogênese

A síntese dos metabólitos secundários de plantas deriva, principalmente, do metabolismo da glicose via dois intermediários principais: ácido chiquímico e acetato.

A via do ácido chiquímico (chiquimato) produz três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptofano e tirosina, que intermediam a biossíntese de numerosos produtos naturais aromáticos em plantas superiores (SHIMID; AMRHEIN, 1995, p. 737) entre eles, os alcalóides, taninos, lignanas, ligninas e cumarinas (Fig. 4).

* Compostos cumarínicos também são produzidos por fungos e bactérias.

Os metabólitos secundários podem ser encontrados na forma livre, sendo denominados genericamente de agliconas ou estar ligado a uma ou mais unidades de açúcar formando o que se denomina heterosídeos (SANTOS, 1999, p. 333).

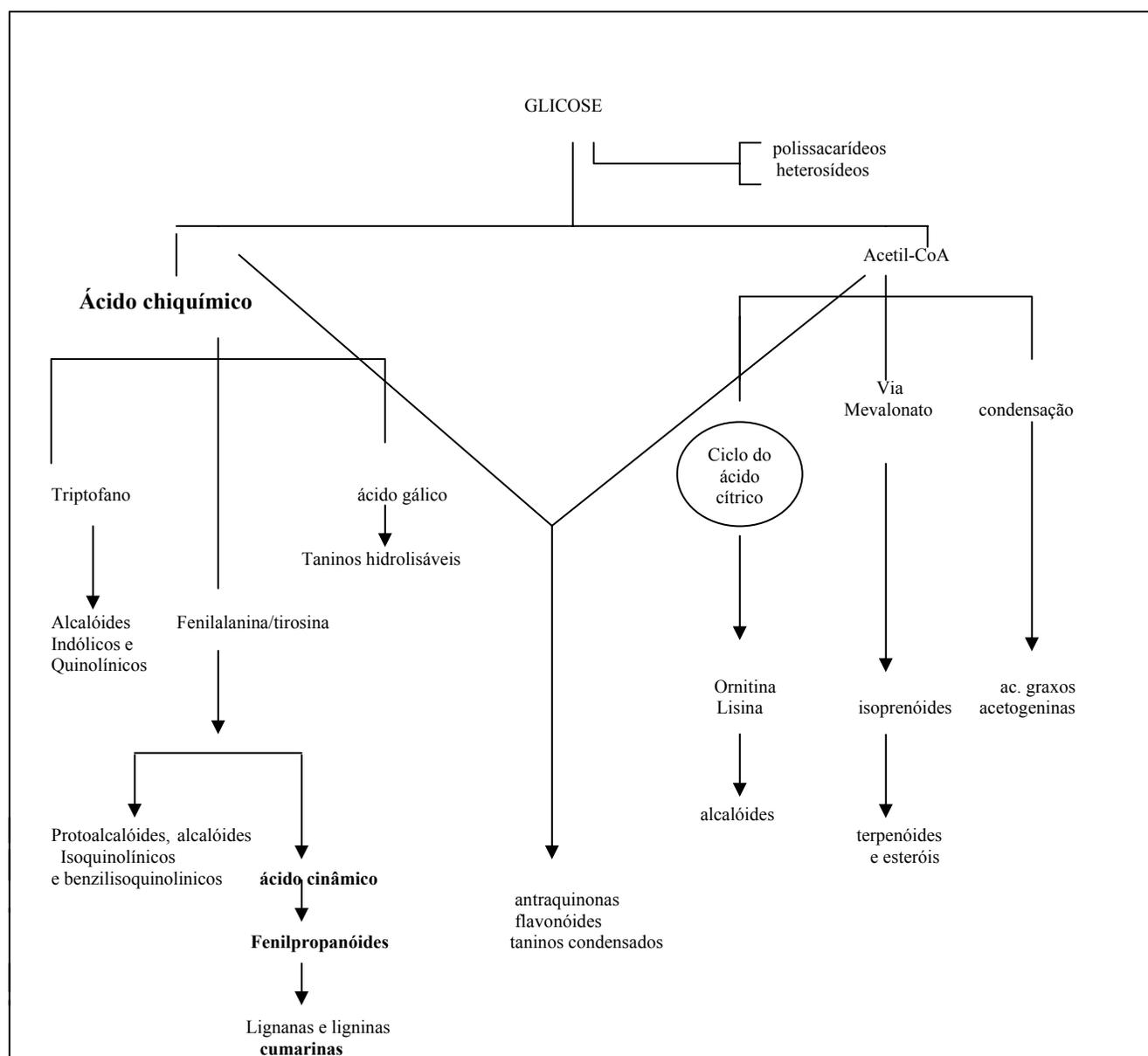


Figura 4 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.
Fonte: Santos (1999, p. 331)

As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, sendo um dos seus primeiros precursores do ácido *p*-hidróxi-cinâmico (ácido *p*-cumarínico), que é hidroxilado na posição C-2' (*orto*-hidroxilação). O derivado *orto* - hidroxilado sofre isomerização fotocatalizada da ligação dupla (E→Z). O isômero Z lactoniza-se, espontaneamente, produzindo a umbeliferona (7-hidroxicumarina) (KUSTER; ROCHA, 1999, p. 454). Em alguns casos, glicosilação do ácido cinâmico ocorre, (impedindo a lactonização). Em tais casos, cumarina surge após injúria tecidual e hidrólise enzimática. Quando isso ocorre, o ácido cinâmico glicolisado sofre ação de uma glicosidase, e sua molécula de açúcar é retirada e o ácido cinâmico esterifica formando a cumarina. A formação de di- e trihidroxicumarinas e seus éteres envolvem a hidroxilação da umbeliferona (7-hidroxicumarina) e não a lactonização dos ácidos cinâmicos correspondentes (BRUNETON, 1995, p. 231). A prenilação do anel benzênico nas posições C₆ ou C₈ do derivado 7-hidroxicumarina é o passo inicial na biogênese das furanocumarinas e piranocumarinas. A ciclização dos derivados C₆ ou C₈ – isoprenilcumarina ocorre por ataque nucleofílico do grupo hidróxido em C₇ ao epóxido formado pela oxidação da ligação dupla do resíduo isopentila. Dependendo da orientação do ataque nucleofílico, o produto poderá ser o hidroxi -iso-prop il-di-hidrofurano cumarina ou o hidroxi-dimetil -di-hidropiranocumarina (KUSTER; ROCHA, 1999, p. 454). A prenilação na posição C₆ origina furanos e piranocumarinas lineares e na posição C₈ homólogos angulares (BRUNETON, 1995, p. 231) (Fig. 5). A maioria das cumarinas é derivada biogeneticamente da via do ácido chiquímico, mas um número significativo delas parece derivar de uma via mista (ácido chiquímico e acetato) como as 4-fenilcumarinas. As 4-*n*-propilcumarinas, por exemplo, derivam totalmente da via do acetato (KUSTER; ROCHA, 1999, p. 454).

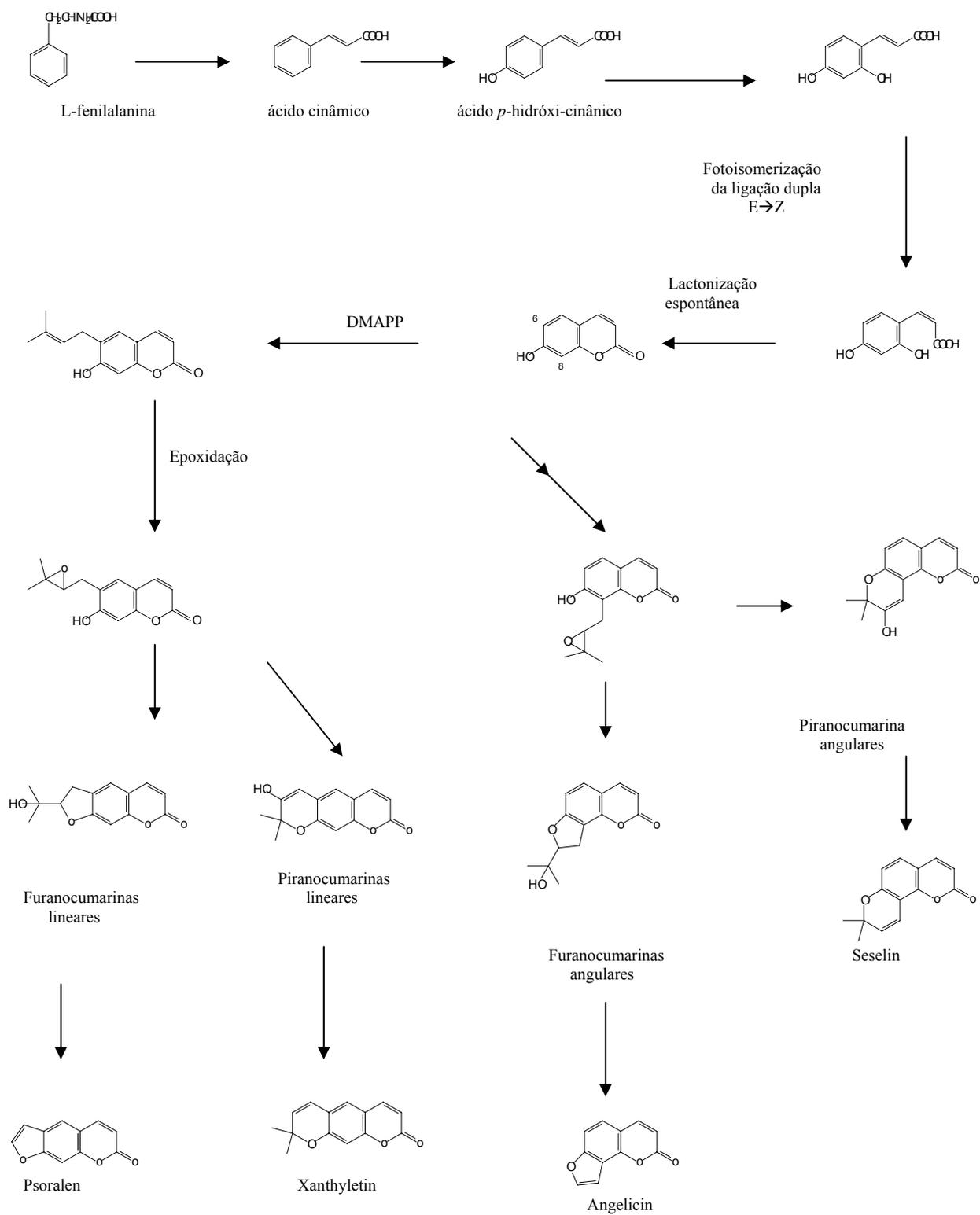


Figura 5 – Origem biossintética de cumarinas e derivados. Fonte: Kuster e Rocha (1999, p. 454).

1.1.3. Classificação química das cumarinas

A cumarina *per se* é o esqueleto básico de todos os outros derivados e é considerada quimicamente como a fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona (primeiro átomo numerado do ciclo é o oxigênio sem dupla ligação) (COSTA, 1994, p. 591) e podem ser classificadas como segue: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas (MURRAY, 1989, p. 591-618; BRUNETON, 1995, p. 230; ROJAHN, 1956, p. 1757). (Fig. 6).

1.1.3.1. Cumarinas simples

Compreendem os derivados da cumarina *per se* contendo radicais hidróxi, alcóxi, alquil bem como as formas glicosídicas. A oxigenação ocorre em um ou mais das seis posições do núcleo da cumarina, sendo que as cumarinas sem átomos de oxigênio são de rara ocorrência. Exceto em casos raros todas as cumarinas tem grupos hidroxila no carbono C₇. Esses grupos podem estar metilados ou com ligação glicosídica. Grupos isoprenóides são comuns a muitas cumarinas sejam elas simples ou ligadas a anéis furanos ou piranos.

1.1.3.2. Furanocumarinas

Estes compostos consistem de um anel furano (anel de 05 membros) condensados ao núcleo cumarínico, e se subdividem em lineares e angulares com substituintes ligados às posições dos demais anéis benzenóides (C₅, C₆, C₇ e C₈).

1.1.3.3. Piranocumarinas

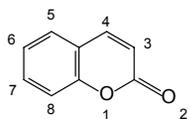
Análogos as furanocumarinas, porém com anel pirano (06 membros).

1.1.3.4. Cumarinas com substituintes no anel pirona

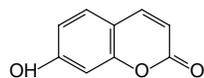
São cumarinas com grupos substituintes na posição C₃ e C₄.

1.1.3.5. Cumarinas miscelâneas

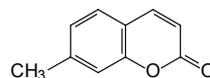
Compreendem biscumarinas (cumarinas diméricas como o dicumarol) e as isocumarinas que com relação a cumarina, tem o átomo de oxigênio e o carbono ligado ao oxigênio por dupla ligação invertidos de posição.

CUMARINAS SIMPLES

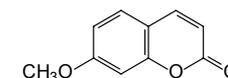
Cumarina per se



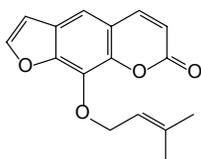
7-hidroxicumarina



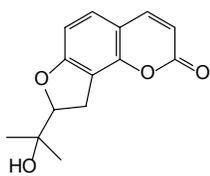
7-metilcumarina



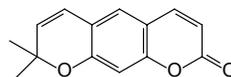
7-metóxicumarina

FURANOCUMARINAS

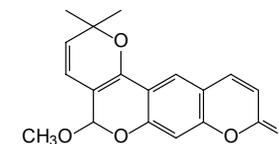
Furanocumarina linear



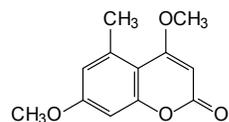
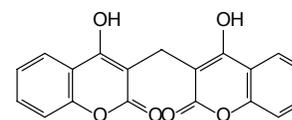
furanocumarina angular

PIRANOCUMARINAS

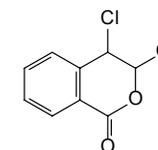
Piranocumarina linear



piranocumarina angular

CUMARINAS COM SUBSTITUINTES NO ANEL PIRONAC₃ substituída**CUMARINAS MISCELÂNEAS**

cumarina dimérica



isocumarina

Figura 6 - Cumarinas em suas diferentes estruturas.

1.1.4. Propriedades, extração e caracterização

A cumarina ocorre como cristais prismáticos, incolor com odor de fragrância característica e de sabor amargo, aromático e picante. Quando em estado livre é solúvel em álcool e em outros solventes orgânicos como o éter e solventes clorados, com os quais ela pode ser extraída. Em meio alcalino, o anel lactônico se abre, enquanto que a acidificação em meio aquoso recupera o anel (relactonização) (BRUNETON, 1995, p. 233).

Algumas cumarinas são sensíveis a pH ácidos ou alcalinos, levando ao isolamento de artefatos ao invés do isolamento das cumarinas originais, portanto, é necessário identificar quais cumarinas estão presente em extratos vegetais antes do tratamento químico, o que pode ser obtido usando cromatografia de camada delgada onde elas podem ser facilmente identificadas devido a característica de fluorescência da maioria das cumarinas sob luz ultravioleta (MURRAY, 1978, p. 204-205). A técnica de isolamento por CLAE tem sido usada por um grande número de pesquisadores, mostrando-se uma das mais eficientes (MURRAY, 1978, p. 206).

A determinação estrutural das cumarinas é feita através dos métodos espectroscópicos de análise tais como a infravioleto e infravermelho, RNM, e massa (MURRAY, 1978, p. 206-207).

1.1.5. Importância comercial das cumarinas

Cumarinas são compostos orgânicos que possuem aplicações extensas e diversas. Exibem forte fluorescência na região VIS (visível) que as tornam apropriadas para uso como colorantes, laser de corante e cromóforos óticos não lineares (KOVAC; NOVAC, 2002, p. 1483).

Em solução amoniacal, estes compostos exibem uma fluorescência azul, azul-esverdeada ou violeta, que tem sido utilizado como teste qualitativo para resinas como asafetida (TREASE; EVANS, 1983, p. 384).

Uma solução de 1:200 é empregada como inseticida (ROJAHN, 1956, p. 1751).

A cumarina é uma das substâncias aromáticas que mais tem tido emprego de caráter geral. Por longo tempo, foi utilizada para aromatizar manteiga, o tabaco, numerosos medicamentos e perfumes (ROJAHN, 1956, p. 1751). Além disso, os seres humanos estão expostos as cumarinas como fragrâncias em produtos cosméticos, tais como desodorantes antiperspirantes, produtos para banho, loções corporais, *eau de toilette*, cremes faciais, fragrâncias em creme, *spray* de cabelo, xampus, gel de banho e sabonetes de banho. É estimado que a exposição humana diária a cumarinas seja de cerca de 0,04 mg/kg/dia em cosméticos e perfumaria (LAKE, 1999, p. 424).

1.1.6. Cumarinas na dieta

As cumarinas fazem parte da dieta do ser humano e de outros animais. São encontradas em vegetais da família das umbelíferas como a cenoura, o aipo, a salsa e a chicória; bem como nas frutas mirtilo e toranja (*grapefruit*). Outras fontes desses derivados ainda incluem o chá verde e a canela. Estima-se que cerca de 0,02 mg/kg/dia de cumarinas seja a quantidade que os seres humanos estão expostos diariamente (LAKE, 1999, p. 425).

De acordo com o Anexo II do Council Directive, 1988 (88/388/EEC) o limite geral permitido do uso de cumarinas no alimento e em bebidas não -alcoólicas é de até 2mg/kg; entretanto, em bebidas alcoólicas e caramelo o limite permitido é de 10 mg/kg e em goma de mascar é de 50mg/kg.

1.1.7. Farmacocinética

Quando ocorre a aplicação tópica de produtos contendo cumarinas, a absorção (cerca de 60%) é rápida e extensiva pela pele humana (e de roedores), permanecendo metabolicamente imutáveis durante a absorção (BECKLEY-KARTEY; HOTCHKISS; CAPEL, 1997, p. 34). Na maioria dos estudos com seres humanos, a cumarina é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal (ingestão oral), distribuída pelo organismo e metabolizada extensivamente pela CYP2A6 hepática à 7-hidroxicumarina, que é excretada na urina sob a forma de conjugados sulfatados e glucuronido (LAKE, 1999, p. 434). Assim sendo, a isoforma do citocromo P450 responsável pela 7-hidroxilação da cumarina é o P450 2A6, que segundo Yun; Shimada; Guegerich (1991, p. 679) constitui no máximo 1% do P450 total presente no fígado humano. As cumarinas podem ser metabolizadas por hidroxilação em todas as 6 posições possíveis (átomos de carbono 3, 4, 5, 6, 7 e 8) para produzir 3-,4-,5-,6-,7- e 8-C hidróxicumarinas e por abertura do anel lactona resultando em vários produtos incluindo o *o*-hidroxifenilacetaldeído (*o*-HPA), o *o*-hidroxifeniletanol (*o*-HPE), o ácido *o*-hidroxifenilacético (*o*-HPAA) e o ácido *o*-hidroxifenilático (*o*-HPLA). Outros metabólitos menores incluem ainda a 6,7-hidroxicumarina, o ácido *o*-cumárico, o ácido *o*-hidroxifenilpropionico e a dihidrocumarina. A 7-hidroxilação é a via principal para o metabolismo das cumarinas em seres humanos (HADIDI *et al.*, 1997, p. 903), porém, alguns indivíduos podem também metabolizar a cumarina por 3,4 epoxidação ou por outras vias que levem a formação de *o*-HPAA (Fig. 7). Diferenças interindividuais no metabolismo da cumarina demonstraram a existência de alelos variantes no gene CYP2A6 humano (CYP2A6*2 e CYP2A6*3) (LAKE, 1999, p. 430). Quando a esses indivíduos é administrado cumarina por via oral, ao invés de ser detectado na urina a 7-hidroxicumarina,

são observados a presença do ácido 2-hidroxifenilacético (cinquenta por cento da dose) e o produto final que resulta da hidroxilação da cumarina na posição C₃, a 3- hidroxicumarina. Estes dados alertaram para o risco da exposição dessas pessoas às cumarinas, uma vez que a 7-hidroxilação está relacionada com a via de detoxificação, enquanto que a 3-hidroxilação é um processo que resulta na ligação covalente da cumarina a proteínas microsossomais (HADIDI *et al.*, 1997, p. 903).

Diferença notória com relação ao metabolismo das cumarinas entre as espécies animais tem sido observada (LAKE, 1999, p. 427). Enquanto que a 7-hidroxilação é a via principal do metabolismo da cumarina em seres humanos e babuínos, é uma via irrelevante em outras espécies. Por exemplo, a via principal do metabolismo das cumarinas em ratos é a 3,4 epoxidação (ou 3-hidroxilação) (por isoformas de citocromo P450 ainda não elucidadas) resultando na formação de metabólitos de anel aberto como o *o*-HPA, *o*-HPE e o *o*-HPAA (LAKE, 1999, p. 430) os quais são responsáveis pelo efeito hepatotóxico nesses animais. Assim, a hepatotoxicidade parece estar mediada pelo metabolismo, que no caso dos roedores está ligada a 3-hidroxilação e quebra do anel heterocíclico (FENTEM; FRY, 1993, p. 1). Essa ação tóxica das cumarinas provoca necrose hepática e deprime atividade de um número de enzimas hepáticas, em 24 horas (LAKE, 1984, p. 16) e pode ser parcialmente atribuída a excreção dos metabólitos cumarínicos na bile (LAKE, 1999, p. 444).

Apesar das cumarinas não mostrarem ser carcinógenos genotóxicos nesses animais, outros mecanismos são necessários para explicar porque altas doses desse composto podem produzir tumores hepáticos e pulmonares (LAKE, 1999, p. 445).

metabolismo de drogas (GUO *et al.*, 2000, p. 122-123). Sahi *et al.* (2002, p. 135) demonstraram que bergapteno aumenta a biodisponibilidade oral do Diazepan em cães *Beagle* (pela inibição da atividade enzimática do P450) e que ao mesmo tempo pode tanto induzir como inibir a atividade da CYP1A1/2.

Geralmente, a meia vida para eliminação das cumarinas é similar em todas as espécies já examinadas, sendo por volta de 1 a 2 horas em humanos e entre 1 e 4 horas em outras espécies (camundongos, ratos, hamster siberiano, coelho, babuíno). Embora, na maioria das espécies a rota de excreção seja a urina, excreção biliar ocorre em ratos, resultando na presença de metabólitos cumarínicos nas fezes (LAKE, 1999, p. 426).

1.1.8. Toxicidade em modelo animal e fototoxicidade

A toxicidade da cumarina e da 3,4-dihidrocumarina foram estudadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) e o *National Cancer Institute* devido ao uso em alta escala desses metabólitos em perfumes (fixadores e realçadores), cosméticos e fragrâncias e realçadores de aromas para alimentos. O estudo foi conduzido com ratos e camundongos onde se observou evidências de efeitos carcinogênicos e nefropáticos. (NPT, 1993, p. 1-4). Entretanto, segundo Lake (1999, p.444) o rato é um modelo animal impróprio para avaliação da segurança da exposição de seres humanos as cumarinas.

Ao contrário do que acontece com ratos e camundongos, onde doses altas de cumarina podem produzir toxicidade e carcinogenicidade, há pouca evidência de toxicidade induzida pela cumarina em seres humanos, quando são administradas doses até 1900 vezes maiores do que aquelas obtidas de fontes dietéticas e de cosméticos (LAKE, 1999, p. 444). Os estudos de Born *et al.* (2000, p.23) sugeriram que em humanos, é improvável que ocorra

a produção do metabólito *o*-HPA em concentrações toxicologicamente relevantes se expostos a nível baixo de cumarina. Segundo Ojala (2001 p. 29) a possibilidade de efeitos fototóxicos de furanocumarinas e hepatotóxicos de aflatoxinas (metabólitos cumarínicos de espécies de *Aspergillus*), entretanto, deve ser levada em consideração. Xantotoxina (8-MOP, 8-metoxipsoraleno), bergapteno (5-MOP, 5-metoxipsoraleno) e trioxsaleno (TMP) são furanocumarinas (psoralenos) utilizadas no tratamento de algumas desordens dermatológicas (psoríases, vitiligo, e micose) em combinação com luz ultravioleta A (320 a 400nm), constituindo um tratamento conhecido como PUVA - (psoralenos - por exemplo, xantotoxina, bergapteno ou trioxsaleno + UVA) (SAID *et al.*, 1997, p. 136; SCHIMITT; CHIMENTI; GASPARRO, 1995, p. 101). A eficácia da fotoquimioterapia em questão é atribuída à formação de fotoadutos entre psoralenos e DNA, bem como com outros componentes celulares (SCHIMITT; CHIMENTI; GASPARRO, 1995, p. 101). Psoralenos causam danos ao ligar-se covalentemente ao DNA seguido de irradiação UVA. As moléculas de psoralenos exibem estruturas tricíclicas planares com dois sítios fotoreativos (3,4-pirona e 4', 5'-dupla ligação furano). A intercalação inicial e a interação com o DNA dupla hélice são caracterizadas pela absorção de um fóton de UVA, um resíduo de pirimidina (principalmente timina) do DNA se liga covalentemente ao primeiro sítio fotoreativo. O monoaduto resultante pode formar um diaduto (Fig. 8) pela absorção do segundo fóton se uma nova pirimidina no lado oposto da fita de DNA se estiver disponível para uma ligação cruzada entre as fitas (LAPRONTI *et al.*, 2003, p. 190).

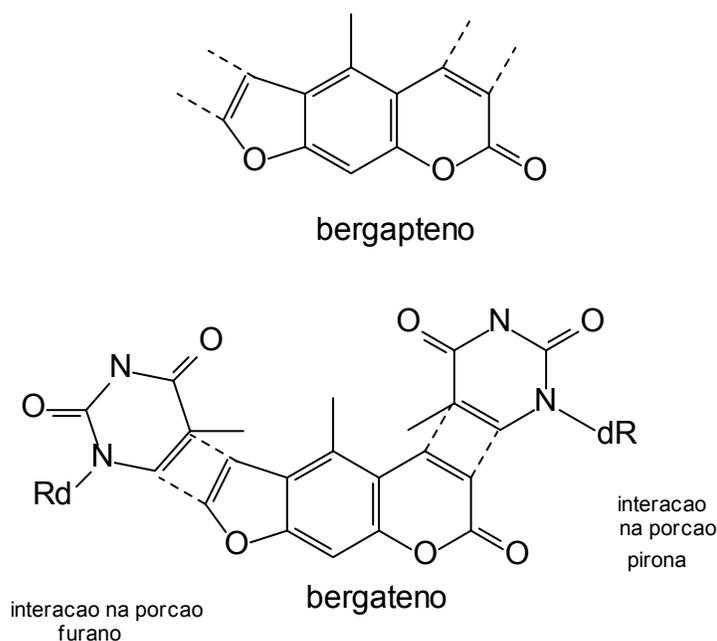


Figura 8. Bergapteno e a formação de fotoadutos com DNA. Fonte: Lapronti *et al.* (2003, p. 190).

Em baixas doses de psoralenos mais UVA, as células acometidas de psoríases são colocadas em estado citostático onde processos celulares podem ser suspensos até que o dano subletal no DNA seja reparado (BETHEA *et al.*, 1999, p. 79). Com relação ao vitiligo, a eficácia do tratamento é devido a pigmentação induzida por PUVA a qual pode estar relacionada a conversão fotoassistida da glutathiona celular a glutathiona oxidada (ISCHIA; NAPOLITANO; PROTA, 1989, p.143). Já o 8-MOP estimula a pigmentação através da estimulação de níveis de expressão do MTIF (*microphthalmia-associated transcription factor*) através ativação da via da proteína quinase A, que por sua vez estimula a expressão de tirosinase e aumento da melanina em melanoblastos (LEI *et al.*, 2002, p. 1341). Fototoxicidade é o efeito adverso mais significante em curto prazo em terapia com PUVA acometendo 10,9% dos pacientes e causando efeito colateral em 0,3% dos tratamentos ocasionado principalmente por dificuldade em seguir o protocolo do tratamento

(MORISON; MARWAHA; BECK, 1997, p. 183). Os sintomas são eritema com bolhas, pigmentação epidérmica (GANGE; PARRISH, 1984, p. 117).

A reação fototóxica causada pelo contato com plantas contendo furanocumarinas (família *Umbelliferae*) após exposição aos raios de sol, a fitofotodermatite, se caracteriza por eritema com hiperpigmentação pós-inflamatória.(WAGNER *et al.*, 2002, p. 10; LAGEY *et al.*, 1995, p. 542). Compostos químicos fototóxicos produzidos por plantas são agentes protetores que são liberados em caso de haver danos físicos causados por mamíferos e insetos herbívoros. (BERENBAUM, 1995, p. 119).

1.1.9. Efeitos biológicos das cumarinas

As cumarinas possuem um espectro amplo de atividade biológica. Recentes estudos sobre as atividades biológicas das cumarinas estão apresentados na Tabela I e alguns são discutidos a seguir. Entre os estudos mais promissores, podem ser citados aqueles relacionados com a atividade antiprotozoária “*in vitro*”. Scio *et al.* (2003, p. 634) isolaram da planta *Kielmeyera albopunctata* a cumarina 4-(1-metilpropil)-5,7-dihidroxi-8-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil) cromen-2-ona e observaram que esta apresenta atividade “*in vitro*” contra formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi*, matando 80% dos parasitas após 24h de contato dessa substância com sangue infectado. Amotosalen HCl (psoraleno) e uso de radiação de UVA se mostraram efetivos para eliminar formas tripomastigotas, em concentrados plaquetários e plasmáticos, infectados por *T. cruzi*. (VAN VOORHIS *et al.*, 2003, p. 475). A dafnetina (7,8 dihidroxicumarina) tem potente atividade antimalárica, demonstrada “*in vitro*” contra *Plasmodium falciparum* provocando redução em 60% atividade.

Tabela I. Atividade biológica atribuída as cumarinas.

Efeito biológico	Referências
Atividade anti-prurítica.	MATSUDA <i>et al.</i> , 2002.
Atividade anti-tripanosomicida	VAN VOORHIS <i>et al.</i> , 2003; SCIO <i>et al.</i> , 2003.
Atividade antifilarial	TRIPATHI <i>et al.</i> , 2000.
Atividade antimalarial	OKETCH-RABAH <i>et al.</i> , 2000; WANG <i>et al.</i> , 2000; MU; WANG; NI, 2002.
Atividade estimulante da memória	KNAUBER; MÜLLER, 2003; YAN <i>et al.</i> , 2004.
Atividade vasorelaxante	CHEN <i>et al.</i> , 2000; CAMPOS-TOIMIL <i>et al.</i> , 2002.
Atividade acaricida	GLEYE <i>et al.</i> , 2003.
Atividade inibitória da girase B	GORMLEY <i>et al.</i> , 1996; LAURIN <i>et al.</i> , 1999; PERIERS <i>et al.</i> , 2000; LONG, 2003;
Atividade hepatoprotetora.	OKAMOTO <i>et al.</i> , 2001 ; OKAMOTO <i>et al.</i> , 2003.
Atividade anti- <i>Helicobacter pylori</i>	KAWASE <i>et al.</i> , 2003.
Atividade antimicrobiana	KAYSER; KOLODJZIEJ, 1999; KAWASE <i>et al.</i> , 2001; TADA <i>et al.</i> , 2002.
Atividade antifúngica	SARDARI <i>et al.</i> , 1999; KOKUBUN <i>et al.</i> , 2003.
Atividade antiinflamatória	PAYA <i>et al.</i> , 1994; MURAKAMI <i>et al.</i> , 2000; CORSINI <i>et al.</i> , 2001; CHENG <i>et al.</i> , 2004; CURINI <i>et al.</i> , 2004.
Atividade imunossupressora	TADA <i>et al.</i> , 2002.
Atividade rodenticida	SITTERT; TUINMAN, 1994.
Atividade antitumor	GUILLET <i>et al.</i> , 2001; RAJ <i>et al.</i> , 2001; BABA <i>et al.</i> , 2002; BOCCA <i>et al.</i> , 2002; FINN <i>et al.</i> , 2002; YOO <i>et al.</i> , 2002; AKIHISA <i>et al.</i> , 2003; ITO <i>et al.</i> , 2003; LEE, K.H. <i>et al.</i> , 2003; ZHANG <i>et al.</i> , 2003.
Atividade anti serina protease	POCHET <i>et al.</i> , 2003.
Atividade citostática	JIMÉNEZ-OROSCO <i>et al.</i> , 2001; KLEINER <i>et al.</i> , 2001; LIU <i>et al.</i> , 2001; YIN <i>et al.</i> , 2001; FINN <i>et al.</i> , 2002; ZHANG <i>et al.</i> , 2003 ; KEMPEN <i>et al.</i> , 2003.
Atividade antidepressiva	SINGH <i>et al.</i> , 1992.
Atividade inibidora de SHC	CRAVOTO <i>et al.</i> , 2004.
Atividade redutora de lipídeos	MADHAVAN <i>et al.</i> , 2003.
Atividade anticoagulante	HEGLAND, 1980; PINEO & HULL, 2003; MANOLOV; DANCHEV, 2003.
Atividade antiagregação plaquetária	SEKIYA; OKUDA; ARICHI, 1982.
Atividade anti-HIV	WU <i>et al.</i> , 2001; BRACCIO <i>et al.</i> , 2004, FULLER <i>et al.</i> , 1994; SPINO; DODIER; SOTHEESWARAN, 1998; WU <i>et al.</i> , 2001; TUMMINO <i>et al.</i> , 1996 e MAO <i>et al.</i> , 2002.
Atividade antioxidante	NISHIYAMA <i>et al.</i> , 2001; KANEKO; BABA; MATSUO, 2003; ZHANG; WANG, 2004.
Atividade antiosteoporose	QIN <i>et al.</i> , 2003.
Atividade diurética	BONSIGNORE <i>et al.</i> , 1998.
Atividade analgésica	BONSIGNORE <i>et al.</i> , 1998.
Atividade antialérgica, in vivo	MATSUDA <i>et al.</i> , 1999.
Atividade bloqueadora de Ca ²⁺	TAKEUCHI <i>et al.</i> , 1991.
Atividade neuroprotetora, in vitro	MOLINA-JIMENEZ; SANCHEZ-REUS; BENEDI, 2003.
Atividade antimelanogênica	LEI <i>et al.</i> , 2002.

da enzima superóxido dismutase (SOD), além de diminuir a síntese de DNA do parasita (MU; WANG; NI, 2003, p.157). Esta ação é atribuída a atividade quelante de ferro da dafnetina (MU; WANG; NI, 2002, p. 83) que também exibiu atividade esquizotóxica contra *P. falciparum*, comparada a ação da cloroquina (1~10 µmol/L) “*in vitro*” (WANG *et al.*, 2000, p. 204). A atividade antimalárica também foi demonstrada com a cumarina 5,7-dimetoxi-8-(3'-hidroxi-3'metil-1'-buteno), encontrada em extrato metanólico das raízes da planta *Toddalia asiática* (OKETCH-RABAH *et al.*, 2000, p. 636).

Campos-Toimil *et al.* (2002, p. 783) sintetizaram derivados cumarínicos e furanocumarínicos com atuação vasorelaxante em anéis pré-contraídos da aorta de ratos com noradrenalina ou por despolarização com KCl (cloreto de potássio) e se mostraram promissores agentes anti-hipertensivos e/ou espasmolíticos. Ostol, outro derivado cumarínico tem ação vasorelaxante nos tecidos do corpo cavernoso de coelhos atribuído a liberação de NO (ácido nítrico) do endotélio sinusoidal e potenciação do relaxamento mediado por sinais do cGMP (guanosina monofosfato cíclico) e / ou cAMP (adenosina monofosfato cíclico) pela inibição da fosfodiesterase. O ostol é, portanto, um agente candidato para tratamento da impotência.(CHEN *et al.*, 2000, p. 1975).

A DNA girase bacteriana é o alvo enzimático da classe de antibióticos aminocumarínicos (Novobiocina, Coumermicin A₁ e Clorobiocina) que são produzidos por cepas de *Streptomyces* (LAURIN *et al.*, 1999, p. 2079). As drogas se ligam à subunidade B da girase bacteriana, inibindo a atividade da enzima ATPase (GORMLEY *et al.*, 1996, p. 5083) sendo seletivamente ativas contra *Staphylococcus aureus* (LONG, 2003, p. 351).

Diversos estudos relatam a atividade antiviral das cumarinas, por diferentes mecanismos. Piranocumarinas presentes no látex de árvores do gênero *Calophyllum* são inibidoras da enzima transcriptase reversa do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Fuller *et al.* (1994, p. 1961) e Gustafson *et al.* (1994, p. 5821) isolaram piranocumarinas com ação anti-HIV, respectivamente costatolido (inibidora da transcriptase reversa) e soulatrolido do látex de *C. teysmanii*. Atividade semelhante à dessas cumarinas foi também encontrada para uma outra piranocumarina, a calanolido B, a qual foi isolada de outra espécie do mesmo gênero, a *C. cerasiferum* (SPINO; DODIER; SOTHEESWARAN, 1998, p. 3475). A inibição da transcriptase reversa não é o único mecanismo antiviral das cumarinas. A 4-hidróxi-3-(3-fenóxiopropil) cumarina desempenha ação anti-HIV pela inibição da enzima protease do vírus (TUMMINO *et al.*, 1996, p. 1401). Uma terceira enzima viral, a integrase, tem sua ação inibida por uma série de cumarinas diméricas quimicamente modificadas (cuja potência é maior naquelas contendo fração hidrofóbica) (MAO *et al.*, 2002, p. 1634). Algumas cumarinas como as 3-fenilcumarinas ainda suprimem, em nível gênico, a expressão do HIV, inibindo sua transcrição viral na região do promotor (UCHIUMI *et al.*, 2003, p. 89). Cumarinas e biscumarinas (pabulenol, heraclenol, oxipeucedanina, pranferol e xantotoxina), da planta *Férula sumbul*, são inibidoras da replicação do HIV em linfócitos H9 com índice terapêutico superior a 1.000 (ZHOU *et al.*, 2000, p. 689). As cumarinas são também importantes antioxidantes naturais (ZHANG; WANG, 2004, p. 199). Nishiyama; Ohnishi; Hashiguchi (2001, p. 1127) mostraram atividade antioxidante da 7 hidroxycumarina em fibroblastos humanos. A cumarina *per se*, a 7-hidroxycumarina e 3-hidroxycumarina são indutoras da quinona reductase e outras enzimas anticarcinogênicas detoxificantes de Fase 2 “*in vivo*” (DINKOVA-KOSTOVA, 2002, p. 595). As 4-metilcumarinas, principalmente aquelas contendo dois grupos hidroxil ou acetoxil nas posições *orto*, no anel benzenóide, mostram propriedades fortemente antioxidantes, melhores que as do α -tocoferol (vitamina E) (RAJ *et al.*, 1998, p. 833). Kaneko; Baba; Matsuo (2003, p. 239) pesquisaram e comprovaram os efeitos protetores das

cumarinas esculina, esculetina, 4-metilesculetina e fraxetina contra citotoxicidade induzida por hidroperóxido de ácido linoleico em células endoteliais venosas de cordão umbilical humano em cultura, atribuídos à presença da unidade *orto* catecol nas cumarinas. Entretanto, a unidade 1,2 pirona tem pouca influência na atividade antioxidante das cumarinas (ZHANG; WANG, 2004, p. 199). A fraxetina (7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina) também protegeu “*in vivo*”, a *Drosophila melanogaster* contra os efeitos do estresse oxidativo por causar aumento importante das reservas da enzima glutatona redutase (GSH), prevenindo dano peroxidativo (FERNANDEZ-PUNTERO *et al.*, 2001, p. 777). Kleiner; Reed; DiGiovanni (2003, p. 415) estudaram a ação antioxidante de cumarinas presentes naturalmente na dieta (frutas cítricas, por exemplo) como a bergamotina, a imperatorina e a isopimpinellina e demonstraram que, essas cumarinas, são capazes de inibir a ação de enzimas metabolizadoras pró carcinógenas e bloquear a bioativação de agentes carcinogênicos como o B{a}P(benzo[a]pireno) e DMBA (7,12-dimetil Benz[a]antraceno promotores de formação de adutos de DNA em células MCF-7 (linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano).

Inúmeros trabalhos sobre a atividade antiinflamatória das cumarinas já foram publicados. Paya *et al.* (1994, p. 445) observaram que cumarinas 7,8-dihidroxiladas como a fraxetina são agentes capazes de seqüestrar radicais ânions superóxido oriundos de neutrófilos fagocíticos ativados, os quais estão implicados em vários aspectos do processo inflamatório. Murakami *et al.* (2000, p. 1843) estudaram a atividade antiinflamatória do aurapten (uma cumarina prenilada) na derme de ratos tratada com 12-*O*-tetradecanoil-forbol-13-acetato. Os achados indicaram que o aurapteno, encontrada em frutas cítricas, é um agente atenuador da resposta bioquímica de leucócitos inflamatórios. Estudos “*in vitro*”, mostraram que suprimiu a expressão de iNOS/COX-2 (Óxido Nitrico Sintetase

Induzível /Ciclooxigenase-2) e a liberação de TNF- α (citocina pró-inflamatória, liberada por macrófagos e monócitos em resposta a estímulos inflamatórios externos ou de estresse) fatores esses com papéis importantes na patogênese da inflamação e câncer. A (8-monocloro-3- β -dietilaminoetil-4-metil-7-etoxi-carbonil-metoxi-cumarina é uma cumarina semi-sintética que segundo Corsini *et al.* (2001, p. 231) demonstrou inibir a transcrição de TNF- α induzida por lipopolissacarídeo e a ativação de NF-Kb (fator nuclear - κ B) em macrófagos de ratos. Cheng *et al.* (2004, p. 2411) demonstraram a atividade de derivados cumarínicos como inibidores de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico humano estimulados por lipopolissacarídeos bacterianos “*in vitro*”, sugerindo que esses derivados com substituintes em C₆ (principalmente halogênios) influenciam o efeito inibitório com atividade nanomolar. Curini *et al.* (2004, p. 2241) sintetizaram e verificaram a atividade antiinflamatória de geraniloxicumarinas. A atividade antiinflamatória tópica foi avaliada usando o teste do óleo de cróton na orelha de camundongo como modelo inflamatório agudo. Aurapten e seus derivados 8-metoxi e 8-acetoxi reduziram em 50% o edema, similarmente a indometacina (droga antiinflamatória não esteroideal de referência) a 0,25 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2\text{m}$.

O desenvolvimento tumoral é um processo de múltiplas etapas durante o qual eventos genéticos e epigenéticos determinam a transição da célula normal ao estado maligno. Comuns na maioria dos tumores, vários circuitos regulatórios estão alterados na progressão tumoral, entre eles, o controle da proliferação, equilíbrio entre sobrevivência celular e morte celular (apoptose), comunicação entre células vizinhas e com a matriz celular, a neovascularização tumoral (angiogênese) e finalmente, a migração, invasão e disseminação metastática (COMPAGNI; CHRISTOFORI, 2000, p. 1). Dentre as diversas

cumarinas até hoje pesquisadas, algumas apresentam ação em alguns processos relacionados a gênese tumoral. A dafnetina (YANG *et al.*, 1999, p. 682; FINN; CREAVER; EGAN, 2004, p. 177-178) tem ação antiproliferativa por ser inibidora de proteínas quinases. Liu *et al.* (2001, p. 929) comprovaram os efeitos antiproliferativos da escopoletina por meio de indução a apoptose em células PC₃ e WANG *et al.* (2002, p. 163) por inibição da fosforilação de pRb (proteína restinoblastoma) em células HL-60 (células de leucemia humana) Praeruptorina C, um derivado cumarínico isolado da planta *Peucedanum praeruptorum* Dunn também é um antiproliferativo testado em células da musculatura lisa aórtica bovina (WEI *et al.*, 2002, p. 129). A 7-hidroxycumarina, o principal metabólito da cumarina em seres humanos, tem ação citostática por causar a diminuição da porcentagem de células de adenocarcinoma humano que expressam ciclina D1 (JIMENEZ-OROZCO *et al.*, 2001, p. 185). A ativação da via da apoptose é o mecanismo chave pelas quais drogas citotóxicas matam células tumorais. Defeitos na sinalização da apoptose contribuem para a resistência dos tumores (DEBATIN, 2004, p. 153). A cumarina e a 7-hidroxycumarina (umbeliferona) induziram distúrbios no ciclo celular e apoptose em células do carcinoma humano (LOPEZ-GONZALEZ *et al.*, 2004, p. 275). A isocumarina sintética 2-(8-hidroxi-6-metoxi-1-oxo-1H-2-benzopirran-3-il) NM-3 mostrou possuir atividade apoptótica, por geração de ROS (espécies reativas do oxigênio) e parada do crescimento celular (YIN *et al.*, 2001, p. 43). Em tumores malignos, a angiogênese é necessária para o crescimento de tumores sólidos e desenvolvimento de metástases (DREVS; DROLL; UNGER, 1999, p. 282). A NM-3 é uma molécula antiangiogênica que induz morte celular endotelial (SALLOUM *et al.*, 2000, p. 6958), a concentrações baixas, por mecanismo não apoptótico (YIN *et al.*, 2001, p. 43). Nam *et al.* (2002, p. 2345) modificaram e analisaram a relação estrutura-atividade de 4-senecioloimetil-6,7-dimetoxicumarinas antiangiogênicas,

concluindo que a fração 6,7-dimetoxi é importante para a bioatividade. As MMPs (matrix metalloproteinases) estão implicadas no processo de crescimento tumoral, invasão e metástases, onde são superexpressas especialmente em fenótipos agressivos (HIDALGO; ECKHARDT, 2001, p. 178). Kempen *et al.* (2003, p. 1111) demonstraram a evidência de que alguns derivados cumarínicos sintéticos possuem marcantes propriedades anti-invasivas ‘*in vitro*’ e antitumorais ‘*in vivo*’. Inibição da motilidade foi também demonstrada em estudos com células de B16-F10 (melanoma) usando a 4-hidroxycumarina (VELASCO-VELÁZQUEZ *et al.*, 2003, p. 179).

Com o aumento dramático da resistência de patógenos agentes antimicrobianos tanto na área farmacêutica como na agroquímica, há uma necessidade crescente da descoberta de novos compostos antimicrobianos. As atividades antimicrobianas das cumarinas têm sido avaliadas com emprego de diversos protocolos e, geralmente, difíceis de serem comparadas. Existem relatos sobre a eficácia de cumarinas puras contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas bem como contra fungos (Tabela II). Extratos vegetais também têm mostrado atividade, por exemplo: extratos em éter das raízes de *Angélica gigas* foram ativos contra *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* e *Salmonella typhimurium* (LEE, S. *et al.*, 2003, p. 449); extratos metanólicos de *Angélica archangelica* L., *Levisticum officinalis* Koch, *Peucedanum palustre* (L.), *Ruta graveolens* L. *Petroselinum crispum* (P.Mill) foram ativas contra fungos fitopatogênicos *Fusarium culmorum* e *Heterobasidion annosum* (OJALA *et al.*, 2000, 299); extratos de *Toona ciliata* e *Amoora rohituka* em metanol, éter de petróleo e diclorometano foram ativas contra *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* A e B, *S. typhi*, *Sarcina lútea*, *Shigella boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneriae*, *S. sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *V. mimicus* e

V. parahemolyticus e contra os fungos *Macrophomina phaseolina*, *Botryodiplodia theobromae* e *Curvularia lunata* (CHOWDHURY *et al.*, 2003, 155). Sardari *et al.* (1999, p. 1933) ao estudar diferentes furanocumarinas, demonstraram que a presença de uma hidroxila na posição C6 do núcleo cumarínico era essencial para atividade antifúngica.

Tabela II. Atividade bacteriostática e fungistática de diferentes cumarinas.

Micróbio	Cumarina	Método	Referência	
Gram positiva				
<i>Bacillus cereus</i>	Dafnetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
	Aesculetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
<i>Bacillus subtilis</i>	Escopoletina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
	Xantotoxina	Difusão em meio sólido	OJALA <i>et al.</i> , 2000.	
	Dafnetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aesculetina	Réplica em prato de Lederberg.	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
	Preniletina	Difusão em meio sólido	CHIANG <i>et al.</i> , 1982.	
	Haplopinol	Difusão em meio sólido	CHIANG <i>et al.</i> , 1982.	
	Xantotoxina	Difusão em meio sólido	OJALA <i>et al.</i> , 2000.	
	Psoraleno	Microdiluição em meio líquido	RAHMAN; GRAY, 2002.	
	Ostol	Difusão em meio sólido	TADA <i>et al.</i> , 2002.	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRS)	Dafnetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.
		Aesculetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.
<i>Sarcina lutea</i>	Cumarina	Microdiluição em meio líquido	KAYSER; KOLODZIEJ, 1999.	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				
Gram negativa				
<i>Escherichia coli</i>	Dafnetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
	Aesculetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
	Haplopinol	Difusão em meio sólido	CHIANG <i>et al.</i> , 1982.	
	Umckalina	Microdiluição em meio líquido	KAYSER; KOLODZIEJ, 1999.	
	Umbeliferona	Difusão em meio sólido	OJALA <i>et al.</i> , 2000.	
	Bergapteno	Difusão em meio sólido	OJALA <i>et al.</i> , 2000.	
	Psoraleno	Microdiluição em meio líquido	RAHMAN; GRAY, 2002.	
<i>Haemophilus influenzae</i>	Cumarina	Microdiluição em meio líquido	KAYSER; KOLODZIEJ, 1999.	
<i>Enterobacter cloacae</i>	Psoraleno	Microdiluição em meio líquido	RAHMAN; GRAY, 2002.	
	Psoraleno	Microdiluição em meio líquido	RAHMAN; GRAY, 2002.	
<i>Klebsiella erogenes</i>	Herniarina	Microdiluição em meio líquido	KAYSER; KOLODZIEJ, 1999.	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Dafnetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
	Umckalina	Microdiluição em meio líquido	KAYSER; KOLODZIEJ, 1999.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ostol	Difusão em meio sólido	TADA <i>et al.</i> , 2002.	
	Dafnetina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
<i>Salmonella typhimurium</i>				
Fungos				
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Escopoletina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
<i>Aspergillus niger</i>	Angelicina	Microdiluição em meio líquido	SARDARI <i>et al.</i> , 1999.	
	Alopsoraleno	Microdiluição em meio líquido	SARDARI <i>et al.</i> , 1999.	
	Psoraleno	Microdiluição em meio líquido	RAHMAN; GRAY, 2002.	
<i>Byssochlamys fulva</i>	Escopoletina	Réplica em prato de Lederberg	JURD <i>et al.</i> , 1971b.	
<i>Cândida albicans</i>	Angelicina	Microdiluição em meio líquido	SARDARI <i>et al.</i> , 1999.	
	Psoraleno	Microdiluição em meio líquido	RAHMAN; GRAY, 2002.	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Angelicina	Microdiluição em meio líquido	SARDARI <i>et al.</i> , 1999.	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Angelicina	Microdiluição em meio líquido	SARDARI <i>et al.</i> , 1999.	
	Xantotoxina	Difusão em meio sólido.	OJALA <i>et al.</i> , 2000.	

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a atividade antibacteriana da cumarina e seus derivados visando o controle de microorganismos patogênicos ao homem.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM).
- Determinar as concentrações bactericidas mínimas (CBM).
- Distinguir as cumarinas segundo a atividade antimicrobiana, como sendo bacteriostáticas ou bactericidas.
- Avaliar a influência dos grupos substituintes no núcleo cumarínico, sobre a atividade antimicrobiana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cumarinas

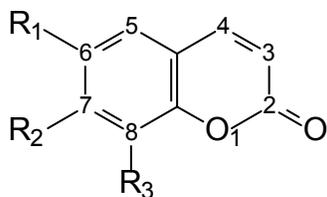
Os derivados cumarínicos (Tabela III) foram fornecidos pelo Professor Franco Delle Monache do *Istituto di Chimica, Università Cattolica Del Sacro Cuore* (Roma, Itália). Essas substâncias foram obtidas principalmente por fito-extração, modificação química (Di-Metoxi-Esculetina e Di-Metoxi-Dafnetina são derivados metilados da esculetina e dafnetina, respectivamente) e por aquisição comercial (herniarina e fraxetina foram adquiridos comercialmente da Sarsynthese Co., Genay, França e esculetina da Fluka, Buchs, Suíça). As estruturas dos derivados cumarínicos naturais ou semi-sintéticos foram elucidadas por comparação de seus dados espectroscópicos (^1H e ^{13}C NMR) em comparação com a literatura referência (DELLE-MONACHE *et al.*, 1976, p. 681; DELLE-MONACHE *et al.*, 1977, p. 399; DELLE-MONACHE *et al.*, 1989, p. 435; DELLE-MONACHE *et al.*, 1995, p. 474).

Nas Tabelas IV e V estão apresentadas as cumarinas estudadas no presente trabalho, as quais estão agrupadas de acordo com suas estruturas químicas em cumarinas simples (Tabela IV), dihidro e furano cumarinas, piranocumarinas e cumarinas preniladas (Tabela V).

Tabela III. Origem das 46 cumarinas investigadas neste estudo.

Cumarinas (nome trivial)	Referência
Aurapteno	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1995.
Bergapteno	COMPAGNONE <i>et al.</i> , 1993.
Chalepina	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1977.
Clausindina	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1977.
3 α , α -Dimetil-Xantiletina	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1976.
Hortilina	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1976.
3 α , α -Dimetil-Psoraleno	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1976.
Isoangenomalina	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1977.
Marmesina	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1989.
Oroselona	MURRAY, 1978.
Febalosina	CUCA-SUAREZ & DELLE-MONACHE, 1991.
Psoraleno	ERAZO, GARCIA & DELLE-MONACHE, 1990.
Preniletina	MURRAY, 1978.
Escopoletina	TORRES <i>et al.</i> , 1979.
Xantiletina	DELLE-MONACHE <i>et al.</i> , 1976.
Xantotoxina	COMPAGNONE, RODRIGUES & DELLE-MONACHE, 1993.
Angelicina	ERAZO, GARCIA & DELLE-MONACHE, 1990.
Columbianetina	CUCA-SUAREZ, MARTINEZ & DELLE-MONACHE, 1998.
Di-Metoxi-Esculetina (6,7-D-Metoxi-cumarina)	Metilação da esculetina.
Di-Metoxi-Dafnetina (7,8-Di-Metoxi-cumarina)	Metilação da dafnetina.
Esculetina (6,7-Di-Hidroxi-cumarina)	FLUKA.
Fraxetina (7,8-Di-Hidroxi-6-Hidroxi-cumarina)	SARSYNTHESE.
<i>Herniarin</i> (7-Metoxi-cumarina)	SARSYNTHESE.
7-O-Geranyl-Esculetina (6-Metoxi-7-geraniloxi-cumarina)	TORRES <i>et al.</i> , 1979.
Ostenol	CUCA-SUAREZ, MARTINEZ & DELLE-MONACHE, 1998.
Aloxantoxiletina	CUCA-SUAREZ, MENICHINI & DELLE-MONACHE, 2002.
(-) Heraclenol	TRANI <i>et al.</i> , 1997.
Imperatorina	TRANI <i>et al.</i> , 1997.
Isopimpineline	TRANI <i>et al.</i> , 2004.
Cumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
7-Metilcumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
7-O-Acetilcumarina	GOTTLIEB ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
7-Clorocumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
7-Nitrocumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Metilcumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Hidroxycumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-O-Acetilcumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Metoxicumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Clorocumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Iodocumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Aminocumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Carboxycumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Cianocumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Aldeidocumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
6-Nitrocumarina	GOTTLIEB, ALVES DE LIMA & DELLE-MONACHE, 1979.
Balsamiferona	CUCA-SUAREZ, L.E. comunicação pessoal.

Tabela IV. Estruturas químicas de derivados cumarínicos simples estudados nesse trabalho.



I-Cumarinas simples MONOSSUBSTITUIDAS	R ₁	R ₂	R ₃
(1) Cumarina	H	H	H
(2) 6-Metilcumarina	CH ₃	H	H
(3) 6-Hidroxicumarina	OH	H	H
(4) 6-O-Acetilcumarina	O-C ₂ H ₃ O	H	H
(5) 6-Metoxicumarina	O-CH ₃	H	H
(6) 6-Clorocumarina	Cl	H	H
(7) 6-Iodocumarina	I	H	H
(8) 6-Aminocumarina	NH ₂	H	H
(9) 6-Carboxcumarina	COOH	H	H
(10) 6-Cianocumarina	CN	H	H
(11) 6-Aldeidocumarina	CHO	H	H
(12) 6-Nitrocumarina	NO ₂	H	H
(13) 7-Metoxicumarina (Herniarina)	H	O-CH ₃	H
(14) 7- Metilcumarina	H	CH ₃	H
(15) 7-O-Acetilcumarina	H	O-C ₂ H ₃ O	H
(16) 7-Clorocumarina	H	Cl	H
(17) 7-Nitrocumarina	H	NO ₂	H
I.II-Cumarinas simples BISSUBSTITUIDAS			
(18) Escopoletina (6-Metoxi, 7-Hidroxycumarina)	O-CH ₃	OH	H
(19) Esculetina (6,7 di-hidroxycumarina)	OH	OH	H
(20) Di-Metoxi-Esculetina (6,7-Di-Metoxi-Cumarina)	O-CH ₃	O-CH ₃	H
(21) Di-Metoxi-Dafnetina (7,8-Di-Metoxi-Cumarina)	H	O-CH ₃	O-CH ₃
I.III-Cumarinas simples TRISSUBSTITUIDAS			
(22) Fraxetina (6-Metoxi- 7,8- Di-Hidroxycumarina)	O-CH ₃	OH	OH

Tabela V. Estruturas químicas de derivados cumarínicos complexos estudados nesse trabalho.

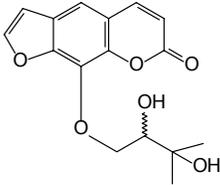
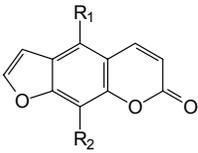
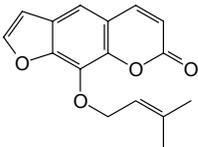
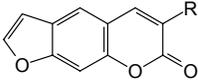
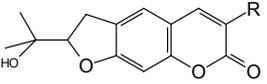
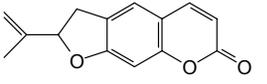
II. Furano e dihidrofuranocumarinas	R	R1	R2
II. I Lineares			
			
(23) (-) Heraclenol			
			
(24) Bergapteno		O-CH ₃	H
(25) Xantoxina		H	O-CH ₃
(26) Isopimpineline		O-CH ₃	O-CH ₃
			
(27) Imperatorina			
			
(28) Clausindina			
(29) Psoraleno	H		
(30) 3 α,α Di-Metil-Psoraleno			
			
(31) Marmesina	H		
(32) Chalepina			
			
(33) Isoangelomalina			

Tabela V. Estruturas químicas de derivados cumarínicos complexos estudados nesse trabalho (cont.)

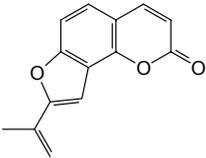
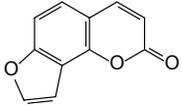
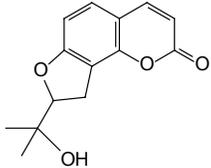
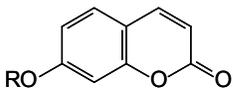
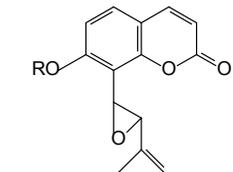
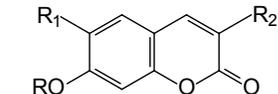
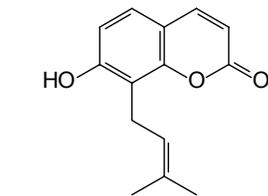
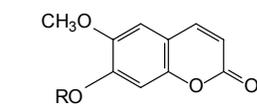
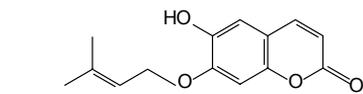
II. Furano e dihidrofuranocumarinas	R	R1	R2
II.II - Angulares			
			
(34) Oroselone			
			
(35) Angelicina			
			
(36) Columbianetina			

Tabela V. Estruturas químicas de derivados cumarínicos complexos estudados nesse trabalho (cont.)

III – Piranocumarinas	R	R1	R2
III.I – Angulares			
(37) Hortilina			
(38) Aloxafantoxiletina			
III.II – Lineares			
	H		
(39) Xantiletina			
(40) 3 α, α Di-Metil-Xantiletina			

Tabela V. Estruturas químicas de derivados cumarínicos complexos estudados nesse trabalho (cont.)

IV- Cumarinas Preniladas	R	R1	R2
			
(41) Aurapteno			
	CH ₃		
(42) Febalosina	CH ₃		
	H		
(43) Balsamiferona	H		
			
(44) Ostenol			
			
(45) 7-O-Geranyl-Esculetina			
			
(46) Preniletina			

3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

3.2.1. Dissolução e diluição das cumarinas

As cumarinas foram dissolvidas em DMSO (10% do volume final) e os volumes completados com caldo de Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, USA) para uma concentração final de 2 mg/mL. A partir desta solução foram preparadas diluições usadas nos testes de atividade antibacteriana.

3.2.2. Microrganismos testes

Os estudos foram desenvolvidos com as seguintes estirpes bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EUA) e *Bacillus cereus* MIP 96016 (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSC). Essas foram mantidas em caldo de cérebro e coração (Brain Heart Infusion, BHI) à -20°C, no Laboratório de Antibióticos, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.3. Preparo do inóculo

Os inóculos de bactérias foram preparados a partir da transferência de 300µL de cada cultura estoque para 3 mL de caldo BHI. As incubações foram mantidas por 24h a 36°C, sendo a pureza das culturas verificadas após as primeiras 8 horas de incubação em meio Ágar Sangue (Blood Agar Base, adicionado de 5% de hemácias de sangue de carneiro). A concentração das suspensões foi ajustada com solução fisiológica estéril (0,9%

cloreto de sódio) para a turvação correspondente a 10^8 UFC mL⁻¹ (tubo 0,5 da escala de McFarland) (SMÂNIA *et al.*, 1995, p. 178-179)

3.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima

A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo. As substâncias teste foram dissolvidas em 100µL em dimetil sulfóxido (DMSO) previamente esterilizado por autoclavação e as soluções foram adicionadas em 900 µL de caldo Mueller-Hinton. Posteriormente foram preparadas diluições seriadas em concentrações variando de 2,0 a 0,0156 mg/mL as quais foram distribuídas em volumes de 100 µL em placa de microdiluição de 96 orifícios. Como controle de crescimento e de esterilidade foram usadas apenas as misturas de meio de cultura e DMSO sem a adição de agentes antimicrobianos. Em cada orifício teste e de controle de crescimento foram adicionados 5µL de inóculo bacteriano. Os experimentos foram desenvolvidos em duplicata e as placas foram incubadas por 24h a 36°C. A leitura dos experimentos foi realizada primeiramente através da densidade ótica com uso de leitora de ELISA (modelo CLX800-BioTek Instrumentos, Inc.) e, posteriormente, com uso de 20 µL de revelador de crescimento bacteriano, o *p*-iodo nitro tetrazolium (o INT- cloreto de (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium, diluído 1/1 em etanol PA).

A CIM foi considerada a menor concentração da substância que inibiu o crescimento bacteriano após incubação (após revelação com INT, amarelo indica ausência de crescimento bacteriano, púrpura indica crescimento) (SMÂNIA *et al.*, 1995, p. 178-179). Os resultados foram expressos em µg/mL.

3.2.5. Determinação da concentração mínima bactericida

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foram transferidos 10 μ L de cada cultura sem crescimento aparente, para 90 μ L de meio de cultura apropriado. A incubação, leitura e interpretação foram realizadas conforme especificado para CIM.

A CBM foi considerada a menor concentração dos compostos que geraram redução de 99,9% no número de unidades formadoras de colônia (UFC) (SMÂNIA *et al.*, 1995, p.178-179).

3.2.6. Análise dos resultados

As cumarinas cuja relação entre o valor obtido para CBM/CIM for igual ou inferior a 4 são consideradas bactericidas. Aquelas cuja relação CBM/CIM for superior a 4 foram consideradas de atividade bacteriostática (DESHPANDE *et al.*, 2004, p. 73-75)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Tabela IV, as cumarinas simples podem apresentar substituições nos carbonos 6, 7 e 8. Para facilitar o entendimento da relação entre as estruturas e atividade antibacteriana, essas serão discutidas em etapas. Na Tabela VI estão apresentados os resultados da atividade antibacteriana das cumarinas simples monossubstituídas.

A cumarina *per se* (composto **1**) exibiu atividade inibitória contra ambas bactérias Gram-positivas e, especialmente, contra Gram-negativas. Nos estudos de Kayser; Kolodziej (1999, p. 172) a atividade da cumarina *per se* foi ligeiramente menor nas Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, a cumarina foi ativa na concentração 400 µg/mL, enquanto que atividade antibacteriana foi observada com 500 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*). Esses autores sugerem que a atividade antibacteriana das cumarinas oxigenadas depende, aparentemente, da posição e composição dos radicais substituintes no anel aromático do esqueleto cumarínico. A inclusão de uma hidroxila na posição C₆ da cumarina (composto **3**) resulta em decréscimo da atividade antibacteriana (o que confirma estudos anteriores de JURD *et al.*, 1971 b, p. 2971-2974) enquanto que a inclusão de radicais menos polares como CH₃ e O-CH₃ restituem a atividade da cumarina principalmente contra bactérias Gram-negativas. Esses dados corroboram os estudos de Kayser; Kolodziej (1999, p. 172) que enfatizam o grau de substituição e a polaridade das substâncias como fatores importantes na definição da atividade antimicrobiana. Um radical metil na posição C₆ (composto **2**) bem como a presença de um grupo metoxi (composto **5**) realça a atividade da cumarina principalmente contra bactérias Gram-negativas. O radical metil em C₆ confere um poder antimicrobiano

maior que um radical metoxi para bactérias Gram-positivas, porém menor em comparação a cumarina (composto **1**). A atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas parece não ser tão efetiva quanto nas Gram-negativas, provavelmente devido às propriedades físicas de cada bactéria. A introdução de um grupo metil em C₇ (composto **14**) da cumarina mantém a atividade antibacteriana para Gram-negativas, porém diminuída com relação às bactérias Gram-positivas. Um grupo metoxi nesta mesma posição, entretanto, (composto **13**) restitui a mesma atividade daquela da cumarina (composto **1**) para todas as cepas testadas. Jurd; King; Mihara (1971 a, p. 2965-2970) mostraram que a metoxilação em C₇ da umbeliferona (7-hidroxycumarina) bem como em C₆ aumenta a atividade antimicrobiana contra os microorganismos testados. O derivado *O*-acetil da cumarina em C₇ (composto **15**) ou C₆ (composto **4**) reflete na diminuição da atividade. Entretanto, a cumarina *O*-acetilada na posição C₆ (composto **4**) é menos ativa que a 7-*O*-acetil-cumarina (composto **15**). A *O*-acetilação na posição C₆ (composto **4**) faz a atividade antibacteriana da cumarina diminuir similarmente a 6-hidroxycumarina (composto **3**). A adição de NO₂ nas posições C₆ (composto **12**) e C₇ (composto **17**) da cumarina *per se* parece não ser requisito para atividade antibacteriana (com CIMs variando entre 1000 e superior a 2000 µg/mL) bem como a adição de radical amina (NH₂) em 6-aminocumarina (composto **8**). A halogenação da cumarina em C₆ e C₇ produzindo 6-clorocumarina (composto **6**) e a 7-clorocumarina (composto **16**) faz a atividade diminuir, enquanto que a adição de átomo de iodo em 6-iodocumarina (composto **7**) a torna inativa contra todas as bactérias testadas. Diferentes modificações na cumarina (composto **1**) na posição C₆, resultando em 6-carboxycumarina (composto **9**), 6-cianocumarina (composto **10**) e 6-aldeidocumarina (composto **11**), fazem a atividade diminuir ou até mesmo a inativam com CIMs iguais ou superiores a 2000 µg/mL.

Tabela VI. Concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas de cumarinas monossustituídas ($\mu\text{g/mL}$).

GRUPO I Cumarinas monossustituídas	GRAM NEGATIVAS				GRAM POSITIVAS			
	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>
(1) Cumarina	500	1000	500	1000	500	2000	1000	2000
(2) 6-Metilcumarina	500	2000	500	>2000	1000	>2000	1000	>2000
(3) 6-Hidroxycumarina	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(4) 6-O-Acetilcumarina	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(5) 6-Metoxicumarina	500	1000	500	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(6) 6-Clorocumarina	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(7) 6-Iodocumarina	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
(8) 6-Aminocumarina	1000	2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(9) 6-Carboxycumarina	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	1000	>2000
(10) 6-Cianocumarina	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(11) 6-Aldeido-cumarina	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(12) 6-Nitrocumarina	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(13) 7-Metoxicumarina (Herniarina)	500	1000	500	>2000	1000	>2000	1000	>2000
(14) 7-Metilcumarina	500	2000	500	>2000	2000	>2000	1000	>2000
(15) 7-O-Acetil-cumarina	1000	1000	1000	>2000	1000	>2000	1000	>2000
(16) 7-Clorocumarina	2000	>2000	2000	>2000	1000	2000	2000	>2000
(17) 7-Nitrocumarina	1000	>2000	2000	>2000	1000	>2000	2000	>2000

Os compostos **18**, **19**, **20**, **21** (Tabela VII) são cumarinas com duas substituições em qualquer das três posições (C_6 , C_7 e C_8). Todas essas substituições resultaram em diminuição da atividade antibacteriana, quando os compostos foram comparados com a cumarina *per se* com exceção da esculetina que com relação a bactérias Gram-positivas demonstrou atividade similar da cumarina *per se*. Resultados semelhantes a estes foram divulgados por Kayser; Kolodziej (1999, p. 172) onde os autores afirmam que a atividade antibacteriana das cumarinas monossustituídas não aumenta de maneira significativa com a adição de mais um grupo funcional. A introdução de dois radicais metoxi nas posições C_7 e C_8 (composto **21**) diminui a atividade antibacteriana se comparado a cumarina *per se* (composto **1**). Na esculetina (6,7 dihidroxycumarina, composto **19**) a adição de hidroxilas

nas posições C₆ e C₇, provavelmente, facilitou a passagem da substância através do peptoglicano e com isso, ocorreu a atividade (CIM = 500µg/mL) contra Gram-positivas. A atividade da esculetina contra bactérias Gram-positivas já havia sido descrita por Tegos e colaboradores (2002, p. 3136). Os autores ainda comentam sobre a possibilidade do incremento da atividade contra Gram-negativas pelo bloqueio das bombas de efluxo (famílias de proteínas especializadas em expulsar substâncias nocivas às células para o meio extracelular) dessas bactérias (TEGOS *et al.*, 2002, p. 3136). As cumarinas umbeliferona (7-hidroxicumarina) e dafnetina (7,8-dihidroxicumarina) não foram fornecidas para teste para que houvesse comparação da atividade antibacteriana entre uma OH em C₇ e duas em C₇ e C₈. Jurd *et al.* (1971, p. 2972) demonstraram que a alquilação da dafnetina resultando em 7-O-metil, ou dimetil ou dialil resulta na perda da atividade antimicrobiana da mesma. Apesar da 7-hidroxicumarina (umbeliferona) não ter sido usada para testes nesse estudo, relatos prévios mostram que a presença do radical OH na posição C₇ também resulta em decréscimo na atividade da cumarina contra todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (KAYSER; KOLODZIEJ, 1999, p. 172). A metoxilação nas posições C₆ e C₇ gerando Di-metoxi-esculetina (composto **20**), diminui a atividade antibacteriana para ambos os grupos de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Kayser; Kolodziej (1999, p. 172) demonstraram que a introdução de um grupo metoxi em C₆ diminui a atividade antibacteriana da 7- metoxicumarina. A manutenção do grupo O-metil em C₆ e a adição de um radical hidroxila em C₇, diminui a atividade (CIM=1000 µg/mL, composto **18**). Os resultados com escopoletina (composto **18**) e Di-metoxi-esculetina (composto **20**) indicam que o radical metoxi em C₆ diminui a atividade antibacteriana da cumarina (composto **1**) bem como dois grupos metoxi em C₇/C₈.

Tabela VII. Concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas de cumarinas dissubstituídas ($\mu\text{g/mL}$).

GRUPO I.II Cumarinas dissubstituídas	GRAM NEGATIVAS				GRAM POSITIVAS			
	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>
(18) Escopoletina	1000	1000	1000	>2000	1000	>2000	1000	2000
(19) Esculetina	1000	1000	1000	2000	500	1000	500	2000
(20) Di-Metoxi-esculetina	2000	2000	2000	>2000	2000	>2000	1000	2000
(21) Di-Metoxi-dafnetina	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000

A cumarina fraxetina (composto **22**) representou o grupo dos análogos trissubstituídos, apresentou atividade diminuída para ambos os grupos de microorganismos (Tabela VIII). A adição de um radical O-CH₃ na posição C₆ ou a presença de duas hidroxilas nas posições C₇ e C₈, provavelmente devem ter alterado a configuração espacial do composto e com isso diminuiu a afinidade aos sistemas de transportes ou sítios de interação bacterianos. Kayser; Kolodziej (1999, p. 171) testaram a atividade da 7,8-dihidroxicumarina (dafnetina) e observaram CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas testadas. A fraxetina demonstrou fraca atividade antibacteriana possivelmente porque falta um grupo adicional metoxi. Kayser; Kolodziej (1999, p. 171) estudaram análogos trissubstituídos e tetrassubstituídos e os derivados mais ativos foram aqueles possuindo dois grupos metoxi em C₅ e C₆ ou C₆ e C₇.

Tabela VIII. Concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas de cumarinas trissubstituídas ($\mu\text{g/mL}$).

GRUPO I. III Cumarinas trissubstituídas	GRAM NEGATIVAS				GRAM POSITIVAS			
	<i>E coli</i>		<i>P aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>
(22) Fraxetina	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000

Na Tabela IX estão apresentados os resultados de um grupo de análogos, as furanocumarinas, caracterizadas pela presença do anel furano condensado ao anel aromático do núcleo cumarínico (psoraleno) (composto **29**). Alguns análogos desse grupo foram testados pela primeira vez quanto sua ação antibacteriana, neste trabalho. A presença do anel furano condensado ao núcleo cumarínico, fez com que a atividade do psoraleno (composto **29**) diminuísse duas vezes com relação às bactérias Gram-negativas e o tornou inativo contra Gram-positivas, até a concentração testada. A adição de um grupo metoxi em C₅ (composto **24**) diminuiu a atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativa e contra Gram-positivas. A metoxilação na posição C₉ (composto **32**) também fez a atividade diminuir contra Gram-negativas e restituiu a ação da cumarina *per se* (composto **1**) para Gram-positivas. A adição de grupos metoxi na posição C₅ (composto **29**) e C₉ (composto **25**) fizeram a atividade diminuir contra bactérias Gram-negativas e restituiu a atividade da cumarina *per se* (composto **1**) contra Gram-positivas. Por outro lado, o derivado dimetoxi C₅-C₉ gerando isopimpinellina (composto **26**), reduziu a atividade chegando a ser inativa contra *S. aureus*. Clausindina (composto **28**) e 3 α,α Di-Metil-psoraleno (composto **30**) são furanocumarinas C-preniladas (cadeia ramificada de 5 carbonos) Essas substituições apresentaram atividade antibacteriana diminuída provavelmente pela posição do radical prenil em C₃. A estrutura da unidade prenilica do composto **28** e do composto **30** na posição C₃ não interferiu na atividade. O (-)-heraclenol (composto **23**) e imperatorina

(composto **27**) são furanocumarinas O-preniladas em C₉, sendo ainda que o grupo prenil do composto **23** é hidroxilado e do **27** não. A oxidação da unidade isoprenílica formando o derivado β-γ-dihidroxil-9-O-prenil (composto **23**, (-)- heraclenol) pode ser responsável pela restituição da atividade da cumarina (composto **1**) contra bactérias Gram-positivas com relação ao composto **27**. Isoangenomalin (composto **33**), chalepina (composto **32**) e marmesin (composto **31**) são cumarinas são C₇-prenil cumarinas. Ambas furanocumarinas (**31** e **33**) exibiram diminuição da atividade antibacteriana, sugerindo que a presença de radical prenil hidroxilado ou não, na posição C₇ diminui a atividade contra os dois grupos de bactérias. A atividade da cumarina chalepina (composto **32**) é similar ao dos compostos **33** e **31**, sugerindo que a presença de radical prenil é irrelevante para atividade antimicrobiana da cumarina *per se*. Das furanocumarinas angulares, (onde a fusão do anel furânico ocorre entre os carbonos C₈ e C₉ do núcleo cumarínico originando uma estrutura angular tal como) a angelicina (composto **35**) apresenta atividade aumentada com relação ao composto **1**, sugerindo que esta formação estrutural em ângulo realçou a atividade da cumarina *per se* contra bactérias Gram-negativas e diminuí contra bactérias Gram-positivas. Os compostos **34** e **36** não apresentaram atividade. Parece que o grupo isopropil inibe a atividade destes compostos para as bactérias Gram-negativas. Contra as Gram positivas, a atividade antibacteriana parece estar relacionada com o grau de oxidação deste radical isopropil. Existem muitas variáveis para explicar as diferenças com relação à estrutura e especificidade de espectro bacteriano, porém se sabe que a estrutura espacial, a polaridade, o tamanho das cadeias substituinte e a presença de mecanismos de resistência bacteriana são aspectos importantes no composto para a atividade antimicrobiana.

Tabela IX. Concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas de furano e dihidrofurancumarinas ($\mu\text{g/mL}$).

GRUPO II Furano e dihidrofuranos	GRAM NEGATIVAS				GRAM POSITIVAS			
	<i>E coli</i>		<i>P aeruginosa</i>		<i>S aureus</i>		<i>B cereus</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
LINEARES								
(23) (-) Heraclenol	NT	NT	2000	>2000	NT	NT	500	2000
(24) Bergapteno	>2000	>2000	2000	>2000	1000	2000	1000	2000
(25) Xantotoxina	2000	2000	2000	>2000	1000	2000	500	1000
(26) Isopimpineline	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(27) Imperatorina	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(28) Clausindina	2000	>2000	NT	NT	2000	>2000	NT	NT
(29) Psoraleno	1000	>2000	NT	NT	>2000	>2000	NT	NT
(30) 3 α,α Di-Metil-Psoraleno	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
(31) Marmesina	>2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	2000
(32) Chalepina	2000	>2000	NT	NT	1000	>2000	NT	NT
(33) Isoangenomalina	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
ANGULARES								
(34) Oroselone	2000	>2000	2000	>2000	1000	2000	500	1000
(35) Angelicina	250	1000	NT	NT	2000	>2000	NT	NT
(36) Columbianetina	2000	2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000

NT: substância não testada por ser insuficiente

As piranocumarinas (cumarinas que possuem um anel pirano condensado ao anel aromático do núcleo cumarínico, nos carbonos C_9 - C_8 - angulares como lineares, nos carbonos C_7 - C_8) constituíram uma classe de derivados cumarínicos testados com pouca ou nenhuma atividade antibacteriana (Tabela X), com CIMs iguais ou superiores a 2000 $\mu\text{g/mL}$ contra todas as cepas testadas. Os resultados sugerem que a presença do anel pirano

condensado cumarina, não é um fator estrutural importante para a atividade antibacteriana da cumarina.

Tabela X. Concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas de piranocumarinas ($\mu\text{g/mL}$).

GRUPO III Piranocumarinas	GRAM NEGATIVAS				GRAM POSITIVAS			
	<i>E coli</i>		<i>P aeruginosa</i>		<i>S aureus</i>		<i>B cereus</i>	
	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>
(37) Hortilina	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
(38) Alloxantiletina	>2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000	2000	>2000
(39) Xantiletina	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
(40) 3- α,α Dimetil-Xantiletina	2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

Dentre as cumarinas preniladas (Tabela XI), a balsamiferona (composto **43**), o aurapteno (composto **41**), o febalosina (composto **42**), o preniletina (composto **46**) e 7-O-geranil-esculetina (composto **45**) mostraram-se ineficazes contra todas as cepas testadas. A única exceção foi o ostenol (composto **44**) (Fig. 9), uma C_7 -hidroxi- C_8 -prenil cumarina que teve atividade surpreendentemente mais intensa com $CIM = 62.5 \mu\text{g/mL}$ contra bactérias Gram-positivas, porém diminuída contra bactérias Gram-negativas em relação ao composto **1**. Os resultados mostram a importância da C_9 -prenilação para a atividade antibacteriana. No entanto, a oxidação da unidade prenilica e migração da dupla do composto **42** (febalosina) tornaram o mesmo inativo. Estas observações sugerem que a adição de um radical prenil em C_9 aumenta a afinidade (composto **44**), porém sua oxidação inibe tal afinidade (composto **42**). O composto **43** apresenta hidroxila em C_8 , e um radical prenil em C_3 e outro em C_7 , todavia apresentou atividade antibacteriana diminuída contra as cepas testadas, sugerindo que a presença de grupos volumosos nestas posições (C_7 e C_3) impedem

que a molécula se aproxime do sítio ativo ou receptor da bactéria. Os demais substituintes prenilados como prenilatina (composto **46**), 7-O-geranil-esculetina (composto **45**), ou aurapteno (composto **41**) demonstraram pouca atividade, sugerindo que em C₇, tanto a presença de radical prenil (composto **46**), como uma cadeia prenilóxi (composto **41** e **45**) bem como a concomitante adição de grupo OH ou metoxi torna a atividade dos derivados pouco notável.

Tabela XI. Concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas de cumarinas preniladas (µg/mL).

GRUPO IV Cumarinas preniladas	GRAM NEGATIVAS				GRAM POSITIVAS			
	<i>E coli</i>		<i>P aeruginosa</i>		<i>S aureus</i>		<i>B cereus</i>	
	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>	<i>CIM</i>	<i>CBM</i>
(41) Aurapteno	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
(42) Febalosina	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
(43) Balsamiferona	>2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(44) Ostenol	2000	>2000	2000	>2000	62,5	125	62,5	125
(45) 7-O-geranil esculetina	>2000	>2000	2000	>2000	>2000	>2000	2000	>2000
(46) Prenilatina	2000	>2000	NT	NT	>2000	>2000	NT	NT

NT: substância não testada por ser insuficiente.

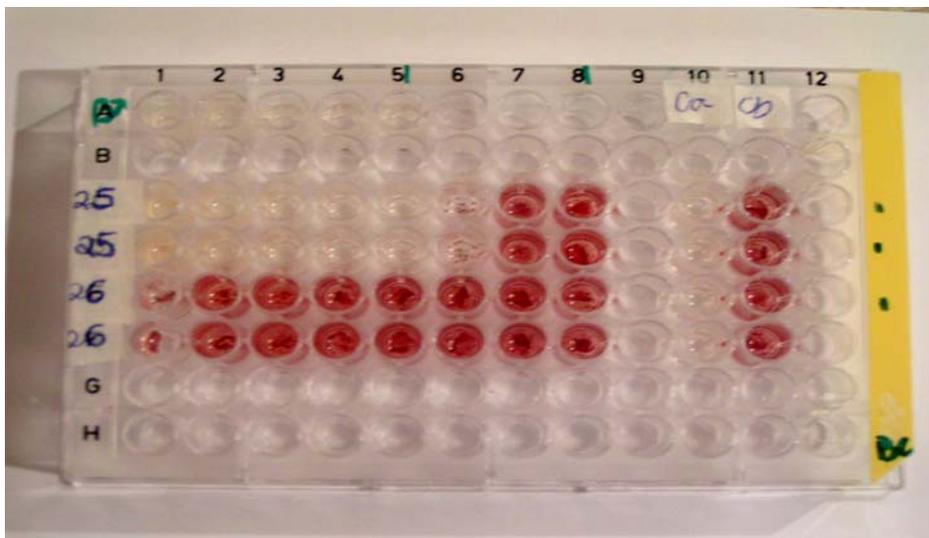


Figura 9. Microdiluição em placa. Determinação das concentrações inibitórias mínimas do *osthenol* (composto 25) e do *alloxanthoxyletin* (composto 26) contra *B. cereus*.

Além das concentrações inibitórias nas tabelas de VI a XI, estão dispostas as concentrações bactericidas mínimas (CBM). Se observarmos a razão entre CIMs e CBMs para as cumarinas com atividade inibitória de até 1000 $\mu\text{g/mL}$ constata-se que na maioria dos casos, (86%) o valor obtido não foi superior a quatro vezes, indicando que de maneira geral, as cumarinas apresentam atividade bactericida.

5. CONCLUSÕES

- a) A cumarina *per se* (composto **1**) foi o composto que de maneira geral, apresentou a melhor atividade antibacteriana. Substituições no anel básico deste composto original alteraram a atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme segue abaixo:
- b) A adição de radicais menos polares (CH₃ e O-CH₃) nas posições C₆ ou C₇ da cumarina manteve a atividade contra bactérias Gram-negativas.
- c) A *O*-acetilação nas posições C₆ são ineficazes, porém a *O*-acetilação na posição C₇ faz a atividade antibacteriana aumentar contra ambas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em relação a cumarina *per se*.
- d) Cumarinas aminadas nas posições C₆ ou C₇ apresentaram atividade diminuída ou até mesmo mostraram-se inativas contra todas as cepas, em relação ao composto **1**.
- e) Radicais ciano, carboxi e aldeído na posição C₆ diminuíram a atividade antibacteriana das cumarinas contra ambas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- f) Na esculetina (6,7 dihidroxicumarina) o radical *orto*-dihidroxil, favoreceu a ação, principalmente, contra bactérias Gram-positivas. A *O*-metilação da *esculetin* em C₆ e C₇ diminuiu a atividade para os dois grupos de bactérias.
- g) Hidroxilas nas posições C₇ e C₈ na 6-metóxicumarinas fizeram a atividade antibacteriana diminuir contra todas as cepas bacterianas.

- h) Cumarinas furanoangulares mostraram relação estrutura atividade diversificada. O estudo mostrou que a presença de radical isopropil em C₈ predispôs a atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e pouca atividade contra Gram-negativas. Na ausência desse radical, a suscetibilidade dos microrganismos foi invertida, sendo fraca contra Gram negativas e aumentada contra Gram-positivas.
- i) Piranocumarinas foi a única classe de cumarinas inativas contra as bactérias estudadas. O anel extra de seis elementos pareceu influir negativamente na atividade antibacteriana.
- j) Cumarinas preniladas necessitam de uma hidroxila na posição C₇ e um radical prenil na posição C₈ para se mostrarem ativas contra as bactérias Gram-positivas. Essa estrutura, entretanto, não é ativa contra Gram-negativas.
- k) Sugere-se estudar a cumarina *per se*, bem como o ostenol e angelicina como protótipos (líder) para futuras explorações referentes a trabalhos relacionando a atividade antimicrobiana de compostos cumarínicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHISA, T.; TOKUDA, H.; UKIYA, M.; IIZUKA, M.; SCHNEIDER, S.; OGASAWARA, K.; MUKAINAKA, T.; IWATSUKI, K.; SUZUKI, T.; NISHINO, H. Chalcones, coumarins, and flavanones from the exudates of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects. **Cancer letters**, v. 201, p.133-137, 2003.

BABA, M.; JIN, Y.; MIZUNO, A.; SUZUKI, H.; OKADA, Y.; TAKASUKA, N.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; OKUYAMA, T. Studies on cancer Chemoprevention by Traditional Folk MedicinesXXIV. Inhibitory Effect of a coumarin Derivative, 7-Isopentenylcoumarin, against Tumor-promotion. **Biol Pharm Bull.** v. 25, n. 2, p. 244-246, 2002.

BANERJI, A. Biotechnical Potential of Natural Products. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 27, p. 105-113, 1992.

BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J. The Millennium Bugs- The Need for and Development of New Antibacterials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 51-59, 2000.

BECKLEY-KARTEY, S.A., HOTCHKISS, S.A.; CAPEL, M. Comparative *in vitro* skin absorption and metabolism of coumarin (1,2- benzopyrone) in human, rat, and mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 145, n. 1, p. 34-42, 1997.

BERENBAUM, M. – Phototoxicity of Plant Secondary metabolites: Insect and Mammalian Perspectives. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 29, n. 2, p. 119-134, 1995.

BETHEA, D.; FULLMER, B.; SYED, S.; SELTZER, G.; TIANO, J.; RISCHKO, C.; GILLESPIE, L.; BROWN, D.; GASPARRO, F.P. Psoralen photobiology and photochemoterapy: 50years of science and medicine. **Journal of Dermatological Science**, v. 19, p. 78-88, 1999.

BOCCA, C.; GABRIEL,L.; BOZZO, F. ; MIGLIETTA,A. Microtubule-Inteacting Activity and Cytotoxicity of the Prenylated Coumarin Ferulenol. **Planta Med**, v. 68, p. 1135-1137, 2002.

BONSIGNORE, L.; COTTIGLIA, F.; LAVAGNA, S.M.; LOY, G.; SECCI, D. Synthesis via carbon suboxide and pharmacological activity of coumarin derivatives. **Il Farmaco**, v.53, p. 693-697, 1998.

BORN, S.L., CAUDILL, D., SMITH, B.J.; LECHMAN-McKEEMAN, L.D.*In Vitro* Kinetics of Coumarin 3,4-Epoxydation: Application to Species Differences in Toxicity and Carcinogenicity. **Toxicological Sciences**, v.58, p. 23-31, 2000.

BRACCIO, M.; GROSSI, G.; ROMA, G.; SIGNORELLO, M.G.; LEONCINI, G. Synthesis and in vitro inhibitory activity on human platelet aggregation of novel properly substituted 4-(1-piperaziny) coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 397-409, 2004.

BRUNETON, J.C. – Coumarins. In: _____ **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris:Intercepted Ltd, 1995. Bibliografia: p. 229-240.

COMPAGNONE, R.; RODRIGUES, M.C. and MONACHE, F.D. – Coumarins from *Pilocarpus racemosus*. **Fitoterapia**, v. 64, p. 557, 1993.

CAMPOS-TOIMIL, M.; ORALLO, F.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Synthesis and Vasorelaxant Activity of New Coumarin and Furanocoumarin Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**,v. 12, p. 783-786, 2002.

CHEN, J.; CHIOU, W.F.; CHEN, C.C.; CHEN, C.F. Effect of the plant -extract osthole on the relaxation of rabbit *corpus cavernosum* tissue *in vitro*. **The Journal of Urology**, v. 163, p. 1975-1980, 2000.

CHENG, J.F.; CHEN, M.; WALLACE, D.; TITH, S.; ARRHENIUS, T.; KASHIWAGI, H.; ONO, Y.; ISHIKAWA, A.; SATO, H.; KOZONO, T.; SATO, H.; NADZAN, A.M. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF- α inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p.2411-2415, 2004.

CHIANG, M.T.; BITTNER, M.; SILVA, M.; MONDACA, A.; ZEMELMAN, R.; SAMMES, R. A prenylated coumarin with antimicrobial activity from *Haplopappus multifolius*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 11, p. 2753-2755, 1982.

CHOWDHURY, R.; HASAN, C.M.; RASHID, M.A. Antimicrobial activity of *Toona ciliata* and *Amoora rohituka*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1-2, p. 155-158, 2003.

COMPAGNI, A.; CHRISTOFORI, G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis, **Br J Cancer**, v. 83, n. 1, p. 1-5, 2000.

CORSINI, E., LUCCHI, L.; BINAGLIA, M.; VIVIANI, B.; BEVILACQUA, C.; MONASTRA, G.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L. Cloricromene, a semi-synthetic coumarin derivative, inhibits tumor necrosis factor- α production at a pre-transcriptional level. **European Journal of Pharmacology**, v. 418, p. 231-237, 2001.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. Bibliografia: p. 591.

Council Directive of 22 June 1988 on the approximation of the laws of the Member states relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. **Official Journal of the European Communities**, 5.7. 88, No L 184/61.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobials Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-82, 1999.

CRAVOTTO, G.; BALLIANO, G.; ROBALDO, B.; OLIARO-BOSSO, S.; CHIMICHI, S.; BOCCALINI, M. Farnesyloxycoumarins, a new class of Squalene-hopene cyclase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1931-1934, 2004.

CUCA-SUAREZ, L.E.; DELLE-MONACHE, F.- Constituents of *Murraya Exótica* adapted in Colombia. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 22, p. 38-40, 1991.

CUCA-SUAREZ, L.E.; MARTINEZ, J.C.; DELLE-MONACHE, F. Constituentes quimicos de *Zanthoxylum monophyllum*. **Rev. Col. Quim**, v. 27, p. 17-27, 1998.

CUCA-SUAREZ, L.E.; MENICHINI, F.; DELLE-MONACHE, F. Tetranortriterpenoids and dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia colombiana*. **Journal Braz Chem Soc**, v. 13, p. 339-344, 2002.

CURINI, M.; EPIFANO, F.; MALTESE, F.; MARCOTULLIO, M.C.; TUBARO, A.; ALTINIER, G.; GONZALES, S.P.; RODRIGUEZ, J. Synthesis and anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxycouamrins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 2241-2243, 2004.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 53, n. 3, p. 153-159, 2004.

DELE-MONACHE, F., MARLETTI, F., BERTOLO, G.B.M., DE MELLO, J.F.; DE LIMA, O.G. Coumarins de *Hortia Arborica*: Hortiline and Hortiolone. **Gazzetta chimica Italiana**, v. 106, p. 681-689, 1976.

DELE-MONACHE, F.; TRANI, M.; YUNES, R.A.; FALKENBERG, D. (-) Lunacrinol from *Esembeckia hieronium*. **Fitoterapia**, v. 66, p. 474, 1995.

DELLE-MONACHE, F.; MONACHE, G.D.; SOUZA, M.A.M.; CAVALCANTI, M.S.; CHIAPPETA, A. Isopentenylindole derivatives and other components of *Esebeckia leiocarpa*. **Gazzetta chimica Italiana**, v. 119, p. 435-439, 1989.

DELLE-MONACHE, F.; VALERA, G.C.; BERTOLO, G.B.M.; MELLO, J.F.; LIMA, O.G. Coumarins of *Hortia arborea*. II Hortiolone and Hortionone. **Gazzetta chimica Italiana**, v. 107, p. 399-402, 1977.

DESPHPANDE, L.; RHOMBER, P.R.; FRITSCHKE, T.R.; SADER, H.S.; JONES, R.N. Bactericidal activity of BAL 9141, a novel parenteral cephalosporin against contemporary Gram-positive and Gram-negative isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious disease**, v.50, p. 73-75, 2004.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T. Protection Against cancer by Plant Phenylpropanoids: Induction of mammalian Anticarcinogenic Enzymes. **Mini Reviews in Medical Chemistry**, v. 2, p. 595-610, 2002.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas com acción antimicrobiana. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DREVS, J.; DROLL, A.; UNGER, C. Angiogenesis Inhibition: Drugs in Clinical Trials. **Onkologie**, v. 22, n. 4, p. 282-290, 1999.

ERASO, S; GARCIA, R.; MONACHE, F.D. Bakuchiol and compounds from *Psoralea glandulosa*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 21, p. 62, 1990.

FENTEM, J. H.; FRY, J.R. Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarins. **Comparative Biochemistry and Physiology C.**, v. 104, n. 1, p. 1- 8, 1993.

FERNANDEZ-PUNTERO, B.; BARROSO, I.; IGLESIAS, I.; BENEDI, J.; VILLAR, A. Antioxidant Activity of Fraxetin: *In Vivo* and *ex Vivo* Parameters in Normal Situation versus Induced Stress. **Biol Pharm Bull.**, v. 24, n. 7, p. 777-784, 2001.

FINN, G.J.; CREAVEN, B.S.; EGAN, D.A. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. **Biochemical Pharmacology**, n. 67, p. 1779-1788, 2004.

FINN, G.J.; KENEALY, E.; CREAVEN, B.S.; EGAN, D. A. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human cell lines. **Cancer Letters**, v. 183, p. 61-68, 2002.

FULLER, R.W.; BOKESCH, H.R.; GUSTAFSON, K.R.; McKEE, T.C.; CARDELINNA II, J.H.; McMAHON, J.B.; CRAGG, G.M.; SOEJARTO, D.; BOYD, M.R. HIV-Inhibitory coumarins from latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmanii* var. *inophylloide*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 16, p. 1961-1964, 1994.

GANGE, R.W.; PARRISH, J.A. Cutaneous phototoxicity due to psoralens. **Natl Cancer Inst Monogr.**, v. 66, p. 117-126, 1984.

GLEYE, C.; LEWIN, G.; LAURENS, A.; JULLIAN, J.C.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R. Acaricidal Activity of Tonka Bean Extracts. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Bioactive Derivatives. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 690-692, 2003.

GORMLEY, N.A.; ORPHANIDES, G.; MEYER, A., CULLIS, P.M.; MAXWELL, A. The interaction of coumarin antibiotics with fragments of DNA gyrase B protein. **Biochemistry**, v. 35, n. 15, p. 5083-5092, 1996.

GOTTLIELO, H.E.; ALVES DE LIMA, R.; DELLE-MONACHE, F. ¹³ CNMR of 6- and 7- substituted coumarins. Correlation with Hammett constants. **J Chem Soc Perkin Transactions II**, p. 435-437, 1979.

GUILLET, D.; SÉRAPHIN, D.; RONDEAU, D.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 571-575, 2001.

GUO, L.Q., TANIGUCHI, M., XIAO, Y.Q., BABA, K.; OHTA, T.; YAMAZOE, Y. Inhibitory Effect of Natural Furanocoumarins on Human Microsomal Cytochrome P450 3A Activity. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 82, p. 122-129, 2000.

GUSTAFSON, K.R.; BOKESCH, H.R.; FULLER, R.W.; CARDELLINA, J.H.; KADUSHI, M.R.; SOEJARTO, D.D.; BOYD, M.R. Calanone, a novel coumarin from *Calophyllum teysmannii*. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 32, p. 5821-5824, 1994.

HADIDI, H., ZAHLSEN, K., IDLE, J.R.; CHOLERTON, S. A single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 9, p. 903-907, 1997.

HELGELAND, L. The Action of Vitamin K and Coumarin Anticoagulants. **Biochemical Education**, v. 8, n. 3, p. 66-69, 1980.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **J. Natl Cancer Inst.**, v. 93, n. 3, p. 178-193, 2001.

HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

ISCHIA, M.; NAPOLITANO, A.; PROTA, G. Psoralens sensitize glutathione photooxidation *in vitro*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 993, p. 143-147, 1989.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL FILHO, V.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliense*.

2. Structure of Three New Couamrins and Cancer Chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins, **J. Nat Prod**, v. 66, p. 368-371, 2003.

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A. –Novel Antiviral Agents: a Medicinal Plant Perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 412-427, 2003.

JIMÉNEZ-OROSCO, F.A.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, J.S.; NIETO-RODRIGUEZ, A.; VELASCO-VELÁSQUEZ, M.A.; MOLINA-GUARNEROS, J.A.; MENDOZA-PATIÑO, N.; MANDRAGÓN-GRACÍA, M.J.; ELIZALDE-GALVAN, P.; CEDEÑO-LEÓN, F.; MANDOKI, J.J. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line a-427 by 7-hydroxycoumarin. **Lung Cancer**, v. 34, p. 185-194, 2001.

JURD, L.; KING Jr. A.D.; MIHARA, K. Antimicrobial properties of umbelliferone derivates. **Phytochemistry**, v.10, p. 2965-2970, 1971a.

JURD, L.; CORSE J.; KING, A.D.; BAYNE, Jr.H; MIHARA, K. Antimicrobial properties of 6,7-dihydroxy-, 7,8-dihydroxy-, 6-hydroxy-and 8-hydroxycoumarins. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2971-2974, 1971b.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, n. 3, p. 239-254, 2003.

KAWASE, M.; TANAKA, T.; SOHARA, Y.; TANI, S.; SAKAGAMI, H.; HAUER, H.; CHATTERJEE, S.S. Structural requirements of hydroxylated coumarins for *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity. **In Vivo**, v. 17, n. 5, p. 509- 512, 2003.

KAWASE, M.; VARU, B.; SHAH, A.; MOTOHASHI, N.; TANI, S.; SAITO, S.; DEBNATH, S.; MAHAPATRA, S.; DASTIDAR, S.G.; CHAKRABARTY, A.N. Antimicrobial activity of new coumarin derivatives. **Arzneimittelforschung**, v. 51, n. 1, p. 67-71, 2001.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Antibacterial Activity of Simple Coumarins: Structural Requirements for Biological Activity. **Z. Naturforsch**, v. 54c, p. 169-174, 1999.

KEMPEN, I.; PAPAPOSTOULOU, D.; THIERRY, N.; POCHE, N.; COUNEROTTE, S.; MASERREL, B.; FOIDART, J.-M.; REBOUD-RAVAUX, M.; NOËL, A.; PIROTTE, B. – 3-Bromophenyl 6-acetoxymethyl-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylate inhibits cancer cell invasion *in vitro* and tumour growth *in vivo*. **British Journal of Cancer**, v. 88, p. 1111-1118, 2003.

KLEINER, H.E.; REED, M.J.; DiGIOVANNI, J. Naturally Occurring Coumarins Inhibit Human Cytochromes P450 and Block Benzo[a]pyrene and 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene DNA Adduct Formation in MCF-7 Cells. **Chem Res Toxicol.**, v. 16, p. 415-422, 2003.

KLEINER, H.E.; VULIMIRI, S.V.; MILLER, L.; JOHNSON JR., W.H.; WHITMAN, C.P.; DI GIOVANNI, J. Oral administration of naturally occurring coumarins leads to

altered phase I and II enzyme activities and reduced DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons in various tissues of SENCA mice. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 1, p. 73-82, 2001.

KNAUBER, J.; MÜLLER, W.E. Anseculin improves passive avoidance learning of aged mice. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 225-233, 2003.

KOENIGS, L.L.; PETER, R.M.; THOMPSON, S.J.; RETTIE, A.E.; TRAGER, W. Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, n. 12, p. 1407-1415, 1997.

KOKUBUN, T.; VEITCH, N.C.; BRIDGE, P.D.; SIMMONDS, M.S.J. Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 779-782, 2003.

KOVAC, B.; NOVAK, I. Electronic structure of coumarins. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 58, p. 1483-1488, 2002.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999. Bibliografia: p. 451-462.

LAGEY, K.; DUINSLAEGER, L.; VANDERKELEN, A. Burns Induced by Plants. **Burns**, v. 21, n. 7, p. 542-543, 1995.

LAKE, B.G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevante for Human Risk Assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 423-453, 1999.

LAKE, B.G. Investigations into the mechanism of coumarin-induced hepatotoxicity in the rat. **Archives of Toxicology, Supplement**, v. 7, p. 16-29, 1984.

LAPRONTI, I.; BIANCHI, N.; BORGATTI, M.; FIBACH, E.; PRUS, E.; GAMBARI, R. Accumulation of γ -globin mRNA in human erytroid cells treated with angelicin. **Eur J. Haematol**, v. 71, p. 189-195, 2003.

LAURIN, P.; FERROUD, D.; KLICH, M.; DUPUIS-HAMELI, C.; MAUVAIS, P.; LASSAIGNE, P.; BONNEFOY, A.; MUSICKI, B. – Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 2079-2084, 1999.

LEE, K.H.; CHAI, H.B.; TAMEZ, P.A.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A.; WIN, K.K.; WA, M.T. Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 535-541, 2003.

LEE, S.; SHIN, D.S.; KIM, J.S.; OH, K.B.; KANG, S.S. Antibacterial Coumarins from *Angelica gigas* Roots. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 6, p. 449-452, 2003.

LEI, T.C.; VIRADOR, V.; YASUMOTO, K.I.; VIEIRA, W.D.; TOYOFUKU, K.; HEARING, V.J. STIMULATION OF Melanoblast Pigmentation by 8- Methoxypsoralen:

The Involvement of Microphthalmia-Associated Transcription Factor, the Protein Kinase A Signal Pathway, and Proteasome-Mediated Degradation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 6, p. 1341-1349, 2002.

LIU, X.L.; ZHANG, L.; FU, X.L.; CHEN, K.; QIAN, B.C. Effect of scopoletin on PC₃ cell proliferation and apoptosis. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 22, n. 10, p. 929-933, 2001.

LONG, T.E. Recent progress toward the clinical development of new anti-MRSA antibiotics. **I Drugs**, v. 6, n. 4, p. 351-359, 2003.

LOPEZ -GONZALEZ, J.S.; PRADO-GARCIA, H.; AGUILAR-CAZARES, D.; MOLINA-GUARNEROS, J.A.; MORALES-FUENTES, J.; MANDOCKI, J.J. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxicoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung Cancer**, v. 43, p. 275-283, 2004.

MADHAVAN, G.R.; BALRAJU, V.; MALLESHAM, B.; CHAKRABARTI, R.; LOHRAY, V.B. Novel Coumarin Derivatives of Heterocyclic Compounds as Lipid-Lowering Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 2547-2551, 2003.

MANOLOV, I.; DANCHEV, N.D. Synthesis and Pharmacological Investigations of Some 4-Hydroxycoumarin Derivatives. **Arch. Pharm. Pharm Med Chem**, v. 2, p. 83-94, 2003.

MAO, P.C.M.; MOUSCADET, J.F.; LEH, H.; AUCLAIR, C.; HSU, L.Y. Chemical Modification of Coumarin Dimer and HIV-1 Integrase Inhibitory Activity. **Chem Pharm. Bull.**, v. 50, n. 12, p. 1634-1637, 2002.

MATSUDA, H.; IDO, Y.; HIRATA, A.; INO, Y.; NARUTO, S. AMAMIYA, T.; KUBO, M. Antipruritic Effect of Cnidii Monnieri Fructus (Fruits of *Cnidium monnieri* Cusson). **Biol. Pharm. Bull.** V. 25, n. 2, p. 260-263, 2002.

MATSUDA, H.; SHIMODA, H.; YOSHIKAWA, M. Structure-Requirements of Isocoumarins, Phthalides, and Stilbenes from Hydrangeae Dulcis Folium for Inhibitory Activity on Histamine Release from Rat peritoneal Mast Cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1445-1450, 1999.

MOLINA-JIMENEZ, M.F.; SANCHEZ-REUS, M.I.; BENEDI, J. Effect of fraxetin and myricetin on rotenone-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells: comparison with *N*-acetylcysteine. **European Journal of Pharmacology**, v. 472, p. 81-87, 2003.

MORISON, W.L.; MARWAHA, S.; BECK, L. PUVA- Induced Phototoxicity: incidence and causes. **J Am Acad Dermatol.**, v. 36, n. 2 Pt 1, p. 183-185, 1997.

MU, L.Y.; WANG, Q.M.; NI, Y.C. Effect of Daphnetin on SOD Activity and DNA Synthesis of *Plasmodium falciparum* in vitro. **Chin J Parasitol Dis**, v. 21, n. 3, p. 157-159, 2003.

MU, L.Y.; WANG, Q.M.; NI, Y.C. In vitro Antimalarial Effect of Daphnetin Relating to Its iron-chelating Activity. **Chin J Parasitol Dis.**, v. 20, n. 2, p. 83-85, 2002.

MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; TANAKA, T.; KAWABATA, K.; TAKAHASHI, D.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Suppression by citrus auraptene of phorbol ester- and endotoxin-induced inflammatory responses: role of attenuation of leukocyte activation. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1843-1850, 2000.

MURRAY, R.D.H. Coumarins. **Natural Products Reports**, p. 591-618, 1989.

MURRAY, R.D.H. **Naturally Occurring Plant Coumarins**. New York: Springer-Verlag/Wien., 1978. Bibliografia: p. 200-209.

NAM, N.H.; KIM, Y.; YOU, Y.J.; HONG, D.H.; KIM, H.M.; AHN, B.Z. Preliminary Structure-Antiogenic Activity relationships of 4-Seneciolyloxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry letters**, v. 12, p. 2345-2348, 2002.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM - NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Coumarin (CAS No. 91-64-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). **Nacional Toxicology Program Technical Reports Series**, v. 422, p. 1-340, 1993.

NISHIYAMA, T.; OHNISHI, J.; HASHIGUCHI, Y. Fused Heterocyclic Antioxidants: Antioxidative Activities of Hydrocoumarins in a Homogeneous Solution. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 65, n. 5, p. 1127-1133, 2001.

OJALA, T. **Biological Screening of Plant Coumarins** Academic Dissertation, University of Helsinki., 2001. Bibliografia: p. 11-32.

OJALA, T.; REMES, S.; HAANSUU, P.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; HAAHTELA, K.; VUORELA, P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 299-305, 2000.

OKAMOTO, T.; KAWASAKI, T.; HINO, O. Osthole prevents anti-Fas antibody-induced hepatitis in mice by affecting the caspase-3-mediated apoptotic pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 677-681, 2003.

OKAMOTO, T.; YOSHIDA, S.; KOBAYASHI, T.; OKABE, S. Inhibition of Concanavalin A- Induced Mice Hepatitis by Coumarin Derivatives. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 85, p. 95-97, 2001.

OKETCH-RABAH, H.A.; MWANGI, J.W.; LISGARTEN, J.; MBERU, E.K. A New Antiplasmodial coumarin from *Toddalia asiatica* roots. **Fitoterapia**, v. 71, p. 636-640, 2000.

PAYA, M.; GOODWIN, P.A.; LAS HERAS, B.; HOULT, J.R.S. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 445-451, 1994.

PERIERS, A.M.; LAURIN, P.; FERROUD, D.; HAESSLEIN, J.L.; KLICH, M.; DUPUIS-HAMELIN, C.; MAUVAIS, P.; LASSAIGNE, P.; BONNEFOY, A.; MUSICKI, B. Coumarin Inhibitors of Gyrase B with *N*-Propargyloxy-carbamate as an Effective Pyrrole Bioisostere. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 161-165, 2000.

PINEO, G.; HULL, R.D. Coumarin therapy in thrombosis. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 17, p. 201-216, 2003.

PINTO, A.C.; SIQUEIRA, D.H.; BOLZANI, V.S.; LOPEZ, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45- 61, 2002.

POCHET, L., DIEU, M.; FRÉ'DERICK, R.; MURRAY, A.M.; KEMPEN, I.; PIROTTE, B.; MASEREEL, B. Investigation of the inhibition mechanism of coumarins on chymotrypsin by mass spectrometry. **Tetrahedron**, v. 59, p. 4557-4561, 2003.

QIN, L.P.; ZHANG, Q.Y.; TIAN, Y.P.; ZHENG, H.C.; HUANG, M.; HUANG, B.K. Total coumarins from fruits of *Cnidium monnieri* inhibit formation and differentiation of multinucleated osteoclasts of rats. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 24, n. 2, p. 181-186, 2003.

RAHMAN, M.M.; GRAY, A.I. Antimicrobial constituents from the stem bark of *Feronia limonia*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 73-77, 2002.

RAJ, H.G.; KOHLI, E.; ROHIL, V.; DWARAKANATH, B.S.; PARMAR, V.S.; MALIK, S.; ADHIKARI, J.S.; TYAGI, Y.K.; GOEL, S.; GUPTA, K.; BOSE, M.; OLSEN, C.E. Acetoxy-4-methylcoumarins confer differential protection from aflatoxin B₁-induced micronuclei and apoptosis in lung and bone marrow cells. **Mutation Research**, v. 494, p. 31-40, 2001.

RAJ, H.G.; PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; GOEL, S.; HIMANSHU, P.; MALHOTRA, S.; SINGH, A.; OLSEN, C.E.; WENGEL, J. Mechanism of Biochemical Action of Substituted 4-Metilbenzopiran-2-oneas. Part I: Dioxygenated 4-Metilcoumarins as Superb Antioxidant and Radical Scavenging Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 833-839, 1998.

RIBEIRO, C.V.C.; KAPLAN, M.A.C. Tendências evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em Angiospermae. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 533-538, 2002.

ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. Bibliografia: p. 130-137.

ROJAHN, C. A. **Productos químicos y farmacéuticos**. México: Editorial Atlante, 1956. Bibliografia: p. 1750-1758.

SAHI, J., REYNER, E.L., BAUMAN, J.N., BOUCHEVA-GUENEVA, K., BURLEIGH, J.E.; THOMAS, V.H. The Effect of Bergamottin on Diazepam Plasma Levels and P450 Enzymes in Beagle Dogs. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 2, p. 135-140, 2002.

SAÏD, A.; MAKKI, S.; MURET, P.; HUMBERT, Ph. MILLET, J. Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study). **Journal of Dermatological Science**, v. 14, p. 136-144, 1997.

SALLOUM, R.M.; JASKOWIAK, N.T.; MAURECI, H.J.; SEETHARAM, S.; BECKETT, M.A.; KOONS, A.M.; HARI, D.M.; GUPTA, V.K.; REIMER, C.; KALLURI, R.; POSNE, M.C.; HELLMAN, S.; KUFE, D.W.; WEICHSELBAUM, R.R. NM-3, an Isocoumarin, Increases the Antitumor Effects of Radiotherapy without Toxicity. **Cancer Research**, v. 60, p. 6958-6963, 2000.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999. Bibliografia: p. 330-340.

SARDARI, S.; MORI, Y.; HORITA, K.; MICETICH, R.G.; NISHIBE, S.; DANESH TALAB, M. Synthesis and Antifungal Activity of Coumarins and Angular Furanocoumarins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1933-1940, 1999.

SCHMID, J.; AMRHEIN, N. Molecular Organization of the Shikimate Pathway in Higher Plants. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 737-749, 1995.

SCHMITT, I.M.; CHIMENTI, S.; GASPARRO, F.P. Psoralen-protein photochemistry-a forgotten field. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, p. 101-107, 1995.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T.M.A.; ROMANHA, A.J.; SHIN, Y.G.; CORDELL, G.A.; ZANI, C.L. New Bioactive Coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. **J. Nat. Prod**, v. 66, p. 634-637, 2003.

SEKIYA, K.; OKUDA, H.; ARICHI, S. Seletive inhibition of platelet lipoxygenase by esculetin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 713, p. 68-72, 1982.

SINGH, V.; SRIVASTAVA, V.K.; PALIT, G.; SHANKER, K. Coumarin Congeners as Antidepressants. **Arzneim.-Forsch./Drug Res.** V. 42, n. 8, p. 993-998, 1992.

SITTERT, N.J.; TUINMAN, C.P. Coumarin derivatives (rodenticides)-chapter 10. **Toxicology**, v. 91, p. 71-76, 1994.

SMÂNIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E. F.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177-181, 1995.

SPINO, C.; DODIER, M.; SOTHEESWARAN, S. Anti-HIV Coumarins from Calophyllum seed oil. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 3475-3478, 1998.

TADA, Y.; SHIKISHIMA, Y.; TAKAISHI, Y.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; HONDA, M.; TAKEDA, Y.; KODZHIMATOV, O. K.; ASHURMETOV, O.; OHMOTO, Y. Coumarins and γ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v. 59, p. 649-654, 2002.

TAKEUCHI, N.; KASAMA, T.; AIDA, Y.; OKI, J.; MARUYAMA, I.; WATANABE, K.; TOBINAGA, S. Pharmacological Activities of the Prenylcoumarins, Developed from Folk Usage as a Medicine of *Peucedanum japonicum* Thunb. **Chem. Pharm. Bull.** V. 39, n. 6, p. 1415-1421, 1991.

TEGOS, G.; STERMITZ, F.R.; LOMOVSKAYD, O.; LEWIS, K. Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 10, p. 3133-3141, 2002.

TORRES, R.; DELLE-MONACHE, F.; BERTOLO, G.B.M.; COSSELS, B.K. Coumarins and cinnamic acid from *Gymnophyton isatidicarbom*. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 532-533, 1979.

TRANI, M.; CARBONETTI, A.; DELLE-MONACHE, G.; DELLE-MONACHE, F.
Dihydrochalcones and coumarins of *Esembeckia grandiflora* subsp. *Breviolata*.
Fitoterapia, v. 75, n. 1, p. 99-102, 2004.

TRANI, M.; DELLE-MONACHE, F.; DELLE-MONACHE, G.; YUNES, R.A.;
FALKENBERG, D.K. Dihydrochalcones and coumarins of *Esembeckia grandiflora* subsp.
Grandiflora. **Gazzeta chimica Italiana**, v. 127, p. 415-418, 1997.

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. **Pharmacognosy**, London: Baillière Tindall, 1983.
Bibliografia: p. 382-385.

TRIPATHI, R.P.; TRIPATHI, R.; BHADURI, A.P.; SINGH, S.N.; CHATTERJEE, R.K.;
MURTHY, P.K. Antifilarial activity of some 2H-1-benzopyran-2-ones (coumarins). **Acta
Tropica**, v. 76, p. 101-106, 2000.

TUMMINO, P.T.; PRASAD, J.V.N.V.; FERGUSON, D.; NOUHAN, C.; GRAHAM, N.;
DOMAGALA, J.M.; ELSSWORTH, E.; GAJDA, C.; HAGEN, S.E.; LUNNEY, E.A.;
PARA, K.S.; TAIT, B.D.; PAVLOVSKY, A.; ERICKSON, J.W.; GRACHECK, S.;
McQUADE, T.J.; HUPE, D.J. Discovery and Optimization of Nonpeptide HIV-1 Protease
Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 9, p. 1401-1410, 1996.

UCHIUMI, F.; HATANO, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T.; TANUMA, S.I. Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. **Antiviral Research**, v. 58, p. 89-98, 2003.

VAN VOORHIS, W.C.; BARRETT, L.K.; EASTMAN, R.T.; ALFONSO, R.; DUPUIS, K. *Trypanosoma cruzi* Inactivation in Human Platelet Concentrates and Plasma by Psoralen (Amotosalen HCl) and Long-Wavelength UV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 475-479, 2003.

VELASCO-VELÁZQUEZ, M.A.; AGRAMONTE-HEVIA, J.; BARRERA, D.; JIMÉNEZ-OROSCO, A.; GARCÍA-MONDRAGÓN, M.J.; MENDONZA-PATIÑO, N.; LANDA, A.; MANDOKI, J. 4-Hydroxycoumarins disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. **Cancer Letters**, v. 198, p. 179-186, 2003.

WAGNER, A.M.; WU, J.J.; HANSEN, R.C.; NIGG, H.N.; BEIERE, R.C. Bullous Phytophotodermatitis associated with high natural concentrations of furanocoumarins in limes. **Am J Contact Dermat.** V. 13, n. 1, p. 10-14, 2002.

WANG, C.J.; HSIEH, Y.J.; CHU, C.Y.; LIN, Y.L.; TSENG, T.H. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. **Cancer Letters**, v. 183, p. 163-168, 2002.

WANG, Q.M.; NI, Y.C.; HA, S.H.; CAI, Y. The schizontal activity of Daphnetin against malaria parasites *in vitro* and *in vivo*. **Chin J Parasitol Dis**, v. 18, n. 4, p. 204-206, 2000.

WEI, E.H.; RAO, M.H.; CHEN, X.Y.; FAN, L.M.; CHEN, Q. Inhibitory effects of praeuptorin C on cattle aortic smooth muscle cell proliferation. **Acta Pharmacol Sin**, v. 23, n. 2, p. 129-132, 2002.

WEN, Y.H., SAHI, J., URDA, E., KULKARNI, S., ROSE, K., ZHENG, X., SINCLAIR, J.F., CAI, HONGBO, STROM, S.C.; KOSTRUBSKY, V.E. Effects of bergamottin on human and monkey drug-metabolizing enzymes in primary cultured hepatocytes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 9, p. 977-984, 2002.

WU, T.S.; TSANG, Z.J.; WU, P.L; LIN, F.W.; LI, C.Y.; TENG, C.M.; LEE, K.H. New Constituents and Antiplatelet Aggregation and Anti-HIV Principals of *Artemisia capillaries*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 77-83, 2001.

YAN, J.J.; KIM, D.H.; MOON, Y.S.; JUNG, J.S.; AHN, E.M.; BAEK, N.I.; SONG, D.K. Protection against β -amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of *Angelica gigas* or decursinol in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, p. 25-30, 2004.

YANG, E.B.; ZHAO, Y.N.; ZHANG, K.; MACK, P. Daphnetin, One of Coumarin Derivatives, is a Protein Kinase Inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, p. 682-685, 1999.

YIN, L.; OHNO, T.; WEICHSELBAUM, R.; KHARBANDA, S.; KUFEL, D. The Novel Isocoumarin 2-(8-Hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1*H*-2-benzopyran-3-yl) Propionic Acid (NM-3) Induces lethality of human Carcinoma Cells by Generation of Reactive Oxygen Species. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 43-48, 2001.

YOO, S.W.; KIM, J.S.; KANG, S.S.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KIM, H.P.; BAE, K.; LEE, C.O. Constituents of Fruits and leaves of *Euodia danielli*. **Archives of Pharmacal research**, v. 25, n. 6, p. 824-830-2002.

YUN, C.H.; SHIMADA, T.; GUEGERICH, F.P. Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. **Molecular Pharmacology**, v. 40, n. 5, p. 679-685, 1991.

ZHANG, H.; WANG, L.F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 675, p. 199-202, 2004.

ZHANG, J.X.; FONG, W.F.; WU, J.Y.C.; YANG, M.; CHEUNG, H.Y. Pyranocoumarins Isolated from *Peucedanum praerutorum* as Differentiation Inducers in Human Leukemic HL-60 Cells. **Planta Medica**, v. 69, p. 223-229, 2003.

ZHOU, P.; TAKAISHI, Y.; DUAN, H.; CHEN, B.; HONDA, G.; ITOH, M.; TAKEDA, Y.; KODZHIMATOV, O.K.; LEE, K.H. Coumarins and bicoumarins from *Ferula sumbul*:

anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v. 53, p. 689-697, 2000.