

## Biolška aktivnost derivata kumarina – pregledni rad

Maja Molnar\*, M. Čačić

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

pregledni rad

### Sažetak

Kumarin i njegovi derivati su široko rasprostranjeni u prirodi i nalazimo ih u mnoštvu različitih biljaka, voća i povrća. Kumarin i njegovi derivati pokazuju niz bioloških aktivnosti, međutim njegova upotreba je ograničena, a dopuštena koncentracija u namirnicama određena zakonom. Vrlo su se često kao model za proučavanje toksičnosti kumarina koristili štakori, ali novija istraživanja pokazuju da je metabolizam, a samim time i štetnost kumarina, kod ljudi i štakora, različita. Ovaj rad daje pregled osnovnih bioloških svojstava kumarina i njegovih derivata, kao i opis i specifičnosti metabolizma kumarina kod ljudi u odnosu na štakore.

**Ključne riječi:** kumarin, metabolizam, biološka aktivnost, toksičnost

### Kumarini

Proučavanje kumarina započelo je prije 200 godina, a prvi puta kumarin je izoliran iz biljke *Coumarouna odorata Aube (Dipteryx odorata)* 1820. g., po kojoj je i dobio ime (kumarú je naziv za drvo na jeziku južnoameričkih indijanaca iz Francuske Gvajane) (Ojala, 2001). Kumarin je kemijski spoj koji se nalazi u mnogim biljkama, osobito u tonka sjemenkama, lazarkinji i bizonskoj travi (Liu i sur., 2010), kao i u gospinoj travi, jagodama, marelicama, višnji, cimetu, slatkoj djetelini (Aslam i sur., 2010). Kumarine nalazimo u većoj količini u nekim eteričnim uljima, osobito ulju cimeta (7,000 ppm), ulju lista kineskog cimeta (kasije) (do 87,300 ppm) (Lacy i O'Kennedy, 2004) i lavandinom (*Lavandula latifolia*, *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia*) (Guyot-Declerck i sur., 2002; Shimizu i sur., 1990) ulju, a također ga nalazimo i u biljkama kao što je cikorija (Lacy i O'Kennedy, 2004). Kumarine u prirodi nalazimo kao slobodne ili u obliku heterozida u mnogim dikotiledonskim obiteljima, uključujući *Apiaceae* (*Amni majus*), *Asteraceae* (*Trilisa odoratissima*), *Fabiaceae* (*Melilotus officinalis*), *Rosaceae* (*Prunus mahaleb* L.), *Rubiaceae* (*Asperula odorata*) i *Solanaceae* (*Atropa belladonna*) (Wienmann, 1997), a najviše u biljkama porodice *Rutaceae* i *Umbelliferae* (Lacy i O'Kennedy, 2004).

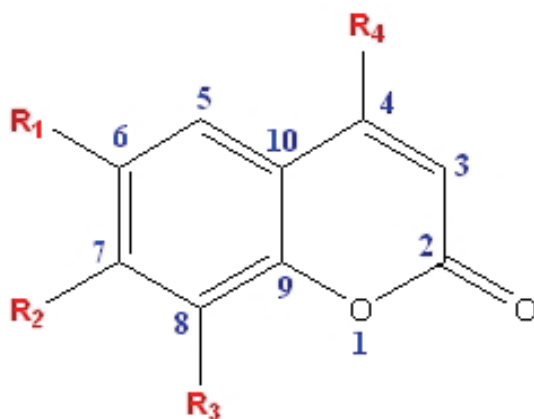
Kumarin je poznat po ugodnom mirisu na vaniliju, koji neki autori karakteriziraju i kao miris na svježe pokošeno sijeno (Liu i sur., 2010). S obzirom da na kumarinskom prstenu postoji 6 položaja na kojima se može vršiti supstitucija, poznato je mnoštvo različitih derivata kumarina, bilo sintetičkih ili prirodnih, a

takva strukturna raznolikost uzrok je mnoštvu različitih bioloških aktivnosti. Prisutnost kumarinskih derivata u biljkama je vrlo česta, a mnoge od tih biljaka se upotrebljavaju u tradicionalnoj medicini od davnina (Čavar i sur., 2009; Mata i sur. 1987; 1988). Kumarin se koristi kao sredstvo za fiksiranje i pojačavanje u parfemima i dodaje se sapunu i detergentima, pasti za zube, duhanskim proizvodima i nekim alkoholnim pićima (Lake, 1999), koristi se kao zaslađivač, pojačivač prirodnih ulja kao kod lavande, dodatak hrani u kombinaciji s vanilinom (Tyagi i sur., 2005). Velike količine se koriste kao dodaci gumi i plastičnim materijalima, kao i u bojama i sprejevima za neutralizaciju neugodnih mirisa (Lake, 1999). Kako se često koristi kao mirisno sredstvo, ima ga u 57 % od 73 deodoranta nađenih na europskom tržištu 1998. g. Sadržaj kumarina u kozmetičkim proizvodima reguliran je zakonom EU (European Commission, 1976), koji zahtijeva označavanje na proizvodima ukoliko je kumarin prisutan u količini većoj od 10 ppm u proizvodima koji se zadržavaju na koži i 100 ppm u proizvodima koji se ispiru s kože. Kumarin se koristi kao aditiv u parfemima i mirisnim proizvodima u koncentracijama od 0,5 % do 6,4 % i manje od 0,01 % u detergentima (European Commission, 2006). Kumarin često nalazimo u duhanskim proizvodima i umjetnim nadomjescima za vaniliju, iako je u mnogim zemljama zabranjen kao dodatak hrani od sredine 20-og stoljeća, jer je umjereno toksičan za jetru i bubrege (LD<sub>50</sub> = 275 mg/kg). Kumarin je zabranjen kao dodatak hrani 1978. g. u SAD-u i kao dodatak cigaretama 1997. g., ali se još koristi kao dodatak u duhanu za lule (Raters i Matissek, 2008). Iako je zabranjen kao dodatak hrani, dozvoljena je

\*Corresponding author: [maja.molnar@pfos.hr](mailto:maja.molnar@pfos.hr)

upotreba aditiva koji ga sadrže, ali samo alkoholnim pićima (Maiwein-vino s lazarkinjom; Zubrowka (votka s dodatkom bizonske trave)) (Raters i Matissek, 2008). Maksimalno dopuštena količina kumarina u hrani i nealkoholnim pićima u Hrvatskoj propisana je Pravilnikom o aromama (Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH, 2010), koji je usklađen s novom uredbom Europskog vijeća 1334/2008 (European Commission, 2008), i iznosi 5 mg/kg za deserte, 15 mg/kg za fine pekarske proizvode (osim tradicionalnih pekarskih proizvoda s cimetom, koji je naveden na deklaraciji), 20 mg/kg za žitarice za doručak, uključujući muesle, i 50 mg/kg za tradicionalne pekarske proizvode s cimetom, koji je

naveden na deklaraciji. Do usklađivanja s novom uredbom Europskog vijeća 1334/2008, u Hrvatskoj su propisi dopuštali razinu kumarina u hrani do 2 mg/kg s izuzetkom alkoholnih pića i karamela (do 10 mg/kg) te guma za žvakanje (50 mg/kg). Novom Uredbom ove su vrijednosti višestruko povećane, pa se za većinu namirnica kreću između 5 i 20 mg/kg do čak 50 mg/kg za novouvedenu kategoriju tradicionalnih pekarskih proizvoda s cimetom, koji je naveden na deklaraciji. Većina proizvoda koji nisu odgovarali u pogledu udjela kumarina odredbama Pravilnika o aromama, udovoljava novim zahtjevima (Papić, 2009).



**Slika 1.** I) **Herniarin**  $R_1, R_3, R_4 = H, R_2 = OCH_3$ ; II) **Eskuletin**  $R_1, R_2 = OH, R_3, R_4 = H$ ; III) **Eskulin**  $R_1 = 6\text{-glukozid}, R_2 = OH, R_3, R_4 = H$ ; IV) **Skopoletin**  $R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3, R_4 = H$ ; V) **Izoskopoletin**  $R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3, R_4 = H$ ; VI) **Umbeliferon**  $R_1, R_3, R_4 = H, R_2 = OH$ ; VII) **Dihidro-kumarin**  $R_1, R_2, R_3, R_4 = H$ ; VIII) **8-OAc-6-hidroksi-7-metoksi-4-metilokumarin**  $R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3 = COOCH_3, R_4 = CH_3$  (Zolek i sur., 2003)

**Fig. 1.** I) **Herniarin**  $R_1, R_3, R_4 = H, R_2 = OCH_3$ ; II) **Esculetin**  $R_1, R_2 = OH, R_3, R_4 = H$ ; III) **Esculin**  $R_1 = 6\text{-glucoside}, R_2 = OH, R_3, R_4 = H$ ; IV) **Scopoletin**  $R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3, R_4 = H$ ; V) **Isoskopoletin**  $R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3, R_4 = H$ ; VI) **Umbeliferone**  $R_1, R_3, R_4 = H, R_2 = OH$ ; VII) **Dihydrocoumarin**  $R_1, R_2, R_3, R_4 = H$ ; VIII) **8-OAc-6-hydroxy-7-methoxy-4-methylcoumarin**  $R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3 = COOCH_3, R_4 = CH_3$  (Zolek i sur., 2003)

## Biološka aktivnost kumarina i derivata kumarina

Kumarini pokazuju mnoštvo bioloških aktivnosti, uključujući antikoagulacijsku, estrogenu, dermalno fotosenzitirajuću, antimikrobnu, vazodilacijsku, moluskicidnu (ubijanje mekušaca), djeluju kao antihelmintici (paraziti, crvi (helmiti) u živim organizmima, najčešće probavnom sustavu), sedativi i hipnotici, a pokazuju i analgetsko i hipotermičko djelovanje. Ostale biološke aktivnosti (Tablica 1) uključuju inhibiciju agregacije krvnih pločica,

citokroma P450 i steroidne  $5\alpha$ -reduktaze, spazmolitičku, antikoagulacijsku, antibakterijsku, antikancerogenu i anti HIV aktivnost (Kostova, 2005; Kashman i sur., 1992; Zhou i sur., 2000). Značajna je i prevencija od bolesti, modulacija rasta (Lacy i O'Kennedy, 2004) i antioksidacijska svojstva (Čačić i Molnar, 2010a; Čačić i sur., 2010b; Čačić i sur., 2011), kao i antitumorski učinci, dok neki kumarini mogu uzrokovati značajne promjene u regulaciji imunološkog odgovora, rastu stanica i diferencijaciji (Lacy i O'Kennedy, 2004).

**Tablica 1.** Biološko djelovanje kumarina i derivata kumarina  
**Table 1.** Biological activities of coumarin and coumarin derivatives

<b>Biološko djelovanje</b>	<b>Izvor</b>
Antiinflamatorno djelovanje, <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	Ojala (2001); O'Kennedy i Thornes (1997); Sardari i sur. (2000); Silvan i sur. (1996)
Analgetsko djelovanje	O'Kennedy i Thornes (1997)
Antifungalna aktivnost	Sardari i sur. (1999); Farshori i sur. (2011)
Antiaritmičko djelovanje	Sardari i sur. (2000)
Antihelminthska aktivnost	O'Kennedy i Thornes (1997)
Antihipertenzijska aktivnost	Pandey i sur. (2004)
Antikancerogeno djelovanje	Manojkumar i sur. (2009); Ojala (2001)
Antikoagulacijsko djelovanje	Kostova i sur. (2005); Ojala (2001)
Antileukemijsko djelovanje	Kotali i sur. (2008)
Antimalarijska aktivnost, <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	Ojala (2001)
Antimikrobna aktivnost	Kwon i sur. (1997); Ojala (2001); Mohareb i sur. (2009); O'Kennedy i Thornes (1997)
Antioksidacijska svojstva	Čačić i Molnar (2010a); Čačić i sur. (2010b); Čačić i sur. (2011)
Antipiretičko djelovanje	O'Kennedy i Thornes (1997)
Antiviralna aktivnost, <i>in vitro</i>	Ojala (2001); Pandey i sur. (2004)
Citostatički efekt, <i>in vivo</i>	Ojala (2001)
Diuretičko djelovanje	O'Kennedy i Thornes (1997)
Estrogensko djelovanje	O'Kennedy i Thornes (1997)
Hipnotički učinak	O'Kennedy i Thornes (1997)
Hipotermalno djelovanje	O'Kennedy i Thornes (1997)
Hipolipidemičko djelovanje	Huang i sur. (1993)
Imunostimulacijsko djelovanje	Sardari i sur. (2000)
Imunosupresivno djelovanje	Sardari i sur. (2000)
Inhibicija gonadotropina	Sardari i sur. (2000)
Inhibicija aldoza reduktaze u leći	Okada i sur. (1995)
Inhibicija otpuštanja histamina	Sardari i sur. (2000)
Inhibicija LDL oksidacije	Natella i sur. (2010)
Inhibicija lipidne peroksidacije	Roussaki i sur. (2010); Yun i sur. (2001)
Inhibicija DNA-giraze	Sardari i sur. (2000)
Inhibicija enzimske aktivnosti u jetri, <i>in vitro</i>	Ojala (2001)
Inhibicija monoamin oksidaze, <i>in vitro</i>	Ojala (2001)
Inhibicija protein kinaze, <i>in vitro</i>	Yang i sur. (1999)
Fotosenzibilizirajuća aktivnost, <i>in vivo</i>	Ojala (2001)
Kalcij antagonistička aktivnost, <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	Ojala (2001); Sardari i sur. (2000); Abyshev i sur. (2006)
Koleretički učinak	O'Kennedy i Thornes (1997)
Narkotički učinak	O'Kennedy i Thornes (1997)
Regulacija rasta biljaka	O'Kennedy i Thornes (1997)
Smanjenje lomljivosti kapilara	Sardari i sur. (2000)
Spazmolitička aktivnost	O'Kennedy i Thornes (1997)
Sprečavanje zubnog karijesa	Sardari i sur. (2000)
Stimulacija respiracije	O'Kennedy i Thornes (1997)
Trovanje ribe	Sardari i sur. (2000)
Tretiranje psorijaze	Sardari i sur. (2000)
Tuberkulostatska aktivnost	O'Kennedy i Thornes (1997)
Urikozurično djelovanje	O'Kennedy i Thornes (1997)
Vazodilatacijski učinak	O'Kennedy i Thornes (1997)
Zaštita endotela	O'Kennedy i Thornes (1997)

Od derivata kumarina najviše se ističu određeni aflatoksini koji pokazuju značajnu hepatotoksičnost i karcinogenost, dikumarol s antikoagulacijskim djelovanjem i novobiocin i kumermicin A s antibiotskom aktivnošću (Sardari i sur., 2000).

### **Antioksidacijska svojstva kumarina i derivata kumarina**

Biljni ekstrakti koji sadrže derivate kumarina su se u povijesti često koristili kao biljni lijekovi, te se i danas istražuju zbog svojih bioloških svojstava. Istraživanja su pokazala da su kumarini vrlo aktivni,

pa tako kumarini s fenolnim hidroksilnim skupinama pokazuju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Čačić i Molnar, 2010a; Čačić i sur., 2010b; Čačić i sur., 2011), osobito reaktivnih kisikovih vrsta (Dighe i sur., 2010; Kalkambar, 2011) i često se koriste kao inhibitori ciklooksigenaze i lipoksigenaze u upalnom ciklusu (Kalkhambkar, 2011). Mnoštvo kumarina utječe na formaciju i hvatanje reaktivnih kisikovih (ROS) i dušikovih vrsta (RNS) i na taj način djeluju kao antioksidansi, što uključuje niz različitih molekularnih mehanizama djelovanja i vjerojatno je povezano s njihovom strukturnom sličnošću s flavonoidima i benzofenonima (Čavar i sur., 2009). Eskuletin i 4-metileskuletin sinergistički djeluju s  $\alpha$ -tokoferolom u obrani od citotoksičnosti izazvane hidroperoksidom linoleinske kiseline, pri čemu važnu ulogu ima *orto* kateholna skupina na kumarinu (Kostova, 2005). Eskuletin, 4-metileskuletin, fraksetin i kava kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina) pokazuju aktivnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Antioksidans aurapten (7-geraniloksikumarin), koji je izoliran iz kore citrusa (*Citrus natsudaidai* Hayata), dokazano posjeduje kemopreventivni učinak na kemijski induciranu karcinogenezu (Kostova, 2005).

7-Hidroksikumarin je prirodni benzopiron, ljudski metabolit i ima važnu ulogu kao antioksidans u ljudskoj prehrani (voće i povrće) (Farshori i sur., 2011).

### Antikancerogeno djelovanje

Razna istraživanja su potvrdila da velika većina biljnih ekstrakata koji su se u povijesti koristili u medicinske svrhe sadrži visoke koncentracije kumarina (Kostova, 2005). Kumarin i 7-hidroksikumarin inhibiraju proliferaciju mnoštva humanih staničnih linija *in vitro*, a pokazuju i aktivnost protiv nekoliko životinjskih tumora. Prema istraživanjima, konzumacija namirnica koje sadrže kumarin pruža određenu zaštitu od inicijacije hepatokarcinogeneze uzrokovane aflatoksinom B1 u štakora (Kostova, 2005). Studije o utjecaju kemijske strukture na biološku aktivnost kumarina su pokazale da dodatak kateholne skupine na osnovnu strukturu uzrokuje povećanu citotoksičnu aktivnost na stanice tumora (Kostova, 2005).

Kumarin i njegovi metaboliti pokazuju antitumorsku aktivnost na nekoliko linija stanica tumora kod ljudi, pokazali su se kao inhibitori stanične proliferacije kod stanica želučanog karcinoma, a već je dokazana aktivnost kumarina protiv raka prostate, malignog melanoma i metastatskog renalnog staničnog karcinoma (Kostova, 2005). Osim što se mogu koristiti u liječenju raka, kumarini se mogu koristiti i

u tretmanima ublažavanja nuspojava izazvanih radioterapijom (Ramesh i Pugalendi, 2005). Kumarini bi također mogli naći primjenu u liječenju karcinoma bubrežnih stanica i kao dodatna kemijska terapija za melanom (Lacy i O'Kennedy, 2004).

Istraživanja su pokazala da 7-hidroksikumarin pokazuje antitumorsku i inhibicijsku aktivnost na aldoza reduktazu i ksantin oksidazu (Farshori i sur., 2011).

### Protuupalna svojstva i liječenje edema

Kumarin također pokazuje sposobnost aktivacije makrofaga, pa postoji mogućnost upotrebe u tretmanima edema (Shi i Zhou, 2011), osobito jer se kumarin pokazao dobrim u smanjenju otekline nakon različitih trauma i bolesti, kod ljudi i životinja (Hoult i Paya, 1996). Rezultati su pokazali da kombinacija kumarina i trokserutina ima povoljan učinak u liječenju upale žlijezde slinovnice i mukozitisa (upala sluznice usne šupljine).

### Ostalo

Prema istraživanju Ramesha i Pugalendija (2005) kumarin smanjuje razinu glukoze u krvi. Istraživanja su pokazala da kumarin ne samo da inducira izoenzim aldo-ketoreduktaze (aflatoksin B1-aldehid reduktaza) koji sudjeluje u metabolizmu aflatoksina, nego i GSTA5 (glutation S-transferaza alfa 5) i druge enzime koji metaboliziraju lijekove (Kostova, 2005). Zbog imunomodulacijskih svojstava postoji mogućnost primjene u tretmanu bruceloze (Shi i Zhou, 2011).

Ostol inhibira agregaciju krvnih pločica, dok klorikromen (sintetički kumarin) inhibira agregaciju *in vivo* i *in vitro*, i izaziva vazodilataciju (Hoult i Paya, 1996). Ostol sprečava progresiju hepatitisa C u hepatokarcinomu kod ljudi (Okamoto i sur., 2001), a derivati ostola koji pokazuju topivost u vodi veću nego sam ostol su nedavno predloženi za upotrebu kao hepatoprotektivni lijekovi. Što se tiče biološke aktivnosti ostola, vrlo je važna prisutnost metoksi skupine, jer je npr. 7-hidroksi derivat, ostenol, neaktivan (Mazzei i sur., 2008). Kolinin pokazuje negativan učinak na replikaciju DNA virusa hepatitisa B (Chang i sur., 1997).

Određeni dimeri kumarina, osobito oni koji sadrže hidrofobne skupine, pokazali su se kao potentni inhibitori HIV-1 integraze, dok je 5,7,4'-trihidroksi-4-stiril Kumarin pokazao značajnu antivirusnu aktivnost prema *Herpes simplex* virusu (Borges i sur., 2005). Geiparvarin pokazuje značajnu *in vitro* citostatsku aktivnost, a neki prirodni i sintetički kumarini su inhibitori kolinesteraze, što bi moglo dobro doći u

liječenju Alzheimerove, kao i Parkinsonove bolesti. Varfarin je i danas jedno od osnovnih antikoagulirajućih sredstava, iako neki derivati 4-hidroksikumarina posjeduju još veću antikoagulacijsku aktivnost od varfarina (Borges i sur., 2005).

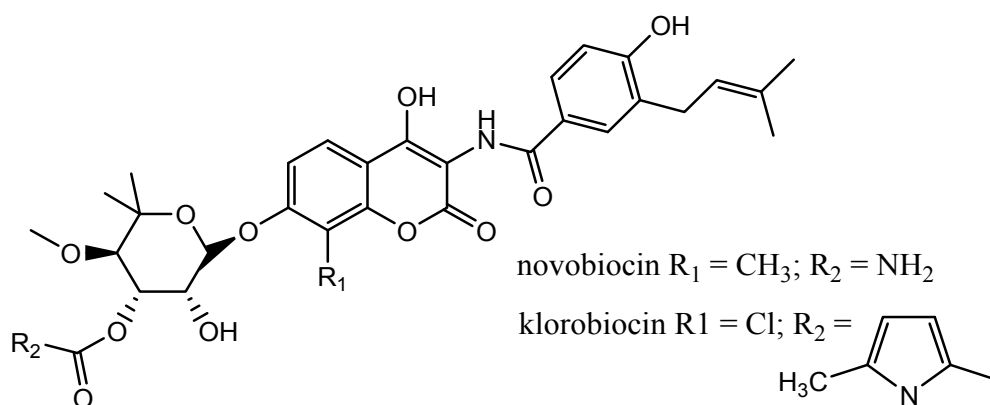
Furanokumarini se koriste u fotokemoterapeutskim tretmanima za neke kožne bolesti, limfome i autoimune poremećaje (Conforti i sur., 2009). Biljke koje sadrže psoralen se stoljećima koriste za tretiranje vitiliga, kožne bolesti koju odlikuje nedostatak pigmentacije. Neki imaju farmakološka svojstva i bez zračenja te su se pokazali djelotvornim u liječenju depresije, a čine se i kao korisni lijekovi u tretmanima multiple skleroze, jer blokiraju kalijeve kanale. Angelicin pokazuje antiupalna, antipiretička (za smanjenje tjelesne temperature) i citotoksična svojstva na humane KB stanične linije (Conforti i sur., 2009), kao i neki drugi kumarini (Guilet i sur., 2001), i antifungalno djelovanje (*Candida albicans*,

*Cryptococcus neoformans* i *Cladosporium cucumerinum*) (Conforti i sur., 2009).

## Upotreba u medicini

Zasad su neki kumarini, kao varfarin, acenokumarol, armilarizin A, himekromon i karbokromen odobreni za kliničku upotrebu (Shi i Zhou, 2011). Eskulin je derivat kumarina koji se koristi u medicini, kao komponenta lijeka Proctosedyla, za tretiranje hemoroida i rektalnih lezija (Stewart, 2010).

Novobiocin i klorobiocin (Slika 2) su antibiotici prirodnog porijekla na bazi kumarina (Borges i sur., 2005) koji se ubrajaju u hidroksilirane kumarine (Farshori i sur., 2011), a inhibiraju DNA girazu i pokazuju široki spektar aktivnosti prema Gram-pozitivnim bakterijama, uključujući i *Staphylococcus* vrste otporne na meticilin (Borges i sur., 2005; Basile i sur., 2009).



**Slika 2.** Struktura novobiocina i klorobiocina  
**Fig. 2.** Novobiocine and chlorobiocine structures

Prema kliničkom ispitivanju provedenom od strane Brouwer i sur. (2002) upotreba kumarina u kombinaciji s aspirinom smanjuje pojavu ugrušaka nakon fibrinolize kod pacijenata s akutnim miokardijalnim infarktom, dok prema Berg i sur. (2000) sprečava komplikacije nakon srčane angioplastike. Temeljeno na kliničkim ispitivanjima postoji mogućnost izolirane primjene kumarina, kao i u kombinaciji s cimetidinom, kao antineoplastika (Lake, 1999).

Kumarin trenutno prolazi razna klinička ispitivanja vezana za liječenje limfoedema, raka dojke, karcinoma pluća i bubrega (Lake, 1999).

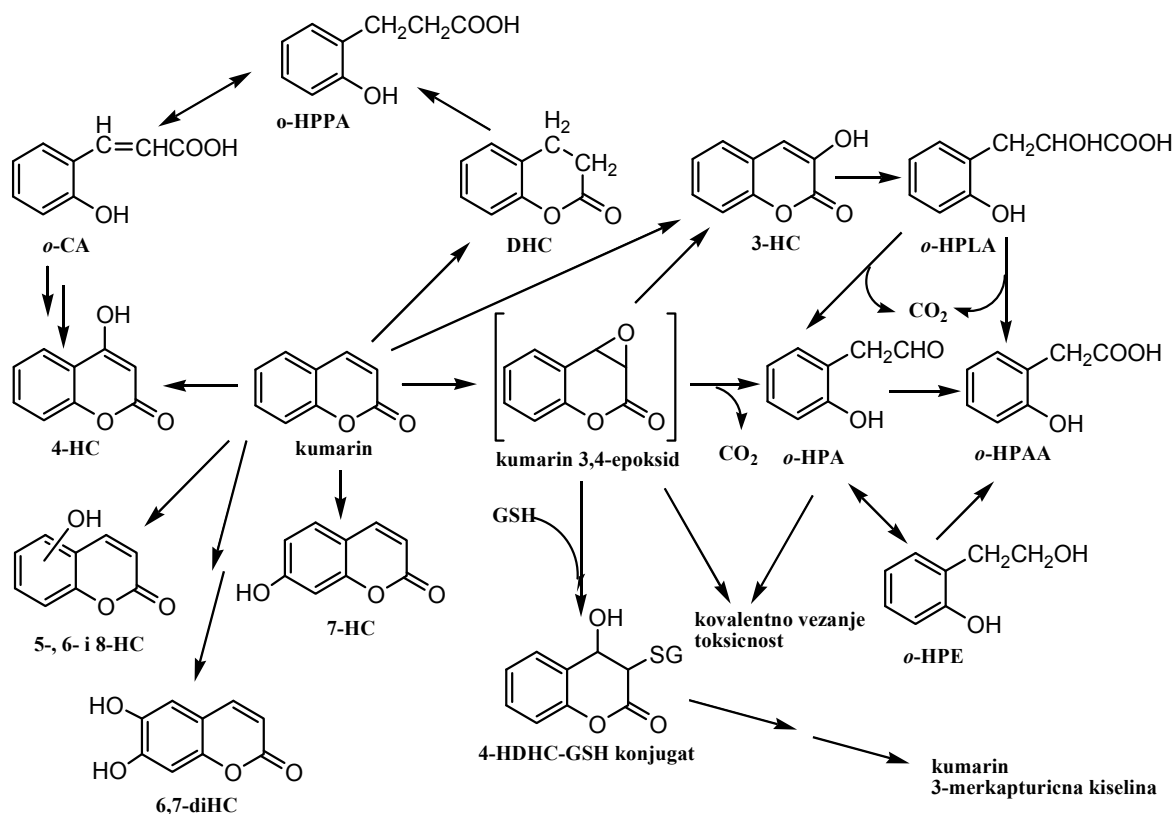
## Metabolizam kumarina

Od 1954. g. kumarin je od strane FDA (Food and Drug Administration) klasificiran kao toksična tvar, koja je potencijalni promotor tumora jetre u štakora i njegova upotreba je zabranjena. Prema istraživanjima provedenima na štakorima, NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) je kumarin proglasio kemijskim karcinogenom (Lacy i O'Kennedy, 2004).

Istraživanje metabolizma kumarina uključuje mnoge studije *in vivo* i *in vitro*, kao i mnoge životinjske vrste, uključujući čovjeka. Kumarin se može metabolizirati hidroksilacijom na svih šest dostupnih položaja (3, 4, 5, 6, 7, 8) i pritom dati 3-, 4-, 5-, 6-, 7-

i 8-hidroksikumarine, kao i otvaranjem laktonskog prstena pri čemu nastaju različiti produkti, kao *o*-hidroksifenilacetaldehid (*o*-HPA), *o*-hidroksifeniletanol (*o*-HPE), *o*-hidroksifenilactena kiselina (*o*-HPAA) i *o*-hidroksifenilmlječna kiselina

(*o*-HPLA) (Lake, 1999). Dodatni metaboliti koji mogu nastati su 6,7-dihidroksikumarin, *o*-kumarinska kiselina, *o*-hidroksifenilpropionska kiselina i dihidrokumarin (Slika 3).



Slika 3. Neki putevi metabolizma kumarina (Lake, 1999)

Fig. 3. Biosynthetic pathways of coumarins (Lake, 1999)

Prikazani metaboliti su: 3-, 4-, 5-, 6- 7- i 8-hidroksikumarin (3-HC, 4-HC, 5-HC, 6-HC, 7-HC, 8-HC), *o*-hidroksifenilacetaldehid (*o*-HPA), *o*-hidroksifeniletanol (*o*-HPE), *o*-hidroksifenilactena kiselina (*o*-HPAA), *o*-hidroksifenilmlječna kiselina (*o*-HPLA), *o*-hidroksifenilpropionska kiselina (*o*-HPPA), *o*-kumarinska kiselina (*o*-CA), dihidrokumarin (DHC), 6,7-dihidroksikumarin (6,7-DHC), 4-hidroksidihidrocoumarin-glutathion konjugat (4-HDHC-GSH konjugat).

Dva važna puta metabolizma kumarina su 7-hidroksilacija i metabolizam laktonskog prstena, koji uključuje otvaranje prstena i otpuštanje ugljikovog atoma 2, pri čemu nastaje ugljikov dioksid (ovaj se korak u starijoj literaturi naziva i 3-hidroksilacija). Kod većine ljudi kumarin se brzo apsorbira i metabolizira jetrenim CYP2A6 (citokrom P450 2A6

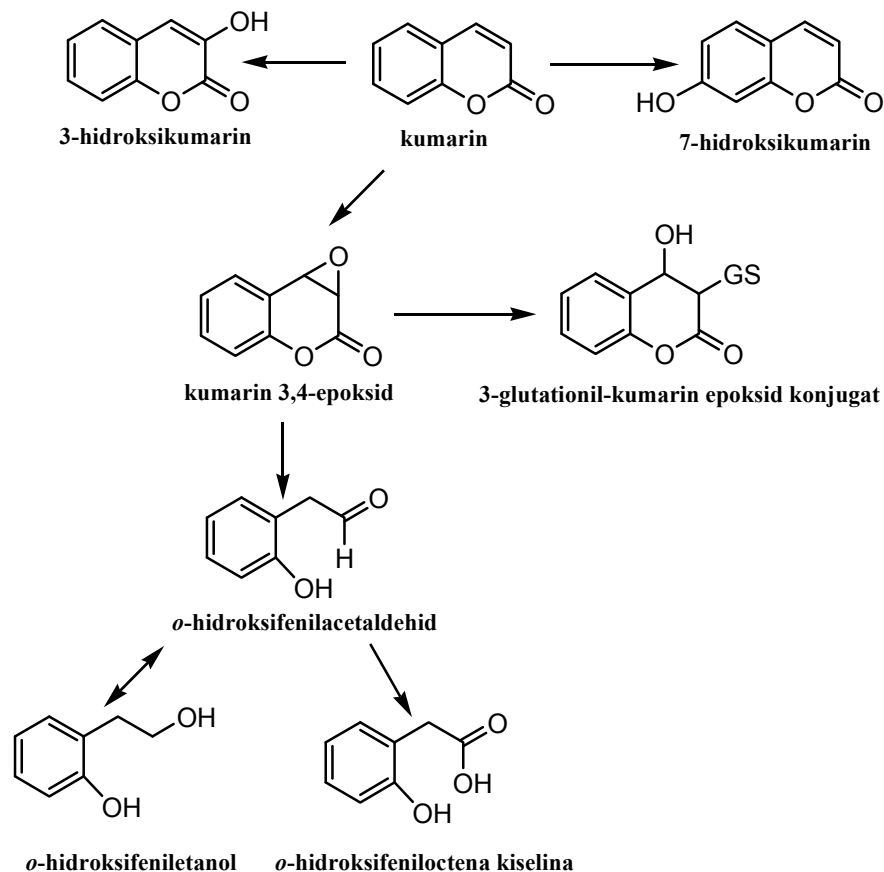
je enzim koji pokazuje aktivnost 7-hidroksilaze kumarina) do 7-hidroksikumarina, koji se izlučuje u urinu kao glukuronid i sulfatni konjugati. Dostupni podaci potvrđuju da kumarin nije genotoksičan (Lake, 1999). Za razliku od štakora i miševa, kod kojih veće doze kumarina mogu uzrokovati toksičnost i karcinogenezu, toksičnost za ljude nije dokazana. Kod pojedinaca, koji su uzimali terapijske doze kumarina, i do 1900 puta veće od onih kojima je čovjek izložen prehranom i kozmetičkim proizvodima, nije utvrđena veza izloženosti i pojave hepatotoksičnosti. Niska toksičnost se temelji na razlici u biotransformaciji kumarina i eliminaciji metabolita kumarina iz tijela kod određenih vrsta (Lake, 1999). Studije na pavijanima, sirijskim hrčcima i određenim vrstama miševa su pokazale da su oni otporni na akutnu

hepatotoksičnost izazvanu kumarinima. Relativna otpornost jetre i/ili hepatocita ljudi i cynomolgus majmuna na toksičnost kumarina se povezuje sa 7-hidroksilacijom, osnovnim metaboličkim putem kumarina kod ovih vrsta, koji je u biti detoksifikacija. Kod štakora se hepatotoksičnost ove vrste pripisuje izlučivanju metabolita kumarina u žuč, što može rezultirati enterohepatičkom cirkulacijom koja povećava izloženost jetrenih stanica toksičnim metabolitima kumarina. Vrste kao sirijski hrčak, pavijan i čovjek izlučuju metabolite kumarina primarno u urinu (Lacy i O'Kennedy, 2004) i brzo izlučivanje kumarina, osobito u obliku 7-hidroksikumarina, u urinu ljudi daje naslutiti da u ovom slučaju nema izlučivanja u žuč. Vrijeme poluraspada (half-life) za eliminaciju kumarina je oko 1-2 sata (Lake, 1999), a bioraspodivnost kumarina u ljudskom organizmu je samo oko 1-5 % (Hoult i Paya, 1996). Mala izloženost kumarinima iz

prehrane i određenih kozmetičkih proizvoda ne bi trebala izazvati hepatotoksičnost, čak niti u pojedinaca sa smanjenom aktivnošću 7-hidroksilaze (Lacy i O'Kennedy, 2004).

Kod štakora je, za razliku od ljudi, dominirajuća reakcija 3,4-epoksidacija pri čemu je glavni metabolit jetrenih mikrosoma *o*-HPA, koji se povezuje s akutnom plućnom toksičnošću i plućnim tumorima kod miševa, dok je glavni urinarni metabolit *o*-HPAA (Slika 4) (EFSA, 2004). Usporedba među vrstama pokazuje da su hepatociti štakora najosjetljiviji na toksičnost kumarina i njegovih derivata, dok su humani hepatociti najotporniji (Kostova, 2005).

Rezultati svih ovih istraživanja (Lake, 1999; EFSA, 2004; Kostova, 2005) potvrđuju da je citoksičnost kumarina ovisna o metabolizmu i vrsti organizma, što znači da štakori nisu pogodan model za procjenu farmakoloških učinaka kumarina na ljudski organizam (Kostova, 2005; Lacy i O'Kennedy, 2004).



Slika 4. Glavni metabolički putevi biotransformacije kumarina (EFSA, 2004)

Fig. 4. Metabolic pathways of coumarin biotransformation

Nakon oralne administracije kumarin se brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta i distribuira tijelom (Lacy

i O'Kennedy, 2004). Neki autori ističu kako bi kumarin mogao biti toksičan jer podliježe

oksidativnoj dekarboksilaciji, što rezultira nastankom derivata *o*-hidroksifenilacetaldehida ili *o*-hidroksifenilactone kiseline koji mogu stvarati stabilne komplekse s teškim metalima u tijelu, dok 4-metilkumarin ne podliježe oksidativnoj dekarboksilaciji i nije toksičan (Malhotra i sur., 2008; Foti i sur., 2005). Nesupstituirani kumarini tijekom metabolizma mogu stvarati 3,4-epokside kumarina, koji su toksični, dok sintetički 4-metilkumarini ne induciraju nastanak epoksida jer nisu supstrat za jetrenu P450 monooksigenazu (Natella i sur., 2010).

## Zaključak

Kumarini su sveprisutni u prirodi i vrlo ih često unosimo u organizam konzumacijom određenih namirnica, voća i povrća. Odlikuje ih široki spektar bioloških aktivnosti, ovisno o supstituentima na osnovnom prstenu samog kumarina. Kumarin je zabranjen kao dodatak hrani, a njegova maksimalno dopuštena koncentracija u namirnicama propisana je zakonom. Ispitivanjem metabolizma kumarina, dolazi se do vrlo važnih spoznaja, jer je dokazano da štakori, nisu pogodana model za ispitivanje toksičnosti kumarina na ljudima. Naime, kod štakora je dominirajuća reakcija metabolizma kumarina 3,4-epoksidacija, pri čemu je glavni metabolit jetrenih mikrosoma *o*-HPA, koji se povezuje s akutnom plućnom toksičnošću i plućnim tumorima kod miševa, dok je glavni urinarni metabolit *o*-HPAA. Kod ljudi je metabolički put razgradnje kumarina različit od onog u štakora, i uključuje 7-hidroksilaciju, koji je u biti detoksifikacija.

## Literatura

- Aslam, K., Khosa, M.K., Jahan, N., Nosheen, S. (2010): Synthesis and applications of coumarin, *Pak. J. Pharm. Sci.* 23, 449-454.
- Basile, A., Sorbo, S., Spadaro, V., Bruno, M., Maggio, A., Faraone, N., Rosselli, S. (2009): Antimicrobial and Antioxidant Activities of Coumarins from the Roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae), *Molecules* 14, 939-952.
- ten Berg, J.M., Kelder, J.C., Suttorp, M.J., Mast, E.G., Bal, E., Ernst, S.M.P.G., Verheugt, F.W.A., Plokker, H.W.T. (2000): Effect of coumarins started before coronary angioplasty on acute complications and long-term follow-up. A randomized trial, *Circulation* 102, 386-391.
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., Uriarte, E. (2005): Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem.* 12, 887-916.
- Brouwer, M.A., van den Bergh, P.J.P.C., Aengevaeren, W.R.M., Veen, G., Luijten, H.E., Hertzberger, D.P., van Boven, A.J., Vromans, R.P.J.W., Uijen G.J.H., Verheugt, F.W.A. (2002): Aspirin plus coumarin versus aspirin alone in the prevention of reocclusion after fibrinolysis for acute myocardial infarction: results of the antithrombotics in the prevention of reocclusion in coronary thrombolysis (APRICOT)-2 trial, *Circulation* 106, 659-665.
- Chang, C.T., Doong, S.L., Tsai, I.L., Chen, I.S. (1997): Coumarins and anti-HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*, *Phytochemistry* 45, 1419-1422.
- Conforti, F., Marrelli, M., Menichini, F., Bonesi, M., Statti, G., Provenzano, E., Menichini, F. (2009): Natural and synthetic furanocoumarins as treatment for vitiligo and psoriasis, *Curr. Drug Ther.* 4, 38-58.
- Čačić, M., Molnar, M. (2010a): Design, synthesis and characterization of some novel 3-coumarinyl-5-arylidene-1,3-thiazolidine-2,4-diones and their antioxidant activity, *Z. Naturforsch.* 66b, 177 – 183.
- Čačić, M., Molnar, M., Šarkanj, B., Has-Schön, E., Rajković, V. (2010b): Synthesis and antioxidant activity of some new coumarinyl-1,3-thiazolidine-4-ones, *Molecules* 15, 6795-6809.
- Čačić, M., Molnar, M., Strelec, I. (2011): Synthesis and biological evaluation of a novel series of 1,3-dicoumarinyl-5-aryl-2-pyrazolines, *Heterocycles* 83, 7, 1553-1556.
- Čavar, S., Kovač, F., Maksimovic, M. (2009): Synthesis and antioxidant activity of selected 4-methylcoumarins, *Food Chem.* 117, 135-142.
- Dighe, N.S., Pattan, S.R., Dengale, S.S., Musmade, D.S., Shelar, M., Tambe, V., Hole, M.B. (2010): Synthetic and pharmacological profiles of coumarins: A review, *Arch. Appl. Sci. Res.* 2, 65-71.
- European Commission (1976): *Cosmetics Directive*, 76/768/EEC.
- European Commission (2006): *Scientific Committee on Consumer Products SCCP Opinion on Coumarin (sensitisation only)*, SCCP/0935/05.
- European Commission (2008): Regulation (EC) No 1334/2008 on flavouring and certain food ingredients with flavouring properties amending Council Regulation (EEC) no 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC, EC 1334/2008.
- European Food Safety Authority (2004): *Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contacts with Food (AFC) on a request from the Commission related to Coumarin Question number EFSA-Q-2003-118*, The EFSA Journal 104, 1-36.
- Farshori, N.N., Banday, M.R., Ahmad, A., Khan, A.U., Rauf, A. (2011): 7-Hydroxy-coumarin derivatives: synthesis, characterization and preliminary antimicrobial activities, *Med. Chem. Res.* 20, 535-541.



- Foti, M.C., Sharma, S.K., Shakya, G., Prasad, A.K., Nicolosi, G., Bovicelli, P., Ghosh, B., Raj, H.G., Rastogi, R.C., Parmar, V.S. (2005): Biopolyphenolics as antioxidants: Studies under an Indo-Italian CSIR-CNR project, *Pure Appl. Chem.* 77, 91–101.
- Guilet, D., Seraphin, D., Rondeau, D., Richomme, P., Bruneton, J. (2001): Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*, *Phytochemistry* 58, 571–575.
- Guyot-Declercq, C., Renson, S., Bouseta, A., Collin, S. (2002): Floral quality and discrimination of *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia*, and *Lavandula angustifolia* × *latifolia* honeys, *Food Chem.* 79, 453–459.
- Hoult, J.R.S., Paya, M. (1996): Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential, *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 27, 713–722.
- Huang H-C, Weng Y-I, Lee C-R, Jan T-R, Chen Y-L, Lee Y-T (1993): Protection by scoparone against the alterations of plasma lipoproteins, vascular morphology and vascular reactivity in hyperlipidaemic diabetic rabbit. *Brit. J. Pharmacol.* 110, 1508–1514.
- Kalkhambkar, R.G. (2011): Synthesis and biological activities of novel ethers of quinolinone linked with coumarins, *Monatsh. Chem.* 142, 305–315.
- Kashman, Y., Gustafson, K.R., Fuller, R.W., Cardellina, J.H., McMahon, J.B., Currens, M.J., Buckheit, R.W. Jr., Hughes, S.H., Cragg, G.M., Boyd, M.R. (1992): The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*, *J. Med. Chem.* 35, 2735–2743.
- Kostova, I. (2005): Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *Curr. Med. Chem. Anti Canc. Agents* 5, 29–46.
- Kotali, A., Lafazanis, I.S., Papageorgiou, A., Chrysogelou, E., Lialiaris, T., Sinakos, Z. (2008): Synthesis, characterization and antileucemic activity of 7-hydroxy-8-acetylcoumarin benzoylhydrazone, *Molbank* M574.
- Kwon, Y.S., Kobayashi, A., Kajiyama, S.I., Kawazu, K., Kanzaki, H., Kim, C.M. (1997): Antimicrobial constituents of *Angelica dahurica* roots, *Phytochemistry* 44, 887–889.
- Lacy, A., O’Kennedy, R. (2004): Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer, *Curr. Pharm. Des.* 10, 3797–3811.
- Lake, B.G. (1999): Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment, *Food Chem. Toxicol.* 37, 423–453.
- Liu, B., Raeth, T., Beuerle, T., Beerhues, L. (2010): A novel 4-hydroxycoumarin biosynthetic pathway, *Plant Mol. Biol.* 72, 17–25.
- Malhotra, S., Shakya, G., Kumar, A., Vanhoecke, B.W., Cholli, A.L., Raj, H.G., Saso, L., Ghosh, B., Bracke, M.E., Prasad, A.K., Biswal, S., Parmar, V.S. (2008): Antioxidant, antiinflammatory and antiinvasive activities of biopolyphenolics, *Arkivoc* vi, 119–139.
- Manojkumar, P., Ravi, T.K., Subbuchettiar, G. (2009): Synthesis of coumarin heterocyclic derivatives with antioxidant activity and *in vitro* cytotoxic activity against tumour cells, *Acta Pharm.* 59, 159–170.
- Mata, R., Calzada, F., del Rosario Garcia, M. (1988): Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, VI. Additional new 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*, *J. Nat. Prod.* 51, 851–856.
- Mata, R., Calzada, F., Garcia, M.R., Reguero, M.T. (1987): Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*, *J. Nat. Prod.* 50, 866–871.
- Mazzei, M., Nieddu, E., Miele, M., Balbi, A., Ferrone, M., Fermeglia, M., Mazzei, M.T., Pricl, S., La Colla, P., Marongiu, F., Ibbac, C., Loddo, R. (2008): Activity of Mannich bases of 7-hydroxycoumarin against *Flaviviridae*, *Bioorg. Med. Chem.* 16, 2591–2605.
- Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi RH (2010): *Pravilnik o aromama*, NN 086/2010.
- Mohareb R.M., El-Arab E.E., El-Sharkawy K.A. (2009): The reaction of cyanoacetic acid hydrazide with 2-acetylfuran: Synthesis of coumarin, pyridine, thiophene and thiazole derivatives with potential antimicrobial activities, *Sci. Pharm.* 77, 355–366.
- Natella, F., Lorrain, B., Prasad, A.K., Parmar, V.S., Saso, L., Scaccini, C. (2010): 4-Methylcoumarins as antioxidants: Scavenging of peroxy radicals and inhibition of human low-density lipoprotein oxidation, *Biochimie* 92, 1147–1152.
- Ojala, T. (2001): Biological screening of plant coumarins. *Disertacija*. Faculty of Science, University of Helsinki, Helsinki.
- Okada Y, Miyauchi N, Suzuki K, Kobayashi T, Tsutsui C, Mayuzumi K, Nishibe S, Okuyama T. (1995): Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation, *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1385–1387.
- Okamoto, T., Kajino, K., Hino, O. (2001): Hepatoprotective drugs for the treatment of virus-induced chronic hepatitis: From hypercarcinogenic state to hypocarcinogenic state, *Jap. J. Pharmacol.* 87, 177–180.
- O’Kennedy, R., Thornes, R.D. (1997): *Coumarins: Biology, applications and mode of action*. Wiley, Chichester.
- Pandey, V.K., Tusi, S., Tusi, Z., Joshi, M., Bajpai, S. (2004): Synthesis and biological activity of substituted 2,4,6-s-triazines, *Acta Pharm.* 54, 1–12.
- Papić, J. (2009): Novi europski propis za arome, <http://www.hah.hr/index.php?id=691>.
- Ramesh, B., Pugalendi, K.V. (2005): Umbelliferone in STZ-diabetic rats, *Yale J. Biol. Med.* 78, 131–138.
- Raters, M., Matissek, R. (2008): Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *Eur. Food Res. Tech.* 227, 637–642.

- Roussaki M., Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D., Hamilakis S., Detsi A. (2010): A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 3889–3892.
- Sardari, S., Nishibe, S., Daneshtalab, U. (2000): Coumarins, the bioactive structures with antifungal property. U *Studies in Natural Products Chemistry* Elsevier Science, Amsterdam, 335-393.
- Shi, Y., Zhou, C.H. (2011): Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 956–960.
- Shimizu, M., Shogawa, H., Matsuzawa, T., Yonezawa, S., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I., Berganza L.H. (1990): Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV. Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crude drug "alhucema" (*Lavandula latifolia* Vill.), *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 38, 2283-2284.
- Silvan, A.M., Abad, M.J., Bermejo, P., Sollhuber, M., Villar, A. (1996): Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*, *J. Nat. Prod.* 59, 1183-1185.
- Stewart, C. (2010): Use of coumarin derivatives in antifungal therapy, US Patent US2010/0267653A1.
- Tyagi, Y.K., Kumar, A., Raj, H.G., Vohra, P., Gupta, G., Kumari, R. (2005): Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity, *Eur. J. Med. Chem.* 40, 413–420.
- Weinmann, I. (1997): History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds. U *Coumarins: Biology, applications and mode of action* Wiley, Chichester, 1-22.
- Yang E.B., Zhao Y.N., Zhang K., Mack P. (1999): Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 260, 682-685.
- Yun B.S., Lee I.K., Ryoo I.J., Yoo I.D. (2001): Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarino-lignans from *Hibiscus syriacus*, *J. Nat. Prod.* 64, 1238-1240.
- Zhou, P., Takaishi, Y., Duan, H., Chen, B., Honda, G., Itoh, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O.K., Lee, K.H. (2000): Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: Anti-HIV activity and inhibition of cytokine release, *Phytochemistry* 53, 689-697.
- Zolek, T., Paradowska, K., Wawer, I. (2003): <sup>13</sup>C CP MAS NMR and GIAO-CHF calculations of coumarins, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 23, 77–87.

---

Received: October 17, 2011

Accepted: December 19, 2011

## Biological activity of coumarin derivatives – a review

Maja Molnar, M. Čačić

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

review

### Summary

Coumarin derivatives are wide spread in nature and found in many plants, fruits and vegetables. They show a broad spectrum of biological activities, but the use of coumarin is restricted by law and its maximal allowed concentration in foodstuff is determined by state regulations. As a model for investigation of coumarin toxicity rats have often been used, but some recent investigations indicate that the coumarin metabolism and therefore coumarin toxicity, are much different in humans and rats. This paper sums up coumarin biological properties as well as specificity of coumarin metabolism in rats and humans.

**Keywords:** coumarin, metabolism, biological activity, toxicity