



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CUMARINAS: ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO E EFEITOS TÓXICOS**

Trabalho submetido por  
**Ana Rita da Silva Vargas Guerreiro Dias**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Junho de 2015**



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CUMARINAS: ORIGEM, DISTRIBUIÇÃO E EFEITOS TÓXICOS**

Trabalho submetido por  
**Ana Rita da Silva Vargas Guerreiro Dias**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Luísa Gonçalves**

**Junho de 2015**



## **Dedicatória**

*À minha Mãe! Sem ti nada seria possível, nem faria sentido.*



## **Agradecimentos**

Mãe, Zé, aos que infelizmente partiram e demais família, o meu OBRIGADA! Todos vocês, de uma maneira ou de outra, ensinaram-me a encarar a vida com serenidade e sem vocês não seria a pessoa que sou hoje!

Às amigas de sempre, Joana, Patrícia e Vanessa, pelas aventuras, histórias, por todos os momentos que estiveram presentes e por todos aqueles que ainda temos para viver juntas, OBRIGADA!

Às “novas” amigas, Catarina, Inês, Laura, Leonor, Mafalda, Maria e Mariana, pela nova família que formamos, bons momentos e batalhas partilhadas, OBRIGADA! Pois tivemos a sorte de vivermos juntas alguns dos melhores anos das nossas vidas!

João Carlos, por tudo o que vivemos juntos, por todo o futuro que ainda temos pela frente, pelo apoio incondicional e muita paciência, OBRIGADA!

À professora Luísa Gonçalves, OBRIGADA, pela atenção e dedicação depositada na realização desta monografia.



## Resumo

A cumarina também conhecida por  $\alpha$ -benzopirona, foi descoberta em 1820 na espécie botânica *Coumarouna odorata*.

Os compostos cumarínicos podem ser classificados, em quatro grupos de acordo com a sua estrutura química: as cumarinas simples, as furanocumarinas, as piranocumarinas e as cumarinas substituídas no anel de lactona; encontram -se amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontradas em várias famílias botânicas.

Devido às suas propriedades organolépticas e farmacológicas, a cumarina tem sido amplamente utilizada por parte da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética, o que tem contribuído para uma exposição humana crescente à mesma.

Os compostos cumarínicos possuem várias aplicações farmacoterapêuticas, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, anticoagulante e como adjuvantes na terapêutica do cancro, entre outras. Contudo, efeitos tóxicos têm sido também reportados, sendo o mais característico a respetiva hepatotoxicidade, observado e descrito em diferentes espécies animais.

Esta monografia, tem como objetivo apresentar o estado da arte no que concerne à distribuição da cumarina no reino vegetal, às suas diferentes vias de metabolização entre espécies, e aos efeitos tóxicos induzidos no homem após exposição a este composto.

Palavras-chave: cumarinas; 7 – hidroxycumarina; efeitos tóxicos; hepatotoxicidade.



## Abstract

The coumarin also known as  $\alpha$ -benzopyrone, was discovered in 1820 in the botanical species *Coumarouna odorata*.

The coumarin compounds can be classified into four groups according to their chemical structure: simple coumarins, furanocoumarins, pyranocoumarins and substituted coumarins in the lactone ring; they are widely distributed in the plant kingdom, being found in various botanic families.

Due to their organoleptic and pharmacological properties, coumarin has been widely used by the food, pharmaceutical and cosmetic industries, which have led to an increased human exposure to coumarin.

The coumarin compounds have various pharmacotherapeutic applications such as, anti-inflammatory, antimicrobial, anticoagulant and as an adjunct in cancer therapy, among others. However, toxic effects have also been reported, with the most characteristic the respective hepatotoxicity observed and described in different species.

This monograph aims to present the state of the art regarding the distribution of coumarin in the plant kingdom, the different routes of metabolism between species, and toxic effects induced in humans after exposure to this compound.

Keywords: coumarin; 7 – hydroxycoumarin; toxic effects; hepatotoxicity.



## Índice geral

Dedicatória.....	3
Agradecimentos .....	5
Resumo .....	7
Abstract.....	9
Índice geral .....	11
Índice de figuras .....	13
Índice de tabelas .....	15
Lista de abreviaturas .....	17
I. Objetivo .....	19
II. Metodologia.....	19
1. Introdução.....	21
1.1. Cumarinas .....	21
1.2. Marcos históricos .....	22
1.3. Estrutura, classificação e compostos derivados da cumarina .....	23
1.4. Propriedades físico-químicas .....	26
2. Biossíntese e síntese química de cumarinas .....	27
2.1. Biossíntese no reino vegetal .....	27
2.2. Métodos clássicos de síntese química de cumarinas .....	28
3. Ocorrência e Distribuição .....	31
3.1. Reino vegetal .....	31
4. Farmacocinética.....	33
4.1. Exposição humana à cumarina .....	33
4.2. Absorção e Distribuição .....	33
4.3. Metabolismo .....	35

4.3.1. Vias metabólicas.....	35
4.4. Excreção .....	39
5. Toxicidade .....	41
6. Propriedades farmacoterapêuticas .....	47
6.1. Cumarina como Agente Antimicrobiano.....	47
6.2 Cumarinas como Agentes Anticoagulantes .....	48
6.3 Cumarinas e o seu papel na terapêutica do cancro .....	48
7. Conclusão .....	49
8. Bibliografia.....	51

**Índice de figuras**

Figura 1 – Estrutura química da Cumarina.....	21
Figura 2 – Ilustração da <i>Coumarouna odorata</i> .....	23
Figura 3 – Estrutura química da Umbeliferona. ....	24
Figura 4 – Estrutura química da Esculetina. ....	24
Figura 5 – Estrutura química da Fraxetina. ....	24
Figura 6 – Biossíntese da cumarina. ....	28
Figura 7 – Via de síntese da cumarina através da Reação de Perkin.....	29
Figura 8 – Via de síntese da cumarina através da Reação de Pechmann .....	29
Figura 9 - Via de síntese da cumarina através da Reação de Knoevenagel.....	29
Figura 10 – Vias de ativação metabólica da cumarina .....	39



## **Índice de tabelas**

Tabela 1- Classificação das Cumarinas em quatro grupos e exemplos de estruturas químicas pertencentes aos dos mesmos.....	25
Tabela 2 – Representação de algumas espécies de plantas que contêm cumarina na sua composição e que podem ser utilizadas como aditivos alimentares ou aditivos em suplementos alimentares.....	32
Tabela 3 – Descrição das isoformas do citocromo P450 envolvidos no metabolismo da cumarina por humanos.....	36
Tabela 4 - Quantidades de alimento necessárias para atingir o TDI de 0,1mg/kg.mc (dose diária tolerada) .....	44



## **Lista de abreviaturas**

FDA – *Food and Drug Administration*

nm – Nanómetros

PAL – Fenilalanina amónio – liase

NADPH – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida adenina

7 – HC – 7 – Hidroxicumarina

CE – 3,4 – epóxido

*o*- HPA – orto – Hidroxifenilacetaldeído

*o*- HPAA – Ácido orto – hidroxifenilacético

*o*- HPE – orto – Hidroxifeniletanol

GSH – Glutathiona

GST – Enzima glutathiona S transferase

ALDH – Aldeído desidrogenase

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

TAMDI – Consumo máximo diário teórico

TDI – Dose diária tolerada

BfR – Instituto Federal Alemão para a Avaliação do Risco



## **I. Objetivo**

A cumarina encontra – se amplamente distribuída no reino vegetal, nomeadamente em plantas comestíveis; devido às suas propriedades é utilizada pelas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. De entre os efeitos tóxicos causados pela exposição à cumarina, a hepatotoxicidade é o mais descrito e observado em várias espécies animais.

Dada a grande exposição do homem a este composto, neste trabalho pretendeu-se fazer uma revisão da literatura acerca da distribuição da cumarina, principalmente em plantas comestíveis e produtos de consumo humano, da sua farmacocinética e dos efeitos tóxicos nas várias espécies, em particular na espécie humana.

## **II. Metodologia**

De modo a cumprir o objetivo proposto, efetuou-se uma pesquisa na B-ON, na Science Direct, no PUBMED, e em sites relacionados com esta tema como o BfR (Instituto Federal Alemão para a Avaliação do Risco) e Official Journal of the European Communities. Para tal, foram utilizadas as seguintes palavras-chave na língua inglesa, isoladas ou combinadas entre si: coumarin, 7 – hydroxycoumarin, toxic effects, daily exposure, edible plants, synthesis, metabolic pathways, tendo como critério de inclusão a faixa temporal entre 1999-2015.



## 1. Introdução

### 1.1. Cumarinas

O estudo das cumarinas foi iniciado há mais de dois séculos, sendo que o nome deste vasto grupo químico deriva do nome planta *Coumarouna odorata*, ou *Dipteryx odorata*, da qual foram isoladas pela primeira vez em 1820 por Vogel (Borges et al., 2005; Boisde e Meuly, 2007)

Dentro deste grupo, como será referido adiante, estão incluídos os vários derivados cumarínicos e ainda a cumarina, que é também conhecida, entre outras designações, por  $\alpha$ -benzopirona e cuja estrutura química consiste num anel benzénico fundido com uma lactona, como se ilustrado na figura 1 (Lake, 1999).

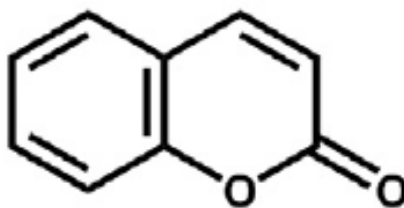


Figura 1 – Estrutura química da Cumarina (retirada de: Samovich et al., 2014)

Os compostos cumarínicos são metabolitos secundários de várias plantas, bactérias e fungos. Embora no passado tenham sido considerados apenas produtos de excreção de plantas, sabe-se atualmente que os metabolitos secundários desempenham funções diretas nos mecanismos de regulação e manutenção da planta. No que toca às cumarinas, a sua função como metabolito secundário ainda não se encontra totalmente esclarecida; no entanto, supõe-se que desempenham papéis fulcrais como reguladores do crescimento, agentes bacteriostáticos e fungistáticos nas plantas (Venugopala et al., 2013).

O seu odor doce e aromático semelhante ao da baunilha despertou interesse por parte da indústria alimentar que a utiliza como aromatizante em vários tipos de produtos alimentares e bebidas alcoólicas (Sproll et al., 2008). As cumarinas são ainda utilizadas

como fixadoras de essências e em pastas de dentes na perfumaria (Lake, 1999; Boisdé e Meuly, 2007).

Apesar do seu amplo uso na indústria alimentar e cosmética, atualmente o estudo das cumarinas tem-se focado principalmente no seu potencial farmacoterapêutico, uma vez que são compostos que apresentam atividade biológica (Borges et al., 2005).

## 1.2. Marcos históricos

A história da cumarina remota ao ano de 1820, quando foi isolada pela primeira vez por Vogel a partir de “*tonka-beans*”, ou fava tonka, e sementes de *Coumarouna odorata*, (figura 2) (Abraham et al., 2010; Clark, 1995). Posteriormente, em 1844, Kosmann reportou também a presença deste composto aromático em “*woodruff*”-aspérula de nome comum (Clark, 1995).

A primeira síntese química da molécula foi descrita em 1868 por Perkins, o que leva a que em 1882 as cumarinas passassem a ser utilizadas em perfumaria. Paul Parquet desenvolveu uma fragrância, que foi utilizada na produção de perfume e sabonetes, à base de óleo de bergamota e cumarinas sintéticas. Esta formulação foi encarada como um marco histórico na indústria da perfumaria, pois até então nunca tinham sido utilizados aromatizantes sintéticos (Clark, 1995).

Contudo, apenas no século 20 começam a ser publicados estudos relativos ao potencial terapêutico dos compostos cumarínicos. Um desses autores foi Von Werder que referenciou pela primeira vez o seu potencial terapêutico em 1936 (Borges et al., 2005).

Em 1958, foram sumariadas as principais propriedades biológicas destes compostos por Bose, e em 1964, Soine, publicou a primeira revisão bibliográfica sobre o papel biológico e farmacológico da cumarina e seus derivados (Borges et al., 2005). Porém, em 1954 foram colocadas as primeiras questões relativas à toxicidade da cumarina, na sequência de relatos de hepatotoxicidade e desenvolvimento de tumores observados em animais de laboratório expostos a este composto (Abraham et al., 2010). Nos anos 80, surgiram várias revisões e publicações relativas à cumarina e seus derivados, sendo novamente levantada a questão de que poderia exibir propriedades genotóxicas ou mesmo carcinogênicas (Borges et al., 2005).

Devido à sua vasta utilização na indústria alimentar e conseqüentemente à elevada exposição humana a estes composto, em 1954 a FDA (*Food and Drug Administration*) proíbe a utilização de cumarinas na indústria alimentar dos Estados Unidos (Sproll et al., 2008; Egan et al., 1990). Em 1988, foi imposto pela União Europeia, na diretiva 88/388/EEC, um limite de 2mg/kg de cumarina em todos os tipos de comidas e bebidas, excetuando alguns tipos de caramelos e bebidas alcoólicas (10 mg/kg) e em pastilhas elásticas (50 mg/kg) (European Council, 1988).

Atualmente são conhecidos cerca de 1300 moléculas pertencentes a esta ampla família de compostos, isoladas de 150 espécies de plantas, pertencentes a 30 famílias diferentes, para além de fungos e bactérias (Cunha, 2010; Maistro et al., 2014).



Figura 2 – Ilustração da *Coumarouna odorata* (retirada de: [http://www.dacademy.org/dagardens\\_tonkabeen3.html](http://www.dacademy.org/dagardens_tonkabeen3.html))

### 1.3. Estrutura, classificação e compostos derivados da cumarina

Como referido anteriormente, as cumarinas são uma grande família de lactonas derivadas do ácido *o*-hidroxicinâmico, da qual fazem parte a cumarina e os derivados da cumarina.

As cumarinas podem ser classificadas, em quatro grupos de acordo com a sua estrutura química: as cumarinas simples, furanocumarinas, as piranocumarinas e as cumarinas substituídas no anel de lactona, como ilustrado na tabela 1 (Lacy e O’Kennedy, 2004).

Apesar desta fragmentação da família das cumarinas em quatro classes, é de frisar que apenas a classe das cumarinas simples, das furanocumarinas e das piranocumarinas partilham a mesma via de biossíntese (Bourgaud et al., 2006).

As cumarinas simples constituem uma vasta classe de compostos, na qual está incluída a cumarina ou  $\alpha$ -benzopirona (figura 1), e sobre a qual se debruçará este trabalho. Os demais compostos inseridos nesta classe são derivados hidroxilados ou alquilados do composto original (Lacy e O’Kennedy, 2004). Como exemplos de cumarinas simples hidroxiladas no anel benzênico temos a umbeliferona (figura 3), a esculetina (figura 4) e a fraxetina (figura 5) que são também as mais prevalentes (Bourgaud et al., 2006).

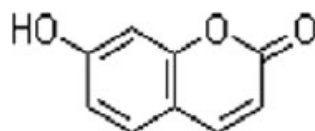


Figura 3 – Estrutura química da Umbeliferona (retirado de: Subramaniam e Ellis, 2013).

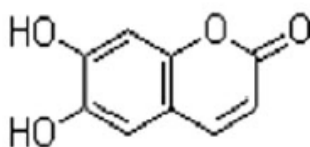


Figura 4 – Estrutura química da Esculetina (retirado de: Subramaniam e Ellis, 2013).

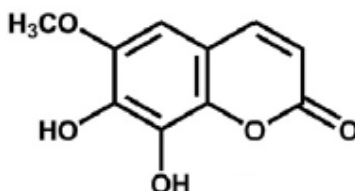


Figura 5 – Estrutura química da Fraxetina (retirado de: Samovich et al., 2014).

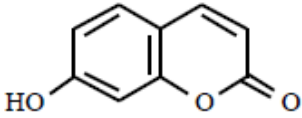
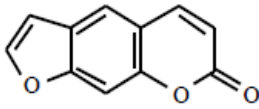
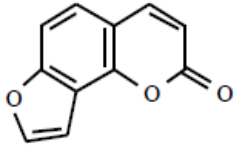
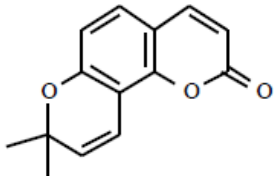
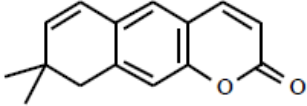
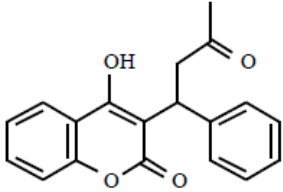
As furanocumarinas são formadas por um anel de furano ligado ao núcleo cumarínico (Lacy e O’Kennedy, 2004). Esta classe pode ser ainda subdividida em furanocumarinas lineares, como o psoraleno, e em furanocumarinas angulares como a angelicina (tabela 1.) Apresentam propriedades biológicas importantes, como o bloqueio da replicação e transcrição de ADN e a capacidade de inativação de enzimas do grupo do citocromo P450.

Quimicamente, as piranocumarinas são compostas por um anel de pirano fundido com o núcleo cumarínico; tal como na classe das furanocumarinas, as

piranocumarinas estão também subdivididas em lineares (seselina) e em angulares (xantiletina), tal como explicitado na tabela 1 (Bourgaud et al., 2006).

As cumarinas substituídas no anel de lactona, tal como o nome indica, são compostos que apresentam substituintes de funcionalidade variada ligados ao terceiro e/ou ao quarto carbono do anel de lactona; dois exemplos pertencentes a esta classe são a 4- hidroxycumarina e a varfarina, que é uma cumarina sintética (Lacy e O’Kennedy, 2004).

Tabela 1- Classificação das Cumarinas em quatro grupos e exemplos de estruturas químicas pertencentes aos mesmos (adaptada de Lacy e O’Kennedy, 2004)

Classificação	Características	Exemplos
Cumarinas Simples	Hidroxilado ou alquilado no anel benzeno.	 7 – Hidroxycumarina
Furanocumarinas	Anel de furano de 5 membros ligado ao anel de benzeno. Linear ou angular.	 Psoraleno  Angelicina
Piranocumarinas	Anel de lactona de 6 membros ligado ao anel de benzeno. Linear ou angular.	 Seselina  Xantiletina
Cumarinas substituídas no anel de lactona	Substituição no anel de lactona, maioritariamente nas posições C – 3 ou C – 4.	 Varfarina

#### **1.4. Propriedades físico-químicas**

A cumarina ou  $\alpha$ -benzopirona é um composto cristalino incolor, com um odor doce e agradável, muito característico. Tem um peso molecular de cerca 146.15 g/mol, um ponto de fusão entre os 68 e 70°C, e um ponto de ebulição de 303°C.

Estes cristais quando dissolvidos em clorofórmio e expostos à luz ultravioleta, absorvem num comprimento de onda de 272 nm (Egan et al., 1990).

É solúvel em solventes orgânicos como o etanol, clorofórmio, éter dietílico, e parcialmente solúvel em água quente e pouco ou nada solúvel em água à temperatura ambiente (20°C) (Lake, 1999).

## 2. **Biossíntese e síntese química de cumarinas**

Os compostos cumarínicos são produzidos por vários tipos de organismos vivos, desde o reino vegetal até aos microrganismos. Diversos fungos e leveduras também sintetizam este tipo de metabolitos secundários, no entanto são bioquimicamente diferentes dos seus análogos produzidos pelas plantas, sendo estes últimos os compostos que serão focados nesta monografia (Croteau, Kutchan, e Lewis, 2000).

Ainda devido ao grande interesse quer por parte da indústria alimentar, farmacêutica ou mesmo pela área da perfumaria e cosmética na cumarina e seus derivados, abordar-se-á também alguns dos métodos clássicos de síntese química de cumarinas.

### 2.1. **Biossíntese no reino vegetal**

Durante as décadas de 1960 e 1970, foram realizados grandes progressos na investigação da via de biossíntese do ácido cinâmico (Croteau et al., 2000). Como ilustra a figura 6, a biossíntese das cumarinas, e naturalmente de alguns dos seus derivados, tem origem na via anabólica do ácido siquímico (figura 6). Aquando este último interage com fosfoenolpiruvato, são produzidos aminoácidos aromáticos como é o caso da fenilalanina e da tirosina (Czelusniak et al., 2012; Cunha, 2010).

Após sofrer uma redução enzimática por parte da enzima fenilalanina amónio-liase (PAL), a qual extrai um grupo amónia à molécula de fenilalanina, é obtido o ácido cinâmico (Czelusniak et al., 2012).

A via de biossíntese a partir do ácido cinâmico apresenta 4 tipos fundamentais de reações enzimáticas: hidroxilações aromáticas, *O*- metilações, ligações a coenzima - A e reduções dependentes de NADPH (Croteau et al., 2000). Uma vez obtido o ácido cinâmico, este sofre uma hidroxilação na posição *orto* da cadeia lateral do anel benzénico, como ilustra a figura 6 (a), passo fundamental neste processo de biossíntese, dando origem a ácido *o*-cumárico (Dewick, 2002).

Como ilustrado na figura 6 (b), o ácido *o*-cumárico sofre uma glicosilação, seguindo – se de uma isomerização *cis/trans*, figura 6 (c), fundamental ao processo de lactonização e formação da molécula de cumarina, figura 6 (d) (Czelusniak et al., 2012).

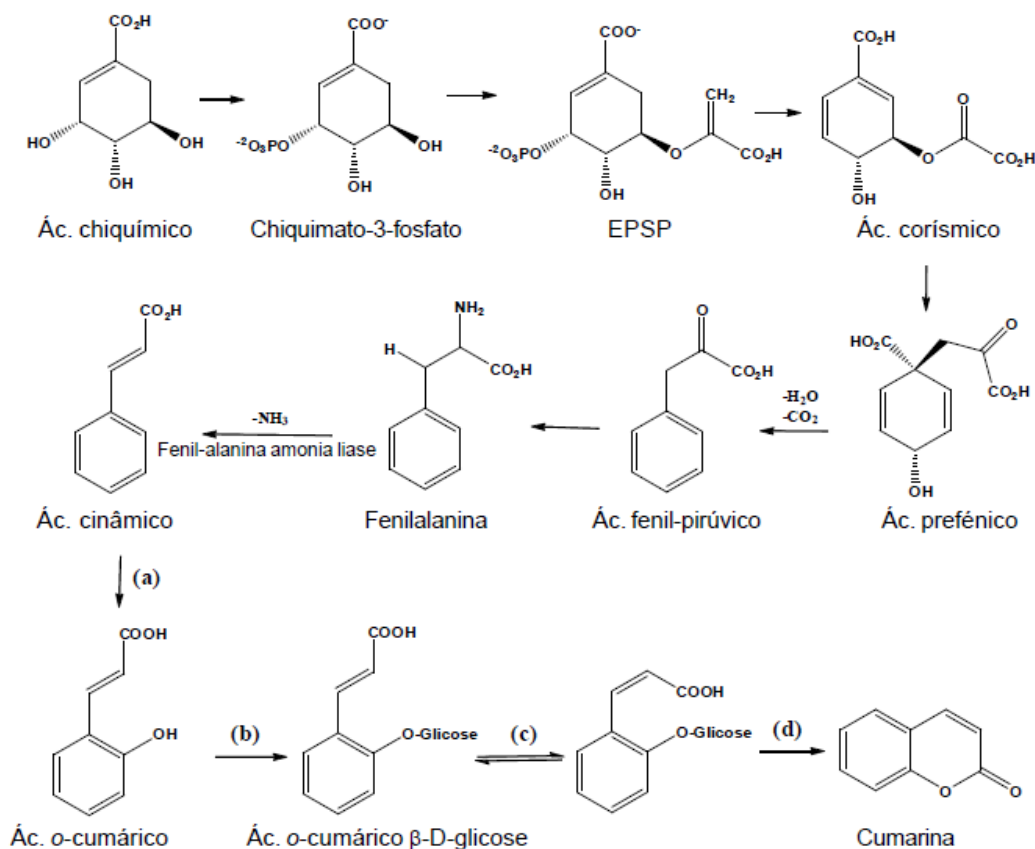


Figura 6 – Biossíntese da cumarina, (a) Hidroxilação do ácido cinâmico pela enzima *trans*-cinamato-4-hidroxilase, (b) *O*-glicosilação do ácido cumárico, (c) Isomerização *cis/trans* da dupla ligação da cadeia lateral e (d) Lactonização do ácido *o*-cumárico por ação enzimática (retirado de: Czelusniak et al., 2012).

## 2.2. Métodos clássicos de síntese química de cumarinas

Normalmente as cumarinas são sintetizadas por meios de reações clássicas como é o caso da reação de Perkin, da reação de Pechmann e da reação de Knoevenagel, reações estas que serão descritas individualmente nos parágrafos seguintes. Apesar das cumarinas continuarem a ser sintetizadas pelos métodos clássicos, existem outras metodologias de síntese, como são os casos das reações de Wittig e de Reformatsky. No entanto, todos os métodos apresentam algumas desvantagens, como baixos rendimentos

reacionais. Neste sentido, o desenvolvimento de novos métodos de preparação de cumarinas sintéticas continua (Borges et al., 2005).

A reação de Perkin, como ilustrado na figura 7, baseia-se numa reação de um salicilaldeído com o anidrido acético, na presença de acetato de sódio anidro e calor (Sethna e Shah, 1945).

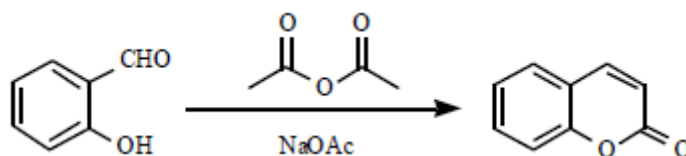


Figura 7 – Via de síntese da cumarina através da Reação de Perkin (retirado de: Borges et al., 2005)

Na reação de Pechmann, a cumarina é obtida por aquecimento de uma mistura de um fenol substituído e ácido málico, na presença de ácido sulfúrico concentrado, como representado na figura 8 (Sethna e Shah, 1945).

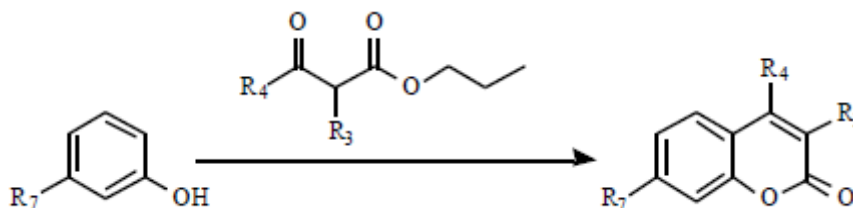


Figura 8 – Via de síntese da cumarina através da Reação de Pechmann (retirado de: Borges et al., 2005)

A reação de Knoevenagel, figura 9, baseia-se na condensação de aldeídos e compostos metileno ativos na presença de uma base fraca como por exemplo a amónia. Usualmente esta reação é catalisada na presença de bases fracas ou ácidos de Lewis (Borges et al., 2005).

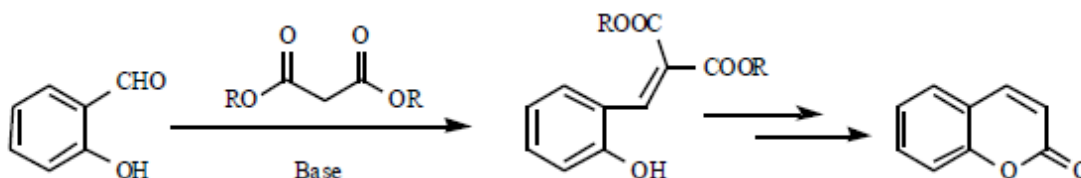


Figura 9 - Via de síntese da cumarina através da Reação de Knoevenagel (retirado de: Borges et al., 2005)



### 3. Ocorrência e Distribuição

#### 3.1. Reino vegetal

As cumarinas e seus derivados encontram -se amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontradas em famílias botânicas como: *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Rubiaceae*, *Solanaceae*, e *Lamiaceae* (Jain e Joshi, 2012; Petrul'ová-Poracká et al., 2013). Quanto à morfologia da planta, a cumarina está distribuída, por ordem decrescente da sua quantidade, nos frutos, sementes, raízes e por último nas folhas (Venugopala et al., 2013).

Tal como acontece com os restantes metabolitos secundários das plantas, a quantidade de cumarina produzida por estas sofre variações, pois é afetada por fatores ambientais, tais como a temperatura, a radiação ultravioleta e a quantidade de água e nutrientes presentes no solo, entre outros (Petrul'ová-Poracká et al., 2013; Czelusniak et al., 2012).

Tal como referido anteriormente, a cumarina foi primeiramente isolada de *Dipterix odorata*, sendo que desde então tem sido reportada a sua presença em várias outras espécies de plantas, como ilustrado na tabela 2 como a *Anthoxanthum odoratum* (erva de cheiro ou feno de cheiro), a *Asperula odorata* (“woodruff” ou aspérula), a *Cinnamomum aromaticum* (casca de cassia, pau de canela), a *Eupatorium triplinerve* (japana roxa), a *Hieracloide odorata* (erva santa), a *Melilotus coerulea* (trevo doce), a *Melilotus officinalis* (trevo amarelo), a *Melilotis melissophyllum* (cidreira falsa ou cidreira bastarda), a *Primula elatior* (prímula), *Peucedanum ostruthium* (imperatória) *Matricaria chamomilla* (camomila) e na lavanda (Clark, 1995; Bourgaud et al., 2006; Sproll et al., 2008; Hiermann et al., 1996; Petrul'ová-Poracká et al., 2013).

A cumarina ou  $\alpha$ -benzopirona é ainda encontrada em especiarias e alimentos, como no chá verde, hortelã-pimenta, arando, mel, cenouras coentros e salsa. Tal composto faz ainda parte da constituição de futas como o mirtilo, amora silvestre, morangos, damasco e cerejas (Felter et al., 2006; Cherng, Chiang, e Chiang, 2008; Jain e Joshi, 2012; Health, No, Commission, Directive, e Assessment, 2006)

Tabela 2 – Representação de algumas espécies de plantas que contêm cumarina na sua composição e que podem ser utilizadas como aditivos alimentares ou aditivos em suplementos alimentares (Adaptado de: European Food Safety Authority, 2012).

<b>Nome botânico</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Família</b>	<b>Parte da Planta</b>
<i>Menyanthes trifoliata</i>	Trevo -de -água	<i>Menyanthaceae</i>	Folha
<i>Melittis melissophyllum</i>	Falsa cidreira	<i>Lamiaceae</i>	Partes aéreas
<i>Melilotus spp.</i>	Meliloto	<i>Leguminosae (Fabaceae)</i>	Partes aéreas
<i>Marsdenia cundurango</i>	Condurango	<i>Apocynaceae (Asclepiadaceae)</i>	Óleo essencial
<i>Galium odoratum</i>	Aspérula	<i>Rubiaceae</i>	Partes aéreas
<i>Dipteryx odorata</i>	Tonka beans	<i>Leguminosae (Fabaceae)</i>	Sementes
<i>Ferula asa foetida</i>	Assa – fétida	<i>Apiaceae</i>	Raiz
<i>Coumarona oppositifolia (taralea oppositifolia)</i>	Cumaru	<i>Leguminosae (Fabaceae)</i>	Semente
<i>Cinnamomum cassia (nees) blume</i>	Canela	<i>Lauraceae</i>	Parte aérea
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	Feno-de-cheiro	<i>Poaceae</i>	Parte aérea

## 4. Farmacocinética

### 4.1. Exposição humana à cumarina

A exposição humana à cumarina é um tópico importante devido à sua toxicidade. A exposição humana a estes compostos ocorre essencialmente por via oral, uma vez que a cumarina se encontra numa grande variedade de alimentos, como já referido anteriormente. Por exemplo, está presente na fruta, especiarias, vinho, cerveja e tabaco e é utilizada pela indústria alimentar como aditivo, devido às suas propriedades organoléticas que confere aos alimentos (Felter et al., 2006; Sproll et al., 2008).

Para além da via oral, o homem pode estar exposto por via tópica à cumarina, visto que é utilizada pela área da perfumaria como aditivo em perfumes e fragrâncias e pela indústria de cosméticos em várias formulações de sabões e óleos de banho, loções e produtos capilares (Felter et al., 2006; Boisdé e Meuly, 2007; Pan et al., 2014).

Atualmente existe ainda um grande interesse por parte da indústria farmacêutica na utilização de cumarina e derivados, devido ao seu grande potencial farmacoterapêutico. É por exemplo o caso do dicumarol e da varfarina, agentes anticoagulantes derivados sintéticos da cumarina, muito utilizados na prática clínica (Bairagi et al., 2012).

Assim e como já fora referido, a toxicidade relatada após exposição à cumarina é uma área de grande interesse para os investigadores, tendo em conta a potencial exposição humana a este composto, sendo então importante o seu estudo farmacocinético.

### 4.2. Absorção e Distribuição

Aquando a administração por via oral, a cumarina é rapidamente absorvida e distribuída por todo o corpo (Lake, 1999; Lacy e O’Kennedy, 2004). Tanto a  $\alpha$ -

benzopirona como a 7 – hidroxycumarina (7- HC), seu metabolito, apresentam baixa solubilidade em água, o que lhes confere uma rápida absorção, quando administradas.

Devido ao seu grande coeficiente de partição e ao fato de que a cumarina é uma molécula polar, teoricamente este composto passa facilmente a bicamada fosfolipídica por difusão passiva (Lacy e O’Kennedy, 2004).

Ao longo dos tempos têm sido desenvolvidos estudos farmacocinéticos da cumarina em várias espécies, como por exemplo na ratazana, no rato, no cão, no macaco e no homem.

É de notar que na ratazana a cumarina é rapidamente eliminada do sangue, após administração por via oral de 1mg/kg de peso corporal, e que apenas 20% desta dose é absorvida intacta, o que sugere que este composto sofre de extenso metabolismo de primeira passagem hepática. Por sua vez, os estudos realizados em ratos revelam que após a administração de uma dose de 40mg/kg de cumarina, esta é rapidamente absorvida e eliminada com um tempo de semivida de uma hora. No cão e no macaco, após a administração de uma dose por via oral de 1mg/kg, aproximadamente 45% da cumarina é absorvida intacta.

Os estudos realizados em humanos evidenciam que a cumarina é totalmente absorvida pelo trato gastro intestinal, após administração por via oral, e extensamente metabolizada pelo fígado numa primeira passagem hepática, sendo que apenas 2 a 6% da dose administrada chega intacta à circulação sistémica (Lake, 1999).

Devido aos seus parâmetros farmacocinéticos, nomeadamente ao seu baixo tempo de semivida e baixa biodisponibilidade, foram levantadas algumas questões relativas à relevância da cumarina *in vivo*. Foi então possível concluir que a cumarina pode ser considerada um pró-fármaco, uma vez que o seu metabolito a 7 – hidroxycumarina tem maior relevância sobretudo a nível terapêutico (Lacy e O’Kennedy, 2004).

É ainda relevante abordar a farmacocinética da cumarina após a sua administração por via tópica, uma vez que este composto é encontrado em vários produtos que entram em contacto com a pele, como perfumes, cosméticos e detergentes (Lake, 1999).

Beckley-Kartey e colaboradores (1997), estudaram a absorção e o metabolismo *in vitro* da cumarina em várias espécies, nomeadamente na ratazana, no rato e no homem. Foi possível observar que a cumarina é rapidamente absorvida através da pele de todas as espécies, tendo-se observado que 50% da dose foi absorvida pela pele da ratazana e

do homem após 72 horas, e que apenas de 45% da dose foi absorvida pela pele do rato após as mesmas 72 horas. Esta rápida absorção parece estar associada às propriedades químicas da cumarina, nomeadamente à sua elevada lipofilicidade e elevado coeficiente de partição óleo em água (1,2) que lhe permitem atravessar facilmente a barreira do *estrato corneum*, primeira barreira da pele (Beckley-Kartey et al., 1997).

### 4.3. Metabolismo

Desde o seu primeiro isolamento que a cumarina tem sido um foco de atenção por parte dos investigadores, tendo sido eleita como o modelo ideal para o estudo do metabolismo de estruturas orgânicas simples (Lacy e O’Kennedy, 2004).

O estudo do metabolismo dos compostos cumarínicos tem recebido uma especial atenção de modo a compreender a potencial toxicidade destes compostos.

A cumarina é principalmente metabolizada por uma superfamília de enzimas, o citocromo 450 (CYP) que catalisam reações oxidativas e redutivas, e desempenham um papel essencial no metabolismo de qualquer composto.

Esta superfamília está dividida em famílias e subfamílias, de acordo com as sequências nucleotídicas de cada enzima, sendo que os citocromos mais importantes na biotransformação de xenobióticos são o CYP1, CYP2 e CYP3 (Lacy e O’Kennedy, 2004).

#### 4.3.1. Vias metabólicas

A cumarina é oxidada principalmente por duas vias de metabolização de fase I, a via da 7 – hidroxilação e a via da 3,4 – epoxidação, esquematizadas na figura 10 (Lewis, Ito, e Lake, 2006). A suscetibilidade relativa à hepatotoxicidade, associada à exposição oral de cumarinas, é maior na ratazana do que no rato, e por último menor no homem (European Food Safety Authority, 2004). Tais diferenças devem-se ao facto das diferentes espécies metabolizarem estes compostos por vias de metabolização diferentes, sendo a via da 3,4 – epoxidação predominante na ratazana, e a via da 7 – hidroxilação predominante no homem e no rato (Felter et al., 2006).

No homem o metabolismo da cumarina tem vindo a ser investigado quer *in vitro* quer *in vivo*, sendo a via de metabolização principal a da 7- hidroxilação, onde a cumarina inicialmente é metabolizada pelo CYP2A6 hepático, representado na tabela 3, levando à obtenção de 7 - HC (Lacy e O’Kennedy, 2004). A 7 – HC e os seus metabolitos, não são considerados tóxicos, e representam cerca de 40 a 97% dos metabolitos da cumarina encontrados na urina humana, após a administração de 200 mg por via oral (Felter et al., 2006). De realçar ainda que estes metabolitos urinários são utilizados frequentemente como biomarcadores da atividade do CYP2A6.

Recentemente foi descoberto que o CYP2A6 pode sofrer de polimorfismos, o que leva a que alguns indivíduos consigam metabolizar a cumarina por uma outra via metabólica, a 3,4 – epoxidação (Lacy e O’Kennedy, 2004). A segunda via principal no metabolismo da cumarina é a 3,4 – epoxidação, como já fora referido. Esta dá origem ao 3,4 – epóxido (CE), que espontaneamente se rearranja em *o*- hidroxifenilacetaldeído (*o*- HPA), por abertura do anel de lactona. Este aldeído pode ser ou oxidado em ácido *o*- hidroxifenilacético (*o*-HPAA) ou reduzido a *o*- hidroxifeniletanol (*o*- HPE) (European Food Safety Authority, 2004).

No homem, esta reação de epoxidação é catalisada pelos CYP1A e CYP2E1 hepáticos, como representados na tabela 3.

Tabela 3 – Descrição das isoformas do citocromo P450 envolvidos no metabolismo da cumarina por humanos (adaptado de: Lewis et al., 2006)

CYP	Via metabólica
1A1	3,4- Epoxidação
1A2	3,4- Epoxidação
2A6	7- Hidroxilação
2E1	3,4- Epoxidação
3A4	3,4- Epoxidação e 3 - Hidroxilação

Esta via está associada à hepatotoxicidade exibida pelas ratas, após administração de cumarina, pois é a sua principal via de metabolização deste composto, sendo o *o*-HPAA é o principal metabolito urinário (European Food Safety Authority, 2004). Esta epoxidação apresenta um valor de  $K_m = 47 \mu\text{M}$  para o rato B6C3F1 e de

$K_m = 39 \mu\text{M}$  para a ratazana F344, o que significa que a formação de CE e de *o*-HPA é imediata.

O volume máximo para o rato é 5 vezes superior ao da ratazana, e uma vez que o rato não demonstra sinais de hepatotoxicidade, surgiram dúvidas se o aparecimento destes efeitos se encontrava associado à formação do epóxido.

Para os humanos, o  $K_m$  da reação de epoxidação varia entre 1 – 7 mM, o que indica que o CE e o *o*-HPA não são formados imediatamente, evidenciando que a 7 – hidroxilação é mesmo a principal via metabólica no homem (Felter et al., 2006).

Felter e colaboradores (2006) estudaram ambas as vias de metabolização da cumarina para diferentes espécies, ratazanas F344, ratos B6C3F1 e homem. No caso do rato B6C3F1, a formação de 7 – HC dá – se pela ação catalítica da CYP2A5, e apenas cerca de 7% da dose de 200 mg é encontrada na urina. Em contraste com o que acontece no homem e no rato B6C3F1, na ratazana F344 o metabolito 7 – HC não é encontrado na urina, o que sugere que esta não metabolize a cumarina pela via da 7 – hidroxilação.

Mediante os estudos realizados, surgiu a hipótese de que a via da 7- hidroxilação é inversamente proporcional ao desenvolvimento de hepatotoxicidade, ou seja, que a hepatotoxicidade se devia à metabolização da cumarina pela via da 3, 4 – epoxidação, uma vez que era formado o *o*-HPA - um aldeído tóxico.

Uma vez que começaram a ser reportados efeitos adversos a nível hepático no homem, foi formulada a hipótese de que um polimorfismo no CYP2A6 poderia ser um fator de risco, aumentando a suscetibilidade à hepatotoxicidade causada pela cumarina. Este polimorfismo no CYP2A6 é encontrado em cerca de 2% da população caucasiana e em cerca de 15 a 20 % da população asiática. Posta esta hipótese, foram feitos estudos em que a amostra incluía indivíduos com polimorfismo no CYP2A6, tendo-se concluído que este polimorfismo não influencia a suscetibilidade individual para o desenvolvimento de hepatotoxicidade, após a administração de uma dose terapêutica de cumarina (Felter et al., 2006).

Tendo em conta a hipótese de que a via de epoxidação nada tem a ver com o desenvolvimento de hepatotoxicidade, foram estudados outros aspetos como o processo de destoxificação do 3,4 – epóxido. Quando se forma, o 3,4 – epóxido é destoxificado através da conjugação com glutatona (GSH), sendo que esta via possui processos não enzimáticos e processos enzimáticos desempenhados pela enzima glutatona S-transferase (GST). Na ausência de glutatona S-transferase, o CE rearranja em *o*-HPA, que por sua vez é oxidado a ácido *o*- hidroxifenilacético (*o*-HPAA) ou reduzido a *o* –

hidroxifeniletanol. As diferenças na taxa de destoxificação do *o*-HPA entre espécies revelam-se importantes, pois este aldeído é mais tóxico que a cumarina *per si* a nível hepático.

Foi ainda demonstrado que o desenvolvimento de hepatotoxicidade pela ratazana aquando da sua exposição à cumarina se encontra relacionado com a destoxificação do epóxido formado, pois a taxa de destoxificação de *o*-HPA é limitada nesta espécie. No caso do rato, o *o*-HPA é rapidamente eliminado e portanto não se observam efeitos tóxicos ao nível do fígado. Em relação aos humanos, apesar da via da 3,4 – epoxidação ser secundária e a formação de *o*-HPA ser relativamente escassa, quando tal acontece o aldeído formado é destoxificado com eficiência. A suscetibilidade humana ao desenvolvimento de hepatotoxicidade após exposição à cumarina por via oral, encontra-se limitada a uma subpopulação com fatores de predisposição, como induções do CYP2A ou CYP2E1, níveis de GSH reduzidos, ou polimorfismos na GST ou na ALDH (aldeído desidrogenase) (Felter et al., 2006).

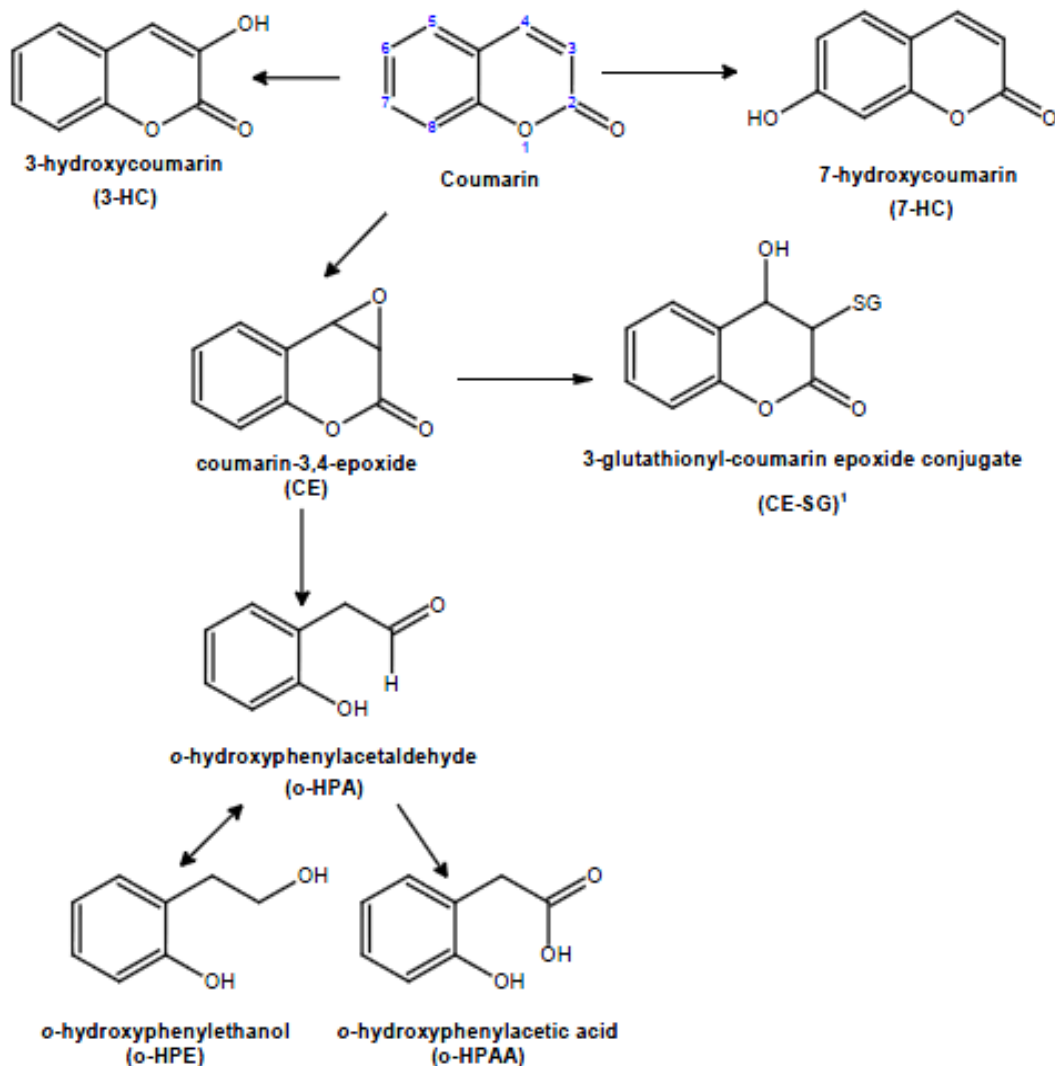


Figura 10 – Vias de ativação metabólica da cumarina, destacando-se a via da 3,4 – epoxidação e a via da 7 – hidroxilação (retirado de: European Food Safety Authority, 2004)

#### 4.4. Excreção

Após a administração de cumarina por via oral, esta é rapidamente eliminada. Cerca de 83% da dose é eliminada na urina passadas 24 horas, em comparação à taxa de 35% que foi observada em roedores no mesmo período e para a mesma dose. Tais resultados estão em concordância com a rápida absorção pelo trato gastro intestinal humano (Felter et al., 2006).

Existem diferenças quantitativas entre espécies relativamente à excreção das cumarinas, e às vias de eliminação; ao contrário do que acontece no homem, na ratazana

existe evidência que este composto sofre elevada excreção pelas vias biliares e pelas fezes (Lake, 1999).

## 5. Toxicidade

Ao longo dos anos, a toxicidade induzida pelos compostos cumarínicos tem recebido especial atenção após terem sido reportados múltiplos efeitos tóxicos em estudos realizados com diversos modelos animais. O mais característico e descrito efeito tóxico, é a hepatotoxicidade, observada após administração de cumarina a ratazanas, e ainda os tumores renais desenvolvidos por esta espécie. No rato, os estudos apontam para o desenvolvimento de tumores renais e hepáticos; no cão a administração de cumarina leva a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, enquanto no babuíno não foram demonstradas efeitos significativos após a administração de cumarina por via oral (Lake, 1999).

Uehara et al., (2008) estudaram as diferenças inter-espécies na hepatotoxicidade induzida após administração de cumarina, em hepatócitos de ratazana e em hepatócitos humanos. A nível histopatológico, após uma semana de administrações repetidas de cumarina, foram observadas diferenças nos tecidos, lesões degenerativas como a degeneração vacuolar e corpos de inclusão intracitoplasmáticos. Adicionalmente, entre o quarto e o nono dia de estudo, foram ainda observadas várias necroses ocasionais a nível dos hepatócitos. Vinte e quatro horas após a primeira administração de cumarina, foram também observadas diferenças a nível dos tecidos, como a dilatação do retículo endoplasmático dos hepatócitos, no grupo sujeito a maior dose. Tal observação é consistente com as lesões hepáticas causadas pela administração repetida de cumarina.

Como já fora referido, as várias espécies metabolizam a cumarina por vias diferentes, sendo que para os humanos a cumarina é maioritariamente metabolizada em 7 – HC, metabolito não tóxico; e nas ratazanas é maioritariamente metabolizada pela 3, 4 – epoxidação, formando o 3,4 – epóxido. Este último metabolito é destoxificado pela via da glutatona, sendo que quando se encontra em excesso não existe capacidade celular para a sua destoxificação, originando lesões celulares, pois a cumarina interfere com vários genes envolvidos no stress oxidativo, o que leva a uma diminuição do metabolismo de fase II (conjugação com a glutatona) (Lewis, Ito, e Lake, 2006; Uehara et al., 2008).

Como já fora referido, o homem está fortemente exposto à cumarina, quer por via oral, pois é utilizada pela indústria farmacêutica para fins medicinais, como aditivo alimentar e está presente numa grande variedade de plantas comestíveis; quer por via tópica, pois a cumarina é também muito utilizada na perfumaria e na indústria da cosmética.

Esta grande exposição do homem à cumarina, aliada aos vários relatos de toxicidade em animais, leva à necessidade de estudos toxicológicos em humanos e à implementação de normas relativas à quantidade máxima de cumarina permissível nos vários produtos alimentares.

Na década de 70 foi aprovada a utilização de cumarina para fins medicinais, devido ao seu grande potencial farmacoterapêutico. Sendo este composto utilizado para o tratamento de edemas, causados por problemas de circulação linfática e venosa, e ainda no tratamento do carcinoma de células renais e outros tumores, em doses até 7000 mg de cumarina por dia. Com a administração prolongada de cumarina, alguns indivíduos desenvolveram hepatotoxicidade, entre algumas semanas e os 6 meses de tratamento (Abraham et al., 2010).

Com base numa compilação de 51 casos reportados de hepatotoxicidade induzida pela cumarina, chegou – se à conclusão que a dose mais baixa passível de causar tal efeito tóxico era de 0.4 mg de cumarina por kg de peso corporal por dia. Sendo que, na maioria dos casos reportados em humanos, a hepatotoxicidade induzida por cumarina é revertida quando se interrompe sua administração (Fotland et al., 2012). Esta hepatotoxicidade, em humanos, foi reportada em mais estudos farmacoterapêuticos e toxicológicos, tendo-se levantado a hipótese da existência de um subgrupo da população que é mais suscetível à hepatotoxicidade induzida pela cumarina que a população em geral (Abraham et al., 2010; Fotland et al., 2012). Esta suscetibilidade acrescida num subgrupo da população, é ainda de causa desconhecida, no entanto algumas teorias têm sido propostas, como a existência de um polimorfismo no CYP2A6; tal polimorfismo levaria a uma maior metabolização da cumarina pela via da 3,4 – epoxidação, ou mesmo, que esta maior suscetibilidade poderia estar relacionada com a existência de uma doença prévia à sua administração, como a hepatite. No entanto, ambas as teorias foram refutadas (Abraham et al., 2010).

A cumarina, e alguns dos seus derivados, são utilizadas como anticoagulantes, sendo estes fármacos utilizados frequentemente na gravidez. Os estudos disponíveis,

relativos à exposição pré-natal à cumarina, referem vários efeitos adversos como efeitos teratogénicos nos ossos, no sistema nervoso central e distúrbios de crescimento.

Wesseling et al., (2001) estudaram os efeitos da exposição pré-natal à cumarina a longo prazo. Os resultados indicam que não foram encontradas anomalias neurológicas ou outras perturbações evidentes em crianças que sofreram exposição pré-natal à cumarina (Wesseling et al., 2001).

Devido à sua marcada presença na indústria alimentar, foram estabelecidos pela União Europeia na diretiva 88/388/EEC, um limite de 2mg de cumarina por kg de produto, em todos os tipos de comidas e bebidas, 10 mg de cumarina por kg de produto nalguns tipos de caramelos e bebidas alcoólicas, e 50 mg de cumarina por kg de produto em pastilhas elásticas (European Council, 1988).

Em 2004 a Autoridade Europeia da Segurança Alimentar (EFSA) publicou um documento que refere que a formação de tumores, após administração oral de cumarina, não tem origem genotóxica. Propondo um valor de TAMDI (consumo máximo diário teórico) e um valor de TDI (dose diária tolerada) para a cumarina (European Food Safety Authority, 2004; Mielke et al., 2011). Propuseram um TAMDI de 0.025mg de cumarina por kg de peso corporal por dia, para um indivíduo de 60kg (European Food Safety Authority, 2004). O cálculo do TAMDI (consumo máximo diário teórico) para a cumarina, baseou – se no consumo de 133.4g de comida sólida, 324g de bebidas variadas, 27g de doces, 2 g de pastilha elástica e 20g de bebidas alcoólicas, em que cada um dos produtos apresentava o valor máximo de cumarina permitido. No cálculo do TDI (dose diária tolerada), a EFSA baseou – se apenas nos relatos de estudos toxicológicos feitos em animais. Em contraste o TDI foi também calculado pelo Instituto Federal Alemão para a Avaliação do Risco (BfR), com base nos relatos de estudos toxicológicos feitos em animais, mas também, com base nos estudos toxicológicos realizados em humanos (Mielke et al., 2011). Ambos os cálculos resultaram num TDI de 0.1mg de cumarina por kg de peso corporal por dia (European Food Safety Authority, 2004; Mielke et al., 2011).

Na indústria alimentar o melhor parâmetro para avaliar a quantidade de cumarina presente nos alimentos e o risco de toxicidade para o homem, é o TDI de 01 mg por kg de peso corporal por dia.

Com vista a determinar a quantidade de cumarina presente nos alimentos e qual a quantidade destes alimentos que seria necessária ingerir para chegar ao TDI, Sproll et al. (2008) estudaram alguns alimentos disponíveis no mercado. Neste estudo foram

analisados bolachas, cereais de pequeno-almoço, algumas vodkas e produtos lácteos aromatizados com canela. As bolachas apresentaram cerca de 25mg de cumarina por kg, os cereais de pequeno-almoço 9 mg de cumarina por kg e as vodkas apresentaram valores abaixo do limite estipulado de 10 mg de cumarina por kg de produto. Relativamente aos produtos lácteos, estes também se encontravam abaixo do limite estipulado de 2 mg de cumarina por kg de produto.

Na tabela 4, encontram – se as quantidades que é necessário ingerir de cada alimento de modo a alcançar o valor de TDI, quer para adultos quer para crianças. É de notar que em relação aos produtos lácteos é necessário ingerir grandes quantidades dos mesmos para se atingir o TDI, o que denota que estão abaixo do limite estipulado para a sua categoria (2 mg de cumarina por kg de produto).Em oposição a estes últimos encontram-se as bolachas de canela (Sproll et al., 2008).

Tabela 4 - Quantidades de alimento necessárias para atingir o TDI de 0,1mg/kg.mc (dose diária tolerada) (retirado de: Sproll et al., 2008)

Product group	Amount of food required to reach the TDI of 0.1 mg/kg b.w. (worst-case scenario calculated with the maximum concentration determined for each food group as given in Table 3)	
	15-kg child	60-kg adult
Cinnamon star cookies (g)	17	68
Other bakery products and breakfast cereals (g)	47	188
Vodka flavoured with sweet grass (g)	–	750
Milk products (yoghurt, quark cheese, rice pudding) (g)	750	3000

A presença de cumarina nos produtos cosméticos não sofre qualquer tipo de restrição, o que torna difícil estimar qual é o limite máximo de exposição à cumarina por dia, por via tópica. No entanto, foi calculado teoricamente que o pior cenário

possível é uma exposição a cerca de 0.04 mg de cumarina por kg de peso corporal por dia (Abraham et al., 2010; Lake, 1999).



## 6. Propriedades farmacoterapêuticas

A indústria farmacêutica tem explorado o potencial de aplicação da cumarina e derivados, devido em grande parte à sua atividade biológica e farmacológica. Estes compostos apresentam várias potenciais aplicações farmacoterapêuticas, devido ao seu poder antioxidante, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, anticoagulante e adjuvante na terapêutica do cancro, entre outras. Tais propriedades julgam-se ter origem no grande poder antioxidante da cumarina, e seus derivados, pois conseguem inibir o *stress* oxidativo celular, diminuindo a produção de radicais livre e de espécies reativas de oxigénio que danificam as células. O poder antioxidante destes compostos está diretamente relacionado com o tipo de grupos substituintes no anel benzénico, e com as posições de substituição. As substituições com grupos hidroxilo no anel benzénico da cumarina aumentam a sua capacidade de suprimir os efeitos negativos das espécies reativas de oxigénio (Bubols et al., 2013).

O intervalo de dosagem da cumarina, quando utilizada para fins medicinais, varia entre as 8 mg por dia, quando utilizada para tratamento de edemas venosos, e as 7000 mg por dia, quando utilizada como adjuvante na terapia anti – neoplásica (Lacy e O’Kennedy, 2004).

### 6.1. Cumarina como Agente Antimicrobiano

A cumarina e os seus derivados, como a novobiocina e a clorobiocina, apresentam um grande poder antimicrobiano. Relativamente à cumarina, devido à sua capacidade de estimular a produção de macrófagos e estimular o sistema imunitário, tem sido utilizada no tratamento de várias infeções crónicas, como exemplo na brucelose por *Brucella abortis*, mononucleose, toxoplasmose e na febre Q (Jain e Joshi, 2012).

A novobiocina e a clorobicina, derivados da cumarina com um grupo amida ligado ao carbono 3 do anel benzénico, atuam impedindo o processo de replicação de ADN na célula bacteriana, sendo considerados antibióticos eficazes (Bubols et al., 2013).

## 6.2 Cumarinas como Agentes Anticoagulantes

Vários são os derivados cumarínicos sintéticos, empregues na prática clínica como agentes anticoagulantes, sendo eles a varfarina, o acenocumarol e o dicumarol. Estes derivados cumarínicos atuam por inibição da vitamina K, importante cofator na cascata de coagulação, impedindo a conversão de protrombina em trombina (De Almeida Chaves et al., 2010; Jain e Joshi, 2012). Ao contrário dos seus derivados, a cumarina *per si*, é utilizada como agente venotónico, pois não possui propriedades anticoagulantes (Felter et al., 2006).

## 6.3 Cumarinas e o seu papel na terapêutica do cancro

O estudo das cumarinas simples como adjuvantes na terapia anti – neoplásica tem merecido também uma particular atenção por parte dos investigadores. Os primeiros estudos incidiram na utilização de varfarina no melanoma maligno, sendo que este composto demonstrou ser capaz de inibir a proliferação tumoral e estimular as células do sistema imunitário, como os granulócitos, linfócitos e macrófagos. Adicionalmente estudaram a cumarina, como agente anti – neoplásico no melanoma maligno. Ambos os compostos cumarínicos demonstraram resultados positivos.

Devido aos resultados promissores obtidos pelos compostos cumarínicos no tratamento do melanoma maligno, a sua potencial aplicação como coadjuvantes no tratamento de carcinomas das células renais, no cancro da próstata e no tratamento de leucemia tem vindo a ser também testada (Lacy e O’Kennedy, 2004; Rohini K, 2014). Para além de utilizadas na terapia anti – neoplásica, as cumarinas podem ainda ser utilizadas como adjuvantes nos efeitos secundários causados por radioterapia (Jain e Joshi, 2012; Rohini K, 2014).

## 7. Conclusão

A cumarina e seus derivados, encontram – se abundantemente distribuídos no reino vegetal e têm sido amplamente utilizados pela indústria farmacêutica, alimentar e da cosmética.

Devido à sua marcada presença na indústria alimentar e tendo em conta os seus potenciais efeitos tóxicos, foram estabelecidos pela União Europeia na diretiva 88/388/EEC, limites máximos sobre a quantidade de cumarinas presentes nos produtos alimentares. Em 2004 a Autoridade Europeia da Segurança Alimentar (EFSA) propôs um valor de TAMDI (consumo máximo diário teórico), de 0.025mg de cumarina por kg de peso corporal por dia, para um indivíduo de 60kg; e um valor de TDI (dose diária tolerada) de 0.1mg de cumarina por kg de peso corporal por dia.

Graças ao seu poder antioxidante, a cumarina denota de várias aplicações farmacoterapêuticas, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, anticoagulante e adjuvante na terapêutica do cancro, entre outras.

Tendo em conta os seus parâmetros farmacocinéticos, é possível concluir que a cumarina é rapidamente absorvida e distribuída por todo o corpo, podendo ser considerada um pró – fármaco, dado que o seu metabolito 7 – HC tem elevada relevância biológica.

De entre os efeitos tóxicos induzidos pela cumarina, o mais descrito e preocupante em seres humanos é a hepatotoxicidade. Os estudos efetuados até à data referem que estes efeitos tóxicos poderão estar relacionados com as diferentes vias de metabolização da cumarina nas diferentes espécies, e ainda com uma suscetibilidade acrescida por parte de um subgrupo da população humana à cumarina, sendo esta suscetibilidade ainda de etiologia desconhecida.

Após esta revisão bibliográfica constata-se que são ainda necessários mais estudos toxicológicos para apurar a toxicidade relativa à exposição oral de cumarinas, uma vez que, apesar da existência de um subgrupo da população que é mais suscetível a este composto, ainda não são conhecidos os mecanismos que causam tal suscetibilidade.



## 8. Bibliografia

- Abraham, K., Wöhrlin, F., Lindtner, O., Heinemeyer, G., e Lampen, A. (2010). Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(2), 228–239. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200900281>
- Bairagi, S. H., Salaskar, P. P., Loke, S. D., Surve, N. N., Tandel, D. V., e Dusara, M. D. (2012). Medicinal significance of coumarins: A review. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2), 16–19.
- Beckley-Kartey, S. a, Hotchkiss, S. a, e Capel, M. (1997). Comparative in vitro skin absorption and metabolism of coumarin (1,2-benzopyrone) in human, rat, and mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145(1), 34–42. <http://doi.org/10.1006/taap.1997.8154>
- Boisde, P. M., e Meuly, W. C. (2007). Coumarin. In John Wiley e Sons Ltd. (Ed.), *Encyclopedia of Chemical Technology* (5<sup>a</sup> ed.). Chichester.
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., e Uriarte, E. (2005). *Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity*. *Current medicinal chemistry* (Vol. 12). <http://doi.org/10.2174/0929867053507315>
- Bourgaud, F., Hehn, a., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., e Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5(2-3), 293–308. <http://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2>
- Bubols, G. B., Vianna, D. D. R., Medina-Reimon, A., von Poser, G., Lamuela-Raventos, R. M., Eifler-Lima, V. L., e Garcia, S. C. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(3), 318–34. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876957>

- Cherng, J. M., Chiang, W., e Chiang, L. C. (2008). Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry*, 106(3), 944–950. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.005>
- Clark, G. S. (1995). Coumarin. An aroma chemical profile. *Perfumer e Flavorist*, 20, 23–34.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., e Lewis, N. G. (2000). Secondary Metabolites. *Biochemistry Molecular Biology of Plants*, 7(7), 1250–1318. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.10.011>
- Cunha, A. P. da (Fundação C. G. (2010). *Farmacognosia e Fitoquímica*. (Fundação Calouste Gulbenkian, Ed.) (3<sup>a</sup> ed.). Lisboa. 212-213; 226-227.
- Czelusniak, K. E., Brocco, A., Pereira, D. F., e Freitas, G. B. L. (2012). Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(2), 400–409. <http://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200022>
- De Almeida Chaves, D. S., Costa, S. S., De Almeida, A. P., Frattani, F., Assafim, M., e Zingali, R. B. (2010). Metabólitos secundários de origem vegetal: Uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. *Química Nova*, 33(1), 172–180. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100030>
- Dewick, P. M. (2002). Coumarins. In John Wiley e Sons Ltd (Ed.), *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (2<sup>a</sup> ed., pp. 142–144). <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.005>
- Egan, D., O’Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., e Thornes, R. D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metabolism Reviews*, 22(5), 503–529. <http://doi.org/10.3109/03602539008991449>

- European Council. (1988). Council Directive (EEC) No. 88/388 on the approximation of the laws of the Member States relating to flavourings for use in foodstuff and to source materials for their production. *Official Journal of the European Communities*, 29(June 1988), 61–66. Disponível em [http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit\\_flavor/flav09\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav09_en.pdf)
- European Food Safety Authority, E. (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; adopted on 6 October 2004. *The EFSA Journal*, 104, 1–36.
- Felter, S. P., Vassallo, J. D., Carlton, B. D., e Daston, G. P. (2006). A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4), 462–475. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.019>
- Fotland, T., Paulsen, J. E., Sanner, T., Alexander, J., e Husøy, T. (2012). Risk assessment of coumarin using the bench mark dose (BMD) approach: Children in Norway which regularly eat oatmeal porridge with cinnamon may exceed the TDI for coumarin with several folds. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 903–912. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.005>
- Health, B., No, A., Commission, T. E., Directive, F., e Assessment, R. (2006). Consumers , who eat a lot of cinnamon , currently have an overly high exposure to coumarin, (043), 1–13.
- Hiermann, A., Schantl, D., Schubert-zsllavec, M., e Reinert, J. (1996). Coumarins from *Peucedanum ostruthium*, 43(4), 881–883.
- Jain, P. K., e Joshi, H. (2012). Coumarin: Chemical and pharmacological profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 236–240. <http://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2643>
- Lacy, A., e O’Kennedy, R. (2004). Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 10(30), 3797–3811. <http://doi.org/10.2174/1381612043382693>

- Lake, B. G. (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 37(4), 423–453. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00010-1](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00010-1)
- Lewis, D. F. V, Ito, Y., e Lake, B. G. (2006). Metabolism of coumarin by human P450s: A molecular modelling study. *Toxicology in Vitro*, 20(2), 256–264. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.001>
- Maistro, E. L., de Souza Marques, E., Fedato, R. P., Tolentino, F., da Silva, C. D. A. C., Tsuboy, M. S. F., ... Varanda, E. A. (2014). In Vitro Assessment of Mutagenic And Genotoxic Effects of Coumarin Derivatives 6,7-Dihydroxycoumarin and 4-Methylesculetin. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(2), 109–118. <http://doi.org/10.1080/15287394.2014.943865>
- Mielke, H., Abraham, K., Götz, M., Vieth, B., Lampen, A., Luch, A., e Gundert-Remy, U. (2011). Physiologically based toxicokinetic modelling as a tool to assess target organ toxicity in route-to-route extrapolation-The case of coumarin. *Toxicology Letters*, 202(2), 100–110. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.01.022>
- Pan, T. L., Wang, P. W., Aljuffali, I. a., Leu, Y. L., Hung, Y. Y., e Fang, J. Y. (2014). Coumarin derivatives, but not coumarin itself, cause skin irritation via topical delivery. *Toxicology Letters*, 226(2), 173–181. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.009>
- Petruľová-Poracká, V., Repčák, M., Vilková, M., e Imrich, J. (2013). Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides. *Food Chemistry*, 141(1), 54–59. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.004>
- Rohini K, S. P. (2014). Therapeutic Role of Coumarins and Coumarin-Related Compounds. *Journal of Biofertilizers e Biopesticides*, 05(01), 5–7. <http://doi.org/10.4172/2157-7544.1000130>
- Samovich, S. N., Brinkevich, S. D., Edimecheva, I. P., e Shadyro, O. I. (2014). Radiation-chemical transformations of coumarins in ethanolic solutions. *Radiation*

- Physics and Chemistry*, 100, 13–22.  
<http://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2014.03.015>
- Sethna, S., e Shah, N. (1945). The Chemistry of Coumarins. *Chemical Reviews*, (224), 1–62. <http://doi.org/10.1021/cr60113a001>
- Sproll, C., Ruge, W., Andlauer, C., Godelmann, R., e Lachenmeier, D. W. (2008). HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. *Food Chemistry*, 109(2), 462–469. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.068>
- Subramaniam, S. R., e Ellis, E. M. (2013). Neuroprotective effects of umbelliferone and esculetin in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 91(3), 453–461. <http://doi.org/10.1002/jnr.23164>
- Uehara, T., Kiyosawa, N., Shimizu, T., Omura, K., Hirode, M., Imazawa, T., ... Urushidani, T. (2008). Species-specific differences in coumarin-induced hepatotoxicity as an example toxicogenomics-based approach to assessing risk of toxicity to humans. *Human e Experimental Toxicology*, 27(1), 23–35. <http://doi.org/10.1177/0960327107087910>
- Venugopala, K. N., Rashmi, V., e Odhav, B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International*, 2013(Table 1). <http://doi.org/10.1155/2013/963248>
- Wesseling, J., Van Driel, D., Smrkovsky, M., Van Der Veer, E., Geven-Boere, L. M., Sauer, P. J. J., e Touwen, B. C. L. (2001). Neurological outcome in school-age children after in utero exposure to coumarins. *Early Human Development*, 63(2), 83–95. [http://doi.org/10.1016/S0378-3782\(01\)00140-2](http://doi.org/10.1016/S0378-3782(01)00140-2)

