

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Cristina Montagner

ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, CITOTÓXICA (CÉLULAS  
TUMORAIS HUMANAS) E HEMOLÍTICA DE  
CUMARINAS NATURAIS E SEMI-SINTÉTICAS

FLORIANÓPOLIS  
2007

Cristina Montagner

ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, CITOTÓXICA (CÉLULAS  
TUMORAIS HUMANAS) E HEMOLÍTICA DE  
CUMARINAS NATURAIS E SEMI-SINTÉTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Saúde.

Orientadores: Prof<sup>o</sup>. Dr. Artur Smânia Júnior  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Elza F. A. Smânia.

FLORIANÓPOLIS  
2007

MONTAGNER, Cristina

Atividade Antifúngica e Citotóxica de Cumarinas Naturais e Semi-sintéticas / Cristina Montagner. – Florianópolis/SC, 2005. 125 f., enc.

Orientador: Artur Smânia Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2005.

Bibliografia: f. 102-125

1. Cumarinas; 2. Atividade Antifúngica; 3. Atividade Citotóxica; 4. Atividade Hemolítica.

Dedico este trabalho a Deus, razão de tudo na minha vida.

Aos meus pais Miro e Lída, ao meu irmão Mateus  
e ao meu marido Dino, pelo amor incondicional  
que sempre me dedicaram em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Artur Smânia Júnior, pela orientação, apoio, confiança e incentivo e pela preciosa oportunidade de realizar este trabalho.

À Professora Elza Albino Smânia, pela orientação, amizade, paciência, valiosa ajuda em todos os momentos e por ter sempre uma palavra de carinho e estímulo.

Aos meus pais Miro e Lídia pelo amor, carinho, compreensão, pelos esforços sem limites que dedicaram aos meus estudos e por me ensinarem que o bem é sempre o melhor caminho.

Ao meu irmão Mateus, quem me deu o exemplo que derrotas são passos sublimes na vida.

Ao meu marido, companheiro e amigo Dino, uma das melhores pessoas que conheci que em todos os momentos me deu apoio, carinho, amor, e que foi sem dúvidas, uma pessoa imprescindível para a realização deste trabalho.

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões, pela grande oportunidade de realizar uma parte deste trabalho em seu laboratório e principalmente pelo aprendizado adquirido, pela orientação, confiança e exemplo de dedicação, competência e profissionalismo.

À professora Margherita Anna Barraco por sua inestimável colaboração nesse trabalho, pelas valiosas sugestões e ensinamentos, pelo carinho, estímulo e pelo exemplo de dedicação, entusiasmo, competência e verdadeiro amor à ciência.

Ao professor Sydney Hartz Alves por todos os ensinamentos desde a graduação, pelo exemplo de dedicação, honestidade, esforço e competência, pela atenção e pelas importantes e valiosas sugestões para este trabalho.

À Professora Iraci Tosin pelo apoio, carinho, conselhos e pela maravilha convivência.

Ao Professor Ricardo Nunes pela preciosa contribuição na análise química, pela disposição, atenção, paciência e simpatia.

Ao Professor Mário Steindel, pelas sugestões, pelos ensinamentos, pela dedicação e atenção.

Ao Professor Carlos Pinto pelo auxílio na análise estatística, pelos ensinamentos, dedicação, simpatia e por estar sempre disposto a ajudar.

As Professoras Sandra Trevisan Beck, Yarema Rodrigues, Rosmari Hörner e Carmem Dickown pelo apoio, incentivo, carinho e amizade.

Professora Clarice Loguercio Leite pela disposição e prestativa ajuda sempre que precisei.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em biotecnologia que sempre estiveram dispostos a ajudar em especial aos professores Carlos Roberto Zanetti, Vetúria Lopes de Oliveira e Célia Regina Monte Barardi pelos ensinamentos, atenção e agradável convivência.

À Cláudia Groposo, uma pessoa simplesmente maravilhosa, inteligente e dedicada, que tive o imenso prazer de conhecer, trabalhar na bancada e me tornar amiga, um verdadeiro exemplo de persistência, coragem, competência, dedicação e simplicidade; agradeço por tudo que me ajudou e ensinou.

A uma amiga muito especial e maravilhosa que Deus colocou em minha vida e nunca mediu esforços em me ajudar em todos os sentidos: Gisela Dalcin (Gisa), obrigada por todos os momentos, os estudos, as conversas, os almoços, as hospedagens e principalmente pela amizade sincera.

À Joana D'arc Costa e Jane Drech Rech duas pessoas muito especiais e importantes na minha vida, que estiveram sempre presentes, em particular nos momentos mais difíceis, e me ajudaram a entender que tudo passa; e Deus sempre dá as forças para aquilo que se pede.

À querida amiga Jesuana Cássias Valério pela ajuda imprescindível, pela acolhida em sua casa, por todos os momentos juntas, pelo exemplo de amor ao próximo, alegria, simplicidade, delicadeza, radicalidade e dedicação.

À Roberta Paulert, uma pessoa que teve participação muito importante no meu trabalho, agradeço de coração pela preciosa ajuda em muitos momentos, pela atenção, carinho e amizade.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz pela doação das espécies fúngicas utilizadas neste trabalho.

Ao Professor Franco Delle Monache pela provisão das cumarinas.

À estimada farmacêutica Simone Vieira Costa, minha amiga, sempre pronta para ajudar em tudo que foi preciso, com atenção e carinho.

À Carla Maísa Campestrini, pelo incentivo, apoio em todos os momentos, pela disposição em ajudar sempre e pela amizade, alegria e carinho.

Ao amigo Luís Afonso Borges, pelo apoio, incentivo, dedicação e amizade.

À amiga Beti Tosato, pelo incentivo, apoio, carinho e prestativa ajuda em todos os momentos.

À Susana Johan pela atenção e importantes informações para realização das análises deste trabalho.

À Vanessa Muller pela simpatia e alegre convivência sempre que nos encontrávamos, e por todo apoio.

As queridas colegas Débora Trichez, Lia Kubelka Fernandes de Carlos Back e Sara Emelie Löfgren pelas palavras, sorrisos e pela disposição em ajudar sempre.

Aos colegas Roberto Torquato Rocha, Rafael Diego da Rosa, Thiago Bruce Rodrigues, Marcelo Goulart Dário, Cleo Rodrigo Bressan e Luciano Henrique Campestrini, pelos bons momentos que passamos juntos nas aulas e por todos os auxílios.

À secretaria do programa de Pós-Graduação em biotecnologia, especialmente a Joice Ferrari, sempre disposta a ajudar com paciência e carinho, e a Lígia por toda atenção.

À Luciane Savi pela dedicação, paciência, carinho e atenção com que me auxiliou em todos os detalhes no laboratório e a todos os alunos do LVA, Deise, Débora, Carol, Cristiane, Franciele, Tiago, Jadel, Adriana, Cristiane e Jonas por todos os auxílios.

Aos colegas do laboratório Marcelo Quint e Simone Machado pela valiosa ajuda em muitos momentos.

À farmacêutica Karina Bettega, pela preciosa ajuda na realização de alguns testes.

A todos os autores que atenciosamente enviaram seus artigos para minha pesquisa.

A Farmácia e ao setor de Quimioterapia do Hospital Universitário e ao CEPON pela doação dos fármacos e em especial as enfermeiras do Hospital Universitário: Nair Terezinha Grando da Silva e Léia Emília May e as farmacêuticas do CEPON: Rita Franz Vieira e Estela Olívio Savi, pela prestativa e valiosa ajuda.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho.

E principalmente a DEUS por iluminar o meu caminho e possibilitar o agradecimento a todas essas pessoas especiais.

*Cristina*

“Há duas formas de viver sua vida:  
Uma é acreditar que não existe milagre.  
E a outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”

Albert Einstein

## RESUMO

As atividades antifúngica, citotóxica e hemolítica de 40 cumarinas foram avaliadas frente às espécies fúngicas: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium solani*, três linhagens de células tumorais humanas: Caco-2 (adenocarcinoma colo retal), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal) e HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe) e eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “O” Rh positivo. Entre os compostos cumarínicos estudados, encontram-se as cumarinas simples (monossubstituídas, dissustituídas e trissubstituídas), as cumarinas preniladas, as furano e piranocumarinas. Para cada uma destas cumarinas foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) pelo método de microdiluição em caldo, a  $CC_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular, pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT) e a porcentagem de hemólise. Os resultados foram expressos em mM. As atividades antifúngica, citotóxica e hemolítica das cumarinas monossubstituídas estudadas não dependeram dos padrões de substituição no núcleo cumarínico, nem mesmo das características dos grupos substituintes. Entre as cumarinas monossubstituídas, a 6-nitrocumarina evidenciou a melhor atividade antifúngica, com CIM de 0,65 mM para *Fusarium solani*; em relação à atividade citotóxica destacou-se, dentre as cumarinas monossubstituídas, a 6-hidroxycumarina inibindo o crescimento da linhagem celular HCT-8 ( $CC_{50}$ : 0,58 mM). As cumarinas di e trissubstituídas não apresentaram atividades antifúngica, citotóxica e hemolítica relevantes. O ostenol foi a cumarina que apresentou a melhor atividade antifúngica dentre todos os compostos testados, com CIM de 0,54 mM para *Fusarium solani* e 1,08 mM para *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. A piranocumarina 3 $\alpha$ , $\alpha$  di-metil-xantiletina demonstrou a atividade citotóxica mais expressiva dentre todos os compostos estudados, com  $CC_{50}$  de 0,34 mM, 0,93 mM e 0,58 mM para as células HEp-2, Caco-2 e HCT-8 respectivamente. A única cumarina que desenvolveu atividade hemolítica foi a balsamiferona, com porcentagem de hemólise de 8,87%.

**Palavras-chave:** Cumarinas, Atividade Antifúngica, Atividade Citotóxica, Atividade Hemolítica.

## ABSTRACT

The antifungal, cytotoxic and hemolytic activities of 40 coumarins were tested against the fungal species: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium solani*, against three lines of human tumor cell: Caco-2 (colorectal adenocarcinoma), HCT-8 (ileocecal adenocarcinoma) and HEP-2 (epidermoid carcinoma of larynx) and human erythrocytes of group "O" Rh-positive. Among the compounds studied are found simple coumarins (monosubstituted, disubstituted and trisubstituted), prenylated coumarins, furano and pyranocoumarins. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined for each one of these coumarins using the broth microdilution method; CC<sub>50</sub>, the concentration of each sample that reduced in 50% the cellular viability, using colorimetric assay with tetrazolium salt (MTT) and the hemolysis percentage was calculated. The results were expressed in mM. The antifungal, cytotoxic and hemolytic activities of the monosubstituted coumarins studied did not depend on the substitution patterns in the coumarin nucleus, not even on the characteristics of the substituting groups. Among the monosubstituted coumarins, the 6-nitrocoumarin presented the best antifungal activity, the MIC was 0,65 mM against *F. solani*; in relation to cytotoxic activity, the main effect was observed, among the monosubstituted coumarin, with the 6-hydroxycoumarin inhibiting the growth of the cell line HCT-8 (CC<sub>50</sub>: 0,58 mM). The di and trisubstituted coumarins did not show relevant antifungal, cytotoxic and hemolytic activities. The osthenol was the coumarin that showed the best antifungal activity among all tested compounds, with a MIC of 0,54 mM for *F. solani* and 1,08 mM for *C. albicans* and *A. fumigatus*. The pyranocoumarin 3 $\alpha,\alpha$  di-methyl-xanthyletin demonstrated the most expressive cytotoxic activity among all compounds studied with CC<sub>50</sub> of 0,34 mM, 0,93 mM and 0,58 mM for the cells HEP-2, Caco-2 and HCT-8 respectively. The only coumarin that presented hemolytic activity was the balsamiferone, with a hemolysis percentage of 8,87%.

**Keywords:** Coumarins, Antifungal Activity, Cytotoxic Activity, Hemolytic Activity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Coumarouna odorata</i> (fava-tonca).....	18
Figura 2 - Trevo-doce ( <i>Melilotus officinalis</i> Lam.).....	19
Figura 3 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	21
Figura 4 - Origem biossintética de cumarinas e derivados.....	23
Figura 5 - Diferentes estruturas das cumarinas.....	25
Figura 6 - Vias do metabolismo da cumarina.....	32
Figura 7 - Ilustração dos compostos chapelina (I), safrol (II) e 3 $\alpha$ , $\alpha$ -dimetil xantiletina (III).....	97

## LISTA DE TABELAS

1 - Propriedades e Aplicações das Cumarinas.....	28
2 - Origem de 40 cumarinas incluídas no estudo das atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica.....	59
3 - Derivados cumarínicos simples.....	60
4 - Derivados cumarínicos complexos.....	61
5 - Concentrações inibitórias mínimas dos fármacos utilizados como controles positivos em relação aos dados da literatura.....	75
6 - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das cumarinas simples monossubstituídas.....	75
7 - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das cumarinas di e trissubstituídas.....	79
8 - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das cumarinas preniladas.....	81
9 - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das furanocumarinas lineares e angulares.....	82
10 - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das piranocumarinas lineares e angulares.....	83
11 - Atividade citotóxica dos fármacos utilizados como controles positivos em relação aos dados da literatura.....	87
12 - Atividade citotóxica das cumarinas simples monossubstituídas.....	88
13 - Atividade citotóxica das cumarinas di e trissubstituídas.....	92
14 - Atividade citotóxica das cumarinas preniladas.....	93
15 - Atividade citotóxica das furanocumarinas lineares e angular.....	94
16 - Atividade citotóxica das piranocumarinas.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**CIM:** Concentração Inibitória Mínima

**CRC:** Companhia Britânica de Pesquisa do Câncer

**CYP:** Citocromo P450

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**D.O.:** Densidade óptica

**EDTA:** Ácido etilenodiaminatetracético

**EGFR:** Receptor do fator de crescimento epidérmico

**EORTC:** Organização Européia para Pesquisa e Tratamento do Câncer

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**MEM:** *Minimal Essential Medium*

**MOPS:** ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico

**MRSA:** *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

**MTT:** [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium]

**NAPRALERT:** *Natural Products ALERT*

**NCCLS:** *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

**NCI:** *National Cancer Institute*

**NTP:** *National Toxicology Program*

**PBS:** Tampão salina fosfato

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**SOAD:** Escritório Sul Americano para Desenvolvimento de Drogas Anti-Câncer

**TNF:** Fator de Necrose Tumoral

**UFC:** Unidades Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1 Cumarinas.....	18
2.1.1 Considerações históricas.....	18
2.1.2 Biossíntese.....	20
2.1.3 Estrutura e Classificação.....	24
2.1.4 Ocorrência e Distribuição.....	26
2.1.5 Propriedades.....	26
2.1.5.1 Propriedades físico-químicas.....	26
2.1.5.2 Propriedades industriais.....	27
2.1.5.3 Propriedades alelopáticas.....	29
2.1.6 Extração, Caracterização.....	29
2.1.7 Farmacocinética.....	30
2.1.7.1 Absorção.....	30
2.1.7.2 Distribuição.....	30
2.1.7.3 Excreção.....	33
2.1.8 Toxicidade.....	33
2.1.8.1 Genotoxicidade.....	36
2.1.8.2 Fototoxicidade.....	37
2.1.9 Atividades Biológicas.....	38
2.1.9.1 Vasorrelaxante.....	39
2.1.9.2 Antioxidante.....	40
2.1.9.3 Antiinflamatória.....	42
2.1.9.4 Antiparasitária.....	42
2.1.9.5 Antiviral.....	43
2.1.9.6 Antibacteriana.....	44
2.1.9.7 Antifúngica.....	46
2.1.9.8 Citotóxica e Antitumoral.....	48
2.2 Considerações sobre as infecções fúngicas.....	52
2.3 Considerações sobre neoplasias.....	55
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	57

3.1	Objetivo Geral.....	57
3.2	Objetivos Específicos .....	57
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
4.1	Cumarinas.....	58
4.1.1	Origem das cumarinas.....	58
4.2	Avaliação da atividade antifúngica.....	65
4.2.1	Fungos.....	65
4.2.2	Meios de cultura e reagentes.....	65
4.2.3	Preparo da solução estoque do meio RPMI-1640.....	66
4.2.4	Dissolução e Diluição das cumarinas.....	66
4.2.5	Preparo do inóculo.....	66
4.2.5.1	Inóculo dos fungos filamentosos.....	66
4.2.5.2	Inóculo dos fungos leveduriformes.....	67
4.2.6	Controles positivos.....	67
4.2.7	Determinação da concentração inibitória mínima.....	68
4.3	Avaliação da atividade citotóxica.....	69
4.3.1	Células.....	69
4.3.2	Meios de cultura e reagentes.....	69
4.3.3	Preparação das soluções estoques das cumarinas.....	70
4.3.4	Controles positivos.....	70
4.3.5	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	70
4.4	Avaliação da atividade hemolítica.....	72
4.4.1	Reagentes.....	72
4.4.2	Dissolução e diluição das cumarinas.....	72
4.4.3	Ensaio hemolítico.....	72
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
5.1	Avaliação da atividade antifúngica.....	74
5.1.1	Atividade antifúngica das cumarinas simples monossubstituídas.....	75
5.1.2	Atividade antifúngica das cumarinas di e trissubstituídas.....	79
5.1.3	Atividade antifúngica das cumarinas preniladas.....	81
5.1.4	Atividade antifúngica das furanocumarinas.....	82
5.1.5	Atividade antifúngica das piranocumarinas.....	83
5.2	Avaliação da atividade citotóxica.....	84

5.2.1 Avaliação da atividade citotóxica das cumarinas simples monossubstituídas.....	88
5.2.2 Avaliação da atividade citotóxica das cumarinas di e trissubstituídas.....	91
5.2.3 Avaliação da atividade citotóxica das cumarinas preniladas.....	93
5.2.4 Avaliação da atividade citotóxica das furanocumarinas.....	94
5.2.5 Avaliação da atividade citotóxica das piranocumarinas.....	95
5.3 Avaliação da atividade hemolítica.....	99
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento e a utilização de plantas medicinais têm revelado, desde a Antiguidade, seu amplo potencial no tratamento de doenças (BANERJI, 1992; NASCIMENTO et al., 2000; PINTO et al., 2002) representando, muitas vezes, o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002).

Apesar da diversidade molecular e da importância farmacológica do reino vegetal serem incalculáveis, apenas uma pequena porcentagem dos compostos naturais com essas propriedades é conhecida até o presente (SHU, 1998; HARVEY, 2000; DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003). Recentemente, a estrutura e o papel desses compostos nas interações biológicas dos organismos e nos seus ecossistemas vêm sendo mais estudados (BANERJI, 1992). Essas substâncias podem ser utilizadas diretamente ou servir de modelos para a síntese de novos princípios bioativos (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003).

A busca de novos compostos farmacologicamente ativos, através da triagem de produtos naturais e as inovações tecnológicas, para gerar propriedades terapêuticas superiores com menor toxicidade, vêm conduzindo à descoberta de muitos fármacos que desempenham importante função no tratamento de doenças (NISBET; MOORE, 1997; SHU, 1998).

As plantas possuem capacidade ilimitada de sintetizar metabólitos primários e secundários (OJALA, 2001). Os metabólitos secundários, na maioria relacionados com o fenol e seus derivados, são produtos de baixo peso molecular, que se diferenciam dos primários por não serem essenciais à vida da planta (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003).

Por muitos anos, o papel dos metabólitos secundários foi negligenciado pela ciência, julgando-os como desperdício, sem aparente função (VERPOORTE, 1998). Entretanto, sua importância aumentou devido ao potencial para aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002). Em 1988 o banco de dados NAPRALERT (Natural PRoducts ALERT) já registrava um número superior a 88.000 metabólitos

secundários catalogados, e todos os anos são informados mais 4.000 novos compostos (VERPOORTE, 1998).

Os metabólitos secundários são úteis na defesa da própria espécie vegetal (OJALA, 2001) protegendo-a de outras plantas, de insetos, de herbívoros predadores e de microrganismos causadores de infecções. Por isso podem ser chamados de fitotoxinas ou aleloquímicos (PINTO et al., 2002).

Dentre as fitotoxinas estão as fitoalexinas, que são substâncias com propriedades antimicrobianas produzidas pelas plantas quando estas são infectadas por microrganismos patogênicos (vírus, bactérias, fungos), ou produzidas sob condições de estresse, como clima árido, frio, ação de luz ultravioleta, dentre outros. As fitoalexinas aparecem, geralmente, em altas concentrações em resposta à infecção, desempenhando nos vegetais, um papel semelhante ao dos anticorpos nos animais (PINTO et al., 2002).

Destacam-se entre as fitoalexinas, o grupo das cumarinas, devido às diferentes bioatividades atribuídas a alguns de seus membros (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003; AL-BARWANI; ELTAYEB, 2004). As cumarinas são metabólitos secundários de plantas, mas também podem ser encontradas em bactérias e fungos (MURRAY, 1989) e estão despertando interesse na indústria farmacêutica, por mostrarem propriedades farmacológicas diversas e relevantes, associadas à baixa toxicidade, a sua presença na dieta alimentar e ao custo relativamente reduzido (HOULT; PAYÁ, 1996).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cumarinas

As cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do metabolismo da fenilalanina (KUSTER; ROCHA, 2003). O primeiro e mais simples representante é a cumarina *per se* (1,2-benzopirona), isolada em 1820, da espécie *Coumarouna odorata* (popularmente conhecida como fava tonca), por Vogel, membro da *Royal Academy of Science of Munich*. Vogel associou o odor doce e agradável das sementes do cumaru (*Coumarouna odorata*), ao cheiro das flores do trevo (*Melilotus officinalis*), e conseguiu isolar, em ambos, a cumarina, em forma de cristais brancos. (MURRAY, 1978) (Figura 1).

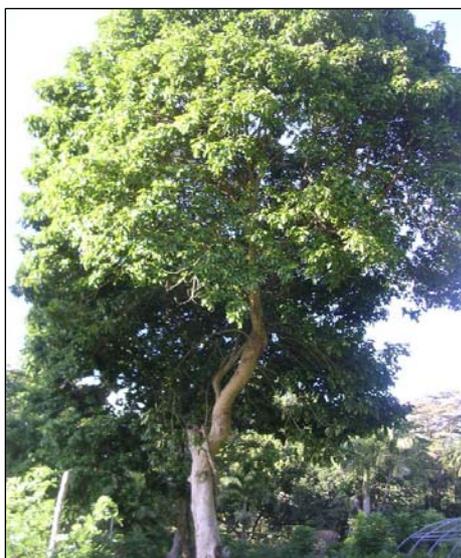


FIGURA 1 - *Coumarouna odorata* (fava tonca)

Fonte: <http://www.da-academy.org>

#### 2.1.1 Considerações históricas

De acordo com uma revisão realizada por Egan et al. (1990), a cumarina *per se*, após ter sido isolada por Vogel, foi sintetizada por Perkin em 1868.

Na década de 1920 uma doença hemorrágica inexplicável acometeu o gado das pradarias de Dakota do Norte nos Estados Unidos, e em Alberta, Canadá. Naquela ocasião, os cientistas associaram esta doença à alimentação do gado por trevo-doce ou trevo de cheiro amarelo (*Melilotus officinalis* Lam.) (Figura 2), plantado nessas regiões como um substituto para o milho (GUSTAFSSON et al., 2004). Em 1939, Karl Paul Link e colaboradores isolaram uma cumarina dimérica, o dicumarol (derivado da 4-hidroxycumarina), como agente causador dessa doença hemorrágica, cuja síntese foi concluída em 1940. Após um ano, reportava-se a sua ação em seres humanos e, em 1942, foram publicadas as primeiras experiências clínicas do dicumarol como fármaco anticoagulante (ALLEN; BARKER; WAUGH, 1942; LEHMANN, 1942; WRIGHT; PRANDONI, 1942).



FIGURA 2 - Trevo-doce (*Melilotus officinalis* Lam.)

Fonte: <http://www.spectrum.troy.edu>

Subseqüentemente, no laboratório de Link, foi sintetizada uma série de 4-hidroxycumarinas substituídas, entre elas a warfarina, inicialmente usada como rodenticida. Porém, após uma tentativa de suicídio, procurou-se direcionar as pesquisas para seu uso como um anticoagulante (LINK, 1958).

A warfarina é atualmente a principal representante das cumarinas (GUSTAFSSON, 2004), e vem sendo empregada com sucesso na terapia anticoagulante (HELGELAND, 1980).

Em 1954 a agência americana *Food and Drug Administration* – FDA, baseando-se em dados sobre a toxicidade hepática da cumarina *per se*, verificada em ratos, a classificou como substância tóxica, banindo seu uso, o que posteriormente também ocorreu na Europa (KUSTER; ROCHA, 2003).

Em junho de 1988, o Conselho das Comunidades Europeias determinou o limite máximo permitido de cumarinas em gêneros alimentícios, bebidas e gomas de mascar (COUNCIL DIRECTIVE, 1988).

A partir da década de 1990, um número significativo de trabalhos passaram a ser publicados, relacionando inúmeras atividades biológicas às cumarinas, tais como: antimicrobiana (SARDARI et al., 1999; OJALA, 2000), imunossupressora (TADA et al., 2002), anti-HIV (MAO et al., 2002), antimelanogênica (LEI et al., 2002), citostática (JIMÉNEZ-OROSCO et al., 2001; LIU et al., 2001), entre outras.

### **2.1.2 Biossíntese**

A origem de todos os metabólitos secundários dos vegetais deriva do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico que é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, origina os aminoácidos: fenilalanina, triptofano e tirosina, que são precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, entre eles, os alcalóides, as lignanas, as ligninas e as cumarinas (SANTOS, 2003) (Figura 3).

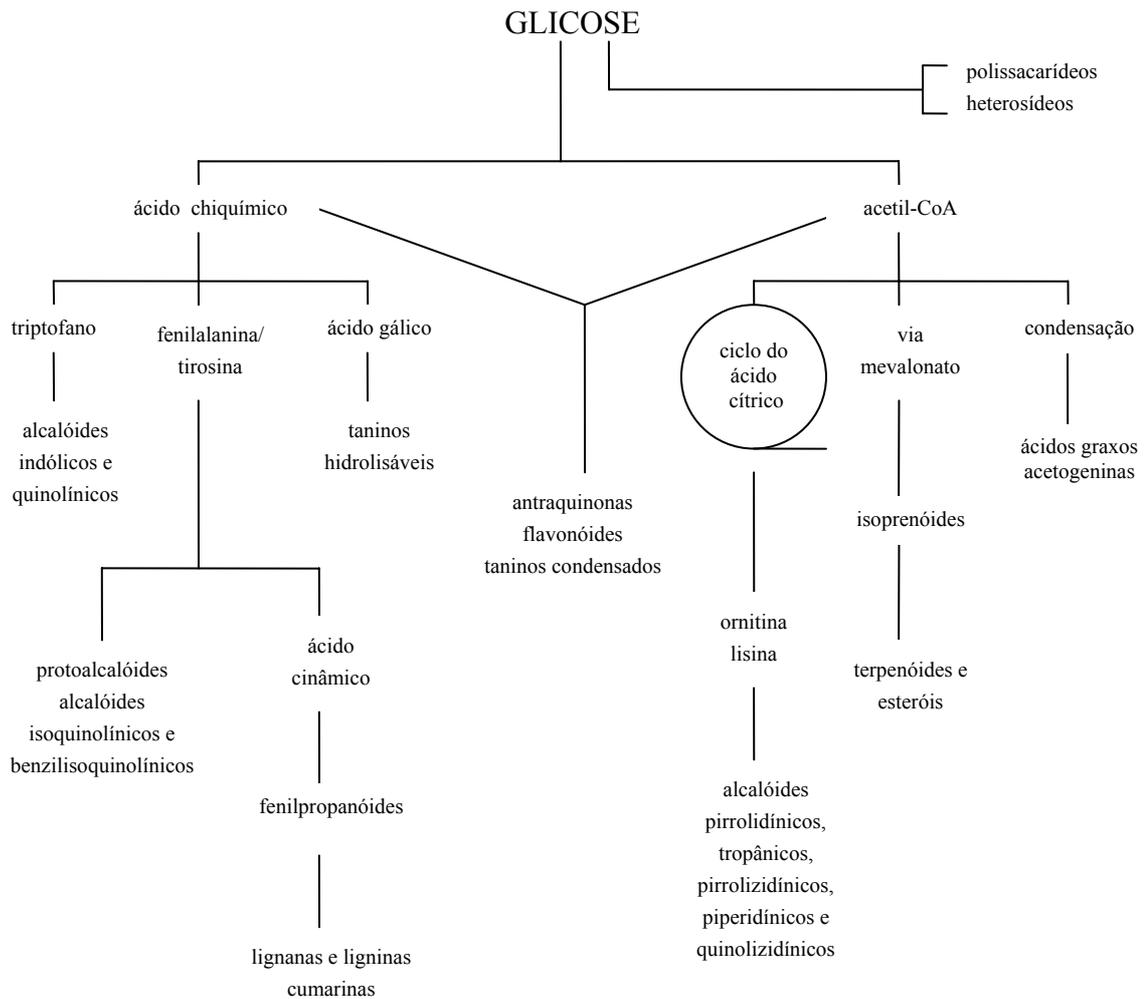


FIGURA 3 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

Fonte: Santos, 2003, p. 411.

A desaminação enzimática da fenilalanina, pela ação da enzima fenilalanina amonialiase, origina o ácido cinâmico, precursor da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

As cumarinas, como outros fenilpropanóides, são derivadas do metabolismo da fenilalanina via ácido *p*-hidroxicinâmico que é hidroxilado na posição C-2' (*orto*-hidroxilação), o derivado *o*-hidroxilado sofre isomerização fotocatalisada *trans* para *cis* da ligação dupla da cadeia lateral, resultando no fechamento do anel entre o grupo *orto*-hidroxila e o grupo carboxila da cadeia lateral (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; KUSTER; ROCHA, 2003), originando o ácido *cis-o*-hidroxicinâmico; que em virtude de sua constituição

espacial, não se encontra no estado livre, pois lactoniza-se espontaneamente, produzindo a umbeliferona (7-hidroxicumarina) (COSTA, 1994).

A formação de di- e trihidroxicumarinas (6,7-di-hidroxiadas e 6,7,8-tri-hidroxiadas) e seus éteres envolvem a hidroxilação da umbeliferona (7-hidroxicumarina), e os grupos hidroxilas podem ser metilados ou glicosilados (BRUNETON, 1995). A prenilação do anel benzênico nas posições 6 ou 8 da mesma é o passo inicial na biogênese das furano- e piranocumarinas (KUSTER; ROCHA, 2003). A prenilação na posição 6 origina furano- e piranocumarinas lineares e na posição 8 homólogos angulares (BRUNETON, 1995) (Figura 4).

A ciclização dos derivados 6- ou 8-isoprenilcumarina ocorre por ataque nucleofílico do grupo hidroxila em C-7 ao epóxido formado pela oxidação dupla do resíduo isopentenila. Dependendo da orientação do ataque nucleofílico, o produto será o hidroxil-iso-propil-di-hidrofuranocumarina ou o hidroxil-dimetil-di-hidropiranocumarina (KUSTER; ROCHA, 2003).

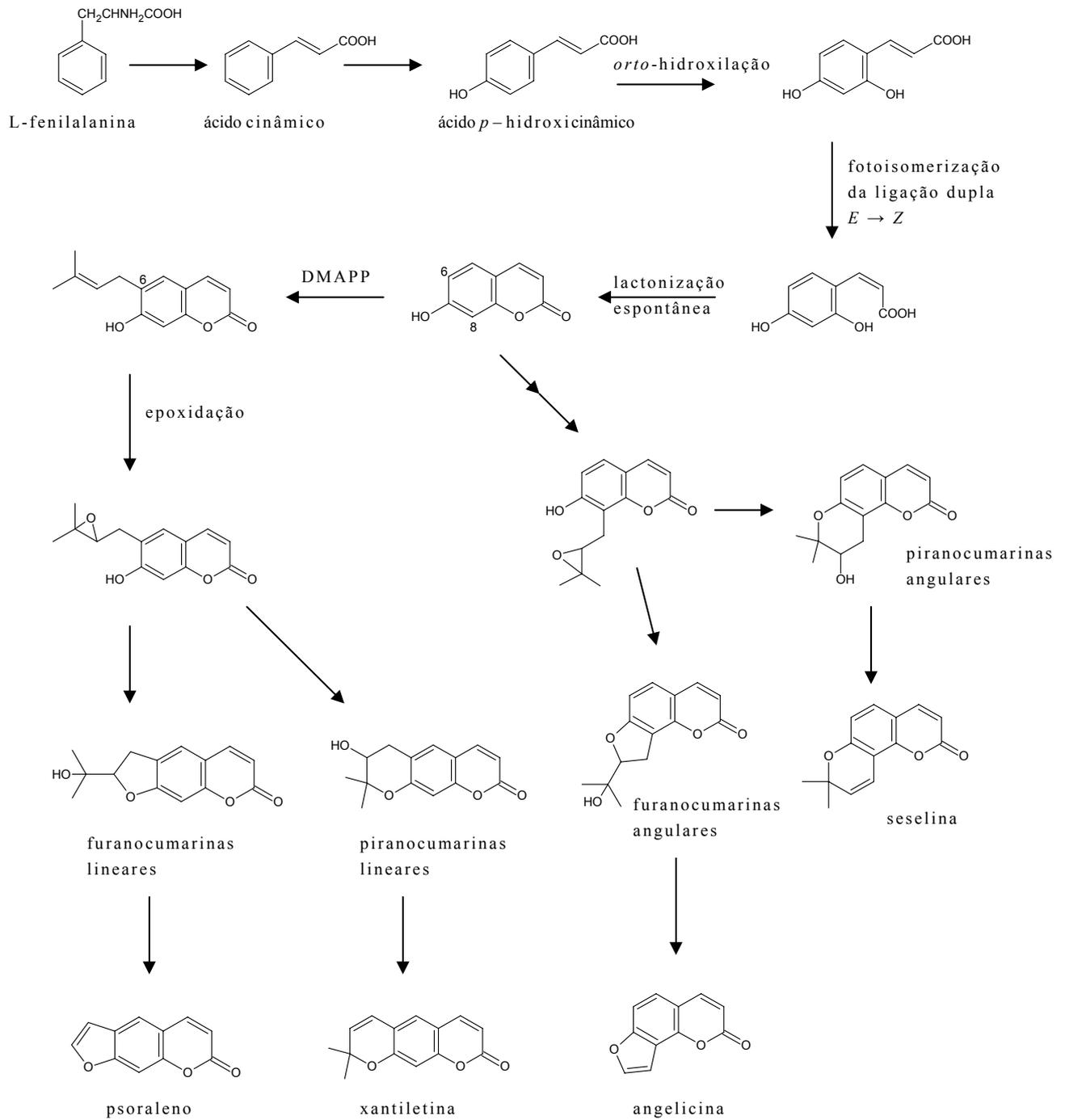


FIGURA 4 - Origem biossintética de cumarinas e derivados

Fonte: Kuster e Rocha, 2003, p. 540.

### 2.1.3 Estrutura e Classificação

O núcleo básico de todas as cumarinas é resultante da fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona (o primeiro átomo numerado do ciclo é o de oxigênio sem dupla ligação) (COSTA, 1994).

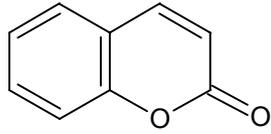
As cumarinas podem ser classificadas em: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas (MURRAY, 1978; BRUNETON, 1995) (Figura 5).

As cumarinas simples são compostos derivados da cumarina *per se* podendo conter grupos substituintes como: hidróxi, alcóxi, acetóxi, alquil, entre outros. Excetuando-se raros casos, incluindo a cumarina *per se*, todas as cumarinas são substituídas por um grupo hidroxila na posição 7. A 7-hidroxycumarina, também conhecida como umbeliferona, é a precursora das cumarinas 6,7-dihidroxiladas e 6,7,8-trihidroxiladas. Esses grupos hidroxilas podem ser metilados ou glicosilados (BRUNETON, 1995).

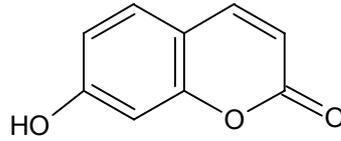
As furanocumarinas possuem um anel furano condensado ao núcleo cumarínico, enquanto as piranocumarinas apresentam um anel pirano, ambas subdividem-se em lineares e angulares (MURRAY, 1989).

As cumarinas que possuem substituintes na posição 3 e 4 são cumarinas com substituintes no anel pirona (BRUNETON, 1995). E as cumarinas miscelâneas compreendem as biscumarinas, cumarinas diméricas como, por exemplo, o dicumarol e as isocumarinas, que possuem o átomo de oxigênio e o carbono ligado ao oxigênio por dupla ligação em posições invertidas da cumarina *per se* (MURRAY, 1989).

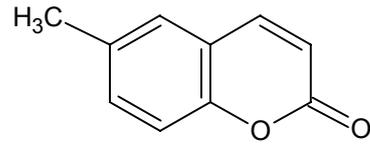
### Cumarinas simples



Cumairna *per se*

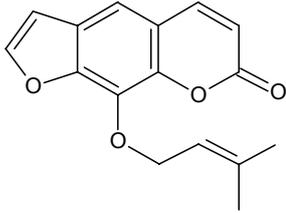


7-hidroxicumarina

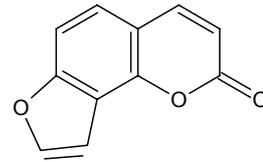


6-metilcumarina

### Furanocumarinas

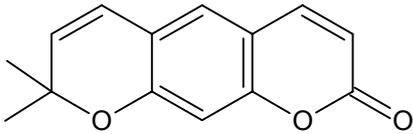


Furanocumarina linear (Imperatorina)

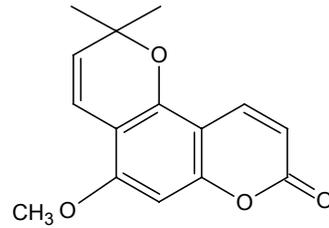


Furanocumarina angular (Angelicina)

### Piranocumarinas

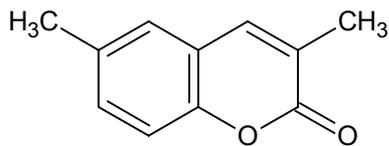


Piranocumarina linear (Xantiletina)



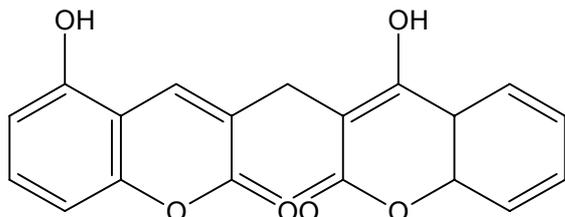
Piranocumarina angular (Aloxantoxiletina)

### Cumarinas com substituintes no anel pirona

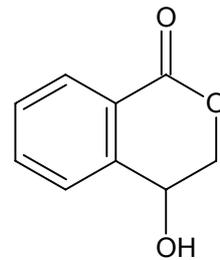


3,6 dimetilcumarina

### Cumarinas miscelâneas



Cumarina dimérica (dicumarol)



Isocumarina (4-hidromeleína)

FIGURA 5 - Diferentes estruturas das cumarinas

### 2.1.4 Ocorrência e Distribuição

Mais de 3.400 cumarinas encontram-se naturalmente distribuídas em, aproximadamente, 160 famílias de plantas (BOOTH et al., 2004).

As cumarinas encontram-se distribuídas predominantemente nas angiospermas, em diferentes famílias de dicotiledôneas, como: Apiaceae, Araliaceae, Asteraceae, Fabaceae, Moraceae, Oleaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae, Thymeleaceae, Urticaceae encontradas livres ou como heterosídeos (OJALA, 2001; RIBEIRO; KAPLAN, 2002). Na família Apiaceae, as cumarinas são encontradas na cenoura, no aipo, na salsa e na chicória. Na família Rutaceae, em algumas frutas como a toranja (*grapefruit*). Outras fontes desses derivados ainda incluem o chá verde e a canela, fazendo parte, portanto, da dieta do ser humano e de outros animais (LAKE, 1999).

Os compostos cumarínicos são especialmente isolados de plantas verdes, mas também podem ser produzidas por fungos e bactérias (HOULT; PAYÁ, 1996). Embora sintetizadas principalmente nas folhas, também estão presentes em elevados níveis nas frutas, seguidas pelas raízes e talos. Além disso, as mudanças sazonais, as condições ambientais ou estresses provocados por interação com microrganismos, podem afetar a ocorrência em diversas partes da planta (OJALA, 2001; TORRES et al., 2004; TRANI et al., 2004; KAI et al., 2006; MAES; DEBENEDETTI; DE KIMPE, 2006).

### 2.1.5 Propriedades

#### 2.1.5.1 Propriedades físico-químicas

A cumarina *per se* apresenta-se como cristais brancos à temperatura ambiente, possui peso molecular de 146,15 g/mol, ponto de fusão entre 68-70° C , ponto de ebulição de 303°C e densidade de 0,94 (EGAN et al., 1990). Quando em estado livre, são solúveis em álcool e

outros solventes orgânicos como éter e solventes clorados (BRUNETON, 1995), sendo pouco solúveis em água (ROJAHN, 1956).

As cumarinas possuem um espectro ultravioleta - UV característico, o qual é fortemente influenciado pela natureza e posição dos grupos substituintes; deste modo são facilmente visualizadas por cromatografia em camada delgada, onde as manchas sob ação da luz UV aparecem em diversas cores, como azul, amarela e roxa (KUSTER; ROCHA, 2003). Também exibem forte fluorescência na região visível, podendo ser usadas como corantes (KOVAC; NOVAC, 2002).

#### **2.1.5.2 Propriedades industriais**

As cumarinas possuem uma ampla aplicação na indústria, principalmente as cumarinas simples, por possuírem odor característico e acentuado (EGAN et al., 1990). São encontradas em muitos extratos aromáticos de plantas, porém, algumas vezes encontram-se sob a forma de combinações inodoras, de heterosídeos, que somente após ação hidrolisante, adquirem aroma agradável (COSTA, 1994).

A cumarina *per se* se destaca entre as substâncias aromáticas, por ser amplamente utilizada como aromatizante em alimentos industrializados, como a manteiga, o tabaco, várias bebidas, numerosos medicamentos e perfumes (ROJAHN, 1956; KUSTER; ROCHA, 2003). No entanto, com base em dados sobre a sua toxicidade hepática em ratos, a FDA a classificou como substância tóxica, passando a considerar sua adição em alimentos como adulteração. Posteriormente o Conselho Europeu estabeleceu o limite geral permitido do uso de cumarinas em alimentos e bebidas não alcoólicas de até 2 mg/kg. Para bebidas alcoólicas, e alguns doces, balas ou chocolates de caramelo foi permitido até 10 mg/kg e nas gomas de mascar 50 mg/kg (EGAN et al., 1990).

Devido a seu aroma acentuado, estabilidade e custo reduzido é bastante utilizada nas indústrias de produtos de limpeza e cosméticos (KUSTER; ROCHA, 2003): em desodorantes e perfumes como agente fixador ou para ressaltar a fragrância, *spray* de cabelo, xampus, sabonetes, pasta de dentes, detergentes, bem como em borrachas, materiais plásticos e tintas com a finalidade de mascarar odores de solventes orgânicos (EGAN et al., 1990).

Também se atribuiu à cumarina a capacidade de reduzir a porosidade e aumentar o brilho de minerais, como o níquel; de ser usada como aditivo em soluções aquosas de eletrodeposição (EGAN et al., 1990); e de apresentar resultados positivos no aumento da resistência à corrosão do zinco (MOUANGA et al., 2006).

Desde a síntese da primeira cumarina, inúmeras informações sobre as suas propriedades e aplicações vêm sendo descritas (Tabela 1).

**Tabela 1** - Propriedades e Aplicações das Cumarinas

Composto	Aplicação
Cumarina	adoçante, condimento, aromatizante
4-Hidroxycumarina	produção do dicumarol e warfarina
Warfarina	rodenticida
3,4-Dihidrocumarina	perfume industrial
6-Metilcumarina	melhora o aroma
7-Hidroxycumarina	protetor solar
Aminometil cumarina	rótulo fluorescente
4-Metilumbeliferona	corante a laser

Fonte: Egan et al., 1990, p. 506.

### **2.1.5.3 Propriedades alelopáticas**

Alelopatia é qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico, que uma planta exerce sobre a outra pela ação de compostos químicos liberados no ambiente, sendo estes compostos denominados de aleloquímicos (FERREIRA; AQUILA, 2000).

As cumarinas e lactonas podem ter sua síntese aumentada pelo contato das plantas com fungos patogênicos. Essas substâncias podem ser liberadas no meio e agir como aleloquímicos, inibindo a ação de predadores, insetos, microrganismos ou de plantas infestantes (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Um exemplo é a escopoletina, composto alelopático presente na exsudação radicular da aveia. Constatou-se que esse composto pode controlar o crescimento de plantas infestantes, por apresentar maior fitotoxicidade para a planta invasora do que para a planta cultivada (JACOBI; FLECK, 2000). Mata et al. (1998), também observaram propriedades alelopáticas na cumarina imperatorina.

### **2.1.6 Extração e Caracterização**

As cumarinas, pelo fato de possuírem um anel lactônico, podem ser extraídas em meio ácido ou alcalino. Em meio alcalino, ocorre a abertura do anel, proporcionando a obtenção das substâncias na forma de sais solúveis em água. Enquanto que a acidificação em meio aquoso torna possível a relactonização do anel, recuperando-as por extração com solventes orgânicos (MURRAY, 1978). Porém, com o avanço dos métodos de extração e isolamento, na maioria das vezes, é desnecessário submeter extratos vegetais a tratamentos químicos preliminares (KUSTER; ROCHA, 2003).

O desenvolvimento de diversas fases estacionárias para cromatografia em coluna e em camada delgada, contribuiu para a separação de misturas de cumarinas sensíveis a adsorventes. Além disso, técnicas cromatográficas mais rápidas como cromatografia líquida

de alta eficiência - CLAE, cromatografia líquida de média - CLMP e baixa pressão - CLBP e cromatografia a vácuo, possibilitaram separações em menor tempo e com resoluções superiores aos métodos em coluna aberta (KUSTER; ROCHA, 2003).

A quantificação de cumarinas é comumente realizada por métodos cromatográficos como: a cromatografia gasosa em colunas capilares e a cromatografia líquida de alta eficiência (HAGE; TWEED, 1997). Através de métodos espectroscópicos de análise, é realizada a determinação estrutural das cumarinas, entre os quais: a Ressonância Magnética Nuclear - RMN, a Espectrometria de Massa – EM e o Infravermelho - IV (MURRAY, 1978).

## **2.1.7 Farmacocinética**

### **2.1.7.1 Absorção**

A cumarina, em estudos *in vitro*, é absorvida rápida e extensivamente pela pele humana, de ratos e camundongos, sem sofrer biotransformações por enzimas cutâneas. A absorção pode chegar a 45% em camundongos e 50% em humanos e ratos. Valores comparáveis aos encontrados nos testes *in vivo* com ratos, que apresentaram 66% de absorção da dose aplicada topicamente (BECKLEY-KARTEY; HOTCHKISS; CAPEL, 1997). Quando aplicada topicamente em emulsão óleo/água, a cumarina apresentou extensa absorção em ratos e humanos, alcançando concentrações superiores a 75% e 95%, respectivamente (YOURICK; BRONAUGH, 1997). A administração por via oral da cumarina em humanos, tem mostrado rápida absorção no trato intestinal (RITSCHER et al., 1977).

### **2.1.7.2 Distribuição**

Após administração oral em seres humanos, a cumarina é rápida e completamente absorvida no trato gastrointestinal, extensamente metabolizada pelo fígado, submetida ao metabolismo de primeiro passo e distribuída pelo organismo (LAKE, 1999).

Aproximadamente 3,4% da dose são encontradas na circulação sistêmica inalterada (RITSCHER et al., 1977).

O metabolismo é iniciado por enzimas específicas do sistema citocromo P450 (CYP), formando metabólitos hidroxilados, produtos da Fase I e seus conjugados glicuronídeos da Fase II (EGAN et al., 1990; BECKLEY-KARTEY; HOTCHKISS; CAPEL, 1997). Este processo pode ocorrer por diversas vias, como: a 3,4-epoxidação, a 3-hidroxilação, a 4-hidroxilação, a 5-hidroxilação, a 6-hidroxilação e a 7-hidroxilação (LEWIS; ITO; LAKE, 2006). A distinção de cada via metabólica da cumarina se deve a alguns fatores, como espécie, raça e sexo (BECKLEY-KARTEY; HOTCHKISS; CAPEL, 1997).

Muitos estudos têm demonstrado que em ratos e na maioria das espécies de camundongos a cumarina é submetida à via 3,4-epoxidação. Nesta via o metabólito instável 3,4-epóxido é gerado, resultando na abertura do anel lactônico, e na formação de metabólitos de anel aberto, como: o ácido hidroxifenilacético (*o*-HPAA), o *o*-hidroxifenilacetaldeído (*o*-HPA) e o *o*-hidroxifeniletanol (*o*-HPE) (EGAN et al., 1990).

O metabólito 3,4-epóxido pode ser convertido a *o*-HPA, através de um rearranjo espontâneo, perdendo uma molécula de dióxido de carbono (LAKE, 1999), ou pode conjugarse à glutatona - GSH. Este aldeído (*o*-HPA) é hepatotóxico e é detoxificado por oxidação a *o*-HPAA ou reduzido a *o*-HPE (BORN; HU; LEHMAN-MCKEEMAN, 2000).

Ao contrário do metabolismo de ratos e camundongos, em humanos e babuínos a 7-hidroxilação é a principal via (68-92%), tanto em estudos *in vivo* como *in vitro* (LAKE, 1999), dando origem a 7-hidroxicumarina, e seus conjugados glicuronídeos (EGAN et al., 1990) (Figura 6).

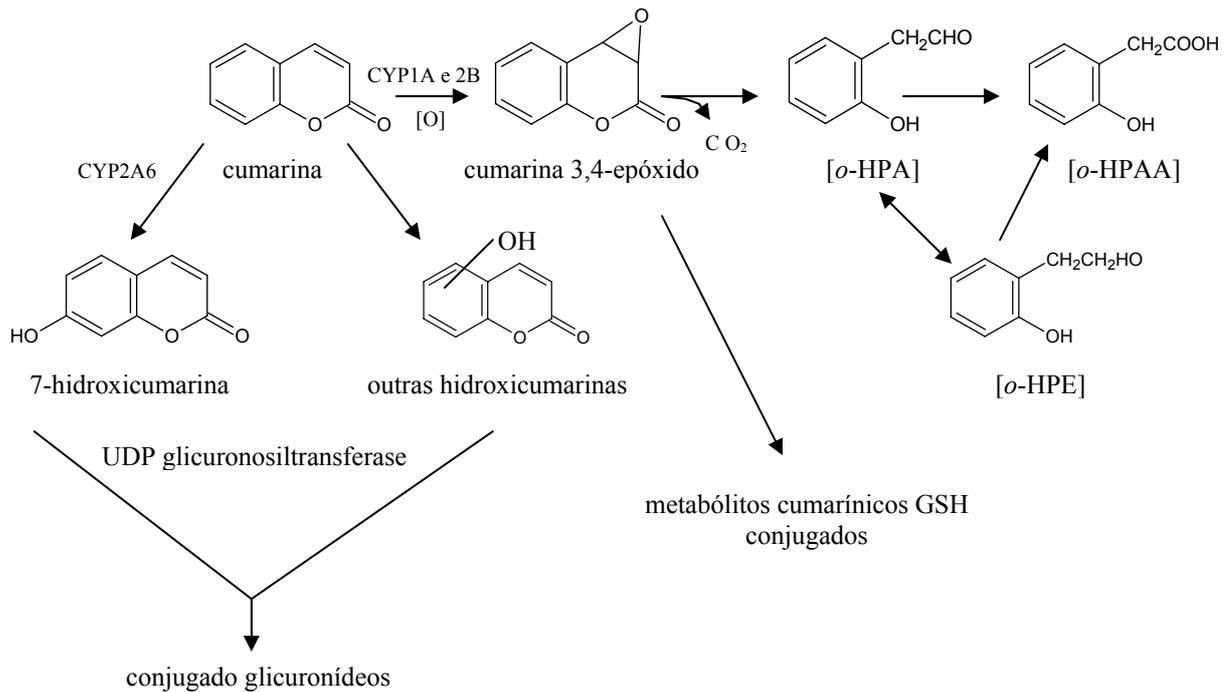


FIGURA 6 - Vias do metabolismo da cumarina.

Fonte: Adaptado de Lake et al., 2002, p. 810.

A 7-hidroilação em humanos é catalizada pela enzima da família do citocromo P450, a CYP2A6 enquanto que a 3-4 epoxidação em ratos é mediada pelas enzimas CYP1A e CYP2B. Isto pode sugerir que a 7-hidroilação representa uma via de detoxificação, e a 3,4-epoxidação uma via de ativação, que resulta na ligação covalente da cumarina a proteínas microsossomais. Os metabólitos desta via (3,4-epóxido e *o*-hidroxifenilacetaldeído) sugerem a melhor hipótese da diferença de hepatotoxicidade entre espécies e raças (BECKLEY-KARTEY; HOTCHKISS; CAPEL, 1997).

Estudos recentes informam que a 3,4-epoxidação também ocorre em humanos. As enzimas do citocromo P450 envolvidas nesta via são: CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2E1 e CYP3A4 (LEWIS; ITO; LAKE, 2006) e o principal metabólito da detoxificação é o *o*-HPAA (90%) (VASSALO et al., 2004 a), sendo este o metabólito urinário menos freqüente em seres humanos (LEWIS; ITO; LAKE, 2006), confirmando que a 7-hidroilação é a principal via do metabolismo da cumarina nesta espécie.

### 2.1.7.3 Excreção

A meia vida de eliminação da cumarina é, geralmente, similar em todas as espécies, sendo por volta de uma a duas horas em humanos e entre uma e quatro horas em outras espécies (camundongos, ratos, hamsters siberianos, coelhos, babuínos) (LAKE, 1999).

A excreção renal é a principal via de eliminação da cumarina na maioria das espécies, sendo superior a 80% em humanos (EGAN et al., 1990). Em ratos ocorre extensiva excreção biliar, resultando na presença de cumarinas nas fezes (LAKE, 1999).

Em humanos a 7-hidroxycumarina, e seus conjugados sulfatados e glicuronídeos constituem 40-97% dos metabólitos excretados na urina e o *o*-HPAA é o metabólito encontrado em menor quantidade (BORN et al., 2000).

Dos derivados da 3,4-epoxidação da cumarina, apenas o ácido *o*-HPAA é detectado na urina de ratos e camundongos (BORN et al., 2003).

### 2.1.8 Toxicidade

Em 1954 a FDA banuiu o uso da cumarina, pois resultados preliminares indicaram-na como agente hepatotóxico. Esta decisão foi baseada, principalmente, em conclusões obtidas de estudos realizados em ratos (EGAN et al, 1990). No entanto camundongos, hamsters e babuínos parecem ser modelos melhores para serem comparados com humanos do que o rato (LAKE; GRASSO, 1996; LAKE et al., 2002). Fentem e Fry (1992) apontaram o pequeno roedor gerbil como modelo animal mais apropriado para o homem, no que diz respeito aos estudos de metabolismo e hepatotoxicidade de cumarinas.

A toxicidade da 3,4-Dihidroxycumarina e da cumarina *per se* foram avaliadas pela FDA e pelo *National Toxicology Program* dos EUA - NTP, devido ao amplo emprego desses metabólitos em condimentos, bebidas, gelatinas, pudins, perfumes e cosméticos. Ambas apresentaram evidências de carcinogênese em ratos machos, com base na incidência

aumentada de adenocarcinomas nos túbulos renais. Apenas a cumarina *per se* apresentou evidência de atividade carcinogênica em camundongos considerando o aumento da incidência de carcinoma brônquio-alveolar e adenoma hepatocelular nestes animais (NTP n° 91-64-5, 1993; NTP n° 119-84-6, 1993). Born et al. (1998; 1999) apontaram a cumarina como um agente carcinogênico de pulmão em camundongos, causando necrose em células Clara (células não ciliadas do epitélio bronquiolar), após administração aguda. Este resultado não foi observado em humanos (BORN et al. 1999).

Em cachorros, uma dose oral de 100mg/kg de cumarina, administrada em um período de 8 a 22 dias, demonstrou ser hepatotóxica e nefrotóxica (LAKE et al., 1999).

Os estudos de Lake e Grasso (1996) mostraram que a cumarina apresenta diferentes níveis de toxicidade entre as espécies. Enquanto o desenvolvimento do tumor no fígado de ratos foi associado à hepatotoxicidade crônica da cumarina, este resultado não foi observado em camundongos (CD-1) e em hamsters sírios.

A diferença de susceptibilidade entre as espécies decorre da disparidade de seus processos metabólicos (BORN et al., 1997) e acredita-se, que a toxicidade não se deve ao composto *per se*, mas ao intermediário reativo, possivelmente o 3,4-epóxido, o qual pode ligar-se a proteínas do fígado e por esta razão causar danos ao tecido (BECKLEY-KARTEY; HOTCHKISS; CAPEL, 1997; BORN; HU; LEHMAN-MCKEEMAN, 2000). Esta hipótese também foi relatada por Vassallo et al. (2004 b); os autores observaram que a toxicidade da cumarina em células Clara de pulmão de camundongos, resultou da formação local do metabólito 3,4-epóxido.

Ao contrário do que ocorre com ratos e camundongos, onde altas doses de cumarina podem produzir toxicidade e carcinogenicidade, há pouca evidência de toxicidade induzida pela cumarina em seres humanos, quando são administradas doses de até 1900 vezes àquelas obtidas de fontes dietéticas ou de produtos cosméticos (LAKE et al., 1999).

Em humanos a cumarina é convertida ao metabólito não tóxico 7- hidroxycumarina, enquanto que em roedores (principalmente em ratos) a principal via metabólica é a 3,4-epoxidação, gerando o metabólito instável 3,4-epóxido que é convertido a *o*-HPA, pela perda de uma molécula de dióxido de carbono (LAKE, 1999). Sendo este último o principal metabólito encontrado em microsossomos hepáticos de ratos (BORN et al., 1997; BORN; HU; LEHMAN-MCKEEMAN, 2000).

Além disso, a cinética da formação *in vitro* do composto *o*-HPA, e a grande quantidade de cumarina requerida para a sua produção em microsossomos hepáticos humanos, sugere fortemente, que os humanos são incapazes de produzir relevantes concentrações tóxicas deste metabólito, quando expostos a uma concentração reduzida de cumarina (BORN et al., 2000), como a concentração de exposição diária, em torno de 0,02 a 0,06 mg/kg (LAKE, 1999).

Alguns efeitos adversos foram descritos em humanos submetidos a tratamentos com cumarinas. Miyamoto et al. (2004) relataram um caso de necrose de mama bilateral em paciente tratada com o anticoagulante warfarina o que é considerado uma complicação rara na terapia com anticoagulantes. Dois casos de hepatite aguda foram relatados em pacientes tratados com cumarina por um período de cinco meses (KOCH et al., 1997). Todavia, estudos realizados por Cox, O’Kennedy e Thornes (1989), num período de aproximadamente dez anos, delinearam um percentual de toxicidade hepática de apenas 0,37%, e concluíram que esta atividade parece ser dose independente, visto que, a condição imunológica do paciente interfere, em maior proporção, do que a quantidade de droga administrada.

Ainda é importante considerar, que algumas cumarinas, sintetizadas por fungos, são tóxicas, entre as quais, as aflatoxinas que são produzidas por diversas espécies de *Aspergillus* (BRUNETON, 1995) e a citrinina, subproduto metabólico de origem cumarínica oriundo do crescimento de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Estas micotoxinas são

produzidas durante o desenvolvimento fúngico em grãos, alimentos processados e produtos alimentícios durante a estocagem, e sua ingestão está relacionada a intoxicações agudas ou crônicas (CARVALHO; FERNANDES; FREIRE, 2005).

#### 2.1.8.1 Genotoxicidade

Diversos estudos avaliaram a genotoxicidade da cumarina e os dados sugerem que este composto não é um agente genotóxico, não havendo evidências de indução de genotoxicidade em estudos *in vivo* (*Drosophila melanogaster* e teste de micronúcleos em camundongos) e *in vitro* (em cultura de fígado humano). Porém, testes *in vitro* com altas doses de cumarina resultaram em genotoxicidade (LAKE, 1999).

Os metabólitos 3,4-dihidroxicumarina e 7-hidroxicumarina, não induziram mutação genética em diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*. Já a 7-hidroxicumarina apresentou resultados positivos para *Klebsiella pneumoniae*. Enquanto que, a 3,4-dihidroxicumarina induziu a troca das cromátides irmãs em cultura celular de ovário de hamster chinês (NTP n° 91-64-5, 1993; NTP n° 119-84-6, 1993).

Estudos realizados por Pillai et al. (1999) demonstraram que a 7-hidroxicumarina (umbeliferona) e alguns análogos possuem elevado potencial em prevenir mutações e sugeriram que esta atividade pode estar relacionada com propriedades antioxidantes, também observadas nestes derivados cumarínicos.

Novas isocumarinas foram isoladas de uma planta nativa do Brasil (*Paepalanthus vellozioides*), a paepalantina, a qual demonstrou ser, através de diferentes testes, mutagênica, clastogênica e citotóxica (VARANDA et al., 1997). A paepalantina-9-*O*- $\beta$ -*D*-glicopiranosíde apresentou mutagenicidade inferior a paepalantina, quando o H da posição 9 foi substituído por uma molécula de glicose (VARANDA et al., 2004).

### 2.1.8.2 Fototoxicidade

As furanocumarinas ou psoralenos são compostos planares, tricíclicos, constituídos de um anel furano ligado ao núcleo cumarínico. Como a maioria das cumarinas, são substâncias que absorvem fortemente a energia na região ultravioleta e, por isso, são altamente reativas sob incidência de luz (BETHEA et al., 1999).

A ação de furanocumarinas sobre a pele, quando esta é submetida à ação de raios ultravioleta, pode ser utilizada para o tratamento de enfermidades cutâneas como a psoríase, vitiligo, micoses, eczemas e outras desordens dermatológicas, através da fotoquimioterapia denominada PUVA (psoralenos + UVA) (SCHMITT; CHIMENTI; GASPARRO, 1995; GRUNDMANN-KOLLMANN et al., 2002).

O tratamento consiste da administração via oral da furanocumarina (20 a 40 mg em dose única), seguido de duas horas de exposição à luz solar ou a radiação UVA (320-400nm), como forma de induzir a repigmentação da pele (BRUNETON, 1995). As furanocumarinas mais utilizadas no tratamento PUVA são a xantotoxina (8-metoxipsoraleno, 8-MOP), bergapteno (5-metoxipsoraleno, 5-MOP) e o 4,5', 8-trimetilpsoralen (TMP) (SAÏD et al., 1997; MATSUDA et al., 2005).

A terapia pode ter alguns efeitos adversos: desordens gastrintestinais, catarata, e em longo prazo pode causar câncer. Estudos têm demonstrado o aumento da incidência de câncer de pele e de pulmão nos pacientes (KUSTER; ROCHA, 2003). Também foram observados eritema e náuseas em alguns pacientes após administração oral de 8-MOP, enquanto o 5-MOP foi melhor tolerado (SAÏD et al., 1997).

A eficácia da PUVA é atribuída à formação de fotoadutos entre psoralenos e o DNA, bem como com outros componentes celulares. Algumas investigações têm demonstrado que o psoraleno fotoativado pode modificar proteínas e suas atividades (SCHMITT; CHIMENTI; GASPARRO, 1995).

As moléculas de psoralenos exibem estruturas tricíclicas planares, hidrofóbicas com dois sítios fotorreativos (3,4-pirona e 4',5'-dupla ligação furano), o que possibilita se intercalar com as bases do DNA. Os danos causados no DNA pelo 8-MOP, em doses subletais, e pela radiação UVA, podem induzir reparos no DNA (BETHEA et al., 1999).

A manifestação mais comum, em mamíferos, da toxicidade das furanocumarinas é a fitofotodermatite, uma reação epidérmica caracterizada por erupções bolhosas, hiperpigmentação, eritema e formação de vesículas, devido ao contato direto com vegetais que contenham furanocumarinas como, por exemplo, as frutas cítricas, ou por ingestão (KUSTER; ROCHA, 2003).

### **2.1.9 Atividades Biológicas**

Diversas atividades biológicas foram atribuídas às cumarinas, entre as quais: tratamento de dislipidemias (MADHAVAN et al., 2003), atividade antidepressiva (SINGH et al., 1992), hepatoprotetora (OKAMOTO et al., 2001; PARK et al., 2004), antiinflamatória (IVANOVSKA et al., 1994), antihistamínica (TAKEUCHI et al., 1991; MATSUDA; SHIMODA; YOSHIKAWA, 1999), anti-prurídica (MATSUDA et al., 2002), acaricida (GLEYE et al., 2003), antiulcerogênica (BIGHETTI et al., 2005), antimelanogênica (YAMAMURA; ONISHI; NISHIYAMA, 2002) e uma cumarina simples, a escoparona, exerce ação no organismo, como bloqueadora dos canais de cálcio (BOOTH et al., 2004).

É importante ressaltar a propriedade anticoagulante de algumas cumarinas como a 4-hidroxicumarina, a escopoletina e o dicumarol (BOOTH et al., 2004), este último foi o primeiro medicamento com ação anticoagulante via oral, e constituiu o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes, do qual derivam importantes fármacos entre os quais a warfarina (3-fenilacetiletil, 4-hidroxicumarina) (MUELLER, 2004), cuja

administração oral está também associada à prevenção do tromboembolismo venoso (PINEO; HULL, 2003).

Observa-se a presença de cumarinas em outros medicamentos amplamente utilizados na prática clínica, como exemplo o antivaricoso Venocur triplex. Entre seus componentes se encontra a Castanha da Índia, que é empregada no tratamento de enfermidades venosas; seus princípios ativos consistem em uma mistura de saponina (escina), um glicosídeo de hidroxycumarina (esculina) ou de seu aglucônio (esculetina) (PR-vade-mécum, 2000).

Qin et al. (2003), em estudos com ratas ovariectomizadas, observaram que as cumarinas totais dos frutos de *Cnidium monnieri*, uma importante planta da medicina chinesa, possuem efeitos antiosteoporóticos, pois inibiram e reverteram a perda óssea.

A anseculina (KA-672, 7-metoxi-6-[3-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]propoxi]-3,4-di-metil-2H-1-benzopiran-2-ona) é um derivado cumarínico com promissoras propriedades de melhora da função cognitiva (KNAUBER; MÜLLER, 2003). Outra cumarina com atividade no sistema nervoso é o decursinol, a administração em longo prazo deste composto em camundongos preveniu a deficiência de memória induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide, principal componente das placas senis presentes na doença de Alzheimer (YAN, 2004).

#### **2.1.9.1 Vasorrelaxante**

Campos-Toimil et al. (2002) sintetizaram derivados cumarínicos e furanocumarínicos e avaliaram a atividade vasorrelaxante destes compostos em anéis pré-contraídos da aorta de ratos com noradrenalina ou por despolarização com cloreto de potássio - KCl. Os resultados mostraram potencial ação vasodilatadora destes novos compostos, indicando serem promissores agentes anti-hipertensivos. A cumarina  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -butirolactona sintetizada por Chen et al. (2005), exibiu ação vasorelaxante em artéria aorta porcina, tendo sido contraída por KCl.

Uma das substâncias ativas isoladas da *Angelica pubescens* Maxim. (Apiaceae), usada na medicina chinesa, é o ostol (7 metóxi-8-[3-metilpent-2-enil]cumarina). Extratos desta planta, contendo a substância citada, provocaram uma resposta hipotensora de curta duração após a injeção intramuscular em cães. Além disso, os extratos também apresentaram *in vitro* a propriedade de inibir a agregação plaquetária e relaxar as musculaturas lisa e cardíaca, possivelmente devido à inibição das enzimas cAMP e cGMP-fosfodiesterases e do influxo de cálcio (HOULT; PAYÁ, 1996).

Alguns estudos investigaram a associação do tratamento com cumarinas e a redução da frequência e da severidade das crises de enxaqueca. O mecanismo deste efeito positivo ainda é desconhecido, mas sugere-se que as cumarinas interfiram na agregação plaquetária (RAHIMTOOLA, 2001).

#### **2.1.9.2 Antioxidante**

As cumarinas são importantes antioxidantes naturais, todavia a relação estrutural-atividade não está bem elucidada, sabe-se apenas, que o anel 1,2-pirona exerce pouca influência na atividade antioxidante, sendo, portanto o grupo *orto* catecol e seus substituintes os principais responsáveis por esta ação (ZHANG; WANG, 2004). Kaneko, Baba e Matsuo (2003) também concluíram ser um fator determinante, a participação do grupo *orto* catecol, na proteção contra citotoxicidade induzida por hidroperóxidos de ácido linoleico em células endoteliais venosas de cordão umbilical humano em cultura.

A importância do grupo hidroxila no núcleo cumarínico foi salientada por Ng, Liu e Wang (2000) que observaram uma potente atividade antioxidante do xantotoxol em testes de inibição da peroxidação de lipídeos (utilizando-se cérebro e homogeneizados de rim de ratos) e inibição da hemólise em eritrócitos de ratos.

Kabeya et al. (2000) realizaram estudo sobre o efeito da cumarina (1,2-benzopirona) e de três de seus derivados (7-hidroxycumarina, 7-acetoxicumarina e 7-aliloxicumarina) sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelhos estimulados. Os autores observaram que a cumarina não afeta a produção de radicais superóxidos, no entanto seus derivados apresentaram efeitos inibitórios dose-dependente sugerindo que a presença de radicais substituintes na posição 7 do anel benzopirona é importante para a atividade inibitória da produção de radicais superóxido.

A fraxina (7-hidroxi-6-metoxi-8-O-glicosilcumarina) exibiu ação protetora contra *stress* oxidativo mediado pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) recuperando a viabilidade de células endoteliais venosas de cordão umbilical humano em cultura (WHANG et al., 2005). Molina-Jimenez, Sanchez-Reus e Benedi (2003) associaram os efeitos neuroprotetores da fraxetina com sua atividade antioxidante em estudos com células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), induzidas à apoptose pela rotenona (pesticida derivado de plantas, inibidor do complexo mitocondrial I).

Estudos recentes mostraram que a substituição de um dos grupos hidroxila por grupo amina (*orto* hidroxí-aminocumarinas) resulta em compostos com eficaz ação antioxidante na peroxidação de lipídeos *in vitro*, e conseqüentemente superiores as do  $\alpha$ -tocoferol (TYAGI et al., 2005).

As pesquisas por antioxidantes cumarínicos extraídos de plantas são promissoras. Duas cumarinas isoladas da planta *Weigela subsessilis* (Caprifoliaceae) - a escopoletina e a cleomiscosina A - inibiram a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) induzida por íons cobre e pelo composto AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorida) (THUONG et al., 2005).

### 2.1.9.3 Antiinflamatória

As cumarinas possuem propriedades antiinflamatórias, provavelmente em consequência de sua atividade antioxidante como, por exemplo, a capacidade da fraxetina e da 7,8-di-hidroxicumarina em seqüestrarem radicais superóxidos oriundos de neutrófilos fagocíticos ativados, envolvidos em vários processos inflamatórios (PAYÁ et al., 1994).

A cumarina (1,2 benzopirona) reduziu gradualmente o linfodema de pacientes com filariose crônica - elefantíase (HOULT; PAYÁ, 1996). Por outro lado, não foi eficaz no tratamento de pacientes pós-mastectomizadas (LOPRINZI et al., 1999). Sugere-se que o mecanismo de ação envolva macrófagos, os quais ativam a proteólise no local da injúria (EGAN et al., 1990).

Kontogiorgis e Hadjipavlou-Litina (2003) observaram propriedade imunomodulatória em uma pirocumarina linear, uma vez que ratos tratados com esse composto não desenvolveram artrite.

No trabalho de Cheng et al. (2004), novos derivados cumarínicos foram sintetizados e suas atividades como inibidores de TNF- $\alpha$  comprovadas em células mononucleares humanas, estimuladas por lipopolissacarídeos bacterianos *in vitro*.

### 2.1.9.4 Antiparasitária

Baseado na propriedade antiinflamatória da cumarina (1,2-benzopirona) e alguns de seus derivados sintéticos, Tripathi et al. (2000) verificaram a atividade antifilarial destas cumarinas, como agentes capazes de eliminar o parasita na fase adulta e concluíram que podem ser úteis no combate da inflamação e da infecção filarial simultaneamente.

A atividade antimalárica também foi atribuída a 5,7-dimetoxi-8-(3'-hidroxi-3'-metil-1'-buteno)cumarina isolada da raiz da planta *Toddalia asiática*, demonstrando potente atividade antiplasmodial (OKETCH-RABAH et al., 2000). Esta atividade também foi

observada na dafnetina (7,8-di-hidroxycumarina) em estudos *in vitro* e *in vivo* contra o *Plasmodium falciparum* (WANG et al., 2000; MU; WANG; NI, 2002).

Scio et al. (2003) isolaram compostos cumarínicos de uma planta do cerrado brasileiro, *Kielmeyera albopunctata*, e testaram a atividade tripanocida destes. A cumarina 4-(1-metilpropil)-5,7-di-hidroxi-8-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil)cromen-2-ona apresentou atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, matando 80% dos parasitas após 24 h em uma concentração de 125 µg/ml. O psolareno (amotosaleno HCl) em associação com tratamento fotoquímico UVA mostrou-se efetivo para inativar o *Trypanosoma cruzi* em concentrados, de plasma e plaquetas, infectados (VAN VOORHIS et al., 2003).

#### **2.1.9.5 Antiviral**

A atividade antiviral das cumarinas, em especial sobre o vírus HIV, é relatada em diversos estudos por diferentes mecanismos. Entre os mecanismos mais descritos está a capacidade dos compostos cumarínicos de inibirem a enzima transcriptase reversa (NG et al., 1997). Capacidade esta, que foi atribuída por Bourinbaier, Jirathitikal (2002) ao anticoagulante cumarínico warfarina, demonstrando que esta droga pode ser considerada um inibidor da replicação do vírus HIV, uma vez que possui singular propriedade de inibir outras enzimas, além da transcriptase reversa, como a serino protease, aspartil protease e a integrase, todas essenciais para replicação viral.

O calanolídeo B isolado de sementes da árvore *Calophyllum cerasiferum* (SPINO; DODIER; SOTHEESWARAN, 1998) e os calanolídeos A e B, isolados das folhas de uma árvore de floresta tropical, *Calophyllum lanigenum* Miq. var. *austrocoriaceum*, impediram a replicação *in vitro* do HIV-1, demonstrando serem importantes inibidores da enzima transcriptase reversa (KUSTER; ROCHA, 2003). Fuller et al. (1994) isolaram uma

piranocumarina denominada costatolido (inibidora da transcriptase reversa) que apresentou substancial atividade anti-HIV e foi considerado um composto promissor para as pesquisas por encontrar-se em elevadas quantidades no látex de árvores do gênero *Calophyllum*.

Mao et al. (2002) descreveram a síntese de uma série de dímeros cumarínicos análogos, modificados quimicamente, e sua atividade como inibidores da enzima integrase HIV-1 (enzima responsável pela integração do DNA viral, reversivelmente transcrito do vírus HIV-1, no DNA cromossomal de células recém infectadas). Os autores concluíram que dímeros de cumarinas contendo fração hidrofóbica desenvolvem potente ação inibitória sobre a enzima integrase HIV-1.

A ação anti-HIV de algumas 4-hidroxycumarinas com substituintes na posição 3 é atribuída a inibição da enzima protease do vírus (KIRKIACHARIAN et al., 2002).

Uchiumi et al. (2003) obtiveram resultados positivos com a 3-fenilcumarina, a qual interfere no mecanismo de expressão genética em nível de transcrição.

#### **2.1.9.6 Antibacteriana**

A atividade antibacteriana das cumarinas é relatada em diversos trabalhos. O mecanismo de ação antimicrobiano parece ser mediado pela capacidade das cumarinas de interagirem com o DNA (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003).

Os antibióticos aminocumarínicos novobiocina, coumermicina A<sub>1</sub> e clorobiocina, foram primeiramente produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* (LANCINI; LORENZETTI, 1993), com espectro de ação para bactérias Gram-positivas tais como *Staphylococcus aureus* (LONG, 2003). Esses antibióticos são potentes inibidores da DNA girase e da topoisomerase IV bacteriana, enzimas que possuem importante função no processo de replicação, transcrição, translação e recombinação (LAURIN et al., 1999). Estas drogas ligam-se a subunidade B da enzima DNA girase bacteriana e inibem a atividade da adenosina

trifosfatase (ATPase) (MAXWELL, 1993). Nos últimos anos, várias informações genéticas foram elucidadas, possibilitando a biossíntese de novos aminocumarínicos com atividade antimicrobiana, através de diferentes métodos (LI; HEIDE, 2005).

Kawase et al. (2003) observaram a atividade anti-*Helicobacter pylori* em derivados da 7-hidroxicumarina, concluindo que a presença do grupo hidroxila na posição 6 ou 7 é essencial para esta função. A 7-hidroxicumarina também apresentou atividade sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (RAHMAN; GRAY, 2002).

Em pesquisas realizadas por Souza et al. (2005), visando observar a atividade antibacteriana de cumarinas naturais e semi-sintéticas, o ostenol foi o composto que apresentou a melhor atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*).

A siderina, uma cumarina simples trissubstituída apresentou atividade para *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Shigella flexneri* (CHOWDHURY; HASAN; RASHID, 2003).

Ngwendson et al. (2003) isolaram a imperatorina, o bergapteno e a isopimpinellina de uma planta medicinal da floresta equatorial africana (*Peucedanum zenkeri*), os quais inibiram o crescimento de *Mycobacterium intracellulare*.

Ensaio usando cumarinas frente ao *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) têm indicado resultados promissores (YASUNAKA et al., 2005). Creaven et al. (2005; 2006) sintetizaram uma série de novas cumarinas complexadas com a prata (Ag I) e este complexo exibiu potente atividade antibacteriana, principalmente ao MRSA. O ostol, uma cumarina prenilada apresentou significativa atividade sobre MRSA e *Pseudomonas aeruginosa* (TADA et al., 2002).

### 2.1.9.7 Antifúngica

Segundo Cowan (1999), diversos derivados cumarínicos hidroxilados podem apresentar atividade antifúngica. Kokubun et al. (2003) demonstraram que a isocumarina 3,5-di-metil-8-hidroxi-7-metoxi-3,4-di-hidroisocumarina apresentou atividade para o fungo *Aspergillus niger*.

De uma planta selvagem usada como tempero na Grécia, *Tordylium apulum*, Kofinas et al. (1998) isolaram oito cumarinas: umbeliferona, isopimpinella, xantotoxina, isobergapteno, dihidrofurano-cumarina, diacetildihidroangelicina, cnidiadina e columbianetina. Todas as cumarinas isoladas, com exceção da columbianetina, exibiram propriedades antifúngicas sobre uma espécie de fungo fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum*. A germinação de esporos de outras espécies fúngicas fitopatógenas (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Alternaria mali*, *Phytophthora capsici* e *Pyricularia oryzae*) também foi inibida por novas cumarinas 3,4,7-trissubstituídas (MOURI et al., 2005).

Testes antifúngicos realizados por Jurd, King e Mihara (1971) em derivados da umbeliferona (7-hidroxycumarina) mostraram que esta cumarina foi ineficaz para as espécies de fungos e leveduras testadas: *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Entretanto, a 7-metoxicumarina (herniarina) e a 7-etoxicumarina inibiram completamente o crescimento destas espécies, demonstrando que a atividade antifúngica foi resultado de uma simples alquilação do grupo 7-hidroxil. Os autores também concluíram que a atividade antifúngica é dependente do tamanho da cadeia lateral alquila, bem como do seu grau de saturação, visto que, os compostos 7-aliloxicumarina, 7-(3-metilbutil)oxicumarina, 7-(3-metil-butenil)oxicumarina e 7-geraniloxicumarina apresentaram-se inativos.

A 6,7 di-metoxi cumarina, conhecida como escoparona, foi isolada de cascas de *Citrus limon* (limão tahiti), e demonstrou atividade antifúngica (na concentração de 250 µg/ml),

inibindo os fungos filamentosos *Microsporium canis* e *Trichophyton mentagrophytes* (JOHANN, 2003).

Godoy et al. (2005) testaram a atividade antifúngica de cumarinas para inibir o crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, mutualista das formigas cortadoras de folhas (*Atta sexdens*). A inibição do crescimento deste fungo é uma estratégia alternativa de controle das formigas, que são consideradas pragas para a agricultura, devido à grande quantidade de material vegetal utilizado por elas para cultivar o fungo que lhe serve de alimento e fonte de enzimas. Os resultados da pesquisa foram positivos, as cumarinas: suberosina, xantoxiletina, isopimpineline, umbeliferona, xantiletina e 7-hidroxi-3-(1',1'-dimetilalil)-8-metoxicumarina inibiram o crescimento do fungo em reduzidas concentrações.

A escopoletina (6-metoxi,7-hidroxycumarina), pode ser encontrada em diversos vegetais comestíveis e frutas como *Avena sativa* (aveia), *Allium ampeloprasum* (alho), *Dacus carota* (cenoura), *Citrus limon* (limão tahiti) e tubérculos de batata (JURD et al., 1971; CARPINELLA; FERRAYOLI; PALACIOS, 2005). Jurd et al. (1971) observaram que esta cumarina dissubstituída inibiu a esporulação e o crescimento das hifas de *Fusarium solani*.

As furanocumarinas imperatorina e oxipeucedanina, isoladas de uma planta medicinal da Turquia, demonstraram atividade sobre *Candida albicans* (ULUBELEN et al., 1995). A furanocumarina angelicina também demonstrou ter atividade frente *C. albicans* e *Aspergillus niger*, e a pseudoisopsoraleno foi ativa para *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae* (SARDARI et al., 1999).

Stein et al., (2006) fracionaram o extrato em hexano das partes aéreas da planta *Pterocaulon polystachyum* e entre os componentes isolados, apenas a mistura das cumarinas preniladas - prenilletina e prenilletina-metil-éter – apresentou-se ativa frente os fungos *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton*

*mentagrophytes*. Outra cumarina prenilada, a 7-isopenteniloxicumarina inibiu o crescimento do fungo *Epidermophyton floccosum* na concentração de 10 µg/ml (CURINI et al., 2006).

Cumarinas policíclicas fusionadas sinteticamente, através de uma seqüência de substituições da 4-bromometilcumarina, inibiram o crescimento de *Aspergillus fumigatus* na concentração de 25 µg/ml (KHAN et al., 2005).

Rehman et al. (2005), complexaram derivados cumarínicos com metais (cobalto, cobre, níquel e zinco) e testaram frente os fungos: *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis*, *Fusarium solani* e *Candida glabrata*. A atividade antifúngica obtida foi superior nestes compostos se comparados às cumarinas não complexadas. Provavelmente este processo aumentou a natureza lipofílica do átomo central metálico, o que favoreceu a sua permeabilidade na membrana lipídica dos microrganismos.

#### **2.1.9.8 Citotóxica e Antitumoral**

As cumarinas representam uma fonte explorável de novos agentes antitumorais (KOSTOVA, 2005 a), devido a sua atividade imunomodulatória e a ação direta nas células cancerígenas (ZLABINGER et al., 1994).

A cumarina *per se* tem demonstrado atividade em carcinoma de próstata em modelo animal (MAUCHER; KAGER; VON ANGERER, 1993; MOHLER et al., 1994) e capacidade de reduzir entre 40 a 50% o número de metástase de pulmão nos animais com tumores de próstata (VON ANGERER; KAGER; MAUCHER, 1994).

A 7-hidroxycumarina, o principal metabólito da cumarina em humanos, é considerada um potente inibidor do crescimento tumoral, *in vitro* (COX; O'KENNEDY; THORNES, 1989). Em linhagens de células de adenocarcinoma pulmonar, causou um efeito inibitório direto na proliferação destas células (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 1998; ELINOS-BÁEZ; LEÓN; SANTOS, 2005) e induziu a suspensão do ciclo celular na fase G<sub>1</sub> (LÓPEZ-

GONZÁLEZ et al., 2004). Em células A-427, correspondente também a adenocarcinoma de pulmão, o mecanismo molecular, da atividade citostática, foi atribuído à ação da 7-hidroxicumarina em diminuir a porcentagem das células tumorais que expressam ciclina D1 (JIMÉNEZ-OROZCO et al., 2001).

Atribuiu-se também à 7-hidroxicumarina a capacidade de induzir, *in vitro*, a apoptose de células de adenocarcinoma pulmonar humano (LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2004), sendo a ativação da via apoptótica um mecanismo chave pelo qual as drogas citotóxicas matam as células tumorais (DEBATIN, 2004). Estudos realizados em animais demonstraram que a 7-hidroxicumarina tem atividade em carcinoma mamário, com efeitos inibitórios comparáveis aos do quimioterápico tamoxifeno (MAUCHER; VON ANGERER, 1994).

Em células de carcinoma renal (A-498) a 6-nitro-7-hidroxicumarina tem se mostrado importante agente seletivo e anti-proliferativo, capaz de induzir alterações no ciclo celular e possibilitar a morte da célula por apoptose (FINN; CREAVER; EGAN, 2004 c).

Reddy et al. (2005) sintetizaram uma série de cumarinas carboxiamidas e investigaram sua atividade citotóxica *in vitro* em células de carcinoma mamário. Os resultados mostraram que a cumarina 3-carboxiamida inibiu seletivamente as células tumorais que expressavam, em níveis elevados, o receptor do fator de crescimento epidérmico, a oncoproteína erbB2.

Um composto 5,7-diidroxycumarínico com um grupo fenil na posição 4 e um grupo prenil (3-metil-1-oxobutil) na posição 8, isolado dos frutos da planta *Calophyllum dispar* (Clusiaceae), exibiu significante atividade citotóxica, *in vitro*, em células de carcinoma de nasofaringe (KB) (GUILLET et al., 2001).

Finn, Creaven e Egan (2004 a) avaliaram o potencial das cumarinas como agentes capazes de prevenir a reincidência do melanoma, devido à capacidade destas substâncias em mobilizar o sistema imune. Resultados *in vitro* apontam que as nitro derivadas da 7-

hidroxicumarina (6-nitro-7-hidroxicumarina e 3,6,8-trinitro-7-hidroxicumarina) exibem efeitos anti-proliferativos em linhagens de células de melanona (SK-MEL-31).

A decursina, uma piranocumarina linear, demonstrou atividade citotóxica nas linhagens de células leucêmicas K562, U937 e TUR (KIM et al., 2005). Outra piranocumarina, porém angular (4'-*O*-acetil-3'-*O*-angeloil-*cis*-khellactone), extraída da raiz de uma planta medicinal da China, *Peucedanum praeruptorum*, apresentou efeito antileucêmico com capacidade de inibir o crescimento de células HL-60 e induzir a diferenciação das mesmas (ZHANG et al., 2003). Utilizando estas mesmas células tumorais, Wang et al. (2002) demonstraram o potencial antiproliferativo da esculetina por diminuição da fosforilação da proteína restinoblastoma (pRb) e redução dos níveis de CDK4 (enzima quinase dependente de ciclina).

A angiogênese associada aos tumores sólidos é um processo em que novos capilares são formados no estroma tumoral a partir de células endoteliais do hospedeiro; evidências experimentais demonstram que a angiogênese também contribui com o processo metastático (TARTA et al., 2000). A isocumarina sintética 2-(8-hidroxi-6-metoxi-1-oxo-1*H*-2-benzopiran-3-il) ácido propiônico (NM-3) foi considerada uma molécula antiangiogênica, induzindo a morte de células endoteliais, em concentrações baixas, por mecanismo não apoptótico; este estudo demonstrou que a NM-3 induz a geração de espécies reativas de oxigênio e inibe o crescimento das células tumorais; esses efeitos podem ser explicados, em parte, pela ativação do fator supressor de tumores p53 (YIN, et al., 2001). Segundo Salloum et al. (2000), a associação da isocumarina NM-3 à radioterapia em camundongos reduziu significativamente o tamanho do tumor e não foi observado aumento da toxicidade sistêmica ou local depois de realizado o tratamento.

Nam et al. (2002) observaram a atividade antiangiogênica da 4-senecioiloximetil-6,7-dimetioxicumarina em células endoteliais venosas de cordão umbilical humano (HUVEC).

Essa mesma atividade também foi descrita por Lee et al. (2006) para uma série de compostos 7-dietilamonicumarinas derivados.

O processo de crescimento tumoral, invasão e metástase envolve também a secreção de enzimas proteolíticas, entre as quais as serino proteases e as matrix metalloproteinasas (MMPs). A 3-bromofenil,6-acetoximetil-2-oxo-2*H*-1-benzopiran-3-carboxilada pode ser considerada uma alternativa de agente antitumoral, pois inibiu a atividade destas enzimas proteolíticas, tendo demonstrado atividade antiinvasiva em ensaios *in vitro* e atividade antitumoral em células humanas de fibrosarcoma e adenocarcinoma de mama injetadas em camundongos (KEMPEN et al., 2003).

A dafnetina (7,8-di-hidroxycumarina) tem mostrado ser um agente antiproliferativo em células de carcinoma renal humano (A-498) (FINN et al., 2002; FINN; CREAVER; EGAN, 2004 b) e células de hepatoma humano (HepG2) por inibir as proteína quinases (YANG et al., 1999). Liu et al. (2001) também comprovaram os efeitos antiproliferativos da escopoletina (6-metoxi,7-hidroxycumarina) em células de adenocarcinoma de próstata (PC<sub>3</sub>). Manuele et al. (2006) concluíram que a última pode ser um potente composto antitumoral, pois exibiu efeito citotóxico e citostático em linfomas de células T e induziu a profiferação de linfócitos T normais.

Uma cumarina prenilada, a 4-hidroxycumarina ferulenol, pode representar um novo produto natural capaz de atuar na estabilização de microtúbulos, tendo demonstrado efeito citotóxico *in vitro* em várias linhagens de células tumorais humanas: adenocarcinoma de mama (MCF-7), de cólon (Caco-2), de ovário (SK-OV-3) e células leucêmicas (HL-60) (BOCCA et al., 2002).

Madari et al. (2003) demonstraram que a cumarina dicumarol, usada como anticoagulante, apresenta capacidade de estabilizar os microtúbulos. Suas pesquisas demonstraram inibição da divisão celular em embriões de ouriços marinhos. O dicumarol

também inibiu o crescimento de células de tumor pancreático por indução de estresse oxidativo (LEWIS et al., 2004).

Velasco-Velázquez et al. (2003) determinaram os efeitos da 4-hidroxicumarina em células de melanoma (B16-F10) e observaram que esta cumarina causa desorganização da actina no citoesqueleto, diminuindo a adesão das células com a matriz extra celular e também a adesão entre as células.

As cumarinas possuem capacidade de formar complexos com íons metálicos (KOSTOVA et al., 2001). Alguns trabalhos têm investigado a atividade citotóxica de biscumarinas complexadas com metais como o lantânio, o cério, o zircônio e o neodímio, em células de leucemia mielóide aguda e crônica, e todos os compostos foram considerados biologicamente ativos, inibindo a proliferação das células tumorais (KOSTOVA; MANOLOV; MOMEKOV, 2004; KOSTOVA et al., 2005 b; KOSTOVA et al., 2005 c; KOSTOVA; MOMEKOV, 2006).

## **2.2 Considerações sobre as infecções fúngicas**

Ao longo dos últimos dez anos, a incidência de infecções fúngicas tem aumentado, apresentando-se principalmente como infecções nosocomiais, devido ao advento das terapias antibióticas e imunossupressoras, acometendo indivíduos com o sistema imunológico comprometido, em consequência de infecção pelo vírus HIV, transplantes, hemodiálise ou tratamentos oncológicos (ESPINEL-INGROFF, 1996; TORTORA et al., 2005). Estudos mostram que o aumento de infecções fúngicas não abrange apenas as unidades de transplantes e centros oncológicos, mas também unidades clínicas e cirúrgicas, correspondendo a 43% dos casos (FERNANDES, 2004).

Em países desenvolvidos, 10% das infecções nosocomiais são causadas por fungos; o gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente

hospitalar e constitui causa relevante de infecções disseminadas. Nos EUA, este gênero é o 4º maior causador deste tipo de infecção (PFALLER et al., 1998). No Brasil, o gênero *Candida* ocupa o terceiro lugar na lista dos responsáveis pelas infecções hospitalares (LAPCHIK, 2004).

O espectro das candidíases é bastante extenso, desde colonização das mucosas, até quadros sistêmicos (SIDRIM; ROCHA, 2004), o que depende, em grande parte, das condições e susceptibilidade do paciente (NUCCI; COLOMBO, 2002). A mortalidade geral causada pelas fungemias por *Candida* spp. é da ordem de 40 a 60% (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Uma pesquisa realizada em hospitais da América Latina, em isolados de hemoculturas, revelou que das espécies de *Candida* isoladas, *C. albicans* aparece com maior frequência (42%), porém o surgimento de episódios de candidemia por espécies não-*albicans* também é preocupante (GODOY et al., 2003).

A colonização e infecção por *C. albicans* é freqüente em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, recebendo radioterapia (REDDING, 1999) bem como, em pacientes com AIDS, onde as infecções oportunistas ocorrem em 80 a 95% dos casos. Estudos realizados em seis centros universitários brasileiros apontaram a prevalência da espécie *C. albicans* (91%) em isolados de cavidade oral de pacientes com AIDS (SANT'ANA et al., 2002). É importante ainda considerar, a candidíase vulvovaginal, uma vez que esta é a infecção do trato genital mais prevalente em pacientes do sexo feminino imunocompetentes não hospitalizadas (RIBEIRO et al., 2000).

As infecções por fungos filamentosos invasores ocorrem, quase exclusivamente, em pacientes imunodeprimidos. A aspergilose invasiva representa 75% das infecções por fungos filamentosos invasores em pacientes com doenças hematológicas e 85% nas micoses invasivas em transplantes de medula óssea (TELLES, 2004). O gênero *Aspergillus* tem

distribuição ubíqua na natureza, podendo ser encontrado no ar, no solo, em plantas, em superfícies inertes e em alimentos. As espécies de maior relevância clínica são *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA, 2004). A porta de entrada destas infecções é a inalação de propágulos infectantes com colonização de vias aéreas superiores do hospedeiro, que podem progredir até as vias aéreas inferiores, instalando-se ao nível de alvéolos e desencadeando foco infeccioso pulmonar (TELLES, 2004).

Os fungos do gênero *Fusarium* são encontrados como sapróbios no solo, água e plantas, podendo, neste último ser considerados como fitopatógenos. Em humanos a apresentação clínica da fusariose é inespecífica, podendo ser observada desde acometimentos superficiais (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA, 2004), ceratomicoses (VARGAS; PILTZ; ALVES, 2004), até doenças angioinvasivas (TELLES, 2004). A via de entrada é incerta, podendo ser através das vias respiratórias e posteriormente disseminar-se pela corrente sanguínea, ou através de cateteres (GODOY; COLOMBO, 2004). As espécies mais envolvidas em infecções são *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. moniliforme* (SIDRIM; CORDEIRO; ROCHA, 2004).

Em função do sucesso da profilaxia e tratamento de doenças virais e bacterianas, observa-se a emergência das infecções fúngicas como causa de mortalidade relacionada à infecção nos transplantados de órgãos (MONTEJO, 2002). As infecções mais documentadas no período pós-transplante (recente) incluem quadros de candidíase, particularmente candidíase oral, esofágica e candidúria. Na etapa intermediária ocorrem maiores riscos de infecções fúngicas oportunistas, predominando quadros de aspergilose e mucormicose (COLOMBO; SILVA, 2005).

A epidemiologia de infecções fúngicas em pacientes que receberam transplante de medula óssea tem mudado na última década. Com a introdução do tratamento profilático com triazóis reduziu o número de infecções por espécies de *Candida* e aumentou a incidência de

aspergilose invasiva e outras infecções, entre as quais, a fusariose, que se apresenta em aproximadamente 6,18 casos em 1000 pacientes transplantados no Brasil, e 5,89 casos em 1000 pacientes transplantados nos EUA (OLIVEIRA et al., 2002; NUCCI et al., 2004).

No que se refere ao tratamento das infecções fúngicas, diversas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de descrever os mecanismos de resistência dos fungos às drogas, o que vem se tornando um problema emergente (COLOMBO et al., 2003; FERREIRA et al., 2004; GOLDMAN et al., 2004; FERREIRA et al., 2005).

### **2.3 Considerações sobre neoplasias**

O câncer, atualmente, é considerado uma doença relativamente comum no mundo, atingindo cerca de 20 milhões de pessoas e já assumiu, em alguns países, a principal causa de óbito na população (WÜNSCH; MONCAU, 2002).

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 e para a maioria dos tumores, a progressão é consequência de vários circuitos regulatórios alterados (COMPAGNI; CHRISTOFORI, 2000).

A busca de novas moléculas com atividade antitumoral a partir de produtos naturais tem se tornado um campo promissor (CORDELL, 2000; MANS; ROCHA; SCHWARTSMANN, 2000). A utilização das plantas no tratamento do câncer iniciou-se com a medicina popular a mais de 3.500 anos, porém, se intensificou na década de 1950 com o descobrimento e desenvolvimento dos alcalóides da vinca (CRAGG; NEWMAN, 2005) e com avaliações do potencial antiproliferativo dos extratos brutos de plantas. Desde então, mais de 120.000 extratos já foram testados. Alguns destes provaram ser clinicamente úteis, outros serviram como ferramentas para descobertas dos mecanismos bioquímicos envolvidos

no crescimento e regulamento de tumores (MANS; ROCHA; SCHWARTSMANN, 2000; CHEN et al., 2006).

Desde o ano de 1950 o *National Cancer Institute* - NCI dos EUA tem dedicado extensivos recursos para a descoberta e desenvolvimento de terapias clínicas e pré-clínicas para o tratamento do câncer (TAKIMOTO, 2003).

Cragg, Newman e Snader (1997) relataram que, em um estudo publicado pelo NCI, 39% dos 520 novos medicamentos aprovados pelo FDA, entre 1983 e 1994, eram produtos naturais ou derivados desses. E aproximadamente 60% de todas as drogas antitumorais disponíveis comercialmente ou que se encontravam nos últimos estágios de avaliação clínica, tinham origem natural (GRAGG; NEWMAN, 2000).

Encontra-se, com sede no Brasil, o Escritório Sul Americano para Desenvolvimento de Drogas Anti-Câncer - SOAD, que opera em colaboração com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, com a Organização Européia para Pesquisa e Tratamento do Câncer - EORTC e com a Companhia Britânica de Pesquisa do Câncer - CRC; implementando um amplo programa de coleção e pesquisas anti-câncer com espécies de plantas sul americanas (MANS; ROCHA; SCHWARTSMANN, 2000).

Considerando o amplo espectro de atividade das cumarinas, já foi realizada no Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Santa Catarina a atividade antibacteriana de compostos cumarínicos naturais e semi-sintéticos (SOUZA et al., 2005). Com o intuito de contribuir na ampliação do conhecimento de suas propriedades biológicas foram avaliadas neste trabalho as atividades antifúngica, citotóxica (para células tumorais humanas) e hemolítica destes mesmos compostos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Estudar a atividade antifúngica, citotóxica (para células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade antifúngica através da determinação das concentrações inibitórias mínimas - CIM pelo método de microdiluição em caldo;

- Correlacionar os substituintes do anel básico cumarínico com a atividade antifúngica;

- Comparar a atividade antifúngica das cumarinas entre os fungos filamentosos e leveduriformes;

- Avaliar a atividade citotóxica das cumarinas em células tumorais humanas (Caco-2, HEp-2 e HCT-8), através da determinação da viabilidade celular, usando o ensaio colorimétrico com o sal de tetrazolium;

- Comparar a atividade citotóxica das cumarinas nas diferentes linhagens de células tumorais humanas;

- Correlacionar os substituintes do anel básico cumarínico com a atividade citotóxica;

- Avaliar a atividade hemolítica das cumarinas em estudo.

- Comparar a atividade hemolítica entre as cumarinas testadas e correlacionar com os substituintes do anel básico.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Cumarinas**

#### **4.1.1 Origem das cumarinas**

Os derivados cumarínicos foram fornecidos pelo Professor Franco Delle Monache do *Instituto di Chimica, Università Cattolica Del Sacro Cuore* (Roma-Itália).

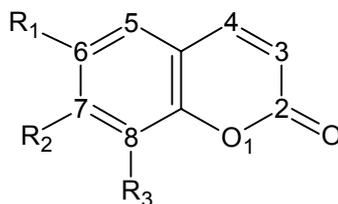
Estas substâncias foram obtidas principalmente por fito-extração, modificações químicas (Di-metoxi-esculetina e Di-metoxi-dafnetina são derivados metilados da esculetina e dafnetina, respectivamente) e por aquisição comercial (herniarina e fraxetina foram adquiridas comercialmente da Sarsynthese Co., Genay, França e a esculetina adquirida da Fluka, Buchs, Suíça).

As estruturas dos derivados cumarínicos foram elucidadas por comparação de seus dados espectroscópicos com a literatura.

Na Tabela 2 estão representadas as origens dos derivados cumarínicos. As estruturas químicas destes compostos, seus pesos moleculares e o valor de seus log P (parâmetro usado como medida quantitativa da lipofilicidade) estão apresentados nas Tabelas 3 (cumarinas simples) e 4 (derivados cumarínicos complexos).

**Tabela 2** - Origem de 40 cumarinas incluídas no estudo das atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica

Cumarinas	Referências
Aurapteno	DELLE-MONACHE et al., 1995.
Bergapteno	COMPAGNONE; RODRIGUES; DELLE-MONACHE, 1993
3 $\alpha,\alpha$ -Dimetil-Xantiletina	DELLE-MONACHE et al., 1976.
Hortilina	DELLE-MONACHE et al., 1976.
3 $\alpha,\alpha$ -Dimetil-Psoraleno	DELLE-MONACHE et al., 1976.
Isoangenomalina	DELLE-MONACHE et al., 1977.
Marmesina	DELLE-MONACHE et al., 1989.
Oroselona	MURRAY, 1978.
Febalosina	CUCA-SUAREZ; DELLE-MONACHE, 1991.
Escopoletina	TORRES et al., 1979.
Xantiletina	DELLE-MONACHE et al., 1976.
Xantotoxina	COMPAGNONE; RODRIGUES; DELLE-MONACHE, 1993.
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.
Herniarin (7-Metoxi-cumarina)	Sarsynthese.
7-O-Geranyl-Esculetina (6-Metoxi-7-geraniloxi-cumarina)	TORRES et al., 1979.
Ostenol	CUCA-SUAREZ; MARTINEZ; DELLE-MONACHE, 1998.
Aloxantoxiletina	CUCA-SUAREZ; MENICHINI; DELLE-MONACHE, 2002.
Imperatorina	TRANI et al., 1997.
Isopimpineline	TRANI et al., 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 (informação verbal).

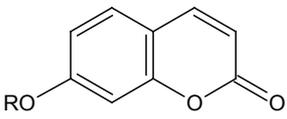
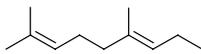
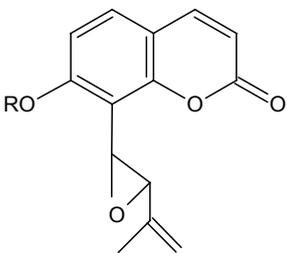
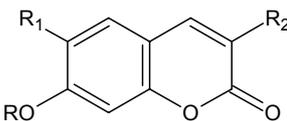
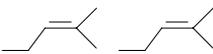
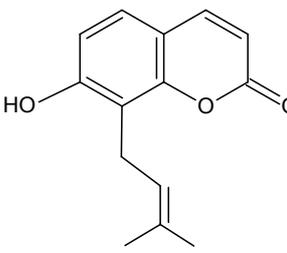
**Tabela 3** - Derivados cumarínicos simples

Cumarinas simples	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	PM*	log P
<b>MONOSSUBSTITUÍDAS</b>					
(1) Cumarina	H	H	H	146,1	1,49
(2) 6-Metilcumarina	CH <sub>3</sub>	H	H	160,2	1,95
(3) 6-Hidroxycumarina	OH	H	H	162,1	1,20
(4) 6-O-Acetilcumarina	O-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O	H	H	204,2	0,98
(5) 6-Metoxicumarina	O-CH <sub>3</sub>	H	H	176,2	1,23
(6) 6-Clorocumarina	Cl	H	H	180,6	2,00
(7) 6-Iodocumarina	I	H	H	272,0	2,74
(8) 6-Aminocumarina	NH <sub>2</sub>	H	H	161,1	0,70
(9) 6-Carboxycumarina	COOH	H	H	190,1	1,18
(10) 6-Cianocumarina	CN	H	H	171,1	1,52
(11) 6-Aldeidocumarina	CHO	H	H	174,1	1,16
(12) 6-Nitrocumarina	NO <sub>2</sub>	H	H	191,1	-0,49
(13) 7-Metoxicumarina (Herniarina)	H	O-CH <sub>3</sub>	H	176,2	1,23
(14) 7-Metilcumarina	H	CH <sub>3</sub>	H	160,2	1,95
(15) 7-O-Acetilcumarina	H	O-C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O	H	204,2	0,98
(16) 7-Clorocumarina	H	Cl	H	180,6	2,00
(17) 7-Nitrocumarina	H	NO <sub>2</sub>	H	191,1	-0,49
<b>DISSUBSTITUÍDAS</b>					
(18) 6-Metoxi, 7-Hidroxycumarina (Escopoletina)	O-CH <sub>3</sub>	OH	H	192,2	0,95
(19) 6,7 di-hidroxycumarina (Esculetina)	OH	OH	H	178,1	0,92
(20) 6,7-Di-Metoxi-Cumarina (Di-Metoxi-Esculetina)	O-CH <sub>3</sub>	O-CH <sub>3</sub>	H	206,2	0,98
(21) 7,8-Di-Metoxi-Cumarina (Di-Metoxi-Dafnetina)	H	O-CH <sub>3</sub>	O-CH <sub>3</sub>	206,2	0,98
<b>TRISSUBSTITUÍDA</b>					
(22) 6-Metoxi-7,8 Di-Hidroxycumarina (Fraxetina)	O-CH <sub>3</sub>	OH	OH	208,2	0,66

\* Resultados expressos em g/mol.

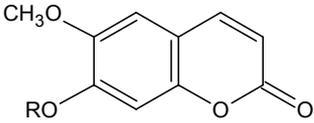
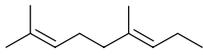
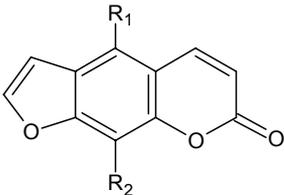
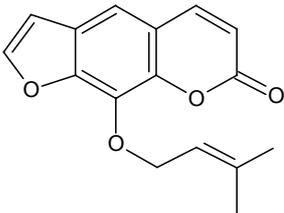
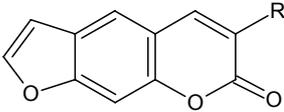
Tabela 4 - Derivados cumarínicos complexos

(Continua)

Cumarinas Preniladas	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PM*	log P
					
(23) Aurapteno				298,4	3,96
					
(24) Febalosina	CH <sub>3</sub>			258,3	1,83
					
(25) Balsamiferona	H			298,4	4,30
					
(26) Ostenol				230,2	2,75

**Tabela 4 - Derivados cumarínicos complexos**

(Continua)

Cumarinas Preniladas	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PM*	log P	
						
(27) 7-O-Geranyl-Esculetina				328,4	2,70	
Furanocumarinas Lineares	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PM*	log P	
						
(28) Bergapteno			O-CH <sub>3</sub>	H	200,2	1,18
(29) Xantotoxina			H	O-CH <sub>3</sub>	200,2	1,18
(30) Isopimpineline			O-CH <sub>3</sub>	O-CH <sub>3</sub>	230,2	0,93
						
(31) Imperatorina					270,3	2,43
						
(32) 3 $\alpha$ , $\alpha$ Di-Metil-Psoraleno				254,3	3,24	

**Tabela 4 - Derivados cumarínicos complexos**

(Continua)

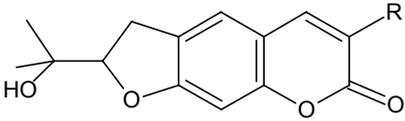
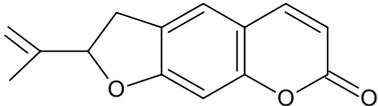
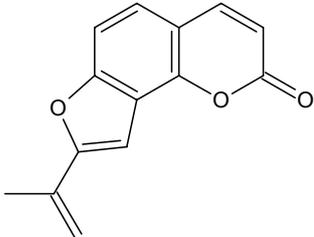
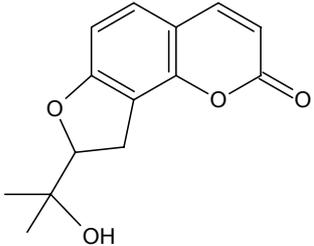
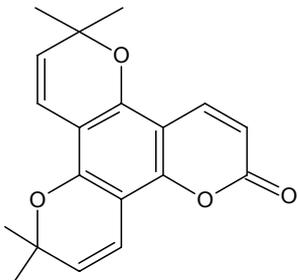
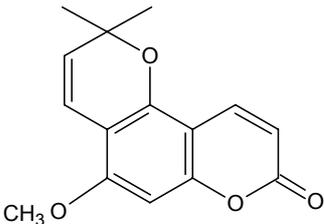
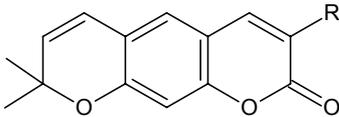
Furanocumarinas Lineares	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PM*	log P
	H			246,2	0,84
(33) Marmesina					
				228,2	2,18
(34) Isoangelomalina					
Furanocumarinas Angulares	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PM*	log P
				226,2	1,85
(35) Oroselone					
				246,2	1,16
(36) Columbianetina					

Tabela 4 - Derivados cumarínicos complexos

(Conclusão)

Piranocumarinas	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	PM*	log P
				310,3	2,49
(37) Hortilina					
				258,3	1,73
(38) Aloxantoxiletina					
				228,3	1,99
(39) Xantiletina	H				
(40) 3 $\alpha$ , $\alpha$ Di-Metil-Xantiletina				296,4	3,79

\* Resultados expressos em g/mol.

## 4.2 Avaliação da atividade antifúngica

Os testes antifúngicos foram realizados segundo a metodologia proposta pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS, EUA.

Para os testes com fungos filamentosos seguiu-se a norma M38-A: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos (Norma Aprovada) (NCCLS, 2002 a).

Para os testes com fungos leveduriformes seguiu-se a norma M27-A2: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (Norma Aprovada) (NCCLS, 2002 b).

### 4.2.1 Fungos

Os experimentos foram realizados com as seguintes espécies: *Candida albicans* ATCC 14053, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 e *Fusarium solani* ATCC 36031, cedidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

### 4.2.2 Meios de cultura e reagentes

**Meios de cultura:** O meio de cultura utilizado para o cultivo dos fungos filamentosos e leveduriformes foi o ágar batata-dextrose (Oxoid); para a avaliação da atividade antifúngica foi utilizado o meio RPMI-1640, pH 7, com glutamina, sem bicarbonato e com indicador de pH vermelho de fenol (Cultilab). O ágar sangue foi utilizado para verificação da pureza das culturas fúngicas (NCCLS, 2002 a; NCCLS, 2002 b).

**Tampão:** Foi utilizado o tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico) (Fischer Scientific), na concentração final de 0,165 mol/l para obtenção de pH 7 (NCCLS, 2002 a; NCCLS, 2002 b).

### **4.2.3 Preparo da solução estoque do meio RPMI-1640**

Foi solubilizada a quantidade exata de 10,4 g do meio de RPMI-1640 em 900 ml de água destilada, acrescentando-se o tampão MOPS (0,165mol/l) e, posteriormente, foi ajustado o pH para 7,0 a 25°C, usando-se hidróxido de sódio 1 mol/l. Foi acrescentado água destilada para obtenção do volume final de 1 l. O meio foi filtrado em condições assépticas utilizando-se filtro (Millipore) de 0,22 µm. Em seguida, o meio foi mantido sob refrigeração a 4°C e protegido da luz até seu uso (NCCLS, 2002 a; NCCLS, 2002 b).

### **4.2.4 Dissolução e Diluição das cumarinas**

Foram pesadas 2000 µg de cada cumarina e dissolvidas em frascos estéreis com dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck), na concentração final de 1%; os volumes foram completados com meio RPMI 1640; e a concentração final de cada solução foi de 2000 µg/ml, a qual foi diluída 1:1 quando colocadas na placa de 96 cavidades (Kartell), iniciando os testes na concentração de 1000 µg/ml.

### **4.2.5 Preparo do inóculo**

#### **4.2.5.1 Inóculo dos fungos filamentosos**

Para induzir a formação de conídios e esporangiosporos, os fungos filamentosos foram cultivados em ágar batata dextrose durante sete dias a 35°C (a espécie *Fusarium solani* foi incubada durante 48 a 72 h a 35°C, e depois, até o sétimo dia, à temperatura de 25 - 28°C). Após sete dias foi adicionado sobre as colônias aproximadamente 1mL de solução salina 0,85% estéril, agitando-se delicadamente para preparar uma suspensão. Essa mistura de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo de ensaio estéril. Após três a quatro minutos, quando as partículas mais pesadas se depositaram no fundo, a suspensão homogênea superior foi transferida para um tubo estéril com tampa e homogeneizada em vórtex por 15 segundos. A densidade óptica das suspensões foi lida em espectrofotômetro

(comprimento de onda de 530 nm) e ajustada com solução salina estéril 0,85%, para obtenção de absorbância entre 0,09 a 0,11 para *Aspergillus fumigatus* e entre 0,15 a 0,17 para *Fusarium solani*. Posteriormente essas suspensões foram diluídas 1:50 em meio RPMI, o que corresponde a duas vezes a densidade necessária de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/ml (unidades formadoras de colônia por ml).

O ajuste final foi obtido no momento da distribuição deste inóculo (100  $\mu$ l) aos diferentes orifícios da placa de 96 cavidades, contendo o volume de 100  $\mu$ l do meio de RPMI 1640 tamponado (COLOMBO; ALVES, 2004).

#### 4.2.5.2 Inóculo dos fungos leveduriformes

*Candida albicans* foi cultivada em ágar batata dextrose por 24 h a 35°C, com realização do teste de pureza em meio ágar sangue, após as primeiras 8 h de incubação. O inóculo foi preparado diluindo-se cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm em 5 ml de solução salina estéril 0,85%, agitando-se em vórtex por 15 segundos e ajustando-se a densidade celular em espectrofotômetro (comprimento de onda 530 nm), para se obter a absorbância equivalente à solução-padrão da escala 0,5 de McFarland em meio RPMI-1640; obteve-se um inóculo concentrado duas vezes ( $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC/ml), que foi diluído 1:1 quando inoculado na placa de 96 cavidades, chegando-se à concentração final desejada de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml (NCCLS, 2002 b).

#### 4.2.6 Controles positivos

Foi utilizado como controle positivo para os testes com fungos filamentosos a anfotericina B (Cristália), e para os testes com *C. albicans* o fluconazol.

Estes fármacos foram dissolvidos em DMSO (concentração final 1%) e diluídas em RPMI-1640, resultando em uma concentração final de 2000  $\mu$ g/ml (diluída 1:1, quando colocadas na placa de 96 cavidades, iniciando os testes na concentração de 1000  $\mu$ g/ml)

#### 4.2.7 Determinação da concentração inibitória mínima

A atividade antifúngica foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo. As soluções de cumarinas previamente diluídas foram distribuídas no volume de 100 µl nos primeiros orifícios da placa de 96 cavidades, posteriormente realizou-se diluições seriadas com o meio de RPMI-1640, para obtenção de concentrações que variaram de 1000 µg/ml a 15,6 µg/ml.

A seguir era adicionado 100 µl da suspensão do inóculo em cada orifício (nesta etapa ocorre a diluição 1:1 do inóculo e da concentração das cumarinas). Os poços de controle do crescimento foram inoculados com 100 µl do meio de RPMI-1640 adicionados do inóculo fúngico, sem a presença das substâncias testes.

Para o controle de esterilidade foi utilizada a última diluição da cumarina, sem a adição do inóculo fúngico. Os fármacos controle foram diluídos (diluição seriada) partindo da concentração 1000 µg/ml até 0,00047 µg/ml.

As placas contendo fungos filamentosos foram incubadas a 35°C por 46 a 50 h. As placas com testes para *C. albicans* foram incubadas a 35°C por 24 h. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A leitura da menor concentração da substância que inibia o crescimento fúngico foi detectada visualmente, comparando-se com o controle de crescimento, recebendo um escore numérico da seguinte forma: 4= nenhuma redução do crescimento; 3= ligeira redução do crescimento (aproximadamente 75%); 2= redução proeminente do crescimento (aproximadamente 50%); 1= ligeiro crescimento ou aproximadamente 25%; 0= opticamente claro ou ausência de crescimento.

Foi considerada a concentração inibitória mínima - CIM para os testes realizados a concentração que obteve escore zero; isto é, ausência de crescimento.

A leitura da CIM dos controles positivos foi realizada seguindo as normas do NCCLS: para a anfotericina B a CIM é a menor concentração da droga que impedir qualquer crescimento fúngico (escore zero) e para o fluconazol é a concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico (escore 2) (NCCLS, 2002 a; NCCLS, 2002 b).

### 4.3 Avaliação da atividade citotóxica

#### 4.3.1 Células

Foram utilizadas as células: Caco-2 (ATCC: HTB-37, de adenocarcinoma colo retal humano); HCT-8 (ATCC: CCL-244, de adenocarcinoma ileocecal humano) e HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana, adquirida do Banco de células da UFRJ). Todas as células foram utilizadas antes da 20<sup>a</sup> passagem.

#### 4.3.2 Meios de cultura e reagentes

**Meios de cultura:** o meio utilizado para manutenção e crescimento das células Caco-2 e HEp-2 foi o Meio MEM (*Minimal Essential Medium*) (Cultilab), adicionado de 2,2 g de bicarbonato de sódio (5,6%) por litro de meio pH 7,2 a 7,4.

Para manutenção e crescimento das células HCT-8 foi utilizado o meio RPMI-1640 (Cultilab) com piruvato de sódio (1 mM) (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003).

**Soro Fetal Bovino - SFB:** foi adicionado aos respectivos meios de cultura 10% de SFB (Cultilab) para promoção do crescimento e 5 % para manutenção da linhagem celular

**Antibióticos e antifúngico:** Uma solução de antibióticos e um antifúngico (Cultilab: 10.000 U de penicilina, 10.000 µg de estreptomicina, 25 µg de anfotericina B) foi adicionada aos meios de cultura correspondentes, na proporção de 1%.

**Tripsina:** essa enzima proteolítica (tripsina de pâncreas de porco 1:250 (Sigma) preparada em solução de EDTA a 0,25% ) foi o agente de dispersão celular.

### 4.3.3 Preparação das soluções-estoque das cumarinas

As cumarinas foram pesadas e dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck) na concentração final de 1%, as soluções foram mantidas sob refrigeração a 4°C e protegidas da luz até o uso; quando foram dissolvidas em meio de cultura nas concentrações desejadas.

### 4.3.4 Controles positivos

Foram utilizados como controles positivos os seguintes fármacos antineoplásicos: cloridrato de doxorubicina (Meizler), cloridrato de daunorubicina (Meizler) e paclitaxel (Zodiac).

### 4.3.5 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

No ensaio do MTT, o sal de tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazana, de coloração roxo-azulado, insolúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular, sendo posteriormente solubilizado e quantificado colorimetricamente, através de espectrofotometria, sendo o valor da absorbância proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

**Procedimento:** As células HEP-2, Caco-2 e HCT-8 foram cultivadas em placas de 96 cavidades (TPP) (100 µl por cavidade) nas seguintes densidades celulares:  $2,0 \times 10^5$ ;  $6,0 \times 10^5$  e  $6,0 \times 10^5$  células/ml respectivamente, até confluência (24 h), nos meios de culturas adequados. Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 200 µl das

soluções de cumarinas diluídas na razão de 1:2, a partir da concentração de 500 µg/ml até a concentração 7,8 µg/ml.

Paralelamente, foram realizados controles celulares (200 µl de meio/cavidade) e um branco (100 µl de DMSO/cavidade). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C e 5%CO<sub>2</sub> por 72 h. Posteriormente, foi aspirado todo o meio e adicionaram-se 50 µl da solução de MTT (Sigma) a 1 mg/ml em meio de cultura, e as placas foram incubadas por mais 4 h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado cuidadosamente o meio contendo MTT de cada cavidade, e adicionaram-se 100 µl de DMSO/cavidade com a finalidade de solubilizar os sais de formazana. A placa foi agitada, levemente, a temperatura ambiente, por 10 minutos, para solubilização de toda formazana e a absorbância foi medida a 540 nm num espectrofotômetro (Bio-Tek®, Elx 800) (MOSMANN, 1983; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003).

Os valores da absorbância medidos para cada concentração de cada material teste (DO amostra) foram transformados em porcentagem (x%) em relação ao controle celular (DO controle celular), o qual é considerado 100% viável, através da seguinte fórmula:

$$X\% = \frac{\text{DO (amostra)} \times 100}{\text{DO (controle celular)}}$$

Em seguida, foram calculados os valores de CC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC<sub>50</sub> calculados representam à média de dois experimentos independentes ± erro padrão da média e com intervalo de confiança de 95% .

#### **4.4 Avaliação da atividade hemolítica**

O ensaio de atividade hemolítica foi desenvolvido segundo metodologia descrita por Hubert, Cooper e Roch (1997) e Shin et al. (2001), utilizando-se eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “O” Rh positivo.

##### **4.4.1 Reagentes**

Foi utilizado para este ensaio o tampão salina fosfato (PBS) (pH 7,2-7,4), água Mili Q e o anticoagulante heparina.

##### **4.4.2 Dissolução e Diluição das cumarinas**

As cumarinas foram pesadas e então dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1%, os volumes completados com água Mili Q. Posteriormente, foram diluídas seriadamente, em concentrações variando de 1000 µg/ml a 15,6 µg/ml.

##### **4.4.3 Ensaio hemolítico**

O sangue foi coletado em heparina e centrifugado para obter a fração correspondente aos eritrócitos. Os eritrócitos foram, então, lavados três vezes em PBS por centrifugação (1000 g/5 min, a temperatura ambiente). Posteriormente foi realizada a diluição para a obtenção da concentração de 4%.

Volumes de 200 µl da solução de eritrócitos + 160 µl de PBS + 40 µl das diferentes diluições das amostras de cumarina, foram incubados a 37°C por 1 h e então centrifugados a 1000 g/5 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante (100 µl) foi retirado, cuidadosamente, e colocado em placa de 96 cavidades. A lise celular foi determinada pela medida da concentração de hemoglobina livre. A leitura realizada em espectrofotômetro (Bio-Tek®, Elx

800), comprimento de onda de 540 nm, e o grau de hemólise determinado de acordo com a equação:

$$\% \text{ hemólise} = 100 \times \frac{\text{Absorbância (teste)} - \text{Absorbância (controle negativo)}}{\text{Absorbância (controle positivo)} - \text{Absorbância (controle negativo)}}$$

Onde, o controle positivo representa 100% de hemólise, preparado com 200 µl da solução de eritrócitos + 200 µl de água Mili Q; o controle negativo preparado com 200 µl da solução de eritrócitos + 160 µl do tampão PBS + 40 µl de água Mili Q com 1% de DMSO. Os controles foram também incubados a 37°C por 1 h e, posteriormente, centrifugados a 1000 g/5 min, a temperatura ambiente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da atividade antifúngica

Com o aumento na incidência das infecções fúngicas sistêmicas e o número crescente de agentes antifúngicos, aumentou também o interesse em métodos laboratoriais para orientar a seleção da terapia antifúngica. O Comitê da Área de Microbiologia do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS estabeleceu o subcomitê para testes de Sensibilidade a Agentes Antifúngicos e publicou as normas M38-A e M27-A2 que são métodos de referência para testar a suscetibilidade de fungos filamentosos e leveduriformes respectivamente, que causam infecções fúngicas invasivas (NCCLS, 2002 a; NCCLS, 2002 b).

Os testes antifúngicos realizados neste trabalho seguiram essa metodologia proposta pelo NCCLS, conforme descrito no item 4.2. Os resultados das atividades antifúngicas, representados pela concentração inibitória mínima (CIM), serão apresentados e discutidos posteriormente e foram expressos na unidade milimolar (mM). Os resultados expressos em  $\mu\text{g/ml}$  foram acrescentados entre parênteses nas tabelas com o objetivo de facilitar a compreensão na correlação com os dados da literatura, também expressos em  $\mu\text{g/ml}$ . De acordo com Stein et al. (2006), compostos com valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) superiores a 250  $\mu\text{g/ml}$  não apresentam atividade antifúngica.

Foram utilizados como controles positivos os seguintes fármacos antifúngicos: a anfotericina B para os fungos filamentosos e o fluconazol para fungos leveduriformes. Os resultados dos testes realizados para os controles, em comparação com os dados da literatura estão expressos na Tabela 5. Pôde-se observar que houve correlação entre os resultados dos antifúngicos utilizados como controles positivos com os dados encontrados na literatura.

**Tabela 5** - Concentrações inibitórias mínimas dos fármacos utilizados como controles positivos em relação aos dados da literatura

Fungos	Antifúngicos	MIC (mM)		Referências
		Teste	Literatura	
<i>C. albicans</i>	Fluconazol	0,00078	0,0008 - 0,032	NCCLC, 2002 b.
<i>A. fumigatus</i>	Anfotericina B	0,00051	0,0054 -0,0021	NCCLC, 2002 a.
<i>F. solani</i>	Anfotericina B	0,00097	0,001 - 0,0021	Espinel-Ingroff et al., 1997.

### 5.1.1 Atividade antifúngica das cumarinas simples monossubstituídas

Os resultados da atividade antifúngica estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das cumarinas simples monossubstituídas

Cumarinas monossubstituídas	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium solani</i>
(1) Cumarina	3,42* (500)**	6,84 (1000)	3,42 (500)
(2) 6-Metilcumarina	3,12 (500)	6,24 (1000)	3,12 (500)
(3) 6-Hidroxycumarina	3,08 (500)	> 6,16 (1000)	3,08 (500)
(4) 6-O-Acetilcumarina	2,44 (500)	2,44 (500)	4,89 (1000)
(5) 6-Metoxicumarina	2,83 (500)	> 5,67 (1000)	2,83 (500)
(6) 6-Clorocumarina	2,76 (500)	5,53 (1000)	2,76 (500)
(7) 6-Iodocumarina	1,83 (500)	3,67 (1000)	1,83 (500)
(8) 6-Aminocumarina	3,10 (500)	6,20 (1000)	6,20 (1000)
(9) 6-Carboxicumarina	5,25 (1000)	>5,25 (1000)	5,25 (1000)
(10) 6-Cianocumarina	2,92 (500)	5,84 (1000)	1,46 (250)
(11) 6-Aldeidocumarina	2,87 (500)	5,74 (1000)	1,43 (250)
(12) 6-Nitrocumarina	2,61 (500)	2,61 (500)	0,65 (125)
(13) 7-Metoxicumarina (Herniarina)	2,83 (500)	5,67 (1000)	5,67 (1000)
(14) 7-Metilcumarina	6,24 (1000)	6,24 (1000)	3,12 (500)
(15) 7-O-Acetilcumarina	1,22 (250)	2,44 (500)	1,22 (250)
(16) 7-Clorocumarina	2,76 (500)	5,53 (1000)	2,76 (500)
(17) 7-Nitrocumarina	1,33 (250)	1,33 (250)	1,33 (250)
Fluconazol	0,00078 (0,24)		
Anfotericina B		0,00051 (0,48)	0,00097 (0,90)

\* Resultados expressos em mM.

\*\* Resultados expressos em µg/ml.

Como pode ser observado a cumarina *per se* (composto 1), não exibiu atividade antifúngica para os fungos testados (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium solani*). Sardari et al. (1999) também observaram que a cumarina *per se* não é ativa frente a *C. albicans*, apresentando resultados superiores a 6,84 mM (1000 µg/ml), e Ojala et al. (2000) confirmaram que a cumarina *per se* não inibe o crescimento dos fungos *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*, na concentração de 500 µg/ml.

Stein et al. (2006) concluíram que as propriedades farmacológicas e bioquímicas de cumarinas simples podem depender do padrão de substituições no núcleo cumarínico. Neste trabalho observou-se que a inserção de grupos substituintes nas posições C<sub>6</sub> e C<sub>7</sub> modificou a atividade antifúngica; entretanto, não demonstrou ser muito significativa, visto que, os resultados da atividade antifúngica dos compostos cumarínicos testados, se comparados com os controles positivos, apresentaram-se pouco expressivos.

Para alguns compostos, os padrões de substituição não seguiram a mesma analogia, a inclusão do grupo metil (CH<sub>3</sub>) na posição C<sub>6</sub> (composto 2) não alterou a atividade em relação a cumarina *per se* (composto 1); este mesmo grupo adicionado a posição C<sub>7</sub> (composto 14) resultou em valores menos expressivos para *C. albicans* e permaneceu inalterado para *A. fumigatus* e *F. solani*. Com o grupo O-acetil (O-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O) ocorreu o oposto, na posição C<sub>7</sub> a 7-O-acetilcumarina (composto 15) mostrou-se mais ativa para *C. albicans* e *F. solani* do que seu análogo 6-O-acetilcumarina (composto 4) e para *A. fumigatus* não houve alteração dos resultados entre os compostos.

As cumarinas 6-clorocumairna (composto 6) e 7-clorocumarina (composto 16) não apresentaram nenhuma alteração na atividade antifúngica para as três espécies estudadas. O mesmo foi observado com a 6-metoxicumarina (composto 5) e a 7-metoxicumarina (composto 13) para *C. albicans*; já em relação aos fungos filamentosos a 7-metoxicumarina demonstrou CIM superiores para o *F. solani* e inferiores para o *A. fumigatus*.

A presença do substituinte halogênico iodo na posição C<sub>6</sub> (composto 7), conferiu maior atividade para as três espécies, se comparado com a cumarina *per se*. No entanto, estes não demonstraram ser resultados expressivos. O mesmo pôde ser observado com a 6-cianocumarina (composto 10) e a 6-aldeidocumarina (composto 11).

Além do padrão de substituição no núcleo, a polaridade e hidrofobicidade dos grupos inseridos poderiam representar um requisito para a atividade antifúngica entre as cumarinas monossubstituídas. No entanto, pode-se observar que para as cumarinas estudadas estas características não foram responsáveis pela atividade antifúngica, não ocorrendo variação considerável da atividade em decorrência das características dos grupos substituintes.

De acordo com Godoy et al. (2005) não se descarta a hipótese de que a atividade antifúngica, em alguns casos, pode ser espécie-específica. Isto pôde ser observado em estudos com diversas cumarinas, na concentração de 200 µg/ml, frente a: *Microsporum canis*, *A. flavus*, *F. solani*, *C. albicans* e *Candida glabrata*. Constatou-se que apenas a cumarina (4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il)-4-metilbenzenosulfonato foi ativa para *C. albicans*; nenhuma cumarina inibiu o crescimento da *C. glabrata* e a cumarina 4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-il-benzoato inibiu 80% do crescimento de *F. solani*, 90% do crescimento de *M. canis* e 37% de *A. flavus* (KHAN et al., 2004). Ojala et al. (2000) também observaram inatividade para *C. albicans* e *A. niger*; no entanto, as mesmas cumarinas inibiam expressivamente *Fusarium culmorum*, na concentração de 500 µg/ml.

Sardari et al. (1999) relacionaram a atividade antifúngica com a presença de um grupo hidroxila (OH) livre na posição C<sub>6</sub> e outros substituintes nas posições C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub>. Entretanto, no presente trabalho, pesquisou-se atividade antifúngica somente com 6-hidroxycumarina (composto 3) sem outros substituintes e observou-se que esta cumarina não apresentou atividades expressivas. Estes resultados confirmaram os obtidos por Jurd et al. (1971), onde, a 6-hidroxycumarina foi completamente inativa para todos os fungos testados (*Candida*

*tropicalis*, *S. cerevisiae*, *A. flavus*, *A. niger* e *Alternaria* spp.). No entanto, estes últimos autores observaram que a adição do grupo metoxi (OCH<sub>3</sub>), na posição C<sub>6</sub>, originando a 6-metoxicumarina conferiu atividade antifúngica, o que não foi constatado no presente estudo.

A 7-hidroxicumarina (umbeliferona) não foi utilizada para os testes deste estudo, portanto, não foi possível comparar com a atividade da 6-hidroxicumarina. Porém, relatos prévios mostram que esta cumarina também não exerce inibição do crescimento fúngico, não apresentando atividade para *C. albicans*, *A. niger* e *S. cerevisiae*, em concentrações de 500 µg/ml (SARDARI et al., 1999; OJALA et al., 2000). Também, segundo Jurd, King e Mihara (1971) a umbeliferona não foi ativa frente diversas espécies de *Saccharomyces* e *Aspergillus*. Estes mesmos autores verificaram que a substituição por um grupo metoxi, dando origem a 7-metoxicumarina, conhecida por herniarina, inibiu o crescimento de espécies de *Aspergillus*.

No presente trabalho a 7-metoxicumarina (composto 13), não foi ativa para os fungos testados o que corrobora com os estudos de Ojala et al. (2000), que não observaram atividade antifúngica da herniarina para *C. albicans* e *A. niger* e, com Ngwendson et al. (2003) que consideraram esta cumarina inativa frente *C. albicans* e *A. fumigatus*.

Entre as cumarinas monossubstituídas a 6-nitrocumarina (composto 12) apresentou atividade antifúngica mais expressiva, porém apenas para *F. solani*, com CIM de 0,65 mM (125 µg/ml). Este mesmo grupo substituinte na posição C<sub>7</sub>, (7-nitrocumarina) (composto 17), evidenciou uma reduzida atividade para as três espécies estudadas com CIMs de 1,33 mM (250 µg/ml). Todavia, não foram encontrados trabalhos relacionando a atividade antifúngica de cumarinas com o grupo substituinte NO<sub>2</sub>.

Para *C. albicans* e *F. solani* a atividade antifúngica mais expressiva foi observada pela 7-O-acetilcumarina (composto 15) (1,22 mM = 250 µg/ml). Estes achados são similares aos de Jurd, King e Mihara (1971) os quais constataram a atividade antifúngica desta cumarina frente *C. tropicalis*, *A. niger* e *A. flavus*; atribuíram a atividade antifúngica à alquilação do

anel cumarínico. Entretanto a 6-O-acetilcumarina (composto 4) não demonstrou ser ativa para as espécies de fungos estudadas.

### 5.1.2 Atividade antifúngica das cumarinas di e trissubstituídas

Na Tabela 7 estão apresentados os valores das concentrações inibitórias mínimas das cumarinas di e da cumarina trissubstituída fraxetina, pode-se observar que essas substituições não resultaram em atividades antifúngicas significativas.

**Tabela 7** - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das cumarinas di e trissubstituídas

Cumarinas dissubstituídas	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium solani</i>
(18) Escopoletina	2,60*(500)**	N.T.***	N.T.
(19) Esculetina	2,80 (500)	5,60 (1000)	5,60 (1000)
(20) Di-Metoxi-esculetina	4,84 (1000)	4,84 (1000)	4,84 (1000)
(21) Di-Metoxi-dafnetina	2,42 (500)	4,84 (1000)	4,84 (1000)
Cumarina trissubstituída	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium solani</i>
(22) Fraxetina	2,40 (500)	4,80 (1000)	4,80 (1000)

\* Resultados expressos em mM.

\*\* Resultados expressos em µg/ml.

\*\*\* NT: substância não testada por não ter quantidade suficiente.

A escopoletina, 6-metoxi,7-hidroxycumarina (composto 18), apresentou reduzida atividade antifúngica para *C. albicans* (2,60 mM = 500 µg/ml); no entanto, Jurd et al. (1971) observaram que esta cumarina foi inativa frente *S. cerevisiae*, *A. flavus*, *A. niger* e *C. tropicalis*.

De acordo com Jurd et al. (1971), a esculetina (6,7-dihidroxycumarina) não apresenta atividade antifúngica, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho (composto 19). Sardari et al. (1999) também observaram inexpressiva atividade da esculetina

frente *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans*, com CIMs superiores a 1000 µg/ml.

A metoxilação nas posições C<sub>6</sub> e C<sub>7</sub> gerando di-metoxi-esculetina (6,7-dimetoxicumarina, composto 20) resultam em maiores CIMs para *C. albicans* e *F. solani*, quando comparados com a cumarina monossubstituída 6-metoxicumarina (composto 5). A di-metoxi-dafnetina (7,8-dimetoxicumarina, composto 21) quando comparada com a 7-metoxicumarina (composto 13) não revela diferenças significativas.

A di-metoxi-esculetina (composto 20) não apresentou atividade antifúngica neste trabalho, entretando outros autores constataram atividade antifúngica para esta cumarina frente a *A. flavus*, *A. niger*, *C. tropicalis* (JURD et al., 1971), *Microsporium canis* e *Trichophyton mentagrophytes* (JOHANN, 2003).

Estudos realizados por Sardari et al. (1999) com diversos compostos cumarínicos, mostraram atividades antifúngicas inexpressivas, para *C. albicans*, de cumarinas di e trissubstituídas (nas posições C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub>), as quais apresentaram CIMs superiores a 250 µg/ml.

### 5.1.3 Atividade antifúngica das cumarinas preniladas

Os compostos 23, 24, 25, 26 e 27 são cumarinas preniladas e os resultados das respectivas atividades antifúngicas estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das cumarinas preniladas

Cumarinas preniladas	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium solani</i>
(23) Aurapteno	3,35* (1000)**	>3,35 (1000)	3,35 (1000)
(24) Febalosina	1,93 (500)	3,87 (1000)	>3,87 (1000)
(25) Balsamiferona	1,67 (500)	3,35 (1000)	>3,35 (1000)
(26) Ostenol	1,08 (250)	1,08 (250)	0,54 (125)
(27) 7-O-Geranyl-esculetina	1,52 (500)	3,04 (1000)	3,04 (1000)

\* Resultados expressos em mM.

\*\* Resultados expressos em µg/ml.

Destacou-se, neste grupo, a atividade antifúngica do ostenol (composto 26) principalmente frente a *F. solani* com CIM de 0,54 mM (125 µg/ml); para *C. albicans* e *A. fumigatus* as CIMs foram de 1,08 mM (250 µg/ml).

A atividade antifúngica do ostenol pode ser explicada pela presença da cadeia alquila na posição C<sub>8</sub> o que sugere uma relação com o aumento da lipofilicidade da molécula, favorecendo a passagem pela membrana fosfolipídica dos fungos (SARDARI et al., 1999; REHMAN et al., 2005). Da mesma forma a associação com o grupo hidroxila livre na posição C<sub>7</sub> apresentou melhores resultados quanto à inibição do crescimento fúngico do que compostos que possuíam uma hidroxila livre na posição C<sub>6</sub>, sugerindo, que este grupo na posição C<sub>7</sub> também pode influenciar na atividade antifúngica. (SARDARI et al., 1999).

No entanto, a balsamiferona (composto 25), composto de maior lipofilicidade deste grupo, também apresenta um grupo OH livre em C<sub>7</sub>, e o mesmo grupo prenil do ostenol, porém nas posições C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>. É possível que estes dois grupos modifiquem a configuração

espacial da molécula e assim diminuem a afinidade pelos transportadores ou sítios de ligação, o que justificaria a não atividade desta cumarina frente aos fungos testados.

As cumarinas aurapteno (composto 23) e a 7-O-geranil-esculetina (composto 27), também são compostos lipofílicos, entretanto, o grupo prenil se encontra na posição C<sub>7</sub>, demonstrando a importância da C<sub>8</sub>-prenilação na atividade antifúngica, visto que, estas cumarinas não foram ativas aos fungos estudados. Porém, a febalosina (composto 24) que possui um grupo prenil em C<sub>8</sub>, não apresentou atividade antifúngica, podendo-se sugerir que a oxidação da unidade prenilica e a migração da dupla ligação tornaram-na inativa.

#### 5.1.4 Atividade antifúngica das furanocumarinas

Na Tabela 9 estão representados os resultados da atividade antifúngica das furanocumarinas lineares e angulares.

**Tabela 9** - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das furanocumarinas lineares e angulares

Furanocumarinas lineares	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium solani</i>
(28) Bergapteno	1,24* (250)**	4,99 (1000)	N.T.***
(29) Xantotoxina	>4,99 (1000)	4,99 (1000)	4,99 (1000)
(30) Isopimpineline	2,17 (500)	>4,34 (1000)	4,34 (1000)
(31) Imperatorina	3,70 (1000)	3,70 (1000)	3,70 (1000)
(32) 3 $\alpha,\alpha$ Di-metil Psoraleno	1,96 (500)	>3,93 (1000)	3,93 (1000)
(33) Marmesina	2,03 (500)	4,06 (1000)	4,06 (1000)
(34) Isoangenomalina	2,19 (500)	4,38 (1000)	2,19 (500)
Furanocumarinas angulares	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium solani</i>
(35) Oroselone	2,21 (500)	4,42 (1000)	N.T.
(36) Columbianetina	4,06 (1000)	4,06 (1000)	4,06 (1000)

\* Resultados expressos em mM.

\*\* Resultados expressos em  $\mu\text{g/ml}$ .

\*\*\*NT: Substância não testada por não ter quantidade suficiente.

O grupo das furanocumarinas lineares e angulares também apresentou atividade antifúngica pouco significativa, destacando-se apenas a cumarina bergapteno (composto 28). Este composto, frente a *C. albicans*, evidenciou CIM de 1,24 mM (250 µg/ml). Contrariamente, Ojala et al. (2000) não observaram atividade desta cumarina em concentrações de 500 µg/ml.

Os testes de atividade antifúngica realizados por Ulubelen et al. (1995), utilizando o método de disco difusão, demonstraram que a imperatorina possui atividade para *C. albicans*, com CIM de 0,19 mM (54 µg/ml); valores não encontrados neste estudo (composto 31), onde o método utilizado foi a microdiluição em caldo.

### 5.1.5 Atividade antifúngica das piranocumarinas

A Tabela 10 representa a atividade antifúngica das piranocumarinas.

**Tabela 10** - Atividade antifúngica, expressa em Concentração Inibitória Mínima, das piranocumarinas angulares e lineares

Piranocumarinas angulares	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium solani</i>
(37) Hortilina	1,61* (500)**	>3,22 (1000)	>3,22 (1000)
(38) Aloxantoxiletina	1,93 (500)	3,87 (1000)	3,87 (1000)
Piranocumarinas lineares	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Fusarium solani</i>
(39) Xantiletina	2,19 (500)	4,38 (1000)	4,38 (1000)
(40) 3 $\alpha,\alpha$ -Dimetil Xantiletina	3,37 (1000)	3,37 (1000)	3,37 (1000)

\* Resultados expressos em mM.

\*\* Resultados expressos em µg/ml.

No grupo das piranocumarinas não foi obtido nenhum resultado expressivo. Observou-se apenas, que para *C. albicans* as piranocumarinas angulares (compostos 37 e 38) foram mais ativas que as lineares (compostos 39 e 40); estes resultados sugerem que a presença do anel pirano, condensado ao núcleo cumarínico, não é fator estrutural importante para a atividade antifúngica.

A atividade antifúngica das piranocumarinas, ainda que fraca, foi mais intensa em *C. albicans* do que sobre os fungos filamentosos.

## 5.2 Avaliação da atividade citotóxica

A atividade citotóxica das cumarinas foi realizada frente as células Caco-2 (adenocarcinoma colo retal humana), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal humana) e HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana).

O câncer do intestino é o tumor maligno gastrointestinal mais freqüente nos EUA, e o terceiro mais comumente diagnosticado no mundo em ambos os sexos (PARKIN et al., 2005).

Os principais tratamentos para os cânceres retal e de cólon são a ressecção cirúrgica curativa e as terapias adjuvantes: a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia, de acordo com o estágio de cada caso clínico. Estas terapias têm como objetivo tratar a doença microscópica residual, provável responsável por futuros implantes macroscópicos (RANSOM, 2006).

A quimioterapia adjuvante para o câncer de intestino demonstrou melhores resultados a partir de 1988-1990, sendo a fluoruracila, o primeiro fármaco administrado. Trata-se de uma uracila fluorada, que possui como efeito antitumoral a inibição da timidilato sintetase, a enzima catalisadora da transformação do ácido desoxiuridílico a ácido timidílico, impedindo assim a síntese do DNA (COUTINHO; SAMPAIO, 2003). Posteriormente novos fármacos foram incorporados no tratamento, o irinotecano, inibidor da topoisomerase I (DOUILLARD et al., 2000), o oxaliplatina que atua sobre o DNA inibindo sua síntese e a formação de novas moléculas; o raltitrexato, análogo do folato da quinazolina, inibidor específico da timidilato sintetase (CUNNINGHAM, 1998); e a capecitabina, agente citostático que é convertido, *in vivo*, à fração 5-fluoruracila (SCHMOLL; ARNOLD, 2006).

Outros fármacos vêm sendo estudados no tratamento adjuvante, como os anticorpos monoclonais (edrecolomabe, bevacizumabe, cetuximabe); os inibidores orais de tirosina cinase (gefitinibe) e os inibidores de ciclo-oxigenase (celecoxibe) (COUTINHO; SAMPAIO, 2003).

O câncer de laringe é um dos mais freqüentes a atingir a região da cabeça e pescoço, representando cerca de 25% dos tumores malignos que acometem esta área; é responsável por uma incidência de aproximadamente 159.000 novos casos e de 90.000 mortes por ano no mundo, representando 2,4% de todos os casos desta doença e 2,1% dos óbitos por câncer (PARKIN et al., 2005).

O tratamento quimioterápico mais utilizado abrange a associação dos fármacos: cisplatina, agente antineoplásico alquilante, que estabelece ligação cruzada com a fita de DNA, e fluoruracila, inibidora da enzima timidilato sintetase (TAGUCHI et al., 2006). Outros antineoplásicos também são administrados como o paclitaxel (KUHNT et al., 2003), e o docetaxel, que promovem a estabilização dos microtúbulos, resultado da sua agregação aos dímeros de tubulina, inibindo a despolimerização (MAEDA et al., 2004).

Os anticorpos monoclonais também representam uma nova estratégia terapêutica para o câncer de laringe, como o cetuximabe, que bloqueia o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (MACHIELS et al., 2007).

Com o aumento da incidência de câncer no mundo, a busca de novos agentes eficazes tem aumentado. As pesquisas iniciam-se com ensaios de triagem *in vitro*, permitindo avaliar a atividade citotóxica dos compostos. Portanto, a citotoxicidade é o termo utilizado para expressar a toxicidade de um composto para células em cultura, o que não prediz nenhum efeito seletivo entre células tumorais e normais (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). A toxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que leva a uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células,

bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas. A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, a capacidade do composto em penetrar na célula, entre outros (HU; HSIUNG, 1989).

Os ensaios de triagem podem ser divididos em dois grupos: ensaios celulares e ensaios moleculares. Os testes com células utilizam culturas celulares intactas, enquanto os testes moleculares consideram como parâmetros atividades isoladas como ação de enzimas ou receptores das células (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

A utilização dos testes de citotoxicidade *in vitro* representa uma ferramenta útil e promissora nas primeiras etapas de seleção de compostos antitumorais (LEÓN et al., 2006), e tais testes são necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto em causar alterações e morte celular, como consequência de dano das funções celulares básicas (EISENBRAND et al., 2002).

Pode-se avaliar a citotoxicidade através de alterações da permeabilidade celular, das funções mitocondriais, da morfologia e da proliferação celulares (EISENBRAND et al., 2002).

O ensaio do MTT é apropriado para uma variedade de linhagens celulares, que exibem crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial. Deve-se levar em consideração que alguns compostos afetam seletivamente as mitocôndrias, resultando em uma superestimação da toxicidade (SMEE et al., 2002).

Os testes de citotoxicidade foram realizados com células em crescimento e não em monocamadas com células em fase estacionária, devido a três razões: os efeitos tóxicos no ciclo celular podem desaparecer; o metabolismo de células estacionárias é geralmente menor; e a alta densidade celular da monocamada pode influenciar a disponibilidade dos alvos (COS et al., 2001).

A avaliação da citotoxicidade dos compostos cumarínicos frente às linhagens de células tumorais (HEp-2, Caco-2, HCT-8) foi realizada através da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico com MTT, conforme metodologia descrita no item 5.3.5. Os resultados obtidos através da análise de regressão serão apresentados e discutidos mais adiante.

Foram utilizados como controles positivos os seguintes antineoplásicos: cloridrato de doxorubicina, cloridrato de daunorrubicina e paclitaxel. Na Tabela 11 pode-se observar a coerência entre os resultados obtidos com esses fármacos em comparação com os dados da literatura.

**Tabela 11** - Atividade citotóxica dos fármacos utilizados como controles positivos em relação aos dados da literatura

Células	Fármacos	CC <sub>50</sub> (mM)		Referências
		Teste	Literatura	
<b>HEp-2</b>	Doxorrubicina	0,00051	0,00026	León et al., 2006.
	Paclitaxel	0,00009	0,00012	León et al., 2006.
<b>Caco-2</b>	Daunorrubicina	0,072	0,061	Maher; McClean, 2006.
<b>HCT-8</b>	Doxorrubicina	0,00069	0,00068	Costa-Lutofo et al., 2005.
	Paclitaxel	0,00008	0,00016	Santos et al., 2003.

### 5.2.1 Avaliação da atividade citotóxica das cumarinas simples monossubstituídas

A Tabela 12 mostra os valores de  $CC_{50}$  das cumarinas simples monossubstituídas, avaliadas no presente trabalho.

**Tabela 12** - Atividade citotóxica das cumarinas simples monossubstituídas

AMOSTRAS	$CC_{50}$ (mM) $\pm$ EPM* (IC 95%)**		
	HEp-2	Caco-2	HCT-8
(1) Cumarina	<b>3,80</b> $\pm$ 0,93 (2,51-5,09)	<b>7,40</b> $\pm$ 2,9 (3,32-11,49)	<b>8,32</b> $\pm$ 1,43 (6,35-10,29)
(2) 6-Metilcumarina	<b>1,76</b> $\pm$ 0,16 (1,53-1,98)	<b>1,88</b> $\pm$ 0,36 (1,37-2,39)	<b>1,61</b> $\pm$ 0,71 (0,63-2,61)
(3) 6-Hidroxycumarina	<b>3,49</b> $\pm$ 0,56 (2,71-4,26)	<b>2,92</b> $\pm$ 0,58 (2,11-3,73)	<b>0,58</b> $\pm$ 0,04 (0,51-0,64)
(4) 6-O-Acetilcumarina	<b>3,61</b> $\pm$ 0,84 (2,45-4,77)	<b>27,64</b> $\pm$ 6,45 (18,70-36,58)	<b>3,35</b> $\pm$ 0,19 (3,08-3,62)
(5) 6-Metoxicumarina	<b>3,47</b> $\pm$ 2,20 (0,42-6,52)	<b>5,88</b> $\pm$ 1,65 (3,59-8,17)	<b>3,82</b> $\pm$ 0,50 (3,13-4,53)
(6) 6-Clorocumarina	<b>3,67</b> $\pm$ 0,07 (3,56-3,77)	<b>3,76</b> $\pm$ 0,04 (3,71-3,82)	<b>4,09</b> $\pm$ 0,28 (3,69-4,49)
(7) 6-Iodocumarina	<b>2,87</b> $\pm$ 1,19 (1,22-4,52)	<b>3,72</b> $\pm$ 0,64 (2,83-4,60)	<b>1,75</b> $\pm$ 0,15 (1,55-1,97)
(8) 6-Aminocumarina	<b>19,67</b> $\pm$ 2,98 (15,53-23,80)	<b>7,36</b> $\pm$ 1,02 (5,94-8,78)	<b>3,66</b> $\pm$ 0,62 (2,80-4,53)
(9) 6-Carboxycumarina	<b>2,48</b> $\pm$ 0,61 (1,63-3,33)	<b>3,24</b> $\pm$ 0,03 (3,19-3,29)	<b>6,76</b> $\pm$ 2,62 (3,14-10,40)
(10) 6-Cianocumarina	<b>9,77</b> $\pm$ 0,23 (9,45-10,08)	<b>11,03</b> $\pm$ 3,01 (6,86-15,21)	<b>4,59</b> $\pm$ 0,51 (3,89-5,31)
(11) 6-Aldeidocumarina	<b>5,61</b> $\pm$ 0,59 (4,80-6,43)	<b>7,06</b> $\pm$ 0,58 (6,25-7,86)	<b>3,07</b> $\pm$ 0,37 (2,55-3,59)
(12) 6-Nitrocumarina	<b>2,30</b> $\pm$ 0,17 (2,07-2,54)	<b>4,29</b> $\pm$ 0,04 (4,22-4,35)	<b>4,18</b> $\pm$ 0,12 (4,01-4,36)
(13) 7-Metilcumarina	<b>2,67</b> $\pm$ 0,42 (2,09-3,25)	<b>10,62</b> $\pm$ 6,99 (0,93-20,31)	<b>12,96</b> $\pm$ 0,50 (12,25-13,66)
(14) 7-O-Acetilcumarina	<b>2,65</b> $\pm$ 0,47 (1,99-3,31)	<b>8,69</b> $\pm$ 0,83 (7,53-9,84)	<b>7,56</b> $\pm$ 2,03 (4,74-10,39)
(15) 7-Clorocumarina	<b>2,91</b> $\pm$ 0,58 (2,11-3,72)	<b>9,05</b> $\pm$ 5,96 (0,78-17,33)	<b>5,36</b> $\pm$ 0,76 (4,31-6,43)

\* Concentração citotóxica a 50%: os resultados estão expressos em mM e representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média.

\*\* Intervalo de confiança de 95%.

No presente estudo a cumarina *per se* (composto 1) evidenciou reduzida capacidade de inibir o crescimento das células tumorais testadas (HEp-2, Caco-2 e HCT-8).

Weber, Steffen e Siegers (1998) também pesquisaram a citotoxicidade da cumarina *per se* em linhagem de células Caco-2 e obtiveram o valor de  $CC_{50}$  de 3,57 mM, resultado inferior ao encontrado neste trabalho (7,40 mM); porém ambos sem atividade citotóxica expressiva.

Diversas pesquisas demonstraram que a cumarina *per se* apresenta atividade diferenciada para cada linhagem de célula tumoral. Finn, Creaven e Egan (2001) obtiveram valores de  $CC_{50}$  superiores a 0,5 mM e Jiménez-Orozco et al. (1999) observaram resultados de 1,91 mM, ambos estudando células de melanomas. Nos estudos de López-González et al. (1998), a cumarina *per se* apresentou  $CC_{50}$  de 0,54 mM como resultado da ação antiproliferativa em linhagens de células de adenocarcinoma pulmonar humano (SK-LU-1, 1.3.15, 3A5A). Os resultados de  $CC_{50}$  encontrados por Weber, Steffen e Siegers (1998) da cumarina *per se* para as células linfoblásticas (CCRF CEM), células de hepatoma (Hep G2) e carcinoma de células gástricas (St 23132) foram de 1,59 mM, 2,14 mM e 2,47 mM respectivamente.

As pesquisas de Kolodziej et al. (1997) com a cumarina *per se* demonstraram os resultados mais significativos de  $CC_{50}$  sendo para células de carcinoma de pulmão (GLC-4) de 0,19 mM e de adenocarcinoma coloretal (COLO-320) de 0,13 mM.

A inclusão de um grupo metil ( $CH_3$ ) na posição  $C_6$  do núcleo cumarínico originando a 6-metilcumarina (composto 2) resultou em maior inibição do crescimento celular em todas as células, se comparado com a cumarina *per se*; porém, quando este grupo encontra-se na posição  $C_7$  (composto 14) o espectro de ação é reduzido, demonstrando inexpressiva atividade citotóxica.

O composto 3, com grupo hidroxila (OH) localizado na posição C<sub>6</sub> (6-hidroxicumarina), exibiu melhor atividade antiproliferativa que a cumarina *per se* para as linhagens celulares HEp-2 e Caco-2, porém foi menos ativa que o composto 2 (6-metilcumarina). Entretanto, observou-se que nas células HCT-8, tal composto 3 apresentou a melhor atividade citotóxica do grupo de cumarinas monossubstituídas com um valor de CC<sub>50</sub> de 0,58 mM. Esta mesma cumarina 6-hidroxilada, em pesquisas realizadas por Jiménez-Orozco et al. (1999) apresentou para células de melanona (B16-F10), um valor de CC<sub>50</sub> de 0,21mM.

Apesar de não terem sido testadas neste trabalho outras cumarinas hidroxiladas para que se pudesse fazer a comparação entre as posições do substituinte hidroxila, relatos prévios em diversas linhagens celulares mostraram que a presença do grupo OH nas posições C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub> resulta em diferentes valores de citotoxicidade.

Nos estudos de Kolodziej et al. (1997), a 7-hidroxicumarina apresentou valores de CC<sub>50</sub> superiores a 0,2 mM em células de carcinoma de pulmão (GLC4) e de adenocarcinoma colo retal (COLO-320).

Weber, Steffen e Siegers (1998) demonstraram que esta cumarina 7-hidroxilada quando testada em células de hepatoma (Hep G2), carcinoma de células gástricas (St 23132) e carcinoma colo retal (Caco-2) apresentou os valores de CC<sub>50</sub> de 1,01 mM, 1,44 mM e 2,69 mM, respectivamente. Entretanto para células linfoblásticas (CCRF CEM) o valor de CC<sub>50</sub> foi mais expressivo: 0,68 mM. Pode-se observar que o valor de CC<sub>50</sub> encontrado neste trabalho para a 6-hidroxicumarina (composto 3: 2,92 mM) frente a linhagem celular Caco-2 é semelhante ao apresentado por estes autores para o composto 7-hidroxicumarina (2,69 mM), testando a mesma linhagem celular.

Finn et al. (2002) detectaram valores de CC<sub>50</sub> superiores a 0,5 mM, para a 7-hidroxicumarina, em células de adenocarcinoma de rim (A-498). Esta mesma cumarina nos

testes de Elinos-Báez, León e Santos (2005) inibiu 54% do crescimento das células de carcinoma de pulmão (A-427) utilizando a concentração de 1,0 mM.

Alguns autores, tais como López-González et al. (1998) obtiveram resultados expressivos com esta cumarina 7-hidroxilada, e os efeitos citostáticos foram obtidos na concentração de 0,12 mM em células de adenocarcinoma de pulmão (SK-LU-1, 1.3.15, 3A5A). Outros trabalhos indicaram que a adição de um ou mais grupos nitro (NO<sub>2</sub>) a 7-hidroxicumarina, em diferentes posições, pode gerar aumento significativo na inibição do crescimento de células tumorais (EGAN et al., 1997; FINN; CREAVEN; EGAN, 2001; FINN et al., 2002; FINN; CREAVEN; EGAN, 2004 a).

Jiménez-Orozco et al. (1999) também testaram a atividade citotóxica de cumarinas hidroxiladas em células de melanomas e obtiveram os seguintes valores de CC<sub>50</sub>: 3-hidroxicumarina (1,1 mM), 4-hidroxicumarina (0,67 mM), 7-hidroxicumarina (0,86 mM) e 8-hidroxicumarina (0,59 mM).

Os demais derivados cumarínicos monossustituídos nas posições C<sub>6</sub> e C<sub>7</sub> não apresentaram atividade significativa, demonstrando que as características dos grupos substituintes nestas cumarinas testadas, tais como polaridade, hidrofobicidade e tamanho do grupo substituinte não influenciaram no crescimento das células tumorais estudadas.

### **5.2.2 Avaliação da atividade citotóxica das cumarinas di e trissustituídas**

As cumarinas dissustituídas testadas não apresentaram atividade citotóxica expressiva, como pode ser observado na Tabela 13.

**Tabela 13** - Atividade citotóxica das cumarinas di e trissubstituídas

AMOSTRAS	CC <sub>50</sub> (mM) ± EPM* (IC 95%)**		
	HEp-2	Caco-2	HCT-8
<b>Cumarinas dissubstituídas</b>			
(16) Esculetina	<b>3,65 ± 0,10</b> (3,51-3,78)	<b>3,03 ± 0,02</b> (2,99-3,06)	<b>3,02 ± 0,26</b> (2,66-3,38)
(17) Di-Metoxi-esculetina	<b>2,52 ± 0,31</b> (2,09-2,95)	<b>15,32 ± 3,02</b> (11,13-19,51)	<b>4,07 ± 0,23</b> (3,75-4,40)
(18) Di-Metoxi-dafnetina	<b>7,18 ± 4,43</b> (1,04-13,32)	<b>7,88 ± 1,70</b> (5,51-10,24)	<b>2,75 ± 0,23</b> (2,43-3,09)
<b>Cumarina trissubstituída</b>			
(19) Fraxetina	<b>3,18 ± 0,00</b> (3,18-3,18)	<b>3,32 ± 0,52</b> (2,59-4,04)	<b>2,47 ± 0,44</b> (1,86-3,09)

\* Concentração citotóxica a 50%: os resultados estão expressos em mM e representam a média de dois experimentos independentes ± erro padrão da média.

\*\* Intervalo de confiança de 95%.

A 6,7-dihidroxicumarina (esculetina) (composto 16) demonstrou ser mais ativa que as demais deste grupo, corroborando com os resultados de Kolodziej et al. (1997), obtidos com células de carcinoma de pulmão (GLC4) e de adenocarcinoma colo retal (COLO-320), onde as cumarinas com substituintes *orto*-hidroxilas apresentaram valores de CC<sub>50</sub> significantes (todos inferiores a 43,5 µM).

Estas observações também foram confirmadas pelos estudos de Finn et al. (2002), que obtiveram resultados bastante expressivos (CC<sub>50</sub> = 4,3 µM), para o composto 7,8-dihidroxicumarina (dafnetina) em células de adenocarcinoma renal; demonstrando que, para as cumarinas dissubstituídas a localização e a polaridade dos grupos substituintes interferem no potencial citotóxico (KOLODZIEJ et al., 1997; FINN; CREAVER; EGAN, 2001).

A cumarina fraxetina (6 metoxi-7,8-di-hidroxicumarina) (composto 19) representando o grupo dos análogos trissubstituídos, não apresentou atividade citotóxica significativa para as células estudadas.

### 5.2.3 Avaliação da atividade citotóxica das cumarinas preniladas

Cumarinas preniladas são cumarinas com substituintes prenil no anel cumarínico básico. A Tabela 14 demonstra a avaliação da atividade citotóxica frente as três linhagens celulares estudadas.

**Tabela 14** - Atividade citotóxica das cumarinas preniladas

AMOSTRAS	CC <sub>50</sub> (mM) ± EPM* (IC 95%)**		
	HEp-2	Caco-2	HCT-8
(20) Aurapteno	<b>2,14 ± 0,05</b> (2,07-2,22)	<b>3,43 ± 0,189</b> (3,17-3,70)	<b>2,02 ± 0,259</b> (1,67-2,39)
(21) Febalosina	<b>2,89 ± ,78</b> (1,81-3,96)	<b>12,51 ± 1,87</b> (9,91-15,11)	<b>1,93 ± 0,29</b> (1,52-2,35)
(22) Balsamiferona	<b>2,18 ± 0,21</b> (1,90-2,47)	<b>3,66 ± 0,42</b> (3,07-4,25)	<b>2,45 ± 0,49</b> (1,78-3,14)
(23) Ostenol	<b>2,17 ± 0,22</b> (1,86-2,48)	<b>7,58 ± 2,93</b> (3,51-11,65)	<b>2,07 ± 0,18</b> (1,82-2,32)
(24) 7-O-Geranyl-esculetina	<b>1,60 ± 0,29</b> (1,20-2,01)	<b>2,88 ± 0,03</b> (2,84-2,93)	<b>1,78 ± 0,28</b> (1,39-2,18)

\* Concentração citotóxica a 50%: os resultados estão expressos em mM e representam a média de 2 experimentos independentes ± erro padrão da média.

\*\* Intervalo de confiança de 95%.

No presente trabalho, as cumarinas preniladas não foram tóxicas para as células tumorais testadas. Yang et al. (2003) concluíram que a presença do grupo prenil foi de fundamental importância para a atividade citotóxica do composto cumarínico ostol em linhagens de células tumorais humanas: leucêmicas (HL-60), de carcinoma cervical (HeLa) e de carcinoma colo retal (COLO 205). O ostol não foi testado neste trabalho, apenas a cumarina ostol (composto 23), que difere do ostol pelo grupo substituinte da posição C<sub>7</sub>: uma hidroxila no ostol e um grupo metoxi no ostol; sugerindo que o grupo O-CH<sub>3</sub> poderia também influenciar, juntamente com o grupo prenil, na atividade citotóxica. Esta observação corrobora os resultados deste trabalho, pois apesar das cumarinas preniladas não terem apresentado atividade expressiva, a que apresentou o menor valor de CC<sub>50</sub> foi a 7-O-geranyl-

esculetina, sendo a única cumarina prenilada deste grupo que possui como substituintes o grupo metoxi e um grupo prenil.

#### 5.2.4 Avaliação da atividade citotóxica das furanocumarinas

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados obtidos com as furanocumarinas (lineares e angulares), as quais são caracterizadas pela presença do anel furano condensado ao anel aromático do núcleo cumarínico.

**Tabela 15** - Atividade citotóxica das furanocumarinas lineares e angular

AMOSTRAS	CC <sub>50</sub> (mM) ± EPM* (IC 95%)**		
	HEp-2	Caco-2	HCT-8
<b>Furanocumarinas lineares</b>			
(25) Xantotoxina	<b>4,31 ± 0,71</b> (3,32-5,30)	<b>17,21 ± 1,18</b> (15,57-18,85)	<b>4,86 ± 2,32</b> (1,64-8,08)
(26) Isopimpineline	<b>2,00 ± 0,26</b> (1,64-2,36)	<b>30,75 ± 7,88</b> (19,82-41,67)	<b>7,71 ± 2,79</b> (3,85-11,58)
(27) Imperatorina	<b>2,18 ± 0,22</b> (1,88-2,49)	<b>2,72 ± 0,80</b> (1,61-3,83)	<b>2,07 ± 0,07</b> (1,98-2,18)
(28) Marmesina	<b>3,12 ± 0,06</b> (3,04-3,20)	<b>3,36 ± 0,68</b> (2,42-4,31)	<b>2,55 ± 0,25</b> (2,19-2,91)
(29) Isoangenomalina	<b>2,92 ± 0,24</b> (2,59-3,26)	<b>2,28 ± 0,001</b> (2,28-2,28)	<b>8,37 ± 3,50</b> (3,51-13,23)
<b>Furanocumarina angular</b>			
(30) Columbianetina	<b>3,17 ± 0,70</b> (2,20-4,13)	<b>4,4 ± 0,86</b> (3,21-5,60)	<b>2,28 ± 0,11</b> (2,12-2,44)

\* Concentração citotóxica a 50%: os resultados estão expressos em mM e representam a média de dois experimentos independentes ± erro padrão da média.

\*\* Intervalo de confiança de 95%.

Observa-se que nenhuma das furanocumarinas apresentou citotoxicidade frente às células testadas, não encontrando-se diferença significativa entre as furanocumarinas com grupos substituintes no núcleo cumarínico (compostos 25 e 26) e as furanocumarinas com substituintes no anel furano (compostos 28 e 29) sugerindo que o anel furano não é um fator estrutural importante para a atividade citotóxica. Resultados inexpressivos também foram

observados por Mar, Je e Seo (2001) com as furanocumarinas psoraleno e psoralidina, as quais foram inativas em linhagens celulares de câncer de pulmão (A541) e hepatoma de fígado (HEpG2), mas a psoralidina foi citotóxica para as células tumorais de cólon (HT-29) e de mama (MCF-7), salientando a possibilidade da atividade citotóxica ser específica para cada célula.

### 5.2.5 Avaliação da atividade citotóxica das piranocumarinas

As três piranocumarinas estudadas estão apresentadas na Tabela 16; e neste grupo encontra-se a cumarina 3 $\alpha,\alpha$ -dimetil xantiletina (composto 33), cuja atividade citotóxica representou o resultado mais expressivo entre todos os compostos cumarínicos testados.

**Tabela 16** - Atividade citotóxica das piranocumarinas

AMOSTRAS	CC <sub>50</sub> (mM) $\pm$ EPM* (IC 95%)**		
	Piranocumarinas	HEp-2	Caco-2
(31) Hortilina	<b>2,66</b> $\pm$ 0,56 (1,88-3,43)	<b>1,79</b> $\pm$ 0,17 (1,55-2,04)	<b>2,78</b> $\pm$ 0,03 (2,75-2,83)
(32) Xantiletina	<b>4,17</b> $\pm$ 0,19 (3,91-4,44)	<b>13,01</b> $\pm$ 3,22 (8,53-17,48)	<b>5,04</b> $\pm$ 1,23 (3,33-6,75)
(33) 3 $\alpha,\alpha$ -Dimetil Xantiletina	<b>0,34</b> $\pm$ 0,03 (0,30-0,38)	<b>0,93</b> $\pm$ 0,23 (0,61-1,26)	<b>0,58</b> $\pm$ 0,13 (0,39-0,78)

\* Concentração citotóxica a 50%: os resultados estão expressos em mM e representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média.

\*\* Intervalo de confiança de 95%.

A xantiletina (composto 32) apresentou atividade citotóxica inferior às demais cumarinas deste grupo. Lin, Yang e Chou (2003) também relataram que esta piranocumarina não foi ativa frente a diversas linhagens de células tumorais humanas como células de leucemia mielóide crônica (K562), células do linfoma de Burkitt (Raji), linfócitos T (leucemia aguda - Jurkat), células de carcinoma epidermóide de pulmão (Calu-1) e de carcinoma cervical (HeLa).

No presente trabalho, a presença do grupo dimetilalil na posição C<sub>3</sub> da xantiletina originando a 3 $\alpha$ , $\alpha$ -dimetil xantiletina (composto 33) aumentou consideravelmente a atividade citotóxica, possivelmente sendo resultado de um conjunto de fatores, entre eles a estrutura planar da cumarina, a presença do anel pirano e a adição do grupo dimetilalil na posição C<sub>3</sub> do núcleo cumarínico.

A importância de substituintes na posição C<sub>3</sub> foi previamente verificada por alguns autores; Bocca et al. (2002), que obtiveram resultados expressivos em células tumorais humanas de mama (MCF-7), de adenocarcinoma colo retal (Caco-2), de ovário (SK-OV-3) e células leucêmicas (HL-60), com a cumarina prenilada ferulenol, cujo grupo prenila substituinte foi adicionado na posição C<sub>3</sub>. Reddy et al. (2005) descreveram a atividade antiproliferativa de cumarinas com substituintes carboxi (COOH) na posição C<sub>3</sub> em linhagens de células tumorais de mama (SKBR-3 e BT474) e sugeriram que a atividade citotóxica seria dependente das substituições no anel cumarínico e de receptores específicos nas células tumorais.

Ensaio de citotoxicidade realizados por Lee et al. (2006) com uma série de 7-dietilaminocumarinas em diversas células tumorais humanas (glioblastoma-U87MG, melanoma-B16BL6, fibroblasto-NIH, adenocarcinoma colo retal-DLD-1, carcinoma de células escamosas da cérvix-SiHa, carcinoma cervical-HeLa) mostraram que os substituintes na posição C<sub>3</sub> do núcleo cumarínico foram os responsáveis pela atividade citotóxica, e os grupos funcionais adicionados nesta posição possuíam caráter hidrofóbico, aumentando assim, a interação de Van der Waals no sítio ativo, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho, visto que o grupo dimetilalil também apresenta perfil hidrofóbico.

A relação dos efeitos citotóxicos com os parâmetros hidrofóbicos na região do substituinte C<sub>3</sub> do anel benzopirona também foi salientada por Budzisz et al. (2003).

Emerole et al. (1981) relacionaram a estrutura química com a hepatotoxicidade de algumas cumarinas naturais e concluíram que: o potencial tóxico da chapelina (I) é análogo ao apresentado pelo safrol (II), e poderia estar relacionado à presença do grupo  $\alpha,\alpha$ -dimetilalil localizado também na posição C3 do núcleo cumarínico, supondo-se então, que o comportamento citotóxico da cumarina 3 $\alpha,\alpha$ -dimetil xantiletina (III) seja semelhante (Figura 7).

No safrol, o principal componente do óleo de sassafrás, o grupo dimetilalil está presente na unidade C3 lateral de sua estrutura química. Estudos do metabolismo desta substância evidenciaram que o grupo dimetilalil é toxicofórico, especialmente devido à fácil oxidação hepática por ação de enzimas microsossomais dependentes do citocromo-P450, seguido de sulfoconjugação do álcool alílico intermediário, levando à formação de espécies oxidadas reativas frente à nucleófilos bioorgânicos (BARREIRO; FRAGA, 1999).

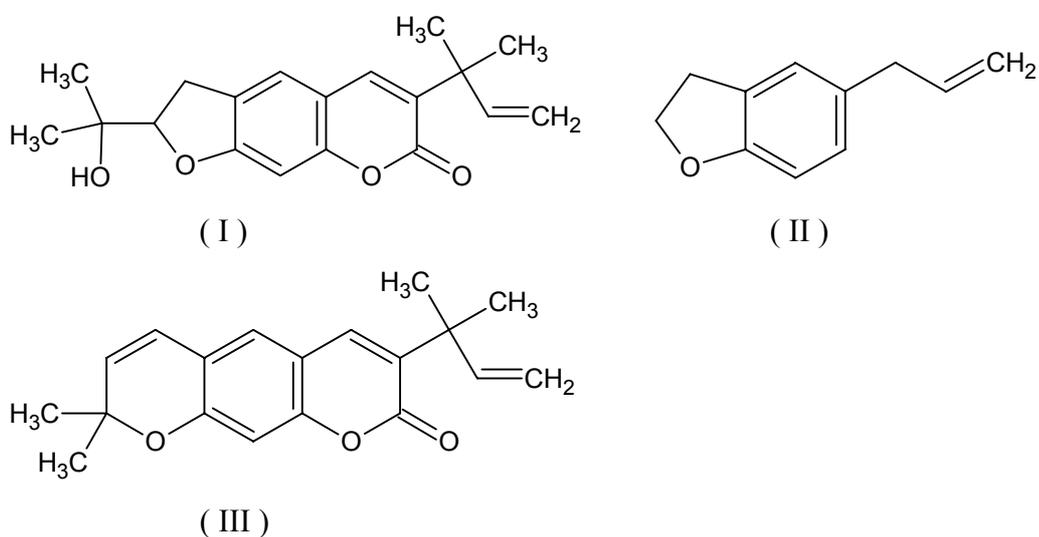


FIGURA 7 - Ilustração dos compostos chapelina (I), safrol (II) e 3 $\alpha,\alpha$ -dimetil xantiletina (III).

De acordo com os critérios adotados pelo *American National Cancer Institute* (EUA), o valor de  $CC_{50}$  para o extrato bruto de um produto natural ser considerado promissor para posterior purificação deve ser inferior a 20  $\mu\text{g/ml}$  e para compostos puros o valor sugerido é de 4  $\mu\text{g/ml}$  (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

Neste trabalho, testou-se a atividade citotóxica de 33 compostos sintéticos e semi-sintéticos derivados de uma classe de metabólitos secundários, cumarinas. A média dos resultados expressa em  $\mu\text{g/ml}$ , foi: para a 6-hidroxicumarina (composto 3), que apresentou a melhor atividade do grupo das cumarinas monossubstituídas, para as células HCT-8, de 93,44  $\mu\text{g/ml}$ ; e, para a 3 $\alpha,\alpha$ -dimetil xantiletina (composto 33), que apresentou a melhor atividade entre as piranocumarinas, a média dos valores foi de 100,56  $\mu\text{g/ml}$ ; 277,08  $\mu\text{g/ml}$  e 173,07  $\mu\text{g/ml}$ , para as linhagens HEp-2, Caco-2 e HCT-8 respectivamente. Portanto, os resultados obtidos são superiores aos parâmetros propostos pelo *American National Cancer Institute* e também aos valores de  $CC_{50}$  dos fármacos antineoplásicos utilizados como controles positivos; porém os testes realizados fazem parte de um estudo preditivo, onde, de acordo com Suffness e Pezzuto (1991), os ensaios de triagem para citotoxicidade são executados *in vitro*.

De acordo com a revisão realizada por Kostova (2005) que salientou a importância das cumarinas como agentes citotóxicos; o mecanismo de ação destas nas células tumorais não é ainda completamente esclarecido e a variabilidade estrutural em decorrência das substituições no anel básico da cumarina pode influenciar em suas atividades biológicas. No entanto, a correlação dos resultados das atividades citotóxicas, frente a diversas linhagens de células tumorais, com as estruturas químicas dos compostos cumarínicos são ainda, em parte, contraditórias e inconclusivas; corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

### 5.3 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada através da interação entre os compostos cumarínicos e os eritrócitos humanos do grupo sanguíneo “O” fator Rh positivo, conforme descrito no ensaio hemolítico, item 5.4.3.

O teste de hemólise *in vitro* tem sido utilizado como uma das metodologias de triagem para diversos agentes tóxicos e para avaliação toxicológica de diferentes plantas (GANDHI; CHERIAN, 2000).

É relevante considerar a importância da atividade hemolítica das cumarinas em estudo, uma vez que a propriedade anticoagulante de alguns compostos já foi comprovada (HELGELAND, 1980) e conseqüências desta ação, foram observadas na década de 1920, quando o gado alimentado com trevo de cheiro amarelo (planta que contém a cumarina dicumarol) foi acometido por uma doença hemorrágica (GUSTAFSSON et al., 2004). Entretanto, na literatura pesquisada, foi encontrado um número reduzido de trabalhos relacionados à atividade hemolítica de cumarinas.

Estudos realizados por Ng, Liu e Wang (2000) avaliaram a inibição da hemólise em diversos compostos naturais e observaram que a cumarina xantotoxol possui capacidade de inibir em 79,85% a hemólise de eritrócitos de ratos.

O resultado da atividade hemolítica das cumarinas testadas neste trabalho demonstrou que apenas a cumarina balsamiferona apresenta atividade hemolítica, com porcentagem de hemólise de 8,87%, que corresponde a concentração de 1000 µg/ml dessa cumarina. Resultado bastante significativo, uma vez que, esta atividade hemolítica é reduzida e importante para a realização de testes biológicos posteriores.

## 6 CONCLUSÕES

- As atividades antifúngica citotóxica e hemolítica das cumarinas monossubstituídas estudadas não dependeram dos padrões de substituição no núcleo cumarínico, nem mesmo das características dos grupos substituintes.

- Entre as cumarinas monossubstituídas, a 6-nitrocumarina apresentou o resultado mais expressivo da atividade antifúngica para o fungo *Fusarium solani*.

- A espécie *Aspergillus fumigatus* foi a mais resistente aos compostos cumarínicos monossubstituídos testados, sugerindo que a atividade antifúngica pode ser espécie-específica.

- As cumarinas di e trissubstituídas, e as furano e piranocumarinas apresentaram atividades antifúngicas pouco significativas. *Candida albicans* mostrou-se mais sensível, para estes compostos, que os fungos filamentosos.

- Dentre todas as cumarinas estudadas, o ostenol foi o composto cumarínico mais ativo para todas as espécies de fungos estudadas.

- As cumarinas com estrutura planar mostraram-se mais ativas nas atividades antifúngica e citotóxica, dentre todas as avaliadas.

- Entre as cumarinas simples monossubstituídas, a 6-hidroxycumarina foi a que evidenciou atividade citotóxica mais significativa, frente à linhagem celular HCT-8.

- As cumarinas di e trissubstituídas, as preniladas e as furanocumarinas não evidenciaram atividade citotóxica.

- Dentre todos os compostos estudados, a piranocumarina 3 $\alpha$ , $\alpha$  di-metil-xantiletina foi o composto cumarínico mais citotóxico para as células tumorais testadas.

- Os resultados encontrados para a atividade antifúngica e atividade citotóxica não podem ser considerados significantes quando comparados com os fármacos antifúngicos e com os antineoplásicos utilizados como controles positivos. Porém os testes realizados são

preditivos e correspondem a ensaios de triagem dos diversos compostos cumarínicos estudados.

- A cumarina balsamifera foi o único composto que apresentou uma leve atividade hemolítica.

## REFERÊNCIAS

AL-BARWANI, F.M.; ELTAYEB, E. A. Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1097-1108, 2004.

ALLEN, E. V.; BARKER, N. W.; WAUGH, J. M. A preparation from spoiled sweet clover [3,3'-methylene-bis-(4-hydroxycoumarin)] which prolongs coagulation and prothrombin time of the blood: A clinical study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 120, p. 1009-1015, 1942.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; et al. Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 843-848, 2003.

BANERJI, A. Biotechnical potential of natural products. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 27, p. 105-113. 1992.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. The utilization of the saffrole, principal chemical constituent of sassafras oil, in the synthesis of compounds actives in the arachidonic acid cascade: anti-inflammatory, analgesic and antithrombotic. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php>>. Acesso em: 8 dez. 2006.

BECKLEY-KARTEY, S. A. J.; HOTCHKISS, S. A. M.; 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, p. 34-42, 1997.

BETHEA, D.; et al. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. **Journal of Dermatological Science**, v. 19, p. 78-88, 1999.

BIGHETTI, A. E.; et al. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, p. 72-77, 2005.

BOCCA, C.; et al. Microtubule-Interacting Activity and Cytotoxicity of the Prenylated Coumarin Ferulenol. **Planta Medica**, v. 68, p. 1135-1137, 2002.

BOOTH, N. L.; et al. Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements. **Clinical Pharmacology e Therapeutics**, v. 76, p. 511-516, 2004.

BORN, S. L.; et al. Synthesis and Reactivity of Coumarin 3,4-epoxide. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, p. 1318-1323, 1997.

BORN, S. L.; et al. Selective Clara Cell Injury in Mouse Lung Following Acute Administration of Coumarin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 151, p. 45-56, 1998.

BORN, S. L.; et al. Development of Tolerance to Clara Cell Necrosis with Repeat Administration of Coumarin. **Toxicological Sciences**, v. 51, p. 300-309, 1999.

BORN, S. L.; HU, J. K.; LEHMAN-MCKEEMAN, L. D. *o*-Hydroxyphenylacetaldehyde is a Hepatotoxic Metabolite of Coumarin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, p. 218-223, 2000.

BORN, S. L.; et al. *In vitro* Kinetics of Coumarin 3,4-Epoxidation: Application to Species Differences in Toxicity and Carcinogenicity. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 23-31, 2000.

BORN, S. L.; et al. Comparative metabolism and kinetics of coumarin in mice and rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 247-258, 2003.

BOURINBAIAR, A. S.; JIRATHITIKAL, V. Low-cost anti-HIV compounds: Potential application for AIDS therapy in developing countries. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 18, p. 1419-1431, 2002.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 2.ed. Paris: Technique e Documentation Lavoisier, 1995. Bibliografia: p. 229-240.

BUDZISZ, E.; et al. Cytotoxic effects, alkylating properties and molecular modeling of coumarin derivatives and their phosphonic analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 597-603, 2003.

CAMPOS-TOIMIL, M.; et al. Synthesis and Vasorelaxant Activity of New Coumarin and Furocoumarin Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 783-786, 2002.

CARPINELLA, M. C.; FERRAYOLI, C. G.; PALACIOS, S. M. Antifungal Synergistic Effect of Scopoletin, a Hydroxycoumarin Isolated from *Melia azedarach* L. Fruits. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2922-2927, 2005.

CARVALHO, C. A.; FERNANDES, B. C. T. M.; FREIRE, B. B. Supressão da resposta humoral causada pela citrina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 171-176, 2005.

CHENG, J. F; et al. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF- $\alpha$  inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2411-2415, 2004.

CHEN, W.; et al. Pregnane, coumarin and lupane derivatives and cytotoxic constituents from *Helicteres angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1041-1047, 2006.

CHEN, Y.; et al. Synthesis, antiproliferative, and vasorelaxing evaluations of coumarin  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5710-5716, 2005.

CHOWDHURY, R.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Antimicrobial activity of *Toona ciliata* and *Amoora rohituka*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 155-158, 2003.

COLOMBO, A. L.; ALVES, S. H. Ensaios de diluição em caldo para testes de sensibilidade com fungos pela metodologia do NCCLS. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. (Org). **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Bibliografia: p. 358-361

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; et al. Global Distribution and Outcomes for *Candida* Species Causing Invasive Candidiasis: Results from an International Randomized Double-Blind Study of Caspofungin Versus Amphotericin B for the Treatment of Invasive Candidiasis. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 22, p. 470-474, 2003.

COLOMBO, A. L.; SILVA, V. P. Infecções Fúngicas em Pacientes Submetidos a Transplante Renal. **Prática Hospitalar**, São Paulo, n.42, nov/dez 2005. Disponível em <<http://www.praticahospitalar.com.br>>. Acesso em: 11 fev. 2006.

COMPAGNI, A.; CHRISTOFORI, G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 83, p. 1-5, 2000.

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

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.

COS, P.; et al. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Medica**, v. 67, n. 6, p. 515-519, 2001.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. Bibliografia: p. 591-592.

COSTA-LOTUFO, L. V.; et al. Studies of the anticancer potencial of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 21-30, 2005.

COUNCIL DIRECTIVE of 22 June 1988 on 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**, N° L 184/61, 15/07/1988.

COUTINHO, A. K.; SAMPAIO FILHO, C. Câncer do Cólon: Tratamento Adjuvante. O que há de novo? **Prática Hospitalar**, São Paulo, n.29, set/out 2003. Disponível em <<http://www.praticahospitalar.com.br>>. Acesso em: 11 dez. 2006.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

COX, D.; O’KENNEDY, R.; THORNES, R. D. The Rarity of Liver in Patients Treated with Coumarin (1,2-Benzopyrone). **Human Toxicology**, v. 8, p. 501-506, 1989.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, p. 2783-2797, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.

CREAVEN, B. S.; et al. Synthesis and antimicrobial activity of copper(II) and silver(I) complexes of hydroxynitrocoumarins: X-ray crystal structures of  $[\text{Cu}(\text{hnc})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $[\text{Ag}(\text{hnc})]$  (hncH = 4-hydroxy-3-nitro-2H-chromen-2-one). **Polyhedron**, v. 24, p. 949-957, 2005.

CREAVEN, B. S.; et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a series of substituted coumarin-3-carboxylatosilver(I) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 359, p. 3976-3984, 2006.

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

CUCA-SUAREZ, L. E.; MARTINEZ, J. C.; DELLE-MONACHE, F. Constituintes quimicos de *Zanthoxylum monophyllum*. **Revista Colombiana de Química**, v. 27, p. 17-27, 1998.

CUCA-SUAREZ, L. E.; MENICHINI, F.; DELLE MONACHE, F. Tetranortriterpenoids and Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Hortia colombiana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 339-344, 2002.

CUNNINGHAM, D. Mature results from three large controlled studies with raltitrexed ('Tomudex'). **British Journal of Cancer**, v. 77, p. 15-21, 1998.

CURINI, M.; et al. Chemistry and Biological Activity of Natural and Synthetic Prenyloxycoumarins. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 199-222, 2006.

DEBATIN, K. M. Apoptosis pathways in cancer therapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 53, p. 153-159, 2004.

DELLE-MONACHE, F.; et al. Coumarins de *Hortia arborea*: Hortiline and Hortiolone. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 106, p. 681-689, 1976.

DELLE-MONACHE, F.; et al. Coumarins of *Hortia arborea*. II Hortiolone and Hortionone. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 107, p. 399-402, 1977.

DELLE-MONACHE, F.; et al. Isopentenylindole derivatives and other components of *Esembeckia leiocarpa*. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 119, p. 435-439, 1989.

DELLE-MONACHE, F.; et al. (-) Lunacrinol from *Esembeckia hieronium*. **Fitoterapia**, v. 66, p. 474, 1995.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

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

DOUILLARD, J. Y.; et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomized trial. **Lancet**, v. 25, p. 1041-1047, 2000

EGAN, D. A.; et al. The Pharmacology, Metabolism, Analysis, and Applications of coumarin and coumarin-related compounds. **Drug Metabolism Review**, v. 22, p. 503-529, 1990.

EGAN, D. A.; et al. Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin. **Cancer Letters**, v. 118, p. 201-211, 1997.

EISENBRAND G. et al., Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

ELINOS-BÁEZ, C. M.; LÉON, F.; SANTOS, E. Effects of coumarin and 7OH-coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human lung cancer cell lines in vitro. **Cell Biology International**, v. 29, p. 703-708, 2005.

EMEROLE, G.; et al. Structure-Activity Relationship in the Toxicity of some Naturally Occurring Coumarins – Chalepin, Imperatorin and Oxypeucedanone. **Toxicology**, v. 20, p. 71-80, 1981.

ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal Susceptibility Testing. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 18, p. 161-168, 1996.

ESPINEL – INGROFF, A. et al. Multicenter evaluation of a standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, p. 139-143, 1997.

FENTEM, J. H.; FRY, J. R. Metabolism of coumarin by rat, gerbil and human liver microsomes. **Xenobiotica**, v. 22, n. 3, p. 357-367, 1992.

FERNANDES, A. T. Alerta para os surtos de infecções fúngicas em ambientes hospitalares. **BioNotícias**, 2004. Disponível em: <<http://www.ccih.med.br>>. Acesso em: 9 jul. 2006.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente na ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, M. E. S.; et al. In Vitro Evolution of Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Involves Multiple Mechanisms of Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4405-4413, 2004.

FERREIRA, M. E. S.; et al. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology Supplement**, v. 43, p. S313-S319, 2005.

FINN, G. J.; CREAVER, B. S.; EGAN, D. A. Study of the *in vitro* cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. **Melanoma Research**, v. 11, p. 461-467, 2001.

FINN, G. J.; et al. *In Vitro* cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. **Cancer Letters**, v. 183, p. 61-68, 2002.

FINN, G. J.; CREAVER, B. S.; EGAN, D. A. A study of the role of cell cycle events mediating the action of coumarin derivatives in human malignant melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 214, p. 43-54, 2004 a.

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

FINN, G. J.; CREAVER, B. S.; EGAN, D. A. Investigation of intracellular signaling events mediating the mechanism of action of 7-hydroxycoumarin in human renal cells. **Cancer Letters**, v. 205, p. 69-79, 2004 c.

FULLER, R. W.; et al. HIV-Inhibitory Coumarins from Latex of the Tropical Rainforest Tree *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 16, p. 1961-1964, 1994.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. **Toxicology in Vitro**, v. 14, p. 513-516, 2000.

GLEE, C.; et al. Acaricidal Activity of Tonka Bean Extracts. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Bioactive Derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 690-692, 2003.

GODOY, M. F. P.; et al. Inhibition of the Symbiotic Fungus of Leaf-Cutting Ants by Coumarins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 669-672, 2005.

GODOY, P.; et al. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Profile of *Candida* spp. Bloodstream Isolates from Latin American Hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 401-405, 2003.

GODOY, P.; COLOMBO, A. L. Biologia e Relevância Clínica das Espécies do Gênero *Fusarium* spp. **Prática Hospitalar**, São Paulo, n. 34, p. 136-140, 2004.

GOLDMAN, G. H.; et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 25-32, 2004.

GOTTLIEB, H. E.; ALVES DE LIMA, R.; DELLE-MONACHE, F. <sup>13</sup>CNMR of 6-and 7-substituted coumarins. Correlation with Hammett constants. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions II**, v. 4, p. 435-437, 1979.

GRUNDMANN-KOLLMANN, M.; et al. Spatial distribution of 8-methoxypsoralen penetration into human skin after systemic or topical administration. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, p. 535-539, 2002.

GUILLET, D.; et al. Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 571-575, 2001.

GUSTAFSSON, D.; et al. A new oral anticoagulant: the 50- year challenge. **Nature Reviews Drugs Discovery**, v. 3, p. 649-659, 2004.

HAGE, D. S.; TWEED, S. A. Recent advances in chromatographic and electrophoretic methods for the study of drug-protein interactions. **Journal of Chromatography Biomedical Biomedicine Science Applications**, v. 699, p. 499-525, 1997.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

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

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.

HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v. 11, n. 5-6, p. 217-232, 1989.

HUBERT, F.; COOPER, E. L.; ROCH, P. Structure and differential target sensitivity of the stimutable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1361, p. 29-41, 1997.

IVANOVSKA, N.; et al. Effect of some Hydroxycoumarins on Complement-Mediated Hemolysis in Human Serum. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 16, p. 557-562, 1994.

JACOBI, U. S.; FLECK, N. G. Avaliação do potencial alelopático de genótipos de aveia no início do ciclo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 11-19, 2000.

JIMÉNEZ-OROZCO, F. A.; et al. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. **Melanoma Research**, v. 9, p. 243-247, 1999.

JIMÉNEZ-OROZCO, F. A.; et al. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. **Lung Cancer**, v. 34, p. 185-194, 2001.

JOHANN, S. **Atividade Antimicrobiana de Flavonóides Polimetoxilados isolados de frutos cítricos**. 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

JURD, L.; et al. Antimicrobial properties of 6,7-dihydroxy-, 7,8-dihydroxy-, 6-hydroxy- and 8-hydroxycoumarins. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2971-2974, 1971.

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

KABEYA, L. M.; et al. Estudo da Atividade de Cumarinas no Metabolismo Oxidativo de Neutrófilos. **Nova Química**, São Paulo, 2000. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br>>. Acesso em: 16 jun. 2005.

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

KAI, K.; et al. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 379-386, 2006.

KAWASE, M.; et al. Structural requirements of hydroxylated coumarins for in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity. **In Vivo**, v. 17, p. 509-512, 2003. Abstract

KEMPEN, I.; et al. 3-Bromophenyl 6-acetoxymethyl-2-oxo-2H-I-benzopyran-3-carboxylate inhibits cancer cell invasion *in vitro* and tumor growth *in vivo*. **British Journal of Cancer**, v. 88, p. 1111-1118, 2003.

KHAN, K. M.; et al. Synthesis of Coumarin Derivatives with Cytotoxic, Antibacterial and Antifungal Activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 373-379, 2004.

KHAN, I. A.; et al. Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 3584-3587, 2005.

KIM, H. H.; et al. Involvement of PKC and ROS in the cytotoxic mechanism of anti-leukemic decursin and its derivatives and their structure-activity relationship in human K562 erythroleukemia and U937 myeloleukemia cells. **Cancer Letters**, v. 223, p. 191-201, 2005.

KIRKIACHARIAN, S.; et al. Structure-activity relationships of some 3-substituted-4-hydroxycoumarins as HIV-1 protease inhibitors. **Il Farmaco**, v. 57, p. 703-708, 2002.

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

KOCH, S.; et al. Acute cytolytic hepatitis caused by coumarin. 2 cases. **Gastroenterologie Clinique et Biologique**, v. 21, n. 3, p. 223-225, 1997.

KOFINAS, C.; et al. Flavonoids and Bioactive Coumarins of *Tordylium apulum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 637-341, 1998.

KOKUBUN, T.; et al. Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 779-782, 2003.

KOŁODZIEJ, H.; et al. Structure – Cytotoxicity Relationships of a Series of Natural and Semi-Synthetic Simple Coumarins as Assessed in Two Human Tumour Cell Lines. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52, p. 240-244, 1997.

KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Biological Evaluation of Several Coumarins Derivatives Designed as Possible Anti-inflammatory / Antioxidant Agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 63-69, 2003.

KOSTOVA, I.; et al. New lanthanide complexes of 4-methyl-7-hydroxycoumarin and their pharmacological activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 339-347, 2001.

KOSTOVA, I.; MANOLOV, I.; MOMEKOV, G. Citotoxic activity of new neodymium (III) complexes of bis-coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 765-775, 2004.

KOSTOVA, I. Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 5, p. 1-18, 2005 a.

KOSTOVA, I.; et al. Citotoxic activity of new lanthanum (III) complexes of bis-coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 542-551, 2005 b.

KOSTOVA, I.; et al. Citotoxic activity of new cerium (III) complexes of bis-coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1246-1254, 2005 c.

KOSTOVA, I.; MOMEKOV, G. New zirconium (IV) complexes of coumarins with cytotoxic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 717-726, 2006.

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

KUHNT, T.; et al. Aggressive simultaneous radiochemotherapy with cisplatin and paclitaxel in combination with accelerated hyperfractionated radiotherapy in locally advanced head and neck tumors. Results of a phase I-II trial. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 179, n. 10, p. 673-681, 2003.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, Cromonas e Xantonomas. In: SIMÕES, C. O. S.; et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003. Bibliografia: p. 537-556.

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

LAKE, B. G.; et al. Studies on the disposition, metabolism and hepatotoxicity of coumarin in the rat and Syrian hamster. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 809-823, 2002.

LAKE, B. G.; GRASSO, P. Comparison of the Hepatotoxicity of Coumarin in the Rat, Mouse, and Syrian Hamster: A Dose and Time Response Study. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 34, p. 105-117, 1996.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites**. New York: Plenum Press, 1993. Bibliografia: p. 46-48.

LAPCHIK, M. Bio notícias, **O estado de São Paulo**, São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 11 jul. 2005.

LAURIN, P.; et al. Synthesis and *InVitro* Evaluation of Novel Highly Potent Coumarin Inhibitors of Gyrase B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 2079-2084, 1999.

LEE, S.; et al. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4596-4599, 2006.

LEHMANN, J. Hypoprothrombinemia produced by methylene-bis-(hydroxycoumarin) its use in thrombosis. **The Lancet I**, v. 14, p. 318, 1942.

LEI, T. C.; et al. Stimulation of Melanoblast Pigmentation by 8-methoxypsoralen: The Involvement of Microphthalmia-Associated Transcription factor, the Protein Kinase A Signal Pathway, and Proteasome-Mediated Degradation. **Journal Investigative Dermatology**, v. 119, p. 1341-1349, 2002.

LEÓN, C. J.; et al. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. **Biomédica**, v. 26, p. 161-168, 2006.

LEWIS, A.; et al. Treatment of Pancreatic Cancer Cells with Dicumarol Induces Cytotoxicity and Oxidative Stress. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 4550-4558, 2004.

LEWIS, D. F. V.; ITO, Y.; LAKE, B. G. Metabolism of coumarin by human P450s: A molecular modelling study. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 256-264, 2006.

LI, S. M.; HEIDE, L. New aminocoumarin antibiotics from genetically engineered *Streptomyces strains*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 419-427, 2005.

LIN, L.; YANG, L.; CHOU, C. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 619-622, 2003.

LINK, K. P. The Discovery of Dicumarol and Its Sequels. **Circulation**, v. 19, p. 97-107, 1958.

LIU, X.; et al. Effect of scopoletin on PC<sub>3</sub> cell proliferation and apoptosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 22, 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.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. S.; et al. Efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxycumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v. 11, p. 261-267, 1998.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. S.; et al. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung Cancer**, v. 43, p. 275-283, 2004.

LOPRINZI, C. L.; et al. Lack of effect of coumarin in women with lymphedema after treatment for breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 4, p. 346-350, 1999.

MACHIELS, J. P.; et al. Phase I/II study of preoperative cetuximab, capecitabine, and external beam radiotherapy in patients with rectal cancer. **Annals of Oncology**, v. 5, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MADARI, H.; et al. Dicoumarol: A Unique Microtubule Stabilizing Natural Product that Is Synergistic with Taxol. **Cancer Research**, v. 63, p. 1214-1220, 2003.

MADHAVAN, G. R.; et al. Novel Coumarin Derivatives of Heterocyclic Compounds as Lipid-Lowering Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 2547-2551, 2003.

MAEDA, Y.; et al. A case of pulmonary metastases from laryngeal cancer showing a complete response to chemotherapy with docetaxel. **Gan To Kagaku Ryoho**, v. 31, n. 1, p. 75-77, 2004

MAES, D.; DEBENEDETTI, S.; DE KIMPE, N. New coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 165-169, 2006.

MAHER, S.; McCLEAN, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1289-1298, 2006.

MANS, D. R. A.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. **The Oncologist**, v. 5, p. 185-198, 2000.

MANUELE, M. G.; et al. Comparative immunomodulatory effect of scopoletin on tumoral and normal lymphocytes. **Life Science**, v. 79, n. 21, p. 2043-2048, 2006.

MAO, P. C.; et al. Chemical Modification of Coumarin Dimer and HIV-1 Integrase Inhibitory Activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 12, p. 1634-1637, 2002.

MAR, W.; JE, K. H.; SEO, E. K. Cytotoxic constituents of *Psoralea corylifolia*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 24, n. 3, p. 211-213, 2001.

MATA, R.; et al. Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob* in honour of Professor G. H. Neil Towers 75<sup>TH</sup> Birthday. **Phytochemistry**, v. 49, p. 441-449, 1998.

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

MATSUDA, H.; et al. Antipruritic Effects of *Cnidii Monnieri* Fructus (Fruits of *Cnidium monnieri* Cusson). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 2, p. 260-263, 2002.

MATSUDA, H.; et al. Melanogenesis Stimulation in Murine B16 Melanoma Cell by *Umberiferae* Plant Extracts and Their Coumarin Constituents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1229-1233, 2005.

MAUCHER, A.; KAGER, M.; VON ANGERER, E. Evaluation of the antitumor activity of coumarin in prostate cancer models. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 119, p. 150-154, 1993.

MAUCHER, A.; VON ANGERER, E. Antitumor activity of coumarin and 7-hydroxycoumarin against 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene-induced rat mammary carcinomas. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. 502-504, 1994.

MAXWELL, A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 681-686, 1993.

MIYAMOTTO, M.; et al. Necrose de mama relacionada ao uso de warfarina. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, p. 52-54, 2004.

MOHLER, J. L.; et al. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. S.35-38, 1994.

MONTEJO, M. Infección invasora por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos en enfermos con trasplante de órgano sólido. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 9-12, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOUANGA, M.; et al. Influence of coumarin on zinc electrodeposition. **Surface & Coatings Technology**, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 03 fev. 2006.

MOURI, T.; et al. Synthesis and Antifungal Activity of New 3,4,7- Trisubstituted Coumarins. **Journal of Pesticide Science**, v. 30, n. 3, p. 209-213, 2005.

MU, L.; WANG, Q.; NI, Y. *In vitro* Antimalarial Effect of Daphnetin Relating to Its Iron-chelating Activity. **Chinese Journal of Parasitology Disease**, v. 20, p. 83-85, 2002.

MUELLER, R. L. First-generation agents: aspirin, heparin and coumarins. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 17, p. 23-53, 2004.

MURRAY, R. D. H. **Naturally Occurring Plant Coumarins**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 1978. Bibliografia: p. 200-209.

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

NAM, N.; et al. Preliminary Structure-Antiangiogenic Activity Relationships of 4-Seneciolyloxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 2345-2348, 2002.

NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Ed). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p. 471-495.

NASCIMENTO, G. G. F. ; et al. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. M38-A. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, USA, v.22, n. 16, p.1-50, 2002 a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. M27-A2. Ed 2. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, USA, v.22, n. 15, p.1-51, 2002 b.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM – NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Coumarin (CAS N° 91-64-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). **National Toxicology Program Technical Reports Series**, v. 422, p. 1-340, 1993.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM – NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of 3,4-Dihydrocoumarin (CAS N° 119-84-6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). **National Toxicology Program Technical Reports Series**, v. 423, p. 1-337, 1993.

NG, T. B.; et al. Anti-Human Immunodeficiency virus (Anti-HIV) Natural Products with Special Emphasis on HIV Reverse Transcriptase Inhibitors. **Life Science**, v. 61, n. 10, p. 933-949, 1997.

NG, T. B.; LIU, F.; WANG, Z. T. Antioxidative Activity of Natural Products from Plants. **Life Sciences**, v. 66, p. 709-723, 2000.

NGWENDSON, J. N.; et al. Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects. **Pharmazie**, v. 58, p. 587-589, 2003.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drugs research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 708-712, 1997.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Risk Factors for Breakthrough Candidemia. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 21, p. 209-211, 2002.

NUCCI, M.; et al. *Fusarium* Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p.1237-1242, 2004.

OJALA, T.; et al. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 299-305, 2000.

OJALA, T. **Biological Screening of Plant Coumarins**. 2001. 62f. Academic Dissertation, University of Helsinki.

OKAMOTO, T.; et al. Inhibition of Concanavalin A-Induced Mice Hepatitis by Coumarin Derivatives. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 95-97, 2001.

OKETCH-RABAH, H. A.; et al. A new antiplasmodial coumarin from *Toddalia asiatica* roots. **Fitoterapia**, v. 71, p. 636-640, 2000.

OLIVEIRA, J. S. R.; et al. Fungal infections in marrow transplant recipients under antifungal prophylaxis with fluconazole. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 789-798, 2002.

PARK, E. J.; et al. An Isocoumarin with Hepatoprotective Activity in Hep G2 and Primary Hepatocytes from *Agrimonia pilosa*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 9, p. 944-946, 2004.

PARKIN, et al. Global Cancer Statistics, 2002. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 74-108, 2005.

PAYÁ, M.; et al. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, p. 445-451, 1994.

PFALLER, M. A.; et al. National Surveillance of Nosocomial Blood Stream Infection Due to Species of *Candida* Other than *Candida albicans*: Frequency of Occurrence and Antifungal Susceptibility in the SCOPE Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 30, n. 2, p. 121-129, 1998.

PILLAI, S. P.; et al. Umbelliferone Analogues and Their Potential to Inhibit Benzo(a)pyrene- and Hydrogen Peroxide-Induced Mutations. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1358-1362, 1999.

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

PINTO, A. C.; et al. Produtos Naturais: Atualidade, Ensaio e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

P.R. VADE-MÉCUM. 6. ed. São Paulo: Soriak, 2000. Bibliografia: p. 750-751.

QIN, L.; et al. Total coumarins from fruits of *Cnidium monnieri* inhibit formation and differentiation of multinucleated osteoclasts of rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 2, p. 181-186, 2003.

RAHIMTOOLA, H.; et al. Reduction in the Intensity of Abortive Migraine Drug Use During Coumarin Therapy. **Headache**, v. 41, p. 768-773, 2001.

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

RANSOM, C. Opções do tratamento para o Cancer de Colorectal. **PTB articles. com**, 2006. Disponível em: <<http://www.ptbarticles.com/pt/Cancer/Colon-Rectal-Cancer>>. Acesso em: 17 jan. 2007.

REDDING, S. W.; et al. Epidemiology of Oropharyngeal *Candida* Colonization and Infection in Patients Receiving Radiation for Head and Neck Cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3896-3900, 1999.

REDDY, N. S.; et al. Novel coumarin-3-(N-aryl)carboxamides arrest breast cancer cell growth by inhibiting ErbB-2 and ERK1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 3141-3147, 2005.

REHMAN, S. U.; et al. In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 333-340, 2005.

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendência Evolutiva de Famílias Produtoras de Cumarinas em Angiospermae. **Química Nova**, v. 25, n. 4, 2002.

RIBEIRO, M. A.; et al. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. **Mycopathologia**, v. 151, p. 5-10, 2000.

RITSCHER, W. A.; et al. Pharmacokinetics of Coumarin and its 7-Hydroxy-Metabolites upon Intravenous and Peroral Administration of Coumarin in Man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 12, p. 457-461, 1977.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e Farmacobiocnologia, 1. ed. São Paulo: Premier, 1997.

ROJAHN, C. A. **Productos Químicos y Farmacêuticos**, 3 ed. Mexico: Editorial Atlante, 1956. Bibliografía: p. 1750-1758.

SAÏD, A.; et al. 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.; et al. NM-3, an Isocoumarin, Increases the Antitumor Effects of Radiotherapy without Toxicity. **Cancer Research**, v. 60, p. 6958-6963, 2000.

SANT'ANA, P. L.; et al.; Multicenter Brazilian Study of Oral *Candida* Species Isolated from Aids Patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 253-257, 2002.

SANTOS, H. S.; et al. Cytotoxic Naphthoquinones from Roots of *Limpia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 517-520, 2003.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. O. S.; et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2003. Bibliografía: p. 404-420.

SARDARI, S.; et al. Synthesis and Antifungal Activity of Coumarins and Angular Furanocoumarins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1933-1940, 1999.

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

SCHMOLL, H. J.; ARNOLD, D. Update on Capecitabine in Colorectal Cancer. **The Oncologist**, v. 11, p. 1003-1009, 2006

SCIO, E.; et al. New Bioactive Coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 634-637, 2003.

SHIN, S. Y.; et al. Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of  $\alpha$ -helical antibiotic peptide P18 and its analogs. **Journal of Peptide Research**, v. 58, p. 504-514, 2001.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SIDRIM, J. J. C.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G. Aspergilose e Fusariose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. (Org). **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Bibliografia: p. 275-282.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Candidíase. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. (Org). **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Bibliografia: p. 265-274.

SINGH, V.; et al. Coumarins Congeners as Antidepressants. **Arzneim-Forsch/Drug Research**, v. 42, p. 993-996, 1992.

SMEE, D. F.; et al. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 106, p. 71-79, 2002.

SOUZA, S. M.; DELLE-MONACHE, F.; SMÂNIA, A. Antibacterial Activity of Coumarins. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60, p. 693-700, 2005.

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

STEIN, A. C.; et al. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 95-98, 2006.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays Related to Cancer Drugs Discovery, in: **Methods in Plant Biochemistry**, v. 6. Biological Techniques, Academic Press London, 1991. Bibliografia: p. 71-131.

TADA, Y.; et al. Coumarins and  $\gamma$ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v. 59, p. 649-654, 2002.

TAGUCHI, T.; et al. Concurrent chemoradiotherapy with cisplatin, 5-fluorouracil, methotrexate, and leucovorin in patients with advanced resectable squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. **Acta oto-Otolaryngologica**, v. 126, n. 4, p. 408-413, 2006.

TAKEUCHI, N.; et al. Pharmacological Activities of the Prenylcoumarins, Developed from Folk Usage as a Medicine of *Peucedanum japonicum* THUNB. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 1415-1421, 1991.

TAKIMOTO, C. H. Anticancer drug development at the US National Cancer Institute. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 52, p. S29-S33, 2003.

TARTA, et al. Angiogênese no carcinoma colorretal - revisão e perspectivas. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 20, n. 4, p. 227-230, 2000.

TELLES, F. Q. Infecções por Fungos Filamentosos Invasores. **Prática Hospitalar**, São Paulo, n.36, nov/dez 2004. Disponível em <<http://www.praticahospitalar.com.br>>. Acesso em: 10 jan. 2006.

THUONG, P. T.; et al. Inhibitory Effect of Coumarins from *Weigela subsessilis* on Low Density Lipoprotein Oxidation. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1095-1097, 2005.

TORRES, R.; et al. Coumarins and cinnamic acid from *Gymnophyton isatidicarbom*. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 532-533, 1979.

TORRES, R.; et al. Two new *O*-geranyl coumarins from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 5-8, 2004.

TORTORA, G. J.; et al. **Microbiologia**, 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Bibliografia: 334-375.

TRANI, M.; et al. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *Grandiflora*. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 127, p. 415-418, 1997.

TRANI, M.; et al. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *Brevipetiolata*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 99-102, 2004.

TRIPATHI, R. P.; et al. Antifilarial activity of some 2H-1-benzopyran-2-ones (coumarins). **Acta Tropica**, v. 76, p. 101-106, 2000.

TYAGI, Y. K.; et al. Synthesis of noval amino and acetyl amino-4-methyl coumarins and evaluation of their antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 413-420, 2005.

UCHIUMI, F.; et al. Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. **Antiviral Research**, v. 58, p. 89-98, 2003.

ULUBELEN, A.; et al. Biological activities of a Turkish medicinal plant, *Prangos platychnaena*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 193-197, 1995.

VAN VOORHIS, W. C.; et al. *Trypanosoma cruzi* Inactivation in Human Platelet Concentrates and Plasma by a Psoralen (Amotosalen HCl) and Long-Wavelength UV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 475-479, 2003.

VARANDA, E. A.; et al. Mutagenic and Cytotoxic Activity of an Isocoumarin (Paepalantine) Isolated From *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 17, p. 75-85, 1997.

VARANDA, E. A.; et al. Mutagenicity of paepalantine dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 109-114, 2004.

VARGAS, P. A.; PILTZ, L.; ALVES, S. H. Ceratomicose causada por *Fusarium solani* no interior do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 207-208, 2004.

VASSALLO, J. D.; et al. Metabolic Detoxification Determines Species Differences in Coumarin-Induced Hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 80, p. 249-257, 2004.a

VASSALLO, J. D.; et al. Roles for Epoxidation and Detoxification of Coumarin in Determining Species Differences in Clara Cell Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 82, p. 26-33, 2004.b

VELASCO-VELÁZQUEZ, M. A.; et al. 4-Hydroxycoumarin 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.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drugs development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VON ANGERER, E.; KAGER, M.; MAUCHER, A. Antitumor activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. S14-S16, 1994.

WANG, C.; et al. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. **Cancer Letters**, v. 183, p. 163-168, 2002.

WANG, Q.; et al. The Schizontocidal activity of Daphnetin against Malaria Parasites *In Vitro* and *In Vivo*. **Chinese Journal of Parasitology Disease**, v. 18, p. 204-206, 2000.

WEBER, U. S.; STEFFEN, B.; SIEGERS, C. P. Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. **Research Communication in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 99, n. 2, p. 193-205, 1998.

WHANG, W. K.; et al. Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related fraxin protect cells from oxidative stress. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 37, n. 5, p. 436-446, 2005.

WRIGHT, I. S.; PRANDONI, A. The dicoumarin 3,3'-methylene-bis-(4-hydroxycoumarin) its pharmacologic and therapeutic action in man. **The Journal of the American Medical Association**, v. 120, p. 1015-1021, 1942.

WÜNSCH, V. F.; MONCAU, J. E. Mortalidade por Câncer no Brasil 1980-1995: Padrões Regionais e Tendências Temporais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 250-257, 2002.

YAMAMURA, T.; ONISHI, J.; NISHIYAMA, T. Antimelanogenic activity of hydrocoumarins in cultured normal human melanocytes by stimulating intracellular glutathione synthesis. **Arch Dermatol Research**, v. 294, p. 349-354, 2002.

YAN, J.; et al. Protection against  $\beta$ -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.; et al. Daphnetin, One of Coumarin Derivatives, Is a Protein Kinase Inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, p. 682-685, 1999.

YANG, L. L.; et al. Cytotoxic activity of coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* on leukemia cell lines. **Planta Medica**, v. 69, p. 12, p. 1091-1095, 2003.

YASUNAKA, K.; et al. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 293-299, 2005.

YIN, L.; et al. The Novel Isocoumarin 2-(8-Hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1H-2-benzopyran-3-yl) Propionic Acid (NM-3) Induced Lethality of Human Carcinoma Cells by Generation of Reactive Oxygen Species. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 43-48, 2001.

YOURICK, J.; BRONAUGH, R. L. Percutaneous Absorption and Metabolism of Coumarin in Human and Rat Skin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 153-158, 1997.

ZHANG, H.; WANG, L. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 673, p. 199-202, 2004.

ZHANG, J.; et al. Pyranocoumarins Isolated from *Peucedanum praeruptorum* as Differentiation Inducers in Human Leukemic HL-60 Cells. **Planta Medica**, v. 69, p. 223-229, 2003.

ZLABINGER, G. J.; et al. Mode of action of coumarin in immune cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, S17-S18, 1994.