University of Mosul
College of Pharmacy

Isolation, derivatization and evaluation of coumarins from Red Delicious apple seeds as antimicrobial agents

Eman Tarek Mohammed

M.Sc. Thesis
in pharmacy

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Yasser Fakri Mustafa

2020 A.D. 1442 A.H.

ABSTRACT

Multi-drugs resistance has addressed a growing trouble in the treatment of many infectious diseases caused by several kinds of bacteria and fungi. The discovery and development of effective antibacterial and antifungal agents with novel chemical structures become urgent tasks for infectious disease research programs.

In the current work, the powder obtained from crushing the seeds of Red Delicious apple was extracted by solvents of different polarities including water, methanol, chloroform, and n-hexane. The extraction was carried out via three extraction methods named kinetic maceration, ultrasound-expedited and microwave-expedited extraction techniques. For each one, the extraction was performed in three styles, which are non-serial, serial risingly- and fallingly-arranged in polarity.

The resultant extracts were submitted to the phytochemical screening tests for seeking the existence of many primary and secondary plant metabolites. The investigated phytochemicals were flavonoids, tannins, terpenoids, carbohydrates, alkaloids, emodins, phenols, steroids, anthocyanins, betacyanins, amino acids, proteins, saponins, glycosides, coumarins, anthraquinones, and fixed oils.

The results acquired from the phytochemical analysis documented that coumarins could be detected in the obtained methanol and chloroform extracts. According to these results, the chloroform extract obtained from a

non-serial ultrasound-expedited extraction method was selected to isolate its coumarin components.

Since the processes of separation and purification completed, four novel furanocoumarins have been acquired. Their chemical structures were illustrated by analyzing their FTIR, ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra and corresponding their spectroscopic data with those found in the literature.

Two in vitro antimicrobial studies were verified for the isolated products via a broth dilution method; the antibacterial activity versus the following standard bacterial strains: *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia, Haemophilus influenzae* and *Escherichia coli* utilizing Ciprofloxacin as a reference, and the antifungal activity versus the following standard fungal strains: *Candida albicans* and *Aspergillus niger* using Nystatin as a reference. The results indicated that the isolated furanocoumarins had a promising antimicrobial activity against the test pathogens with the superior activity attributed to compound **E1** ((E)-12-(2'-Chlorovinyl)bergapten) . Also, the isolated products displayed encouraging bactericidal and fungicidal activities based on their MBC/MIC and MFC/MIC values.

In the literature, there is a large number of reports which documented that the enhanced lipophilicity of the antimicrobial agent may improve its penetration into pathogenic microorganisms resulting in a better antimicrobial effect. To examine this assumption on the isolated furanocoumarins, one of them, which is compound

E3 (12-(2'-chloropropan-2'-yl)-8-hydroxybergapten) was chemically modified in such a way to increase its lipophilicity. The results of testing the antimicrobial activity of this semisynthetic product revealed improvement in the activity versus the same test pathogens. Accordingly, it is concluded that it is possible to increase the antimicrobial activity of the isolated natural furanocoumarins by enhancing their lipophilicity. This may be accomplished by either introducing a non-polar functional group or modifying the currently available polar active group.

جامعة الموصل
كلية الصيدلة

عزل وتحضير مشتقات الكومارين من بذور التفاح الأحمر اللذيذ وتقييمها كمضادات للميكروبات

رسالة مقدمة الى
لجنة الدراسات العليا في كلية الصيدلة/ جامعة الموصل
كجزء من متطلبات الحصول على شهادة الماجستير في الصيدلة

من قبل

إيمان طارق محمد

(بكالوريوس صيدلة 2008)

باشراف

أ.م.د. ياسر فخري مصطفى

١٤٤٢ هـ ٢٠٢٠ م

الخلاصة

اصبحت المقاومة لعدة ادوية مشكلة متزايدة في علاج العديد من الأمراض المعدية التي تسببها أنواع متعددة من البكتيريا والفطريات. إن اكتشاف وتطوير عوامل فعالة مضادة للبكتيريا ومضادة للفطريات ذات تركيبات كيميائية جديدة اصبحت مهمة ملحة لبرامج أبحاث الأمراض المعدية.

في هذا العمل، تم استخلاص المسحوق الذي تم الحصول عليه من طحن بذور التفاح الأحمر اللذيذ بواسطة مذيبات مختلفة القطبية بما في ذلك الماء والميثانول والكلوروفورم والهكسان. تم إجراء الاستخلاص من خلال ثلاث طرق استخلاصية وهي النقع مع التحريك وتقنيات الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية وبالموجات الدقيقة. ضمن كل تقنية ، تم إجراء الاستخلاص من خلال استخدام ثلاثة أنماط مختلفة وهي النمط غير المتسلسل، المتسلسل المرتب تصاعديا والاخر المرتب تنازليا من حيث القطبية.

تم اجراء اختبارات الفحص الكيميائي النباتي على المستخلصات الناتجة من أجل البحث عن وجود العديد من المستقلبات النباتية الأولية والثانوية. المواد الكيميائية النباتية التي تم فحصها كانت الفلافونويد والتانينات والتيربينويد والكربوهيدرات والقلويدات والإيمودات والفينول والستيرويدات والأنثوسيانين والبيتاسيانين والأحماض الأمينية والبروتينات والصابونين والجليكوسيدات والكومارين والأنثراكوينونات والزيوت الثابتة.

أوضحت النتائج المحصلة من التحليل الكيميائي النباتي وجود الكومارينات في مستخلصات الميثانول والكلوروفورم. وفقًا لهذه النتائج ، تم اختيار مستخلص الكلوروفورم الذي تم الحصول عليه من طريقة الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية بالنمط غير المتسلسل لعزل مكوناته من الكومارينات.

بعد اكتمال عمليات الفصل والتنقية, تم الحصول على أربعة فيورانوكومارينات جديدة. تم التعرف على هياكلها الكيميائية من خلال تحليل أطيافها للاشعة تحت الحمراء والرنين النووي المغناطيسي للكاربون والرنين النووي المغناطيسي للبروتون ومطابقة بياناتها الطيفية مع تلك الموجودة في البحوث.

تم دراسة الفعالية المضادة للمايكروبات خارج جسم الكائن الحي للمواد المعزولة باستخدام طريقة تخفيف المرق الزرعي, شملت هذه الدراسة الفعالية المضادة للبكتيريا ضد السلالات البكتيرية القياسية التالية: الزائفة الزنجارية ،الكلبسيلة الرئوية، إنفلونزا المستدمية والإشريكية القولونية باستخدام السبروفلوكساسين كمادة قياسية. كما تم دراسة الفعالية المضادة للفطريات مقابل السلالات الفطرية القياسية التالية أسبرجيلوس نيجر و المبيضات البيض باستخدام النستاتين كمادة قياسية. وقد اشارت النتائج الى ان المركبات المعزولة لها فعالية واعدة ضد الميكروبات التجريبية مع فعالية متفوقة للمركب **E1**. اضافة لذلك, اظهرت النتائج ان المركبات المعزولة لها فعالية مشجعة قاتلة للبكتيريا وقاتلة للفطريات وذلك بالاعتماد على قيم النسبة التركيز الادنى القاتل للجرثومة الى التركيز الادنى المثبط لنمو الجرثومة.

في البحوث العلمية المنشورة, هناك عدد كبير من التقارير التي وثقت ان زيادة قابلية المركب المضاد للميكروبات على الذوبانية في الدهون تزيد قابليته على اختراق الميكروبات المرضية مما يؤدي إلى تأثير أفضل كمضاد للميكروبات. لفحص هذا الافتراض على الفيورانوكومارينات المعزولة، تم تعديل أحد المركبات المعزولة كيميائيًا بطريقة تزيد قابليته على الذوبانية في الدهون. كانت النتيجة زيادة فعالية المركب المصنع ضد الميكروبات التجريبية. وبناءً على ذلك ، يُستنتج أنه من الممكن زيادة النشاط المضاد للميكروبات للفيوروكومارينات الطبيعي المعزولة عن طريق تعزيز محبتها للدهون. يمكن تحقيق ذلك إما عن طريق إدخال مجموعة وظيفية غير قطبية أو تعديل المجموعة القطبية النشطة الموجودة في المركب.