

HPLC ANALIZA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BIOLOŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA IZOLOVANIH IZ LIŠAJA

Hypogymnia physodes

*Nedeljko Manojlović¹, Branko Ranković², Marijana Kosanić², Perica
Vasiljević³, Selena Rančić¹, Pavle Mašković⁴, Jovica Tomović¹,
Miroslav Sovrlic¹*

Izvod: Cilj ovog rada je izolovanje sekundarnih metabolita iz acetonskog ekstrakta lišaja *Hypogymnia physodes* i njihova identifikacija primenom HPLC analize. Rad je koncipiran sa ciljem da ispita i antimikrobnu aktivnost izolovanih aktivnih komponenti. Fisodinska kiselina, usninska kiselina i atranorin su izolovana jedinjenja iz acetonskog ekstrakta lišaja *Hypogymnia physodes*. Antimikrobna aktivnost, izražena preko vrednosti MIC, ispitana je na tri standardizovana bakterijska soja i dva soja gljivica. Dobijene MIC vrednosti su se kretale u opsegu od 7.5 do 1000 µg/ml, pri čemu su izolovana jedinjenja najjače dejstvo ispoljila prema vrstama *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. Pored pomenutih jedinjenja, rezultati HPLC analize pokazali su prisustvo više različitih sekundarnih metabolita među kojima su identifikovani: fumaroprotocetrarinska kiselina, 3-hidroksifisodinska kiselina, fisodalinska kiselina, fisodinska kiselina, usninska kiselina, atranorin i hloratranorin.

Ključne reči: HPLC analiza, antimikrobna aktivnost, *Hypogymnia physodes*

Uvod

Lišajevisuzajednicadvaorganizma:gljive (mikobiont) ialge (fotobiont) združenih u mutualističku simbiotsku zajednicu (Richardson, 2008.). Vegetativno telo lišaja naziva se talus. U zavisnosti od vrste on može biti različito obojen: mrko, zeleno, naradžasto, žuto pa do skoro potpuno crno. Rasprostranjenost lišajeva uslovljena je različitim ekološkim činiocima i prirodnim i antropogenim. Uglavnom rastu na visokoplaninskim područjima, u šumama, voćnjacima, na pašnjacima zajedno sa mahovinom, eruptivnim stenama, zemljištu, kori drveća, a u tropskim predelima i na listovima. Lišajevi imaju vrlo važnu ulogu kako u ishrani ljudi i životinja tako i u farmaceutskoj industriji i tradicionalnoj medicini (Romagni i Dayan, 2002.). Sastojci lišajeva su primarni i sekundarni metabolite za koje je dokazano da imaju širok spektar biološke aktivnosti (Boustie i sar., 2011.). Prvu studiju o antibiotskom dejstvu lišajeva sproveo je Burkholder (1944.) i potvrdio antibakterijsko delovanje nekoliko ispitivanih lišajeva. Takođe su od tada i drugi istraživači proučavali antibakterijsko delovanje lišajeva na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (Turk i sar., 2003.).

¹ Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Svetozara Markovića 69, Kragujevac, Srbija (mtnedeljko@yahoo.com);

² Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija;

³ Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Višegradska 33, Niš, Srbija;

⁴ Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da ekstrakti i metabolite pojedinih vrsta lišajeva (*Parmelia caperata*, *Parmelia saxatilis*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria cylindrica*, *Lasalia pustulata*, *Evernia prunastri*, *Pseudoevernia furfuraceae*, *Toninia candidai* *Usnea barbata*) ispoljavaju različita antimikrobna, antioksidativna, antiinflamatorna i antitumorska svojstva (Ranković i sar. 2010; 2012; Manojlović i sar., 2012; Kosanić i sar., 2013.). Upotreba lišajeva u medicini i u prehrambenoj tehnologiji zasnovan je na činjenici da je njihov sadržaj biološki aktivnih jedinjenja jedinstven i raznolik i povezan sa njihovom antimikrobnom i antioksidativnom aktivnošću. Hemijska struktura izolovanih jedinjenja je slična i često ih je veoma teško izolovati i identifikovati (Molnar i Farkas, 2010; Huneck, 1999; Shukla i sar., 2010.). Biološka aktivnost lišajeva i njihovih ekstrakata je u poslednje vreme postala predmet velikog interesovanja zbog njihove potencijalne primene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Materijal i metode rada

Priprema biljnog materijala

U eksperimentalnom delu ovog rada korišćen je lišaj *Hypogymnia physodes*. Sakupljanje materijala izvršeno je po lepom i sunčanom vremenu na teritoriji Borača, Srbija. Nakon toga je izvršeno sušenje biljnog materijala na promajnom mestu, u tankom sloju, u trajanju od 4 dana. Zatim je usledilo odstranjivanje nečistoća iz osušenog materijala i determinacija Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu, a uzorci su deponovani pod imenom i brojem *Hypogymnia physodes* DBFS 18. Na vazduhu osušeni materijali odabranih vrsta lišajeva je usitnjen do grubog praška pomoću mlina. Iz grubog praška lišaja *Hypogymnia physodes* korišćenjem aparature po Soxhlet-u napravljen je acetonski ekstrakt. Višak rastvarača otklonjen je uparavanjem pomoću rotacionog vakuumaparivača. Dobijeni suvi ekstrakt je čuvan u tamnoj bočici.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analiza ekstrakata

Visoko efikasna tečnohromatografska analiza sa korišćenjem UV detektoraja primenjena za analizu sekundarnih metabolite u ispitivanim ekstraktima lišaja *Hypogymnia physodes*. Analiza sevršila na aparatu *Agilent 1200 Series* C18 kolonom (C18; 25 cm 4.6 mm, 10 m) i UV spektrofotometrijskim detektorom na tri talasne dužine (Manojlović i sar., 2012.). Isti sastav je utvrđen na sve tri talasne dužine (254, 280 i 320 nm). Za analizu su se koristili suvi ekstrakti koji se, preizvođenja analize, biti rastvoreni u mobilnoj fazi i profiltrirani kroz filtere. Kao mobilna faza korišćen je sistem rastvarača metanol-voda–fosfornakiselina (90:10:0,1, v/v/v). Svi rastvarači su HPLC stepena čistoće. Brzina protoka je 1.0 ml/min. Zapremina ubrizgavanja uzoraka je 10 µl. Detekcija razdvojenih pikova izvršila se primenom detektora sa serijom dioda (*Diode Array Detector, DAD*) na 280, 330 i 350 nm, a apsorpcioni spektri komponenata su snimljeni u opsegu od 200 do 400 nm. Identifikacija komponenti ekstrakata je izvršena komparacijom sa standardima na osnovu retencionih vremena i UV spektara.

Izolovanje usninske kiseline, atranorina i fisodinske kiseline

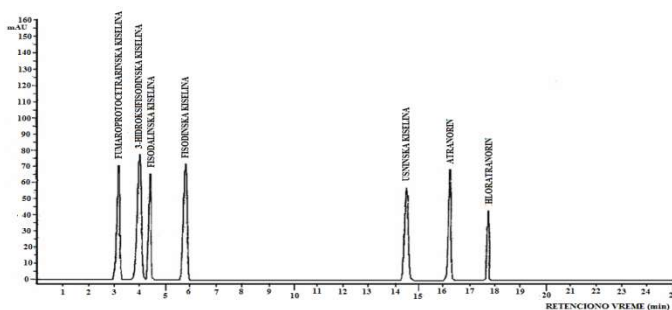
Hemijskim i instrumentalnim metodama se odredilo kvalitativni i kvantitativni hemijski sastav lišaja *Hypogymnia physodes*. Razdvajanje komponenata ekstrakta urađeno je na hromatografskoj koloni sa Silikagelom (0.063-0.2) primenom različitih sistema rastvarača (metanol/hloroform). Usninska kiselina, od ranije poznato jedinjenje sa antibiotskim delovanjem, je identifikovana na osnovu tačke topljenja i primenom spektroskopskim podacima. Atranorin je identifikovan na osnovu tačke topljenja i spektroskopskim podacima. Fisodinska kiselina je identifikovana komparacijom tačke topljenja i spektroskopskih podataka sa standardom (Huneck and Yoshimura, 1996).

Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost ekstrakata lišaja *Hypogymnia physodes* ispitivana je na tri standardnih bakterijskih sojeva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Escherichia coli* ATCC 25922 i dva soja gljivica: *Candida albicans* ATCC 10231 i *Aspergillus niger* ATCC 16404. Kultivacija gljivica vršena je na krompir-glukoznom agru tokom 7 dana na temperaturi od 20 °C pod naizmenično svetlim i tamnim uslovima. Nakon 7 dana izvršena je rekultivacija na novom krompir-glukoznom agru tokom narednih 7 dana. Bakterije su kultivisane na agaru tokom 7 dana na sobnoj temperaturi od 25 °C pod naizmenično svetlim i tamnim uslovima. Rekultivacija bakterijskih sojeva vršena je na novom agar substratu tokom 5 dana. Postupak kultivacije je izvodjen 4 puta dok nije dobijena čista kultura. Identifikacija testiranih mikroorganizama urađena je u Departmanu za mikrobiologiju, Instituta Torlak, Beograd, Srbija. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ispitivanih ekstrakata određene su mikrodilucionom metodom upotrebom mikrotitar ploča sa 96 udubljenja (Satyajit i sar. 2007.). Testiranje aktivnosti prema bakterijama vršeno je u Müller–Hinton bujonu kao medijumu, dok je kao medijum za testiranje aktivnosti prema gljivicama korišćen Sabouraud dekstrozni bujon. U prvi red mikrotitar ploče pipetirano je 100 µl rastvora ekstrakata rastvorenih u metanolu (200 µl /ml) i cirsamarin (rastvoren u 10 % DMSO, 2 mg/ml). U ostala udubljenja ploče dodato je po 50 µl Müller–Hinton odnosno Sabouraud dekstroznog bujona (sa dodatkom Tween 80 do finalne koncentracije od 0,5% (v/v) za analizu ekstrakata). Zapremina od 50 µl iz prvog reda udubljenja pipetirana je u drugi red za svaku mikrotitarsku liniju, a zatim je 50 µl razblaženja skalarno prenešeno iz drugog do dvanaestog reda udubljenja. U svako udubljenje je dodato po 10 µl indikatora (rastvor resazurina pripremljen rastvaranjem 270 mg tableta u 40 ml sterilne destilovane vode) i 30 µl hranljivog bujona. Na kraju, u svako udubljenje je dodato 10 µL suspenzije bakterija (10⁶ CFU/ml) odnosno suspenzija spora gljivica (3×10⁴ CFU /ml). Ploče su potom umotane u foliju, kako bi se sprečila dehidratacija i inkubirane 24 časa na temperaturi od 37 °C za bakterije i 48 časa na temperaturi od 28 °C u toku 48 h za gljivice. Svi eksperimenti su urađeni u tri ponavljanja.

Rezultati istraživanja i diskusija

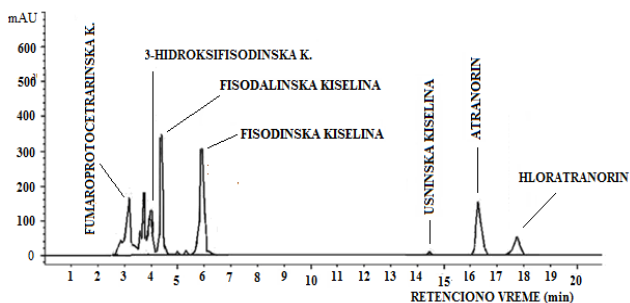
U ovom radu je prikazano izolovanje sekundarnih metabolita iz acetonskog ekstrakta lišaja *Hypogymnia physodes* i njihova identifikacija primenom HPLC analize. Na slikama 1. i 2. prikazan je HPLC hromatogram standarda i acetonskog ekstrakta lišaja *Hypogymnia physodes*. Utvrđeno je prisustvo sedam metabolita u lišaju *Hypogymnia physodes*: fumaroprocetrarinska kiselina, 3-hidroksifusodinska kiselina, fusodalinska kiselina, fusodinska kiselina, usninska kiselina, atranorin i hloratranorin. Identifikacija ovih jedinjenja postignuta je poređenjem njihovih vrednosti t_r (retenciono vreme) sa standardima koji su prethodno izolovani iz različitih vrsta lišajeva i čija je struktura potvrđena spektroskopskim metodama. Tabela 1. pokazuje retenciona vremena identifikovanih jedinjenja i njihove apsorpcione maksimume. Fusodinska kiselina, usninska kiselina i atranorin su jedinjenja koja su bila predmet ispitivanja brojnih istraživača zbog njihove aktivnosti i njihovih interakcija sa drugim metabolitima (Turk i sar., 2006.). Zbog toga nakon HPLC analize, fusodinska kiselina, usninska kiselina i atranorin su izolovani iz acetonskog ekstrakta listova lišaja *Hypogymnia physodes* isti bili predmet ispitivanja antimikrobne aktivnosti.



Slika 1. HPLC hromatogram standarda korišćeni za identifikaciju jedinjenja koja se nalaze u lišaju *Hypogymnia physodes*

Figure 1. HPLC chromatogram of the standards used for identification of the compounds present in *Hypogymnia physodes*

U ovom radu prikazani su rezultati hemijskog sastava acetonskog ekstrakta lišaja *Hypogymnia physodes* i *in vitro* antimikrobna aktivnost izolovanih jedinjenja (fusodinske kiseline, usninske kiseline i atranorina). Izolovana jedinjenja su pokazala umerenu do umereno jaku antimikrobnu aktivnost. Bakterije su znatno bile osetljivije u odnosu na gljive. Ovo zapažanje je u skladu i sa drugim studijama (Kosanić i sar., 2012.) sa težištem na antimikrobnoj aktivnosti u kojima je pokazano da su bakterije osetljivije od gljivica zbog razlike u sastavu propustljivosti ćelijskog zida. Ćelijski zid Gram negativnih bakterija sastavljen je od peptidoglukana, lipolisaharida i lipoproteina dok ćelijski zid Gram pozitivnih bakterija sastoji se od peptidoglukana i aminokiselina (Heijenoort, 2001). Ćelijski zid gljiva je slabo propustljiv i sastoji se od polisaharida kao što su hitin i glukan (Farkaš, 2003.). Iz gore navedenog razloga su bakterije bile osetljivije na sve ispitivane izolovane metabolite u odnosu na gljive.



Slika 2. HPLC hromatogram acetonskog ekstrakta lišaja *Hypogymnia physodes* snimljen 254 nm

Figure 2. HPLC chromatograms of the acetone extract of *Hypogymnia physodes* acquired at 254 nm.

Tabela 1. Retenciona vremena nađenih jedinjenja lišaja i njihovi apsorpcioni maksimumi

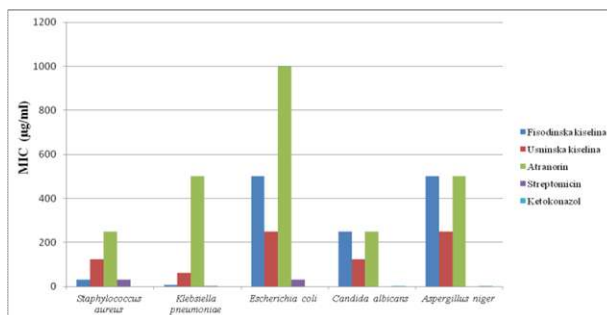
Table 1. Retention time of the examined lichen substances and their absorbance maxima (nm)

Komponente <i>Compounds</i>	Klasa komponente <i>Substance classes</i>	Retenciono vreme $t_r \pm SD^*(min)$	Apsorpcioni maksimumi (nm) UV spektra
	<i>Retention time</i>	<i>Absorbance maxima (nm)</i>	
	$t_r \pm SD^*(min)$	<i>UV spectrum</i>	
Atranorin	Depsid	16.21 ± 0.20	210, 252, 321m
Hloratranorin	Depsid	17.73 ± 0.20	213, 252, 315m, 350
Usninska kiselina	Dibenzofuran	14.32 ± 0.20	234, 282
Fumaroprotocetrarinska kiselina	Depsidon	3.12 ± 0.10	212, 240, 318
Trihidroksifisodinska kiselina	Depsidon	3.98 ± 0.10	205, 278, 308
Fisodalinska kiselina	Depsidon	4.31 ± 0.10	212, 242, 318
Fisodinska kiselina	Depsidon	5.91 ± 0.10	212, 263, 314

*tri ponavljanja ±SD, m-sporadni apsorpcioni maksimum

Antimikrobne aktivnosti jedinjenja izolovanih iz lišaja na ispitivanim mikroorganizmima prikazani su na grafikonu 1. Izolovani metaboliti iz lišaja *Hypogymnia physodes* su pokazali umerenu do umereno jaku antibakterijsku i antigljivičnu aktivnost. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za različita jedinjenja kreće se od 7.5 do 1000 µg/ml. Najjača antibakterijska aktivnost zabeležena je kod fisodinske kiseline prema *Klebsiella pneumoniae* (MIC=7.5µg/ml) i *Staphylococcus aureus* (MIC= 31.2 µg/ml) i usninske kiseline prema *Klebsiella pneumoniae* (MIC= 61.5 µg/ml). Najslabije aktivnosti pokazali su atranorin prema *Escherichia coli* (MIC=1000 µg/ml) i *Klebsiella pneumoniae* (MIC= 500 µg/ml). U slučaju ispitivanja antifungalne aktivnosti izolovanih jedinjenja iz acetonskog ekstrakta lišaja *Hypogymnia physodes* vrednosti MIC su se kretale u opsegu od 125 do 500µg/ml. Najbolju aktivnost

ispoljila je usninska kiselina prema *Candida albicans*(MIC=125µg/ml). Najslabije aktivnosti (MIC = 500µg/ml) zabeležene su u slučaju fusidinske kiseline i atranorin prema vrsti *Aspergillusniger*. Antimikrobna aktivnost upoređivana je sa standardima (streptomycin za bakterije i ketokonazol za gljive).



Graf.1. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) izolovanih jedinjenja iz acetonskog ekstrakta lišaja

Graph. 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of acetone extracts of isolated compound

Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da metaboliti acetonskog ekstrakta *Hypogymnia physodes*, ispoljavaju antibakterijsku i antifungalnu aktivnost prema testiranim vrstama mikroorganizama, čije su se vrednosti kretale od 7.5 do 1000µg/ml. Testirana izolovana jedinjenja su ispoljila najjače dejstvo prema vrstama *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. HPLC analiza je potvrdila prisustvo fusidinske kiseline, usninske kiseline i atranorina u ispitivanom ekstraktu. Izolovani metaboliti predstavljaju potencijalne antibakterijske supstance. Na osnovu rezultata možemo konstatovati da lišajevi predstavljaju značajan potencijal antimikrobnih konstituenata, posebno antibakterijskih. Ova studija zahteva dalja istraživanja antioksidativnog delovanja ovih jedinjenja i njihovu potencijalnu primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta (172015), koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

Richardson D. (1988). Medicinal and other economic aspects of Lichens. Handbook of Licheology. 11, 93-102.

- Romagni J.G., Dayan F. (2002). Structural diversity of lichen metabolites and their potential use. Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation. 12, 151-169.
- Boustie J., Tomasi S., Grube M. (2011). Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. *Phytochemistry Reviews*. 10 (3), 287-307.
- Burkholder P.R., Evans A.W., McVeigh I., Thornton H.K. (1944). Antibiotic activity of Lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 30 (9), 250-255.
- Turk A.O., Yılmaz M., Kivanc M., Turk H. (2003). The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Centraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 58(11-12), 850-854.
- Ranković B., Ranković D., Marić D. (2010). Antioxidant and Antimicrobial activity of some lichen species. *Mikrobiologija*. 79 (6), 812-818.
- Ranković B., Kosanić M., Stanojković T., Vasiljević P., Manojlović N. (2012). Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (11): 14707-14722.
- Manojlović N., Ranković B., Kosanić M., Vasiljević P., Stanojković T. (2012). Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*. 19 (13), 1166-1172.
- Kosanić M., Manojlović N., Janković S., Stanojković T., Ranković B. (2013). *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chemical Toxicology*. 53, 112-118.
- Molnar K., Farkas E. (2010). Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*. 65(3-4), 157-173.
- Huneck S. (1999). The Significance of Lichens and Their Metabolites. *Naturwissenschaften*. 86 (12), 559-570.
- Shukla V., Joshi G.P., Rawat M.S.M. (2010). Lichens as potential natural source of bioactive compounds. *Phytochemistry Reviews*. 13, 27-34.
- Manojlović N., Mašković P., Vasiljević P., Jelić R., Jusković M., Sovrlić M., Mandić L., Radojković M. (2012). HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Daphne cneorum* L. *Hemijska industrija*. 66, 709–716
- Turk H., Yılmaz M., Tay T., Turk A.O., Kivanc M. (2006). Antimicrobial Activity of Extracts of Chemical Races of the Lichen *Pseudoevernia furfuracea* and their Physodic Acid, Chloroatranorin, Atranorin, and Olivetoric Acid Constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 61 (7-8), 499-507.
- Satyajit D., Sarker L.N., Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate based antibacterial assay incorporating resazurin as indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 42, 321-324
- Kosanić M., Ranković B., Stanojković T. (2012). Antioxidant, antimicrobial, and anticancer activities of three *Parmelia* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92, 1909-1916.

- Heijenoort J. (2001). Formation of the glucan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. 11, 25-36.
- Huneck S., Yoshimura I. (1996). Identification of lichen substances. Springer. 11-123.
- Farkaš V. (2003). Structure and biosynthesis of fungal cell walls. Folia Microbiologica. 48 (4), 469-478.

**HPLC ANALYSIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF
BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS ISOLATED FROM
LICHENS *Hypogymnia physodes***

Nedeljko Manojlović¹, Branko Ranković², Marijana Kosanić², Perica Vasiljević³, Selena Rančić¹, Pavle Mašković⁴, Jovica Tomović¹, Miroslav Sovrlic¹

Abstract

The aim of this work was the isolation of secondary metabolites from acetone extract of the lichen *Hypogymnia physodes* and their identification by HPLC analysis. The work was also conceived with the aim to investigate the antimicrobial activity of isolated active components. Fisodic acid, usnic acid and atranorin were isolated from the acetone extract of *Hypogymnia physodes*. The antimicrobial activity, expressed by the MIC value, were investigated using three standardized bacterial strains and two strains of fungi. The obtained MIC values ranged from 7.5 to 1000 µg/ml, wherein the isolated compounds had the strongest influence on species, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. Beside above-mentioned compounds, the results of the HPLC analysis showed the presence of other of secondary metabolites, among which were also identified: fumarprotocetraric acid, 3-hydroxyfisodic acid, fisodalic acid, fisodic acid, usnic acid, atranorin and chloratranorin.

Key words: HPLC analysis, antimicrobial activity, *Hypogymnia physodes*

¹ University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Svetozar Markovic 69, Kragujevac, Serbia (mtnedeljko@yahoo.com);

² University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia;

³ Univerzitet of Nis, Faculty of Science, Višegradska 33, Niš, Serbia;

⁴ Univerzitet of Kragujevac, Faculty of Agronomy in Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia.