

## ESTUDOS *IN SILICO* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DA CUMARINA 2H-1-BENZOPIRANO-2-ONA SOBRE *Candida spp.*

Laísa Vilar Cordeiro<sup>1</sup>  
Helivaldo Diógenes da Silva Souza<sup>2</sup>  
Maria das Neves da Silva Neta<sup>3</sup>  
Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>4</sup>

### RESUMO

As candidíases estão associadas a uma ampla variedade de manifestações clínicas. Seu tratamento farmacológico está restrito a poucas classes de medicamentos antifúngicos, os quais apresentam efeitos tóxicos indesejáveis e estão associados cada vez mais a altas taxas de resistência antifúngica. Faz-se necessário o desenvolvimento de novas classes de antifúngicos e, nesse contexto, destaca-se a cumarina, a qual é um metabólito secundário que apresenta uma vasta gama propriedades farmacológicas, como antifúngico, antibacteriano, anticâncer e dentre outros. O objetivo de trabalho foi avaliar a atividade da cumarina 2H-1-benzopirano-2-ona contra as leveduras do gênero *Candida* e sua potencialidade teórica. Nos estudos *in silico*, a cumarina apresentou melhores resultados quando comparados com os da droga-padrão anfotericina B e sugere-se que a cumarina tenha potencial para ser um bom candidato a fármaco. Além disso, a cumarina apresentou *in vitro* atividade antifúngica classificando-se de forte a moderada, com um CIM variando entre 256 a 1024 µg/mL e comportamento fungistático. Mais estudos são necessários a fim de investigar o mecanismo de ação da molécula e também verificar sua atividade *in vivo*. A cumarina apresenta bom potencial antifúngico e pode inclusive ser alvo de modificações moleculares que visem aprimorar sua atividade antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Cumarina, antifúngico, *Candida spp.*

### INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento gradual de doenças infecciosas causadas por microrganismos levando a taxas consideráveis de morbidade e mortalidade, principalmente devido à baixa efetividade dos medicamentos disponíveis e ao aumento e desenvolvimento de cepas resistentes (GUO et al., 2015, p. 358-364). Paralelamente, progressos significativos

<sup>1</sup> Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba- UFPB, [laisavilar@gmail.com](mailto:laisavilar@gmail.com);

<sup>2</sup> Pós Doutorando em Química Orgânica pela Universidade Federal da Paraíba- UFPB, [helivaldog3@gmail.com](mailto:helivaldog3@gmail.com);

<sup>3</sup> Mestranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba- UFPB, [neves\\_neta@hotmail.com](mailto:neves_neta@hotmail.com);

<sup>4</sup> Professora Doutora orientadora vinculada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba- UFPB, [edelolima@yahoo.com.br](mailto:edelolima@yahoo.com.br).

foram realizados no desenvolvimento de novas moléculas bioativas para diagnosticar e tratar as doenças causadas por microrganismo.

Microrganismos resistentes (incluindo bactérias, vírus e alguns parasitas) são capazes de resistir ao ataque de medicamentos antimicrobianos e passaram a ser uma preocupação e problema mundial complexo, sério e desafiador. Com base em informações coletadas em mais de 114 países, a OMS, Organização Mundial de Saúde, fez esse alerta oficial em seu primeiro relatório global sobre o problema.

As candidíases estão associadas a uma ampla variedade de manifestações que variam de infecções superficiais e da mucosa a infecções amplamente disseminadas e da corrente sanguínea. Infecções graves causadas por *Candida* spp. são geralmente referidas como candidíase invasiva (CI) e constituem um grande problema de saúde em pacientes hospitalares e imunocomprometidos, apresentando grandes índices de morbidade e mortalidade. Estimativas globais sugerem que a candidíase invasiva ocorre em mais de um quarto de milhão de pacientes todos os anos com taxas de incidência para candidemia de 2-14 por 100.000 habitantes em estudos de base populacional. A candidemia é a terceira ou quarta causa mais comum de infecção da corrente sanguínea (ICS) e é uma das principais causas de ICSs nas unidades de terapia intensiva (UTI). Existem pelo menos 15 espécies distintas de *Candida* que causam doenças humanas, mas cerca de 90% das doenças invasivas são causadas por estas cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei* (MCCARTY; PAPPAS, 2016, p. 103; PAPPAS et al., 2016, p. e1).

Um número limitado de agentes antifúngicos está disponível para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., principalmente para as candidíases invasivas. Dentre as opções disponíveis estão as equinocandinas (casposfungina, micafungina ou anidulafungina), fluconazol e anfotericina B (PAPPAS et al., 2016, p. e1-e50). Nenhuma nova classe de antifúngicos foi introduzida no mercado desde 2006, quando a Agência Europeia de Medicamentos e a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovaram anidulafungina. Além de problemas relacionados à resistência das leveduras aos antifúngicos disponíveis atualmente, estes fármacos têm várias limitações devido aos seus perfis de segurança, propriedades farmacocinéticas, indesejáveis efeitos colaterais, e reduzido espectro de atividade e alvos farmacológicos que impactam diretamente no tratamento clínico (FUENTEFRÍA et al., 2017, p. 2-13).

Os produtos naturais têm sido confirmando como uma excepcional fonte de moléculas biologicamente ativas antes mesmo das moléculas sintéticas. No mundo contemporâneo, o mercado dos produtos naturais vem aumentando em média de 20% ao ano. Muitas moléculas

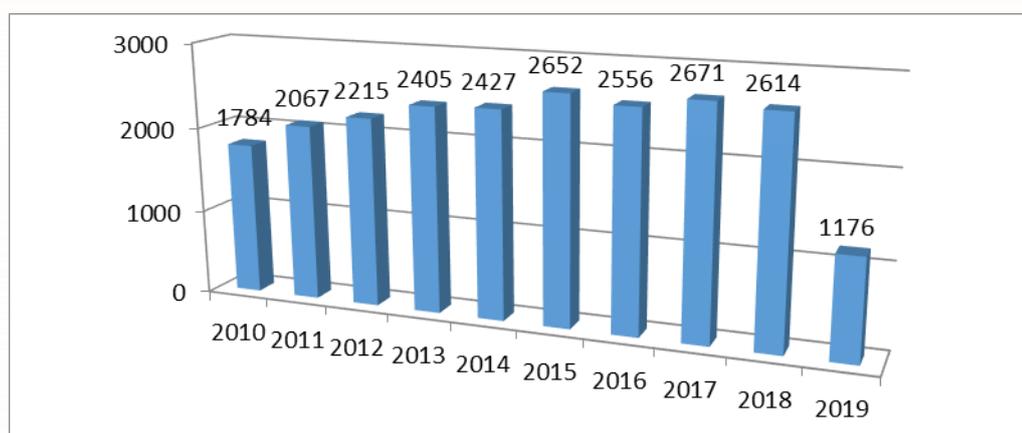
biologicamente ativas podem ser encontradas em plantas, bactérias e fungos para a análise de suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Entretanto essas moléculas existem em baixas concentrações na maior parte dos organismos vivos, dessa forma exigem quantidades maiores para uma averiguação terapêutica mais elaborada.

Dentre as moléculas biologicamente ativas estão as cumarinas. As cumarinas isoladas em 1820 por Vogel na espécie *Coumarona odorata* (RIBEIRO e KAPLAN, 2002, p. 533-538), compõem uma classe de metabólitos secundários largamente compartilhados nos reinos vegetais e podendo ser encontrados em fungos e bactérias e possuem mais de 1400 tipos descobertas e caracterizadas. As cumarinas podem ser encontradas em diversas famílias do reino vegetal, como na *Papilionaceae (Fabaceae)*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Poaceae*, *Umbelliferae* e principalmente na *Apiaceae* e *Rutaceae*, nas quais são mais abundantes. Sua concentração é maior em frutos, sementes e raízes (SANTOS, SIQUEIRA, SILVA-FILHO, 2013, p. 1303-1307).

Os estudos das propriedades químicas e biológicas da cumarina e de seus derivados vêm se destacando nas últimas décadas. A cada ano os números de atividades científicas com esses compostos estão expandindo extraordinariamente, como pode ser analisado a partir das informações extraídas do Scifinder Scholar® (<http://www.cas.org/products/scifinder/>) que registra entre os anos de 2010 até 2019 com mais de 22 mil artigos relacionados à cumarina e seus derivados.

Na figura 1 (Fig. 1) está demonstrado o número de publicações entre os anos de 2010 até 2019 envolvendo a cumarina e seus derivados. O gráfico não é totalmente linear. Verifica-se um aumento de **2010** (1784 artigos) para **2015** (2652 artigos), logo após uma diminuição, de **2015** para **2016** (2556 artigos), seguida de um aumento gradual de **2016** para **2017** (2671 artigos). Novamente ocorre uma redução de **2017** até **2019** (1176 artigos).

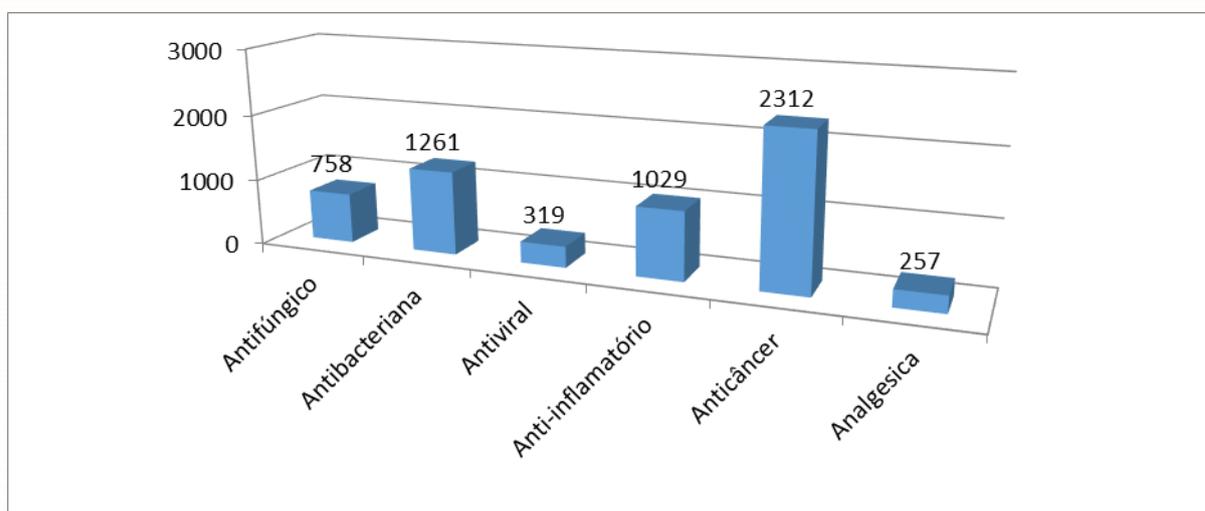
**Figura 1:** Número de publicações entre os anos de 2010 até 2019 sobre cumarina e seus derivados.



Fonte: Autoria Própria (2019)

A repercussão dos compostos envolvendo o núcleo da cumarina na química medicinal pode ser conferido pelos resultados demonstrados na busca por atividades farmacológicas na base de informações do Scifinder Scholar<sup>®</sup>. Entre os anos de 2010-2019 contabilizam mais de 5 mil artigos com estudos com atividades como, antifúngico, antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, analgésico, sendo que, mais de 2 mil artigos são relacionados à atividade anticâncer (Fig. 2).

**Figura 2:** Número de publicações com relacionado à cumarina no período de 2010-2019 referentes às atividades farmacológicas.



Fonte: Autoria Própria (2019)

Na literatura relatam-se várias atividades farmacológicas associadas às cumarinas, tanto sintética como a partir da extração de produtos naturais. Entres esses trabalhos, destacam-se alguns que além de mostrarem o efeito da cumarina, evidenciaram também o efeito de seus derivados.

Estudos *in vitro* têm demonstrado o enorme potencial antimicrobiano das cumarinas e dos derivados. Singh et al. (2015, p. 128-134) relataram a síntese e a atividade antimicrobiana contra duas espécies Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e quatro Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*), com Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 1.95-200 µg/mL. Al-Amiery et al. (2012, p. 5713-5723) verificaram a atividade antifúngica contra cepas de *Aspergillus niger* e *Candida albicans* as quais exibiram ótimos resultados quando comparados

com o fluconazol, a droga padrão. Karakaya et al. (2019) isolaram cumarinas de quatro espécies de *Ferulago* da Turquia e verificaram a atividade contra cepas de *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*, e *S. aureus*, que exibiram valores de concentração inibitória mínima de 62.5 µg/mL.

Portanto, levando-se em consideração o potencial da cumarina no processo para o desenvolvimento de candidatos a fármacos, o objetivo desse trabalho foi submeter a cumarina 2H-1-benzopirano-2-ona a estudos *in vitro* de atividade antifúngica contra as leveduras do gênero *Candida* e avaliar teoricamente sua viabilidade para se tornar novo candidato a fármaco a partir de um estudo *in silico* obedecendo à regra de Lipinski, utilizando programas disponíveis gratuitamente.

## METODOLOGIA

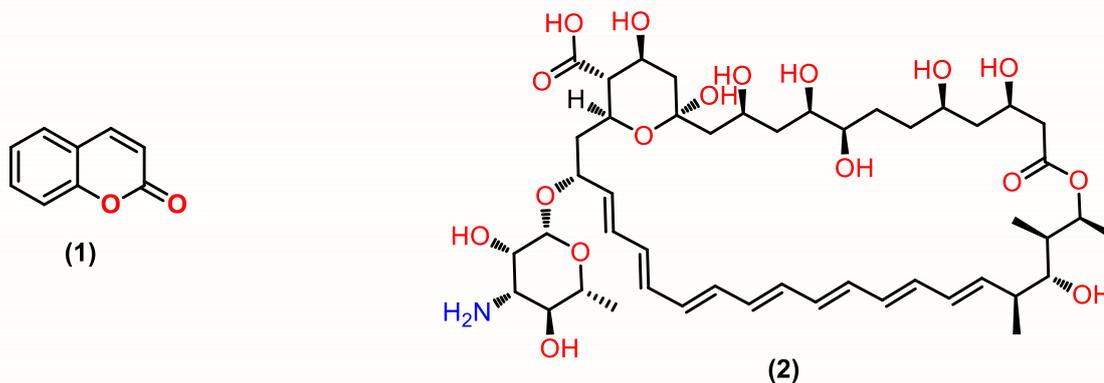
### Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes a este estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) Universidade Federal da Paraíba (UFPB) no período de abril a maio de 2019, sob coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima.

### Estudos *in silico*

Os parâmetros da regra dos cinco de Lipinski (cLog P, massa molecular, número de aceptores de ligações de hidrogênio e doadores de ligações de hidrogênio), Área de Superfície Polar Topológica (TPSA), solubilidade aquosa (Log S), druglikeness, drug score e número de ligações rotáveis foram calculados utilizando os programas livres online Molinspiration (<http://www.molinspiration.com>), SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) e Osiris Property Explorer ([www.organicchemistry.org/prog/peo/](http://www.organicchemistry.org/prog/peo/)) com o objetivo de analisar e comparar a cumarina 2H-1-benzopirano-2-ona (**1**) com droga padrão anfotericina B (**2**) (Fig. 3).

**Figura 3:** Estrutura da Cumarina (1) e da Anfotericina B (2)



Fonte: Autoria Própria (2019)

### Atividade antifúngica

Foi avaliada a atividade antifúngica da cumarina 2H-1-benzopirano-2-ona adquirida comercialmente da empresa Sigma-Aldrich/Merck<sup>®</sup>. A substância foi pesada e devidamente solubilizada em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL (PEREIRA, 2015, p. 229).

### Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para manutenção das cepas fúngicas foi Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltd, USA, France). Para os ensaios de atividade antimicrobiana, foi usado meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (INLAB, São Paulo, Brasil). Ambos os meios foram preparados conforme as recomendações dos respectivos fabricantes.

### Micro-organismos

Foram utilizados os isolados clínicos *Candida albicans* LM-111, *Candida albicans* LM-122, *Candida tropicalis* LM-04, *Candida tropicalis* LM-06, *Candida krusei* LM-656 e *Candida krusei* LM-13. Como cepas-padrão, utilizou-se *Candida albicans* ATCC-76645 e *Candida tropicalis* ATCC 13803. Os micro-organismos pertencem à MICOTECA do

Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em ASD à temperatura de 4°C. Para utilização nos ensaios, as leveduras foram repicadas em ASD com incubação a 35±2°C durante 24-48h.

### Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas recentes dos microorganismos em meio ASD foram suspensas em solução fisiológica estéril a 0,9% e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de Mc Farland para obtenção de 10<sup>6</sup> UFC/mL (CLSI, 2015).

### Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos recomendados (CLSI, 2015). A determinação da CIM das substâncias sobre cepas fúngicas foi realizada através da técnica de microdiluição em meio líquido em placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100µL de caldo RPMI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100µL da substância foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024µg/mL até 16µg/mL. Por fim, foram adicionados 10µL das suspensões das cepas fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles para comprovação de viabilidade das cepas (RPMI + leveduras) e esterilidade do meio de cultura (RPMI). Também foi feito o controle negativo com anfotericina B (32µg/mL) para inibição dos fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de 35±2°C por 24 - 48 horas. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano.

A avaliação dos resultados obtidos foi feita conforme análise realizada por Peixoto et al. (2016 p. 1812) que classificou o potencial antimicrobiano de produtos vegetais com base nos resultados da CIM, considerando como forte poder antimicrobiano os produtos com CIM

até 500µg/mL, moderado poder antimicrobiano aqueles com CIM entre 600 e 1500µg/mL e de fraco poder antimicrobiano os produtos com CIM acima de 1600µg/mL.

### Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da concentração fungicida mínima foi feita conforme metodologia estabelecida por Pinheiro et al. (2017, p.116). Após a leitura da CIM, alíquotas de 10µL dos sobrenadantes foram retiradas dos poços das placas de microdiluição nas concentrações correspondentes à CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8 da cumarina para cada cepa e inoculadas em novas placas de microdiluição contendo apenas meio RPMI. As placas foram incubadas a 35±2°C por 24 - 48 horas e em seguida foi observado o crescimento fúngico. A CFM foi definida como a menor concentração capaz de causar completa inibição do crescimento dos micro-organismos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### Estudo *in silico*

O processo de desenvolvimento de novos fármacos requer muito tempo e recurso. Os estudos teóricos têm papel fundamental para minimizar estes fatores pois apresentam indicativos de potencialidades de aplicação ou não como fármaco. Diversos autores citam que não basta um composto apresentar elevada atividade biológica e baixa toxicidade, para que ele possa ser testado como um fármaco, é necessário também atender aos parâmetros farmacocinéticos ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção), que determinam o acesso e a concentração do composto no alvo terapêutico e sua posterior eliminação do organismo (DAINA et al. 2017, p. 1-13; VEBER et al. 2002, p. 2615-2623; LIPINSKI et al. 2001, p. 3-26). Muitos candidatos a fármacos podem ser descartados por apresentarem uma farmacocinética desfavorável. Os parâmetros ADME podem ser verificados através de estudos *in silico*, com base em padrões físico-químicos calculados. Dentre estes padrões são enfatizados a lipofilicidade, solubilidade em água, tamanho da molécula e flexibilidade.

O estudo mais difundido foi o do pioneiro Lipinski et al. (1997, p. 3-25) que apresentou uma relação entre parâmetros farmacocinéticos e físico-químicos, indicando que uma determinada molécula terá alta potencialidade como fármaco se apresentar elevada

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

semelhança com fármacos já existentes, conhecido como *druglikeness*. Considerando tais fatores, Lipinski e colaboradores (1997, p. 3-25) propuseram um conjunto de regras que avaliam a biodisponibilidade oral de novas moléculas com potencial terapêutico, conhecida como “Regra dos Cinco de Lipinski” e que considera quatro parâmetros (cujos valores são múltiplos de 5) que identificam fármacos com possíveis problemas de absorção e permeabilidade, sendo eles: Massa Molar  $\leq 500$ g/mol; LogP  $\leq 5$ ; Número de aceptores de ligação de hidrogênio  $\leq 10$  (contabilizados em função de átomos de N ou O na molécula); Número de doadores de ligação de hidrogênio  $\leq 5$  (contabilizados em função de grupos NH ou OH na molécula).

Neste presente trabalho, decidimos investigar a potencialidade da cumarina 2H-1-benzopirano-2-ona a partir dos parâmetros de Lipinski usando a abordagem *in silico*. Outro fator importante é a porcentagem de absorção (% ABS) é calculada pela equação  $\%ABS = 109 - (0.345 \times TPSA)$  de acordo com Zhao et al (2002, p. 1446-1457). Os resultados podem ser vistos da tabela 1.

**Tabela 1:** Estudos *in silico* avaliando a regra de cinco de Lipinski da cumarina 2H-1-benzopirano-2-ona (1) e da anfotericina B (2).

Comp.	Lipinski Parameters						NLR	TPSA (Å) <sup>2</sup>	% ABS	Ali Log S	Ali Class	Drug <i>likeness</i>	Drug Score
	MW	DLH	ALH	milogP	nV								
1	146.15	0	2	2.01	0	0	30.21	98.57	-2.21	Muito	-1.83	0.12	
2	924.08	13	18	-2.49	3	3	319.61	0	-6.26	Pouco	-0.14	0.27	

Propriedades Físico-Químicas: MW = massa molecular, DLH = doadores de ligação de hidrogênio; ALH = aceptores de ligação de hidrogênio; milogP = coeficiente de partição octanol/água baseado no modelo do Molinspiration; nV = número de violação; NLR = número de ligações rotáveis; TPSA (Å)<sup>2</sup> = área de superfície polar topológica; %ABS = porcentagem de absorção; log S = coeficiente de solubilidade determinado pelo método de Ali calculado no SwissADME; Class = Insolúvel < -10 < Pouco < -6 < Moderado < -4 < Solúvel < -2 < Muito < 0 < Alto.

**Fonte:** Autoria Própria (2019)

De acordo com os resultados obtidos a partir da abordagem *in silico*, a cumarina 2H-1-benzopirano-2-ona (1) obedeceu à regra dos cinco de Lipinski. Segundo Veber et al. (2002, p.

2615-2623), compostos com TPSA menor ou igual a  $140 \text{ \AA}^2$  e um NLR menor ou igual a 10 apresentam alta probabilidade de boa disponibilidade oral. Desse modo, a cumarina se encaixa nessa descrição, uma vez que o TPSA foi de  $30.21 \text{ \AA}^2$  e o NLR foi de 0, exibindo uma alta perspectiva de ser empregado por meio oral. Esta descrição é confirmada em aplicação, uma vez que a anfotericina B possui um TPSA de  $319.61 \text{ \AA}^2$ , ou seja, acima de  $140 \text{ \AA}^2$  e sua aplicação é restrita ao uso intravenoso. Os resultados na tabela 1 indicam que a cumarina apresenta uma absorção alta (98%), enquanto que a anfotericina B a sua absorção é nula, na qual é confirmada pelo valor do TPSA.

A solubilidade em água é uma característica importante para a absorção e distribuição de fármacos no organismo. Os valores de Log S representam a solubilidade de acordo com a escala: insolúvel < -10 < pouco solúvel < -6 < moderado < -4 < solúvel < -2 < muito solúvel < 0 < altamente solúvel (ALI et al., 2012, p. 2950-2957). Foi observado que o valor de LogS para a cumarina foi de -2.21 (solúvel), enquanto da anfotericina B foi de -6.26 (pouco solúvel).

O *drug-likeness*, é um importante índice que indica se um determinado composto tem similaridade com fármacos já disponíveis comercialmente e, conseqüentemente, se um composto será um bom candidato a fármaco. Na tabela 1 observa-se que a cumarina possui um valor de -1.83 enquanto a anfotericina B possui um valor de -0.14. Valores positivos para o “*drug-likeness*” indicam que os compostos investigados possuem fragmentos e/ou propriedades físicas com a maioria dos fármacos comerciais. Dessa forma, a anfotericina B se aproxima mais dessa característica.

O valor de *drug score* combina registros de *drug-likeness*, lipofilicidade, solubilidade, massa molecular e riscos de toxicidade em um único valor numérico que varia de 0,0 a 1,0 e pode ser utilizado para prever o potencial global de um dado composto como candidato a novo fármaco. Os valores obtidos a partir dessa abordagem ficaram entre 0,12 para a cumarina e 0,27 e pode-se dizer que a cumarina tem o potencial de se tornar candidato a um novo fármaco.

#### Atividade antifúngica *in vitro*

Após análises dos ensaios *in vitro* de atividade antifúngica foi possível observar que a cumarina 2H-1-benzopirano-2-ona foi capaz de inibir o crescimento fúngico de todas as três espécies de *Candida* utilizadas nesse estudo: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. As

concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da cumarina variaram entre as diferentes cepas, como pode ser visualizado através da tabela 2.

Para *C. albicans* LM-111, *C. albicans* ATCC-76645 e *C. tropicalis* LM-06 a CIM da cumarina foi de 1024 µg/mL e classifica-se como moderada atividade antifúngica (Peixoto et al., 2016, p. 1812). Já para as cepas *C. albicans* LM-122, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. krusei* LM-13 a CIM foi de 512 µg/mL. Além disso, foi encontrada CIM de 256 µg/mL para *C. tropicalis* LM-04 e *C. krusei* LM-656. Para produtos naturais, determina-se como forte poder antimicrobiano quando CIM até 500 µg/mL, moderado poder antimicrobiano aqueles com CIM entre 600 e 1500 µg/mL e de fraco poder antimicrobiano os produtos com CIM acima de 1600 µg/mL (PEIXOTO et al., 2016, p. 1812).

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL) da cumarina

<i>Candida</i> spp.	CIM (µg/mL)		Controles	
	Cumarina	Anfotericina B	Viabilidade	Caldo
<i>C. albicans</i> LM-111	1024	-	+	-
<i>C. albicans</i> LM-122	512	-	+	-
<i>C. albicans</i> ATCC-76645	1024	-	+	-
<i>C. tropicalis</i> LM-04	256	-	+	-
<i>C. tropicalis</i> LM-06	1024	-	+	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	512	-	+	-
<i>C. krusei</i> LM-656	256	-	+	-
<i>C. krusei</i> LM-13	512	-	+	-

(-) Inibição do crescimento fúngico (+) Crescimento fúngico.

**Fonte:** Autoria Própria (2019)

A cumarina apresentou atividade antifúngica variando entre moderada a fraca, sobre as leveduras de *Candida* spp. utilizadas nesse estudo. Resultados semelhantes utilizando a 2H-1-benzopirano-2-ona foram encontrados por outros autores. Montagner et al. (2008, p. 26), utilizando também o método de microdiluição em caldo, verificaram CIM de 500 µg/mL da cumarina benzopirano-2-ona frente a *C. albicans* ATCC-14053. Por outro lado, Sardari et al. (1999, p. 1936) encontraram CIM > 1000 µg/mL contra a mesma cepa de *C. albicans* ATCC-

14053, embora tenham verificado boa atividade antifúngica da molécula contra as leveduras da espécie *Cryptococcus neoformans* (CIM = 500 µg/mL) e moderada atividade contra *Saccharomyces cerevisiae* (CIM = 1000µg/mL).

Com relação à concentração fungicida mínima (CFM), a cumarina apresentou valor de 8192µg/mL para *C. albicans* LM-111, *C. albicans* ATCC-76645, e *C. tropicalis* LM-06. Para *C. albicans* LM-122, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. krusei* LM-13 a CFM foi de 4096 µg/mL e de 2048 µg/mL para *C. tropicalis* LM-04 e *C. krusei* LM-656 (Tab. 2). Embora tenham sido encontrados valores variáveis, quando é feita a relação entre CIM/CFM tem-se o valor de 1:8 em todos estes casos, conforme mostrado na tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração Fungicida Mínima (CFM) (µg/mL) da cumarina

<i>Candida</i> spp.	CFM (µg/mL)	CIM:CFM	Efeito
<i>C. albicans</i> LM-111	8192	1:8	Fungistático
<i>C. albicans</i> LM-122	4096	1:8	Fungistático
<i>C. albicans</i> ATCC-76645	8192	1:8	Fungistático
<i>C. tropicalis</i> LM-04	2048	1:8	Fungistático
<i>C. tropicalis</i> LM-06	8192	1:8	Fungistático
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	4096	1:8	Fungistático
<i>C. krusei</i> LM-656	2048	1:8	Fungistático
<i>C. krusei</i> LM-13	4096	1:8	Fungistático

**Fonte:** Autoria Própria (2019)

Conforme explicado por Flamm et al. (2017, p. e00468-17) e Thwaites et al. (2018, p. e00236-18), uma razão CIM/CFM maior que 1:2 é indicativo de que a substância atue de modo fungistático. Já quando essa razão é igual ou menor que 1:2, o produto é considerado fungicida. A razão CIM/CFM da cumarina foi 1:8 para 100% das cepas analisadas neste estudo, dessa forma, os resultados sugerem que a cumarina possivelmente esteja atuando de modo fungistático sobre as cepas de *Candida* spp. analisadas neste estudo.

A cumarina apresenta bom potencial antifúngico, que torna interessante que hajam maiores estudos afim de esclarecer o seu mecanismo de ação sobre as células fúngicas. Além disso, estudos demonstram que o esqueleto base das cumarinas é passível de ser alvo de

alterações estruturais que podem aumentar a atividade antimicrobiana das moléculas dele derivadas (KHAN et al., p. 373-379, 2004; REHMAN et al., p. 333-340, 2005; AL-AMIERY; KADHUM; MOHAMAD, p. 5713-5723, 2012; KHARB; KAUR; SHARMA, p. 87-94, 2013).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho descrevemos a avaliação *in silico* e antifúngica da cumarina. No estudo *in silico* a cumarina não viola a regra de Lipinski, possui uma alta permeabilidade, alta absorção e um perfil desejável para ser um novo candidato a medicamento. No estudo antifúngico *in vitro* a cumarina apresentou capacidade de atuar contra leveduras do gênero *Candida*, com um CIM variando entre 256 a 1024 µg/mL e comportamento fungistático. Mais estudos são necessários a fim de verificar sua atividade *in vivo*, bem como investigar o mecanismo de ação da molécula, a qual pode inclusive ser alvo de modificações moleculares que visem aprimorar sua atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

AL-AMIERY, A. A.; KADHUM, A. A. H.; MOHAMAD, A. B. Antifungal Activities of New Coumarins. **Molecules**, v. 17, p. 5713-5723, 2012.

ALI, J.; CAMILLERI, P.; BROWN, M. B.; HUTT, A. J.; KIRTON, S. B.; In Silico Prediction of Aqueous Solubility Using Simple QSPR Models: The importance of Phenol and Phenol-like moieties. **Journal of Chemical Information and Modeling**. v.52, n. 11, p. 2950-2957, 2012.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**. V. 7, p. 1-13. 2017.

FLAMM, R. K.; FARRELL, D. J.; RHOMBERG, P. R.; SCANGARELLA-OMAN, N. E.; SADER, H. S. Gepotidacin (GSK2140944) *In Vitro* Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00468-17, 2017.

FUENTEFRIA, A. M.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, K. K.; ANDRADE, S. F. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in applied microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2018.

GUO, W., HE, Q., WANG, Z., WEI, M., YANG, Z., DU, Y., HE, J. Influence of antimicrobial consumption on gram-negative bacteria in inpatients receiving antimicrobial resistance therapy from 2008-2013 at a tertiary hospital in Shanghai, China. **American Journal of Infection Control**, v. 43, n. 4, p. 358-364, 2015.

KARAKAYA, S.; SIMSEK, D.; ÖZBEK, H.; GÜVENALP, Z.; ALTANLAR, N.; KAZAZ, C.; KILIÇ, C. S. Antimicrobial Activities of Extracts and Isolated Coumarins from the Roots of Four *Ferulago* Species Growing in Turkey. **Iranin Journal of Pharmaceutical Research**.

KHAN, K. M.; SAIFY, Z. S.; KHAN, M. Z.; CHOUDHARY, Z. M. I.; ATTA-UR-RAHMAN; PERVEEN, S.; CHOHAN, Z. H.; SUPURAN, C. T. Synthesis of Coumarin Derivatives with Cytotoxic, Antibacterial and Antifungal Activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 373-379, 2004.

KHARB, R.; KAUR, M.; SHARMA, A. K. Imperative advances on antimicrobial activity of coumarin derivatives. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 20, p. 87-94, 2013.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.

MONTAGNER, C.; SOUZA, S. M.; GROPOSO, C.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, E. F. A.; JÚNIOR, A. S. Antifungal activity of coumarins. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 21-28, 2008.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2015.

PEIXOTO, I. N.; SOUZA, H. D. S.; LIRA, B. F.; SILVA, D. F.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis and Antifungal Activity Against Candida Strains of Mesoionic System Derived From 1, 3-Thyazolium-5-thiolate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1807-1813, 2016.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 2, p. 228-234, 2015.

PINHEIRO, L. S.; FILHO, A. A. O.; GUERRA, F. Q. S.; MENEZES, C. P.; SANTOS, S. G.; SOUSA, J. P.; DANTAS, T. B.; LIMA, E. O. Antifungal activity of the essential oil isolated from *Laurus nobilis* L. against *Cryptococcus neoformans* strains. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 5, p.115-18, 2017.

REHMAN, S. U.; CHOCHAN, Z. H.; GULNAZ, F.; SUPURAN, C. T. In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 333-340, 2005.

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendências Evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em Angioptermae. **Química Nova**. v. 24, n. 4, p. 533-538, 2002.

SANTOS, W. H.; SIQUEIRA, M. S.; SILVA-FILHO, L. C. Síntese de derivados 4-aril-3,4-di-hidrocoumarínicos catalisada por NbCl<sub>5</sub>. **Química Nova**. v. 36, n.9, p. 1303-1307, 2013.

SARDARI, S.; MORI, Y.; HORITA, K.; MICETICH, R. G.; NISHIBE, S.; DANESHTALAB, M. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 7, n. 9, p. 1933-1940, 1999.

SINGH, L. K.; SINGH, V.; KATIYAR, D. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Some New Coumarin Derivatives as Potent Antimicrobial Agents. **Medicinal Chemistry**. v. 11, p. 128-134, 2015.

THWAITES, M.; HALL, D.; SHINABARGER, D.; SERIO, A. W.; KRAUSE, K. M.; MARRA, A.; PILLAR, C. Evaluation of the Bactericidal Activity of Plazomicin and Comparators against Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 62, n. 8, p. e00236-18, 2018.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. U.; SMITH, B. R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral Bioavailability of Drug candidates. **Journal of Medical Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

ZHAO Y, ABRAHAM MH, LEE J, HERSEY A, LUSCOMBE NC, BECK G, SHERBONE, B. COOPER I. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. **Pharmaceutical Research**. v. 19, p. 1446-1457, 2002.