University of Mosul
College of Pharmacy

Antioxidant and Antitumor Activities of Coumarins isolated from Granny Smith Apple Seeds: In Vitro Study

Raghad Riyadh Khalil

M.Sc. Thesis
in pharmacy

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Yasser Fakri Mustafa

2020 A.D. 1442 A.H.

ABSTRACT

There is an abundant amount of evidence which documented that oxidative stress can play a crucial role in the pathogenesis of many diseases including cancer. The discovery and development of potential antioxidants with novel chemical structures to be exploited as a therapeutic approach have recently become the focal point of many research agendas.

In the present work, the crushed seeds of Granny Smith apples were extracted by solvents of various polarities including n-hexane, chloroform, methanol, and water. The extraction was performed via three extraction techniques, which are kinetic maceration, ultrasound-facilitated and microwave-facilitated extraction methods. For every single technique, the extraction was established in three modes named non-serial, serial descendingly- and ascendingly-ordered in polarity.

The resultant extracts were subjected to the phytochemical screening assay to identify the presence of several phytochemicals. The examined primary and secondary metabolites were flavonoids, coumarins, tannins, terpenoids, carbohydrates, alkaloids, fixed oils, emodins, anthraquinones, betacyanins, anthocyanin, phenols, proteins, amino acids, steroids, saponins, and glycosides.

The results gained from the phytochemical screening assay showed that coumarin backbone could be determined in the prepared chloroform and methanol extracts. Based on the acquired results, the chloroform extract obtained from the ultrasound-facilitated extraction method engaged in a non-serial mode was chosen to separate and isolate its coumarin contents.

As the operations of the isolation and purification finished, five simple coumarins (**R1-R5**) were gained. Their chemical structures were qualified by means of analyzing their FTIR, ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra and also by matching their spectral information alongside with their physical properties to those found in the literature.

The biological activities of the isolated products were screened for their in vitro antioxidant and antitumor potentials. The first potential was studied by examining the capacity of the isolated simple coumarins for scavenging DPPH and hydroxyl free radicals. The second potential was detected by testing the antitumor activity of the isolated coumarins versus HeLa and MCF-7 cancer cell lines utilizing MTT assay. The results showed that the isolated simple coumarins have encouraging antiradical and antitumor activities with prevalence attributed to the compounds **R3** and **R5**. Also, the results revealed a significant positive correlation between the antioxidant activity of the isolated coumarins and their antitumor activity. It is proposed that the possible mechanism of the antitumor activity of the isolated coumarins could be contributed to their ability to scavenge the free radicals.

A relation between the chemical structural characteristics of coumarins and their antioxidant capacity has been highlighted and frequently found in the literature. This capacity may be related to the number of phenolic hydroxyl groups located on the coumarin nucleus and to the ability of the ortho substitution for donating electrons to adjacent hydroxyl group. To test this hypothesis on the isolated simple coumarins, compound **R3** with the best free radicals scavenging activities was chemically revised in such a way to cover the effect of its hydroxyl groups on the antiradical activity. The results acquired from the test of biological activities concerning the semisynthetic compound **R6** revealed that this chemical revision results in a marked decrease in the antiradical activity as well as the antitumor activity. This exhibited two important issues: the first one is the acceptability of the aforementioned hypothesis while the second issue is the possible mechanism of antitumor activity of the isolated coumarins may be relied on their antioxidant activity.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية الصيدلة

النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للورم للكومارينات المعزولة من بذور التفاح غراني سميث: دراسة مختبرية

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

من قبل

رغد رياض خليل

(*بكالوريوس صيدلة 2009*)

باشراف

أ.م.د. ياسر فخري مصطفى

١٤٤٢ هـ ٢٠٢٠ م

الخلاصة

هناك العديد من الادلة التي توثق أن الإجهاد التأكسدي يمكن أن يؤدي دورًا حاسمًا في التسبب بالعديد من الأمراض بما في ذلك السرطان. وعليه فان اكتشاف وتطوير مضادات الأكسدة الفعالة ذات الهياكل الكيميائية الجديدة ليتم استخدامها كنهج علاجي اصبح مؤخرًا النقطة المحورية للعديد من الأعمال البحثية.

في هذا العمل، تم استخلاص بذور تفاح Granny Smith المسحوقة بواسطة مذيبات ذات قطبية مختلفة بما في ذلك الماء، الميثانول، الكلوروفورم و الهكسان الأعتيادي. تم استخدام ثلاث تقنيات لاجراء الاستخلاص وهي النقع الحركي، استخدام حمام مائي بالموجات الفوق الصوتية والاستخلاص بالموجات الدقيقة. لكل تقنية ، تم استخدام المذيبات المشار اليها بالاعتماد على قطبيتها بطريقة غير متسلسلة، متسلسلة تنازليًا و متسلسلة تصاعديا.

تم إخضاع المستخلصات الناتجة للفحص الكيميائي النباتي لتحديد وجود العديد من المواد الكيميائية النباتية. تم فحص المستقلبات الأولية والثانوية التالية: مركبات الفلافونويد ، الكومارين ، التانينات ، التربينات ، الكربوهيدرات ، القلويدات ، الزيوت الثابتة ، الإيموديز ، الأنثراكينونات ، بيتاسيانين ، الأنثوسيانين ، الفينول ، البروتينات ، الأحماض الأمينية ، الستيرويدات ، الصابونين ، والكليكوسيدات.

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها من الفحص الكيميائي النباتي تبين أن التركيب الكيميائي لمركب الكومارين موجود في مستخلصات الكلوروفورم والميثانول. بناءا على ذلك، تم اختيار مستخلص الكلوروفورم الذي تم الحصول عليه من طريقة الاستخلاص التي تعمل بالموجات فوق الصوتية وبترتيب المذيبات في وضع غير تسلسلي لفصل وعزل محتويات الكومارين.

مع انتهاء عمليات العزل والتنقية ، تم الحصول على خمسة كومارينات بسيطة. تم التعرف على تركيباتها الكيميائية عن طريق تحليل أطيافها للاشعة تحت الحمراء والرنين النووي المغناطيسي للبروتون والرنين النووي المغناطيسي للكاربون بالاضافة الى مطابقة معلوماتها الطيفية و خصائصها الفيزيائية مع تلك الموجودة في المراجع.

تم دراسة الأنشطة البيولوجية للمركبات المعزولة في خارج الجسم الحي والتي شملت إمكاناتها المضادة للأكسدة والمضادة للورم. تمت دراسة الإمكانات المضادة للاكسدة من خلال فحص قدرة الكومارينات البسيطة المعزولة على كسح جزيئات DPPH وجذور الهيدروكسيل الحرة. في حين ان النشاط البيولوجي الثاني تمت دراسته بواسطة اختبار النشاط المضاد للورم للكومارينات المعزولة على خطوط الخلايا السرطانية HeLa و MCF-7 باستخدام فحصMTT. أظهرت النتائج أن الكومارينات البسيطة المعزولة تمتلك أنشطة بايولوجية مشجعة مع تفوق المركبات **R3** و**R5**. كما كشفت النتائج عن وجود ارتباط إيجابي كبير بين النشاط المضاد للأكسدة في الكومارينات المعزولة ونشاطها المضاد للورم. وعلى ذلك فأن الآلية المحتملة لنشاط الكومارينات المعزولة المضاد للورم يمكن أن تعزى لقدرتها على كسح الجذور الحرة.

لقد سلطت الكثير من المراجع الضوء على العلاقة التي تربط بين الخصائص التركيبية الكيميائية للكومارين وقدرته المضادة للأكسدة. حيث أن هذه القدرة قد ترتبط بعدد مجاميع هيدروكسيل الفينول الموجودة في نواة مركب الكومارين وقدرة المجموعة المعوضة في موقع أورثو على منح الإلكترونات إلى مجموعة هيدروكسيل المجاورة. لاختبار هذه الفرضية، تم تعديل المركب **R3** صاحب أفضل قدرة لكسح الجذور الحرة كيميائيًا بطريقة تغطي تأثير مجموعات الهيدروكسيل على النشاط المضاد للجذور الحرة. أن النتائج المكتسبة من اختبار الأنشطة البيولوجية المتعلقة بالمركب شبه الصناعي **R6** بينت أن هذا التعديل الكيميائي أدى إلى انخفاض ملحوظ في النشاط المضاد للاكسدة والنشاط المضاد للورم. افضت هذه النتائج الى مسألتين: الأولى هي قبول الفرضية المذكورة أعلاه بينما المسألة الثانية هي أن الآلية المحتملة لنشاط الكومارينات المعزولة كمضادات للورم قد تعتمد على نشاطها المضاد للأكسدة.