

계피식물(*Cinnamomum loureiroi*)에서 분리한 coumarin과 유도체의 방오효과

김영도 · 신현웅 · 조지영*

순천향대학교 해양생명공학과

Antifouling Activity of Coumarin and its Derivatives Isolated from the Cinnamon Tree *Cinnamomum loureiroi*

Young Do Kim, Hyun Woung Shin and Ji Young Cho*

Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

The active antifouling compounds coumarin and its derivatives were isolated from the cinnamon tree *Cinnamomum loureiroi*. The antifouling activities were determined using representative soft fouling organisms: the seaweed *Ulvapertusa* and diatom *Navicula annexa*. The chemical constituents with antifouling activities were identified as coumarin, hydroxycoumarin, coumaric acid, and cinnamaldehyde by interpreting nuclear magnetic resonance, and high-resolution mass spectroscopy data. These compounds were isolated from 1.09 g of crude *Cinnamomum* sp. methanol extract, yielding approximately 18.4, 6.3, 9.8, and 14.7 mg of coumarin, hydroxycoumarin, coumaric acid, and cinnamaldehyde, respectively. The compounds inhibited *U. pertusa* zoospores with EC₅₀ values of 0.13-0.25 µg/mL, and the diatom *N. annexa* with EC₅₀ of 0.21-0.81 µg/mL.

Key words: Antifouling, Coumarin, *Ulva pertusa*, *Navicula annexa*, NMR

서 론

해수 및 담수 환경에서 생물의 부착현상은 인공구조물이나 배의 선체, 발전소와 공장의 냉각장치, 양식장의 그물 등에 부착하게 되어 시설물의 기능저하를 일으키며 기술적, 경제적 손실을 야기시킨다(Callow and Edyvean, 1990). 부착방지를 위해 기존에 주석을 함유한 방오제를 사용하여 왔으나 국제해사기구(International Maritime Organization) (IMO, 2001)의 사용규제로 Igarol, dichlofluanid, diuron 등과 같은 물질이 대체 물질로서 사용되고 있다(Voulvoulis et al. 2000; Yamada 2007; Cresswell et al. 2006). 그러나 최근의 연구에 따르면 이들 물질 또한 비표적 생물에 대한 독성을 지니며 한국연안에서도 오염이 확인되고 있다. Irgarol과 diuron의 경우 식물에 대한 강한 독성과(Fernández-Alba et al. 2002), 성계에 대한 배아독성(embryotoxicity)를 나타내며(Manzo et al., 2006), dichlofluanid의 경우 발암성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Fernández-Alba et al. 2002). 또한 Lee et al. (2010)의 연구에

의하면 한국연안에서의 Irgarol의 오염은 2006년도 조사에서는 23.80 ng/L였으며 2009년의 경우는 67.64 ng/L로 증가하였고 dichlofluanid는 61.69 ng/L에서 74.79 ng/L로 오염도가 증가하고 있는 것으로 보고되었다.

따라서 본 연구는 이들 물질을 대체 할 수 있는 새로운 방오제의 개발을 목적으로 실시하였고, 그 대상으로 주변에서 흔한 육상식물 추출물을 탐색하였다. 70여종의 식물 추출물을 파래포자를 대상으로 방오효능을 탐색 한 결과, 계피 추출물에서 가장 좋은 효능을 확인 하였다. 계피는 녹나무과(Lauraceae)의 식물로 250종이 보고되고 있으며 인도, 중국, 스리랑카, 베트남, 호주 등에 분포하는 것으로 알려져 있다(Prasad et al. 2009). 계피로부터 coumarins, cinnamaldehyde, cinnamon oil, diterpenoids, polyphenols, cinnamic acid 등의 물질이 분리되어 보고되었으며, 이들 물질과 그 유도체는 항균활성과 노화방지 효능 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되었다. 일례로 cinnamon oil은 노화방지 효능을 보이며(Gende et al. 2008; Faix et al. 2009), cinnamic aldehyde는 항균효과

Article history;

Received 24 September 2012; Revised 8 January 2013; Accepted 13 February 2013

*Corresponding author: Tel: +82. 41. 530. 1709 Fax: +82. 41. 530. 1638

E-mail address: jycho@sch.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 46(1) 053-058, February 2013

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0053>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

(Kim et al. 2004), cinnamon diterpene은 엘러지 억제효과를 보인다(Nohara et al. 1985). 또한 계피 추출물은 경련억제, 항궤양, 담즙분비촉진, 진통효과, 항균, 해열, 지방분해효과 등의 효능이 보고되어 있다(Cralg 1999).

계피에서 많은 물질이 분리되어 다양한 효능이 보고되고 있지만 방오효능이 알려진 물질은 cinnamic acid 뿐으로 trans-cinnamic acid는 갈파래(*Ulva fasciata*)의 포자 부착을 저해하며(Shin et al., 2001), p-(sulphoxy) cinnamic acid는 해양세균과 따개비의 부착을 저해하는 것으로 알려져 있다(Todd et al., 1993). 본 연구에서는 다양한 생리활성이 보고된 계피의 추출물에서 방오효능을 나타내는 또다른 물질을 분리하여 그 구조분석의 결과와 물질의 효능을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

추출 및 분리

계피는 베트남산의 *Cinnamomum loureiroi* (Saigon cinnamon, Vietnamese cassia. or Vietnamese cinnamon)를 구입하여 파쇄하고 Jin et al. (1997)의 방법으로 80% 메탄올을 이용하여 추출하였다. 추출은 3회 반복하였고 진공농축기를 사용하여 메탄올을 증발시킨 후 40 mg/mL의 농도로 조제 하였다. 추출물은 celite에 흡착시켜 실리카겔(500 g; 70-230 mesh) 크로마토그래피를 통하여 1차 분리하였고, 전개용매는 hexane, ethyl acetate, methanol을 비극성에서 극성으로 20% 간격의 비율로 혼합하여 step-gradient로 사용하였다. 분획구 중 방오활성을 나타내는 ethyl acetate:methanol (4:1, v/v)의 분획을 HPLC (Agilent 1200series; Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 2차 분리를 실시하였다. 컬럼은 uBondapak C8 reversed-phase column (10 × 250 mm, 10 μm; Phenomenex, Torrance, CA)을 사용하였고, acetonitrile과 water (HPLC grade)를 이동상으로 하여 isocratic (30% acetonitrile)의 조건으로 분리하였다. 유속 2 mL/min로 하여 100분 동안 분리하였고 물질의 검출은 UV detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 220 nm에서 실시하였다.

구조분석

분리된 물질은 high resolution fast atom bombardment mass spectrometer (HR-FABMS, JMS HX 110; JEOL, Japan)를 이용하여 질량분석을 실시하였다. 핵자기공명분석(nuclear magnetic resonance: NMR)은 JNM-ECP 600 NMR spectrometer (JEOL)을 이용하였으며 용매는 methanol-*d* (CD₃OD)를 이용하여 ¹H, ¹³C, correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear multiple bond correlation (HMBC), heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC)등을 측정하였다.

방오효능 검증

물질의 부착방지 효능은 대표적인 연성 부착생물인 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)의 포자와 부착성 미세조류(*Navicula annexa*)를 대상으로 실험하였다. 파래는 2010년 6-7월 안면도 암반에서 채집하였고 포자방출은 Cho et al. (2001)의 방법을 따랐다. 방출된 포자는 PES 배지 (Provasoli, 1968)에 현탁시켜 부착방지 효능 검증에 사용하였고 부착기질로는 슬라이드글라스를 사용하였다. 슬라이드글라스(1 × 2.5 cm)는 10% HCl에 12시간 동안 넣어둔 후 증류수에 다시 12시간 넣은 후 세척하여 사용하였다. 슬라이드글라스를 24well plate의 각 well에 3개를 세워서 넣고 파래 포자(1 × 10⁵ cells/mL)를 PES배지에 현탁하여 2 mL 용량으로 접종하였다. 추출물 또는 분리 물질을 주입하고 암기로 20°C에서 배양하였고 6시간 후 결과를 확인하였다. 부착성 미세조류 *Navicula annexa*는 한국미세조류 은행에서 분양 받아 F/2 배지에서 배양하였다. 배양은 20°C에서 70 μmol/m²/s (light:dark=12:12)의 광 조건으로 진탕배양기에서 50 rpm으로 실시하였다. 효능검증을 위한 실험은 파래를 대상으로 한 실험과 동일한 방법으로 실시하였고, 2.5 × 10⁴ cells/mL의 농도로 접종하여 7일 배양 후 부착여부를 확인하였다 (Cho, 2012). 실험에 사용한 물질은 DMSO에 녹여 접종하였으며 음성대조군으로는 DMSO를 사용하였고, 양성대조군으로는 Irgarol을 사용하였다. 물질의 방오효능은 LC₅₀ (반수치사농도)와 EC₅₀ (반수영향농도)를 구하여 효능계수(therapeutic ratio)로 나타내었다(Clare 1992). 효능계수는 독성에 대한 효능의 비율을 나타낸 것으로 값이 15이상인 경우 친환경의 방오효능을 가진 것으로 판단한다(Fusetani, 2011).

결과 및 고찰

활성물질 분리 및 효능

부착방지 물질의 분리를 위해 계피(건중량 17.6 g)로부터 추출물 1.09 g을 얻었고 silica gel chromatography와 역상 HPLC를 이용하여 분리하였다. 먼저 silica gel chromatography로 분리한 결과 9개의 분획구를 얻었고 그 중 파래포자를 대상으로 한 실험에서 부착억제 효능을 나타내는 2개의 분획구를 확인하였다. 분획구6은 ethyl acetate : methanol (4: 1)을 전개용매로 하였고, 포자 부착억제에 대한 4.6 μg/mL의 EC₅₀ 값을 나타내었다. 이 분획구는 다른 분획구에 비해 가장 높은 활성이 보였으며 91 mg을 얻었다. 분획구7 (126 mg)은 ethyl acetate : methanol (1: 1)을 전개용매로 하였고 포자 부착억제에 대한 5.3 μg/mL의 EC₅₀ 값을 나타내었다. 분획구6은 HPLC를 통해 2차 분리를 실시하였고 30% acetonitrile을 이용한 isocratic 조건에서 4개의 활성물질 peak를 확인하였다. 각 물질 peak는 29, 35, 45, 75분에서 나타났으며, 물질의 양은 각각 18.4, 6.3, 9.8, 14.7 mg 이었다.

Table 1. Inhibition of zoospores settlement of *Ulva pertusa* by coumarin and its derivatives

Compounds ($\mu\text{g/mL}$)	LC ₅₀	EC ₅₀	LC ₅₀ /EC ₅₀
Compound (1)	13	0.18	72.2
Compound (2)	12	0.13	92.3
Compound (3)	20	0.25	166.7
Compound (4)	29	0.24	120.8

¹LC₅₀: the mean lethal dose.

²EC₅₀: the half-maximal effective concentration.

본 실험에서 계피에서 추출한 각 활성물질의 방오효능을 측정 한 결과, 파래 포자의 부착방지 효능에서는 EC₅₀ 값은 0.13-0.25 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며 LC₅₀ 값은 12 - 29 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 그 중 물질 (2)는 가장 낮은 EC₅₀값을 보였고 효능 계수는 92.3이었다(Table 1).

또한 미세조류 부착방지 효능에서는 EC₅₀ 값은 0.21-0.81 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며 LC₅₀ 값은 15-48 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 그 중 물질 (2)가 가장 낮은 EC₅₀값을 보였고 효능계수는 71.4로 가장 우수하였다(Table 2).

구조분석

계피추출물의 분획구6에서 분리한 4개의 활성물질은 NMR과 HR-MS로 분석한 결과, 물질은 각각 coumarin (1), hydroxylcoumarin (2), coumaric acid (3), cinnamaldehyde (4)로 확인되었고 분석결과는 Table3과 Table 4에 나타내었다. 물질 (1)은 HR-FABMS 질량분석결과 146.1024 ([M+H]⁺)로 분자량은 145로 나타났으며, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 통해 분자식은 C₉H₆O₂인것으로 확인되었다. ¹H-NMR에서는 6개의 signal을 확인하였고 그것은 각 δ 6.43 (H-3: 1H, d), 7.95 (H-4: 1H, d), 7.57 (H-5: 1H), 7.34 (H-6, 1H), 7.49 (H-7: 1H), 7.32 (H-8: 1H)이었다. ¹³C-NMR에서는 9개의 signal을 확인하였고 δ 162.7 (C-2), δ 117.3 (C-3), 145.6 (C-4), 129.4 (C-5), 125.8 (C-6), 133.1 (C-7), 117.6 (C-8), 155.4 (C-9), 120.3 (C-10)이었다. NMR 분석 결과와 Günther et al. (1975)이 보고한 문헌의 자료를 비교한 결과, 물질(1)은 coumarin으로 확인되었다 (Fig.1-1).

물질 (2)는 질량분석결과 162.0974 ([M+H]⁺)로 분자량은 165였으며 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 통한 분자식은 C₉H₆O₃이었다. ¹H-NMR에서는 δ 6.45 (H-3: 1H, d), 7.56 (H-5: 1H), 7.34 (H-6, 1H), 7.48 (H-7: 1H), 7.32(H-8: 1H)등의 5개의 signal을 나타내었고, ¹³C-NMR에서는 δ 162.7 (C-2), 95.6 (C-3), 164.8 (C-4), 129.5 (C-5), 125.8 (C-6), 133.1 (C-7), 117.6 (C-8), 155.5 (C-9), 119.5 (C-10)의 9개의 signal을 나타내었다. NMR의 분석 결과와 Günther et al. (1975)이 보고한 문헌의 자료를 비교한 결과 물질(2)은 hydroxylcoumarin으로 확인

Table 2. Inhibition of diatom settlement of *Navicula annexa* by coumarin and its derivatives

Compounds ($\mu\text{g/mL}$)	LC ₅₀	EC ₅₀	LC ₅₀ /EC ₅₀
Compound (1)	20	0.35	57.1
Compound (2)	15	0.21	71.4
Compound (3)	40	0.64	109.3
Compound (4)	48	0.81	59.3

¹LC₅₀: the mean lethal dose.

²EC₅₀: the half-maximal effective concentration.

되었다(Fig.1-2).

물질 (3)은 질량분석결과 164.1187 ([M+H]⁺)이며 분자량은 163이었으며, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 통해 분자식은 C₉H₈O₃로 나타났다. ¹H-NMR에서는 6개의 signal을 확인하였고 그것은 각 δ 6.56 (H-2: 1H), 6.95 (H-3: 1H), 7.12 (H-3a, 1H), 7.21 (H-4a: 1H), 7.19 (H-5a: 1H), 7.46 (H-6a: 1H)이었다. ¹³C-NMR에서는 δ 171.6 (C-1), 121.3 (C-2), 146.5 (C-3), 123.4 (C-1a), 161.0 (C-2a), 121.8 (C-3a), 132.4 (C-4a), 124.3 (C-5a), 129.8 (C-6a)의 9개의 signal을 확인하였다. Hoff et al. (1994)이 보고한 문헌의 자료와 비교한 결과, 물질(3)은 coumaric acid로 확인되었다(Fig. 1-3).

물질(4)는 질량분석결과 146.1346([M+H]⁺)으로 분자량은 145이며 분자식은 C₁₀H₁₀O인것으로 확인되었다. ¹H-NMR에서는 δ 8.91 (H-1: OH), 6.98 (H-3: 1H), 1.91 (H-4, 3H), 7.42 (H-2a: 1H), 7.35 (H-3a: 1H), 7.28 (H-4a: 1H), 7.31 (H-5a: 1H), 7.53 (H-6a: 1H) 등의 8개의 signal을 확인하였고, ¹³C-NMR에서는 δ 191.2 (C-1), 134.6 (C-2), 141.8 (C-3), 9.7 (C-4), 142.6 (C-1a), 131.2 (C-2a), 136.4 (C-3a), 132.4 (C-4a), 136.4 (C-5a), 131.3 (C-6a)로 10개의 signal을 확인하였다. SubashBabu et al. (2007)이 보고한 문헌의 자료와 비교한 결과, 물질(4)은 cinnamaldehyde로 확인되었다(Fig. 1-4).

Coumarin은 benzopyrone 그룹의 물질로 벤젠고리와 pyrone 고리로 구성되며 많은 식물에서 분리가 보고되고 있다. 이것은 essential oils, cinnamon barkoil, cassia leaf oil, lavender oil 등에서 많이 발견되고(Lacy and O'Kennedy 2004), 그 유도체들은 *Streptomyces*, *Aspergillus*와 같은 미생물에서도 분리가 보고되었다(El-Gendy et al. 2008; Aguirre-Pranzoni et al. 2011). Coumarin은 6개의 탄소 자리가 hydroxylation에 의해 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-hydroxycoumarins 또는 6,7-dihydroxycoumarin으로 생합성되어진다. 또한 펼쳐진 pyrone 링의 형태로 부터 o-hydroxyphenylacetal-dehyde, o-hydroxyphenylethanol, o-hydroxyphenylacetic acid, o-hydroxyphenyllactic acid, o-hydroxyphenylpropionic acid, o-coumaric acid등이 생성된다 (Lake 1999). Coumarin과 그 유도체들은 다양한 생리활성을 가진 것으로 보고되고 있다. 예를들어 furanocoumarins은 살

Table 3. ^{13}C -NMR spectral data for coumarin and its derivatives

Position	Compound	Compound	Compound	Compound
	(1)	(2)	(3)	(4)
	δC	δC	δC	δC
1			171.6	191.2
2	162.7	162.7	121.3	134.6
3	117.3	95.6	146.5	141.8
4	145.6	164.8		9.7
5	129.4	129.5		
6	125.8	125.8		
7	133.1	133.1		
8	117.6	117.6		
9	155.4	155.5		
10	120.3	119.5		
1a			123.4	142.6
2a			161.0	131.2
3a			121.8	136.4
4a			132.4	132.4
5a			124.3	136.4
6a			129.8	131.3

Table 4. ^1H -NMR spectral data for coumarin and derivatives

Position	Compound	Compound	Compound	Compound
	(1)	(2)	(3)	(4)
	δH	δH	δH	δH
1				8.91
2			6.56	
3	6.43	6.45	6.95	6.98
4	7.95			1.91
5	7.57	7.56		
6	7.34	7.34		
7	7.49	7.48		
8	7.32	7.32		
9				
10				
1a				
2a				7.42
3a			7.12	7.35
4a			7.21	7.28
5a			7.19	7.31
6a			7.46	7.53

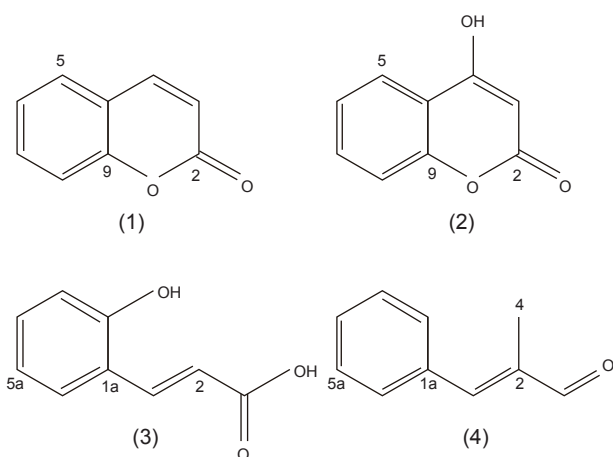


Fig. 1. Structures of coumarin and derivatives isolated from a cinnamon extract. (1); coumarin, (2); hydroxycoumarin, (3); coumaric acid, (4); cinnamaldehyde.

충효과를 나타내며(Hadaček et al. 1994), scopoletin, umbelliferone, xanthotoxin, herniarin 등은 항균효과를 나타낸다(Ojala et al. 2000). Coumaric acid는 항산화효과가 보고되었고(Zang et al. 2000), cinnamaldehyde는 *Helicobacter pylori*에 항균활성을 나타낸다(Ali et al. 2005).

본 연구에서 계피로부터 분리된 물질의 방오효능은 방오 효능계수로 나타내었고, 상용되고 있는 Irgarol의 효능계수가 15 이하인 반면 coumarin과 그 유도체들은 최소 72.3 이상으로 친환경의 방오제로의 가능성을 보여주는 값이다. 방오효능의

결과, coumarin과 hydroxycoumarin은 coumaric acid와 cinnamaldehyde 보다 더 효과가 뛰어나며, 이것은 close ring이 open ring보다 방오효능에서는 더 효과가 있는 것으로 보여진다.

수중환경에서 생물 부착의 초기과정은 부착성 미세조류와 해조류 포자와 같은 연성생물이 주를 이루고, 이들은 polymer를 분비하고 biofilm을 형성한다. 무척추동물의 유생은 이들의 polymer와 biofilm을 인식하여 2차적인 부착이 일어나게 된다(Wieczorek and Todd, 1998). 따라서 초기 연성 생물의 부착을 억제하는 것은 수중환경에서 생물의 부착을 막을 수 있는 가장 효과적인 방법이 될 것이다(Cho, 2012).

본 연구의 효능검증에는 대표적인 연성 부착생물인 *U. per-tusa*와 *N. annexa*를 사용하였고, 이들의 억제를 통해 2차적인 무척추동물의 부착을 억제할 수 있을 것이다. 방오제의 개발은 해양환경의 보호를 위해 중요한 과제일 뿐만 아니라 친환경의 방오제의 개발은 방오도료산업에도 필수적인 과제이다. Coumarin과 그 유도체들의 방오효능에 대한 보고는 본 연구가 최초이며 이 물질들을 혼합한 친환경 방오도료의 개발이 가능할 것이다.

사 사

이 논문은 2012년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (한국연구재단-C1ABA001-2012-0029960).

참고문헌

- Aguirre-Pranzoni C, Orden AA, Bisogno FR, Ardanaz CE, Tonn CE and Kurina-Sanz M. 2011. Coumarin metabolic routes in *Aspergillus* spp. *Fungal Biol* 115, 245-252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2010.12.009>
- Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasal H, Rao LV, Habibullah CM, Sechi LA and Ahmed N. 2005. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annal Clinic Microbiol Antimicro* 4, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-4-20>
- Callow ME and Edyvean RGV. 1990. Algal fouling and corrosion. In: Introduction to applied phycology. Akatsuka I, ed. SPB Academic Publishing, Hague, Netherlands, 369-387.
- Cho JY. 2012. Antifouling steroids isolated from red alga epi-phyte filamentous bacterium *Leucothrixmucor*. *Fish Sci* 78, 683-689. <http://dx.doi.org/10.1007/s12562-012-0490-8>
- Cho JY, Kwon EH, Choi JS, Hong SY, Shin HW and Hong YK. 2001. Antifouling activity of seaweed extracts on the green alga *Enteromorpha prolifera* and the mussel *Mytilus edulis*. *J App Phycol* 13, 117-125.
- Clare AS, Rittschof D, Gerhart DJ and Maki JS. 1992. Molecular approaches to nontoxic antifouling. *Invertebr Reprod Dev* 22, 67-76.
- Cragl WJ. 1999. Health-promoting properties of common herbs. *Amer J Clin Nutr* 70, 4915-4995.
- Cresswell T, Richards JP, Glegg GA and Readman JW. 2006. The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters. *Mar Pollut Bull* 52, 1169-1175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.01.014>
- El-Gendy MMA, Shaaban M, EL-Bondkly AM and Shaaban KA. 2008. Bioactive benzopyrone derivatives from new recombinant fusant of marine Streptomyces. *Appl Biochem-Biotechnol* 150, 85-96. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8192-5>
- Faix Š, Faixová Z, Plachá I and Koppel J. 2009. Effect of *Cinnamomumzeylanicum* essential oil on antioxidative status in broiler chickens. *Act Vet Brno* 78, 411-417. <http://dx.doi.org/10.2754/avb200978030411>
- Fernández-Alba AR, Hernando MD, Piedra L and Chisti Y. 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta* 456, 303-312.
- Fusetani N. 2011. Antifouling marine natural products. *Nat Prod Rep* 28, 400-410. <http://dx.doi.org/10.1039/C0NP00034E>
- Gende, LB, Floris I, Fritz R and Eguaras MJ. 2008. Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomumzeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentina. *Bull Insectol* 61, 1-4.
- GüntherH, PrestienJ and Joseph-NathanP. 1975. Carbon-13 NMR spectra of coumarin and methoxycoumarins-a reinvestigation of charge density/Chemical Shift Relations. *Org Magnet Reson* 7, 339-344.
- Hadaček F, Müller C, Werner A, Greger H and Proksch P. 1994. Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum*(Apiaceae: Apiodeae). *J Chem Ecol* 20, 2035-2054.
- Hoff WD, Dux P, Hard K, Devreese B, Nugteren-Roodzant IM, Crielaard W, Boelens R, Kaptein R, Van Beeumen J and Hellingwerf KJ. 1994. Thiol ester-linked p-coumaric acid as a new photoactive prosthetic group in a protein with rhodopsin-like photochemistry. *Biochem* 33, 13959-13962.
- IMO (The International Maritime Organization). 2001. International convention on the control of harmful anti-fouling systems on ships. www.imo.org (AFS convention)
- Jin HJ, Kim JH, Sohn CH, DeWreede RE, Choi TJ, Tower GHN, Hudson JB and Hong YK. 1997. Inhibition of TaqDNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. *J Appl Phycol* 9, 383-388.
- Kim HO, Park SW and Park HD. 2004. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. *Food Microbiol* 21, 105-110.
- Lacy A and O'Kennedy R. 2004. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Cur Pharm Des*10, 3797-3811.
- Lake BG. 1999. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem-Toxico* 137, 423-453.
- Lee SE, Won HS, Lee YW and Lee DS. 2010. Study on the new antifouling compounds in Korean coasts. *Bull Environ Contam Toxicol* 85, 538-543. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-010-0145-3>
- Manzo S, Buono S and Cremisini C. 2006. Toxic effects of Irgarol and Diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Arch Environ Contam Toxicol* 51, 61-68. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-004-0167-0>
- Nohara T, Kashiwada Y and Nishioka I. 1985. Cinnassiole E, a diterpene from the bark of *Cinnamomum CASSIA*. *Phytochem* 24, 1849-1850.
- Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K and Vuorela P. 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J Ethnopharma* 73, 299-305.
- Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H and Jiang Y. 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Inno Food Sci Emer Technol* 10, 627-632. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.05.009>
- Provasoli L. 1968. Media and prospects for the cultivation of

- marine algae. In A. Watanabe, A Hattori (eds), Cultures and Collections of Algae. Japanese Society Plant Physiology, Hakone, Japan, 63-75.
- Shin HW and Smith CM. 2001. Japan, Antifouling activity of six nontoxic chemicals on spore attachment of *Ulva fasciata*. *J Environ Biol* 22, 145-151.
- SubashBabu P, Prabuseenivasan P and Ignacimuthu S 2007. Cinnamaldehyde-A potential antidiabetic agent. *Phytomed* 14, 15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2006.11.005>
- Todd JS, Zimmerman RC, Crews P and Alberte RS. 1993. The antifouling activity of natural and synthetic phenolic acid sulphate ester. *Phytochem* 34, 401-404.
- Voulvoulis N, Scrimshaw MD and Lester JN. 2000. Occurrence of four biocides utilised in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. *Mar Poll Bull* 40, 938-946.
- Wieczorek SK and Todd CD. 1998. Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. *Biofouling* 12, 81-118.
- Yamada H. 2007. Behaviour, occurrence, and aquatic toxicity of new antifouling biocides and preliminary assessment of risk to aquatic ecosystems. *Bull Fish Res Agen* 21, 31-45.
- Zang LY, Cosma G, Gardner H, Shi X, Castranova Vand Than V. 2000. Effect of antioxidant protection by *p*-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, 954-960.