

*Anna Pawełczyk¹, Katarzyna Sowa-Kasprzak¹, Justyna Michalak^{1, 2}, Bogdan Kędzia²,
Lucjusz Zaprutko¹

Ocena aktywności antybiotycznej Z-jasmonu oraz jego pochodnych heterocyklicznych

Evaluation of antibiotic activity of Z-jasmone and its heterocyclic analogues

¹Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Lucjusz Zaprutko

²Zakład Farmakologii i Biologii Doświadczalnej, Instytut Włókien Naturalnych
i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Dyrektor Naukowy Instytutu: prof. dr n. techn. Ryszard Kozłowski

SUMMARY

Introduction. Plant materials are a traditional source of many of the active compounds commonly used as pharmaceuticals, fragrances, flavours and food colours. The jasmine flower extract provides valuable substances with broad spectrum of pharmacological properties. One of them is examined in this work 3-methyl-2-(2-Z-pentenyl)-2-cyclopenten-1-one, commonly named Z-jasmone.

Aim. The study of antibiotic activity of Z-jasmone and their heterocyclic derivatives.

Material and methods. Antibiotic activity determination of Z-jasmone and its heterocyclic derivatives was performed against the *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P reference strain. Then antibiotic activity of active Z-jasmone against selected strains of bacteria and fungi isolated from clinical materials and herbal raw materials was evaluated. The activity of the tested substances was determined on the basis of the values of the minimum inhibitory concentration MIC and the minimum bactericidal concentration MBC.

Results. Z-Jasmone shows significantly higher activity against to the reference strain *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P compared to its heterocyclic derivatives.

Conclusions. The structural modifications of the cyclopentane ring and the five-carbon side chain of jasmone molecule have a negative effect on the antibiotic activity of the tested derivatives in comparison to the Z-jasmone.

Keywords: antibiotic activity, Z-jasmone, jasmone heterocyclic analogues

STRESZCZENIE

Wstęp. Surowce roślinne stanowią źródło związków powszechnie stosowanych jako środki farmaceutyczne, związki biochemiczne, zapachowe, aromatyzujące czy barwniki spożywcze. Ekstrakt z kwiatów jaśminu dostarcza wielu cennych substancji o szerokim spektrum właściwości farmakologicznych. Jedną z nich jest badany w tej pracy keton 3-metylo-2-(2-Z-pentenylo)-2-cyklopenten-1-on, powszechnie nazywany Z-jasmonem.

Cel pracy. Ocena aktywności antybiotycznej Z-jasmonu i jego heterocyklicznych pochodnych.

Materiał i metody. Ocena aktywności antybiotycznej Z-jasmonu i jego pochodnych heterocyklicznych została przeprowadzona wobec szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Natomiast aktywność antybiotyczną aktywnego Z-jasmonu przeprowadzono wobec wybranych szczepów bakterii i grzybów izolowanych z materiału klinicznego i surowców zielarskich. Aktywność badanych substancji określono na podstawie wartości minimalnego stężenia hamującego MIC i minimalnego stężenia bakteriobójczego MBC.

Wyniki. Z-jasmon wykazuje znacznie większą aktywność względem szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P w porównaniu do jego pochodnych heterocyklicznych.

Wnioski. Zmiany strukturalne w obrębie pierścienia cyklopentanu i pięciowęglowego łańcucha bocznego cząsteczki jasmonu mają negatywny wpływ na aktywność antybiotyczną badanych pochodnych w porównaniu do Z-jasmonu.

Słowa kluczowe: aktywność antybiotyczna, Z-jasmon, pochodne heterocykliczne

Wprowadzenie

Surowce roślinne stanowią tradycyjne źródło wielu aktywnych związków powszechnie stosowanych jako środki farmaceutyczne, związki biochemiczne, zapachowe, aromatyzujące czy barwniki spożywcze. Również rodzaj *Jasminum*, z rodziny Oliwkowatych (*Oleaceae*), obejmujący ponad 200 gatunków krzewów i pnączy, dostarcza wielu cennych substancji o szerokim spektrum właściwości farmakologicznych (1). Dlatego wybrane składniki, od momentu wyizolowania z materiału naturalnego i określenia ich struktury, budzą duże zainteresowanie i są przedmiotem licznych badań. Otrzymywane są przy wykorzystaniu coraz to nowszych metod syntezy oraz poddawane różnorodnym modyfikacjom chemicznym prowadzącym do powstania ich różnorodnych analogów o nowych i nieznanymi jeszcze właściwościach.

Powszechnie stosowany ekstrakt z kwiatów *Jasminum officinale* var. *grandiflorum* zawiera ponad 250 substancji, będących głównie mono-, di-, tri- i seskwiterpenami, alkoholami, fenolami, związkami karbonyłowymi, kwasami, estrami i laktonami, a także różnymi chemicznie kombinacjami tych związków.

Roślina ta występuje w stanie naturalnym głównie w tropikalnych rejonach Azji i Afryki, a wybrane gatunki uprawiane są również w Europie. Ze względu na swoją intensywną, trwałą oraz ciepłą, słodką i kwiatową nutę, ekstrakt z kwiatów jaśminu cieszy się dużą popularnością w przemyśle perfumeryjnym (1). Cennymi i kluczowymi składnikami naturalnego ekstraktu z kwiatów jaśminu są jasmonoidy i to one w pełni decydują o ich oryginalnym zapachu. Jasmonoidy stanowią relatywnie wąską, ale bardzo ważną grupę związków (2). Ważnym reprezentantem tej grupy jest badany w tej pracy 3-metylo-2-(2-Z-pentenylo)-2-cyklopenten-1-on, popularnie zwany Z-jasmonem, a także kwas jasmonowy oraz jego ester – jasmonian metylu (2, 3) (ryc. 1 a-c).

Te ketonowe związki, powstające w wyniku biosyntezy z nienasyconych kwasów tłuszczowych, pełnią w roślinach rolę fitohormonów – warunkują

kontakt z otoczeniem, wytwarzają barierę ochronną przed owadami, odpowiadają za wytwarzanie enzymów roślinnych oraz stymulują procesy biosyntezy. Działają także jako przekaźniki sygnałów w odpowiedzi komórkowej, są regulatorami licznych ważnych funkcji biologicznych, m.in. procesów wzrostu (2).

Z terapeutycznego punktu widzenia zapach jaśminu ma znaczący wpływ na ludzki umysł i ciało. Działa on tonizująco na organizm człowieka, przyczynia się do koncentracji uwagi, zwiększa zdolność do pracy. Uważany jest za środek uspokajający, przeciwdepresyjny, przeciwstresowy, antyseptyczny i przeciwzapalny (3). Ponadto, inne części rośliny, takie jak: łodygi, liście i korzenie, są bardzo ważne i potencjalnie użyteczne w przemyśle farmaceutycznym (4).

Cel pracy

Celem pracy była ocena aktywności antybiotycznej Z-jasmonu i jego pochodnych heterocyklicznych wobec szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus*, a także Z-jasmonu wobec szczepów pochodzenia klinicznego i szczepów wyizolowanych z surowców zielarskich.

Materiał i metody

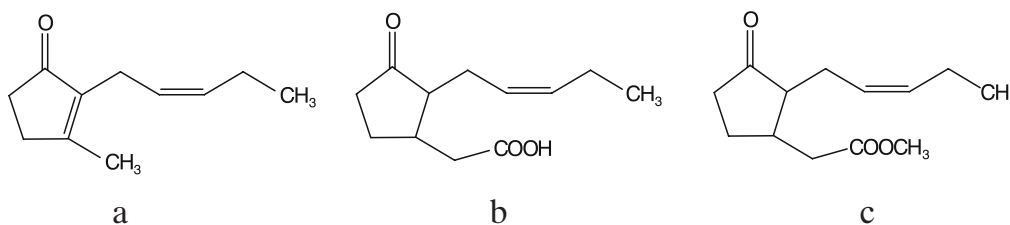
Badane substancje

Badaniami objęto Z-jasmon (Aldrich) oraz cztery jego pochodne heterocykliczne zawierające modyfikacje strukturalne w obrębie pięciocyklicznego pierścienia – zastąpienie atomów węgla heteroatomami (N, O) oraz pięciowęglowego podstawnika bocznego w pozycji C-2 Z-jasmonu (nasylenie łańcucha) (tab. 1) (5, 6).

Szczepy użyte w badaniach

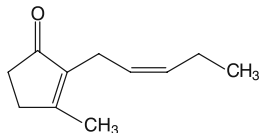
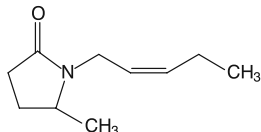
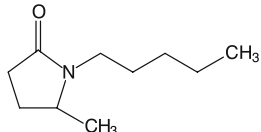
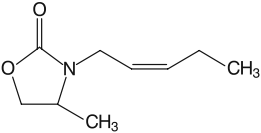
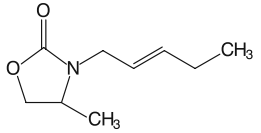
Szczep wzorcowy – *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (American Type Culture Collection).

Szczepy pochodzenia klinicznego (Nr 1, Nr 3, Nr 4, Nr 5, Nr 7, Nr 9) oraz wyizolowane z surowców zielarskich (Nr 2, Nr 6, Nr 8). Należały one do następujących grup drobnoustrojów:



Ryc. 1a-c. Budowa chemiczna głównych jasmonoidów: a – Z-jasmon, b – kwas jasmonowy, c – jasmonian metylu

Tab. 1. Z-jasmon i jego pochodne heterocykliczne

Nr próbki	Wzór	Nazwa
1		Z-jasmon (3-metylo-2-(2-Z-pentenylo)-2-cyklopenten-1-on)
2		5-metylo-1-(Z-2-pentenylo)-2-pirolidynon
3		5-metylo-1-pentylo-2-pirolidynon
4		4-metylo-3-(Z-2-pentenylo)-2-oksazolidynon
5		4-metylo-3-(E-2-pentenylo)-2-oksazolidynon

- Ziarniaki Gram-dodatnie:
 - *Staphylococcus aureus* MRSA (metycylinooporny) 15062,
 - *Enterococcus faecalis* 8040/1.
- Pałeczki Gram-ujemne:
 - *Klebsiella pneumoniae* 291,
 - *Escherichia coli* PZH 026B6,
 - *Salmonella enteritidis* S59,
 - *Pseudomonas aeruginosa* Sept. 58/2.
- Grzyby drożdżoidalne:
 - *Candida albicans* PCM 1409 PZH.
- Grzyby pleśniowe:
 - *Aspergillus flavus* 95/1.
- Dermatofity:
 - *Microsporium gypseum* K1.

Podłoża stosowane w badaniach

- Antibiotic medium (AM) – Merck (płynne),
- Agar tryptozowo-sojowy (TSA) – bioMérieux (stałe),
- Bulion Sabourauda z 2% glukozą (SAB) – Merck (płynne),
- Agar Sabourauda z 2% glukozą (SAB) – Merck (stałe).

Przygotowanie próbek do badań

Próbki do oceny aktywności antybiotycznej przygotowano metodą seryjnych rozcieńczeń próbki podstawowej w DMSO (100 mg/ml – rozcieńczenie podstawowe) w zakresie stężeń 0,1-10 mg/ml oraz 0,25-5 mg/ml w odpowiednim podłożu płynnym (AM – bakterie, SAB – grzyby).

Oznaczanie aktywności antybiotycznej

Aktywność antybiotyczną badanych substancji określono na podstawie wyznaczonych wartości minimalnego stężenia hamującego MIC i minimalnego stężenia bakteriobójczego MBC, w odniesieniu do substancji referencyjnej – chloramfenikolu. Oznaczone wartości MIC i MBC dla chloramfenikolu w odniesieniu do szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P wynosiły 0,0005 mg/ml (MIC = MBC).

Badanie polegało na wprowadzeniu do próbek z określonymi, malejącymi rozcieńczeniami seryjnymi badanych substancji, odpowiedniej objętości zawiesiny (0,1 ml) drobnoustrojów w podłożu płynnym (AM – bakterie, SAB – grzyby) o znanym inokulum (10^5 jednostek tworzących kolonie/ml). Następnie próbki inkubowano w cieplarni przez

okres 18 godz. w przypadku bakterii i grzybów drożdżoidalnych (37°C) oraz przez 5-7 dni w przypadku grzybów pleśniowych i dermatofitów (30°C). Po inkubacji odczytywano wartość MIC dla badanej próbki przez obserwację obecności zmętnienia w danym stężeniu (rozwój hodowli), które wskazywało na wzrost szczepu. Następnie jałową zęą przenoszono odpowiednio stężenia na określone podłoża stałe (TSA – bakterie, SAB – grzyby). Po kolejnej inkubacji w odpowiednich warunkach oceniano wartość MBC, tj. najmniejsze stężenie substancji, przy którym nie obserwowano wzrostu drobnoustrojów.

Dla każdego badania aktywności antybiotycznej dołączano kontrolę, inkubowaną w takich samych warunkach (kontrola wzrostu szczepu, kontrola jałowości podłoża).

Kryteria aktywności antybiotycznej

Kryteria oceny aktywności antybiotycznej dla badanych substancji podano w tabeli 2.

Wyniki

Wyniki badania aktywności antybiotycznej dla Z-jasmonu i jego pochodnych heterocyklicznych wobec szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P przedstawiono w tabeli 3.

Natomiast wyniki badania aktywności antybiotycznej dla Z-jasmonu wobec szczepów pochodzenia klinicznego i wyizolowanych z surowców zielarskich (Nr 1-9) przedstawiono w tabeli 4.

Tab. 2. Kryteria oceny aktywności antybiotycznej

Stężenie badanej substancji (mg/ml)	Stopień aktywności antybiotycznej
> 10,0	bardzo niska
1,0-10,0	niska
0,1-1,0	średnia
0,01-0,1	wysoka
< 0,01	bardzo wysoka

Dyskusja

Oznaczenia aktywności antybiotycznej przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym etapie oceniono aktywność antybiotyczną Z-jasmonu oraz jego pochodnych heterocyklicznych wobec szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. W drugim etapie oceniono natomiast aktywność antybiotyczną Z-jasmonu wobec wybranych szczepów bakterii i grzybów wyizolowanych z materiału klinicznego oraz surowców zielarskich.

Z badań przeprowadzonych w pierwszym etapie stwierdzono, że największą aktywność antybiotyczną wobec *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P wykazywał Z-jasmon (próbka 1). Oznaczona wartość MIC = 0,25 mg/ml oraz MBC = 0,5 mg/ml (tab. 3), przy przyjętych kryteriach aktywności (tab. 2), pozwala na określenie aktywności antybiotycznej Z-jasmonu

Tab. 3. Wartości MIC i MBC dla Z-jasmonu i jego pochodnych heterocyklicznych

Stężenie substancji (mg/ml)	Ocena wzrostu szczepu <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P									
	Z-jasmon		Próbka 2		Próbka 3		Próbka 4		Próbka 5	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2,0	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
1,5	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
1,0	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
0,75	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
0,5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1	+	+								

(+) – wzrost szczepu; (-) – brak wzrostu szczepu

Tab. 4. Wartości MIC i MBC dla Z-jasmonu w odniesieniu do szczepów pochodzenia klinicznego i wyizolowanych z surowców zielarskich (szczepy Nr 1-9)

Stężenie substancji (mg/ml)	Ocena wzrostu badanych szczepów																	
	Nr 1		Nr 2		Nr 3		Nr 4		Nr 5		Nr 6		Nr 7		Nr 8		Nr 9	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
10,0																		
7,5																		
5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,25																		
1,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1																		
0,05																		

(+)- wzrost szczepu; (-) – brak wzrostu szczepu

na poziomie średnim. Natomiast wartość MIC dla 5-metylo-1-(Z-2-pentenylo)-2-pirolidynonu (próbka 2), 5-metylo-1-pentylo-2-pirolidynonu (próbka 3) oraz 4-metylo-3-(Z-2-pentenylo)-2-oksazolidynonu (próbka 4) wynosiła 0,75 mg/ml, a wartości MBC wynosiły odpowiednio: 2,0; 2,0 oraz 2,5 mg/ml (tab. 3). Najniższą aktywnością antybiotyczną cechował się 4-metylo-3-(E-2-pentenylo)-2-oksazolidynon (próbka 5), dla którego oznaczona wartość wynosiła odpowiednio: MIC = 2,0 mg/ml oraz MBC = 5,0 mg/ml (tab. 3) i zgodnie z przyjętymi kryteriami aktywność antybiotyczna dla tych próbek określona została jako niska. Podsumowując zestawienie aktywności antybiotycznych określonych dla badanych substancji 1-5, po analizie wartości MIC i MBC, przedstawiono w tabeli 5.

Analizując wartości MIC i MBC uzyskane dla próbek 1-5 wobec szczepu wzorcowego, w drugim etapie badań określono aktywność antybiotyczną tylko dla Z-jasmonu, wobec wybranych szczepów wyizolowanych z materiału klinicznego i surowców zielarskich (tab. 4). Z przeprowadzonych badań wynika, że Z-jasmon wykazuje

największą aktywność wobec dermatofitu *Microsporium gypseum* (MIC = MBC = 0,25 mg/ml), która została określona jako średnia. Natomiast pałeczka Gramujemna *Pseudomonas aeruginosa* charakteryzowała się największą opornością na badany związek, którego aktywność została określona jako niska (MIC = 10,0 mg/ml) i bardzo niska (MBC > 10,0 mg/ml). Spośród badanych szczepów średnią i niską aktywność antybiotyczną Z-jasmonu obserwowano wobec grzyba drożdżoidalnego *Candida albicans*. Szczep ziarniaka Gram-dodatniego *Staphylococcus aureus* oraz szczepy pałeczek Gramujemnych *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella enteritidis* wykazywały podobną wrażliwość na Z-jasmon, określaną jako niska. Dla pozostałych drobnoustrojów aktywność antybiotyczna Z-jasmonu została również określona jako niska. Podsumowanie aktywności antybiotycznej Z-jasmonu wobec szczepów drobnoustrojów wyizolowanych z materiału klinicznego oraz z surowców zielarskich przedstawiono w tabeli 6.

Wnioski

1. Z-jasmon wykazuje wyższą aktywność antybiotyczną niż jego pochodne heterocykliczne wobec szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.
2. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że strukturalne modyfikacje w obrębie pierścienia cyklopentanowego i pięciowęglowego łańcucha bocznego wpływają niekorzystnie na aktywność antybiotyczną w porównaniu do Z-jasmonu.
3. Uzyskany dla Z-jasmonu średni stopień aktywności antybiotycznej wobec *Microsporium gypseum* może stanowić podstawę do rozszerzenia badań nad wpływem związków o zbliżonej strukturze na inne dermatofity.

Tab. 5. Aktywność antybiotyczna Z-jasmonu i jego pochodnych heterocyklicznych wobec szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

Nr próbki	MIC	MBC	Aktywność antybiotyczna
1	0,25	0,5	średnia
2	0,75	2,0	niska
3	0,75	2,0	niska
4	0,75	2,5	niska
5	2,0	5,0	niska

Tab. 6. Aktywność antybiotyczna Z-jasmonu w odniesieniu do szczepów drobnoustrojów pochodzenia klinicznego i roślinnego

Badany szczep	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	Stopień aktywności antybiotycznej
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 1502	1,5	1,5	niska
<i>Enterococcus faecalis</i> 8040/1	2,0	2,5	niska
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 231	1,5	1,5	niska
<i>Escherichia coli</i> PZH 026B6	3,0	3,0	niska
<i>Salmonella enteritidis</i> S59	1,5	1,5	niska
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Sept. 85/2	10,0	> 10,0	niska i bardzo niska
<i>Candida albicans</i> PCM 1409 PZH	0,75	1,25	średnia i niska
<i>Aspergillus flavus</i> 95/1	2,5	2,5	niska
<i>Microsporium gypseum</i> K1	0,25	0,25	średnia

Piśmiennictwo

1. Pawełczyk A, Zaprutko L. Jasmine and their varieties in perfumery. *Pol J Cosmet* 2011; 14(2):82-7.
2. Cheong JJ, Choi YD. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet* 2003; 19:409-13.
3. Kurek A, Zaprutko L. Substancje o zapachu jaśminu. *Pol J Cosmet* 2004; 3:140-53.
4. Joy P, Raja DP. Anti-bacterial activity studies of *Jasminum grandiflorum* and *Jasminum sambac*. *Ethnobot Leaflets* 2008; 12:481-3.
5. Pawełczyk A, Zaprutko L. Microwave assisted synthesis of fragrant jasmone heterocyclic analogues. *Eur J Med Chem* 2006; 41:586-91.
6. Pawełczyk A, Zaprutko L. Microwave assisted synthesis of unsaturated jasmone heterocyclic analogues as new fragrant substances. *Eur J Med Chem* 2009; 44:3032-9.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 25.04.2017

zaakceptowano/accepted: 20.06.2017

Adres/address:

*dr n. farm. Anna Pawełczyk

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

tel.: +48 (61) 854-66-72

e-mail: apaw@ump.edu.pl