

Sylvia K. Czechowska, Renata Markiewicz, Maria H. Borawska

## AKTYWNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA I CYTOTOKSYCZNOŚĆ WYBRANYCH KWASÓW FENOLOWYCH W TESTACH *IN VITRO*

Zakład Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku  
Kierownik: prof. dr hab. *M.H. Borawska*

*W pracy oceniono aktywność mikrobiologiczną kwasu galusowego (GA), protokatechowego (PCA) oraz wanilinowego (VA) w stosunku do Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa i Candida albicans metodą mikrorozcieńczeń w bulionie, oznaczając minimalne stężenie hamujące (MIC) oraz minimalne stężenie bójcze (MBC) w pH 5,0 i 7,0.*

*Cytotoksyczność kwasów oznaczono w hodowlach fibroblastów skóry ludzkiej (NHSF) testem z użyciem soli tetrazolowej (MTT).*

*Najwyższą aktywnością przeciwbakteryjną w pH=5,0 charakteryzował się VA, którego minimalne stężenie hamujące (MIC) wzrost S. aureus i P. aeruginosa określono odpowiednio: 0,06 i 0,13 mg/ml. W pH=7,0 jedynie GA wykazywał aktywność w stosunku do S. aureus (MIC = 0,13 mg/ml) a PCA hamował wzrost C. albicans (MIC=0,016 mg/ml).*

*W teście oznaczania cytotoksyczności wobec zdrowych fibroblastów skóry ludzkiej jedynie GA, w badanym zakresie stężeń (0,032–1,00 mg/ml), wykazywał zahamowanie przeżycia NHSF średnio o 25,3 ± 3,8% (przeżywalność na poziomie 74,7 ± 3,8% w odniesieniu do kontroli). Pozostałe badane kwasy nie wpływały na przeżywalność fibroblastów skóry ludzkiej w zakresie badanych stężeń.*

Hasła kluczowe: fenolokwasy, aktywność mikrobiologiczna, cytotoksyczność.

Key words: phenolic acids, antimicrobial activity, cytotoxicity.

Kwasy fenolowe występują powszechnie w tkankach roślinnych. Do tej grupy zalicza się hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego i cynamonowego. Kwasy oceniane w niniejszej pracy (galusowy – GA, protokatechowy – PCA, wanilinowy – VA) są prostymi pochodnymi kwasu benzoowego (BA), jednego z najczęściej stosowanych konserwantów w żywności. Poszukiwanie nowych środków konserwujących jest wciąż aktualne, ponieważ dotychczas stosowane konserwanty oprócz pożądanego działania przeciwbakteryjnego oraz przeciwgrzybiczego, mogą wywoływać efekty uboczne, w tym nietolerancje pokarmowe i odczyny alergiczne (1, 2).

Kwasy fenolowe należą do grupy związków polifenolowych, które charakteryzują się głównie właściwościami przeciwutleniającymi. W żywności dominują kwas p-kumarowy, kawowy, ferulowy, występują także kwasy: chlorogenowy, galusowy, protokatechowy i wanilinowy (3, 4). Szczególnie bogatym źródłem fenolokwasów są owoce i warzywa oraz ich przetwory, a także kawa i herbata. Aktywność biolo-

giczna kwasów fenolowych polega głównie na unieczynnianiu wolnych rodników i chelatowaniu jonów metali ciężkich (5, 6).

Kwas benzoesowy charakteryzuje się aktywnością mikrobiologiczną szczególnie w stosunku do pleśni i drożdży w pH <5,0. Fenolokwasy, pochodne kwasu benzoesowego, wykazują również aktywność przeciwdrobnoustrojową (7, 8, 9, 10). Aktywność mikrobiologiczna w szerszym zakresie pH oraz brak toksycznego wpływu na organizm człowieka dałyby podstawy zastosowania tych związków jako nowych konserwantów w żywności. Celem pracy była ocena właściwości przeciwbakteryjnych i przeciugrzybiczych wybranych kwasów fenolowych: galusowego, protokatechowego, wanilinowego oraz ocena ich toksyczności wobec zdrowych fibroblastów skóry ludzkiej.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły wybrane kwasy fenolowe: galusowy (GA – 3,4,5-trihydroksybenzoesowy), protokatechowy (PCA – 3,4-dihydroksybenzoesowy i wanilinowy (VA – 4-hydroksy-3-metoksybenzoesowy) (Sigma, USA) oraz kwas benzoesowy (BA) (Sigma, USA) użyty jako substancja kontrolna.

W badaniach mikrobiologicznych wykorzystano szczepy pozyskane z kolekcji NCTC (*ang. National Collection of Type Cultures*, Wielka Brytania) oraz ATCC (*ang. American Type Culture Collection*, USA): *Staphylococcus aureus* (NCTC 4163), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 6749) oraz *Candida albicans* (ATCC 10231). Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost mikroorganizmów (MIC – *ang. minimal inhibitory concentration*) oraz minimalnego stężenia bójczego (MBC – *ang. minimal bactericidal concentration*) zostały określone metodą mikrorozcieńczeń w bulionie, zgodnie ze standardami Amerykańskiego Narodowego Komitetu Klinicznych Standardów Laboratoryjnych (NCCLS) (11, 12). Oznaczenia wykonano trzykrotnie w pH=5,0 i pH=7,0. Różne wartości pH podłoża uzyskano poprzez dodatek 0,1 mol/l HCl. Badane kwasy rozpuszczano w dimetylosulfotlenku (DMSO) a następnie w bulionie lub podłożu RPMI 1640 o odpowiednim pH i sterylizowano przy użyciu filtrów strzykawkowych o wielkości porów 0,45 µm. Kontrolę wzrostu badanych szczepów wykonano w podłożu zawierającym DMSO (w stężeniu użytym do rozpuszczania badanych kwasów), gentamycynę (PAA, Austria) i nystatynę (Pharma Cosmetic, Polska).

Ocenę cytotoksyczności kwasów w odniesieniu do zdrowych fibroblastów skóry ludzkiej (NHSF – *ang. Normal Human Skin Fibroblasts*), pozyskanych z kolekcji ATCC [CRL-1474], wykonano metodą z użyciem soli tetrazolowej MTT (13). Do hodowli NHSF (z pasażu 9-tego) stosowano podłoże hodowlane DMEM z glukozą (4,5 g/l), L-glutaminą oraz pirogronianem sodu (PAA, Austria) z dodatkiem surowicy bydlęcej (Biomed, Polska) w ilości 10% oraz antybiotyków – penicyliny (50 U/ml) i streptomycyny (50 µg/ml) (Sigma, USA). Konfluentną hodowlę poddawano działaniu trypsyny (Sigma, USA) a następnie zawieszano w medium hodowlanym z surowicą do uzyskania gęstości w zakresie  $0,5-1 \times 10^5$  komórek/ml. Do każdego wgłębienia 96-oczkowej płytki dodawano po 100 µl zawiesiny. Po dwugodzinnej inkubacji komórek w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> do

wgłębień dodano po 100  $\mu$ l odpowiednich stężeń badanych kwasów lub po 100  $\mu$ l medium wzrostowego do dołków kontrolnych. Badane substancje były rozpuszczane w DMSO a następnie rozcieńczane w medium hodowlanym i sterylizowane przez filtr strzykawkowy (końcowe stężenie DMSO – 0,5%). Po 24-godzinnej inkubacji medium usuwano, płytki przepłukiwano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej – PBS (Biomed, Polska) i dodawano roztwór soli tetrazolowej MTT w PBS o stężeniu 0,5 mg/ml w objętości 200  $\mu$ l do każdego wgłębienia. Płytki zawinięte w folię aluminiową inkubowano przez 4 godziny, po tym czasie roztwór MTT usuwano. Powstały formazan rozpuszczano dodając do każdego wgłębienia 180  $\mu$ l DMSO i po 15 minutach 20  $\mu$ l buforu *Sorensen'a* (0,1 mol/l glicyny oraz 0,1 mol/l NaCl doprowadzony do pH 10,5 za pomocą 0,1 mol/l NaOH). Absorbancję mierzono przy długości fali  $\lambda=570$  nm na spektrofotometrze BioTek *EL 800*, dane analizowano z użyciem programu komputerowego KCjunior oraz Statistica 8. Wyniki przedstawiono jako % wartości kontrolnej (P):

$$P = (A_p/A_k) \times 100,$$

gdzie:  $A_p$  – średnia absorbancji próby badanej,  $A_k$  – średnia absorbancji próby kontrolnej.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki MIC oraz MBC poszczególnych kwasów w odniesieniu do *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *C. albicans* w pH=5,0 i pH=7,0 przedstawiono w tabeli I. VA wykazywał najsilniejsze działanie antymikrobiologiczne w pH=5,0 (MIC=0,06–0,13 mg/ml), jednak nie obserwowano tego działania w pH=7,0 (MIC>1,0 mg/ml). Najwyższą aktywnością mikrobiologiczną w pH=7,0 charakteryzował się GA, który wykazywał działanie w stosunku do *S. aureus* oraz *C. albicans* (MIC odpowiednio 0,13 mg/ml i 0,002 mg/ml). Nie stwierdzono aktywności żadnego z kwasów w pH=7,0 w stosunku do G(-) *P. aeruginosa*. GA, PCA oraz VA w pH=5,0 wykazywały silniejszą lub na takim samym poziomie aktywność przeciwbakteryjną w porównaniu do kwasu benzoowego, w pH=7,0 nie stwierdzono takiej zależności. Badane kwasy wykazywały niższą aktywność bójczą w porównaniu do BA, za wyjątkiem GA, który w pH=7,0 działał silniej bójczą w stosunku do *S. aureus* (MBC=0,13 mg/ml).

W teście oznaczania cytotoksyczności badanych kwasów w stosunku do NHSF nie wykazano znaczących różnic w zależności od stężenia kwasu w badanym zakresie (0,032–1,00 mg/ml) (tab. II). W związku z tym obliczono średnią, na podstawie której badano statystyczną zależność pomiędzy przeżywalnością NHSF inkubowanych z BA oraz ocenianymi kwasami. Wykazano istotnie mniejszą przeżywalność fibroblastów poddanych 24-godzinnej inkubacji z GA ( $p<0,000001$ ) oraz VA ( $p=0,00172$ ). Biorąc pod uwagę procent przeżycia fibroblastów poddanych działaniu ocenianych kwasów należy stwierdzić, że jedynie GA wykazywał aktywność cytotoksyczną w zakresie badanych stężeń, powodując zmniejszenie przeżywalności NHSF o  $25,3\pm 3,8\%$  ( $74,7\pm 3,8\%$  przeżywalności w stosunku do kontroli). Pozostałe badane kwasy nie wpływały na przeżywalność fibroblastów skóry ludzkiej w zakresie badanych stężeń.

Tab e l a 1. Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC (mg/ml)) oraz bójczego (MBC (mg/ml)) kwasów: galusowego, protokatechowego oraz wanilinowego w pH=5,0 i pH=7,0

Tab l e 1. Values of minimal inhibitory concentration (MIC (mg/ml)) and minimal bactericidal concentration (MBC (mg/ml)) of gallic, protocatechuic and vanillic acid at pH=5.0 and pH=7.0

Kwas	<i>S. aureus</i> <sup>a</sup>						<i>P. aeruginosa</i> <sup>a</sup>						<i>C. albicans</i> <sup>a</sup>					
	pH=5,0			pH=7,0			pH=5,0			pH=7,0			pH=5,0			pH=7,0		
	MIC	MBC		MIC	MBC		MIC	MBC		MIC	MBC		MIC	MBC		MIC	MBC	
Benzoesowy	0,25	0,5		1,00	1,00		0,25	0,25		1,00	n. ak.		0,13	0,25		n. ak.	n. ak.	
Galusowy	0,25	n. ak <sup>b</sup>		0,13	0,13		0,25	n. ak.		n. ak.	n. ak.		n. ak.	n. ak.		0,002	1,00	
Wanilinowy	0,06	0,75		n. ak	n. ak.		0,13	0,50		n. ak.	n. ak.		0,75	n. ak.		n. ak.	n. ak.	
Protokatechowy	0,25	0,75		n. ak.	n. ak.		0,25	0,75		n. ak.	n. ak.		n. ak.	n. ak.		0,016	n. ak.	
Gentamycyna	0,002	0,003		<0,0001	0,0001		0,002	0,003		<0,0001	0,002		–	–		–	–	
Nystatyna	–	–		–	–		–	–		–	–		0,0003	0,0005		<0,0003	0,001	

<sup>a</sup> kontrola: DMSO–MBC > 1%

<sup>b</sup> n. ak. – brak aktywności (MIC > 1 mg/ml)

Table II. Przeżywalność NHSF po 24-godzinnej inkubacji w podłożu zawierającym różne stężenia kwasów: galusowego, protokatechowego lub wanilinowego

Table II. Viability of NHSF incubated for 24 h in medium with variable concentrations of gallic, protocatechuic and vanillic acid

Stężenie (mg/ml)	Przeżywalność (% kontroli) ± SD			
	Kwas benzoesowy <sup>a, b</sup> (BA)	Kwas galusowy (GA)	Kwas protokatechowy (PCA)	Kwas wanilinowy (VA)
0,032	101,88±14,3	82,77±3,9	100,37±21,4	105,51±1,4
0,063	101,73±10,5	72,76±8,5	106,50±4,2	97,52±4,0
0,125	104,39±8,4	72,09±4,8	109,02±7,2	97,65±3,5
0,250	107,55±6,9	74,06±3,9	107,52±7,8	96,95±4,7
0,500	104,80±4,6	75,60±10,1	102,70±10,9	98,23±4,3
0,750	103,54±6,7	74,11±9,9	102,93±7,8	96,49±4,5
1,000	108,08±4,4	71,48±13,8	96,00±9,7	95,39±4,9
średnia	104,57±2,5	74,70±3,8	103,58±4,5	98,20±3,4

<sup>a</sup>  $p_{(BA/GA)} < 0,000001$ ; <sup>b</sup>  $p_{(BA/VA)} = 0,00172$ .

## WNIOSKI

1. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną (MIC) w pH=5,0 wykazywał kwas wanilinowy.

2. Badane kwasy wykazują niższą aktywność bójczą w porównaniu do kwasu benzoesowego, za wyjątkiem kwasu galusowego, który w pH=7,0 działa silniej bójczo w stosunku do *S. aureus*.

3. Badane kwasy, z wyjątkiem kwasu galusowego, nie wykazywały działania cytotoksycznego w teście oznaczania cytotoksyczności wobec zdrowych fibroblastów skóry ludzkiej.

S.K. Czechowska, R. Markiewicz, M.H. Borawska

### SELECTED ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF VARIED PHENOLIC ACIDS *IN VITRO*

#### Summary

In this study antimicrobial activity of gallic acid (GA), protocatechuic acid (PCA) and vanillic acid (VA) against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* was measured using microbroth dilution method at pH=5.0 and 7.0. Cytotoxicity assay of studied acids was estimated in the human skin fibroblasts using Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) test.

VA showed the highest antibacterial activity at pH=5.0, minimal inhibitory concentration (MIC) ranged 0.06 and 0.13 mg/ml. GA showed antimicrobial activity at pH=7.0 at concentration 0.13 mg/ml against *S. aureus*. PCA at pH=7.0 had the best antifungal activity (MIC=0.016 mg/ml). GA showed slightly cytotoxic activity at concentration of 0.032–1.00 mg/ml (approximately 74.7±3.8 % viability).

