

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DA CUMARINA 2H-1-BENZOPIRANO-2-ONA

Laísa Vilar Cordeiro¹
Fernanda Silva Soares²
Francinara da Silva Alves³
Maria das Neves Silva Neta⁴
Edeltrudes de Oliveira Lima⁵

RESUMO

A classe das cumarinas apresenta uma ampla gama de atividades farmacológicas. Entre elas, tem-se destacado a atividade antimicrobiana. Diante do atual contexto, onde faz-se necessária a busca por novas classes de medicamentos antibacterianos para combater o crescente número de micro-organismos resistentes em todo o mundo, as cumarinas surgem como um potencial alvo para estudos de investigação da sua atividade antibacteriana. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar estudos *in vitro* de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da cumarina 2H-1-Benzopirano-2-ona sobre bactérias Gram-positivas e negativas. Foi encontrada CIMs entre 128 e 1024µg/mL, que classificam o produto como de forte a moderada atividade antibacteriana e a CBM encontrada sugere que este esteja atuando de modo bacteriostático. Mais estudos são necessários a fim de verificar a atividade *in vivo* da cumarina, bem como investigar o mecanismo de ação da molécula, a qual pode inclusive ser alvo de modificações moleculares que visem aprimorar sua atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Cumarina, 2H-1-Benzopirano-2-ona, Antibacteriano, CIM, CBM.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou em 2017 um alerta sobre a escassez de tratamentos farmacológicos disponíveis para o tratamento de infecções por bactérias resistentes. Lançou também uma lista das mais importantes bactérias para as quais há a necessidade urgente de desenvolver novos tratamentos, que foi dividida em três níveis de necessidade de desenvolvimento de antibióticos: crítico, alto e médio. O grupo crítico é composto essencialmente por Gram-negativas. Os especialistas utilizaram como base para construção deste documento critérios como mortalidade, prevalência da resistência e transmissibilidade. (WHO, 2017). Autoridades de saúde do mundo inteiro estão em busca de

¹ Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (PNSB)-UFPB, laisavilar@email.com;

² Graduanda pelo Curso de Química Industrial pela UFPB, fernandaqi@hotmail.com;

³ Mestranda em Química pela UFPB, francinaraufpb@gmail.com ;

⁴ Mestranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB, neves_neta@hotmail.com;

⁵ Professora Doutora orientadora vinculada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB, edelolima@yahoo.com.br.

soluções para esta crise e ressaltam a urgência em conhecer mais sobre os antibióticos a fim de descobrir novas alternativas para o tratamento das infecções bacterianas (PIDDOCK, 2017, p. 639-640). Nesse contexto, as plantas constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas como agentes medicinais, por possuírem uma grande variedade de componentes ativos, produzidos a partir do seu metabolismo, que são capazes de inibir o crescimento de patógenos (HARVEY et al., 2015, p. 111–129).

Dentre os produtos naturais biologicamente ativos estão a classe das cumarinas. As cumarinas foram 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. Relatam-se várias atividades farmacológicas associadas às cumarinas, tanto sintética como a partir da extração de produtos naturais. Com relação à atividade antibacteriana, tem-se verificado bom potencial antimicrobiano dessa classe contra cepas Gram-positivas e negativas (SINGH et al., 2015, p. 128-134; AL-AMIERY; KADHUM; MOHAMAD, p. 5713-5723, 2012; KARAKAYA et al., 2019) o que torna interessante que hajam maiores estudos afim de esclarecer o seu mecanismo de ação. 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).

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar estudos *in vitro* de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da cumarina 2H-1-Benzopirano-2-ona sobre cepas Gram-positivas e Gram-negativas, a fim de investigar sua ação sobre diferentes espécies bacterianas e poder contribuir para viabilização de estudos posteriores de investigação do mecanismo de ação antibacteriano das cumarinas,

bem como para estudos que visem utilizar a 2H-1-Benzopirano-2-ona como molécula-base para futuras modificações estruturais e assim aprimorarem sua atividade antibacteriana.

METODOLOGIA

Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes a este estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisa: 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 maio a junho de 2019, sob coordenação da Prof.^a Dr.^a Edeltrudes de Oliveira Lima.

Produtos testados

Foi avaliada a atividade antibacteriana da cumarina 2H-1-Benzopirano-2-ona (Sigma-Aldrich/Merck) e a substância foi pesada e devidamente solubilizados 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 do produto na concentração inicial de 1024 μ g/mL (Pereira et al., 2014; Pinheiro et al., 2017). Como controle, foi utilizado o antibacteriano-padrão ciprofloxacino, o qual foi preparado seguindo os mesmos procedimentos, mas a uma concentração final de 64 μ g/mL.

Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para manutenção das cepas e nos ensaios de atividade biológica foi Brain Heart Infusion (BHI) adquirido da Difco Laboratories Ltd, USA, France, o qual foi preparado conforme a descrição do fabricante sob condições de esterilidade.

Micro-organismos

Foram utilizadas oito linhagens bacterianas, entre micro-organismos de origem clínica e cepas-padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Bacillus subtilis* ATCC-6633,

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

Staphylococcus aureus ATCC-25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC-12228, *Escherichia coli* ATCC-18739, *Escherichia coli* LM-35, *Proteus mirabilis* ATCC-25933, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027, *Salmonella spp.* LM-90. As bactérias pertencem à MICOTECA do Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (DCF/CCS/UFPB) e foram mantidas em BHI à temperatura de 4°C. Para utilização nos ensaios foram feitos repiques recentes das cepas e encubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48h.

Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas das culturas bacterianas em meio BHI 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 10^6 UFC/mL (CLSI, 2015; Freire et al., 2014).

Concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos estabelecidos pelo CLSI (2015). A determinação da CIM da cumarina 2H-1-Benzopirano-2-ona sobre as cepas bacterianas 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 BHI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100µL da emulsão de cumarina foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa e, por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024µg/mL até 4µg/mL. fim, foi adicionado 10µL das suspensões das cepas bacterianas nas cavidades. Também foi realizado o controle de viabilidade das cepas, esterilidade do meio de cultura e diluentes. Como controle de atividade antibacteriana positivo foi ciprofloxacino (64µg/mL). As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Em seguida foi adicionado 20µL de solução do corante resazurina a 0,01% (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução. Após incubação durante 1-2h, foi realizada a leitura. Bactérias viáveis reduziram o corante, mudando a coloração do azul

para rosa. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador (Elshikh et al., 2016).

A avaliação dos resultados obtidos para a cumarina foi feita conforme análise realizada por Peixoto et al. (2016) 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 bactericida mínima (CBM)

A determinação da concentração bactericida mínima foi feita conforme metodologia estabelecida por Pinheiro et al. (2017). 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 de cada produto para cada cepa e inoculadas em novas placas de microdiluição contendo apenas meio BHI. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e em seguida foi observado o crescimento bacteriano. A CBM foi definida como a menor concentração capaz de causar completa inibição do crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme observado na tabela 1, a cumarina 2H-1-Benzopirano-2-ona apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 128µg/mL frente a *Bacillus subtilis* ATCC-6633 e *Escherichia coli* LM-35. Sobre *Escherichia coli* ATCC-18739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027 e *Salmonella spp.* LM-90 a CIM foi de 256µg/mL. A CIM da cumarina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 e *Proteus mirabilis* ATCC-25933 foi de 512µg/mL e contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC-12228 foi de 1024µg/mL.

Para produtos naturais, determina-se como forte poder antimicrobiano quando CIM é igual ou menor que 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 (PEIXOTO et al., 2016, p. 1812). Assim, a cumarina classifica-se como uma molécula com

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

atividade antibacteriana entre forte a moderada, tanto contra cepas Gram-positivas como contra Gram-negativas.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) da cumarina sobre cepas bacterianas

Micro-organismos	CIM (µg/mL)	Controles		
	Cumarina	CIP	MO	EST
<i>B. subtilis</i> ATCC-6633	128	-	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC-25923	512	-	+	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	1024	-	+	-
<i>E. coli</i> ATCC-18739	256	-	+	-
<i>E. coli</i> LM-35	128	-	+	-
<i>P. mirabilis</i> ATCC-25933	512	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	256	-	+	-
<i>Salmonella spp.</i> LM-90	256	-	+	-

CIP: ciprofloxacino (62µg/mL); MO: controle de viabilidade de crescimento; EST: controle de esterilidade do meio de cultura, (+): crescimento bacteriano, (-): inibição do crescimento bacteriano.

Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado o enorme potencial antimicrobiano das cumarinas e seus derivados. Singh et al. (2015, p. 128-134) relataram 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.

A fim de verificar se a cumarina estava atuando de modo bacteriostático ou bactericida sobre as cepas analisadas, foi realizado o ensaio *in vitro* para determinação da Concentração

Bactericida Mínima (CBM) (tabela 2). A cumarina apresentou CBM > 1024µg/mL frente a *B. subtilis* ATCC-6633 e *E. coli* LM-35. Sobre *E. coli* ATCC-18739, *P. aeruginosa* ATCC-9027 e *Salmonella spp.* LM-90 a CBM foi > 2048µg/mL. Contra *S. aureus* ATCC-25923 e *P. mirabilis* ATCC-25933 foi de > 4096µg/mL e contra *S. epidermidis* ATCC-12228 foi >8192µg/mL.

Tabela 2 – Concentração Bactericida Mínima (CBM) da cumarina sobre cepas bacterianas

Micro-organismos	Cumarina		
	CBM	CIM:CBM	Efeito
<i>B. subtilis</i> ATCC-6633	> 1024µg/mL	> 1:8	Bacteriostático
<i>S. aureus</i> ATCC-25923	> 4096µg/mL	> 1:8	Bacteriostático
<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	> 8192µg/mL	> 1:8	Bacteriostático
<i>E. coli</i> ATCC-18739	> 2048µg/mL	> 1:8	Bacteriostático
<i>E. coli</i> LM-35	> 1024µg/mL	> 1:8	Bacteriostático
<i>P. mirabilis</i> ATCC-25933	> 4096µg/mL	> 1:8	Bacteriostático
<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	> 2048µg/mL	> 1:8	Bacteriostático
<i>Salmonella spp.</i> LM-90	> 2048µg/mL	> 1:8	Bacteriostático

Embora tenham sido encontrados valores variáveis de CBM, quando é feita a relação entre CIM/CBM tem-se um resultado > 1:8 para todas as cepas analisadas. 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 bacteriostático. Já quando essa razão é igual ou menor que 1:2, o produto é considerado bactericida. A razão CIM/CFM da cumarina foi 1:8 para 100% das cepas utilizadas neste estudo, dessa forma, os resultados sugerem que a cumarina possivelmente esteja atuando de modo bacteriostático sobre as cepas analisadas neste estudo.

A cumarina apresenta bom potencial antibacteriano, que torna interessante que hajam maiores estudos afim de esclarecer o seu mecanismo de ação. 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

Foi observada boa atividade antibacteriana da cumarina, a qual apresentou capacidade de atuar contra diferentes espécies bacterianas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, com um CIM variando entre 128 a 1024 μ g/mL. Também foi identificado que a cumarina possivelmente atue de modo bacteriostático sobre estes micro-organismos. 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.

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.

ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**. v. 38, p. 1015-1019, 2016.

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.

FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16 n.2, 2014.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 14, n. 2, p. 111–129, 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.

PEIXOTO, R. M.; SILVA, W. E. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BRANCO, A.; COSTA, M. M. Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against *Staphylococcus* spp. isolates from small ruminants with mastitis. **Revista Caatinga**. v. 29, n.3, p. 758-763, 2016.

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. 1–7, 2014.

PIDDOCK, L. J. V. Understanding drug resistance will improve the treatment of bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**. v. 15, n. 11, p. 639-640, 2017.

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.; CHOHAN, 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 Angiopermae. **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-hidroumarínicos catalisada por NbCl₅. **Química Nova**. v. 36, n.9, p. 1303-1307, 2013.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>>. Acesso em: 31/06/2019.