Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
University of Mosul
College of Pharmacy

Coumarins from Watermelon "Allsweet" Seeds: Natural Antimicrobial Agents

A Thesis
Submitted to the Committee of Postgraduate Studies
College of Pharmacy/ University of Mosul
As a Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree in Pharmacy

By

Rahma Mowaffaq Jebir Allayla

(B.SC. Pharmacy 2016)

Supervised by

Prof. Dr. Yasser Fakri Mustafa

2022 A.D. **1444 A.H.**

ABSTRACT

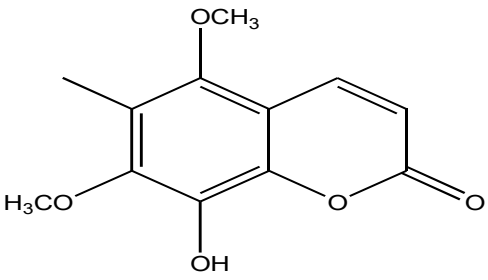
As the wheel of time moves forward, the medical community becomes more convinced that the battle between humanity and pathogenic agents will lead to disaster. This belief is supported by the improper use of antibiotics, which may eventually tip the scales in favor of infectious pathogens. For that, a large body of research has been conducted to address this global concern by discovering novel scaffolds derived from nature or synthetic laboratories. Despite the fact that there are thousands of synthetic compounds prepared for this purpose during the past two decades, plant-isolated products offer the best choice. This is because of the long chronicle of safety and popular acceptability.

In the current work, the milled seeds of Allsweet watermelon were extracted via four solvents of different polarities, which were acetone, chloroform, dichloromethane, and ether. The extraction was achieved utilizing three extracting processes: dynamic soaking, microwave-stimulated, and ultrasound-stimulated extraction processes. Every single one was achieved in three modalities: non-serial, serial-ascending, and -descending designed polarity.

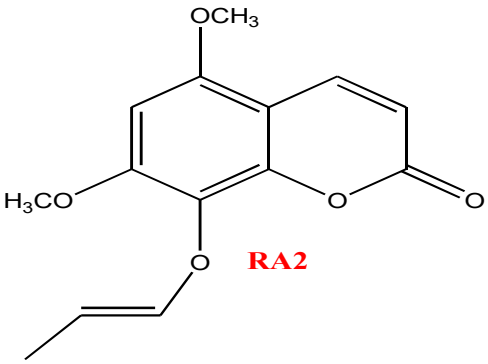
The obtained extracts were then submitted to the phytochemical screening assay to determine the presence of numerous primary and secondary plant metabolites. The inspected phytochemicals were amino acids, proteins, carbohydrates, fixed oils, coumarins, alkaloids, anthocyanins, betacyanins, anthraquinones, emodins, flavonoids, glycosides, phenols, saponins, steroids, tannins, and terpenoids.

The results acquired from the phytochemical analysis revealed that coumarins could be detected in the extracts resulting from the four utilized solvents in each process and each modality. According to the obtained results, the ether extract produced from a serial-descending modality of the microwave-stimulated extraction process was picked to separate its coumarin contents.

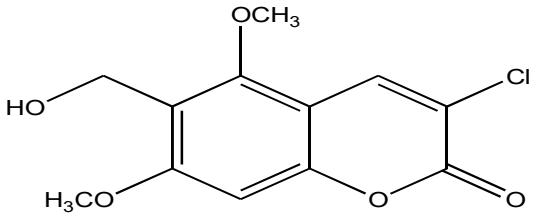
When the procedures of separation and purification steps were accomplished, five simple coumarins, symbolized here as **RA1**, **RA2**, **RA3**, **RA4**, and **RA5**, were explored. The chemical structures, as shown below, of these products were then identified by assessing their physicochemical properties and analyzing their FTIR, ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectral data and comparing them to those found in the literature.



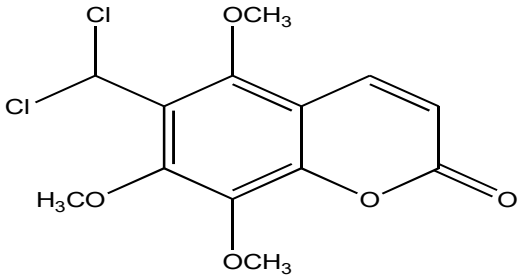
RA1



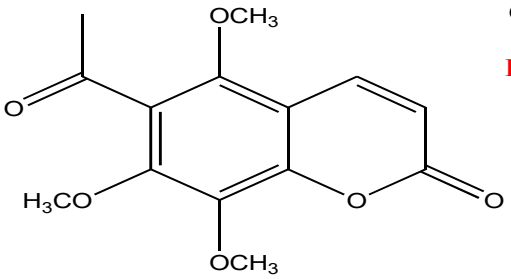
RA2



RA3



RA4



RA5

The antimicrobial potential of the separated products was inspected *in vitro*, utilizing a broth dilution as a lab-working methodology against many microorganisms, which were:

(A) Six standard aerobic gram-negative bacterial strains, including *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), and *Shigella dysenteriae* (ATCC 131313), using ciprofloxacin as a standard.

(B) Four standard anaerobic bacterial strains, including *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), *Fusobacterium necrophorum* (ATCC 25286), and *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845), applying metronidazole as a standard.

(C) Two standard fungal strains, including *Aspergillus niger* (ATCC 16888) and *Candida albicans* (ATCC 10231), employing nystatin as a standard antifungal medicine.

(D) One non-pathogenic bacterial strain was *Escherichia coli* (BAA-1427). By utilizing ciprofloxacin as a standard, the safety of our separated products on this typical normal gut flora was investigated.

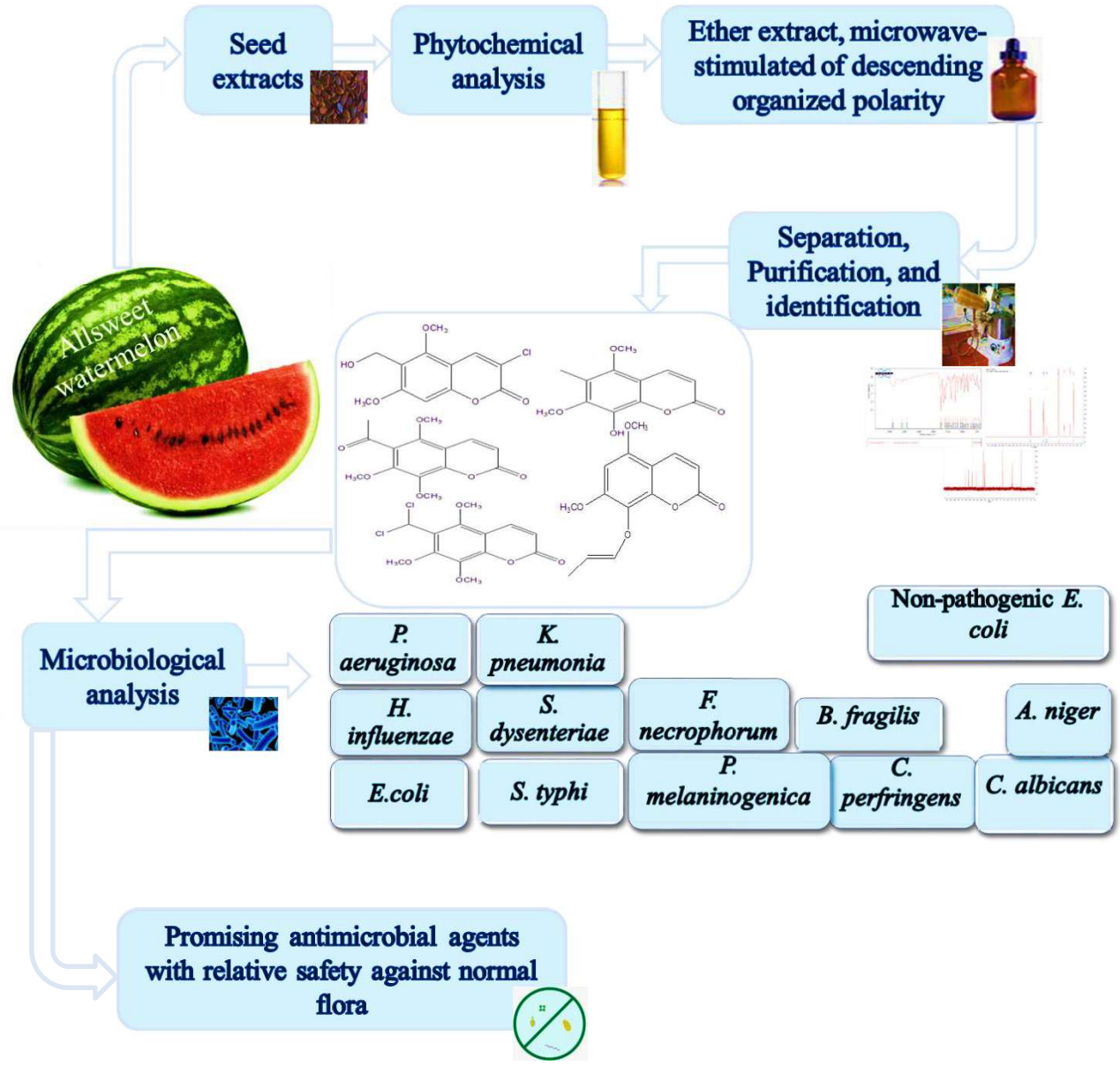
The results revealed that the separated simple coumarins possess a hopeful antimicrobial potential against the inspected pathogens, with the superiority of product **RA4** over the other four against all pathogens tested except for the anaerobic bacterial strains, where **RA3** appeared to outperform it. In addition, all the five separated products exhibited bactericidal and fungicidal potential against the tested pathogens. As for safety towards the non-pathogenic *Escherichia*

coli (BAA-1427), surprisingly, the separated products all show better safety than the control on this strain, with the superiority of **RA4**.

In conclusion, this study supported the possibility of extracting coumarins from Allsweet watermelon seeds and the idea of using them as a building block for the identification of innovative semi-synthetic antimicrobial agents with the potential to enhance their effectivity by modifying the interchanged active functional groups present in their molecular frameworks.

Finally, it is noteworthy to mention that the study of coumarins separated from Allsweet watermelon seeds as antimicrobial agents is unique in that it has never been addressed before, even with the presence of research that assesses the antimicrobial potential of watermelon seeds' extracts, but no one among them highlights the importance of their coumarin contents.

Graphical abstract



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية الصيدلة

الكومارينات من بذور البطيخ "الحلو كليا": عوامل طبيعية مضادة للميكروبات

رسالة مقدمة الى

لجنة الدراسات العليا في كلية الصيدلة – جامعة الموصل

كجزء من متطلبات الحصول على شهادة الماجستير في الصيدلة

من قبل

رحمة موفق جبر الليلة

(بكالوريوس صيدلة ٢٠١٦)

بإشراف

أ.د. ياسر فخري مصطفى

١٤٤٤ هـ **٢٠٢٢ م**

الخلاصة

مع تقدم عجلة الوقت ، يصبح المجتمع الطبي أكثر اقتناعًا بأن المعركة بين البشرية والعوامل المسببة للأمراض ستؤدي إلى كارثة. ويدعم هذا الاعتقاد الاستخدام غير السليم للمضادات الحيوية ، والتي قد تؤدي في النهاية إلى ترجيح كفة الميزان لصالح مسببات الأمراض المعدية. لذلك ، تم إجراء مجموعة كبيرة من الأبحاث لمعالجة هذا القلق العالمي من خلال اكتشاف سقالات جديدة مستمدة من الطبيعة أو المختبرات الاصطناعية. على الرغم من وجود الآلاف من المركبات الاصطناعية التي تم تحضيرها لهذا الغرض خلال العقدين الماضيين ، فإن المنتجات المعزولة من النباتات تقدم الخيار الأفضل. هذا بسبب التأريخ الطويل للسلامة والقبول الواسع الانتشار.

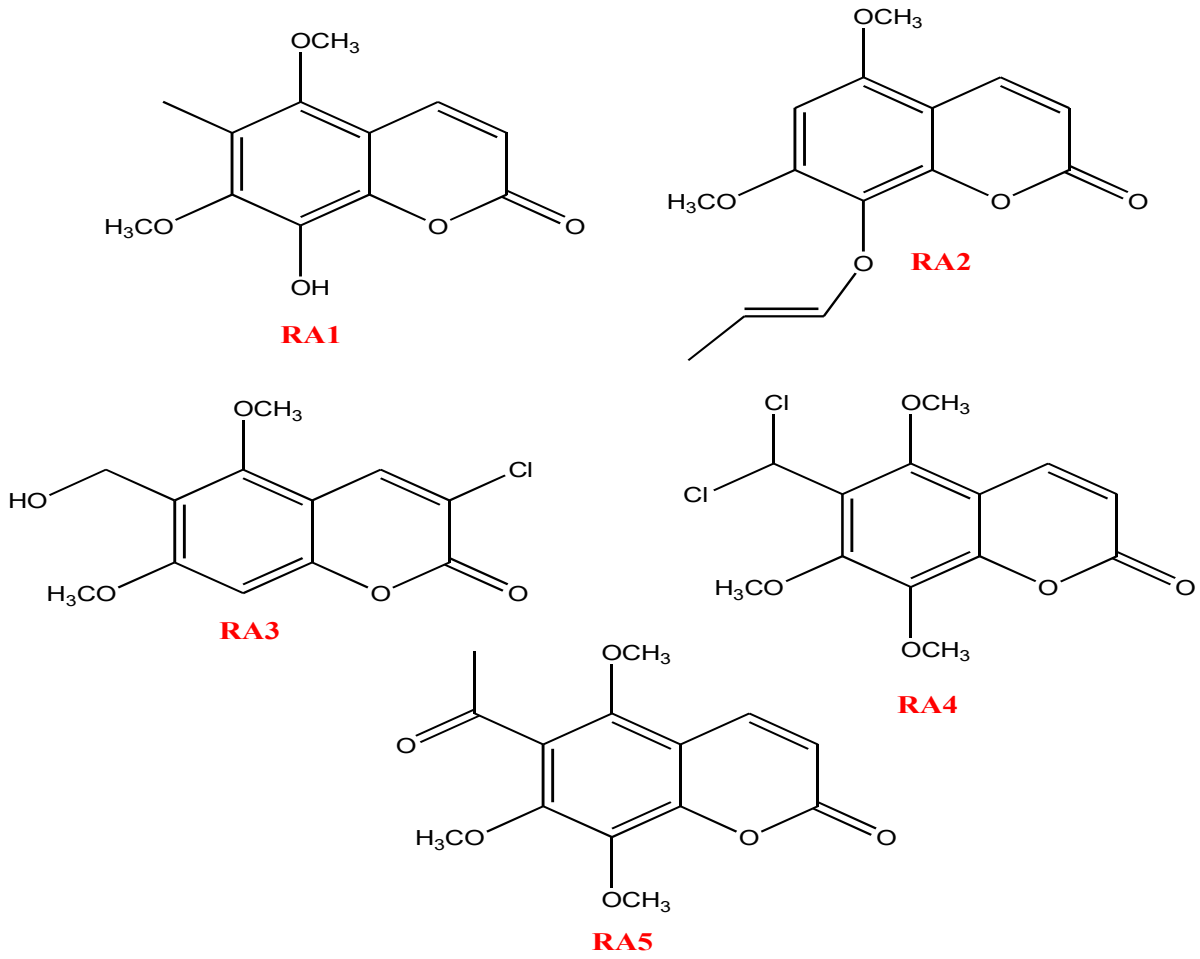
في العمل الحالي ، تم استخلاص بذور البطيخ الحلو كليا المطحون من خلال أربعة مذيبات مختلفة الأقطاب وهي الأسيتون والكلوروفورم وثاني كلورو ميثان والأثير. تم تحقيق الاستخراج باستخدام ثلاث عمليات استخلاص: النقع الديناميكي ، وتحفيز الميكروويف ، وعمليات الاستخراج المحفزة بالموجات فوق الصوتية. تم تحقيق كل واحدة من خلال ثلاث طرق: قطبية مصممة غير تسلسلية ، وتصاعدية ، وتنازلية.

بعد ذلك تم إجراء التحليل الكيميائي النباتي للمستخلصات الناتجة لتحديد وجود العديد من نواتج الأيض النباتية الأولية والثانوية. كانت المواد الكيميائية النباتية التي تم فحصها هي الأحماض الأمينية ، والبروتينات ، والكربوهيدرات ، والزيوت الثابتة ، والكومارين ، والقلويدات ، والأنثوسيانين ، والبيتايسانين ، والأنثراكينون ، والإمودين ، والفلافونويد ، والجليكوسيدات ، والفينولات ، والسابونين ، والمنشطات ، والعفص ، والتربينويدات.

أظهرت نتائج التحليل الكيميائي النباتي أنه يمكن اكتشاف الكومارين في المستخلصات الناتجة من المذيبات الأربعة المستخدمة في كل عملية وكل طريقة. وفقًا للنتائج التي تم الحصول عليها ، تم اختيار مستخلص الأثير الناتج من طريقة تنازلية متسلسلة لعملية الاستخراج المحفزة بالميكروويف لفصل محتويات الكومارين.

عندما تم إنجاز خطوات الفصل والتنقية ، تم استكشاف خمسة كومارينات بسيطة ، رُمز لها هنا بـ (**RA1** ، و **RA2** ، و **RA3** ، و **RA4** ، و **RA5**). تم بعد ذلك تحديد الهياكل الكيميائية، كما هو موضح أدناه ، لهذه المنتجات من خلال تقييم خصائصها الفيزيائية والكيميائية ، وتحليل البيانات الطيفية والتي تشمل

الاشعة تحت الحمراء والرنين النووي المغناطيسي للبروتون والرنين النووي المغناطيسي للكاربون ومقارنتها بتلك الموجودة في المراجع.



تم فحص إمكانات مضادات الميكروبات للمنتجات المفصولة في المختبر ، باستخدام تقنية تخفيف الوسط الزرعي كمنهجية عمل ضد العديد من الكائنات الحية الدقيقة ، والتي كانت:

(أ) ستة سلالات بكتيرية هوائية قياسية سالبة الجرام ، بما في ذلك الإشريكية القولونية (ATCC 25922) ، المستدمية النزلية (ATCC 49247) ، الكلبسيلة الرئوية (ATCC 700603) ، الزائفة الزنجارية (ATCC 27853) ، السالمونيلا التيفية (ATCC 6539) ، والشيغيلة الزحارية (ATCC 131313) ، باستخدام سيبروفلوكساسين كدواء مقارن.

(ب) أربع سلالات قياسية من البكتيريا اللاهوائية ، بما في ذلك العصوانية الهشة (ATC 25285)، كلوستريديوم بيرفرنجنز (ATCC 13124) ، المغزلية الناخرة (ATCC 25286) ، و البريفوتيلا الميلانينية (ATCC 25845) ، باستخدام ميترونيدازول كعامل مقارن.

(ج) نوعان من السلالات الفطرية القياسية ، بما في ذلك الرشاشيات السوداء (ATCC 16888) و المُبيَضّات البيضاء (ATCC 10231) ، باستخدام نيستاتين كدواء مقارن مضاد للفطريات.

(د) سلالة بكتيرية غير مُمْرِضة ، وهي الإشريكية القولونية (BAA-1427). من خلال استخدام سيبروفلوكساسين كمقارن مضاد للبكتيريا ، تم التحقق من سلامة منتجاتنا المنفصلة على هذه الفلورا المعوية الطبيعية النموذجية.

أوضحت النتائج أن الكومارينات البسيطة المعزولة تمتلك إمكانات مأمولة كمضادات للميكروبات ضد مسببات الأمراض التي تم فحصها ، مع تفوق منتج **RA4** على الأربعة الأخرى ضد جميع مسببات الأمراض المختبرة باستثناء السلالات البكتيرية اللاهوائية ، حيث ظهر أن **RA3** يتفوق عليه. بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت جميع المنتجات الخمسة المعزولة إمكانات قاتلة للجراثيم والفطريات ضد مسببات الأمراض المختبرة. بالنسبة للسلامة تجاه الإشريكية القولونية غير المسببة للأمراض (BAA-1427) ، من المدهش أن المنتجات المنفصلة تظهر جميعها أمانًا أفضل من الدواء المقارن تجاه هذه السلالة ، مع تفوق **RA4**.

دعمت هذه الدراسة إمكانية استخلاص الكومارينات من بذور البطيخ الحلوة وفكرة استخدامها كحجر أساس للتعرف على العوامل المضادة للميكروبات شبه الاصطناعية المبتكرة مع القدرة على تعزيز فعاليتها من خلال تعديل المجموعات الوظيفية النشطة المعوضة الموجودة في هيكلها الجزيئي.

أخيراً ، تجدر الإشارة إلى أن دراسة الكومارين المعزولة عن بذور البطيخ الحلو كليا كعوامل مضادة للميكروبات فريدة من نوعها من حيث أنها لم يتم تناولها من قبل ، حتى مع وجود الأبحاث التي تقيم إمكانات مستخلصات بذور البطيخ كمضادات الميكروبات ، ولكن لم يتم تسليط الضوء في أي منها على أهمية محتوياتها من الكومارينات كسبب لهذه الامكانية.