

## SOLUBILIZAÇÃO DA CUMARINA EM MEIO AQUOSO E DETERMINAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

## COUMARIN SOLUBILIZATION IN AQUEOUS MEDIUM AND DETERMINATION OF THE ITS ACTIVITY ANTIBACTERIAL

Milene Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Greicy Mara Mengue Feniman-De-Stefano<sup>2</sup>, Otávio Akira Sakai<sup>3</sup>, Flavio Augusto Vicente Seixas<sup>4</sup>, Cristiane Mengue Feniman Moritz<sup>5</sup>

### RESUMO

A pesquisa teve como objetivo estabelecer o menor grau etanólico para a solubilização da cumarina em meio aquoso e avaliar a sua atividade antibacteriana. Avaliou-se a solubilidade em água destilada e soluções etanólicas 10%, 30%, 50% e 70%, sendo estabelecida a solução etanólica a 30%, como solvente. As concentrações 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 2µg/mL (p/v) de cumarina foram testadas pelo método da microdiluição contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (ATCC 13311), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhi (ATCC 19214) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). A solução etanólica a 30% de cumarina teve efeito inibitório significativo para bactérias Gram positivas, apresentando CIM <2µg/mL para *S. epidermidis*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*.

**Descritores:** Cumarínicos; Solubilidade; Antibacterianos

### ABSTRACT

The research aimed to establish the lowest degree ethanolic to solubilize the coumarin in aqueous and to evaluate its antibacterial activity. It was evaluated the solubility in distilled water and solutions ethanolic 10%, 30%, 50% and 70%, it is set at 30% ethanolic solution as a solvent.. The concentrations of 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, and 2µg/mL (w/v) of coumarin were tested by the microdilution method against bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (ATCC 13311), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhi (ATCC 19214) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022). The ethanolic solution at 30% of coumarin has significant inhibitory effect on Gram positive bacteria, showing MIC <2µg/mL for *S. epidermidis*, *B. cereus* and *L. monocytogenes*.

**Descriptors:** Coumarin; Solubility; Antibacterials

<sup>1</sup> Graduada em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), Umuarama, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Doutor em Física pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil.

<sup>4</sup> Doutor em Biofísica Molecular pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Doutora em Biologia Geral e Aplicada pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

## Introdução

As plantas medicinais são objetos de pesquisa científica na tentativa de descoberta de novos princípios ativos. São plantas assim denominadas por apresentarem propriedades curativas e/ou preventivas para determinadas doenças<sup>1</sup>.

As ações biológicas dos produtos naturais estão diretamente relacionadas à diversidade química que apresentam<sup>2</sup> e a biossíntese dos metabólitos secundários, conseqüentemente, os seus princípios ativos<sup>3</sup>.

As substâncias produzidas pelos vegetais são classificadas como metabólitos primários e secundários. No primeiro caso, são assim chamadas por serem essenciais à manutenção da vida celular, e no segundo, acreditava-se que eram produtos de degradação do metabolismo, sem finalidade específica, cuja concentração ocorria em função do seu acúmulo citoplasmático. Entretanto, atualmente os metabólitos secundários são considerados como consequência de uma alta capacidade de diferenciação e especialização celular, sendo sintetizados com uma finalidade específica no vegetal, e que são responsáveis pela manutenção de processos vitais para a perpetuação da espécie, tais como atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, proteção contra os raios UV, defesa contra herbívoros e micro-organismos, controles hídricos e térmicos do vegetal, controle da ação de hormônios vegetais, efeitos alelopáticos (capacidade de causar um efeito sobre outros organismos ao liberar uma determinada substância no meio ambiente) e ação antioxidante<sup>4</sup>.

Todavia, os antimicrobianos tradicionais não têm sido encontrados por uma pesquisa sistemática, mas por uma combinação de coincidências e observações, ou seja, por tentativa e erro. Desse modo, pode-se inferir que as pesquisas científicas para novos antimicrobianos progrediram em duas linhas principais: etnofarmacologia (ervas medicinais, substâncias de abuso e venenos) e toxicologia (plantas venenosas, animais peçonhentos e venenos de peixes). Historicamente, as plantas são as fontes mais importantes para os produtos naturais<sup>5</sup>.

O gênero *Mikania*, popularmente conhecido como guaco, tem sido associado às ações expectorante e antigripal<sup>6</sup>, alelopatia de sementes de alface<sup>7</sup>, ação anti-inflamatória<sup>8</sup>, além de atividades broncodilatadoras, antialérgicas, antiasmáticas, antiulcerogênicas e relaxantes da musculatura lisa<sup>9</sup>. No entanto, ressalta-se a importância de verificar outras atividades biológicas de *M. glomerata* Sprengel, assim como a cumarina - o principal metabólito encontrado no guaco, presente principalmente nas folhas. A cumarina apresenta ações biológicas tradicionalmente conhecidas para o tratamento de doenças respiratórias, devido às ações broncodilatadora, expectorante, antiinflamatória e antialérgica, tornando o guaco um potente fitoterápico contra asma e bronquite<sup>1</sup>.

Há mais de 1300 tipos de cumarinas identificadas, distribuídas em mais de 30 famílias, totalizando sua presença em cerca de 150 espécies na natureza<sup>10</sup>.

Estruturalmente as cumarinas são lactonas do ácido o-hidróxi-cinâmico, sendo o representante mais simples a cumarina (1,2-benzopirona). A palavra cumarina é originada do caribenho *cumaru*, nome popular da planta *Amburana cearensis* A. C. Smith, também conhecida por fava-tonka. No Brasil essa planta é encontrada na região norte e suas sementes contêm de 1 a 3% de cumarina<sup>11</sup>.

A descoberta da substância inicialmente chamada de dicumarina, hoje conhecida como dicumarol, aconteceu por volta de 1920, quando Schofield descreve a "doença do trevo doce", que afligia o gado de Dakota do Norte (EUA) e do Canadá. O principal sintoma dessa doença era a tendência à hemorragia, que Schofield atribuiu à presença de uma substância tóxica no feno de trevo doce quando inadequadamente seco. A dicumarina foi isolada, identificada e sintetizada por Link *et al.* entre 1933-1939<sup>12</sup>.

As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, sendo um dos seus primeiros precursores o ácido *p*-hidróxi-cinâmico (ácido *p*-cumarínico), que é hidroxilado na posição C-2' (*orto*-hidroxilação)<sup>11</sup>.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer o menor grau etanólico para a solubilização da cumarina em meio aquoso e avaliar a sua atividade antibacteriana.

## Metodologia

### Teste de solubilidade da cumarina

O teste de solubilidade consistiu em preparar soluções de 50 mL com a concentração de 10.240 µg/mL de cumarina adquirida comercialmente (*LaborSyth*) utilizando os seguintes solventes como tratamentos: água destilada e soluções etanólicas 10%, 30%, 50% e 70%.

As soluções dos solventes foram preparadas no volume total de 200mL e dispersas em volumes de 50 mL em três repetições. Para cada repetição foram pesadas as massas de cumarina (soluto) que variaram apenas a última casa decimal (0,5121 a 0,5128 g).

As soluções de cumarina foram então submetidas à agitação em banho de água Dubnoff durante uma hora à 35°C. Após essa agitação, cada solução foi filtrada em papel de filtro previamente seco em estufa de circulação de ar a 105°C/1 h e pesado.

Após a filtração, cada papel de filtro correspondente a cada solução de cumarina foi novamente seco em estufa de circulação de ar a 105°C/3 h e pesado.

A diferença entre o peso do papel de filtro após a filtração e antes da filtração foi considerada como a massa de cumarina não solubilizada durante a agitação de sua solução. Esses valores foram submetidos à análise de variância e as médias de cada solvente foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância para determinar o solvente que teve menor retenção de cumarina após a sua solubilização e com menor teor de etanol, para diminuir a interferência do solvente na atividade antimicrobiana da cumarina.

### Atividade antimicrobiana da cumarina

A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando o método de microdiluição em caldo<sup>13</sup> para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da cumarina.

A solução padrão de cumarina foi preparada na concentração de 10.240 µg/mL utilizando o solvente mais adequado para o estudo determinado no item anterior (teste de solubilidade da cumarina).

A partir da solução padrão foram preparadas as concentrações 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 2 µg/mL (p/v) em Caldo Müeller-Hinton nos volumes finais de 100 µl após a adição do inóculo, além de ensaios controles positivos (bactéria mais meio de cultura e bactéria mais meio de cultura e solvente 1:1), negativo (meio de cultura) e os controles da esterilidade dos princípios ativos.

A atividade antimicrobiana foi verificada para as seguintes culturas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (ATCC 13311), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhi (ATCC 19214) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022).

As culturas estoques foram ativadas em caldo BHI e incubadas a 35°C/24 h, sendo então os inóculos bacterianos padronizados em solução salina 0,85% estéril na escala 0,5 de MacFarland, obtendo suspensão bacteriana ao redor de 1,0x10<sup>8</sup> UFC/mL. A padronização foi verificada pela leitura da absorbância entre 0,08 e 0,10 em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm. Após a padronização foi realizada uma diluição 1:100.

Nas placas de microdiluição (com 96 poços) foram adicionados 50 µL de cada concentração final a serem testadas preparadas em concentração dupla. Adicionou-se 50 µL das suspensões bacterianas padronizadas e diluídas 1:100, obtendo-se então as concentrações finais dos princípios ativos em estudo e a concentração bacteriana de aproximadamente 5x10<sup>5</sup> UFC/mL em cada poço.

A leitura das placas foi realizada após incubação das mesmas a 35°C/24 h, com adição 15 µL de indicador redox (resazurina 0,1%) em cada poço, sendo que a coloração azul final em cada concentração indicou resultado negativo e a coloração rosa resultado positivo para o crescimento bacteriano.

Os testes foram feitos em triplicata para cada bactéria e a CIM de cumarina foi considerada a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano em no mínimo duas replicatas após o período de incubação.

## **Resultados e Discussão**

O teste de solubilidade da cumarina baseou-se na massa retida na filtração do princípio ativo após a sua solubilização em diferentes soluções sob agitação e à 37 °C (Tabela 1). Foram testadas soluções etanólicas em diferentes porcentagens e água destilada como solventes para a cumarina.

Tabela 1 – Massa em gramas de cumarina retida na filtração após solubilização sob agitação à 37°C em diferentes soluções

Água destilada	Solução etanólica 10%	Solução etanólica 30%	Solução etanólica 50%	Solução etanólica 70%
0,0346a ± 0,0058	0,0199b ± 0,0047	0,0060c ± 0,0036	0,0063c ± 0,0025	0,0011c ± 0,0011

Letras iguais na mesma linha indicam igualdade estatística a 5% de significância.

O etanol favoreceu a solubilização da cumarina, sendo que a menor massa retida na filtração indicou maior solubilização, o que ocorreu com a solução de maior porcentagem de etanol testada (70%). No entanto, não houve diferença significativa a 5% de significância entre as porcentagens 30, 50 e 70% de etanol, indicando que a mesmo em menor proporção de etanol, a solução a 30% teve a mesma eficiência da solução a 70% na solubilização da cumarina. Desse modo, adotou-se a concentração etanólica a 30% para preparar a solução padrão de cumarina na concentração de 10.240 µg/mL para a continuidade do estudo. Enfatiza-se a importância da completa dissolução dos princípios ativos para os testes *in vitro* de concentração inibitória mínima, de forma que se os compostos não estiverem completamente solubilizados, compromete a sua atividade contra os micro-organismos a serem testados, resultando em dados controversos.

As CIMs para a cumarina são apresentadas na Tabela 2, encontradas para as bactérias em estudo.

Tabela 2 – Concentrações inibitórias mínimas de cumarina frente a patógenos bacterianos selecionados

Bactérias testadas	Cumarina
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 14458)	256µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	< 2µg/mL
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	< 2µg/mL
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)	< 2µg/mL
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	> 1.024µg/mL
<i>Salmonella enterica</i> sorovar. Typhimurium (ATCC 13311)	> 1.024µg/mL
<i>Salmonella enterica</i> sorovar. Typhi (ATCC 19214)	512µg/mL
<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022)	> 1.024µg/mL

A cumarina solubilizada em solução etanólica a 30% apresentou efeito inibitório principalmente para as bactérias Gram+, além de CIM de 512 µg/mL para *Salmonella enterica* sorovar. Typhi (ATCC 19214).

Especificamente para as bactérias *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) houve inibição na menor concentração testada de cumarina, ficando então estabelecida neste estudo a CIM menor que 2 µg/mL para essas bactérias, apresentando-se promissora como agente antimicrobiano contra bactérias Gram positivas.

Resultados da atividade antimicrobiana associada aos extratos alcoólicos de *M. laevigata* Sch. Bip. Ex Baker e *M. glomerata* Sprengel mostraram que a CIM variou entre 12,5 e 100 µg/ml para três espécies de *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. cricetus*)<sup>14</sup>. Em outro estudo, considerou-se que um extrato é considerado de atividade seletiva e relevante quando apresenta IC<sub>50</sub> abaixo de 100 µg/ml<sup>15</sup>. Ambos os estudos observam que a cumarina é um dos compostos majoritários nas folhas do guaco.

A atividade antimicrobiana da cumarina de ocorrência natural e de seus derivados foi avaliada com um total de 43 compostos, dos quais 20 compostos não exibiram qualquer atividade antimicrobiana na concentração mais alta testada de 1000 µg/mL contra *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium. A cumarina de ocorrência natural apresentou CIM >1000 µg/mL para *S. aureus* e MRSA, CIM de 500 µg/mL para *E. coli* e CIM de 1000 µg/mL para *M. luteus*, *B. subtilis* e *S. Typhimurium*. No entanto, dois derivados da cumarina, o 5,7-dimetoxi-8-iodo-cumarina e o 8-iodo-5,7-dihidroxycumarina apresentaram ótima atividade contra *S. aureus* e MRSA, sendo o CIM de 62,5 µg/mL e de 1,56 µg/mL, respectivamente<sup>16</sup>.

Na investigação da atividade contra MRSA foi identificada maior eficiência de compostos bis-triazoles sintetizados a partir do esqueleto da cumarina com valor de CIM de 2 µg/mL, duas vezes e oito vezes mais ativo que a enoxacina e a cloromicina, respectivamente<sup>17</sup>. No entanto, compostos derivados da cumarina com tiazolidinona também apresentaram menor halo de inibição na concentração de 100 µg/ml que as drogas padrões ciprofloxacina e gresiofulvin, ambos a 50 µg/ml, na ação contra bactérias e fungos, respectivamente<sup>18</sup>.

Compostos derivados da cumarina com sulfonamidas exibiram moderada atividade contra bactérias e fungos, sendo concentrações iguais ou superiores às das drogas padrões testadas, ciprofloxacina (CIM de 1 µg/mL) e fluconazol (CIM de 8 µg/mL), respectivamente<sup>19</sup>.

Para a bioquímica e fisiologia vegetal há um grande envolvimento das cumarinas no metabolismo, que podem atuar como inibidores enzimáticos, antioxidantes, precursores de substâncias tóxicas, além de ações hormonais reguladoras de crescimento, respiração e fotossíntese. Outras atividades farmacológicas têm sido descritas para esses compostos, que podem agir como hepatoprotetores, antioxidantes, antialérgicos, anti-inflamatórios, antitrombóticos, antivirais e anticancerígenos<sup>20</sup>.

Estudo recente mostrou que o dicumarol inibe a divisão celular em células embrionárias do ouriço do mar, agindo sobre um processo essencial durante a mitose, processo esse relacionado com a função dos microtúbulos do fuso mitótico. Os microtúbulos são polímeros dinâmicos constituídos pela proteína tubulina heterodimérica, que alternam estados de crescimento e encurtamento, comportamento denominado de instabilidade dinâmica. Os microtúbulos são compostos por um núcleo de tubulina-GDP instável e uma tubulina-GTP estável ou tubulina-GDP-Pi em suas extremidades. O dicumarol pode exercer um efeito antiproliferativo através de uma ligação à tubulina-GDP instável, promovendo uma estabilização dinâmica dos microtúbulos fusiformes<sup>21</sup>.

Diante desse contexto, evidencia-se a necessidade de pesquisas científicas para a busca de novas fontes de substâncias antimicrobianas e os produtos naturais têm sido a fonte mais importante para novas drogas<sup>5</sup>. No entanto, é essencial o uso responsável, racional, seguro e não abusivo, para que a fitoterapia possa trazer os benefícios esperados aos usuários e ser utilizada como uma terapia alternativa<sup>1</sup>.

## Considerações Finais

Neste estudo observou-se a completa solubilização da cumarina, princípio ativo do guaco, em solução etanólica a 30%, sendo essa solução com efeito inibitório significativo para bactérias Gram positivas, apresentando CIM menor que 2 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*.

## Referências

1. Czelusniak KE, Brocco A, Pereira DF, Freitas GBL. Farmocobotânica, fitoquímica e farmacologia do guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. Rev Bras Plantas Med. 2012;14(2):400-9.
2. Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microbiol. 2012;156(3):7-17.
3. Souza GS, Castro EM, Soares AM, Pinto JEBP, Resende MG, Bertolucci SKV. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. Biotemas. 2011;24(3):1-11.
4. Feniman-De-Stefano GMM, Martin LC, Barreti P. Potencial do uso da espironolactona em pacientes em hemodiálise In: Cruz J, Cruz HMM, Kirsztajn GM, Barros RT (org). Atualidades em Nefrologia 12. São Paulo: Sarvie; 2012, p.703-10.
5. Lucera A, Costa C, Conte A, Del Nobile MA. Food applications of natural antimicrobial compounds. Front Microbiol. 2012;3(287):1-13.
6. Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. MultiCiência. 2006;7:1-16.
7. Baratto L, Lang LK, Vanz DC, Reginatto FH, Oliveira JB, Falkenberg M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(4):577-82.
8. Vanderlinde FA, Rocha FF, Malvar DC, Ferreira RT, Costa EA, Florentino IF et al. Anti-inflammatory and opioid-like activities in methanol extract of *Mikania lindleyana*, sucuriçu. Rev Bras Farmacogn. 2012;22(1):150-6.

9. Gasparetto JC, Campos FR, Budel JM, Pontarolo R. Mikania glomerata Spreng. e M. laevigata Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. *Rev Bras Farmacogn.* 2010;20(4):627-40.
10. Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int.* 2013;Mar:1-14.
11. Kuster RM, Rocha LM. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G (ed). *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 2. ed. Porto Alegre: UFRGS; 2000. p.451-69.
12. Korolkovas A, Burckhalter JH. *Química farmacêutica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
13. Clinical and laboratory standards institute / national committee for clinical laboratory standards (CLSI/NCCLS). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Wayne: CLSI/NCCLS document M7-A8; 2009.
14. Yatsuda R, Rosalen P.L, Cury JA, Murata RM, Rehder VLG, Melo LV et al. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(2):183-9.
15. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept. *J Ethnopharmacol.* 2006;106(3):290-302.
16. Smyth T, Ramachandran VN, Smyth WF. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(5):421-6.
17. Shi Y, Zhou CH. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011;21(3):956-60.
18. Ronad PM, Noolvi M, Sapkal S, Dharbhamulla S, Maddi V. Synthesis and antimicrobial activity of 7-(2-substituted phenylthiazolidinyl)-benzopyran-2-one derivatives. *Eur J Med Chem.* 2010;45(1):85-9.
19. Basanagouda M, Shivashankar K, Kulkarni MV, Rasal VP, Patel J, Mutha S et al. Synthesis and antimicrobial studies on novel sulfonamides containing 4-azidomethyl coumarin. *Eur J Med Chem.* 2010;45(3):1151-7.
20. Kostova I, Raleva S, Genova P, Argirova R. Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1inhibitors. *Bioinorg Chem Appl.* 2006;1-9.
21. Madari H, Panda D, Wilson L, Jacobs RS. Dicoumarol: a unique microtubule stabilizing natural product that is synergistic with taxol. *Cancer Res.* 2015;63(6):1214-20.

### **Cristiane Mengue Feniman Moritz**

Endereço para correspondência – Rua: Av. Ângelo Moreira da Fonseca, n° 1800,  
Bairro: Parque Danielle, CEP: 87506-370, Umuarama, PR, Brasil.

E-mail: [crisfeniman@yahoo.com.br](mailto:crisfeniman@yahoo.com.br)

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7906324507297720>

Milene Ribeiro da Silva – [ribeiro.milene@gmail.com](mailto:ribeiro.milene@gmail.com)

Greicy Mara Mengue Feniman-De-Stefano – [gmmfds@yahoo.com.br](mailto:gmmfds@yahoo.com.br)

Otávio Akira Sakai – [otavio.sakai@ifpr.edu.br](mailto:otavio.sakai@ifpr.edu.br)

Flavio Augusto Vicente Seixas – [favseixas@gmail.com](mailto:favseixas@gmail.com)

**Enviado em 25 de abril de 2016.  
Aceito em 15 de setembro de 2016.**

