

WIADOMOŚCI *chemiczne*



2023

(77)

5 - 6

(911 - 912)

CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

RADA REDAKCYJNA

IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI, BOGUSŁAW BUSZEWSKI
(PRZEWODNICZĄCY), TADEUSZ GÓRECKI, MIETEK JARONIEC,
ANATÓL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,
JERZY LESZCZYŃSKI, KRZYSZTOF MATYJASZEWSKI, PIOTR PANETH,
JANUSZ PAWLISZYN, K. MICHAŁ PIETRUSEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, SŁAWOMIR RUBINSZTAJN, GRZEGORZ SCHROEDER,
ANDRZEJ W. SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

MARCIN DRAĞ, ADAM JEZIERSKI, LESZEK KĘPIŃSKI,
LUDWIK KOMOROWSKI, WITOLD RYBA-ROMANOWSKI, SŁAWOMIR SZAFERT,
ANDRZEJ TROCHIMCZUK, KAZIMIERA WILK

REDAKTOR NACZELNY

PIOTR J. CHMIELEWSKI

P. O. SEKRETARZA REDAKCJI

DAGMARA JACEWICZ

e-mail: czasopisma@ptchem.pl

BIURO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO (FINANSE)

e-mail: biuro@ptchem.pl

MARTA PAWLAK (KOLPORTAŻ)

e-mail: kolportaz@ptchem.pl

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

e-mail: czasopisma@ptchem.pl

ADRES STRONY INTERNETOWEJ

<https://ptchem.pl/pl/chem-news>

©Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

Warszawa 2019

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Obsługa artykułów:

Joanna Drzeżdżon

Skład i przygotowanie do druku:

Mateusz Drzeżdżon

Druk:

Sowa Sp. z o.o.

ul. Raszyńska 13, 05-500 Piaseczno

Tel.: +48(22) 431 81 40

Fax. +48(22) 431 81 50

e-mail: sowadruk@sowadruk.pl

PROFESOROWI CZESŁAWOWI WAWRZEŃCZYKOWI W 80. ROCZNICĘ URODZIN



Kiedy poproszono mnie o krótkie przedstawienie sylwetki Profesora dr hab. Czesława Wawrzeńczyka, zgodziłem się z radością. Połączył mnie z nim los dość dawno temu - gdy w roku 1971 podjąłem pracę w Instytucie Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej. Tyle tylko, że przez wiele lat nie wiedziałem, że Jego imię to Czesław, bo na Politechnice funkcjonował jako Marek. Gdy zacząłem pisać, zdałem sobie sprawę, jak niewiele naprawdę wiemy o współtowarzyszach naszej zawodowej drogi przez życie i dlatego poprosiłem o wsparcie, którego chętnie mi udzielono, za co serdecznie dziękuję.

Profesor Wawrzeńczyk jest dumnym synem Ziemi Kieleckiej. Urodził się 8 września 1943 roku w Strawczynie oddalonym niewiele ponad 20 km od Kielc. Dorastał w rodzinie Józefa i Marianny, a Rodzice w odstępach trzyletnich obdarzyli go bratem Józefem (choć większość nazywa go Ryśkiem), siostrami Kazimierą i Marianną. W roku 1961 ukończył I Liceum Ogólnokształcące im. Stefana Żeromskiego w Kielcach (Żeromski również urodził się w Strawczynie). Jako uczeń chciał studiować filologię polską, ale zdawał sobie sprawę z ograniczonych możliwości ciekawej pracy po takich studiach, więc wybrał chemię. Zdecydował o tym fakt, że w liceum w Kielcach była świetna pracownia chemiczna i lubił ten przedmiot.

Ze względów geograficznych powinien wybrać Kraków, Lublin lub Warszawę, ale za namową kolegi przyjechał do Wrocławia i zaczął studiować na Wydziale Matematyczno-Fizyczno-Chemicznym Uniwersytetu Wrocławskiego. Ukończył je w roku 1966 pracą magisterską pt. „Otrzymywanie 2,4-karadienu” wykonaną pod kierunkiem prof. Henryka Kuczyńskiego twórcy szkoły chemii i stereochemii terpenów na Politechnice Wrocławskiej. Bezpośrednim opiekunem pracy był późniejszy prof. Krzysztof Piątkowski. I tak zaczęła się przygoda Profesora z chemią związków naturalnych. Po ukończeniu studiów podejmuje pracę w Katedrze Chemii Organicznej II na Politechnice Wrocławskiej, gdzie prof. Kuczyński powierza nad nim opiekę doktorowi Andrzejowi Zabży.

Kiedy zaczął pracować, nie do końca był przekonany co do kariery naukowej i wystartował w konkursie na sprawozdawcę sportowego w telewizji. Przeszedł pierwszy etap konkursu, ale w następnym miał za zadanie komentować podnoszenie ciężarów. To mało dynamiczny sport i taki sam był komentarz, co skończyło marzenia Profesora o karierze telewizyjnego sprawozdawcy sportowego.

W roku 1974 mgr Czesław Wawrzeńczyk uzyskuje stopień naukowy doktora nauk chemicznych, który nadaje mu Rada Naukowo-Dydaktyczna Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej Politechniki Wrocławskiej. Podstawą nadania tego stopnia była rozprawa pt. „Stereochemia cyklicznych azaterpenów”, a promotorem był doc. Andrzej Zabża.

Młody doktor stał się wcześniej głową rodziny. W dniu 20 lipca 1968 roku bierze ślub z Mirosławą Płokarz, młodszą koleżanką z Uniwersytetu. W 1970 roku pojawia się w domu syn – Michał (architekt), a w roku 1978 córka Julia (dzisiaj znany wrocławski chirurg-onkolog).

W grupie prof. Andrzeja Zabży zwrócono uwagę na fizjologię owadów, głównie na ich rozwój. Rolę kluczową w tym procesie odgrywa układ hormonalny, a jednym z dwóch kluczowych jest hormon juwenilny. Wiele grup badawczych, wśród nich i ta na Politechnice Wrocławskiej, projektowało i otrzymywało analogi strukturalne tych hormonów w nadziei na znalezienie skutecznego insektycydu. Jako współorganizator konferencji naukowej, która odbyła się w roku 1980 w Karpaczu, gdzie zjechała się cała światowa śmietanka specjalistów z zakresu fizjologii owadów i chemii, Profesor

Wawrzeńczyk przekonuje się ostatecznie do tej tematyki i kontynuuje badania z zakresu syntezy analogów strukturalnych hormonów juvenilnych. W roku 1984 wyjeżdża na staż do zespołu profesora Glenna Prestwicha na Uniwersytet Stanu Nowy Jork w Stony Brook. Po powrocie ze stażu, w roku 1985 na podstawie rozprawy habilitacyjnej pt. „*Analogi strukturalne hormonów juvenilnych owadów*”, decyzją Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej dr Czesław Wawrzeńczyk uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych. Po tym wydarzeniu dr hab. Czesław Wawrzeńczyk zapragnął większej samodzielności naukowej i organizacyjnej. Rozglądał się więc za uczelnią, która da mu możliwości tworzenia zespołu badawczego. Wybór, trochę z sentymentu padł na Wyższą Szkołę Pedagogiczną w Kielcach (obecnie Uniwersytet im. Jana Kochanowskiego), gdzie od lutego 1987 roku pracował na pełnym etacie docenta w Instytucie Chemii. W tym samym roku rozpoczął też pracę w Katedrze Podstaw Chemii Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) we Wrocławiu, najpierw w wymiarze pół etatu, a od 1989 w pełnym wymiarze. W roku 1987 odbyła się druga międzynarodowa konferencja omawiająca wpływ hormonów owadzych na ich rozwój i behavior. I znów zgromadziła ona światową czołówkę badaczy, a prof. Glenn Prestwich zaproponował Czesławowi Wawrzeńczykowi drugi roczny staż naukowy, który odbył się w roku 1988. Ten staż zaowocował otrzymaniem znaczonych trytem i jodem hormonów juvenilnych i ich późniejsze zastosowanie do badania białka wiążącego ten hormon. Badania te pozwoliły zdefiniować molekularne podstawy regulacji hormonalnej rozwoju owadów.

Po powrocie ze stażu od 1 października 1989 roku pierwszym pracodawcą stała się Akademia Rolnicza we Wrocławiu a drugim Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Kielcach. W obu tych uczelniach prof. Wawrzeńczyk rozpoczął budowanie dwóch zespołów badawczych. W latach 1992-2000 był zatrudniony na Akademii Rolniczej we Wrocławiu na stanowisku profesora nadzwyczajnego, a od 2000 roku profesora zwyczajnego. W międzyczasie z rąk Prezydenta Aleksandra Kwaśniewskiego otrzymał w roku 1998 tytuł profesora nauk chemicznych. Procedurę o nadanie tytułu przeprowadziła Rada Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. W roku 1996 został kierownikiem Katedry Podstaw Chemii, której nazwa szybko została zmieniona na Katedrę Chemii. Prof. Wawrzeńczyk rozwija swoją tematykę badawczą, która w nowatorski sposób łączy doświadczenia wyniesione z Politechniki Wrocławskiej (chemia izoprenoidów), stażu na uniwersytecie w Stony Brook (badania na pograniczu biologii i chemii) oraz tradycji badań prowadzonych przez prof. Stanisława Meyera (redukcja związków aromatycznych w ciekłym amoniaku, redukcja Birch'a) i prof. Antoniego Siewińskiego na Akademii Rolniczej (zastosowanie mikroorganizmów jako katalizatorów w syntetycznej chemii organicznej).

Naukę można wyobrazić sobie jako wielki i piękny zamek, w którym jest wiele imponujących i wystawnie umeblowanych komnat. Jednak jest tam jeszcze wiele pokoi, które kryją niespodzianki, ale aby je poznać trzeba otworzyć odpowiednie drzwi, zbadać te niespodzianki a następnie urządzić te pokoje. W moim odczuciu prof. Czesław Wawrzeńczyk otworzył wiele drzwi, sam umeblował kilka pokoi, a inne przygotował swoim następcom. Co najmniej trzy z nich to prawdziwe komnaty. Pier-

wsza z nich to projektowanie, synteza i ocena aktywności deterentów pokarmowych owadów w nadziei, że mogą znaleźć zastosowanie jako czynniki regulujące populację szkodników upraw roślinnych i magazynów żywności. Badania te prowadził ściśle współpracując z laboratoriami prof. Jana Nawrota z Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu, prof. Beaty Gabrys z Katedry Biologii i Ekologii Uniwersytetu Zielonogórskiego oraz prof. Maryli Szczepanik z Katedry Zoologii Bezkręgowców na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Druga komnata zastawiona jest półkami z flakonikami zawierającymi substancje zapachowe. Celem badań było otrzymanie składników kompozycji perfumeryjnych oraz preparatów, które mogą być dodatkami smakowymi w przemyśle spożywczym. Badania te to nie tylko ich synteza, ale również próby korelacji struktury cząsteczki z jej właściwościami zapachowymi. Prawie wszystkie metody otrzymywania związków zapachowych są objęte ochroną patentową. Niezwykłym poszerzeniem grupy połączeń zapachowych były krzemioizoprenoidy – hybryda związków krzemu z terpenami. W trzeciej komnacie opracowano nowe metody enzymatycznej modyfikacji fosfolipidów wyizolowanych z żółtek jaj kurzych, pod kątem wzbogacenia ich w nienasycone kwasy tłuszczowe takie jak: α -linolenowy, linolowy, γ -linolenowy czy sprzężony kwas punikowy. Modyfikacje części polarnej fosfolipidów pozwoliły otrzymać pochodne hybrydowe zawierające dehydroepiandrosteron (DHA), czy betulinę. Badania te prowadzono w celu stwierdzenia, czy połączony z lekiem fragment lipidowy może służyć jako nośnik ulepszający właściwości farmaceutyku.

Obok życia naukowego toczyło się życie rodzinne i Profesorowi udało się wytyczyć pewną granicę między rodziną a pracą. W roku 1996 zostaje On wdowcem, a rodzą się i dorastają wnuki: Antoni, Maksymilian i Natalia, – jak łatwo się domyślić prof. Wawrzeńczyk jest kochanym dziadkiem. W kolejnym okresie Jego życia pojawia się Krystyna i wnosi wiele słońca i spontanicznego optymizmu. Nieomal corocznie razem wyjeżdżają na pieszą pielgrzymkę Szlakiem Jakubowym do Santiago de Compostela. Szlak ten nazywany też *Camino de Santiago* (lub po prostu *camino*), to droga dla każdego, ale niezwykła, gdyż każdy przeżywa ją na inny sposób. Potrafią tak pięknie opowiadać o swoich przeżyciach, że skusili też mnie i w roku 2016 wybraliśmy się tam rodzinnie. Nie bardzo tylko wiem, dlaczego współpracownicy Profesora nazywają te wyprawy pielgrzymkami rekreacyjnymi; zwykle jest to poważne wyzwanie.

Największym osiągnięciem Prof. Wawrzeńczyka jest niewątpliwie stworzenie uznanej na świecie szkoły naukowej. Szkoła ta to nie tylko badania, ale również wychowankowie i współpracownicy, którym pomógł w osiągnięciu kolejnych etapów rozwoju naukowego. Wypromował on blisko 100 dyplomantów, 31 doktorów i jednego doktora Honoris Causa a 10 osób, korzystając z Jego opieki, uzyskało samodzielność naukową (czwórka jest już profesorami tytularnymi). Jako promotor i kierownik Profesor dał się poznać jako osoba życzliwa, pomocna, pełna empatii, wspierająca szczególnie w trudnych momentach, która zawsze znajduje czas na rozmowę, u której można zawsze zasięgnąć porady nie tylko w sprawach naukowych. Posiada wyjątkowy dar motywowania pracowników do twórczej pracy, pozwalając jednocześnie na ich du-

żą samodzielność. Motywując do nauki, do rozwoju czy do stawiania sobie celów ambitnych i wymagających wyrzeczeń bardzo często posługuje się cytataми z Biblii. Jest bowiem profesor człowiekiem głębokiej wiary.

Będąc wieloletnim kierownikiem katedry dobrze wiedział, że o jakości prowadzonych badań silnie decydują pieniądze. Dokonał znaczącej rozbudowy infrastruktury laboratoriów oraz diametralnie poprawił stan pomieszczeń Katedry Chemii. Zdobył też wiele projektów badawczych pozwalających na prowadzenie badań na odpowiednio wysokim poziomie. Jest oczywistym, że tak intensywna kariera naukowa obfituje w recenzje, prezentacje konferencyjne (ponad 10 konferencji sam zorganizował), wykłady i współprace naukowe. Kariera ta również owocowała wieloma odznaczeniami, nagrodami i wyróżnieniami, żeby wspomnieć tylko o Krzyżu Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski i Medalu Komisji Edukacji Narodowej.

Last but not least, jest też Profesor lubianym i cenionym dydaktykiem – można nawet postawić tezę, że uczenie to jedna z jego pasji. Jego wykłady charakteryzuje nie tylko wysoki poziom merytoryczny, ale ciekawy i barwny sposób przybliżania omawianych zagadnień. Jest autorem podręcznika akademickiego pt. „*Chemia organiczna. Właściwości chemiczne i spektroskopowe związków organicznych*”, bardzo przydatnego do nauki chemii organicznej i interpretacji widm NMR i IR.

W końcu pozwolę sobie na moment „prywatny”. Najbardziej mi brak wystawnych śniadań (kiełbasa, kaszanka, śledzik i chleb), które prof. Marek Wawrzeńczyk wydawał raz na kilka miesięcy w swoim gabinecie. Tam przyjaźniliśmy się, plotkowaliśmy, dyskutowali o polityce, czy też rozważaliśmy problemy chemiczne. Niejednokrotnie były one okraszane nalewkami (zwykle produkcji sekretarki Profesora – pani Basi). Niestety gabinetu Profesor już nie ma.

Prof. Czesława Wawrzeńczyka można by nazwać nowoczesnym profesorem o konserwatywnych poglądach na naukę. Ceni sobie bowiem tradycję i rolę struktury akademickiej. Dobrze wie, że do roli lidera naukowego trzeba po prostu dojrzeć, nie tylko poprzez uzyskanie odpowiedniego dorobku naukowego, ale również poprzez rozumienie życia. Jest on Przy tym osobą optymistyczną, otwartą i przyjazną. Nie sposób Go nie lubić – ale jak tu nie czuć sympatii do osoby, która lubi pszczoły („*bo zapylają kwiaty i produkują miód*”) i motyle („*bo są piękne*”).

*Prof. dr hab. inż. Paweł Kafarski
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*



Kościół pod wezwaniem Najświętszej Marii Panny w Strawczynie



Typowa pamiątka z wyjazdu nad morze



Profesor prowadzi Mirkę do ślubu



W Stony Brook z Glennem D. Prestwichem



Nominacja profesorska



Profesor z doktorantami



Certyfikat potwierdzający udział w pielgrzymce do Santiago de Compostela



Na *camino*



Profesor z córką Julią



Profesor z wnukami

PEPTYDY I PEPTYDOMIMETYKI JAKO INHIBITORY TYROZYNAZY

PEPTIDES AND PEPTIDOMIMETICS AS INHIBITORS OF TYROSINASE

**Patrycja Ledwoń^{1,2}, Michał Jewgiński¹,
Rafał Latajka^{1*}**

¹ *Katedra Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska,
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Polska*

² *Interdepartmental Research Unit of Peptide and Protein Chemistry and
Biology, Department of NeuroFarBa, University of Florence, Via Ugo Schiff 6,
50019 Sesto Fiorentino, Italy*

**e-mail: rafal.latajka@pwr.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń


Wprowadzenie

1. Tyrozynaza
2. Kwas kojowy
3. Peptydy i ich koniugaty jako znane inhibitory tyrozynazy
 - 3.1. Koniugaty aminokwasowe i peptydowe z kwasem kojowym
 - 3.2. Peptydy
4. Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane


Mgr Patrycja Ledwoń jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Po stażu odbytym w 2018 r. na Uniwersytecie Florenckim, rozpoczęła badania do pracy doktorskiej w Katedrze Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem prof. dr. hab. Rafała Latajki oraz na Uniwersytecie Florenckim pod kierunkiem prof. Paolo Rovero. Skupia się na projektowaniu, syntezie i zastosowaniu peptydów o potencjalnym znaczeniu w kosmeceutyce, głównie jako inhibitory enzymów wpływających na procesy starzenia się skóry.



 <https://orcid.org/0000-0003-2382-390X>


Dr inż. Michał Jewgiński jest adiunktem w Katedrze Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Pracę doktorską, realizowaną na Uniwersytecie Opolskim pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Pawła Kafarskiego, obronił w 2009 roku. Jego zainteresowania naukowe skupiają się na syntezie oraz badaniu zależności struktury i aktywności biologicznej różnej klasy foldamerów chinolinowych oraz peptydowych.



 <https://orcid.org/0000-0003-4931-5452>

Prof. dr hab. Rafał Latajka jest pracownikiem Katedry Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Pracę doktorską, realizowaną pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Pawła Kafarskiego, obronił w 2001 roku, w 2009 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego, a 2022 roku tytuł profesora. Jego zainteresowania naukowe skupiają się wokół badań peptydomimetyków oraz foldamerów peptydowych, jak również badań zależności struktura-aktywność.



 <https://orcid.org/0000-0003-2943-2838>

ABSTRACT

The publication reviews the results on the tyrosinase inhibition capacity of a short peptide and peptide conjugates with known low molecular weight inhibitors of this enzyme. Tyrosinase is a widespread copper-dependent enzyme capable of catalyzing two reaction pathways for oxidizing monophenols to *o*-diphenols and *o*-diphenols to *o*-quinones. Despite the wide distribution in nature, the peptide chain that builds the catalytic cavity is relatively highly conserved for all organisms. As the research results collected in the work show, the creation of short peptide conjugates with known tyrosinase inhibitors, such as kojic acid, significantly reduces the toxicity of the inhibitor and improves its stability.

Keywords: tyrosinase, peptides, peptidomimetics, tyrosinase inhibitors, cosmeceuticals

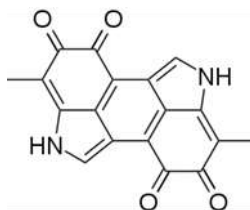
Słowa kluczowe: tyrozynaza, peptydy, peptydomimetyki, inhibitory tyrozynazy, kosmeceutyki

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

mTYR	– Tyrozynaza grzybowa, ang. <i>mushroom tyrosinase</i>
hTYR	– Tyrozynaza ludzka, ang. <i>human tyrosinase</i>
KA	– Kwas kojowy, ang. <i>kojic acid</i>
DOPA	– 3,4-dihydroksyfenyloalanina

WPROWADZENIE

Melaniny (Rysunek 1) to naturalne pigmenty o polimerycznej strukturze, odpowiedzialne za karnację skóry. Są jednymi z najbardziej rozpowszechnionych barwników w naturze. Melaniny obecne są u bakterii, grzybów i roślin. U zwierząt melaniny są produktem utlenienia i polimeryzacji L-tyrozyny podczas procesu zwanego melanogenezą. Zachodzi on w melanocytach, komórkach obecnych w warstwie podstawnej naskórka. Ilość i rodzaj pigmentu wytwarzanego w melanocytach, a także jego dystrybucja w keratynocytach, determinuje kolor ludzkiej skóry i włosów. Proces syntezy melanin jest bardzo złożony, a jego opis można znaleźć w literaturze.^[1,2]



Rysunek 1. Struktura melaniny
Figure 1. Structure of melanine

Po raz pierwszy melanogeneza indukowana przez enzym tyrozynazę była przedstawiona w roku 1927 przez Ropera, w pionierskiej publikacji dotyczącej roli tego enzymu w opisywanym procesie.^[3] W roku 1988 Prota zaproponował schemat melanogenezy, w którym otrzymywane są dwa typy melanin – eumelaniny i feomelaniny.^[4] Eumelanina to polimer o czarno-brązowej barwie, zbudowany głównie z merów dihydroksyindolu. Otrzymywana jest w procesie utlenienia tyrozyny lub 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA) do dopachinonu, katalizowanym przez tyrozynazę. Feomelanina to czerwono-żółty pigment otrzymywany w procesie addycji cysteiny do dopachinonu, bez udziału enzymów. Główną różnicą między tymi dwoma typami melaniny są fotoochronne właściwości eumelaniny i fototoksyczność feomelaniny.^[5] W związku z tym, feomelanina jest w dużej mierze odpowiedzialna za fotostarzenie się skóry spowodowane nadmiernym oddziaływaniem promieni UV. Niedobór eumelaniny powoduje podwyższoną wrażliwość na słońce i powstawanie przebarwień skórnych.

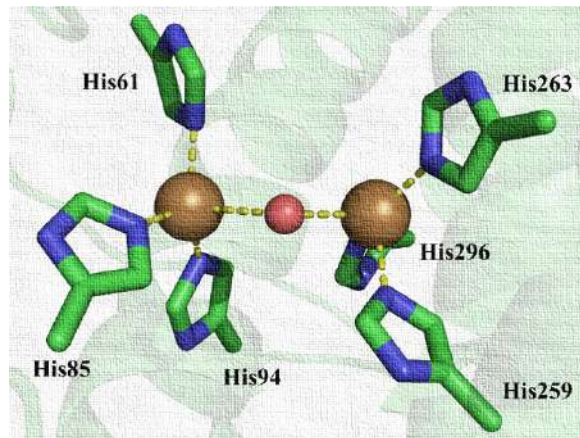
Tyrozynaza odgrywa znaczącą rolę w procesie melanogenezy i bez wątpienia jest niezbędnym czynnikiem w powstawaniu melanin. Spowodowało to zwiększone zainteresowanie nowymi inhibitorami tyrozynazy, głównie do celów leczniczych i kosmetycznych.

1. TYROZYNAZA

Tyrozynaza (EC 1.14.18.1) produkowana przez melanocyty znajduje się w melanosomach. Ten metaloenzym zaliczany jest do oksydoreduktaz, posiada centrum aktywne składające się z cząsteczki tlenu (O₂) i dwóch atomów miedzi – Cu(A)

i Cu(B).^[6] Tyrozynaza zaangażowana jest w dwie reakcje katalityczne: utlenienie monofenoli do *o*-difenoli (aktywność monofenolazowa) oraz utlenienie *o*-difenoli do *o*-chinonów (aktywność difenolazowa). Oba te procesy są skutkiem wiązania atomów tlenu do atomów miedzi w centrum aktywnym enzymu.

Tyrozynaza jest szeroko rozpowszechniona w naturze, pomiędzy organizmami może różnić się strukturą, rozmiarem, ścieżką glikozylacji, sposobami aktywacji bądź dystrybucją między tkankami. Nie istnieje uniwersalna struktura tyrozynazy obecna we wszystkich organizmach, ale każda z nich posiada trzy domeny: N-kończową, C-kończową i centralną.^[7] Domena centralna jest zachowana we wszystkich typach tyrozynazy i zawiera dwa miejsca wiążące. Trzy reszty histydyny są zaangażowane w koordynację każdego z dwóch atomów miedzi.^[8,9] Trójwymiarowa struktura miejsca aktywnego została przedstawiona na Rysunku 2 na podstawie publikacji Zou i in.^[10]



Rysunek 2. Centrum aktywne tyrozynazy. Jony miedzi zostały oznaczone kolorem brązowym, atom tlenu - czerwonym^[10]

Figure 2. Active center of tyrosinase. Copper ions showed as brown spheres; oxygen atom showed as a red spheres^[10]

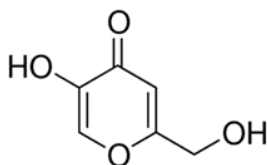
Tyrozynaza grzybowa z *Agaricus bisporus* (mTYR) jest najczęściej używanym rodzajem tyrozynazy podczas badań nad nowymi inhibitorami tego enzymu. Należy jednak podkreślić, że różnice strukturalne między mTYR a ludzką tyrozynazą (hTYR) powodują różną specyficzność substratową, i tylko część z dotychczas opisanych inhibitorów znalazło zastosowania kliniczne.^[11] Spowodowane jest to faktem, że badania wstępne zazwyczaj opierają się na inhibicji mTYR, a trudności z otrzymaniem wystarczających ilości hTYR nie pozwalają na przeprowadzenie pełnych eksperymentów z wykorzystaniem ludzkiego enzymu. Z tego samego powodu badania strukturalne i pełna charakterystyka struktury ludzkiej tyrozynazy wciąż jest utrudniona.^[12] Różnice między mTYR a hTYR są wciąż badane.^[13] Jednym z rozwiązań tego problemu może być wykorzystanie lizatów komórkowych do badań inhibicji tyrozynazy, a następnie takich samych komórek do badania inhibicji melanogenezy.

Należy również wspomnieć, że na przebarwienia skórne oprócz procesów biologicznych mają wpływ różne czynniki zewnętrzne – nadmierna ekspozycja na słońce, wcześniejsze uszkodzenia skóry, stany zapalne, palenie tytoniu, choroby nowotworowe i stres oksydacyjny. Niekontrolowany proces melanogenezy może prowadzić do nowotworu skóry, czerniaka. Warto więc pamiętać o stosowaniu kosmetyków z filtrem na co dzień. Problemy z przebarwieniami na skórze mogą być zmniejszone przez stosowanie kosmetyków i kosmeceutyków o właściwościach wybielających. Składniki aktywne w takich specyfikach to często kwas kojowy (KA) czy witamina C. W ostatnim czasie również peptydy i ich modyfikacje znalazły swoje zastosowanie jako inhibitory tyrozynazy. Przykłady takich związków zostaną omówione w dalszej części artykułu. Wśród produktów kosmeceutycznych oferowanych przez wiodących światowych producentów znaleźć można formułacje zawierające kwas kojowy i arbutynę, zarówno tę izolowaną ze źródeł naturalnych (takich jak mącznica lekarska czy borówka brusznica), jak i otrzymane glikozydowane pochodne tego związku.

2. KWAS KOJOWY

Kwas kojowy (KA, Rysunek 3) naturalny związek będący pochodną 4-pironu, odkryty w latach 80-tych ubiegłego wieku, produkowany jest przez liczne szczepy grzybów. Obecnie komercyjnie uzyskuje się go między innymi z grzybów gatunku *Aspergillus*, gdzie syntezowany jest na drodze enzymatycznej dehydratacji glukozy.^[14] Znany jest antybakteryjnych właściwości, których zebrany opis można odnaleźć w pracy Zilles i in.^[15] Ponadto znacząco poprawia cytotoksyczność względem komórek nowotworowych takich związków jak kwercytyna.^[16]

Kwas kojowy jest szeroko stosowany jako inhibitor tyrozynazy, charakteryzuje się on stosunkowo wysoką wartością IC_{50} (20 μ M), natomiast jego bezpieczne stężenie w aplikacjach skórnych nie powinno przekraczać 1%.^[17] Przeżywalność komórek w obecności 1, 10 i 100 ppm KA została określona odpowiednio na 91.75, 92.36 i 86.92%.^[18] Innym problemem związanym z kwasem kojowym jest jego stabilność i niska trwałość w gotowych preparatach. W związku z powyższym konieczne jest poszukiwanie nowych związków chemicznych o podobnych właściwościach wybielających, a jednocześnie wywołujących mniej skutków ubocznych niż KA.^[17] Jego koniugaty z aminokwasami i peptydami są dobrym przykładem rozwiązania tego problemu.



Rysunek 3. Struktura kwasu kojowego
Figure 3. Structure of kojic acid

3. PEPTYDY I ICH KONIUATY JAKO ZNANE INHIBITORY TYROZYNAZY

3.1. KONIUATY AMINOKWASOWE I PEPTYDOWE Z KWASEM KOJOWYM

W roku 2009 Noh i in. przebadali wpływ sprzężenia kwasu kojowego z aminokwasami na inhibicję tyrozynazy.^[19] 20 koniugatów o ogólnej strukturze KA-aa-NH₂ zostało zsyntezowanych i przetestowanych. Okazało się, że większość z nich cechowała się większą inhibicją mTYR niż sam KA. Co ważne, aminokwasy aromatyczne takie jak Phe, Trp, Tyr i His sprzężone z KA wykazały inhibicję mTYR na poziomie 90% w stężeniu 20 μM. Najaktywniejszy związek, KA-feniloalanina, wykazał wartość IC₅₀ równą 14.7 μM. Dodatkowo, została porównana stabilność KA-Phe-NH₂ względem KA. Właściwości anty mTYR spadły z 18% na 8% w ciągu 3 dni dla KA, podczas gdy pochodna z Phe utrzymała swoje właściwości nawet do trzech miesięcy po przechowywaniu jako roztwór wodny (20 μM) w 50°C.

Kwas kojowy w formie koniugatu z peptydami był opisany w literaturze głównie z uwagi na próby obniżenia wspomnianej cytotoxyczności tego związku. 22 koniugaty KA-tripeptyd w formie amidowej zostały zsyntezowane na drodze syntezy w fazie stałej.^[20] Te same związki w formie kwasowej dały takie same rezultaty pod względem inhibicji, i w każdym przypadku lepsze niż sam kwas kojowy. Koniugaty KA z tripeptydami były stabilne w testowanych warunkach i utrzymały właściwości inhibicyjne w trakcie przechowywania. Najlepsze rezultaty zarówno pod względem stabilności jak i aktywności otrzymano dla koniugatu KA-FWY.

W tym samym czasie zostały opublikowane inne wyniki gdzie KA-FWY okazał się być najlepszym z testowanych koniugatów KA, dając 100-krotnie lepszą aktywność wobec mTYR niż KA (Tabela 1).^[18] Dodatkowo zostały przebadane stabilność i cytotoxyczność tych związków. Jak poprzednio, KA tripeptydy były związkami stabilnymi przez ponad 15 dni, a kwas kojowy utracił znacząco swoje właściwości już po jednym dniu. Bardzo istotnym rezultatem zastosowania koniugatów kwasu kojowego z peptydami jest fakt, że w stężeniu aż do 100 ppm związki te nie dawały żadnych zmian w przeżywalności komórek.

Tabela 1. Koniugaty tripeptydów z kwasem kojowym jako inhibitory mTYR. Wyniki z prac Kim i in.^[18] oraz Noh i in.^[20]

Table 1. Tripeptide-kojic acid conjugates as the inhibitors of mTyr. Results from publications Kim et al.^[18] And Noh et al.^[20]

Związek	IC50 (μM)
KA	22.94
KA-Phe-Trp-Tyr	0.24
KA-Phe-Phe-Tyr	0.33
KA-Phe-Tyr-Tyr	0.39
KA-Trp-Trp-Tyr	0.78
KA-Phe-Trp-Asp	2.13
KA-Phe-Trp-Ile	2.18
KA-Phe-Trp-Phe	4.48
KA-Phe-Trp-Trp	6.17

Kolejnymi wynikami potwierdzającymi znaczenie peptydów w inhibicji tyrozynazy jest ich przykład sprzężenia z mimosyną, znanym inhibitorem tego enzymu.^[21] Również w tym przypadku koniugaty mimosyna-FFY, -FYF czy -FWY dały najlepsze rezultaty wśród testowanych związków (IC₅₀ w μM, odpowiednio: 5.6, 6.1, 7.4).

3.2. PEPTYDY

Łańcuchy peptydowe bez modyfikacji również okazały się być dobrymi inhibitorami tyrozynazy. Mimo, że wyniki aktywności samych peptydów nie zawsze były satysfakcjonujące, szerokie badania w tym temacie pozwoliły dostrzec pewne zależności użyteczne podczas projektowania nowych inhibitorów. Z badań przedstawionych w poprzednim podrozdziale wywnioskować można, że preferowane reszty aminokwasowe powinny mieć właściwości aromatyczne i hydrofobowe (Phe, Trp, Tyr), a tyrozyna powinna znajdować się na C-końcu łańcucha peptydowego.

Jednym z pierwszych doniesień dotyczących peptydów jako inhibitorów tyrozynazy są publikacje z lat 90., gdzie były opisane peptydy cykliczne z bakterii *Lactobacillus helveticus* oraz korzeni *Pseudostellaria heterophylla*.^[22,23] Wartości inhibicji tych związków były jednak bardzo wysokie i w dzisiejszych czasach nie mogą być związkami referencyjnymi.

Z uwagi na obecność atomów miedzi w centrum aktywnym tyrozynazy, wiele badań skupiło się na roli reszty cysteiny w dłuższych sekwencjach peptydowych.^[24] Nie mniej

jednak, obecność C-końcowej Tyr była niezbędna dla aktywności uzyskanych związków. Kolejne badania nad dipeptydami Cys-aminokwas i aminokwas-Cys wykazały, że reszta cysteiny na N-końcu sekwencji okazała się być kluczowa, a potwierdzają to wyniki zebrane w Tabeli 2.^[25] Analog Cys-Cys wykazał wartość IC_{50} równą 3.2 μ M.

Tabela 2. Peptydy zawierające resztę Cys jako inhibitory mTYR.^[25]

Table 2. Cys-containing peptides as mTYR inhibitors^[25]

DIPEPTYD (H-aa1-aa2-OH)	IC_{50} (μ M)	DIPEPTYD (ODWRÓCONA SEKWENCJA) (H-aa2-aa1-OH)	IC_{50} (μ M)
Cys-Glu	2.0	Glu-Cys	140.1
Cys-Phe	2.7	Phe-Cys	7.9
Cys-Tyr	3.1	Tyr-Cys	131.6
Cys-Gln	3.5	Gln-Cys	5.9
Cys-Ile	4.0	Ile-Cys	4.5
Cys-Ser	4.5	Ser-Cys	28.3
Cys-Met	4.9	Met-Cys	10.7
Cys-Trp	5.4	Trp-Cys	47.3
Cys-Gly	5.9	Gly-Cys	24.6
Cys-Lys	5.9	Lys-Cys	39.9
Cys-Leu	8.0	Leu-Cys	14.5
Cys-Arg	8.0	Arg-Cys	32.3
Cys-Val	8.2	Val-Cys	8.3
Cys-Thr	8.2	Thr-Cys	44.0
Cys-Ala	9.6	Ala-Cys	62.2
Cys-His	10.7	His-Cys	20.0
Cys-Asp	14.1	Asp-Cys	56.1
Cys-Asn	22.6	Asn-Cys	5.3
Cys-Pro	55.8	Pro-Cys	20.3

Innym przykładem sekwencji zawierającej resztę cysteiny jest niedawno opisany pentapeptyd *EF-5*: ECGYF.^[26] Związek ten miał zdolność do wychwytu wolnych rodników i inhibicji tyrozynazy (IC_{50} : 460 μ M). Dokowanie molekularne wykazało, że wiązanie peptydu *EF-5* do tyrozynazy stabilizowane jest głównie przez oddziaływania wodorowe i hydrofobowe. Co ważne, po raz kolejny peptyd okazał się być nietoksyczny dla komórek.

Jedenaście różnych tripeptydów zostało przebadanych jako inhibitory tyrozynazy na potrzeby publikacji Hsiao i in., a wśród nich sekwencja z resztą cysteiny wykazała największą aktywność (Tabela 3).^[24] Porównując wyniki dla peptydu FFY z przedstawionymi wcześniej danymi (KA-FFY) można wywnioskować, że koniugacja

peptydów z kwasem kojowym jest dobrym rozwiązaniem (IC_{50} 241.1 μ M dla peptydu *versus* 0.33 μ M dla koniugatu).

Tabela 3. Tripeptydy przebadane jako inhibitory tyrozynazy pracy Hsiao i współautorów^[24]

Table 3. Tripeptides tested as tyrosinase inhibitors by Hsiao et al.

Peptyd (H-aa ₁ -aa ₂ -aa ₃ -OH)	IC ₅₀ (μ M)
Arg-Cys-Tyr	6.16
Cys-Arg-Tyr	127.5
Phe-Phe-Tyr	241.1
Arg-Trp-Tyr	397.8
Lys-Phe-Tyr	564.9
Lys-Asn-Tyr	719.3
Asn-Phe-Tyr	761.2
Lys-Asp-Tyr	800.5
Lys-Val-Tyr	841.9
Val-Phe-Tyr	1143.0
Lys-Lys-Tyr	1512.4

Peptydy do zastosowań w kosmeceutyce posiadające właściwości anty-mTYR mogą być otrzymane również poprzez modyfikacje dotychczas poznanych sekwencji. Przykładem jest dodanie *D*-tyrozyny na końcu peptydów o znanych właściwościach, np. GHK i GEKG.^[27] Otrzymuje się w ten sposób bifunkcyjne sekwencje, obniżające syntezę melanin w komórkach i wykazujące właściwości przeciwwzapalne.^[28] Zostało udowodnione, że *D*-tyrozyna (w przeciwieństwie do *L*-tyrozyny) obniża ilość melanin w melanocytach.^[29]

4. PODSUMOWANIE

Peptydy i peptydomimetyki oraz koniugaty peptydowe mają szerokie zastosowanie w przemyśle kosmeceutycznym.^{[27],[30,31]} Same w sobie mogą wykazywać bioaktywność bądź podwyższać stabilność i/lub efektywność skoniugowanej cząsteczki o już udowodnionym działaniu. W przypadku koniugatów, peptydy obniżają cytotoksyczność cząsteczki sprzężonej z łańcuchem peptydowym.

Podsumowując, podczas projektowania nowych inhibitorów tyrozynazy opartych na sekwencji peptydowej, należy mieć na uwadze niniejsze wskazówki:

- Sekwencja peptydowa powinna być raczej krótka – od dwóch do pięciu reszt aminokwasowych,
- Reszta tyrozyny powinna być zlokalizowana na C-końcu łańcucha,
- Nie ma różnicy w aktywności peptydów z amidowym i kwasowym C-końcem,

- d. Sekwencje zawierające reszty cysteiny i aminokwasów aromatycznych, z uwagi na zdolności chelatujące cysteiny i formowanie oddziaływań hydrofobowych przez fenyloalaninę, tyrozynę i tryptofan, wykazują największe wartości inhibicji tyrozynazy,
- e. Peptydy bez modyfikacji strukturalnych zazwyczaj okazywały się być inhibitorami o umiarkowanej aktywności, z wartością IC_{50} około 100 μ M. Wiele prób koniugacji takich peptydów z dotychczas poznanymi, niskocząsteczkowymi inhibitorami tyrozynazy przyniosło korzystny efekt.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, projektowanie i synteza nowych inhibitorów tyrozynazy powinny skupiać się na połączeniu krótkich sekwencji peptydowych z nowymi bądź dotychczas poznanymi skutecznymi inhibitorami tego enzymu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. d'Ischia, K. Wakamatsu, F. Cicoira, E. Di Mauro, J. C. Garcia-Borron, S. Commo, I. Galván, G. Ghanem, K. Kenzo, P. Meredith, A. Pezzella, C. Santato, T. Sarna, J. D. Simon, L. Zecca, F. A. Zucca, A. Napolitano, S. Ito, *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015, **28**, 520.
- [2] K. Hałdys, W. Goldeman, N. Anger-Góra, J. Rossowska, R. Latajka, *Pharmaceuticals* 2021, **14**, 1.
- [3] H. S. Raper, *Biochem. J.* 1927, **21**, 89.
- [4] G. Prota, *Med. Res. Rev.* 1988, **8**, 525.
- [5] A.-Y. Lee, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**, 3727.
- [6] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, M. Schurink, C. G. Boeriu, H. Wichers, B. W. Dijkstra, *Acta Crystallogr. Sect. F, Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2011, **67**, 575.
- [7] M. Kanteev, M. Goldfeder, A. Fishman, *Protein Sci.* 2015, **24**, 1360.
- [8] M. P. Jackman, A. Hajnal, K. Lerch, *Biochem. J.* 1991, **274**, 707.
- [9] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wichers, B. W. Dijkstra, *Biochemistry* 2011, **50**, 5477.
- [10] C. Zou, W. Huang, G. Zhao, X. Wan, X. Hu, Y. Jin, J. Li, J. Liu, *Molecules* 2017, **22**, 1836.
- [11] T. Mann, W. Gerwat, J. Batzer, K. Eggers, C. Scherner, H. Wenck, F. Stüb, V. J. Hearing, K.-H. Röhm, L. Kolbe, *J. Invest. Dermatol.* 2018, **138**, 1601.
- [12] V. J. Hearing, T. M. Ekel, P. M. Montague, J. M. Nicholson, *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.* 1980, **611**, 251.
- [13] T. Oyama, A. Yoshimori, H. Ogawa, Y. Shirai, H. Abe, T. Kamiya, S. Tanuma, *J. Mol. Struct.* 2023, **1272**, 134180.
- [14] R. Bentley, *Nat. Prod. Rep.* 2006, **23**, 1046.
- [15] J. C. Zilles, F. L. dos Santos, I. C. Kulkamp-Guerreiro, R. V. Contri, *Exp. Dermatol.* 2022, **31**, 1500.
- [16] M. Veverka, T. Dubaj, J. Gallovič, V. Jorík, E. Veverková, M. Danihelová, P. Šimon, *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* 2015, **146**, 99.
- [17] C. L. Burnett, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. C. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Andersen, *Int. J. Toxicol.* 2010, **29**, 244S.
- [18] H. Kim, J. Choi, J. K. Cho, S. Y. Kim, Y.-S. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, **14**, 2843.
- [19] J.-M. Noh, S.-Y. Kwak, H.-S. Seo, J.-H. Seo, B.-G. Kim, Y.-S. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, **19**, 5586.
- [20] J.-M. Noh, S.-Y. Kwak, D.-H. Kim, Y.-S. Lee, *Pept. Sci.* 2007, **88**, 300.

- [21] A. Upadhyay, J. Chompoo, N. Taira, M. Fukuta, S. Gima, S. Tawata, *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 12858.
- [22] H. Kawagishi, A. Somoto, J. Kuranari, A. Kimura, S. Chiba, *Tetrahedron Lett.* 1993, **34**, 3439.
- [23] H. Morita, T. Kayashita, H. Kobata, A. Gonda, K. Takeya, H. Itokawa, *Tetrahedron* 1994, **50**, 6797.
- [24] N.-W. Hsiao, T.-S. Tseng, Y.-C. Lee, W.-C. Chen, H.-H. Lin, Y.-R. Chen, Y.-T. Wang, H.-J. Hsu, K.-C. Tsai, *J. Chem. Inf. Model.* 2014, **54**, 3099.
- [25] T.-S. Tseng, K.-C. Tsai, W.-C. Chen, Y.-T. Wang, Y.-C. Lee, C.-K. Lu, M.-J. Don, C.-Y. Chang, C.-H. Lee, H.-H. Lin, H.-J. Hsu, N.-W. Hsiao, *J. Agric. Food Chem.* 2015, **63**, 6181.
- [26] Z. Shen, Y. Wang, Z. Guo, T. Tan, Y. Zhang, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2019, **34**, 1633.
- [27] F. Errante, P. Ledwoń, R. Latajka, P. Rovero, A. M. Papini, *Front. Chem.* 2020, **8**, 572923.
- [28] J. Park, H. Jung, B. Jang, H.-K. Song, I.-O. Han, E.-S. Oh, *Sci. Rep.* 2020, **10**, 262.
- [29] J. Park, H. Jung, K. Kim, K.-M. Lim, J. Kim, E. Jho, E.-S. Oh, *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018, **31**, 374.
- [30] P. Ledwoń, F. Errante, A. M. Papini, P. Rovero, R. Latajka, *Chem. Biodivers.* 2021, **18**, e2000833.
- [31] P. Ledwoń, A. M. Papini, P. Rovero, R. Latajka, *Materials (Basel)*. 2021, **14**, 3217.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 lutego 2023 r.

PROCES SAMO-DYSPROPORCJONOWANIA ENANCJOMERÓW PODCZAS CHROMATOGRAFII KOLUMNOWEJ

SELF-DISPROPORTIONATION OF ENANTIOMERS VIA COLUMN CHROMATOGRAPHY

**Alicja Wzorek^{1,*}, Magdalena Kwiatkowska¹,
Mariusz Urbaniak¹, Barbara Gawdzik¹**

*¹Instytut Chemii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach,
ul. Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce
e-mail: awzorek@ujk.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Podstawy teoretyczne SDE

1.1. Definicja i terminologia stosowana w badaniach SDE

1.2. Podstawy fizykochemiczne SDE w warunkach chromatograficznych

2. Proces SDE towarzyszący chromatografii kolumnowej amidów

2.1. Pochodne 1-feniloetyloaminy

2.2. Pochodne α -aminokwasów

2.3. Pochodne β -aminokwasów

3. Proces SDE z udziałem związków z centrum stereogennym na atomie siarki

4. Proces SDE z udziałem związków chiralnych osiowo, pochodnych chinazolinonu

5. Badania SDE z udziałem flurbiprofenu

6. Przykłady praktycznego zastosowania SDE

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Alicja Wzorek, prof. UJK uzyskała stopień doktora w dyscyplinie chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w 2009 roku. Stopień doktora habilitowanego uzyskała w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi w 2019 roku. Zainteresowania naukowe skupiają się na syntezie związków makrocyklicznych i aktywnych biologicznie, reakcjach z zastosowaniem biokatalizatorów i metodach enancjomerycznego wzbogacania związków chiralnych w warunkach achiralnych.



<https://orcid.org/0000-0001-9041-7034>

Dr Magdalena Kwiatkowska, stopień naukowy doktora uzyskała na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, broniąc dysertację pt. „Stereochemiczne i kinetyczne studia [2+4] cykloaddycji cyklopentadienu ze sprzężonymi nitroalkenami”, której promotorem był prof. dr hab. inż. Andrzej Barański. Jej zainteresowania naukowe skupiają się na mechanistycznych aspektach reakcji pericyklicznych, enancjomerycznym wzbogacaniu związków chiralnych oraz syntezie związków aktywnych biologicznie.



<https://orcid.org/0000-0003-4961-6634>

Dr hab. Mariusz Urbaniak, prof. UJK pracę w Instytucie Chemii w Kielcach rozpoczął pod kierownictwem prof. Krystyny Rotkiewicz. Stopień naukowy doktora w zakresie chemii fizycznej połączeń supramolekularnych uzyskał w 2002 r. na Uniwersytecie Jagiellońskim. Stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych uzyskał w roku 2018 na Uniwersytecie Opolskim. Jego zainteresowania naukowe obejmują syntezę związków biologicznie czynnych, supramolekuł i ich kompleksów oraz spektroskopię i spektrometrię mas.



<https://orcid.org/0000-0002-3179-542X>

Dr hab. inż. Barbara Gawdzik, prof. UJK zatrudniona jako profesor w Instytucie Chemii Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Specjalizuje się w syntezie i modyfikacjach strukturalnych różnych klas związków organicznych zawierających w swej strukturze układy hetero- i makrocykliczne o potencjalnych właściwościach biologicznych.



<https://orcid.org/0000-002-4355-7381>

ABSTRACT

The review is devoted to self-disproportionation of enantiomers (SDE) phenomenon which has been observed for many different classes of chiral organic compounds. The SDE phenomenon occurs when the fractionation of an enantioenriched sample due the application of a physicochemical process under achiral conditions results in the variation of the proportion of the enantiomers present across the fractions, though the overall composition in terms of the sample ee remains unchanged. The SDE process can be considered in terms of separating the excess enantiomer from the racemate. The basic terminology related to SDE was described. The formation of the SDE under chromatographic conditions is the result of an association process occurring in a solution of a chiral, non-racemic compound. Information on preferred interactions leading to homo-/heterochiral supramolecules can be provided by quantum chemical calculations, NMR spectroscopy and comparison of crystal structures of the racemic and enantiomeric crystals.

Several examples of the chromatographic experiments with different classes of compounds were given in two purposes 1) to highlight the possibility of application SDE during column chromatography as the method for enantiopurification of the chiral, non-racemic compounds; 2) to demonstrate that a standard workup (chromatographic purification, evaporation) can alter the stereochemical outcome of asymmetric reactions.

Keywords: chirality, chromatography, association, enantiomeric enrichment, intermolecular interactions

Słowa kluczowe: chiralność, chromatografia, asocjacja, enancjomeryczne wzbogacanie, oddziaływania międzycząsteczkowe

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

SDE	– samo-dysproporcjonowanie enancjomerów
ee	– nadmiar enancjomeryczny
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy
DFT	– teoria funkcjonału gęstości (ang. <i>Density Functional Theory</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
MPLC	– średniociśnieniowa chromatografia cieczowa
MTBE	– eter <i>tert</i> -butylowo metylowy
R _f	– współczynnik retencji
MPS	– sulfotlenek <i>n</i> -pentylowo metylowy
AcOEt	– octan etylu
GABA	– kwas gamma-aminomasłowy
PBD	– pirolo[2,1- <i>c</i>][1,4]benzodiazepina
NLPZ	– niesteroidowy lek przeciwzapalny
CDCl ₃	– deuterowany chloroform
ESI	– jonizacja przez elektrorozpylanie (ang. <i>Electrospray Ionisation</i>)
Bn	– grupa benzyłowa
Gly	– glicyna
Cbz	– grupa benzyloksykarbonyłowa

WPROWADZENIE

Pozyskiwanie enancjomerycznie czystych związków odgrywa kluczową rolę w chemii, medycynie i farmacji, a także w wielu gałęziach przemysłu, m.in. kosmetycznym i agrochemicznym. Enancjomery danego związku wykazują identyczne właściwości fizykochemiczne w warunkach achiralnych, jednakże zmieniają się one diametralnie w warunkach chiralnych, w których przykładowo mogą wykazywać różnice w szybkości reakcji asymetrycznej, a także we właściwościach biologicznych. W ostatnich latach nastąpił duży postęp w rozwoju reakcji asymetrycznych związanych z zastosowaniem efektywnych katalizatorów, jednak w wielu przypadkach w dalszym ciągu niezbędny jest etap enancjomerycznego wzbogacania powstających związków chiralnych. Jak dotąd, jedyną wciąż stosowaną metodą pozostaje krystalizacja i chromatografia z zastosowaniem chiralnych faz stacjonarnych. Istotnym ograniczeniem krystalizacji jest możliwość zastosowania jej tylko dla związków stałych, przy czym dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, jeśli w ogóle możliwy, często jest procesem czasochłonnym. Z tego też względu możliwość zastosowania zjawiska samo-dysproporcjonowania enancjomerów (ang. self-disproportionation of enantiomers, SDE) towarzyszącego standardowej, achiralnej chromatografii kolumnowej do enancjomerycznego wzbogacania związków chiralnych może mieć duże znaczenie praktyczne, jako prosta metoda laboratoryjna, niewymagająca dużych nakładów finansowych. Kolejnym ważnym aspektem badań nad zjawiskiem SDE jest wyjaśnienie mechanizmu jego powstawania. Jest to o tyle znaczące, że zjawisko to jest rozpatrywane jako jeden z możliwych mechanizmów powstawania homochiralności, a zatem ma związek z powstaniem życia na Ziemi.[1–4]

1. PODSTAWY TEORETYCZNE SDE

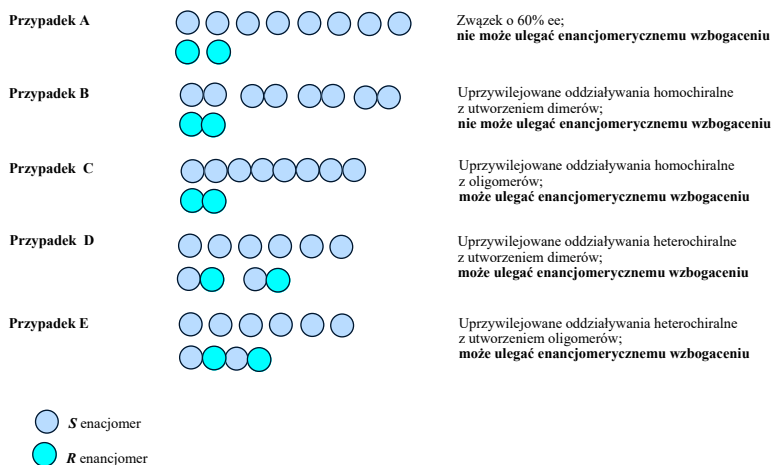
1.1. DEFINICJA I TERMINOLOGIA STOSOWANA W BADANIACH SDE

Proces samo-dysproporcjonowania (SDE) może być obserwowany dla związków chiralnych w postaci nieracemicznej ($0\% < ee < 99,9\%$) podczas przemian fizykochemicznych, takich jak krystalizacja, sublimacja, destylacja, jak również może towarzyszyć chromatografii kolumnowej. Polega on na spontanicznym podziale związku na co najmniej dwie frakcje, które różnią się proporcją enancjomerów w porównaniu z wyjściowym składem enancjomerycznym próbki.[5–7] Należy podkreślić, że proces SDE zachodzi w achiralnych warunkach i nie dotyczy sytuacji rozdziału enancjomerów, dotyczy sytuacji odseparowania nadmiarowego enancjomeru od racematu. Przykładowo dysponujemy próbką związku chiralnego o masie 100 mg z 60% nadmiarem enancjomerycznym. Oznacza to, że próbka zawiera 60 mg pojedynczego enancjomeru i 40 mg racematu, a zatem tylko 60 mg

Badania nad efektem SDE z udziałem innych klas związków trwają i jest wysoce prawdopodobne, że inne wiązania/ugrupowania wiązań będą zaliczone do grup SDE-forycznych. Dodatkowym celem wprowadzenia pojęcia grup SDE-forycznych było zachęcenie naukowców do przeprowadzania testów na obecność SDE zwłaszcza tam, gdzie produkty reakcji asymetrycznych są oczyszczane za pomocą achiralnej chromatografii kolumnowej, tak aby mieć pewność, że efekt SDE nie miał wpływu na końcowy stereochemiczny wynik reakcji.[10, 11]

1.2. PODSTAWY FIZYKOCHEMICZNE SDE W WARUNACH CHROMATOGRAFICZNYCH

Podstawą występowania zjawiska SDE w warunkach chromatograficznych jest tworzenie w roztworze homo-/hetero-chiralnych supramolekularnych struktur poprzez wiązania międzycząsteczkowe, takie jak silne wiązanie wodorowe, halogenowe, oddziaływania dipolowe, a także słabsze oddziaływania typu van der Waalsa lub $\pi-\pi$. Możliwości takich oddziaływań prowadzące do asocjatyw o różnej rzędowości w roztworze chiralnego związku o nadmiarze enancjometrycznym 60% przedstawione są na rysunku 3.[12]

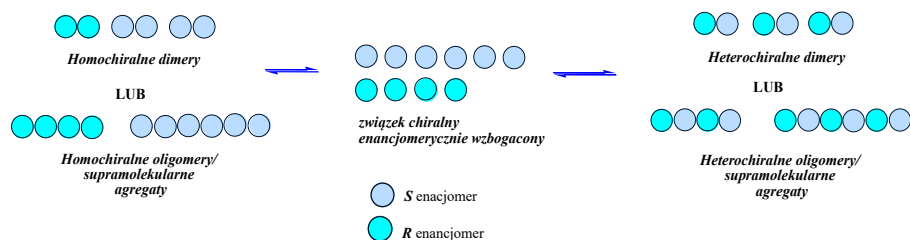


Rysunek 3. Możliwości oddziaływań w roztworze związku chiralnego, nieracemicznego o 60% ee
 Figure 3. Possibilities for the interactions in solution of chiral, non-racemic compound of 60% ee

Przypadek A dotyczy sytuacji, gdy cząsteczki nie oddziałują ze sobą w roztworze, proces ich asocjacji nie następuje i w związku z tym enancjometryczne wzbogacenie na drodze chromatografii kolumnowej nie może mieć miejsca.

Przypadek B przedstawia sytuację, w której preferowane jest tworzenie wiązań homochiralnych z wytworzeniem homochiralnych dimerów. Powstałe homochiralne dimery nie różnią się masą, w związku z tym nie mogą ulec enancjomerycznemu wzbogaceniu. W kolejnym modelu (Przypadek C) uprzywilejowane są również oddziaływania homochiralne, ale z wytworzeniem wyżej rzędowych oligomerów. Oligomery te różnią się masą cząsteczkową, a zatem mieszanina taka może ulec enancjomerycznemu wzbogaceniu. Przypadki D i E przedstawiają sytuację, w której cząsteczki oddziałują ze sobą poprzez uprzywilejowane wiązania heterochiralne z utworzeniem odpowiednio dimerów lub wyżej rzędowych oligomerów. W obu przypadkach powstają asocjaty, które różnią się masą i mogą ulegać enancjomerycznemu wzbogaceniu w warunkach chromatograficznych.[12]

W warunkach rzeczywistych mamy do czynienia z równowagą dynamiczną pomiędzy monomerami i strukturami wyżej rzędowymi: hetero-/homo-chiralnymi dimerami i oligomerami w zależności od trwałości wytworzonych oddziaływań i asocjatów (Rysunek 4).



Rysunek 4. Równowaga dynamiczna w roztworze związku chiralnego, nieracemicznego
 Figure 4. Dynamic equilibrium in the solution of chiral, non-racemic compound

W konsekwencji procesu asocjacji w warunkach chromatograficznych możemy otrzymać frakcje, które różnią się proporcją enancjomerów. W przypadku chromatografii HPLC i MPLC możliwe jest uzyskanie chromatogramów z wyraźną granicą pomiędzy frakcją enancjomerycznie czystą i frakcją racemiczną, natomiast w przypadku chromatografii flash i napędzanej grawitacyjnie otrzymanie frakcji enancjomerycznie czystej jest nadal możliwe, jednak z mniejszą wydajnością, ponadto zmiany nadmiaru enancjomerycznego w poszczególnych frakcjach są stopniowe.[13]

Proces asocjacji jest również obecny w roztworze racemicznym, który prowadzi również do ustalenia równowagi dynamicznej. W tym jednak przypadku bez względu na to jakie oddziaływania są preferowane, powstają tożsame pod względem masy

asocjaty i w warunkach achiralnych (bez obecności zewnętrznej chiralności np. w postaci chiralnego pomocnika) rozdział nie jest możliwy.[5]

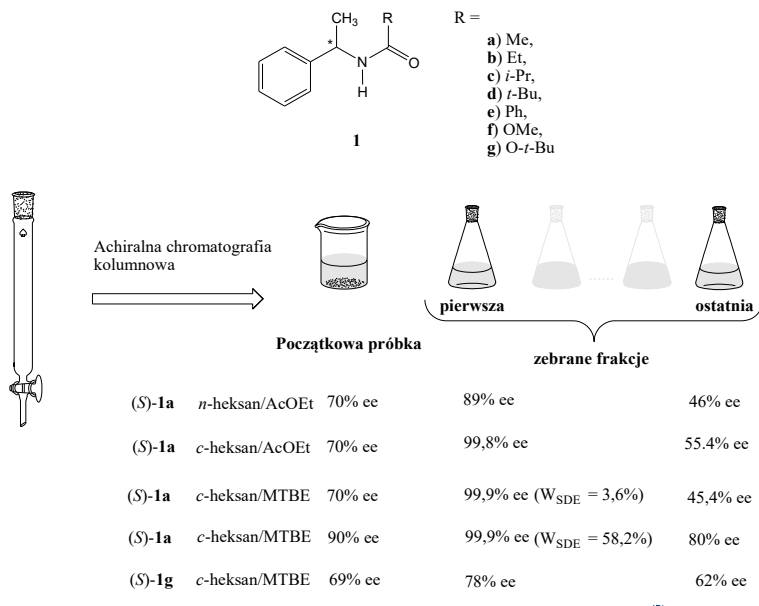
Jak do tej pory nie ma odpowiednich narzędzi, które pozwoliłyby na jednoznaczne określenie, jakie oddziaływania i jakiej rzędowości asocjaty powstają w roztworze chiralnego związku w postaci nieracemicznej. Pewnych informacji może dostarczyć porównanie sieci krystalicznych obu form enancjomerycznie czystej i racemicznej danego związku chiralnego. Dodatkowo za pomocą obliczeń kwantowo-chemicznych metodą DFT, można porównać trwałość homo- i heterochiralnych asocjatów. Tworzenie asocjatów w roztworach związków chiralnych, w postaci nieracemicznej dla wybranych związków potwierdzono za pomocą spektroskopii NMR.[14–16]

2. PROCES SDE TOWARZYSZĄCY CHROMATOGRAFII KOLUMNOWEJ AMIDÓW

2.1. POCHODNE 1-FENYLOETYLOAMINY

Związki zawierające wiązanie amidowe w swojej strukturze mogą tworzyć supramolekularne asocjaty z wykorzystaniem wiązania wodorowego pomiędzy silnie elektroujemnym atomem tlenu i atomem wodoru związanym z atomem azotu. Dodatkowo wprowadzając podstawniki o różnym charakterze w obrębie grupy amidowej można sterować mocą tego wiązania tak, aby wzmacniać lub osłabiać proces asocjacji, a co za tym idzie wielkość SDE. Nic więc dziwnego, że pierwsze doniesienie literaturowe na temat SDE towarzyszące achiralnej, napędzanej grawitacyjnie chromatografii kolumnowej dotyczyło związków amidowych i pochodzi z 1984 roku.[17]

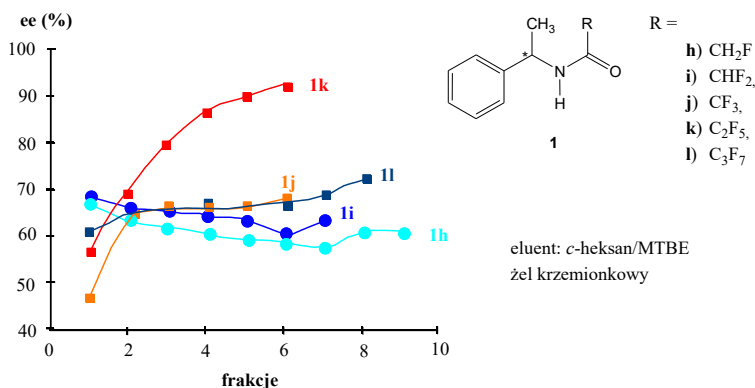
Na rysunku 5 przedstawiona jest struktura amidów **1** otrzymanych w wyniku reakcji acylowania 1-fenylloetyloaminy, zawierające podstawniki w grupie acylowej o różnym zatłoczeniu przestrzennym **1a-e** jak również podstawniki o różnych efektach elektronowych **1f-g**. Amidy te zastosowano jako związki modelowe w badaniach nad efektem SDE na drodze klasycznej chromatografii kolumnowej.[9, 18]

Rysunek 5. Chromatografia kolumnowa z udziałem amidów **1a-g**Figure 5. Column chromatography with amides **1a-g**

Podczas standardowej chromatografii na żelu krzemionkowym związek **1a** ulegał procesowi SDE w każdym zastosowanym eluencie, tak dobranym aby współczynnik retencji R_f miał porównywalną wartość ok. 0,2.[9] Na rysunku 5 przedstawiono wybrane wyniki. Proces asocjacji był najbardziej efektywny w mieszaninie *c*-heksan/MTBE. Już podczas chromatografii próbki **1a** z 70% ee otrzymano enancjomerycznie czystą frakcję z wydajnością 3,6%. Gdy przeprowadzono analogiczny eksperyment dla amidu **1a** z 90% ee otrzymano enancjomerycznie czystą frakcję z 58,2% wydajnością. Zaprezentowane przykłady potwierdzają, że dla niektórych związków towarzyszący chromatografii kolumnowej efekt SDE może być metodą enancjomerycznego wzbogacania.[18] W przypadku pozostałych amidów obecność rozbudowanych sterycznie podstawników w grupie acylowej redukowała proces asocjacji i efekt SDE, niemniej jednak cały czas efekt ten był obecny.[9]

Interesujące wyniki otrzymano podczas chromatografii amidów zawierających atomy fluoru w grupie acylowej.[19] Obecność silnie elektrododatnich atomów fluoru może zwiększać oddziaływania międzycząsteczkowe, jak również może się przyczyniać do zaburzania tego procesu.

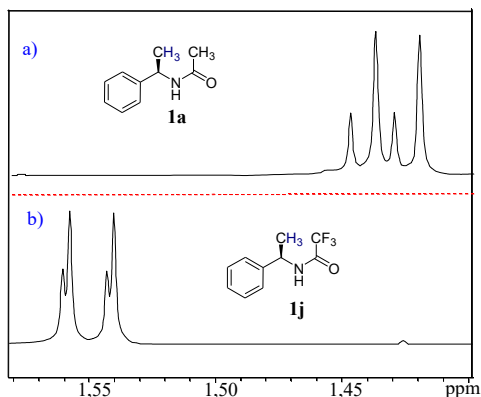
Obecność jednego lub dwóch atomów fluoru w grupie acylowej zaburzyło proces asocjacji w warunkach chromatograficznych i spowodowało znaczącą redukcję obserwowanego efektu SDE podczas chromatografii kolumnowej w najbardziej optymalnych warunkach dla amidu **1a**, wartość Δe_e wyniosła jedynie 9,8 dla **1h** i 8,0 dla **1i**. Tak jak w przypadku chromatografii amidu **1a** również w przypadku eksperymentów z amidami **1h** i **1i** otrzymano ten sam profil elucji, tzn. frakcje enancjomerycznie wzbogacone były wmywane jako pierwsze, świadczy to o tym samym sposobie asocjacji (Rysunek 6).



Rysunek 6. Profile elucji fluoro-amidów **1h-l**
Figure 6. Elution profiles for fluorine-amides **1h-l**

W przypadku amidów zawierających grupy perfluoroalkilowe **1j,k,l**, otrzymane profile elucyjne były przeciwne do profilu elucji związku modelowego **1a**. Oznacza to, że w przypadku amidów z grupami perfluoroalkilowymi zmienia się sposób asocjacji cząsteczek w roztworze. Cząsteczki muszą przyjąć takie ułożenie, aby silnie elektroujemne grupy perfluoroalkilowe były oddalone od siebie tak, aby nie występowały odpychające oddziaływania destabilizujące supramolekularny twór.[19]

Porównując wyniki chromatografii kolumnowej amidu **1a** i jego fluorowego analogu **1j**, zawierającego grupę CF_3 – zaobserwowano spadek wielkości obserwowanego efektu SDE. Jak wspomniano powyżej efekt asocjacji ma miejsce również podczas spektroskopii NMR i objawia się pojawieniem dwóch sygnałów dla tego samego jądra. Na rysunku 7 przedstawione są fragmenty widm protonowego rezonansu jądrowego z sygnałami pochodzącymi od protonów grupy CH_3 – w pozycji benzylowej w amidach: **1a** i **1j**. [20]



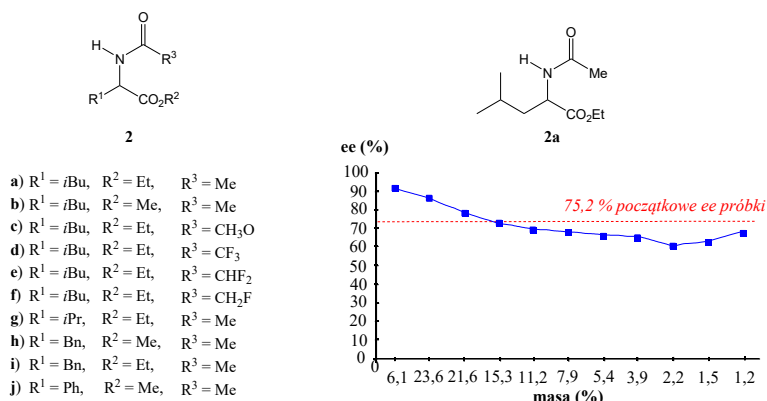
Rysunek 7. Fragment widm ^1H NMR dla amidów **1a** i **1j** z sygnałami dla grupy CH_3 – w pozycji benzylowej
Figure 7. Part of the ^1H NMR spectra of amides **1a** and **1j** with signals for CH_3 – group in the benzylo position

Zmniejszenie separacji sygnałów w przypadku amidu **1j** jest również obserwowane na widmie ^1H NMR. Może to być wynikiem znacznego przesunięcia równowagi w kierunku pojedynczych cząsteczek lub zmiany preferencji między asocjatami homo- i heterochiralnymi. Obliczenia kwantowo-chemiczne metodą DFT przeprowadzone dla dimerów homo- i heterochiralnych amidu **1a** wykazały, że w przypadku tego związku dimery heterochiralne są trwalsze od dimerów homochiralnych.[18]

Najsilniejszym efektem SDE w grupie perfluoroamidów charakteryzował się amid **1k**, zawierający grupę $-\text{CF}_2\text{CF}_3$. W chromatograficznym eksperymencie amidu **1k** (68% ee, 80 mg) w polarnym eluencie *c*-heksan/MTBE (4 :1) dla którego R_f wynosił 0,6 otrzymano dwie frakcje: frakcja pierwsza zawierała 62 mg amidu **1k** z 65% ee; frakcja druga: 13 mg amidu z 82% ee.

2.2. POCHODNE α -AMINOKWASÓW

Analogiczne badania przeprowadzono dla estrów metylowych i etylowych *N*-acylowanych α -aminokwasów **2**.

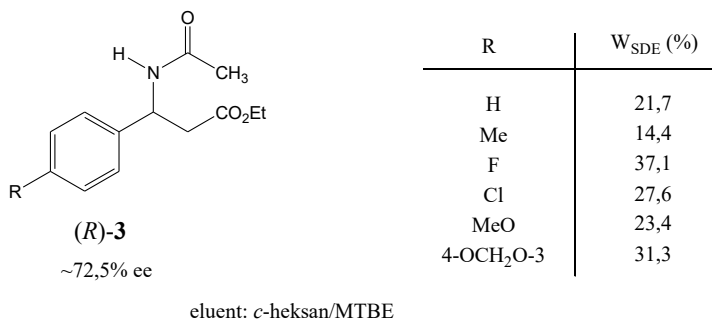
Rysunek 8. Struktura estrów N-acylowych α -aminokwasów i profil elucji związku **2a**Figure 8. Structure of esters of N- acetylated α -amino acids and elution profile of **2a**

W przypadku tej grupy pochodnych amidowych stwierdzono, że ulegają one SDE w każdym zastosowanych warunkach chromatograficznych, jednak rzadko możliwe jest otrzymanie enancjomerycznie czystej frakcji. Obecność grupy estrowej jako dodatkowej grupy funkcyjnej wpływa na proces asocjacji. Na rysunku 8 przedstawiono przykładowy profil elucji otrzymany dla chromatografii kolumnowej z udziałem estru etylowego N-acetylo-L-leucyny **2a** na żelu krzemionkowym jako fazie stacjonarnej i mieszaninie *n*-heksan/AcOEt jako eluencie. Podobnie jak w przypadku pochodnych fluorowych 1-feniloetyloaminy **1h–j** obecność atomów fluoru zaburza proces asocjacji i zmniejsza wielkość obserwowanego SDE. Dla pochodnej **2d**, zawierającej grupę CF₃C(O)– parametr Δee wyniósł $-3,1$, z wyraźnie odwróconym profilem elucji w porównaniu do analogu CH₃C(O)– **2a**. Dla tych dwóch amidów przeprowadzono optymalizację homo-/hetero- chiralnych dimerów metodą DFT. W przypadku związku **2a** to dimer heterochiralny jest trwalszy od dimeru homochiralnego o 0,11 kcal/mol, natomiast w przypadku pochodnej **2d**, dimer utworzony z jednostek homochiralnych jest trwalszy aż o 5,95 kcal/mol od dimeru heterochiralnego. Wyniki obliczeń kwantowo-chemicznych sugerują, że pochodne te w warunkach chromatograficznych ulegają procesowi asocjacji w odmienny sposób.[21]

2.3. POCHODNE β -AMINOKWASÓW

Silny proces asocjacji w warunkach chromatograficznych obserwowany był dla β -aminokwasów, zawierających grupę CF₃– przyłączoną do stereogennego atomu węgla.[5] Kolejne badania z udziałem estrów etylowych N-acetylo β -aminokwasów

3 dowiodły, że obecność grupy CF_3 – nie jest warunkiem koniecznym, aby nastąpił proces SDE.[22]

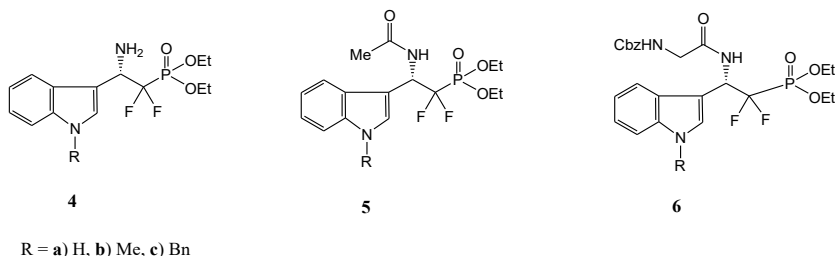


Rysunek 9. Struktura estrów etylowych N-acetylo β -aminokwasów **3**

Figure 9. Structure of ethyl ester of N-acetyl β -amino acids **3**

Przeprowadzona optymalizacja warunków chromatograficznych potwierdziła obecność SDE w każdym zastosowanych warunkach, jednak największe wzmocnienie SDE zaobserwowano dla eluentu składającego się z *c*-heksanu i MTBE. Jak zamieszczono na rysunku 9, chromatografia kolumnowa dla każdej pochodnej z tej grupy amidów dostarczyła enancjomerycznie czystą frakcję z relatywnie wysoką wydajnością, co potwierdza, że chromatografia kolumnowa i obecny silny efekt SDE może być metodą enancjomerycznego wzbogacania tej grupy związków.

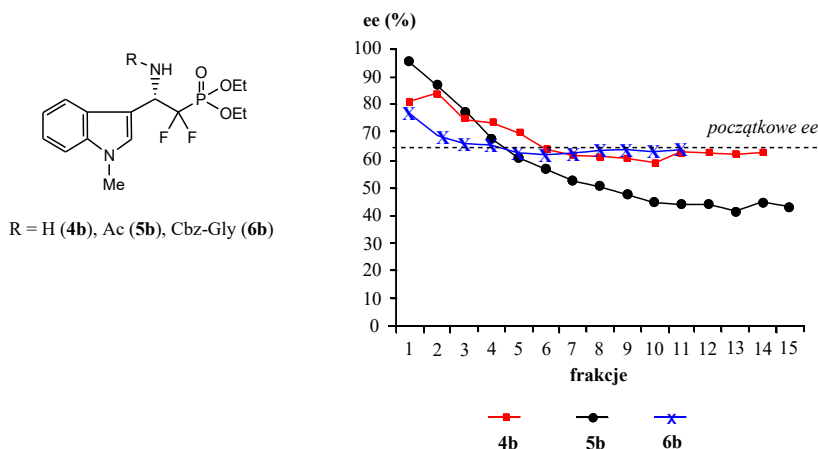
Otrzymane wyniki badań dla β -aminokwasów **3**, były inspiracją do podjęcia analogicznych badań dla pochodnych kwasu β -aminofosfonowego **4**, zawierających atomy fluoru w swojej strukturze i heteroaromatyczny podstawnik 3-indolowy. Zainteresowanie syntezą nowych pochodnych kwasu β -aminofosfonowego wynika z ich dużej aktywności biologicznych i możliwości aplikacyjnych.[23]



Rysunek 10. Struktura pochodnych kwasu β -aminofosfonowego **4-6**

Figure 10. Structures of the derivative of β -amino phosphonic acid **4-6**

Badania chromatograficzne przeprowadzono dla pochodnych zawierających wolną grupę aminową, N-acylowych pochodnych jak również dla dipeptydów, odpowiednio **4**, **5** i **6** (Rysunek 10). Tak jak w przypadku innych pochodnych amidowych silny proces asocjacji w warunkach chromatograficznych przyczyniający się do powstawania SDE był obserwowany, jednak w mniejszym stopniu w porównaniu z pochodnymi β -aminokwasów **3**.



Rysunek 11. Profile elucji dla pochodnych kwasu β -aminofosfonowego z wolną grupą aminową **4b**, N-acetylowej pochodnej **5b** i dipeptydu **6b**

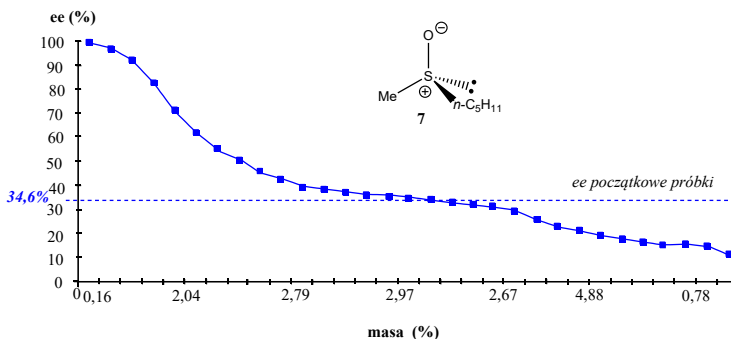
Figure 11. Elution profiles for derivatives of β -amino phosphonic acid with free amine group **4b**, N-acetyl derivative **5b** and dipeptide **6b**

Spadek wielkości SDE jest szczególnie widoczny w przypadku pochodnych dipeptydowych **6**. Przyczyną może być obecność kilku miejsc wiążących, które konkurują w procesie asocjacji.[23] Na rysunku 11 zamieszczono profile elucji dla związków z wolną grupą aminową **4b**, N-acetylowej pochodnej **5b** i dipeptydu **6b**.

3. PROCES SDE Z UDZIAŁEM ZWIĄZKÓW Z CENTRUM STEREOGENNYM NA ATOMIE SIARKI

Sulfotlenek metyloowo *n*-pentyłowy (**7**, MPS), związek o stosunkowo prostej budowie, bez dodatkowych grup funkcyjnych, mogący tworzyć asocjaty poprzez wiązanie typu dipol-dipol wykazał dużą tendencję do generowania SDE w warunkach klasycznej chromatografii kolumnowej.[24, 25] Sulfotlenek ten w postaci enancjomerycznie wzbogaconej w *R*-enancjomer został otrzymany metodą Andersa[26, 27] w reakcji zachodzącej poprzez sulfinian metyloowy (sulfinian Phillipsa)[28] ze stosunkowo niskim nadmiarem enancjomerycznym równym 34,6% ee. Niski nadmiar enancjomeryczny związku modelowego w badaniach nad efektem

SDE pozwolił oszacować, na ile metoda chromatograficzna może być efektywna i przydatna w enancjomerycznym wzbogacaniu tej grupy związków.



Rysunek 12. Profil elucji dla chromatografii kolumnowej MPS z 34,6% ee w mieszaninie AcOEt/*n*-heksan (5:1) jako eluencie

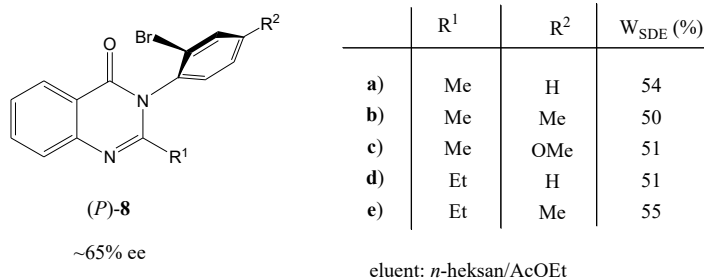
Figure 12. Elution profile for column chromatography of the MPS of 34,6% ee in AcOEt/*n*-hexan (5:1) as an eluent.

Obecność grupy sulfinyowej i możliwość wytwarzania silnego międzycząsteczkowego oddziaływania dipol-dipol powoduje silną tendencję do asocjacji i generowania znacznego efektu SDE. Na rysunku 12 przedstawiony jest profil elucji otrzymany dla chromatografii kolumnowej w najbardziej optymalnych warunkach, sprzyjających SDE. Jak widać możliwe było otrzymanie enancjomerycznie czystej frakcji wychodząc z próbki o niskim nadmiarze enancjomerycznym. Wielkość SDE była obniżona w przypadku, gdy w zastosowanych eluentach obecny był metanol lub aceton.

4. PROCES SDE Z UDZIAŁEM ZWIĄZKÓW CHIRALNYCH OSIOWO, POCHODNYCH CHINAZOLINONU

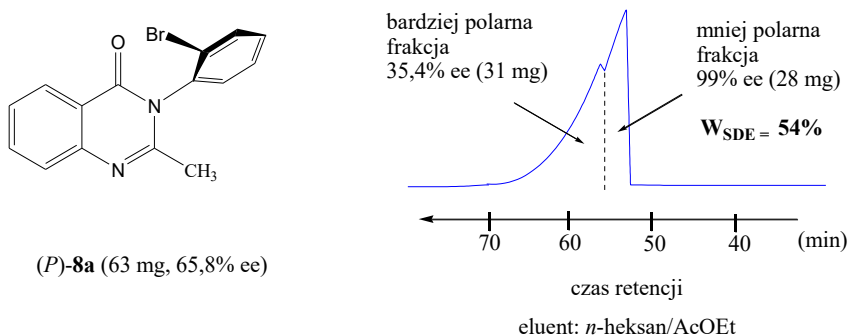
Pochodne chinazolinonu **8** zaliczane do grupy receptorów GABA-ergicznym są związkami chiralnymi osiowo na skutek zahamowanej rotacji wokół wiązania C–N. Związki te otrzymuje się poprzez reakcję asymetrycznej desymetryzacji z nadmiarami enancjomerycznymi w przedziale 28-99% ee.[29] Tylko nieliczne udało się otrzymać w postaci enancjomerycznie czystej. Do procesu ich enancjomerycznego wzbogacania zastosowano achiralną chromatografię MPLC i towarzyszący jej proces SDE.[30] Chromatografię MPLC przeprowadzono stosując żel krzemionkowy i dobierając tak polarność eluentu *n*-heksan/AcOEt, aby czas

retencji wyniósł około jednej godziny. Na rysunku 13 zamieszczono strukturę pochodnych **8** i wartości wydajności otrzymane dla próbek z wyjściowym 65% ee.



Rysunek 13. Struktura pochodnych chinazolinonu **8**
Figure 13. Structures of the quinazolinone derivatives **8**

Na chromatogramach analizowanych związków widoczna była wyraźna granica pomiędzy frakcjami enancjomerycznie czystymi i „bardziej racemicznymi”. Dla przykładu na rysunku 14 zamieszczono chromatogram otrzymany dla związku (*P*)-**8a** z początkowym 65,8% ee. Frakcja zawierająca enancjomerycznie czysty związek charakteryzowała się mniejszą polarnością i była wymywana jako pierwsza.



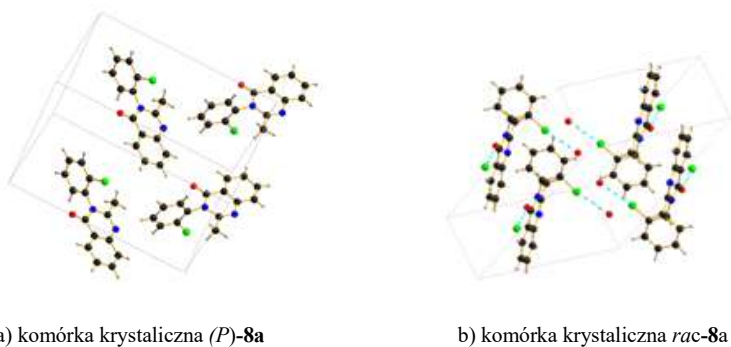
Rysunek 14. Chromatogram MPLC związku (*P*)-**8a** z 65,8% ee
Figure 14. MPLC chart for compound (*P*)-**8a** of 65,8% ee

Jak wynika z przeprowadzonych badań chromatografia MPLC jest efektywną metodą enancjomerycznego wzbogacania pochodnych chinazolinonu **8**, dla wszystkich związków odseparowano pochodne **8** z 99% ee i wysoką wydajnością (powyżej 50%).

Dla porównania przeprowadzono również badania stosując klasyczną, napędzaną grawitacyjnie chromatografię kolumnową z użyciem zarówno żelu

krzemionkowego jak i tlenku glinu jako faz stacjonarnych. We wszystkich zastosowanych warunkach silny efekt SDE towarzyszył chromatografii kolumnowej, jednak najbardziej optymalnym eluentem, sprzyjającym generowaniu silnego SDE był chlorek metylenu i żel krzemionkowy jako faza stacjonarna. Zgodnie z przewidywaniami metoda MPLC okazała się metodą bardziej skuteczną w enancjomerycznym wzbogacaniu tych związków. W przypadku chromatografii napędzanej grawitacyjnie otrzymano profile elucji, w których w sposób stopniowy zmieniała się proporcja enancjomerów, od wartości najwyższej (>90% ee) do wartości najniższej (>30% ee).

Silny efekt SDE obserwowany dla pochodnych chinazolinonu **8** był spowodowany silną asocjacją cząsteczek w warunkach chromatograficznych poprzez wytworzenie silnego międzycząsteczkowego wiązania halogenowego pomiędzy atomem bromu jednej cząsteczki i atomem tlenu drugiej cząsteczki. Bardzo istotnych informacji na temat uprzywilejowanych oddziaływań homo-lub hetero-chiralnych i możliwego mechanizmu SDE dostarcza analiza struktur krystalicznych form racemicznej i enancjomerycznie czystej dla związku **8a**. Jak wynika z rysunku 15, wiązanie halogenowe tworzy się tylko pomiędzy cząsteczkami heterochiralnymi w kryształach formy racemicznej.



Rysunek 15. Struktury krystaliczne dla a) enancjomeru (*P*)-**8a**; b) racemicznego **8a**

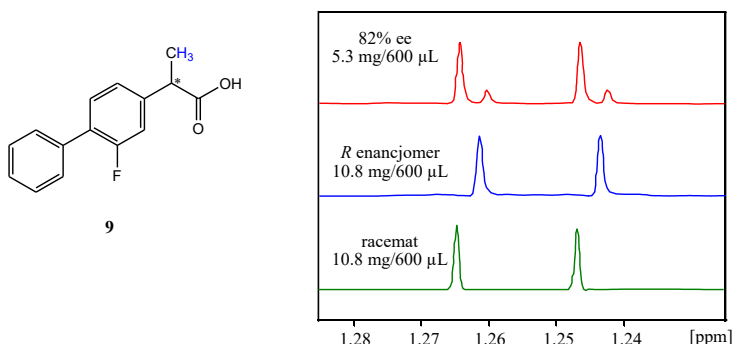
Figure 15. Crystal structures of a) enantiomer (*P*)-**8a**; b) racemic **8a**

Obecność wiązania halogenowego powoduje, że kryształy racemiczne są bardziej trwałe od kryształów chiralnych. Potwierdzają to również parametry fizyczne, takie jak temperatura topnienia, gęstość kryształów. Są one wyższe dla kryształów racemicznych i wynoszą odpowiednio 140-142 °C i 1,650 g/cm³ (przy 105°C i 1,605 g/cm³ dla kryształów chiralnych).[31]

5. BADANIA SDE Z UDZIAŁEM FLURBIPROFENU

Flurbiprofen (**9**) zaliczany do niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) został wybrany jako związek modelowy w kompleksowych badaniach nad SDE na drodze chromatografii kolumnowej i sublimacji.[32] Obliczenia kwantowo chemiczne metodą DFT wykazały, że dimer homochiralny utworzony poprzez wiązania wodorowe z udziałem dwóch grup karboksylowych jest trwalszy o 2,64 kcal/mol od dimeru heterochiralnego. Związek ten wykazywał SDE w warunkach chromatograficznych jak i podczas sublimacji, jednak efekt ten nie był znaczący. Wartości parametru Δe_e oscylowały w zakresie 5–13% dla chromatografii kolumnowej i 2–12% podczas sublimacji.

Przeprowadzono również badania asocjacji cząsteczek flurbiprofenu za pomocą technik NMR. Proces asocjacji objawiający się pojawieniem dwóch sygnałów dla tego samego jądra zależał od rozpuszczalnika. Również od rozpuszczalnika zależała preferencja oddziaływań homo-/heterochiralnych. W deuterowanym toluenie preferowane były oddziaływania heterochiralne, a podwójne sygnały obserwowano na widmach ^1H , ^{19}F i ^{13}C NMR. Dla przykładu na rysunku 16 przedstawiono fragmenty widm protonowych z sygnałami protonów grupy CH_3 – wykonane dla stężonych roztworów flurbiprofenu w postaci: enancjomerycznie wzbogaconej, enancjomerycznie czystej i racematu.

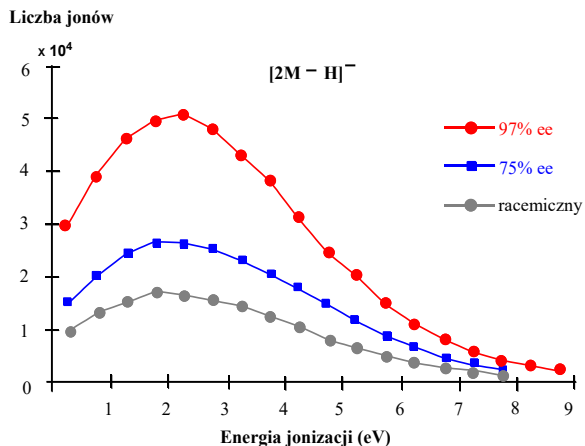


Rysunek 16. Sygnały ^1H NMR protonów CH_3 – dla stężonych próbek (*R*)-flurbiprofenu i *rac*-flurbiprofenu oraz dla stężonej próbki enancjomerycznie wzbogaconego (*R*)-flurbiprofenu o 82% ee w toluenie- d_6

Figure 16. The ^1H NMR signal of the CH_3 – protons for concentrated (*R*)-flurbiprofen and *rac*-flurbiprofen samples and for a concentrated sample of enantioenriched (*R*)-flurbiprofen of 82% ee in toluene- d_6

Badania NMR wykazały, że w rozpuszczalnikach: *c*-heksan- d_{12} /MTBE (4:1) i CDCl_3 dimer homochiralny był trwalszy. W rozpuszczalniku *c*-heksan- d_{12} /MTBE (4:1) nie zaobserwowano rozdzielania sygnałów dla żadnych jąder, natomiast dla CDCl_3 tylko w przypadku grupy CH_3 – na widmach ^1H NMR.

W rozpuszczalnikach polarnych, takich jak 1,4-dioksan- d_8 i acetonitryl- d_3 proces asocjacji był zredukowany. Z tego też względu nie określono za pomocą NMR preferencji oddziaływań. Preferencję oddziaływań w roztworach polarnych określono za pomocą spektrometrii mas, metodą ESI.



Rysunek 17. Liczba jonów dla jonu dimeru $[2M - H]^-$ jako funkcji energii jonizacji dla roztworów 0,5 mg/ml flurbiprofenu w acetonitrylu

Figure 17. Ion counts for the $[2M - H]^-$ dimer ion vs. ionization energy for solutions of 0.5 mg/mL flurbiprofen in acetonitrile

Jak wynika z rysunku 17, jon dimeru homochiralnego był bardziej trwały w acetonitrylu w zastosowanych warunkach pomiaru.

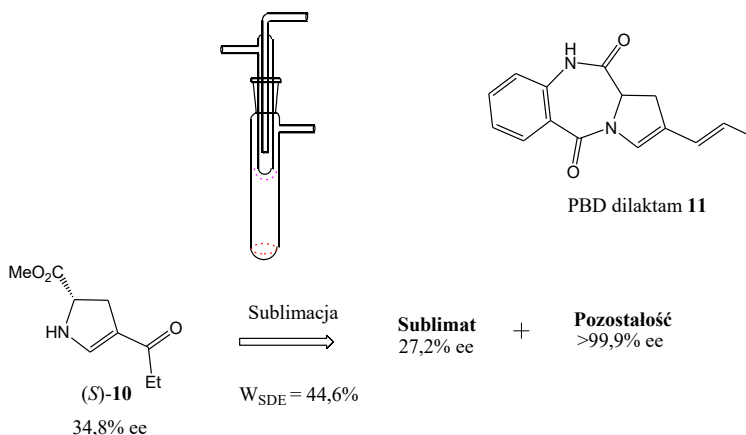
Niestety próby korelacji wyników badań procesu asocjacji za pomocą NMR z otrzymanymi profilami elucji podczas chromatografii kolumnowej i możliwości przewidywania, która frakcja będzie eluowała jako pierwsza, nie powiodły się.

6. PRZYKŁADY PRAKTYCZNEGO ZASTOSOWANIA SDE

Za wyjątkiem dobrze znanej i powszechnie stosowanej krystalizacji, w literaturze naukowej opisanych jest jak dotąd tylko kilka przykładów praktycznego zastosowania zjawiska SDE jako metody enancjomerycznego wzbogacania związków chiralnych.[29, 30]

W wyniku sublimacji estru metylowego kwasu 4-propionilo-2,3-dihydro-1H-pirol-2-karboksyowego (**10**), związku pośredniego w syntezie pirol[2,1-c][1,4]benzodiazepiny (PBD, **11**), o właściwościach antybakteryjnych i cytostacyjnych względem komórek rakowych, zastosowano proces sublimacji do otrzymania enancjomerycznie czystego związku. Jak zaprezentowano na rysunku 18, proces sublimacji estru **10** o początkowym nadmiarze enancjomerycznym 34,8% prowadził do otrzymania dwóch frakcji: pozostałości o czystości optycznej powyżej

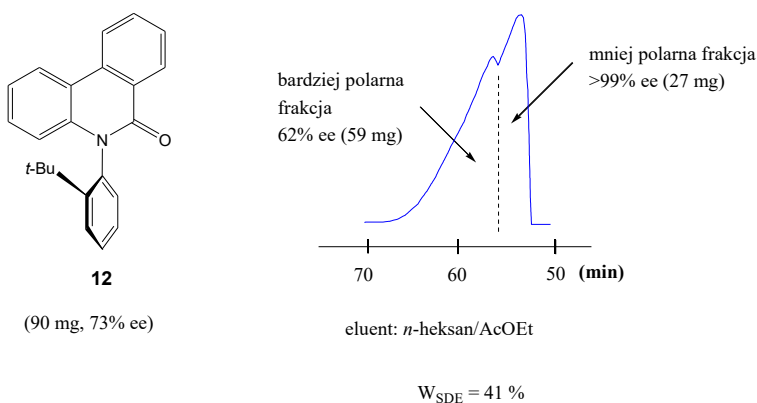
99,9% ee i enancjomerycznie zubożonego sublimatu (27,2% ee). Zastosowanie efektu SDE towarzyszącemu sublimacji pozwoliło na otrzymanie enancjomerycznie czystego, finalnego dilaktamu PBD **11**. [33]



Rysunek 18. Enancjomeryczne wzbogacenie estru (S)-10, związku przejściowego w syntezie PBD dilaktamu **11** w procesie sublimacji

Figure 18. Enantiomeric enrichment of the (S)-10 ester, an intermediate in the synthesis of PBD dilactam **11** by sublimation process

Kolejnym przykładem praktycznego zastosowania zjawiska SDE jest enancjomeryczne wzbogacenie chiralnego osiowo laktamu **12** podczas MPLC na żelu krzemionkowym jako fazie stacjonarnej i zastosowaniem mieszaniny heksanu i octanu etylu jako eluentu.

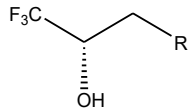


Rysunek 19. Chromatogram MPLC laktamu **12** z 73% ee

Figure 19. MPLC chart for lactam **12** of 73% ee

Na otrzymanym chromatogramie, zarejestrowanym dla próbek o początkowym nadmiarze enancjomerycznym 73% ee, zaobserwowano wyraźną granicę rozdzielenia pików. Analiza frakcji, odpowiadających pikom za pomocą HPLC na kolumnie chiralnej potwierdziła, że pierwszą wymywaną frakcją jest frakcja zawierająca enancjomerycznie czysty związek (>99,9% ee) z wydajnością 41%, natomiast druga, bardziej polarna frakcja była enancjomerycznie zubożona w porównaniu z wyjściową próbką (Rysunek 19).[34]

Chromatografia kolumnowa typu flash na żelu krzemionkowym, w eluencie *c*-heksan/benzen/eter di-*tert*-butylowy (1/1/0,1) przeprowadzona dla chiralnych alkoholi **13** o początkowym nadmiarze enancjomerycznym 75% ee, zawierających w swojej strukturze grupę CF₃– przyłączoną do stereogennego atomu węgla, dostarczyła enancjomerycznie czystych związków z dużą wydajnością.[35]

 <p style="text-align: center;">(S)-13 75% ee</p>	<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">R</th> <th style="text-align: right; padding: 2px;">W_{SDE} (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">a) NHBn,</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">35</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">b) NMe₂,</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">39</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">c) NEt₂,</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">41</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">d) NH₂,</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">44</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">e) N(CH₂)₅,</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">40</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">f) OEt</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">53</td> </tr> </tbody> </table>	R	W _{SDE} (%)	a) NHBn,	35	b) NMe ₂ ,	39	c) NEt ₂ ,	41	d) NH ₂ ,	44	e) N(CH ₂) ₅ ,	40	f) OEt	53
R	W _{SDE} (%)														
a) NHBn,	35														
b) NMe ₂ ,	39														
c) NEt ₂ ,	41														
d) NH ₂ ,	44														
e) N(CH ₂) ₅ ,	40														
f) OEt	53														

Rysunek 20. Chromatografia typu flash dla CF₃– amino alkoholi **13**
Figure 20. Flash chromatography for CF₃– amino alcohols **13**

Warto podkreślić, że chromatografię kolumnową i towarzyszący jej proces SDE w przeciwieństwie do krystalizacji można również zastosować jako metodę enancjomerycznego wzbogacania związków w stanie ciekłym. Pochodne **13c** i **13f** to ciecze i jak zaprezentowano na rysunku 20, enancjomerycznie czyste frakcje otrzymano z wysoką wydajnością.

UWAGI KOŃCOWE

Proces SDE początkowo był postrzegany przez naukowców jako zjawisko nieoczekiwane, którego pojawienie się przysparzało problemów w pracy laboratoryjnej, jak również generowało dodatkową pracę.[36, 37] Dalsze badania dowiodły, że SDE może stanowić nową, tanią i dostępną w każdym laboratorium metodę enancjomerycznego wzbogacania związków chiralnych, tak jak zaprezentowano w przytoczonych przykładach.

Na uwagę zasługuje fakt, że SDE może zmieniać rzeczywisty stereochemiczny wynik reakcji asymetrycznych podczas chromatograficznego oczyszczania i rozdzielania produktów, jak również podczas odparowywania w warunkach próżni. W związku z tym zachęcamy do przeprowadzania testów potwierdzających zjawisko SDE, a także postulujemy, aby namiar enancjomeryczny produktów określać tuż po zakończeniu reakcji, przed przystąpieniem do dalszych etapów izolowania i oczyszczania.[10, 11, 38]

PODZIĘKOWANIE

Pracę dedykujemy Panu Profesorowi Czesławowi Wawrzeńczykowi za jego wsparcie i inspiracje do pracy naukowej oraz wszelką okazaną pomoc na różnych płaszczyznach.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Breslow, Z.-L. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 5723.
- [2] D. K. Kondepudi, R. J. Kaufman, N. Singh, *Science*, 1990, **250**, 975.
- [3] C. Viedma, *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **94**, 065504.
- [4] Y. Saito, H. Hyuga, *Rev. Mod. Phys.*, 2013, **85**, 603.
- [5] V. A. Soloshonok, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 766.
- [6] K. D. Klika V. A., Soloshonok, *Helv. Chim. Acta*, 2014, **97**, 1583.
- [7] V. A. Soloshonok, C. Roussel, O. Kitagawa, A. E. Soroichinsky, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4180.
- [8] J. Han, O. Kitagawa, A. Wzorek, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, *Chem. Sci.*, 2018, **9**, 1718.
- [9] A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1467**, 270.
- [10] J. Han, A. Wzorek, K.D. Klika, V.A. Soloshonok, *Molecules*, 2021, **26**, Article Number: 2757.
- [11] V.A. Soloshonok, A. Wzorek and K.D. Klika, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2017, **28**, 1430.
- [12] J. Martens, R. Bhushan, *Helv. Chim. Acta*, 2014, **97**, 161.
- [13] J. Han, A. Wzorek, V.A. Soloshonok, K. D. Klika, *Electrophoresis*, 2019, **40**, 1869.
- [14] T. Williams, R. G. Pitcher, P. Bommer, J. Gutzwiller, M. Uskokovic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, **91**, 1871.
- [15] A. Dobashi, N. Saito, Y. Motoyama and S. Hara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 307.
- [16] B. S. Jursic and S. I. Goldberg, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 7172.
- [17] R. Charles, E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, 1984, **298**, 516.
- [18] A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, *Helv. Chim. Acta*, 2015, **98**, 1147.
- [19] A. Wzorek, A. Kamizela, Azusa Sato, V.A. Soloshonok, *J. Fluor. Chem.*, 2017, **196**, 37.
- [20] J. Han, S. Fustero, H. Moriwaki, A. Wzorek, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, *The Self-Disproportionation of Enantiomers (SDE): Fluorine as an SDE-Phoric Substituent in Organofluorine Chemistry: Synthesis, Modeling, and Applications*. Szabó, K.J.; Selander, N. (Editors), Wiley-VCH, Weinheim, 2021, Ch. 9, pp. 281
- [21] T. Hosaka, T. Imai, A. Wzorek, M. Marcinkowska, A. Kolbus, O. Kitagawa, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, *Amino Acids*, 2019, **51**, 283.
- [22] A. Wzorek, A. Sato, J. Drabowicz, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, *Amino Acids*, 2016, **48**, 605.

- [23] M. Kwiatkowska, M. Marcinkowska, A. Wzorek, R. Pajkert, J. Han, K. D. Klika, V. A. Soloshonok, G. V. Röschenthaler, *Amino Acids*, 2019, **51**, 1377.
- [24] A. Wzorek, K.D. Klika, J. Drabowicz, A. Sato, J. L. Aceña, V.A. Soloshonok, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 4738.
- [25] J. Han, V.A. Soloshonok, K.D. Klika, J. Drabowicz, A. Wzorek, *Chem.Soc. Rev.*, 2018, **47**, 1307.
- [26] K. K. Andersen, W. Gaffield, N. E. Papanikolaou, J. Foley and R. I. Perkins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 5637.
- [27] K. K. Andersen, *J. Org. Chem.*, 1964, **29**, 1953.
- [28] H. Phillips, *J. Chem. Soc.*, 1925, **127**, 2552.
- [29] M. Matsuoka, M. Goto, A. Wzorek, V. A. Soloshonok and O. Kitagawa, *Org.Lett.*, 2017, **19**, 2650.
- [30] S. Terada, M. Hirai, A. Honzawa, O. Kitagawa, A. Kamizela, A. Wzorek, V.A. Soloshonok, *Chem.—Eur. J.*, 2017, **23**, 14631.
- [31] T. Imai, E. Nijjima, S. Terada, A. Wzorek, V. A. Soloshonok, A. Hori and O. Kitagawa, *CrystEngComm*, 2019, **21**, 3385.
- [32] M. Kwiatkowska, A. Wzorek, A. Kolbus, M. Urbaniak, J. Han, V. A. Soloshonok and K. Klika, *Symmetry-Basel*, 2021, **13**, 543.
- [33] S. Abás, C. Arróniz, E. Molins, C. Escolano, *Tetrahedron*, 2018, **74**, 867.
- [34] M. Takahashi, H. Tanabe, T. Nakamura, D. Kuribara, T. Yamazaki & O. Kitagawa, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 288.
- [35] A. E. Sorochinsky, T. Katagiri, T. Ono, A. Wzorek, J. L. Aceña, V. A. Soloshonok, *Chirality*, 2013, **25**, 365.
- [36] P. Diter, S. Taudien, O. Samuel, H. B. Kagan, *J. Org. Chem.* 1994, **59**, 370.
- [37] J. Drabowicz, A. Jasiak, A. Wzorek, A. Sato, V. A. Soloshonok, *Arkivoc*, 2017, part ii, 557.
- [38] J. Han, R. Dembiński, V. A. Soloshonok, K. D. Klika, *Molecules*, 2021, **26**, 3994.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 marca 2023 r.

ENZYMATYCZNE I CHEMICZNE MODYFIKACJE FOSFOLIPIDÓW

ENZYMATIC AND CHEMICAL MODIFICATIONS OF PHOSPHOLIPIDS

Anna Chojnacka*, Natalia Niezgoda

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk
o Żywności, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław
e-mail: anna.chojnacka@upwr.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Chemiczna i chemoenzymatyczna synteza glicerofosfolipidów
 - 1.1. Koniugaty fosfolipidowe z izomerami sprzężonego kwasu linolowego
 - 1.2. Koniugaty fosfolipidowe z DHEA
 - 1.3. Koniugaty fosfolipidowe z niesteroidowymi związkami przeciwzapalnymi (NLPZ)
2. Modyfikacje enzymatyczne glicerofosfolipidów
 - 2.1 Strukturyzowane fosfolipidy z bioaktywnymi kwasami tłuszczowymi
 - 2.1.1. Wzbogacanie PC żółtka jaja w kwasy *n*-3 i *n*-6 WNKT
 - 2.1.2. Wzbogacanie PC żółtka jaja w sprzężony kwas linolenowy (CLnA)
 - 2.1.3. Wzbogacanie PC żółtka jaja w sprzężony kwas linolowy (CLA)

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Anna Chojnacka, prof. uczelni, w 2006 roku rozpoczęła pracę w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii uzyskała w 2007 r., broniąc pracy pt.: „Enzymatyczny rozdział racemicznych acyklicznych alkoholi allilowych”. Stopień doktora habilitowanego nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia uzyskała w roku 2019. Jej zainteresowania naukowe dotyczą opracowania nowych metod enzymatycznych modyfikacji fosfolipidów, otrzymywania strukturyzowanych lipidów metodami chemicznymi i chemoenzymatycznymi oraz optymalizacji procesów kinetycznego rozdziału drugorzędowych alkoholi allilowych

z zastosowaniem lipaz i fosfolipaz.



<https://orcid.org/0000-0002-2975-5605>



Dr inż. Natalia Niezgoda, w 2018r. rozpoczęła pracę na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii uzyskała w 2016 r., broniąc pracy pt.: „Chemoenzymatyczne modyfikacje fosfolipidów izomerami sprzężonego kwasu linolowego (CLA)”. W 2017 r. odbyła sześciomiesięczny staż naukowy na Wydziale Farmacji Uniwersytetu w Coimbrze (Portugalia) biorąc udział w projekcie badawczym dotyczącym wykorzystania nanoformulacji z niesteroidowymi związkami przeciwzapalnymi w terapii oczu. Jej zainteresowania naukowe związane są z szerokopojętymi modyfikacjami fosfolipidów w celu

opracowywania nowych multifunkcjonalnych związków mogących znaleźć zastosowanie w farmacji i żywieniu.



<https://orcid.org/0000-0002-1154-9707>

ABSTRACT

At the moment, phospholipids are among the most interesting molecules. The possibilities of chemical and enzymatic modifications, while maintaining their integrity and unique nature, also contribute to these compounds' great interest.

This review paper concerns the preparation of new phospholipid conjugates containing fragments of biologically active compounds not found naturally in phospholipids, and phospholipids enriched with specific fatty acids with health-promoting properties (structured phospholipids).

Chemical methods for the synthesis of phospholipids containing conjugated linolenic acid (CLA), dehydroepiandrosterone (DHEA) or selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) at the *sn*-1 and/or *sn*-2 position have been described. In addition, the evaluation of the antiproliferative activity of the obtained conjugates against selected cancer cell lines was also described. Enzymatic methods of modifying natural phospholipids leading to their enrichment with bioactive polyunsaturated fatty acids and conjugated acids have also been described.

Keywords: structured phospholipids, phospholipid conjugates, bioactive fatty acids, phospholipid modification, dehydroepiandrosterone, NSAIDs, lipase, phospholipase

Słowa kluczowe: fosfolipidy strukturyzowane, koniugaty fosfolipidowe, bioaktywne kwasy tłuszczowe, modyfikacje fosfolipidów, sprzężony kwas linolowy, dehydroepiandrosteron, niesteroidowe leki przeciwzapalne, lipaza, fosfolipaza

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ALA	- kwas α -linolenowy
AOT	- dokuzynian sodu
Balb/3T3	- linia komórkowa mysich fibroblastów
B16	- linia komórkowa czerniaka mysiego
Caco-2	- linia komórkowa gruczolakoraka jelita grubego
GLA	- kwas γ -linolenowy
GPC	- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina
DHA	- kwas dokozaheksaenowy
DHEA	- dehydroepiandrosteron (3 β -hydroksy-androst-5-en-17-on)
suc-DHEA	- monobursztynian DHEA (monobursztynian 3' β -O-androst-5'-en-17'-onylu)
EPA	- kwas eikozapentaenowy
LA	- kwas linolowy
CLA	- sprzężony kwas linolowy
CLnA	- sprzężony kwas linolenowy
DBTO	- tlenek dibutylocyny
DCC	- <i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DMAP	- 4-(<i>N,N</i> -dimetyloamino)pirydyna
DMF	- dimetyloformamid
E _{CLA}	- efektywne wbudowanie CLA
GPC	- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocholina
IBU	- ibuprofen (kwas 2-(4-izobutylofenylo)propionowy)
HL-60	- linia komórkowa białaczki promielocytowej
HT-29	- linia komórkowa raka jelita grubego
LDL	- lipoproteiny o niskiej gęstości
LNCaP	- linia komórkowa raka prostaty
LPC	- lizofosfatydylocholina
MCF-7	- linia komórkowa gruczolakoraka piersi
NAP	- naproksen (kwas 2-(6-metoksy-2-naftylo)propionowy)
NLZP	- niesteroidowe leki przeciwzapalne
NNKT	- niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe
PA	- kwas palmitynowy
1-PA-LPC	- 1-palmitoilolizofosfatydylocholina
PL	- fosfolipid
PLA ₂	- fosfolipaza A ₂
PLA ₁	- fosfolipaza A ₁
PC	- fosfatydylocholina
PSO	- olej z pestek granatu
SA	- kwas stearynowy
1-SA-LPC	- 1-stearoilofosfatydylocholina
1,2-diSA-PC	- 1,2-distearoilofosfatydylocholina
SPC	- strukturyzowana fosfatydylocholina
SPL	- strukturyzowane fosfolipidy
WNKT	- wielonienasycone kwasy tłuszczowe
TAG	- triacyloglicerole

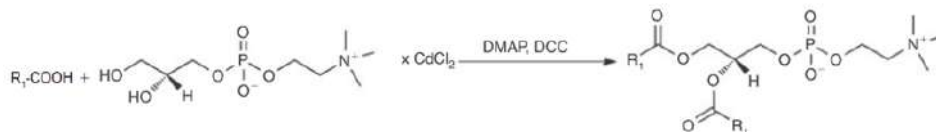
WPROWADZENIE

Wśród biologicznie aktywnych lipidów, fosfolipidy (PL) przyciągają dużą uwagę ze względu na swoje wyjątkowe właściwości odżywcze i funkcjonalne. Z uwagi na swój amfifilowy charakter i zdolność przenikania przez błony, stały się one doskonałą matrycą do wprowadzania do organizmu substancji aktywnych biologicznie. Duże postępy w wiedzy w zakresie biochemii fosfolipidów i rozwój współczesnej bioinżynierii zaowocowały powstaniem nowatorskich koncepcji i znacznym postępem technologicznym w zakresie modyfikacji enzymatycznych i syntezy chemicznej fosfolipidów do zastosowań przemysłowych, farmaceutycznych i w żywieniu człowieka. Najważniejsze kwestie obejmują otrzymywanie nowych analogów fosfolipidów zawierających fragmenty biologicznie aktywnych związków nie występujących w fosfolipidach naturalnie, (tzw. koniugatów fosfolipidowych) oraz fosfolipidów wzbogaconych w konkretne kwasy tłuszczowe o właściwościach prozdrowotnych, o zwiększonej wartości żywieniowej lub korzystnych parametrach funkcjonalnych (tzw. strukturyzowanych fosfolipidów) charakteryzujących się nowymi właściwościami funkcjonalnymi. W Katedrze Chemii (obecnie Chemii Żywności i Biokatalizy) Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu od lat prowadzone są badania nad chemoenzymatycznym otrzymywaniem glicerofosfolipidów o znaczeniu prozdrowotnym, tzw. super fosfolipidów, które oprócz kwasów tłuszczowych występujących w fosfolipidach naturalnie zawierają biologicznie aktywne związki, takie jak izomery sprzężonego kwasu linolowego (CLA) [1,2], fragment związku steroidowego (dehydroepiandrosteronu) [3,4] czy niesteroidowe związki przeciwzapalne [5]. Prowadzone są także badania nad wykorzystaniem lipaz i fosfolipaz do wzbogacania naturalnych fosfolipidów w bioaktywne wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 i n-6 takie jak kwas linolowy [6], α - i γ -linolenowy [7], eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA) [8] a także w sprzężone kwasy tłuszczowe, takie jak kwas punikowy [9] i izomery sprzężonego kwasu linolowego [10, 11,12].

1. CHEMICZNA I CHEMOENZYMATYCZNA SYNTEZA GLICEROFOSFOLIPIDÓW

Głównym wyzwaniem w syntezie fosfolipidów jest skonstruowanie struktury chiralnej i zachowanie konfiguracji na dalszych etapach syntezy chemicznej. Stosunkowo prostą, a przez to rozpowszechnioną metodą syntezy chemicznej homopodstawionej fosfatydylocholiny, zawierającej takie same reszty acylowe w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 jest estryfikacji Steglicha. Polega ona na reakcji kompleksu chlorku kadmu i dowolnego fragmentu glicero-3-fosforanowego, np. *sn*-glicero-3-fosfocholiny (GPC) z kwasem karboksylowym w obecności 4-(*N,N*-dimetylo-

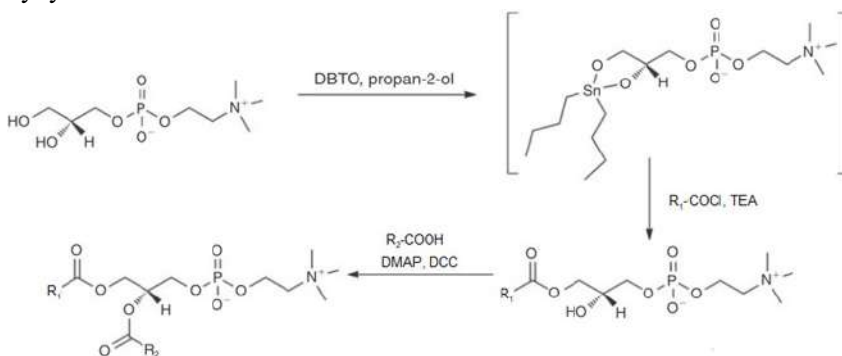
amino)pirydyny (DMAP) i odczynnika sprzęgającego, jakim jest *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC) (Rys. 1).



Rysunek 1. Schemat estryfikacji Steglicha *sn*-glicero-3-fosfocholiny
Figure 1. Scheme of Steglich esterification of *sn*-glicero-3-phosphocholine

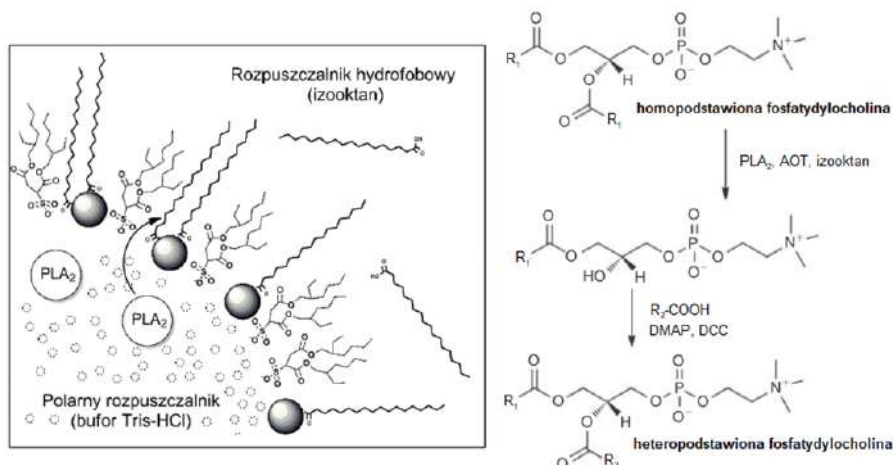
Zaletą tej metody jest możliwość uzyskania stereoizomerycznie czystego produktu o konfiguracji naturalnych glicerofosfolipidów, gdy jako substrat zostanie zastosowany *sn*-glicerofosforan (GPC).

Synteza heteropodstawionych glicerofosfolipidów, zawierających różne reszty acylowe w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 jest wyzwaniem, wymagającym zastosowania regioselektywnych odczynników chemicznych lub katalizy enzymatycznej. W literaturze opisanych jest kilka metod syntezy tej grupy związków [13]. Dwie z nich są szczególnie przydatne w syntezie fosfolipidów o ściśle zdefiniowanym składzie reszt acylowych. Pierwsza opiera się na syntezie 1-acylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny z GPC z użyciem tlenku dibutylocyny (DBTO). Produktem przejściowym w tej reakcji jest cząsteczka acetalu dibutylocynowego glicerofosfocholiny, który w wyniku działania chlorku kwasu tłuszczowego podstawiany jest regioselektywnie grupą acylową w pozycji *sn*-1 (Rys. 2). Otrzymaną w ten sposób 1-acylo lizofosfatydylocholinę (1-acylo LPC) poddaje się kolejnej estryfikacji metodą Steglicha z użyciem kwasu tłuszczowego, który ostatecznie zajmuje pozycję *sn*-2 w fosfatydylocholinie.



Rysunek 2. Dwuetapowa synteza heteropodstawionej fosfatydylocholiny: monoacylowanie *sn*-glicero-3-fosfocholiny za pośrednictwem tlenku dibutylocyny, po którym następuje estryfikacja Steglicha
Figure 2. The two-step synthesis of heterosubstituted phosphatidylcholines: tin-mediated monoacylation of *sn*-glycero-3-phosphocholines followed by a Steglich esterification

Druga metoda to proces chemoenzymatyczny, gdzie 1-acylo LPC uzyskuje się w wyniku hydrolizy homopodstawionej fosfatydylochliny z wykorzystaniem *sn*-2 specyficznej fosfolipazy (PLA₂) jako katalizatora, a następnie po oczyszczeniu poddaje się estryfikacji Steglicha (Rys. 3). Szczególnie wydajnie i szybko hydroliza przebiega w układach micelarnych, w których PLA₂ ulega enkapsulacji w micelach powstałych z fosfatydylochliny (PC) i dokuzynianu sodu (AOT). Bardzo duża efektywność tej metody jest związana z powstaniem granicy międzyfazowej lipid-woda. W odwróconych micelach polarne głowy fosfolipidu skierowane są do wewnątrz miceli, a łańcuchy hydrofobowe na zewnątrz, w kierunku rozpuszczalnika jakim jest izooktan. Metoda ta pozwala uzyskać całkowitą hydrolizę PC do 1-acylo LPC już po 15 minutach reakcji [14,15].



Rysunek 3. Dwuetapowa chemoenzymatyczna synteza heteropodstawionej fosfatydylochliny. Struktura odwróconej miceli w środowisku reakcji enzymatycznej hydrolizy fosfatydylochliny.

Figure 3. Two-step chemoenzymatic synthesis of heterosubstituted phosphatidylcholine. Struktura of reverse micelles in the environment of the enzymatic reaction of phosphatidylcholine hydrolysis.

1.1. KONIUGATY FOSFOLIPIDOWE Z IZOMERAMI SPRĘŻONEGO KWASU LINOLOWEGO

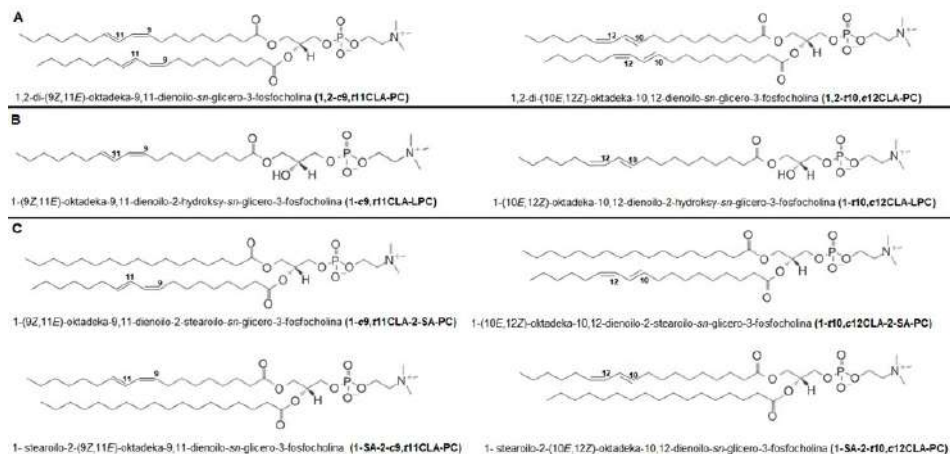
Terminem sprężony kwas linolowy (CLA, ang. *conjugated linoleic acid*) opisywane są izomery pozycyjne i geometryczne kwasu tłuszczowego C18:2 z dwoma sprężonymi wiązaniami podwójnymi. Najczęściej stosowane w badaniach naukowych są izomery *cis*-9,*trans*-11 CLA (*c9,t11*) i *trans*-10,*cis*-12 CLA (*t10,c12*). Kwas *cis*-9,*trans*-11 CLA (kwas rumenowy) występuje głównie w tłuszczach pochodzących od przeżuwaczy, a jego biosynteza jest związana z metabolizmem bakterii symbiotycznych zasiedlających żwacz, głównie *Butyrivibrio fibrisolvens* [16] *trans*-10,*cis*-12 CLA nie występuje naturalnie i otrzymuje się go w wyniku

alkalicznej izomeryzacji kwasu linolowego. Izomer ten jest wytwarzany razem z *cis*-9,*trans*-11 w stosunku równomolowym [17]. Dane literaturowe dowodzą, że CLA ma różnorodny wpływ na funkcje fizjologiczne organizmów żywych, w tym na zmniejszenie zachorowalności na nowotwory, zmianę metabolizmu lipidów, stymulację układu odpornościowego, zmniejszenie ryzyka miażdżycy. Ponadto wykazano, że aktywność biologiczna CLA jest izomerycznie specyficzna [18].

W zespole prof. Wawrzeńczyka przeprowadzono badania, których celem była synteza koniugatów fosfolipidowych z izomerami CLA, mogących znaleźć zastosowanie jako prolek lipidowy zwiększający dostępność CLA w organizmie [1,2].

Pierwszą grupę stanowiły homopodstawione fosfatydylocholino zawierające identyczne reszty kwasów tłuszczowych: *c*9,*t*11CLA lub *t*10,*c*12CLA w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 (Rys. 4A). Otrzymano je w wyniku estryfikacji Steglicha (Rys.1).

Po 40 h reakcji prowadzonej w bezwodnych warunkach i przy stosunku molowym reagentów GPC:CLA:DMP:DCC 1:4:2:4,2 uzyskano produkty z dobrą wydajnością powyżej 75% i czystością >98%. Skład izomeryczny reszt CLA w produktach fosfolipidowych był taki sam jak w kwasach tłuszczowych użytych do estryfikacji (>95%). Struktura otrzymanych fosfolipidowych koniugatów z CLA została potwierdzona metodą spektroskopową.



Rysunek 4. Struktury koniugatów fosfolipidowych z CLA

Figure 4. Structures of phospholipid conjugates of CLA

Drugą grupą otrzymanych związków były heteropodstawione fosfatydylocholino, zawierające określony izomer CLA w pozycji *sn*-1 lub *sn*-2. Synteza tych związków zakładała dwa etapy: (i) otrzymanie odpowiednich 1-acylo LPC z zastosowaniem DBTO, (ii) estryfikację Steglicha (Rys. 2). Ponieważ po

pierwszym etapie procesu, pomimo zastosowanych różnych metod ekstrakcji nie udało się wyizolować produktu z zadowalającą czystością i wydajnością zastosowano alternatywne podejście. Polegało one na hydrolizie odpowiednich homopodstawionych fosfatydylocholin (distearoil-PC, 1,2-*c*9,*t*11CLA-PC oraz 1,2-*t*10,*c*12CLA-PC) w odwróconych micelach przy użyciu fosfolipazy A₂ z trzustki wieprzowej jako katalizatora (Rys. 3). Wydajność izolowana poszczególnych 1-acylo LPC (Rys. 4B) w tym przypadku mieściła się w zakresie 89-99%. W kolejnym etapie 1-acylo-LPC poddano acylowaniu, czego efektem było uzyskanie dwóch typów heteropodstawionych PC: zawierających resztę kwasu stearynowego (SA) w pozycji *sn*-1 oraz izomer CLA w pozycji *sn*-2, oraz z odwrotnym podstawieniem tych reszt kwasowych (Rys. 4C). Wyniki analizy pozycyjnej wszystkich badanych heteropodstawionych PC ujawniły, niewielkie ilości produktu ubocznego (ok. 10%), który był wynikiem częściowej migracji reszt acylowych z pozycji *sn*-1 do pozycji *sn*-2 w LPC. Prawdopodobnym powodem mógł być lekko kwaśny charakter żelu krzemionkowego stosowanego na etapie oczyszczania 1-acylo LPC metodą chromatografii kolumnowej. Badania dowodzą, że w roztworach lizofosfatydylocholin o pH 6-9 ustala się stan równowagi, w którym stosunek 1-acylo LPC do 2-acylo LPC wynosi 9:1 [19].

Wykonano testy biologiczne na aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworowych białaczki promielocytowej (HL-60), raka piersi (MCF-7) i raka jelita grubego (HT-29) w celu określenia zależności struktura-aktywność pomiędzy poszczególnymi grupami koniugatów fosfolipidowych z izomerami CLA. Wszystkie heteropodstawione PC wykazywały mniejszy efekt cytotoksyczny od homopodstawionych PC, a w badaniach nie wykazano różnicy pomiędzy efektem antyproliferacyjnym dla PC z CLA w pozycji *sn*-2 a PC z CLA w pozycji *sn*-1. Wśród homopodstawionych fosfatydylocholin, 1,2-*c*9,*t*11CLA-PC wykazywała lepszą aktywność w stosunku do linii HL-60 i MCF-7 niż PC z dwoma resztami izomeru *t*10,*c*12CLA. Z kolei w przypadku testów na linii HT-29 aktywniejsze okazały się zarówno homo- jak i heterokoniugaty PC z izomerem *t*10,*c*12CLA. Lizofosfatydylocholin wykazały wyższą cytotoksyczność od PC w przypadku testów na liniach HL-60.

Kolejne badania [20] dowiodły, że nanonośniki lipidowe (stałe nanocząstki lipidowe, SLN oraz nanostrukturalne nośniki lipidowe, NLC) w których wykorzystano koniugaty fosfolipidowe z CLA (1,2-diCLA-PC) jako jeden z surfaktantów stabilizujących dyspersję charakteryzowały się wysoką stabilnością i bardzo dobrymi parametrami fizycznymi. Co najważniejsze wykazywały lepszy efekt nekrotyczny w stosunku do komórek ludzkiego raka naskórkowego (A431) i czerniaka złośliwego skóry (MeWo) w porównaniu do nanonośników stabilizowanych distearoilofosfatydylocholiną (1,2-diSA-PC). Te obiecujące wyniki

badają potwierdzają, że koniugaty fosfolipidowe z CLA mogą znaleźć zastosowanie nie tylko jako stabilizatory nanoosników, ale mogą działać wspólnie z innym lekiem lub markerem poddanym enkapsulacji w macierzy lipidowej, a tym samym znaleźć zastosowanie w skojarzonych terapiach farmakologicznych.

1.2. KONIUGATY FOSFOLIPIDOWE Z DHEA

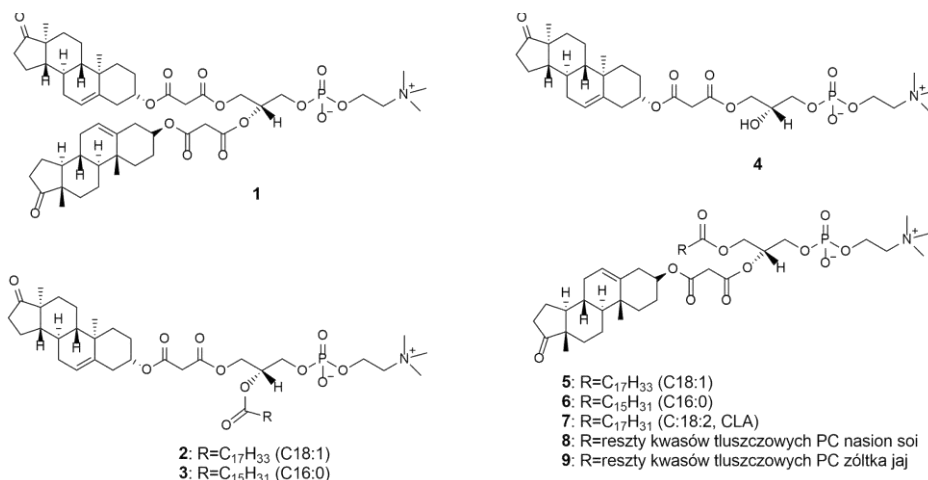
Dehydroepiandrosteron (DHEA) to naturalnie występujący androgenny steroid, który wytwarzany jest głównie w warstwie siatkowatej kory nadnerczy z 17-hydroksypregnenolonu. DHEA jest istotnym związkiem w biosyntezie hormonów płciowych, takich jak testosteron czy estradiol [21]. Szeroki zakres jego działania sprawił, że określa się go mianem „superhormonu”. Wykazano aktywność przeciwnowotworową DHEA wobec kilku linii komórek nowotworowych [22]. Udowodniono również jego przydatność w leczeniu otyłości, obniżaniu poziomu cholesterolu i glukozy we krwi, wzmacnianiu układu odpornościowego, poprawie pamięci, czy spowalnianiu postępów chorób Alzheimera i Parkinsona [23].

Ponieważ fosfolipidy mogą być efektywnymi nośnikami DHEA postanowiono otrzymać pochodne fosfatydylocholiny (PC) zawierające kowalencyjnie związaną cząsteczkę DHEA w pozycjach *sn*-1 i/lub *sn*-2 [3].

DHEA nie posiada wolnej grupy karboksylowej, wykorzystano więc kwas bursztynowy jako łącznik do wytworzenia wiązania estrowego z grupami hydroksylowymi szkieletu glicerolowego. DHEA został zestryfikowany bezwodnikiem bursztynowym w obecności DMAP, a otrzymany z wysoką wydajnością (96%) monobursztynian DHEA (suc-DHEA) posłużył w kolejnych etapach do estryfikacji pozycji *sn*-1 i/lub *sn*-2.

Uzyskano 9 pochodnych fosfatydylocholiny zawierających w swojej strukturze jedną lub dwie cząsteczki DHEA (Rys. 5).

Homopodstawioną di-(suc-DHEA)-PC (**1**) uzyskano w reakcji estryfikacji metodą Steglicha (Rys. 1). Przy zastosowaniu 4-krotnego nadmiaru monobursztynianu DHEA w stosunku do GPC otrzymano produkt estryfikacji obu pozycji (*sn*-1 i *sn*-2) z wydajnością 52%. Dwie fosfatydylocholiny (**2**, **3**) zawierające przyłączone resztkę suc-DHEA w pozycji *sn*-1 a kwas oleinowy lub palmitynowy w pozycji *sn*-2 otrzymano na ścieżce syntezy wg [24] (Rys. 2). W pierwszej kolejności z monobursztynianu DHEA w reakcji z 3-krotnym nadmiarem chlorku oksalilu otrzymano z bardzo wysoką wydajnością (98%) jego chlorek kwasowy, który następnie poddano reakcji z acetalem dibutylocynowym glicerofosfocholiny. Uzyskaną w ten sposób 1-suc-DHEA-LPC (**4**) zestryfikowano następnie odpowiednim kwasem tłuszczowym, stosując dwukrotny nadmiar molowy kwasu.



Rysunek 5. Struktury koniugatów fosfolipidowych z DHEA
Figure 5. Structures of phospholipid conjugates of DHEA

Trzecią grupę fosfolipidów stanowiły fosfatydylocholino z resztą suc-DHEA przyłączoną w pozycji *sn*-2. Zsyntezowano 2-suc-DHEA-PC (**5-9**), które posiadały w pozycji *sn*-1: kwas palmitynowy, kwas oleinowy, CLA lub naturalne kwasy tłuszczowe fosfatydylocholino pozyskanej z nasion soi lub żółtka jaja kurzego. W pierwszym etapie, stosując opisaną wyżej metodykę D'Arrigo uzyskano syntetyczne 1-acylo-LPC zawierające reszty kwasów palmitynowego, oleinowego lub CLA. Naturalne 1-acylo-LPC otrzymano natomiast w wyniku hydrolizy enzymatycznej naturalnych PC wyizolowanych z soi i żółtka jaja, prowadzonej w obecności fosfolipazy A₂ (PLA₂) z trzustki wieprzowej [14]. W kolejnym etapie syntezy ponownie wykorzystując metodę estryfikacji Steglicha przyłączano resztą suc-DHEA do pozycji *sn*-2 lizofosfatydylocholin uzyskując pożądane fosfatydylocholino z dobrymi wydajnościami (61-82%).

Uzyskane pochodne PC posiadające steroidowe ugrupowanie DHEA zostały poddane badaniom na aktywność antyproliferacyjną wobec prawidłowej linii komórkowej mysich fibroblastów (Balb/3T3) oraz nowotworowych linii: białaczki promielocytowej (HL-60), mysiego czerniaka (B16) oraz raka prostaty (LNCaP). Żaden z otrzymanych fosfolipidów nie wykazywał toksyczności wobec prawidłowych komórek mysich fibroblastów (Balb/3T3). Najbardziej aktywnym związkiem wobec wszystkich linii komórek nowotworowych była fosfatydylocholina (**7**) posiadająca w pozycji *sn*-1 kwas CLA a DHEA w pozycji *sn*-2. Fosfolipidy zawierające tylko DHEA czyli di-(suc-DHEA)-PC (**1**) i 1-suc-DHEA-LPC (**4**) pozostały nieaktywne w stosunku do wszystkich linii komórkowych.

1.3. KONIUGATY FOSFOLIPIDOWE Z NIESTEROIDOWYMI ZWIĄZKAMI PRZECIWZAPALNYMI (NLPZ)

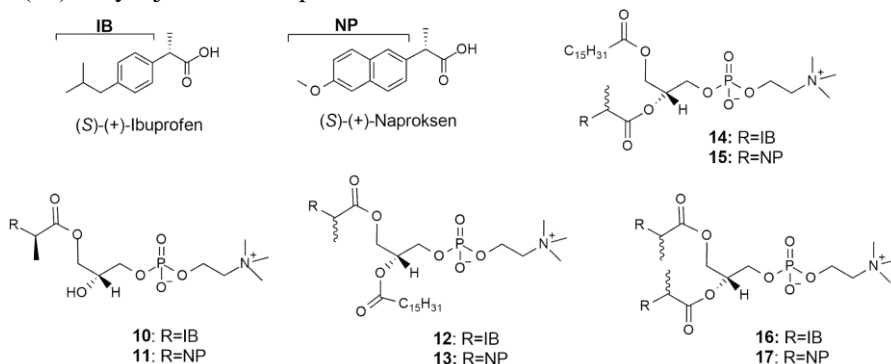
Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe [25] i są obecnie jednymi z najczęściej stosowanych leków na świecie. Stosuje się je również wspomagająco przy chorobach reumatoidalnych oraz dnie moczanowej [26-28]. Udowodniono również ich właściwości antynowotworowe [29-33]. NLPZ to bardzo zróżnicowana strukturalnie grupa związków, wśród których najbardziej znane to pochodne kwasu 2-arylopropionowego (profeny), do których należą między innymi ibuprofen i naproksen.

Oprócz pozytywnych oddziaływań na organizm człowieka, NLPZ posiadają także niepożądane skutki uboczne. Jednym z najpoważniejszych jest uszkodzanie błony śluzowej przewodu pokarmowego, co prowadzi do powstawania owrzodzeń i różnego rodzaju krwawień [34,35]. Z racji tego, że hydroliza fosfolipidów następuje dopiero w jelitach, interesującym wydaje się wykorzystanie tych związków jako nośników NLPZ. Przeprowadzono więc badania nad wbudowaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych z grupy profenów do struktury fosfatydylocholin [5]. (*S*)-(+)-Ibuprofen (IBU) oraz (*S*)-(+)-naproksen (NAP) posiadają grupy karboksylowe, mogą więc tworzyć bezpośrednio wiązanie estrowe z grupami hydroksylowymi szkieletu glicerolowego PL.

Zsyntetyzowano osiem koniugatów w tym 6 fosfatydylocholin z ibuprofenem lub naproksenem w pozycjach *sn*-1 i/lub *sn*-2 oraz dwie lizofosfatydylocholinę zawierające NLPZ w pozycji *sn*-1 (Rys. 6). Ścieżkę syntezy rozpoczęto od otrzymania odpowiednich 1-acylo-LPC. Najpierw zsyntezowano chlorki kwasowe *S*-profenów w wyniku reakcji z chlorkiem oksalilu w obecności katalitycznych ilości bezwodnego dimetyloformamidu (DMF). Następnie zastosowano wspomnianą wcześniej metodę acylowania *sn*-glicero-3-fosfocholiny chlorkiem odpowiedniego kwasu z wykorzystaniem DBTO oraz trietyloaminy (Rys. 2). Uzyskano 1-NAP-LPC (**10**) oraz 1-IBU-LPC (**11**) z dobrymi wydajnościami (odpowiednio 70 i 68%). W kolejnym etapie odpowiednią 1-acylo LPC estryfikowano metodą Steglicha z kwasem palmitynowym (PA) otrzymując fosfatydylocholinę **12** i **13**, z wydajnościami odpowiednio 25% i 57%. PC z wbudowanymi NLPZ w pozycji *sn*-2 i kwasem palmitynowym w pozycji *sn*-1 uzyskano w analogicznej ścieżce. Najpierw przygotowano 1-PA-LPC z chlorku palmitoilu, a następnie estryfikowano ją ibuprofenem lub naproksenem ponownie stosując warunki Steglicha. Wydajności otrzymanych produktów (**14**, **15**) w tym wypadku wynosiły 41% i 53%

Fosfatydylocholinę zawierające ugrupowania ibuprofenu lub naproksenu w obu pozycjach *sn*-1 i *sn*-2 zsyntetyzowano w jednoetapowej estryfikacji Steglicha dwóch

wolnych grup hydroksylowych GPC w obecności czterokrotnego molowego nadmiaru ibuprofenu lub naproksenu. Uzyskano 1,2-diIBU-PC (**16**) oraz 1,2-diNAP-PC (**17**) z wydajnościami odpowiednio 61% i 72%.



Rysunek 6. Struktury koniugatów fosfolipidowych z NLPZ
Figure 6. Structures of phospholipid conjugates of NSAIDs

W prowadzonych warunkach syntezy przyłączone cząsteczki *S*-profenów ulegały racemizacji, prowadząc w rezultacie do uzyskania fosfatydylocholin (**12-17**) w postaci mieszanin diastereoizomerów. Izomeryzacja zachodziła w obecności DMAP oraz DCC i była prawdopodobnie wynikiem enolizacji grupy karboestrowej z udziałem H węgla asymetrycznego *S*-profenów.

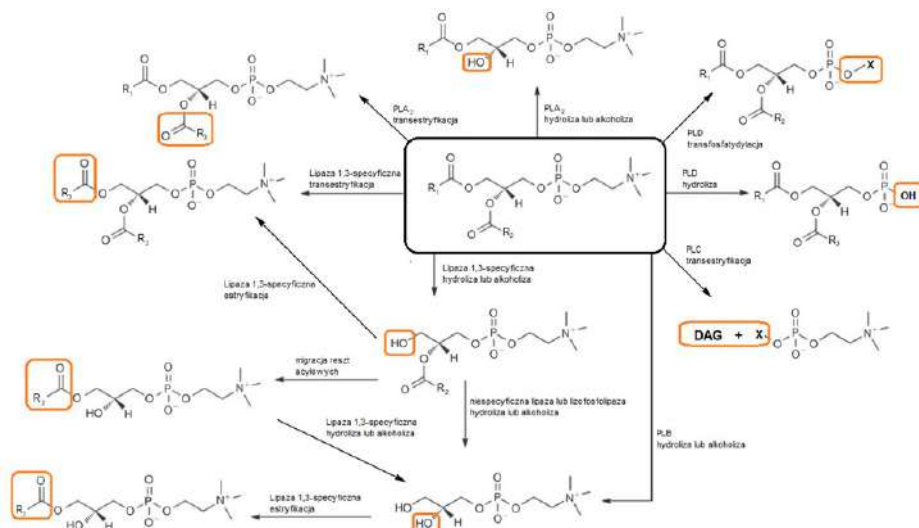
Przeprowadzono również porównawcze badania cytotoksyczności ibuprofenu, naproksenu oraz ich fosfolipidowych koniugatów wobec komórek ludzkiej białaczki promielocytowej (HL-60), ludzkiego raka jelita grubego (Caco-2) oraz prawidłowych komórek nabłonka jelita świńskiego (IPEC-J2). Wyniki tych badań wskazywały, że fosfolipidy z NLPZ w obu pozycjach (**14** i **15**) były bardziej cytotoksyczne niż sam ibuprofen lub naproksen, natomiast zarówno 1-NAP-LPC oraz 1-IBU-LPC były mniej toksyczne wobec wszystkich badanych linii komórkowych. Z kolei fosfolipidy z NLPZ w pozycji *sn*-1 i kwasem palmitynowym w *sn*-2 (**10** i **11**) wykazywały niższą cytotoksyczność wobec komórek Caco-2 i komórek prawidłowych (IPEC-J2) niż związki referencyjne.

2. MODYFIKACJE ENZYMATYCZNE GLICEROFOSFOLIPIDÓW

Wykorzystywanie enzymów, jako biokatalizatorów w syntezie i modyfikacji fosfolipidów, niesie wiele korzyści ze względu na selektywność katalizowanych reakcji, ale także ze względu na to, że wpisują się one w nowoczesne proekologiczne metody biotechnologii zalecane przez Green Chemistry.

Wymianę reszt acylowych w fosfolipidach można przeprowadzić na kilka sposobów (Rys. 7). Pierwszym z nich jest dwuetapowa modyfikacja polegająca na wstępnej lizie fosfolipidów, wyodrębnieniu powstałego lizofosfolipidu i jego estryfikacji wybranym donorem reszt acylowych, w wyniku czego otrzymuje się zmodyfikowany fosfolipid. Lizę można przeprowadzić w środowisku wodnym (hydroliza) lub w środowisku bezwodnym, w obecności alkoholu jako czynnika lizującego (alkoholiza).

Drugą z metod modyfikacji PL jest ich bezpośrednia transestryfikacja z użyciem kwasu karboksylowego (acydoliza) lub estrów tych kwasów (interestryfikacja). Mimo że procesy transestryfikacji prowadzi się bezpośrednio, używając jako substratu fosfolipidu, to wymiana reszty acylowej zajdzie tylko wtedy, gdy w mieszaninie reakcyjnej część substratu ulegnie hydrolizie. Zatem zarówno w procesach jedno-, jak i dwuetapowych kluczowym etapem jest powstawanie puli cząsteczek lizofosfolipidu będącego substratem dla enzymatycznego podstawienia pożądaną grupą acylową.



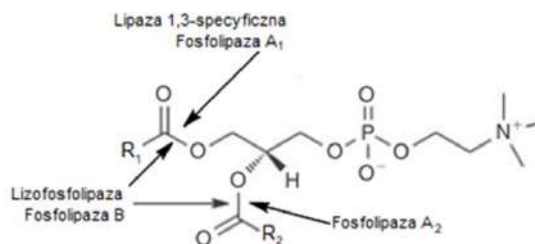
Rysunek 7. Enzymatyczne metody modyfikacji glicerofosfolipidów
Figure 7. Enzymatic method for modification of glycerophospholipids

Obie metody są szeroko stosowane w modyfikacjach fosfolipidów. Posiadają swoje zalety i wady, a dobór odpowiedniej z nich podyktowany jest zazwyczaj żądaną czystością produktu końcowego [36].

Enzymami wykorzystywanymi do modyfikacji części hydrofobowej glicerofosfolipidów są fosfolipazy i *sn*-1,3 regioselektywne lipazy (Rys. 8). Fosfolipaza A₁ (1-acylohydrolaza fosfatydylocholiny, PLA₁) i fosfolipaza A₂ (2-acylohydrolaza fosfatydylocholiny, PLA₂) należą do hydrolaz, które specyficznie

hydrolizują wiązanie estrowe odpowiednio w pozycji *sn*-1 i *sn*-2 glicerofosfolipidów [37]. Natomiast fosfolipaza B hydrolizuje oba wiązania estrowe zarówno w pozycji *sn*-1 jak i *sn*-2.

Wiele lipaz charakteryzuje się większą stabilnością od fosfolipazy A₁ oraz większą dostępnością w formie preparatów komercyjnych zarówno w postaci liofilizowanej, immobilizowanej (Lipozyme TL IM, Novozyme 435) jak i w formie roztworów. W porównaniu do PLA₁ i PLA₂ nie wymagają jonów wapnia oraz pozostają aktywne w aktywności wody poniżej 0,22 [38].



Rysunek 8. Regioselektywność enzymów wykorzystywanych do modyfikacji glicerofosfolipidów
Figure 8. Regioselectivity of enzymes used to modify glycerophospholipids

2.1. STRUKTURYZOWANE FOSFOLIPIDY Z BIOAKTYWNYMI KWASAMI TŁUSZCZOWYMI

Enzymatyczne modyfikacje glicerofosfolipidów umożliwiają między innymi wymianę obecnych oryginalnie w fosfolipidach kwasów tłuszczowych na inne, biologicznie aktywne kwasy, a co za tym idzie zmianę wartości żywieniowych takich fosfolipidów. Prowadzone badania miały na celu uzyskanie strukturyzowanych fosfolipidów wzbogaconych w kwasy tłuszczowe o znaczeniu prozdrowotnym, w tym kwasy wielonienasycone (WNKT) *n*-3 i *n*-6 oraz zawierające sprzężone układy wiązań podwójnych. Proces otrzymywania fosfolipidów wzbogaconych o zdefiniowane kwasy tłuszczowe w określonych pozycjach szkieletu glicerolowego (strukturyzowanych fosfolipidów, SPL) przeprowadzono na drodze enzymatycznej modyfikacji fosfatydylocholiny (PC) uzyskanej z żółtek jaj kurzych [6-12,39].

2.1.1. Wzbogacanie PC żółtka jaja w kwasy *n*-3 i *n*-6 WNKT

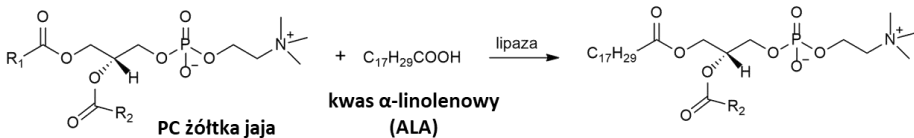
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny *n*-3, w tym kwasy α -linolenowy (ALA, C18:3, 9,12,16, all *cis*), dokozaheksaenowy (DHA, C22:6, 4,7,10,13,16,19, all *cis*) i eikozapentaenowy (EPA, 20:5, 5,8,11,14,17, all *cis*) wpływają korzystnie na gospodarkę lipidową organizmu, wykazują właściwości przeciwzakrzepowe i przeciwpalne, a także działanie ochronne na układ sercowo-naczyniowy [40,41].

DHA i EPA wykazują bardzo wysoką aktywność biologiczną. Obniżają poziom cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL, zapobiegają stłuszczeniu wątroby [42,43]. DHA odpowiada za prawidłową pracę mózgu oraz jest niezbędny do tworzenia odpowiedniej ilości połączeń synaptycznych i zachowania plastyczności neuronów [44,45]. EPA przypisuje się aktywność w hamowaniu rozwoju niektórych rodzajów guzów nowotworowych [46,47]. Kwasy *n*-6 WNKTY są ważnymi związkami biorącymi udział w utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcjonowania skóry [48]. Kwas linolowy (LA, C18:2, 9,12, all *cis*) wbudowywany jest w ceramidy będące swoistym uszczelniaczem skóry, chroni więc organizm przed nadmierną utratą wody [49]. Z kolei kwas γ -linolenowy (GLA, C18:3; 6,9,12, all *cis*) poprawia przepływ krwi w naczyniach krwionośnych, jest również niezbędny w profilaktyce i leczeniu suchej, podrażnionej i zaczerwienionej skóry [50].

Większość tych kwasów (ALA, GLA, EPA, DHA,) nie występuje w naturalnej fosfatydylocholinie żółtka jaja lub występuje w niewielkiej ilości (LA), przeprowadzono więc szereg badań prowadzących do otrzymania strukturyzowanej PC (SPC) wzbogaconej w kwasy *n*-3 i *n*-6 WNKTY.

Analiza składu kwasów tłuszczowych czystej fosfatydylocholiny wyizolowanej z żółtek jaj kurzych wykazała, że dominującymi w niej kwasami są nasycony kwas palmitynowy (C16:0, ok. 40%) oraz mononienasycony kwas oleinowy (C18:1, *c*9, ok. 27%). Ze względu na brak w naturalnej fosfatydylocholinie kwasu α -linolenowego, będącego prekursorem polienowych kwasów tłuszczowych z rodziny *n*-3, w pierwszej kolejności opracowano metodę enzymatycznego wprowadzenia tego kwasu do jej cząsteczki [7,51].

Podjęto próby wzbogacenie PC w kwas α -linolenowy zarówno w pozycji *sn*-1 jak i *sn*-2 [51]. Do modyfikacji pozycji *sn*-1 PC wykorzystano jednoetapowy proces acydolizy (Rys. 9), w którym jako donor grup acylowych zastosowano dostępną komercyjnie mieszaninę kwasów tłuszczowych, zawierającą ponad 70% ALA.

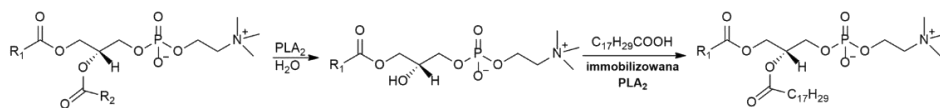


Rysunek 9. Schemat katalizowanej lipazami acydolizy fosfatydylocholiny z kwasem α -linolenowym
 Figure 9. Scheme of lipase-catalyzed acidolysis of phosphatidylcholine with α -linolenic acid

Trzy komercyjnie dostępne preparaty immobilizowanych lipaz: Novozym 435 (CALB, lipaza B z *Candida antarctica*), Lipozyme® (RML, lipaza z *Mucor miehei*) oraz Lipozyme TL IM (TLL, lipaza z *Thermomyces lanuginosus*) przetestowano jako biokatalizatory w tym procesie. Warunki reakcji były następujące: temperatura 52-

55 °C, ponad 5-krotny nadmiar kwasów w stosunku do PC, 20% dodatek enzymu w stosunku do masy substratów oraz heptan jako medium reakcyjne.

Wprowadzenie ALA w pozycję *sn*-2 wymagało zastosowania procesu dwuetapowego, obejmującego regioselektywną hydrolizę fosfatydylocholine do 1-acylo LPC, którą przeprowadzono na całej masie żółtka. Następnie wyizolowaną z mieszaniny produktów 1-acylo LPC poddano procesowi estryfikacji kwasem α -linolenowym (Rys. 10). Oba etapy były katalizowane przez fosfolipazę A_2 - hydrolizę przeprowadzono w zawiesinie żółtka przy użyciu płynnego preparatu enzymatycznego a przed etapem estryfikacji enzym był unieruchomiony na Supelite DAX-8.



Rysunek 10. Schemat dwuetapowego procesu wprowadzania ALA w pozycję *sn*-2 fosfatydylocholine
Figure 10. Scheme of a two-step process of introducing ALA into the *sn*-2 position of phosphatidylcholine

Ponieważ użyte w procesach enzymy (lipazy oraz PLA_2) wykazują selektywność tylko wobec jednej pozycji (*sn*-1 lub *sn*-2 PC) teoretycznie przy 100% wydajności procesów (acydoliza PC lub estryfikacja 1-acylo LPC) maksymalny stopień wbudowania nowego kwasu, jaki można osiągnąć w tego typu procesach wynosi 50%.

Najwyższy stopień inkorporacji ALA w pozycję *sn*-1 (28%) uzyskano w procesie acydolizy z użyciem immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (Tab. 1). Pozostałe lipazy charakteryzowały się niższą aktywnością, przy czym wszystkie zastosowane preparaty wykazywały regioselektywność wobec pozycji *sn*-1, o czym świadczyła zmniejszona zawartość kwasów nasyconych w PC po procesach modyfikacji. Fosfolipaza A_2 również efektywnie wbudowała cząsteczkę ALA w procesie estryfikacji 1-acylo LPC. W tym wypadku w reakcji prowadzonej w toluenie uzyskano około 25%-owe wbudowanie kwasu w pozycję *sn*-2 fosfatydylocholine.

Kolejne badania nad otrzymaniem strukturyzowanych fosfolipidów wzbogaconych w WNKT skupiły się na reakcjach z użyciem *sn*-1,3-regioselektywnych lipaz, gdyż enzymy te pozwalają na wprowadzanie takich kwasów w cząsteczkę fosfolipidu z zachowaniem nienasyconych kwasów tłuszczowych (C18:1, C18:2 i C20:4) naturalnie występujących w pozycji *sn*-2 szkieletu glicerolowego PC.

Tabela 1. Profil kwasów tłuszczowych [% wg GC] w fosfatydylocholinie wyizolowanej z żółtka jaja kurzego oraz uzyskanej po modyfikacji enzymatycznej
 Table 1. Fatty acid profile [% acc. to GC] in egg yolk phosphatidylcholine and obtained after enzymatic modification

Kwas tłuszczowy	PC żółtka jaja			Enzymatycznie modyfikowana PC			
	Total	sn-1	sn-2	Modyfikacja pozycji sn-1			Modyfikacja pozycji sn-2
				Novozym 435	Lipozyme RM IM	Lipozyme TL IM	PLA ₂ (Lecitase 10L)
C16:0	40	66	1	6	16	24	43
C16:1	1	2	-	1	<1	<1	<1
C18:0	17	28	1	3	6	11	17
C18:1	27	3	55	30	27	28	4
C18:2	12	1	35	30	26	23	10
C18:3 ALA	-	-	-	28	23	12	25
C20:4	3	-	8	2	1	1	-

Badania dotyczące wzbogacenia fosfatydylocholinie w EPA i DHA objęły dwa etapy: otrzymanie koncentratu WNKT z oleju z wątroby dorsza, a następnie zastosowanie go jako donora grup acylowych w procesie katalizowanej lipazami acydolizy PC [8]. Koncentrat otrzymano wykorzystując znaną metodę kompleksowania mocznikiem wcześniej zhydrolizowanego oleju [52]. Wyjściowy olej zawierał 27% *n*-3 WNKT. Kompleksowanie mocznikiem pozwoliło na uzyskanie koncentratu zawierającego ponad trzykrotnie większą ilość *n*-3 WNKT (87%), w którym DHA i EPA stanowiły odpowiednio 45% oraz 27%.

Reakcje acydolizy PC uzyskanym koncentratem WNKT prowadzono w standardowych warunkach procesu acydolizy, ustalonych na podstawie wcześniejszych badań [7]. Wyjściową fosfatydylocholinę wyizolowano z żółtek jaj pochodzących od kur karmionych paszą wzbogaconą w WNKT, zawierała więc ona niewielkie ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z rodziny *n*-3 (około 4%).

Tym razem zbadano aktywność 7 różnych lipaz jako biokatalizatorów oraz przeprowadzono dobór optymalnych warunków procesu acydolizy (rodzaj rozpuszczalnika, stosunek molowy substratów oraz ilość dodanego enzymu). Warunki procesu acydolizy katalizowanej Novozymem 435 (heksan jako medium reakcyjne, temperatura 55° C, 1/3 stosunek molowy PC/WNKT, 20% dodatek enzymu, czas reakcji 48 godzin) pozwoliły na otrzymanie strukturyzowanej PC (SPC) zawierającej 27,5% *n*-3 WNKT (Tab. 2). Kwasem, który wprowadzony został w największej ilości do fosfolipidów był DHA (17,6%).

Czynnikiem, który najbardziej wpływał na proces inkorporacji kwasów EPA i DHA do cząsteczki PC okazała się ilość koncentratu kwasów WNKT w mieszaninie reakcyjnej. Zwiększenie stosunku molowego PC/WNKT z 1/3 do 1/10 w procesie

prowadzonym w heksanie z 20% dodatkiem enzymu, skutkowało zwiększeniem zawartości kwasów *n*-3 w zmodyfikowanej PC z 27,5% nawet do 45,5%, niestety znacząco spadła wydajność z jaką uzyskiwano zmodyfikowaną PC.

Tabela 2. Skład kwasów tłuszczowych [% wg GC] w fosfatydylocholinie natywnej (PC żółtka jaja) oraz produktach jej acydolizy z koncentratem WNKT, prowadzonej w obecności Novozym 435
Table 2. Fatty acid composition [% acc. to GC] in native phosphatidylcholine (egg yolk PC) and products of its acidolysis with PUFA concentrate, carried out in the presence of Novozym 435

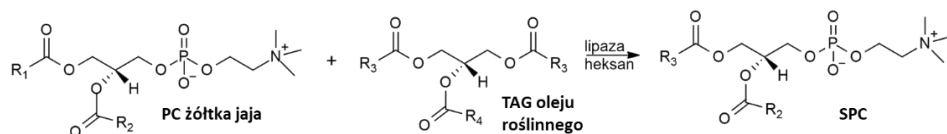
Kwas tłuszczowy	PC natywna			PC zmodyfikowana		
	Total	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	Total	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2
C16:0	34,2±0,11	64,1±0,22	0,8±0,04	15,7±0,48	28,5±0,65	0,5±0,55
C18:0	15,7±0,05	29,2±0,55	1,1±0,09	9,5±0,27	19,5±0,35	0,3±0,13
C18:1	29,0±0,04	5,5±0,33	56,3±0,32	30,1±0,09	7,5±0,12	52,1±0,95
C18:2	15,3±0,02	1,2±0,05	28,8±0,55	15,9±0,34	1,5±0,25	29,0±0,84
C18:4 SDA <i>n</i>-3	-	-	-	2,1±0,06	3,8±0,22	0,2±0,06
C20:4 <i>n</i> -6	2,0±0,01	-	4,5±0,06	1,8±0,08	3,5±0,12	0,5±0,08
C20:5 EPA <i>n</i>-3	0,6±0,02	-	1,4±0,06	7,8±0,13	14,5±0,35	1,5±0,12
C22:6 (DHA) <i>n</i>-3	3,2±0,05	-	7,1±0,22	17,6±0,11	29,1±0,84	3,2±0,55
Σ <i>n</i>-3 WNKT	3,8	0	8,5	27,5	47,4	4,9

Analiza pozycyjna SPC wykazała, że kwasy EPA i DHA wbudowały się prawie całkowicie w pozycję *sn*-1, zastępując kwasy nasycone występujące w tej pozycji w fosfatydylocholinie natywnej. Zaproponowana metoda pozwala więc na uzyskanie 1-DHA-PC w łagodnych warunkach procesu, z naturalnych substratów (PC żółtka jaja, olej z wątroby dorsza) przy udziale komercyjnie dostępnej regioselektywnej lipazy (Novozym 435).

Ponieważ w naturze można znaleźć oleje bogate w bioaktywne kwasy tłuszczowe, kolejnym aspektem badań było zastosowanie naturalnych triacylogliceroli (TAG), czyli olejów roślinnych w procesach enzymatycznego wzbogacania fosfolipidów w *n*-3 i *n*-6 WNKT [51]. W przypadku wzbogacenia PC w kwas α -linolenowy (*n*-3 WNKT) takim surowcem był olej lniany zawierający ok. 58% kwasu α -linolenowego. W celu zwiększenia ilości *n*-6 WNKT, jako źródło tych kwasów wykorzystano oleje słonecznikowy, krokoszowy oraz olej z wiesiołka (zawierające ponad 70% kwasu linolowego,) a także olej z ogórecznika (zawierający 40% LA). Dodatkowo oleje z wiesiołka oraz ogórecznika zawierały niewielkie ilości kwasu γ -linolenowego (*n*-6 WNKT), odpowiednio 10% oraz 20%.

Tym razem zaproponowano metodę opartą na procesie interstryfikacji czyli wymianie reszt acylowych pomiędzy fosfolipidem a triacyloglicerolami oleju roślinnego (Rys. 11). W badaniach przetestowano aktywność tych samych trzech

komercyjnie dostępnych preparatów immobilizowanych lipaz. Zastosowano podobne warunki reakcji, zmniejszono jedynie stosunek molowy substratów PC/TAG z 1/5 na 1/2, gdyż wykorzystany w tym procesie donor grupy acylowej czyli TAG zawiera w jednej cząsteczce aż dwa dostępne dla lipaz łańcuchy kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1 i *sn*-3.



Rysunek 11. Schemat katalizowanej lipazami interestryfikacji fosfatydylocholin - olejami roślinnymi
Figure 11. Scheme of lipase-catalyzed interesterification of phosphatidylcholine with plant oils

Preparat immobilizowanej lipazy z *C. antarctica* (Novozym 435) ponownie najefektywniej wprowadzał zarówno kwasy *n*-3 jak i *n*-6 do cząsteczki PC (Tab. 3).

Tabela 3. Skład kwasów tłuszczowych [% wg GC] w fosfatydylocholinie natywnej (PC żółtka jaja) oraz produktach jej interestryfikacji olejami roślinnymi, katalizowanej przez Novozym 435
Table 3. Fatty acid composition [% acc. To GC] in native phosphatidylcholine (egg yolk PC) and products of its interesterification with plant oils, catalyzed by Novozym 435

Kwasy tłuszczowe	PC żółtka jaja	SPC (olej lniany)	SPC (olej krokoszowy)	SPC (olej słonecznikowy)	SPC (olej z wiesiołka)	SPC (olej z ogórecznika)
C16:0	30	8	8.8	13.9	9.4	15.7
C16:1	1.5	1	-	-	-	-
C18:0	15	3	5.4	8.0	4.5	9.2
C18:1	28	28	39.5	35.7	32.2	35.5
C18:2 (LA)	20	22	43.9	38.7	46.7	28.2
C18:3 (ALA)	-	34	-	-	-	-
C18:3 (GLA)	-	-	-	-	4.0	7.3
C20:4 (ARA)	4.5	3	2.4	3.7	3.2	4.1
Σ <i>n</i> -6 WNKT	24.5	25	46.3	42.4	53.9	39.6
Σ <i>n</i> -3 WNKT	-	34	-	-	-	-

W procesie interestryfikacji PC olejem lnianym uzyskano strukturyzowaną fosfatydylocholinę (SPC) zawierającą w składzie kwasów tłuszczowych aż 34% ALA, nieznacznie więcej niż w procesie acydolizy PC katalizowanej przez ten enzym [7]. Regioselektywność zastosowanej lipazy spowodowała znaczące obniżenie zawartości kwasów nasyconych (z 45% do 11%) w uzyskanej SPC, natomiast zawartość kwasów mononienasyconych pozostała na zbliżonym poziomie jak w PC natywnej. Oprócz uzyskania fosfatydylocholinę zawierającej ponad 35% kwasów *n*-

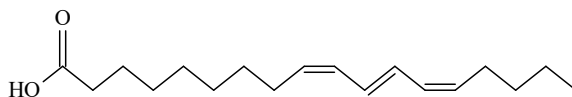
3 WNKT (w tym 34% ALA), nastąpiła istotna redukcja stosunku $n-6/n-3$ WNKT w PC z 24,5 do 0,7, co jest bardzo istotne z punktu zastosowania takiego produktu jako suplementu diety. Niższy stosunek kwasów tłuszczowych $n-6/n-3$ jest bardziej pożądany w diecie gdyż zmniejsza ryzyko wielu chorób przewlekłych, w tym chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów oraz chorób zapalnych i autoimmunologicznych [53].

W procesie interestryfikacji PC żółtka jaja olejami bogatymi w kwas linolowy (olejem krokoszowym, słonecznikowym czy olejem z wiesiołka) uzyskano porównywalne wyniki wbudowania LA do PC. Maksymalny wzrost zawartości tego kwasu w cząsteczce PC z 20% do 46,7% osiągnięto przy zastosowaniu preparatu Novozym 435 i oleju z wiesiołka jak dawcy acylu. W przypadku olejów krokoszowego i słonecznikowego w obecności tego samego enzymu zawartość LA w SPC wzrosła odpowiednio do 43,9 i 38,7% (Tab. 3). Zastosowanie oleju z wiesiołka pozwoliło na uzyskanie produktu o bardzo niskiej zawartości kwasów nasyconych (14%) i około 54%-owej zawartości kwasów $n-6$ niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), w tym 46,7% LA i 4% GLA. Zastosowanie oleju z ogórecznika w procesie interestryfikacji katalizowanej tą samą lipazą również dało produkt zawierający oba te kwasy w ilościach 28% LA i 7% GLA.

2.1.2. Wzbogacanie PC żółtka jaja w sprzężony kwas linolenowy (CLnA)

Zaproponowana metoda interestryfikacji fosfatydylocholino żółtka jaja kurzego z wykorzystaniem TAG olejów roślinnych została również wykorzystana do uzyskania SPC wzbogaconej w kwas punikowy [9].

Kwas punikowy (9Z,11E,13Z – oktadekatrienowy) należy do grupy izomerów sprzężonych kwasów linolenowych, które są geometrycznymi i pozycyjnymi izomerami kwasu linolenowego (18:3), zawierającymi układ trzech sprzężonych wiązań podwójnych (Rys. 12).



Rysunek 12. Wzór kwasu punikowego, 18:3; 9Z,11E,13Z oktadekatrienowego
Figure 12. Formula of puniceic acid, 18:3; 9Z,11E,13Z octadecatrienoic acid

CLnA wykazują szereg korzyści zdrowotnych [54-56] m.in. właściwości antykancerogenne. Udowodniono cytotoksyczne działanie kwasu punikowego wobec linii komórkowych nowotworów piersi, prostaty i okrężnicy. Liczne badania

potwierdzają również działania antyoksydacyjne, regulujące gospodarkę lipidową oraz wpływ tego kwasu na wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej.

Zimnotłoczony, nieoczyszczony olej z pestek granatu (PSO) zawierający ponad 77% kwasu punikowego w TAG, wykorzystano jako donor grupy acylowej w procesie interestryfikacji PC żółtka jaja. Wstępny skrining enzymów ponownie wykazał najwyższą aktywność lipazy B z *Candida antarctica* (Novozym 435), a analiza wpływu badanych czynników, pozwoliła na optymalizację parametrów procesu interestryfikacji katalizowanej lipazą B z *Candida antarctica* zarówno pod względem ilości wbudowanego kwasu punikowego, jak wydajności izolowania SPC. W optymalnych warunkach (1/3 stosunek molowy substratów PC/PSO, 20% dodatek enzymu, 72 godziny reakcji) można uzyskać strukturyzowaną fosfatydylocholinę zawierającą prawie 50% wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym 28,8% kwasu punikowego, z ok. 40% wydajnością izolowania SPC.

2.1.3. Wzbogacanie PC żółtka jaja w sprzężony kwas linolowy (CLA)

Podjęto również badania nad wprowadzaniem izomerów sprzężonego kwasu linolowego do fosfolipidów w procesie acydolizy fosfatydylocholiny z żółtka jaja kurzego [12]. Podczas optymalizacji procesu acydolizy musi zostać osiągnięty pewien kompromis pomiędzy stopniem wbudowania CLA, a wydajnością modyfikowanej PC. Należy więc monitorować nie tylko stopień wbudowania CLA w fosfolipidy, ale również stopień hydrolizy. Dlatego jako najbardziej złożone kryterium oceny efektywności procesu zaproponowano parametr „efektywnego wbudowania CLA” ($E_{CLA} = (\text{ilość moli CLA w PC} + \text{ilość moli CLA w LPC}) / \text{ilość moli PC poddanego acydolizie} \times 100\%$), który opisuje zawartość reszt CLA w PC i LPC w stosunku do początkowej ilości fosfatydylocholiny wykorzystanej w reakcji. Do optymalizacji procesu acydolizy wykorzystano mieszaninę izomerów *c9,t11* i *t10,c12*CLA w stosunku molowym 1:1 uzyskaną w wyniku alkalicznej izomeryzacji kwasu linolowego [17].

Przeprowadzono badania przesiewowe czterech lipaz immobilizowanych: TLL, CALB i RML oraz lipazy z *Burkholderia cepacia* (BCL) i trzech liofilizowanych lipaz: z *Aspergillus niger* (ANL), z trzustki wieprzowej (HPL) i z *Candida cylindracea* (CCL). Jedynie trzy lipazy (TLL, RML, CALB) wykazały wysoką aktywność dając produkt fosfolipidowy o zawartości CLA powyżej 20%. Najwyższe efektywne wbudowanie CLA uzyskano z wykorzystaniem lipazy z *Rhizomucor miehei* (RML), w tym przypadku E_{CLA} wyniosło 21%.

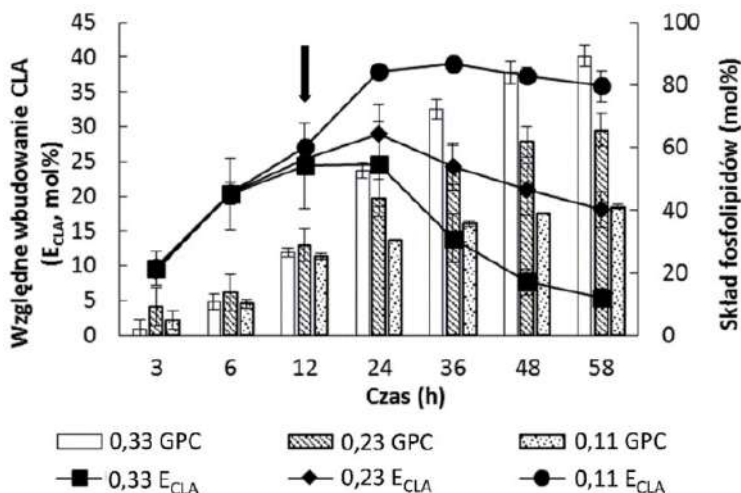
Po 24 h acydolizy prowadzonej w rozpuszczalnikach hydrofobowych (heptan, izooktan czy toluen), efektywne wbudowanie wyniosło 15-20%. W przypadku rozpuszczalników hydrofilowych (DMSO, dioksan) osiągnięto jedynie 3,5%

wbudowania. Najwyższy poziom E_{CLA} (20%) uzyskano w przypadku reakcji prowadzonej w heptanie.

Badając wpływ wody na wydajność fosfolipidów i zawartość CLA w produktach modyfikacji, przeprowadzono eksperymenty w kontrolowanej aktywności wody (a_w) w zakresie od 0,11 do 0,87, w temperaturze 55°C. Przed rozpoczęciem reakcji substraty dodatkowo inkubowano w wybranej aktywności wody przez 24 h. Najwyższe wartości efektywnego wbudowania uzyskiwano po 12 h. Całkowita zawartość PC i LPC badana w czasie, spadała szybciej w reakcjach prowadzonych przy wyższej aktywności wody. Uzyskane wyniki wskazują, że wysoka zawartość wody przyspiesza hydrolizę PC oraz migrację reszty acylowej z 2-acylo LPC, a następnie hydrolizę powstałej w jej wyniku 1-acylo LPC do GPC. Najwyższą wartość E_{CLA} otrzymano w przypadku prowadzenia reakcji w $a_w = 0,33$. W optymalnych warunkach procesu prowadzonego w heptanie, przy tej aktywności wody, w temperaturze 45°C, przy 8-krotnym nadmiarze CLA do PC i 24% zawartości enzymu w stosunku do sumarycznej masy substratów, uzyskano efektywne wbudowanie CLA na poziomie 25%.

Obniżając aktywność wody podczas acydolizy można doprowadzić do przesunięcia równowagi reakcji z hydrolizy w stronę estryfikacji, doprowadzając do powstania dodatkowej ilości fosfatydylocholiny.

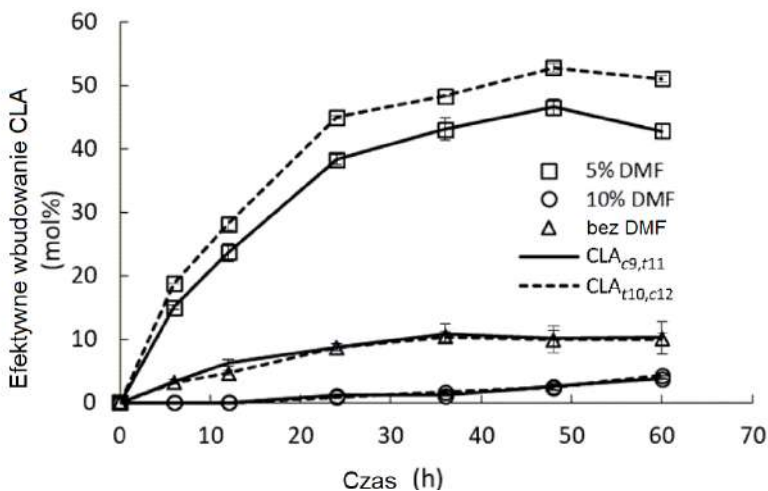
W kolejnych doświadczeniach prowadzono kontrolę aktywności wody poprzez obniżenie a_w z 0,33 do 0,23 lub 0,11 po 12 h trwania acydolizy. Po 24 h takiej reakcji prowadzonej w $a_w = 0,23$ zaobserwowano wzrost E_{CLA} o około 4%. Po 36 h reakcji, w której aktywność została zredukowana do 0,11 uzyskano E_{CLA} na poziomie 39,0%, (Rys. 13). W tych warunkach zawartość CLA w PC osiągnęła 33,8%, a w LPC 50,1%, a wydajności PC i LPC wynosiły odpowiednio 39,5 i 25,3%. Analiza składu kwasów tłuszczowych w otrzymanych produktach acydolizy wykazała, że wbudowanie CLA nastąpiło tylko w pozycję *sn*-1 fosfatydylocholiny. Wysoka zawartość reszt sprzężonego kwasu linolowego w LPC sugeruje, że lizofosfatydylocholina tworzyła się głównie poprzez estryfikację GPC w wyniku obniżenia aktywności wody.



Rysunek 13. Wpływ zmiany aktywności wody podczas acydolizy fosfatydylocholiny z żółtka jaja kurzego sprzężonym kwasem linolowym na efektywne wbudowanie CLA do PL. (Strzałka wskazuje moment zmiany aktywności wody)

Figure 13. Effect of water activity change during acidolysis of egg-yolk phosphatidylcholine with conjugated linoleic acid on the effective incorporation of CLA into PL. (Arrow points water activity change)

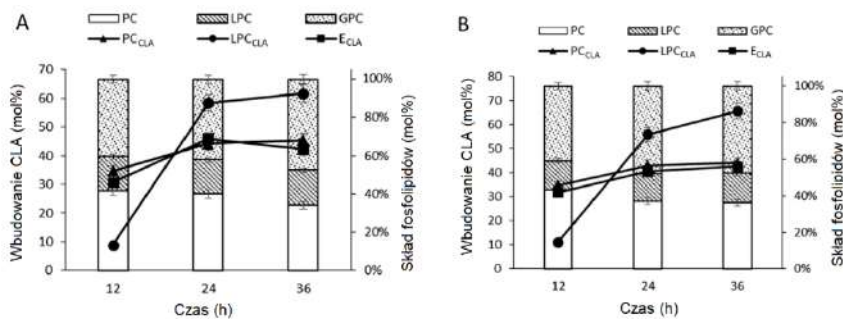
W badaniach nad opracowaniem wydajnej metody enzymatycznej syntezy fosfolipidów z pojedynczymi czystymi (>90%) izomerami *c9,t11* i *t10,c12* CLA zbadano trzy immobilizowane lipazy (RML, CALB, TLL) pod kątem specyficzności wobec izomerów CLA w acydolizie fosfatydylocholiny żółtka jaj [10]. RML i CALB charakteryzowała niewielka selektywność w stosunku do izomeru *c9,t11* CLA. TLL wykazała największą różnicę we wbudowaniu poszczególnych izomerów CLA do cząsteczki PC, które dla *c9,t11* CLA wyniosło 8,8%, a dla *t10,c12* CLA tylko 1,4%. W optymalnych warunkach reakcji prowadzonych w heptanie, w stosunku molowym PC/CLA 1:6; 24% wag. RML i przy kontroli aktywności wody, w tych badaniach zastosowano dodatek (5% lub 10%) dimetyloformamidu (DMF) jako substancji naśladowującej wodę (z ang. *water mimicking co-solvent*). Przy aktywności wody na poziomie 0,11 z 5% dodatkiem DMF po 48 h uzyskano efektywne wbudowanie *c9,t11* CLA i *t10,c12* CLA na poziomie odpowiednio 53 i 47% (Rys. 14). W porównaniu do wcześniejszych wyników acydolizy przeprowadzonej przy $a_w = 0,23$, E_{CLA} wzrosło o 25–30% jedynie w wyniku dodania rozpuszczalnika imitującego wodę i zmniejszenia aktywności wody do 0,11. Ponadto przeprowadzone badania wykazały, że lipazy wykazują selektywność względem fosfatydylocholin różniących się składem reszt kwasów tłuszczowych i lepiej akceptują natywną fosfatydylocholinę z żółtka jaja niż syntetyczną 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny.



Rysunek 14. Wpływ dodatku dimetyloformamidu (DMF) na efektywność inkorporacji izomerów CLA w reakcji acydolizy fosfatydylochliny z żółtka jaja

Figure 14. Effect of dimethylformamide (DMF) on the effective incorporation of *c9,t11*CLA and *t10,c12*CLA in the acidolysis reaction of phosphatidylcholine from egg yolk

Proces acydolizy fosfatydylochliny (PC) żółtka jaja kurzego przeprowadzono również przy użyciu koncentratów CLA otrzymanych z oleju słonecznikowego i oleju z krokosza barwierskiego [11]. Koncentraty uzyskano w wyniku dwuetapowego procesu polegającego na hydrolizie i jednoczesnej izomeryzacji TAG, a następnie krystalizacji adduktów mocznika z uzyskanymi kwasami tłuszczowymi. Otrzymane koncentraty zawierały ponad 90% sprzężonego kwasu linolowego i składały się głównie z *c9,t11* i *t10,c12* CLA z niską zawartością innych izomerów (<2,5%). Kompleksowanie z mocznikiem nie tylko zwiększyło zawartość CLA w koncentracie, ale także wzbogaciło wyjściową równomolową mieszaninę obu izomerów w izomer *t10,c12*. Preparaty CLA były następnie wykorzystywane w procesie acydolizy (temp. 45°C, medium reakcyjne: heptan, stosunek molowy CLA/PC, 8:1, 24% wag. Lipazy RML). Początkową aktywność wody, która wynosiła 0,33, zmniejszono po 12h trwania reakcji do 0,11. Ustalone warunki reakcji pozwoliły uzyskać PC i LPC zawierające odpowiednio 42–44% oraz 62–65% reszt acylowych CLA. Wysoką efektywną inkorporację CLA (42%) uzyskano po 36 h reakcji (Rys. 15).



Rysunek 15. Wbudowanie CLA w fosfatydylocholinę i lizofosfatydylocholinę oraz skład fosfolipidów w mieszaninie reakcyjnej podczas acydolizy koncentratami CLA wytworzonymi na bazie oleju słonecznikowego (A) oraz oleju z krokosza barwierskiego (B)

Figure 15. Incorporation of CLA into PC and LPC and phospholipids distribution in the reaction mixture of PC acidolysis with CLA concentrate from sunflower oil (A) and safflower oil (B)

UWAGI KOŃCOWE

Nowe koniugaty fosfolipidowe otrzymane zaprezentowanymi metodami chemicznymi lub chemoenzymatycznymi, zawierające takie bioaktywne związki jak dehydroepiandrosteron, niesteroidowe leki przeciwzapalne czy CLA, mogą być doskonałymi nośnikami tych substancji, zwiększając między innymi ich biodostępność. Dodatkowo niektóre z uzyskanych połączeń wykazują wyższe aktywności antyproliferacyjne względem badanych linii nowotworowych lub niższą cytotoksyczność wobec zdrowych komórek niż wyjściowe substancje.

Uzyskane strukturyzowane fosfolipidy, wzbogacone w kwasy *n-3* lub *n-6* WNKT można nazwać lipidami multifunkcjonalnymi zawierającymi dwa funkcjonalne fragmenty: reszty kwasów NNKT oraz cholinę, co daje ogromną szansę na wykorzystanie ich jako nutraceutyki, dodatki do formulacji produktów kosmetycznych lub dodatki funkcjonalne do żywności. Zastosowanie tanich olejów roślinnych zamiast syntetycznych dawców grup acylowych w procesie wzbogacania fosfolipidów w kwasy wielonienasycone może znacznie obniżyć koszt takiego procesu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] N. Niezgoda, P. Mituła, K. Kempieńska, J. Wietrzyk, C. Wawrzeńczyk, *Aust. J. Chem.*, 2013, **66**, 354.
- [2] N. Niezgoda, A. Gliszczyńska, W. Gładkowski, K. Kempieńska, J. Wietrzyk, C. Wawrzeńczyk, *Aust. J. Chem.*, 2015, **68**, 1065. <https://doi.org/10.1071/CH14606>.
- [3] M. Kłobucki, A. Grudniewska, D.A. Smuga, M. Smuga, J. Jarosz, J. Wietrzyk, G. Maciejewska, C. Wawrzeńczyk, *Steroids*, 2017, **118**, 109.

- [4] D.A. Smuga, M. Smuga, A. Świzdor, A. Panek, C. Wawrzęczyk, *Steroids*, 2010, **75**, 1146. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.08.001>.
- [5] M. Kłobucki, A. Urbaniak, A. Grudniewska, B. Kocbach, G. Maciejewska, G. Kielbowicz, M. Ugorski, C. Wawrzęczyk, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 220. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36571-1>.
- [6] A. Chojnacka, W. Gładkowski, G. Kielbowicz, A. Gliszczynska, N. Niezgodą, C. Wawrzęczyk, *Grasas Aceites*, 2014, **65**, e053
- [7] A. Chojnacka, W. Gładkowski, G. Kielbowicz, C. Wawrzęczyk, *Biotechnol. Lett.*, 2009, **31**, 705.
- [8] A. Chojnacka, W. Gładkowski, A. Grudniewska, *Molecules*, 2017, **22**, 1771.
- [9] A. Chojnacka, W. Gładkowski, A. Gliszczynska, N. Niezgodą, G. Kielbowicz, C. Wawrzęczyk, *Catal. Commun.*, 2016, **75**, 60.
- [10] N. Niezgodą, A. Gliszczynska, *Catalysts*, 2019, **9**, 1012. <https://doi.org/10.3390/catal9121012>.
- [11] N. Niezgodą, A. Gliszczynska, W. Gładkowski, A. Chojnacka, G. Kielbowicz, C. Wawrzęczyk, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2016, **118**, 1566. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500589>.
- [12] N. Niezgodą, A. Gliszczynska, W. Gładkowski, A. Chojnacka, G. Kielbowicz, C. Wawrzęczyk, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2016, **123**, 14.
- [13] P. D'Arrigo, S. Servi, *Molecules*, 2010, **15**, 1354. <https://doi.org/10.3390/molecules15031354>.
- [14] M.A.P. Morgado, J.M.S. Cabral, D.M.F. Prazeres, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1995, **63**, 181. <https://doi.org/10.1002/jctb.280630214>.
- [15] G. Kielbowicz, A. Chojnacka, A. Gliszczynska, W. Gładkowski, M. Kłobucki, N. Niezgodą, C. Wawrzęczyk, *Talanta*, 2015, **141**, 137.
- [16] D.L. Palmquist, A.L. Lock, K.J. Shingfield, D.E. Bauman, *Adv. Food Nutr. Res.*, 2005, **50**, 179. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(05\)50006-8](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(05)50006-8).
- [17] C. Niezgodą, N. Miłuła, P., Wawrzęczyk, *Przem. Chem.*, 2011, **90**, 949.
- [18] K. Koba, T. Yanagita, *Obes. Res. Clin. Pract.*, 2014, **8**, e525. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.10.001>.
- [19] D. Sugasini, P. V. Subbaiah, *PLoS One.*, 2017, **12**, 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187826>.
- [20] A. Pucek, N. Niezgodą, J. Kulbacka, C. Wawrzęczyk, K.A. Wilk, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2017, **532**, 377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.04.061>.
- [21] F. Labrie, V. Luu-The, A. Bélanger, S.X. Lin, J. Simard, G. Pelletier, C. Labrie, *J. Endocrinol.*, 2005, **187**, 169. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06264>.
- [22] R. López-Marure, P.G. Contreras, J.S. Dillon, *Eur. J. Pharmacol.*, 2011, **660**, 268. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.03.040>.
- [23] M.D. Johnson, R.A. Bebb, S.M. Sirrs, *Ageing Res. Rev.*, 2002, **1**, 29. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00369-4](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00369-4).
- [24] P. D'Arrigo, E. Fasoli, G. Pedrocchi-Fantoni, C. Rossi, C. Saraceno, D. Tessaro, S. Servi, *Chem. Phys. Lipids*, 2007, **147**, 113. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.03.008>.
- [25] S. Shah, V. Mehta, *Postgrad. Med. J.*, 2012, **88**, 73. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2011-130291>.
- [26] B. Möller, M. Pruijm, S. Adler, A. Scherer, P.M. Villiger, A. Finckh, *Ann. Rheum. Dis.*, 2015, **74**, 718. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204078>.
- [27] P.C. Gøtzsche, *Control. Clin. Trials.*, 1989, **10**, 31. [https://doi.org/10.1016/0197-2456\(89\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0197-2456(89)90017-2).
- [28] M.M. Corkill, *Gout, N. Z. Med. J.*, 1994, **107**, 337. <https://doi.org/10.1097/rhu.0b013e3181896921>.
- [29] T. Iwama, *J. Gastroenterol.*, 2009, **44**, 72. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2265-7>.
- [30] D. Wang, R.N. Dubois, *Gut.*, 2006, **55**, 115. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.047100>.
- [31] Y.I. Cha, R.N. DuBois, *Annu. Rev. Med.*, 2007, **58**, 239.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131253>.
- [32] D. Wang, R.N. DuBois, *Annu. Rev. Med.*, 2013, **64**, 131. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-112211-154330>.
- [33] D. Mazhar, R. Ang, J. Waxman, *Br. J. Cancer.*, 2006, **94**, 346. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602942>.
- [34] K.D. Rainsford, *Am. J. Med.*, 1999, **107**, 27. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00365-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00365-4).
- [35] I. Bjarnason, J. Hayllar, A.N. Dre. J. Macpherson, A.N. Thon. S. Russell, *Gastroenterology*, 1993, **104**, 1832. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90667-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90667-2).
- [36] X. Xu, A.F. Vikbjerg, Z. Guo, L. Zhang, A.K. Acharya, *Phospholipid Technology and Applications*, Woodhead Publishing, 2012.
- [37] Z. Guo, A.F. Vikbjerg, X. Xu, *Biotechnol. Adv.*, 2005, **23**, 203. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.02.001>.
- [38] D. Egger, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1997, **1343**, 76. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00115-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00115-5).
- [39] A. Chojnacka, W. Gładkowski, *Catalysts*, 2018, **8**, 281.
- [40] P.M. Kris-Etherton, K.D. Hecker, A.E. Binkoski, *Nutr. Rev.*, 2004, **62**, 414. <https://doi.org/10.1301/nr.2004.nov.414-426>.
- [41] F.B. Hu, M.J. Stampfer, J.A.E. Manson, E.B. Rimm, A. Wolk, G.A. Colditz, C.H. Hennekens, W.C. Willett, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, **69**, 890. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.890>.
- [42] S. Tandy, R.W.S. Chung, W.A.T. Elaine, A.K.K. Berge, M. Griinari, J.S. Cohn, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 9339. <https://doi.org/10.1021/jf9016042>.
- [43] S.M. Kwak, S.K. Myung, Y.J. Lee, H.G. Seo, *Arch. Intern. Med.*, 2012, **172**, 686. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2012.262>.
- [44] W.J. Lukiw, N.G. Bazan, *J. Nutr.*, 2008, **138**, 2510. <https://doi.org/10.3945/jn.108.096016>.
- [45] J.M. Alessandri, P. Guesnet, S. Vancassel, P. Astorg, I. Denis, B. Langelier, S. Aïd, C. Poumès-Ballihaut, G. Champeil-Potokar, M. Lavialle, *Reprod. Nutr. Dev.*, 2004, **44**, 509. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004063>.
- [46] S.T. Russell, M.J. Tisdale, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.*, 2005, **72**, 409. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.03.002>.
- [47] A.P. Simopoulos, *J. Am. Coll. Nutr.*, 2002, **21**, 495. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719248>.
- [48] J. Callaway, U. Schwab, I. Harvima, P. Halonen, O. Mykkänen, P. Hyvönen, T. Järvinen, *J. Dermatolog. Treat.*, 2005, **16**, 87. <https://doi.org/10.1080/09546630510035832>.
- [49] H.S. Hansen, B. Jensen, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.*, 1985, **834**, 357. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90009-8).
- [50] M. Białek, J. Rutkowska, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015, **69**, 892. <https://doi.org/10.5604/17322693.1162991>.
- [51] A. Chojnacka, W. Gładkowski, G. Kielbowicz, C. Wawrzenczyk, *Lipid Technol.*, 2012, **24**, 33. <https://doi.org/10.1002/lite.201200171>.
- [52] D.G. Hayes, Y.C. Bengtsson, J.M. Van Alstine, F. Setterwall, *JAOCS*, 1998, **75**, 1403. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0190-9>.
- [53] Simopoulos A.P., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, **54**, 438.
- [54] M.E. Grossman, N.K. Mizuno, T. Schuster, M.P. Cleary, *Int. J. Oncol.*, 2010, **36**, 421. <https://doi.org/10.3892/ijo>.
- [55] P. Aruna, D. Venkataramanamma, A.K. Singh, R.P. Singh, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, **15**, 16. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12171>.
- [56] R. Holic, Y. Xu, K.M.P. Caldo, S.D. Singer, C.J. Field, R.J. Weselake, G. Chen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, **102**, 3537. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8883-y>.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 marca 2023 r.

DIHYDROCHALKONY JAKO NATURALNA ALTERNATYWA DLA OBECNIE STOSOWANYCH SŁODZIKÓW

DIHYDROCHALCONES AS A NATURAL ALTERNATIVE TO CURRENTLY USED SWEETENERS

**Monika Dymarska^{*}, Dagmara Filip, Martyna Perz,
Tomasz Janeczko, Edyta Kostrzewa-Susłow**

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy,
ul. C. K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
^{*}e-mail: monika.dymarska@upwr.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Negatywny wpływ cukru na zdrowie
2. Odczuwanie słodkości
3. Słodziki
 - 3.1. Półsyntetyczne substancje słodzące
 - 3.2. Intensywne substancje słodzące
4. Potencjał dihydrochalkonów do stosowania jako słodziki
 - 4.1. Ekstrakcja dihydrochalkonów z materiału roślinnego
 - 4.2. Synteza chemiczna dihydrochalkonów
 - 4.3. Znaczenie biotransformacji w syntezie dihydrochalkonów
 - 4.4. Przykłady biotechnologicznego wytwarzania dihydrochalkonów
 - 4.4.1. Biokatalizatory prokariotyczne
 - 4.4.2. Biokatalizatory eukariotyczne

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Monika Dymarska w 2010 roku ukończyła biotechnologię na Wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W latach 2011-2014 była zatrudniona na stanowisku asystenta naukowego w projekcie „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym”. W latach 2014-2018 realizowała studia doktoranckie na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Pracę doktorską obroniła w 2019 roku. Jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.



<https://orcid.org/0000-0002-2688-8883>

Mgr inż. Dagmara Filip (Kaczanowska) studiowała biotechnologię na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. W trakcie studiów była aktywną członkinią Studenckiego Koła Naukowego OrgChem. Studia ukończyła w 2019 roku uzyskując tytuł magistra inżyniera.

Mgr Martyna Perz (Krzywda) studia I stopnia na kierunku biotechnologia odbyła na Uniwersytecie Wrocławskim. Studia magisterskie z zakresu biotechnologii ukończyła na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu w 2020 roku. Od 2020 roku realizuje doktorat w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności.



<https://orcid.org/0000-0002-3011-950X>

Dr hab. Tomasz Janeczko w 2001 roku ukończył chemię, w zakresie chemia środowiska, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W 2007 roku uzyskał tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii. W 2015 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego. Jest zatrudniony na stanowisku profesora Uczelni w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.



<https://orcid.org/0000-0002-9757-6684>

Prof. dr hab. inż. Edyta Kostrzewa - Susłow w roku 1997 ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej. W 2007 roku uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii. W 2015 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego, a w 2020 roku tytuł profesora nauk ścisłych i przyrodniczych. Jest zatrudniona w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.



<https://orcid.org/0000-0002-9259-0161>

ABSTRACT

The craving for sweets is a universal desire that connects people of all ages and cultures. Traditionally used sweeteners based on sugars, such as sucrose or glucose-fructose syrup, are known for their multidirectional negative impact on human health. With the development of research into artificial sweeteners and natural sucrose alternatives, more and more consumers are turning to healthier options to satisfy their sweet tooth.

Among the potential new sweeteners of natural origin, dihydrochalcones deserve special attention. These compounds belong to polyphenols and are present in plants. In the daily diet of people, their source may be citrus fruits, strawberries and apples. Dihydrochalcones, like other polyphenols, have a high and diverse health-promoting effect, e.g. antioxidant, antimicrobial or anticancer. Unfortunately, their extraction from plant material is challenging and economically unprofitable.

The article presents a brief description of traditionally used sweeteners based on sugar, as well as alternative sweeteners. Methods for the chemical synthesis of dihydrochalcones are presented here, and the biotransformation processes involved in producing these sweet-tasting compounds are discussed.

Keywords: sugar, sweeteners, dihydrochalcones, biotransformations

Słowa kluczowe: cukier, słodziki, dihydrochalkony, biotransformacje

WPROWADZENIE

Słodki smak pożądanym jest przez ludzi w różnym wieku, pochodzących z różnych klas i kultur. Słodycz od zawsze odgrywała istotną rolę w żywieniu człowieka, pomagając ukierunkować zachowania żywieniowe na produkty dostarczające zarówno energii, jak i niezbędnych składników odżywczych [1]. Po spożyciu słodkiego pokarmu aktywacji ulegają obwody mózgowo generujące przyjemność. Według badań klinicznych ten obwód jest taki sam lub pokrywa się z tym, który pośredniczy w uzależniającym charakterze narkotyków, takich jak alkohol i opiaty [2].

Najwcześniej stosowanymi substancjami słodzącymi były miód i soki roślinne. W przemyśle spożywczym tradycyjnie najczęściej stosowaną substancją jest sacharoza – dwucukier, którego głównymi źródłami pozyskiwania są trzcina cukrowa i buraki cukrowe [3].

Smak i profil słodkości czystej sacharozy określa się „złotym standardem”. Ponieważ cukier ten jest powszechnie wykorzystywany w produktach spożywczych, ludzie utożsamiają słodkość ze smakiem sacharozy [4]. Sacharoza jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, a także stabilna chemicznie i termicznie. Dodatkowym atutem tego dwucukru jest możliwość jego wykorzystania w konserwowaniu żywności, a także nadawaniu jej odpowiedniej lepkości i tekstury [5]. Sacharoza jest jednak wysoce kaloryczna, a jej zwiększone spożycie skutkuje dodatnim bilansem energetycznym. Nadmierne spożycie sacharozy uważa się za jedną z przyczyn m. in. otyłości, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych, czy nowotworów [6,7]. Obecnie coraz częściej jest ona wypierana przez bogaty we fruktozę syrop pozyskiwany z kukurydzy, który wykazuje jeszcze bardziej negatywny efekt metaboliczny niż sacharoza [8].

Powyższe fakty stanowią silny impuls do poszukiwania niskoenergetycznych substytutów sacharozy, które posiadałyby porównywalne z nią parametry fizykochemiczne i sensoryczne, a ich spożycie nie byłoby obciążone tak negatywnym wpływem na organizm [4].

1. NEGATYWNY WPLYW CUKRU NA ZDROWIE

Glukoza to główny cukier magazynowany w organizmach zwierząt, natomiast u roślin jest to sacharoza złożona z cząsteczki glukozy i fruktozy. Ponieważ ludzie od zawsze konsumowali produkty pochodzenia roślinnego, w ich diecie obecna była również fruktoza [9,10]. Zwiększone wykorzystanie fruktozy w przemyśle spożywczym początkowo wiązało się z przekonaniem, że stanowi ona zdrowszą alternatywę dla glukozy, ze względu na jej niższy indeks glikemiczny i fakt, że metabolizm fruktozy nie jest regulowany przez insulinę. Uważano, że dzięki temu fruktoza może być bezpiecznie stosowana u pacjentów z cukrzycą [11,12]. Fruktoza

jest też najśłodszy naturalnie występującym cukrem, co umożliwi wykorzystanie mniejszych jej ilości do zapewniania pożądanego poziomu słodkości produktów, co obniża ich kaloryczność w stosunku do produktów słodzonych glukozą czy sacharozą [13,14]. Jednak już w latach 60-tych XX wieku zaobserwowano, że zwiększone spożycie fruktozy u zwierząt i ludzi wywołuje hipertriglicydemię na poziomie dużo wyższym niż w wyniku spożywania skrobi czy glukozy [10]. Pomimo tego udział fruktozy w diecie ludzi wzrósł w ciągu ostatnich 40 lat o 30% [15]. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) rekomenduje, by cukry dodawane do żywności nie stanowiły więcej niż 10% naszej diety. Szacuje się jednak, że młodzież z samej tylko fruktozy może czerpać więcej niż 15% dziennej dawki kalorii, a dorośli niemal 20% [13,16]. Wynika to w dużym stopniu z powszechnego wykorzystywania w przemyśle spożywczym syropu kukurydzianego o wysokiej zawartości fruktozy (HFCS). Słodziwo to zostało po raz pierwszy wprowadzone do użytku w USA w 1972 roku w odpowiedzi na rosnące zapotrzebowanie przemysłu spożywczego na alternatywy dla rafinowanego cukru, którego produkcja jest droga [9,17]. HFCS jest tańszy, słodszy i trwalszy niż sacharoza. Słodziak ten nie ulega krystalizacji w produkcji, zapewnia zachowanie wilgotności wypieków i łatwo się rozpuszcza dodany do napojów. Szacuje się, że stanowi on obecnie 40% odżywczych substancji słodzących dodawanych do żywności [9,13,18]. Produkcja HFCS opiera się na wykorzystaniu enzymów pozyskanych z mikroorganizmów – w pierwszym etapie skrobia kukurydziana hydrolizowana jest do monosacharydów, następnie izomeraza ksylozy konwertuje część glukozy do fruktozy. Najbardziej popularny HFCS zawiera 55% fruktozy i 45% glukozy. Dzięki temu jest on słodszy i ma płynną konsystencję [10].

Pomimo tego, że glukoza i fruktoza mają tę samą kaloryczność, są one odmiennie metabolizowane w organizmach zwierząt i różnią się wpływem na rozwój chorób metabolicznych [19]. Glukoza jest podstawowym paliwem energetycznym dla większości tkanek i komórek zwierzęcych, natomiast fruktoza jest metabolizowana głównie w wątrobie [10]. Podczas absorpcji w przewodzie pokarmowym, gdy stężenie fruktozy w jelicie jest niższe niż 1 mM, duża jej ilość jest przekształcana w glukozę w enterocytach. Ta konwersja zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie fruktozy, ułatwiając jej wchłanianie. Jeśli jednak stężenie fruktozy wzrośnie powyżej tego poziomu, mniej fruktozy jest metabolizowane w enterocytach, przez co w niezmienionej formie przechodzi ona do krwioobiegu i ulega metabolizmowi wątrobowemu [16]. W wątrobie ulega przekształceniu do fruktozo-1-fosforanu, którego większość jest następnie metabolizowana do aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Związek ten może zostać przekształcony i uwolniony jako mleczan lub przekształcony w glukozę (glukoneogeneza). Po uwolnieniu do krążenia ogólnoustrojowego glukoza i mleczan mogą być wykorzystywane jako substrat energetyczny przez mózg, serce i tkankę mięśniową. Aldehyd 3-fosfoglicerynowy może jednak również ulec konwersji do acetylo-CoA stanowiącego prekursor kwasów tłuszczowych, lub do glicerolo-3-fosforanu przekształcanego dalej do triglicerydów [12,18].

U ludzi z nadwagą dieta bogata w fruktozę lub z identyczną ilością glukozy (25% całkowitego spożycia kalorii) skutkowała podobnym przyrostem masy ciała. Jednak tylko fruktoza w diecie specyficznie zwiększa lipogenezę de novo w wątrobie, wywołuje dyslipidemię, zmniejsza wrażliwość na insulinę i zwiększa otyłość trzewną. Tłuszcz trzewny, zwany także tłuszczem brzuszny, jest magazynowany pod jamą otrzewnej i jest aktywny w wydzielaniu cytokin prozapalnych. Słuszczenie wątroby, trzustki, mięśni szkieletowych, czy serca upośledza procesy metaboliczne i funkcjonowanie tych narządów. Zatem przechowywanie tłuszczu trzewnego jest bardziej szkodliwe metabolicznie w porównaniu z tłuszczem podskórnym. Osoba może nadal wyglądać na szczupłą z zewnątrz, ale mieć parametry metaboliczne osoby otyłej, jest to określane jako „chudy na zewnątrz, tłusty w środku” (“thin on the outside, fat on the inside”, TOFI) [12,19]. Przyjmowanie fruktozy przyczynia się także wprost do zwiększonego spożycia pokarmu i otyłości poprzez regulację ośrodkowego układu nerwowego [19]. Spożyta fruktoza obniża wrażliwość organizmu na leptynę, nazywaną hormonem sytości [12], natomiast stymuluje wydzielanie greliny, nazywanej hormonem głodu [19].

Spożywanie zwiększonych ilości fruktozy wiąże się bezpośrednio z rozwojem takich schorzeń jak: cukrzyca typu 2; niealkoholowa słuszczeniowa choroba wątroby i jej agresywna postać, niealkoholowe słuszczeniowe zapalenie wątroby; niektóre nowotwory, zwłaszcza wątroby, trzustki i okrężnicy; oraz choroby układu krążenia i nerek [9,12]. Nadmiar fruktozy w diecie sprzyja również zaburzeniom neurologicznym i psychiatrycznym, takim jak wzmożony lęk, depresja i choroba Alzheimera [15].

2. ODCZUWANIE SŁODKOŚCI

Wysoka wrażliwość na słodki smak jest wrodzona, a poszukiwanie słodkich pokarmów jest uwarunkowane ewolucyjnie. Stopień odczuwania słodkości i poziom odczuwanej przyjemności po spożyciu słodkich pokarmów są natomiast zróżnicowane osobniczo [20,21]. Język i podniebienie miękkie są obszarami wyposażonymi w receptory smaku słodkiego i w tych miejscach zaczyna się jego odczuwanie po spożyciu pokarmu [22]. Proces ten jest złożony i opiera się na interakcji pomiędzy słodką substancją a centrami aktywnymi obecnymi w receptorach, które znajdują się w komórkach nabłonka [23]. Związki zdolne do wywoływania słodkiego smaku często znacząco różnią się budową, dlatego wiele ośrodków naukowych podjęło próby wykazania zależności pomiędzy strukturą chemiczną związku a jego słodkością [24]. Już w XIX wieku wykazano znaczenie stereochemii związków w mechanizmie odczuwania słodkości. W 1886 roku Piutti, udowodnił w toku prowadzonych przez siebie badań, że aminokwas D-asparagina jest słodki, a jego L-izomer nie [24].

3. SŁODZIKI

Substancje słodzące można podzielić na dwie grupy: odżywcze i nieodżywcze. Odżywcze zawierają monosacharydy (fruktozę i galaktozę), disacharydy (sacharozę) oraz poliole (alkohole cukrowe), które w różnym stopniu są źródłem energii. Natomiast nieodżywcze substancje słodzące, takie jak acesulfam K, aspartam, sacharyna i sukraloza nie zawierają kalorii w ilościach istotnych dla codziennego bilansu energetycznego [8].

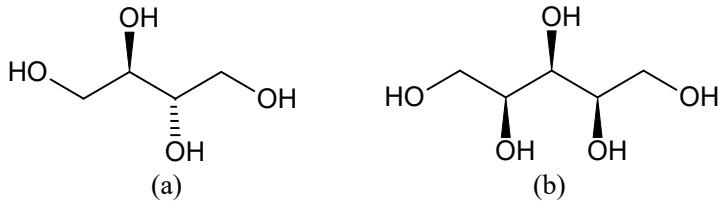
Konsumenci coraz częściej skupiają się na wartości odżywczej kupowanych produktów spożywczych, a nie jedynie na ich smaku i koszcie. Rosnąca świadomość wpływu diety na zdrowie, częstość występowania chorób wynikających ze źle zbilansowanej diety, a także moda na zdrowy styl życia stale potęgują popularność niskokalorycznych produktów spożywczych [25] i są impulsem do poszukiwania nowych substancji słodzących o obniżonej kaloryczności [26]. Zadaniem tych substancji, określanych mianem słodzików, jest naśladowanie słodkości sacharozy, bez drastycznego podnoszenia kaloryczności produktu [25]. Idealny słodzik musi być całkowicie bezpieczny dla zdrowia, a także powinien cechować się stabilnością w całym procesie wytwarzania i przechowywania produktu finalnego [4,27].

3.1. PÓLSYNTETYCZNE SUBSTANCJE SŁODZĄCE

Pólsyntetyczne substancje słodzące, są grupą niskokalorycznych związków, które charakteryzują się nieco niższą słodkością niż sacharoza [28]. Współtworzą one strukturę produktu i są wykorzystywane jako wypełniacze, a także związki konserwujące. By zapewnić konsumentom satysfakcjonujący poziom słodkości, związki te mogą być łączone z innymi słodzikami [29]. Chemicznie pólsyntetyczne substancje słodzące to głównie alkohole cukrowe – poliole. Są to pochodne cukrów, w których grupa aldehydowa lub ketonowa jest zastąpiona grupą hydroksylową [30]. Spożycie polioli nie wiąże się z ryzykiem rozwoju próchnicy, dlatego są one często stosowanymi zamiennikami cukru, szczególnie w cukiernictwie. Dodatkowo, związki te nie powodują wahań poziomu glukozy we krwi, ponieważ zmniejszają odpowiedź glikemiczną i poprawiają wrażliwość insulinową [31]. Wśród alkoholi cukrowych ksylitol, erytrytol, mannitol i sorbitol są najczęściej wskazywane jako potencjalne alternatywy dla zastąpienia sacharozy w produktach spożywczych i należą do najczęściej stosowanych alkoholi cukrowych, obok m.in. maltitolu, laktitolu i izomaltozy [32]. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę ksylitolu i erytrytolu.

Erytrytol (rys. 1a) to czterowęglowy alkohol cukrowy zawierający w swojej strukturze cztery grupy hydroksylowe. Jest białą, krystaliczną, bezwoną substancją o słodkości na poziomie 60-80% słodczy sacharozy [4]. Na tle innych polioli wyróżnia się sposobem otrzymywania – erytrytol jest produkowany na skalę przemysłową przy wykorzystaniu biokatalizatorów [33]. Erytrytol może być wytwa-

rzany biotechnologicznie z glicerolu, glukozy lub fruktozy poprzez kilka konwersji enzymatycznych do erytrozy, która jest następnie przekształcana przez reduktazę erytrozy do polioliu [32]. Erytrytol najczęściej stosowany jest do produkcji niskokalorycznych napojów i gum do żucia [31].



Rysunek 1. Struktura chemiczna erytrytolu (a) i ksylitolu (b)
Figure 1. Chemical structure of erythritol (a) and xylitol (b)

Ksylitol (rys. 1b) jest związkiem powszechnie obecnym w owocach i warzywach, a także jest produktem pośrednim metabolizmu węglowodanów u ssaków. U ludzi jest wolno wchłaniany i nie powoduje gwałtownych zmian stężenia glukozy we krwi [34]. Obecnie w celu zaspokojenia przemysłowego zapotrzebowania na ten słodzik wykorzystuje się chemiczną metodę jego syntezy. W tym procesie ksyloza ekstrahowana z biomasy lignocelulozowej poddawana jest katalitycznemu uwodornieniu w celu wytworzenia ksylitolu [35]. Związek ten można wytwarzać biotechnologicznie z substratów lignocelulozowych, które są przekształcane w hydrolizaty bogate w ksylozę i ostatecznie przekształcane w ksylitol przez reduktazę ksylozową [32]. Związek ten wykazuje działanie przeciwpóchnicze a także remineralizacyjne i dlatego powszechnie stosuje się go do produkcji preparatów stomatologicznych, a także syropów, czy suplementów diety [36]. Wykazano jednak, że wysokie spożycie ksylitolu (20-30 g) może skutkować niegroźną biegunką osmotyczną [34].

3.2. SUBSTANCJE INTENSYWNIE SŁODZĄCE

Drugą grupą środków słodzących są te o dużo wyższej słodczy niż sacharoza, nazywane są one środkami intensywnie słodzącymi lub alternatywnymi słodzikami [37]. W tabeli 1 przedstawiono porównanie popularnie stosowanych substancji słodzących pod kątem ich słodkości i kaloryczności.

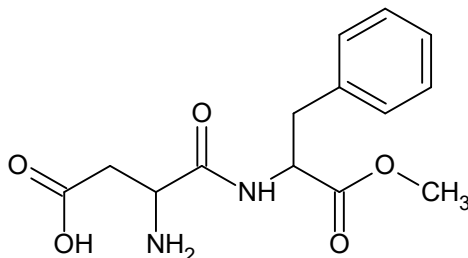
Biorąc pod uwagę siłę słodzącą intensywnie słodzących substancji, stosuje się znacznie mniejszy ich dodatek, niż sacharozy, zatem ładunek energetyczny takiego produktu jest dużo niższy. Niestety, smak wielu alternatywnych słodzików nie jest stabilny, często obserwuje się obce posmaki [42]. Związki te stosowane są jednak powszechnie w batonach, płatkach, jogurtach „light”, dżemach, lekach, czy pastach do zębów [43].

Tabela 1. Zestawienie wybranych substancji słodzących stosowanych jako dodatki do żywności pod kątem ich siły słodzącej i kaloryczności [38–41]

Table 1. List of selected sweeteners used as food additives in terms of their sweetening power and calorific value [38–41]

Słodzik	Symbol „E”	Siła słodząca	Wartość energetyczna [kcal/g]
Sacharoza	-	1	4
Taumatyna	E957	2000	4
Aspartam	E951	200	4
Acesulfam K	E950	150-200	0
Erytrytol	E968	0.7	0.2
Ksylitol	E967	1	2.5
Dihydrochalkon neohesperydyny	E959	1500-2000	2

Aspartam (rys. 2) to najpopularniejszy słodzik na świecie Jego zaletą jest zwiększanie intensywności innych smaków i aromatów, natomiast wadą – stosunkowo niska rozpuszczalność, a także ograniczona stabilność termiczna oraz chemiczna [5,44]. Aspartam to dipeptyd, na który składa się ester metylowy L-feniloalaniny i kwas L-asparaginowy [37]

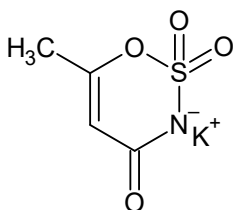


Rysunek 2. Struktura chemiczna aspartamu

Figure 2. Chemical structure of aspartame

Po spożyciu związek ten ulega całkowitemu rozpadowi do kwasu asparaginowego, feniloalaniny i metanolu, który uwalniany jest z aspartamu pod wpływem chymotrypsyny [44]. Metanol w organizmie jest utleniany do formaldehydu i dalej do kwasu mrówkowego wykazujących działanie toksyczne [30]. Spożycie produktów zawierających aspartam wiąże się z występowaniem suchości w jamie ustnej, zmianami nastroju, wymiotami, a także chronicznym bólem głowy [45]. W badaniach na szczurach wykazano również potencjalne działanie rakotwórcze tego słodziku. U samców zaobserwowano zwiększone występowanie i wzrost nowotworów złośliwych, a u obu płci większą częstotliwość chłoniaka i białaczki. Zastosowana w badaniu dawka była zbliżona do tej, która jest dopuszczona do stosowania u ludzi [46].

Acesulfam – K (Rys. 3) to słodzik charakteryzujący się szybko wyczuwalnym słodkim smakiem [44], który jednak w wyższych stężeniach może dawać niepożądany posmak [47]. Związek jest wysoce termostabilny, a także rozpuszczalny, dzięki czemu może być stosowany w wytwarzaniu różnorodnych produktów spożywczych [44].



Rysunek 3. Struktura chemiczna acesulfamu - K
Figure 3. Chemical structure of acesulfame – K

W badaniach na myszach wykazano, że słodzik ten podawany w wysokiej dawce (60 mg/kg masy ciała) uszkadza ich materiał genetyczny [48].

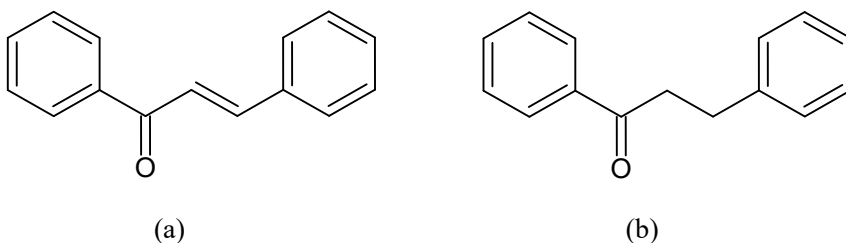
Taumatyna to, na chwilę obecną, jedyny alternatywny słodzik produkowany na skalę przemysłową. Została ona wyizolowana z owoców afrykańskiej rośliny *Thaumatococcus daniellii*. Związek ten jest białkiem występującym pod postacią pięciu różnych form [49]. Taumatyna ulega całkowitemu rozkładowi w organizmie ludzkim i uważa się, że jest bezpieczna dla zdrowia. Cechuje się też dużo wyższą słodkością od sacharozy (tab. 1). Jej wadą jest mało opłacalny proces ekstrakcji z materiału roślinnego [50].

Alternatywne słodziki pozwalają zmniejszyć spożycie cukru i obniżyć kaloryczność przyjmowanych posiłków, co ma bezsprzecznie pozytywny wpływ na zdrowie ludzi. Niestety, coraz częściej spożycie substancji słodzących wiązane jest z różnorodnymi, nierzadko poważnymi, problemami zdrowotnymi. Wśród nich należy wymienić dysbiozę mikrobioty jelitowej [51], stan zapalny [26], przyczynianie się do chorób układu krążenia [52], nowotworów układu moczowego u kobiet [53], a nawet, paradoksalnie, zaburzeń metabolicznych i otyłości [51,54]. Z tego powodu stale poszukuje się alternatyw, które byłyby całkowicie bezpieczne dla ludzi, a najlepiej – dodatkowo pozytywnie wpływałyby na ich zdrowie.

4. POTENCJAŁ DIHYDROCHALKONÓW DO STOSOWANIA JAKO SŁODZIKI

Chalkony to wtórne metabolity roślin, są zaliczane do związków flawonoidowych. W roślinach stanowią prekursory dla flawanonów, flawonów

i izoflawonów. Cechą charakterystyczną tej grupy związków jest intensywna żółta lub pomarańczowa barwa [55,56]. Chalkony składają się z dwóch pierścieni aromatycznych połączonych trójwęglową α,β -nienasyconą karbonylową strukturą. Po raz pierwszy ich syntezy chemicznej dokonało dwóch uczonych – Kostanecki i Tambor i oni są twórcami nazwy „chalkony” [57,58]. Związki te ze względu na łatwość pozyskiwania na drodze syntezy chemicznej, a także szeroki wachlarz aktywności biologicznych są potencjalnie atrakcyjnymi kandydatami na substancje aktywne środków farmaceutycznych, a także dodatki do żywności. Udowodniono, że te roślinne polifenole wykazują aktywność m. in. przeciwutleniającą, przeciwzapalną, przeciwmikrobiologiczną, przeciwnowotworową, przeciw-cukrzycową, przeciwotyłościową, hepatoprotekcyjną, a także kardioprotekcyjną [57–59].



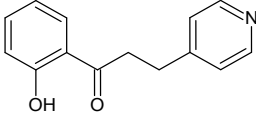
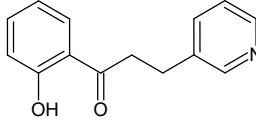
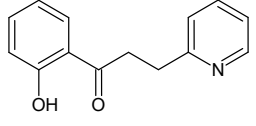
Rysunek 4. Struktura chemiczna chalkonu (a) i dihydrochalkonu (b)
Figure 4. Chemical structure of chalcone (a) and dihydrochalcone (b)

Dzięki uwodornieniu chalkonów uzyskuje się dihydrochalkony (Rys. 4) – związki o wysokim potencjale do zastosowania jako syntetyczne słodziki [60]. Smak tej grupy związków silnie zależy od struktury związku i obecnych w nim podstawników [61], nie wszystkie dihydrochalkony są słodkie, a ich smak może zależeć również od stężenia (Tab. 2) [62].

Dihydrochalkony, podobnie jak chalkony są syntezowane w roślinach, często w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny. Biosynteza tych dwóch klas związków flawonoidowych przebiega podobnie, jednak biosynteza dihydrochalkonów wymaga przekształcenia p-kumaroilo-CoA, głównego prekursora chalkonów otrzymywanego drogą szikimową, w p-dihydrokumaroilo-CoA przez dehydrogenazę zależną od NADPH. Uważa się, że syntaza chalkonu katalizuje wtedy addycję trzech cząsteczek malonylo-CoA, otrzymanego na szlaku poliketydowym, do jednej cząsteczki p-dihydrokumaroilo-CoA. Pierścień A powstaje zatem na szlaku poliketydowym, natomiast B jest tworzony na szlaku fenylopropanoidowym [63].

Tabela 2. Porównanie dihydrochalkonów z azotem wbudowanym w pierścień B. Na podstawie [62]

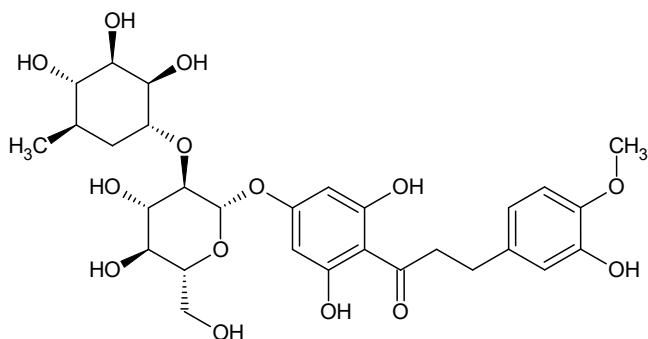
Table 2. Comparison of dihydrochalcones with nitrogen incorporated into the B ring. Based on [62]

		
0,01-0,1 ppm – brak	0,1 ppm – brak smaku	-
1 ppm – bardzo słabo słodki	1 ppm – słaby słodki smak, cierpki	1 ppm – umami
10 ppm – słodki	10 ppm – opóźniony słodki smak, cierpki	10 ppm – silny smak podobny do umami
100 ppm – bardzo słodki, lukrecyjowy	100 ppm – słabo słodki, chemiczny, gorzki	100 ppm – intensywny umami, lekko gorzki

Podobnie jak inni przedstawiciele związków flawonoidowych, również dihydrochalkony są wysoce aktywne biologicznie. Ich prozdrowotne działanie to między innymi aktywność przeciwutleniająca, przeciwzapalna, przeciwdiabetyczna, przeciwnowotworowa, czy hepatoprotekcyjna [63,64].

Słodki smak, bliska zerowej kaloryczność, naturalne pochodzenie i wykazywane działanie prozdrowotne czynią z dihydrochalkonów atrakcyjnych kandydatów na nowoczesne dodatki do żywności.

Najlepiej zbadanym związkiem jest dihydrochalkon neohesperydyny (NHDC) (Rys. 5), który po raz pierwszy został opisany jako intensywnie słodka substancja przez Horowitza w 1963 roku [60]. Związek ten pozyskać można poprzez chemiczną modyfikację neohesperydyny – naturalnego glikozydu flawonoidowego, który obecny jest w skórce gorzkiej pomarańczy [60,65].



Rysunek 5. Struktura chemiczna dihydrochalkonu neohesperydyny

Figure 5. Chemical structure of neohesperidin dihydrochalcone

NHDC nie tylko wykazuje słodkość około 1500 razy wyższą od sacharozy, ale również hamuje aktywność receptorów smaku gorzkiego [66]. Posmak NHDC określa się jako lukrecjowy, jego kaloryczność to około 2 kcal/1 g (8.4 kJ), co ze względu na stosowanie tego dodatku w bardzo małych ilościach nie ma dużego znaczenia żywieniowego. Istotną zaletą tego związku jest wysoka stabilność termiczna [50]. Dzięki temu dihydrochalkon neohesperydyny jest stosowany w przemyśle spożywczym i jest zarejestrowany w krajach Unii Europejskiej jako dodatek E959 [64,67].

NHDC może być wykorzystywany zarówno jako słodzik w napojach, gumach do żucia czy sosach, a także jako modyfikator smaku w margarynach, produktach mięsnych i galaretkach owocowych. Znane jest również zastosowanie tego związku w preparatach farmaceutycznych do maskowania gorzkiego smaku substancji aktywnych, a także jako dodatku poprawiającego smak pasz [68].

4.1. EKSTRAKCJA DIHYDROCHALKONÓW Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO

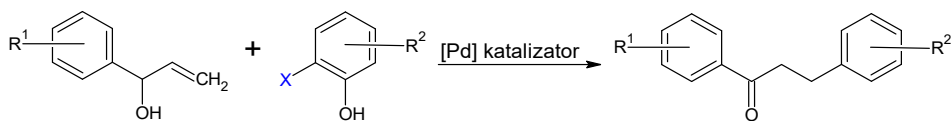
Naturalnym źródłem dihydrochalkonów są rośliny, a najbardziej bogate w te związki są jabłonie zawierające do 14% dihydrochalkonów w suchej masie liści. Dihydrochalkony można pozyskać z materiału roślinnego poprzez ekstrakcję z użyciem takich rozpuszczalników, jak etanol, eter dietylowy, metanol, heksan, dichlorometan, a także dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym [64,69]. Tradycyjne metody ekstrakcji obarczone są szeregiem niedogodności – stosowane rozpuszczalniki są nierzadko toksyczne, czas ekstrakcji sięga kilkunastu dni, proces prowadzony jest często w wysokiej temperaturze, co jest wysoce energochłonne i może powodować degradację wrażliwych związków [70]. Materiał roślinny nierzadko jest trudny do pozyskania, metabolity wtórne zazwyczaj syntezowane są w niewielkich ilościach i tylko w określonych organach roślinnych, uprawa uzależniona jest od warunków klimatycznych. Często musi upłynąć wiele lat, by materiał roślinny zawierał metabolity w satysfakcjonujących ilościach, dla przykładu, korzenie *Panax ginseng* (żeń-szeń) są gotowe do zbioru po około sześciu latach, a cisy najwięcej taksolu produkują dopiero po około sześćdziesięciu latach [71].

4.2. SYNTEZA CHEMICZNA DIHYDROCHALKONÓW

Chemicznie dihydrochalkony można otrzymać między innymi przez regioselektywną redukcję podwójnego wiązania węgiel-węgiel w α,β -nienasyconych ketonach.

Do bezpośredniego uwodornienia chalkonów do dihydrochalkonów niezbędne jest użycie soli (kompleksów) metali, takich jak iryd, pallad, ruten, czy nikiel [72].

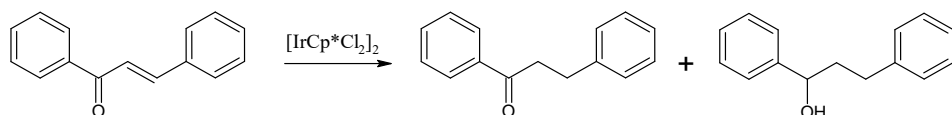
Odczynniki stosowane w tych reakcjach są silnie łatwopalne, z tego względu muszą być zachowane ściśle kontrolowane warunki reakcji [73]. Briot w 2004 roku zaproponował użycie palladu do otrzymywania dihydrochalkonów. Przykładowa reakcja została umieszczona na schemacie 1. Arylowanie palladem 1-arylo-2-propen-1-olu, jest kluczowym etapem procesu. Dzięki tej metodzie możliwe jest otrzymanie szerokiego wachlarza różnorodnych pochodnych [74].



Schemat 1. Chemiczna synteza dihydrochalkonu (R^1R^2 : -H, -OH, -CH₃, -OCH₃, -Br, -Cl etc.) [74]

Scheme 1 Chemical synthesis of dihydrochalcone (R^1R^2 : -H, -OH, -CH₃, -OCH₃, -Br, -Cl etc.) [74]

Redukcja α,β -nienasyconych ketonów zachodzi również przy użyciu innych katalizatorów, takich jak $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ [75] (Schemat 2).



Schemat 2. Przebieg reakcji uwodornienia z zastosowaniem $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ [75]

Scheme 2 The course of the hydrogenation reaction with $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ [75]

Wydajność tej reakcji w optymalnych warunkach była bardzo wysoka i wynosiła 83-99%. Najwyższą wydajność tworzenia się dihydrochalkonu - 99% uzyskano stosując K_2CO_3 (5 mol%) w propanolu [75]. Zestawienie warunków reakcji wraz z uzyskanymi wydajnościami przedstawiono w tabeli 3.

Innym katalizatorem umożliwiającym przeprowadzenie chemoselektywnego uwodornienia są metaliczne nanocząstki rutenu [76]. Substratami wykorzystanymi w badaniu były 3-buten-2-on, 3-penten-2-on oraz 4-metyl-3-penten-2-on. Katalizatorem były nanocząstki rutenu o średnicy 7nm. Reakcja przebiegła z bardzo wysoką selektywnością wynoszącą >99.9%. Kolejną zaletą omawianego procesu są jego łagodne warunki (roztwór etanolu, 35°C, 1–10 bar H_2) i możliwość wielokrotnego stosowania nanocząsteczek rutenu w reakcjach uwodorniania nienasyconych ketonów [76].

Kolejną bardziej przyjazną dla środowiska naturalnego metodą umożliwiającą chemoselektywną redukcję α,β -nienasyconych związków karbonylowych, w tym chalkonów, jest zastosowanie kompleksów palladu z N-heterocyklicznymi karbenami. Stosowanie karbenowych kompleksów palladu jest zgodne z zaleceniami zielonej chemii ze względu na możliwość ich regeneracji i ponownego wykorzystania [64].

Tabela 3. Zestawienie reagentów w reakcji uwodornienia chalkonu wraz z wydajnością. Do reakcji zastosowano: chalkon (0,2 mmol), $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ (1mol%), reagent (0,5 equiv.), rozpuszczalnik (1ml), 85°C, 5h [75]

Table 3. List of reagents used in the chalcone hydrogenation reaction along with the yield. The following were used in the reaction: chalcone (0.2 mmol), $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ (1mol%), reagent (0.5 equiv.), solvent (1ml), 85°C, 5h [75]

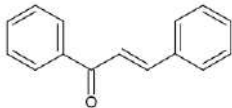
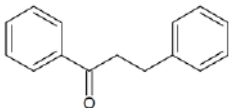
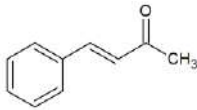
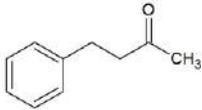
L.p.	Rozpuszczalnik	Reagent	Wydajność [%]	
			Dihydrochalkon	Alkohol
1	MeOH	K_2CO_3	31	0
2	EtOH	K_2CO_3	36	0
3	1-PrOH	K_2CO_3	70	0
4	1-BuOH	K_2CO_3	57	0
5	2-PrOH	K_2CO_3	92	0
6	2-PrOH	Na_2CO_3	89	0
7	2-PrOH	Cs_2CO_3	61	64
8	2-PrOH	KOH	2	86
9	2-PrOH	NaOH	3	84
10	2-PrOH	NEt_3	14	0
11*	2-PrOH	K_2CO_3	99	0
12	2-PrOH	-	66	0

11* - zastosowano 5mol% K_2CO_3

Kolejnym selektywnym katalizatorem umożliwiającym uwodornianie podwójnego wiązania w α,β -nienasyconych ketonach jest $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$ [77]. Zastosowanie wodorku miedzi na powierzchni pirogenicznej krzemionki umożliwia uzyskanie większej aktywności i selektywności katalizatora. Część zastosowanych w badaniu związków uległa konwersji w bardzo wysokim procencie i z dużą selektywnością (Tabela 4), dodatkową zaletą tej reakcji jest brak produktów ubocznych, takich jak alkohole [77].

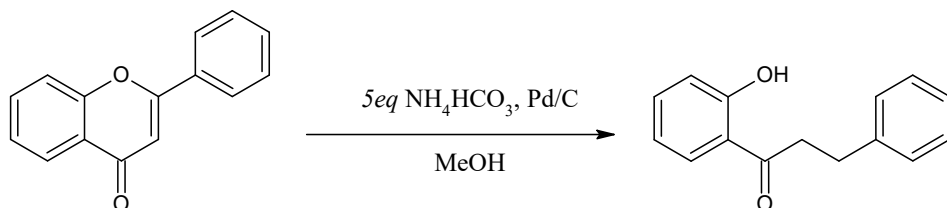
Tabela 4. Uwodornienie nienasyconych ketonów w obecności 8% $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$, 1 atm H_2 , temperatura: 90°C, rozpuszczalnik – toluen. Wybrane związki na podstawie [77]

Table 4. Hydrogenation of unsaturated ketones in the presence of 8% $\text{Cu}/\text{Al}_2\text{O}_3$, 1 atm H_2 , temperature: 90°C, solvent – toluene. The compounds were selected based on [77]

Lp.	Substrat	Produkt	Czas [h]	Konwersja [%]	Selektywność [%]
1			3	100	100
2			6	100	96

2'-Hydroksydihydrochalkony można również otrzymać przez chemiczne rozszczepienie pierścienia C we flawonie, które zachodzi podczas katalicznego

uwodornienia. Flawon w reakcji z mrówczanem amonu w obecności Pd/C w metanolu i w atmosferze azotu dał 2'-hydroksydihydrochalkon z 20% wydajnością (Schemat 3) [78].



Schemat 3. Katalityczne uwodornienie flawonu z towarzyszącym mu rozszczepieniem pierścienia C [78]

Scheme 3 Catalytic hydrogenation of a flavone with C-ring cleavage [78]

Dostępne na rynku hydroksypochodne związków flawonoidowych, takie jak kwercetyna i naryngenina również mogą stanowić substraty do produkcji dihydrochalkonów. Opisano pięcioetapowy proces, w którym wydajność wynosi od 23% do 37% [64]

Większość opisywanych w literaturze chemicznych metod syntezy dihydrochalkonów z odpowiadających im flawonów, czy chalkonów jest nieopłacalna ekonomicznie, ponieważ wymaga przynajmniej dwuetapowej syntezy, wydzielenia odpowiedniego produktu pośredniego i skomplikowanej procedury uwodorniania pod wysokim ciśnieniem [64].

Znaczna część odczynników, które stosuje się w omawianych powyżej reakcjach jest toksyczna i szkodliwa dla środowiska. Z tego względu należy wybierać reagenty odnawialne, które zmniejszają ilość odpadów. Katalizatory powinny cechować się jak najwyższą selektywnością, a uzyskiwane produkty nie powinny pozostawać w środowisku [79].

4.3. ZNACZENIE BIOTRANSFORMACJI W SYNTEZIE DIHYDROCHALKONÓW

W porównaniu ze swoimi chemicznymi odpowiednikami enzymy są uznane za zielone katalizatory, ponieważ pozyskiwane są z surowców odnawialnych i działają w łagodnych warunkach temperatury i ciśnienia. Ogromną zaletą katalizowanych przez nie reakcji jest ich wysoka regio- i enancjoselektywność [80–82]. Biokataliza staje się ważnym narzędziem do produkcji związków chemicznych o złożonej strukturze. Do skali przemysłowej opracowano już co najmniej 134 procesy biotransformacji [83].

Enzymy pochodzenia mikrobiologicznego odznaczają się wieloma zaletami:

-Są aktywne i stabilne.

-Katalizują reakcje z dużą wydajnością, a zmieniając warunki reakcji (zastosowane medium reakcji, temperatura, dodatek jonów metali) można wpływać na rodzaj i ilość wytwarzanego produktu.

-Dzięki rozwojowi procesów fermentacji szczególnie wyselekcjonowane szczepy są w stanie wytwarzać oczyszczone, dobrze scharakteryzowane enzymy na dużą skalę.

-Materiał genetyczny mikroorganizmów jest łatwy do sekwencjonowania, wiele genomów jest dostępnych w otwartych bazach danych, co umożliwi badania bioinformatyczne i odkrywanie nowych sekwencji kodujących białka o aktywności enzymatycznej.

-Mikroorganizmy będące źródłem enzymów wykorzystywanych w biotechnologii są bardziej podatne na modyfikowanie narzędziami inżynierii genetycznej, co umożliwi otrzymywanie nowych preparatów enzymatycznych o poprawionych właściwościach i wyższych możliwościach aplikacyjnych w przemyśle [81,84,85].

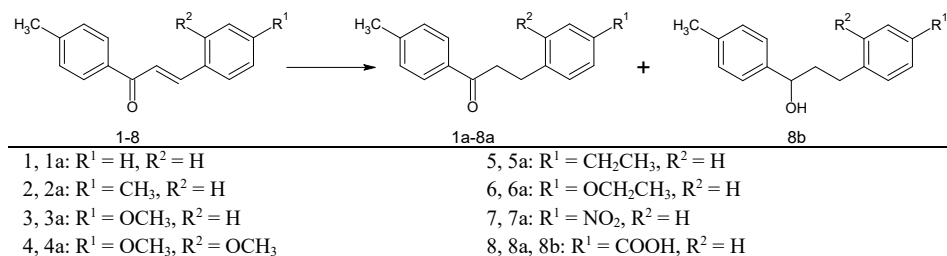
Biotransformacje oparte na oczyszczonych enzymach nie są jednak również wolne od wad, do których należą pracochłonne procedury izolowania i oczyszczania enzymów, wysoki koszt, większa wrażliwość na zmiany warunków środowiska reakcji oraz toksyczność substratu lub wytwarzanego produktu, a także konieczność stosowania drogich kofaktorów enzymów. Biokatalizatory całokomórkowe mogą być namnażane z wykorzystaniem niedrogich podłoży, umożliwiają kaskadowe przemiany substratów, wspomagają regenerowanie kofaktorów, zatem są tańszą i efektywną alternatywą dla preparatów enzymatycznych [82,86,87].

4.4. PRZYKŁADY BIOTECHNOLOGICZNEGO WYTWARZANIA DIHYDROCHALKONÓW

Bogaty aparat enzymatyczny wielu grup drobnoustrojów umożliwia uzyskanie produktów *trans*-uwodornienia wiązania podwójnego trójwęglowego fragmentu chalkonu [88]. Przeprowadzone do tej pory badania dowodzą, że transformacje chalkonów do dihydrochalkonów możliwe są przy wykorzystaniu jako biokatalizatorów komórek bakterii, grzybów strzępkowych, czy drożdży [89]. Odnalezione w literaturze przykłady przedstawiają wyłącznie biokatalizatory całokomórkowe, brak jest prac opisujących wykorzystanie czystych enzymów do otrzymywania dihydrochalkonów.

4.4.1 BIAKATALIZATORY PROKARIOTYCZNE

Wiele gatunków bakterii jest zdolnych do uwodorniania podwójnego wiązania w α,β -nienasyconych ketonach [90]. W badaniach, w których jako substraty zastosowano pochodne 4'-metylochalkonu, biokatalizatory stanowiły bakterie *Gordonia* sp. DSM44456 i *Rhodococcus* sp. DSM364 (schemat 4).

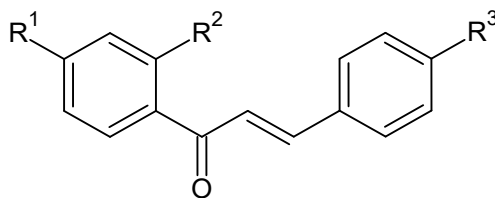


Schemat 4. Biotransformacje pochodnych 4'-metylochalkonu przy zastosowaniu *Gordonia* sp. DSM44456 i *Rhodococcus* sp. DSM364. Na podstawie [90].

Scheme 4. Biotransformations of 4'-methylchalcone derivatives using: *Gordonia* sp. DSM44456 and *Rhodococcus* sp. DSM364 [90]

Reakcja w kulturach obu szczepów przebiegała z wysoką wydajnością wynoszącą od 38% do ponad 99%. 4'-Metylochalkon oraz jego pochodne podstawione grupami alifatycznymi, alkoksylowymi, a także grupą nitrową (1-7) dały wyłącznie produkty redukcji podwójnego wiązania, natomiast w przypadku 4'-metylochalkonu podstawionego grupą karboksylową (8) powstał także produkt dodatkowej redukcji grupy karbonylowej chalkonu. Analizując przebieg biotransformacji substratu 8 odkryto, że po pierwszej godzinie zarówno szczepy *Gordonia* sp., jak i *Rhodococcus* sp. wytworzyły wyłącznie produkt 8a (Schemat 7), redukcja grupy karbonylowej (produkt 8b) rozpoczynała się dopiero od szóstej godziny inkubacji z substratem. Omawiane powyżej biokatalizatory bakteryjne wykorzystano również w biotransformacjach chalkonu, 4-metoksychalkonu i chalkonu naryngeniny. Wszystkie reakcje przebiegały chemoselektywnie skutkując wyłącznie tworzeniem się nasyconych pochodnych 1,3-difenylo-1-propanonu. Po 72 godzinach uzyskano produkty z wydajnością od 13% do 94% [91].

W badaniach Stompor i wsp. zastosowali siedem różnorodnie podstawionych chalkonów pozyskanych na drodze syntezy chemicznej (Rys. 6) i jeden komercyjnie zakupiony chalkon bez dodatkowych grup funkcyjnych [92].



1: R ¹ = R ² = H, R ³ = Cl	5: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; R ³ = CH ₃
2: R ¹ = R ² = H, R ³ = CH ₃	6: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; R ³ = OCH ₂ CH ₃
3: R ¹ = H, R ² = OH, R ³ = CH ₃	7: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; R ³ = Br
4: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; R ³ = H	8: R ¹ = R ² = R ³ = H

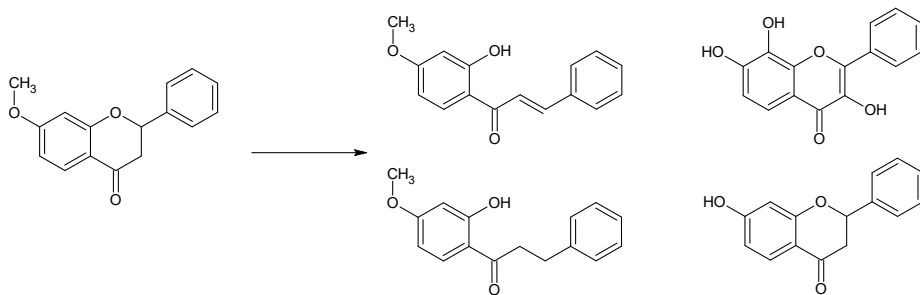
Rysunek 6. Substraty zastosowane do otrzymania dihydrochalkonów w kulturach bakterii z rodzajów *Rhodococcus* i *Lactobacillus* i drożdży z rodzaju *Rhodotorula* [92]

Figure 6. Substrates used to obtain dihydrochalcones in cultures of bacteria of the genus *Rhodococcus* and *Lactobacillus* and yeast of the genus *Rhodotorula* [92]

Wykorzystując jako biokatalizatory bakterie z rodzaju *Rhodococcus* i *Lactobacillus*, a także drożdże z rodzaju *Rhodotorula* uzyskano redukcję wiązania podwójnego chalkonów z wydajnością od 12% do 72% w czasie od 3 do 7 dni [92].

Wydajnymi mikroorganizmami zamieszkującymi środowisko wodne zdolnymi do przekształcania chalkonów okazały się cyjanobakterie. W doświadczeniu substratem był chalkon, a biokatalizatorami halofilne komórki *Spirulina platensis*, a także słodkowodne: *Anabaena laxa*, *Anabaena sp.*, *Aphanizomenon klebahnii*, *Nodularia moravica*, *Chroococcus minutus*, *Merismopedia glauca* and *Synechocystis aquatilis*. Wszystkie testowane organizmy były zdolne do redukcji podwójnego wiązania chalkonu w ciągu 14 dni biotransformacji, z różną wydajnością wynoszącą od 3% do >99%. Cyjanobakterie *Anabaena sp.* i *C. minutus* poza głównym produktem wytwarzały niewielkie ilości produktów redukcji grupy karbonylowej [89].

Chalkony na drodze biotransformacji mogą powstawać nie tylko w wyniku uwodornienia odpowiednich chalkonów, ale także otwarcia heterocyklicznego pierścienia C flawanonów. Takie uzdolnienia posiada szczep bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, który 7-metoksyflawanon przekształcał do czterech różnych produktów w wyniku hydroksylacji, *O*-demetylacji, dehydratacji i otwarcia pierścienia C (Schemat 5). W tym ostatnim przypadku zaobserwowano utworzenie się zarówno dihydrochalkonu, jak i chalkonu. Dihydrochalkon powstał z niewielką wydajnością wynoszącą 3.7% [93].



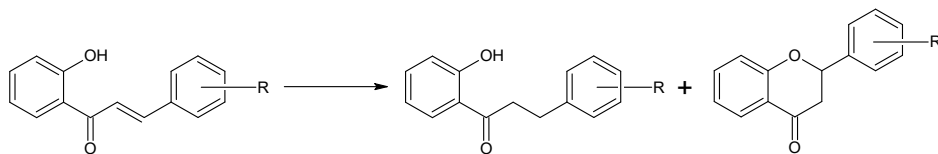
Schemat 5. Biotransformacje 7-metoksyflawanonu w kulturze bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 [93]

Scheme 5. Biotransformations of 7-methoxyflavanone in *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 strain culture [93]

Omawiane bakterie przekształciły, zastosowany jako substrat 5,7-dimetoksyflawanon w ciągu 12 dni, wyłącznie do analogicznego dihydrochalkonu i chalkonu z wydajnościami, odpowiednio 54.1% i 2.7%. Prawdopodobnie chalkon jest produktem pośrednim prowadzącym do powstania dihydrochalkonu [93].

4.4.2 BIOKATALIZATORY EUKARIOTYCZNE

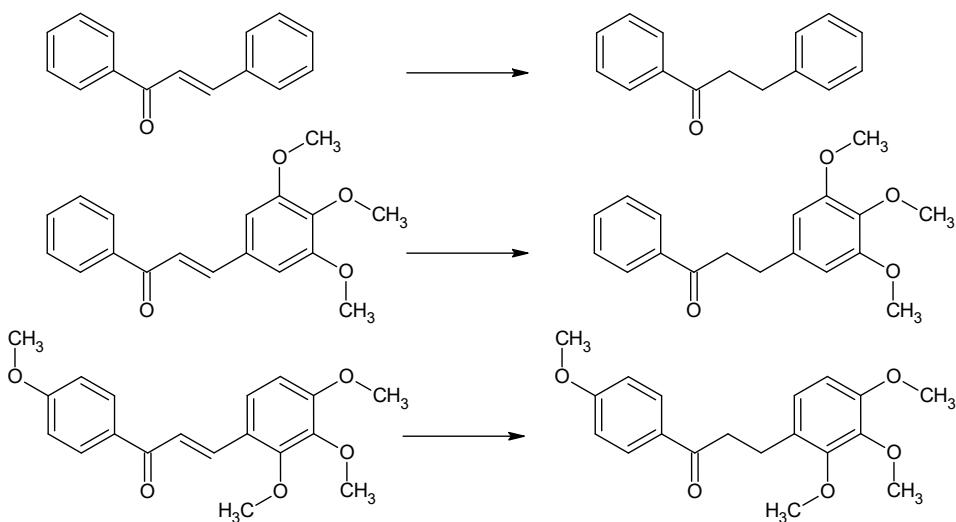
Dobrym źródłem enzymów redukujących wiązanie podwójne jest morski grzyb *Penicillium raistrickii* CBMAI 931. W doświadczeniu substraty stanowiła grupa 2'-hydroksychalkonów zawierających grupę metoksyłową, a także atomy fluorowców – Cl, Br, F. Wiązania podwójne we wszystkich substratach zostały zredukowane w ciągu 14 dni, a wydajność wyniosła od 25% do 83%. Oprócz dihydrochalkonów, produktami reakcji były flawanony powstające z wydajnością 3-9% (schemat 6). Na stopień konwersji substratu wpływał rodzaj podstawnika obecnego w substracie. Badany szczep przekształcał z nieznacznie większą wydajnością 2'-hydroksychalkon, gdy w pierścieniu B w pozycji *para* obecna była grupa metoksyłowa (53%), niż kiedy w tej samej pozycji znajdowała się silnie elektroujemna grupa akceptorowa – Cl (41%). Stopień lipofilności podstawnika skorelowany był ze stopniem konwersji substratu, prawdopodobnie dlatego, że związki zawierające bardziej lipofilne podstawniki mogą lepiej przenikać przez błonę komórkową. W przytoczonym eksperymencie bromopochodne chalkonów biotransformowane były z większą wydajnością od analogicznych chloropochodnych, a najwyższe wydajności uzyskano dla chalkonu zawierającego atom fluoru. Wynikać to może z tworzenia się silnych wiązań wodorowych pomiędzy fluorem a resztami aminokwasów tworzących centrum aktywne w enzymie [94,95].



Schemat 6. Chemoselektywna hydrogenacja 2'-hydroksychalkonów w kulturze *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 [95]

Scheme 6. Chemoselective hydrogenation of 2'-hydroxychalcones in the culture of *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 [95]

Szczepy grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*, które wcześniej szeroko stosowane były w biotransformacjach flawonów [96], również posiadają zdolność do przekształcania chalkonów w dihydrochalkony. Endofityczne grzyby z gatunku *Aspergillus flavus* są zdolne do redukowania podwójnego wiązania chalkonu, 3,4,5-trimetoksychalkonu i 2,3,4,4'-tetrametoksychalkonu (Schemat 7). Wydajność wynosiła od 15.6% dla 2,3,4,4'-tetrametoksychalkonu do 74.5% dla chalkonu [97].



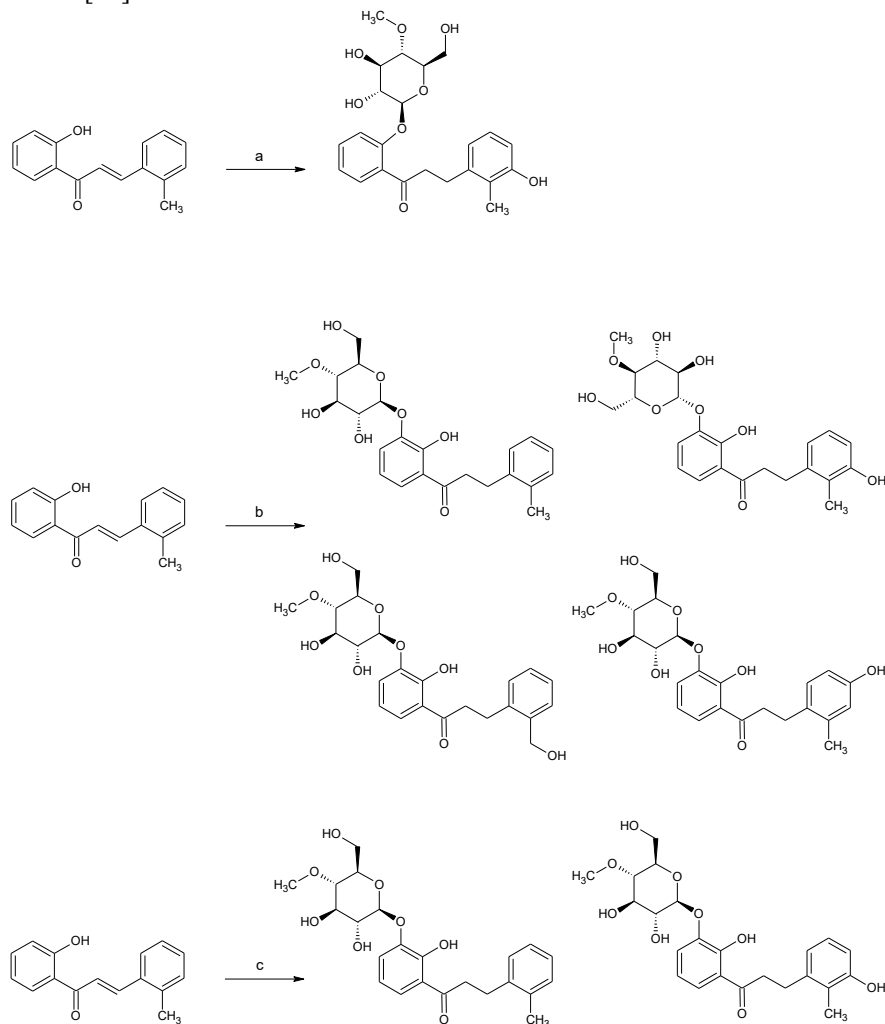
Schemat 7. Biotransformacje chalkonu i jego metoksy pochodnych przeprowadzonych przez *Aspergillus flavus* [97]

Scheme 7. Biotransformations of chalcone and its methoxy derivatives carried out by *Aspergillus flavus* [97]

Entomopatogenne grzyby strzępkowe, od niedawna stosowane do biotransformacji związków flawonoidowych, w swoich komórkach wytwarzają enzymy umożliwiające kaskadowe przekształcenia ksenobiotyków. Mikroorganizmy

te są zdolne nie tylko do prowadzenia redukcji podwójnego wiązania chalconów, ale jednocześnie wprowadzają do struktury związku cząsteczki 4-*O*-metyloglukopiranozy, dzięki czemu poprawiają ich stabilność, rozpuszczalność w wodzie i biodostępność [98,99].

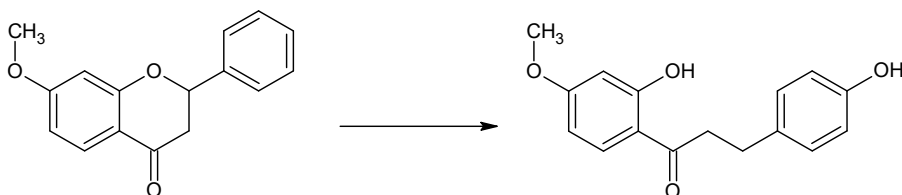
2'-Hydroksy-2-metylochalcon uzyskany na drodze syntezy chemicznej został poddany biotransformacjom w hodowlach szczepów *Beauveria bassiana* KCH J1.5, *Isaria fumosorosea* KCH J2 i *Isaria farinosa* KCH J2.6. W rezultacie otrzymano pięć nowych glikozylowanych dihydrochalconów (Schemat 8) z wydajnością od 2.9% do 13.1% [99].



Schemat 8. Biotransformacje 2'-hydroksy-2-metylochalconu w kulturach: *Isaria fumosorosea* KCH J2 (a), *Beauveria bassiana* KCH J1.5 (b) i *Isaria farinosa* KCH J2.6 (c) [99]

Scheme 8. Biotransformations of 2'-hydroxy-2-methylchalcone in the cultures of: *Isaria fumosorosea* KCH J2 (a), *Beauveria bassiana* KCH J1.5 (b) and *Isaria farinosa* KCH J2.6 (c) [99]

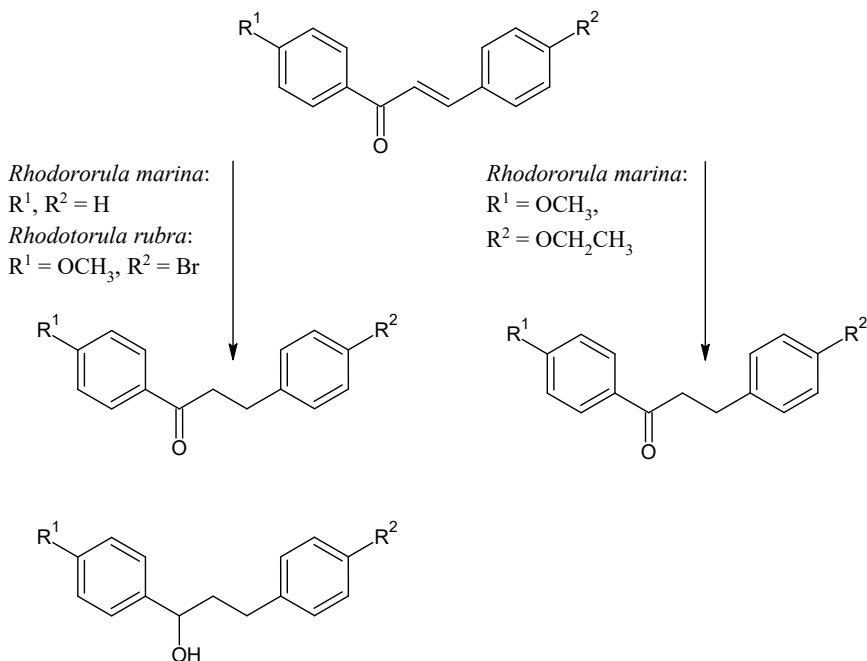
Podobnie jak wspomniany wcześniej szczep bakterii *S. maltophilia* KB2, również grzyb strzępkowy *Penicillium chermesinum* 113 posiada zdolność konwersji flawanonów do odpowiednich dihydrochalkonów. W kulturze tego szczepu 7-metoksyflawanon został przekształcony wyłącznie do 4,2'-dihydroksy-4'-metoksydihydrochalkonu z wydajnością izolowaną wynoszącą 15% po 15 dniach biotransformacji (Schemat 9). 7-Metoksyflawon w kulturze tego samego szczepu uległ jedynie hydroksylacji w pozycję C-4' [100].



Schemat 9. Biotransformacje 7-metoksyflawanonu w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* 113 [100]

Scheme 9. Biotransformations of 7-methoxyflavanone in *Penicillium chermesinum* 113 strain culture [100]

Komórki drożdży stanowią bardzo wydajne narzędzie do produkcji dihydrochalkonów z chalkonów. Schemat 10 przedstawia przykładową redukcję biokatalizowaną komórkami drożdży.



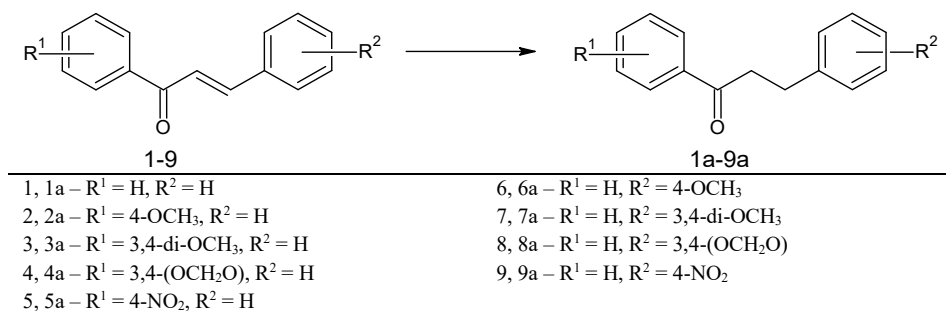
Schemat 10. Przykład biotransformacji chalkonu z użyciem drożdży *Rhodotorula marina* i *Rhodotorula rubra* [79]

Scheme 10. An example of chalcone biotransformation using yeasts *Rhodotorula marina* and *Rhodotorula rubra* [79]

Drożdże z rodzaju *Rhodotorula* posiadają zdolność przekształcania chalkonów niepodstawionych, a także podstawionych grupą metoksyową, czy bromem [56,92].

Janeczko i wsp. porównali przebieg biotransformacji pomiędzy kilkoma gatunkami drożdży (*Yarrowia lipolytica* KCh 71, *Rhodotorula glutinis* KCh 242, *Rhodotorula rubra* KCh 4, *Saccharomyces cerevisiae* KCh 464) i grzybów strzępkowych (*Syncephalastrum racemosum* KCh 105, *Chaetomium* sp. KCh 6651, *Didymosphaeria igniaria* KCh 6670, *Absidia coerulea* KCh 93, *Fusarium culmorum* KCh 10) i wykazali, że pierwsza grupa mikroorganizmów jest zdolna do redukcji podwójnego wiązania chalkonów dużo szybciej. Już po jednej godzinie biotransformacji od 80 do 99% substratu (chalkonu i 2'-hydroksychalkonu) ulegało konwersji. W większości przypadków po trzech godzinach procesu następował jednak spadek zawartości dihydrochalkonu w mieszaninie poreakcyjnej, co było spowodowane redukcją grupy karbonylowej [56].

Modelowy biokatalizator drożdżowy stanowią komórki *Saccharomyces cerevisiae*, które są w stanie zredukować różnie podstawione chalkony (Schemat 11).



Schemat 11. Bioredukcja chalkonu i jego pochodnych przez *Saccharomyces cerevisiae* [101]

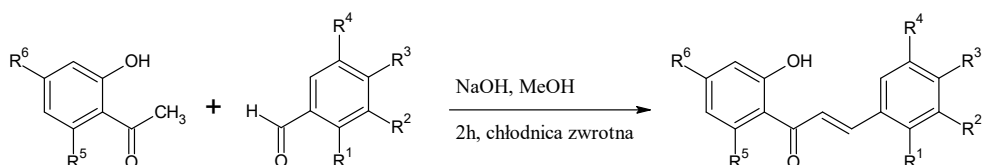
Scheme 11. Bioreduction of chalcone and its derivatives by *Saccharomyces cerevisiae* [101]

W przypadku wszystkich zastosowanych substratów głównemu produktowi nie towarzyszyły produkty uboczne, takie jak alkohole. Dodatkowo zbadano, jak warunki podczas biotransformacji wpływają na jej przebieg, dzięki czemu wykazano, że temperatura 35-45°C i pH \geq 5,5 są najkorzystniejsze i umożliwiają >99% konwersję substratów. Również gęstość komórek biokatalizatora wpływa na wydajność redukcji, a najlepsze wyniki uzyskano dla gęstości 100 g/L całych komórek *S. cerevisiae* [101].

Spośród drożdżowych biokatalizatorów na szczególną uwagę zasługuje gatunek *Y. lipolytica*. Stale rosnące zainteresowanie tymi drożdżami wynika z ich potencjału do katalizowania różnorodnych reakcji, a także łatwości w hodowli wynikającej między innymi z wysokiej tolerancji na zmiany pH, stężenia soli oraz

akceptowania szerokiej gamy źródeł węgla, co podnosi ekonomiczną opłacalność procesu. Co ważniejsze, status GRAS (Generally Recognized As Safe) czyni szczepy tych drożdży atrakcyjnym i przyjaznym dla środowiska narzędziem mikrobiologicznym do produkcji nutraceutyków, żywności fermentowanej i suplementów diety. Drożdże *Y. lipolytica* są dopuszczone w krajach Unii Europejskiej do obrotu jako nowa żywność od 2019 roku (Rozporządzenie UE 2019/760). Maksymalna stosowana dawka wynosi 3 g dziennie dla dzieci w wieku od 3 do 10 lat. Powyżej 10 roku życia dawka wynosi 6 g dziennie [102].

Wysokie zdolności biokatalityczne szczepu *Y. lipolytica* KCh 71, w porównaniu z innymi gatunkami drożdży, zostały dowiedzione przy wykorzystaniu pięciu pochodnych chalkonu uzyskanych na drodze syntezy Claisena–Schmidta (Schemat 12).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
1	OCH ₃	H	H	H	H	H
2	H	OCH ₃	H	H	H	H
3	H	H	OCH ₃	H	H	H
4	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	H
5	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H
6	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃
7	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
8	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

Schemat 12. Synteza metoksychalkonów metodą kondensacji Claisena–Schmidta [102]

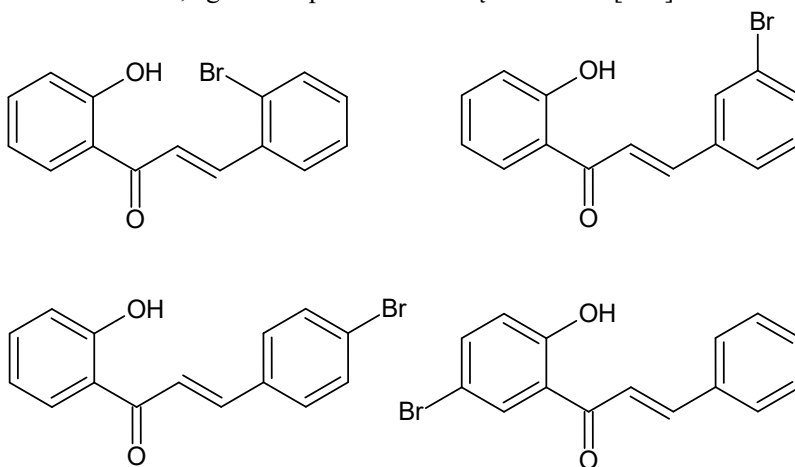
Scheme 12. Synthesis of methoxychalcones by Claisen-Schmidt condensation [102]

Aktywność drożdży *Y. lipolytica* porównano ze szczepami: *Rhodotorula rubra* KCh 4, *Rhodotorula marina* KCh 77, *R. rubra* KCh 82, *Candida viswanathii* KCh 120, *R. glutinis* KCh 242, *Saccharomyces cerevisiae* KCh 464 i *Candida parapsilosis* KCh 909.

Substraty 1-4 były konwertowane przez szczep *Y. lipolytica* KCh 71 do analogicznych chalkonów z bardzo wysokimi wydajnościami wynoszącymi od 88 do 99% już po jednej dobie, jedynie substrat 5 był przekształcany mniej efektywnie. W jego przypadku maksymalna zaobserwowana wydajność wyniosła 20% po siedmiu dniach biotransformacji. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń badacze wysnuli wniosek, że wydajność biotransformacji jest skorelowana ujemnie z liczbą podstawników metoksylowych obecnych w pierścieniu B, a produktów redu-

kcji nie zaobserwowano w ogóle, kiedy dwie grupy metoksyłowe obecne były w pierścieniu A [102].

Stosując ten sam panel biokatalizatorów i pochodne 2'-hydroksychalkonu podstawione bromem w różnych pozycjach pierścienia A i B (Rys. 7) wykazano kluczowe znaczenie położenia atomu bromu dla przebiegu biotransformacji: ilość tworzonego dihydrochalkonu malała w zależności od pozycji atomu bromu w szkieletcie chalkonu, zgodnie z prawidłowością $2>3>5'>4$ [103].



Rysunek 7. Bromopochodne 2'-hydroksychalkonu zastosowane w biotransformacjach katalizowanych przez drożdże [103]

Figure 7. Bromo derivatives of 2'-hydroxychalcone used in yeast-catalysed biotransformations [103]

UWAGI KOŃCOWE

Ukierunkowanie konsumentów na wybór smacznych, ale jednocześnie zdrowych produktów spożywczych jest silnym impulsem do badań nad substytutami tradycyjnie stosowanej sacharozy.

Słodzik powinien nadawać pożywieniu cechy organoleptyczne jak najbardziej zbliżone do tych uzyskiwanych przy użyciu cukru, ale jednocześnie w jak najmniejszym stopniu wpływać na kaloryczność potrawy i nie powodować wahań poziomu glukozy we krwi po jej spożyciu. Idealnie, jeżeli jego pochodzenie byłoby naturalne, a także gdyby zapewniał dodatkowe korzyści zdrowotne konsumentom i poprawiał trwałość żywności. Część dihydrochalkonów, związków pochodzenia roślinnego lub ich bliskich analogów, ma szansę sprostać tym wymaganiom. Dzięki naturalnemu pochodzeniu dihydrochalkony mogą być stosowane w żywności funkcjonalnej i zyskać szeroką akceptację wśród konsumentów. Intensywnie słodki smak i bliska zerowej kaloryczność stanowią znaczące atuty tej grupy polifenoli, w stosunku do sacharozy. Wykazywana przez te związki aktywność biologiczna, w tym przeciwutleniająca i przeciwmikrobiologiczna, może nie

tylko wpływać pozytywnie na zdrowie spożywających je ludzi, ale również przedłużać trwałość żywności.

Dihydrochalkony można pozyskiwać w wyniku ekstrakcji, syntezy chemicznej lub biotransformacji. Ta ostatnia metoda wydaje się optymalna ze względu na uzyskiwane wysokie wydajności, stosunkowo niski koszt, a także znikomy negatywny wpływ na środowisko naturalne. Odkryto do tej pory wiele wydajnych biokatalizatorów i metod umożliwiających pozyskiwanie znaczących ilości dihydrochalkonów. Do dziś jako dodatek do żywności stosowany jest jednak jedynie dihydrochalkon neohesperydyny.

Niezbędne są intensywne badania nad określeniem poziomu słodkości nowo uzyskiwanych dihydrochalkonów, ich bezpieczeństwa, a także potencjału prozdrowotnego. Dzięki temu możliwe będzie rozszerzenie wachlarza zdrowych i naturalnych zamienników sacharozy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] F. Hutteau *et al.*, *Food Chem*, 1998, **63**, 9.
- [2] A. Drewnowski *et al.*, *Journal of Nutrition*, 2012, **142**, 1142S.
- [3] G. Eggleston, *Chemistry's Role in Food Production and Sustainability: Past and Present*. American Chemical Society, 2019, **1314**.
- [4] F.R. Bornet, *Am J Clin Nutr*, 1994, **59**, 763S.
- [5] U. Świerczek, A. Borowiecka, J. Feder-Kubis, *Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc/Food. Science Technology. Quality*, 2016, **4**, 15.
- [6] X. Qi, R.F. Tester, *Mol Nutr Food Res*, 2020, **64**, 1901082.
- [7] L. Kłosiewicz-Latoszek, B. Cybulska, *Probl Hig Epidemiol*, 2011, **92**, 181.
- [8] X. Li *et al.*, *Front Nutr*, 2022, **9**, 1013310.
- [9] M.A. Febbraio, M. Karin, *Cell Metab*, 2021, **33**, 2316.
- [10] M.A. Herman, M.J. Birnbaum, *Cell Metab*, 2021, **33**, 2329.
- [11] Y. Wu *et al.*, *Cell Metab*, 2022, **34**, 1042.
- [12] J.J. DiNicolantonio *et al.*, *Prog Cardiovasc Dis*, 2018, **61**, 3.
- [13] M.A. Payant, M.J. Chee, *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, **128**, 346.
- [14] J.A. Welsh, S.A. Cunningham, *Pediatr Clin North Am*, 2011, **58**, 1455.
- [15] F. Gomez-Pinilla, R.P. Cipolat, L.F.F. Royes, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, **1867**.
- [16] D. de F. Lelis *et al.*, *Life Sci*, 2020, **259**.
- [17] L. Sukiasyan, *Curr Probl Cardiol*, 2023, **48**.
- [18] A. Pepin, K.L. Stanhope, P. Imbeault, *Nutrients*, 2019, **11**.
- [19] H. Jiang *et al.*, *Journal of Genetics and Genomics*, 2021, **48**, 531.
- [20] S.N. Jayasinghe *et al.*, *Nutrients*, 2017, **9**, 750.
- [21] C. Fitch, K.S. Keim, *J Acad Nutr Diet*, 2012, **112**, 739.
- [22] D.R. Reed, T. Tanaka, A.H. McDaniel, *Physiol Behav.*, 2006, **88**, 215.
- [23] A. Shil *et al.*, *Nutrients*, 2020, **12**, 1862.
- [24] L. Hough, *Low-Calorie Foods and Food Ingredients*. Low-Calorie Foods and Food Ingredients, Springer, Boston, MA, 1993.
- [25] A.A. Alsunni, *Int J Gen Med*, 2020, **13**, 775.
- [26] A.R. Basson, A. Rodriguez-Palacios, F. Cominelli, *Front Nutr*, 2021, **8**, 746247.
- [27] M.-J. Gwak *et al.*, *Food Sci Biotechnol*, 2012, **21**, 889.
- [28] Kroger Manfred, Meister Kathleen, Kava Ruth, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2006, **5**, 35.
- [29] M. Michelle Reyes, S.A. Gravina, J.E. Hayes, *Chem Senses*, 2019, **44**, 571.
- [30] A. Koszowska *et al.*, *Nowa Medycyna*, 2014, **1**, 36.

- [31] D. Storey *et al.*, *Eur J Clin Nutr*, 2007, **61**, 349.
- [32] B.N. Paulino *et al.*, *Curr Opin Food Sci*, 2021, **41**, 36.
- [33] P. Liang *et al.*, *Biotechnol Adv*, 2023, **64**, 108105.
- [34] E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, *J Ferment Bioeng*, 1998, **86**, 1.
- [35] D. Umari *et al.*, *Frontiers in Sustainability*, 2022, **3**, 826190.
- [36] Cronin Joseph R., *Alternative & Complementary Therapies*, 2004, **9**, 139.
- [37] S.A. Hutchinson, G.S. Ho, C.-T. Ho, *Food Reviews International*, 1999, **15**, 249.
- [38] M. Kwon *et al.*, *Nutrients*, 2022, **14**, 1087.
- [39] Sękalska Beata, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2007, **3**, 127.
- [40] M. Grembecka, *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2015, **66**, 195.
- [41] M. Carrocho, P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, *Food and Chemical Toxicology*, 2017, **107**, 302.
- [42] K. Świąder *et al.*, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2019, **92**, 160.
- [43] A.C. Sylvestry, K.I. Rother, *Physiol Behav*, 2016, **164**, 446.
- [44] K.R. Tandell, *J Pharmacol Pharmacother*, 2011, **2**, 236.
- [45] Whitehouse Christina R., Boullata Joseph, McCauley Linda, AAOHN J., 2008, **56**, 251.
- [46] M. Soffritti *et al.*, *Environ Health Perspect*, 2007, **115**, 1293.
- [47] K. Büchner *et al.*, *Foods*, 2022, **11**, 2734.
- [48] A. Mukherjee, J. Chakrabarti, *Food and Chemical Toxicology*, 1997, **35**, 1177.
- [49] J. Grupińska *et al.*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2015, **48**, 1.
- [50] J. Myszkowska-Ryciak *et al.*, *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika*, 2010, **59**, 365.
- [51] H. Emamat *et al.*, *EXCLI J*, 2020, **19**, 620.
- [52] C. Debras *et al.*, *BMJ*, 2022, **378**, e071204.
- [53] L. Liu *et al.*, *Food Sci Nutr*, 2021, **9**, 4589.
- [54] J. Shearer, S.E. Swithers, *Rev Endocr Metab Disord*, 2016, **17**, 179.
- [55] W. Dan, J. Dai, *Eur J Med Chem*, 2020, **187**, 111980.
- [56] T. Janeczko, W. Gładkowski, E. Kostrzewa-Susłow, *J Mol Catal B Enzym*, 2013, **98**, 55.
- [57] H. ur Rashid *et al.*, *Bioorg Chem*, 2019, **87**, 335.
- [58] D.K. Mahapatra, S.K. Bharti, *Life Sci*, 2016, **148**, 154.
- [59] E. Karimi-Sales, G. Mohaddes, M.R. Alipour, *Pharmacol Res*, 2018, **129**, 177.
- [60] G.E. Inglett *et al.*, *J Food Sci*, 1969, **34**, 101.
- [61] R.M. Horowitz, B. Gentili, 1963.
- [62] Wang Yili *et al.*, 2015.
- [63] C. Rivière, in *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier B.V., 2016, **51**, 253.
- [64] M. Stompor, D. Broda, A. Bajek-Bil, *Molecules*, 2019, **24**, 4468.
- [65] DuBois Grant E. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1977, **25**, 763.
- [66] X. Shi *et al.*, *J Funct Foods*, 2022, **95**, 105184.
- [67] M. Younes *et al.*, *EFSA Journal*, 2022, **20**, 7595.
- [68] M.G. Lindley, *Advances in Sweeteners*. Springer, Boston, MA, 1996.
- [69] Z. Xiao *et al.*, *Food Chem*, 2017, **231**, 324.
- [70] S.L. Rodríguez De Luna, R.E. Ramírez-Garza, S.O. Serna Saldívar, *Scientific World Journal*, 2020, **2020**, 6792069.
- [71] K. Ramirez-Estrada *et al.*, *Molecules*, 2016, **21**, 182.
- [72] P. Chen, W. Li, Y. Wang, *Catal Commun*, 2019, **125**, 10.
- [73] M. Luźny *et al.*, *Molecules*, 2019, **24**, 1.
- [74] A. Briot *et al.*, *Journal of Organic Chemistry*, 2004, **69**, 1374.
- [75] S.J. Chen, G.P. Lu, C. Cai, *RSC Adv*, 2015, **5**, 13208.
- [76] F.A. Khan, A. Vallat, G. Süß-Fink, *J Mol Catal A Chem*, 2012, **355**, 168.
- [77] N. Ravasio *et al.*, *Tetrahedron Lett*, 1996, **37**, 3529.
- [78] M.-H. Kim *et al.*, *J Appl Biol Chem*, 2007, **50**, 85.
- [79] G.P. Rosa *et al.*, *ACS Sustain Chem Eng*, 2017, **5**, 7467.
- [80] C. de Carvalho, M. da Fonseca, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, 2011, **2**, 451.
- [81] X. Liu, C. Kokare, in *Biotechnology of Microbial Enzymes Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Elsevier Inc., 2017, 267.
- [82] Y.S. Anteneh, C.M.M. Franco, *Front Microbiol*, 2019, **10**.
- [83] A.J.J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**, 548.
- [84] S. Raveendran *et al.*, *Food Technol Biotechnol*, 2018, **56**, 16.

- [85] J.L. Adrio, A.L. Demain, *Biomolecules*, 2014, **4**, 117.
- [86] B. Lin, Y. Tao, *Microb Cell Fact*, 2017, **16**.
- [87] J. Ren, C.D. Barton, J. Zhan, *Fitoterapia*, 2022, **161**, 1.
- [88] S. Raimondi *et al.*, *J Biotechnol*, 2011, **156**, 279.
- [89] B. Żyszka, M. Anioł, J. Lipok, *Microb Cell Fact*, 2017, **16**, 136.
- [90] J. Kozłowska *et al.*, *RSC Adv*, 2018, **8**, 30379.
- [91] M. Stompor *et al.*, *J Mol Catal B Enzym*, 2013, **97**, 283.
- [92] M. Stompor, M. Kałużny, B. Żarowska, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100**, 8371.
- [93] E. Kostrzewa-Susłow *et al.*, *Molecules*, 2017, **22**, 1830.
- [94] S. Burmaoglu *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, **26**, 3172.
- [95] I.L. de Matos, M. Nitschke, A.L.M. Porto, *Marine Biotechnology*, 2019, **21**, 430.
- [96] W. AnMing *et al.*, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, **4**, 847.
- [97] M.J.C. Corrêa *et al.*, *J Braz Chem Soc*, 2011, **22**, 1333.
- [98] M. Dymarska *et al.*, *PLoS One*, 2017, **12**, e0184885.
- [99] A. Krawczyk-Łebek *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2021, **22**, 9619.
- [100] E. Kostrzewa-Susłow, T. Janeczko, *Molecules*, 2012, **17**, 14810.
- [101] V.D. Silva, B.U. Stambuk, M. da G. Nascimento, *J Mol Catal B Enzym*, 2010, **63**, 157.
- [102] M. Łużny *et al.*, *Catalysts*, 2020, **10**, 1135.
- [103] M. Łużny *et al.*, *Molecules*, 2022, **27**, 3681.

Praca wpłynęła do Redakcji 1 marca 2023 r.

OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE RACEMICZNYCH I OPTYCZNIE CZYNNYCH LAKTONÓW Z PIERŚCIENIEM AROMATYCZNYM W POZYCJI β

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF RACEMIC AND OPTICALLY ACTIVE LACTONES WITH AROMATIC RING ON β -POSITION

Witold Gładkowski

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław
e-mail: witold.gladkowski@upwr.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. β -Arylo- δ -jodo- γ -laktony i β -arylo- γ -jodo- δ -laktony
 - 1.1. Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnych jodolaktonów
 - 1.2. Aktywność biologiczna racemicznych i optycznie czynnych β -arylo- δ -jodo- γ -laktonów
2. Optycznie czynne β -arylo- δ -bromo- γ -laktony i β -arylo- γ -bromo- δ -laktony
 - 2.1 Synteza
 - 2.2 Aktywność biologiczna
3. *trans* β -Arylo- δ -hydroksy- γ -laktony
 - 3.1 Synteza i aktywność biologiczna
 - 3.2 Otrzymywanie optycznie czynnych *trans* β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów
 - 3.3 Otrzymywanie optycznie czynnych *cis* β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów w wyniku mikrobiologicznej dehalogenacji
4. β -Arylo- γ -alkilo- γ -laktony – produkty dehalogenacji jodolaktonów
 - 4.1 Synteza racemicznych β -arylo- γ -alkilo- γ -laktonów i ich aktywność biologiczna
 - 4.2 Mikrobiologiczna hydroliza β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Witold Gładkowski, prof. uczelni, w 2006 roku rozpoczął pracę w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora uzyskał w 2006 r., broniąc rozprawy pt. „Mikrobiologiczna funkcjonalizacja bicyklicznych laktonów z układem alkilopodstawionego cykloheksanu”, której promotorem był prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk. Stopień doktora habilitowanego nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia uzyskał w roku 2016. Jego zainteresowania naukowe obejmują izolowanie, identyfikację i modyfikacje struktury fosfolipidów, syntezę pochodnych fitosteroli, otrzymywanie optycznie czynnych laktonów o ukierunkowanej aktywności biologicznej, biotransformacje związków organicznych oraz ustalanie struktury związków chemicznych metodami

spektroskopowymi (NMR, IR, HRMS).



<https://orcid.org/0000-0002-3271-779X>

ABSTRACT

Natural and synthetic lactones containing an aromatic ring exhibit a number of biological properties, e.g. antiproliferative, antifeedant or antimicrobial activity. This review deals with the synthesis and biological properties of lactones containing an aromatic substituent in the β -position of the lactone ring. The described group of compounds includes halolactones, hydroxylactones, unsaturated lactones and products of reductive dehalogenation of iodolactones. In addition to chemical transformations, biotechnological methods for obtaining optically active lactones have also been described, including the use of lipases in the chemoenzymatic pathway leading to the production of halolactones, kinetic separation of hydroxylactones in the process of enzymatic transesterification, microbial hydrolytic dehalogenation of iodolactones and enantioselective hydrolysis of the lactone ring. The biological activity of the obtained β -aryllactones was also briefly characterized.

Keywords: lactones, chemoenzymatic synthesis, absolute configuration, antiproliferative activity, antifeedant activity

Słowa kluczowe: laktony, synteza chemoenzymatyczna, konfiguracja absolutna, aktywność antyproliferacyjna, aktywność antyfidantna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AcOH	– kwas octowy
CAL-B	– lipaza B z <i>Candida antarctica</i>
CLBL-1	– chłoniak B-komórkowy
CLB70	– przewlekła białaczka B-komórkowa
Bcl-2	– białko regulujące apoptozę
Bcl-xL	– białko transmembranowe w mitochondriach hamujące apoptozę
Bid	– białko proapoptyczne
m-CPBA	– kwas <i>meta</i> chloronadbenzoesowy
D17	– kostniakomięsak psa
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DIPE	– eter diizopropylowy
E2	– eliminacja zachodząca według mechanizmu dwucząsteczkowego
EtCOOH	– kwas propionowy
Et ₂ O	– eter dietylowy
GL-1	– ostra białaczka B-komórkowa
HI	– jodowodór
HeLa	– rak szyjki macicy
L	– większy podstawnik przy centrum chiralności
M	– średni podstawnik przy centrum chiralności
MCF7	– gruczolakorak piersi
MeOH	– metanol
NBS	– N-bromoimid kwasu bursztynowego
NHDF	– prawidłowe komórki ludzkich fibroblastów
S _N 2	– substytucja nukleofilowa zachodząca według mechanizmu dwucząsteczkowego
THF	– tetrahydrofuran
U2-OS	– kostniakomięsak człowieka

WPROWADZENIE

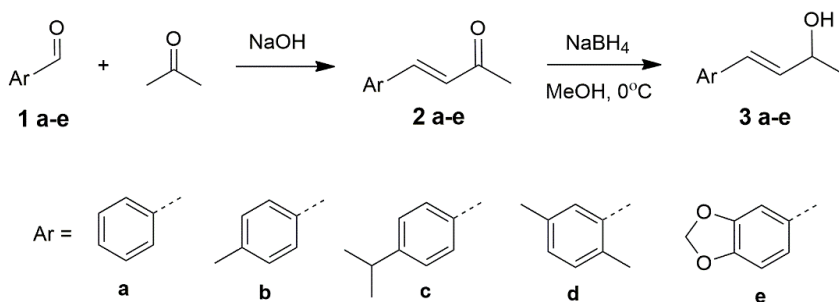
Laktony stanowią jedną z najliczniejszych grup związków spotykanych w przyrodzie. Są wtórnymi metabolitami roślin [1], owadów [2], mikroorganizmów [3,4]. Naturalne i syntetyczne laktony są często nośnikami przyjemnych zapachów [5,6], a większość z nich charakteryzuje się właściwościami biologicznymi, np. aktywnością antyfidantną [7,8], przeciwdrobnoustrojową [9,10] czy cytostatyczną [11]. Pełnią często rolę feromonów u zwierząt [12,13] i mikroorganizmów [14].

Interesujące właściwości biologiczne stwierdzono dla laktonów zawierających pierścień aromatyczny. Wykazują one m.in. działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne [15], przeciwbakteryjne [16], przeciwgrzybicze [17], przeciwwirusowe [18]. Szeroko opisana jest ich aktywność cytostatyczna względem komórek nowotworowych [19–21]. W tej grupie laktonów na uwagę zasługują γ i δ -laktony z podstawnikami aromatycznymi w pozycji β . Serię takich związków, wywodzących się z naturalnych aldehydów aromatycznych, otrzymano także w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Oprócz form racemicznych, opracowano również chemoenzymatyczne i biotechnologiczne metody uzyskania ich poszczególnych enancjomerów.

1. β -ARYLO- δ -JODO- γ -LAKTONY I β -ARYLO- γ -JODO- δ -LAKTONY

1.1. CHEMOENZYMATYCZNA SYNTEZA OPTYCZNIE CZYNNYCH JODOLAKTONÓW

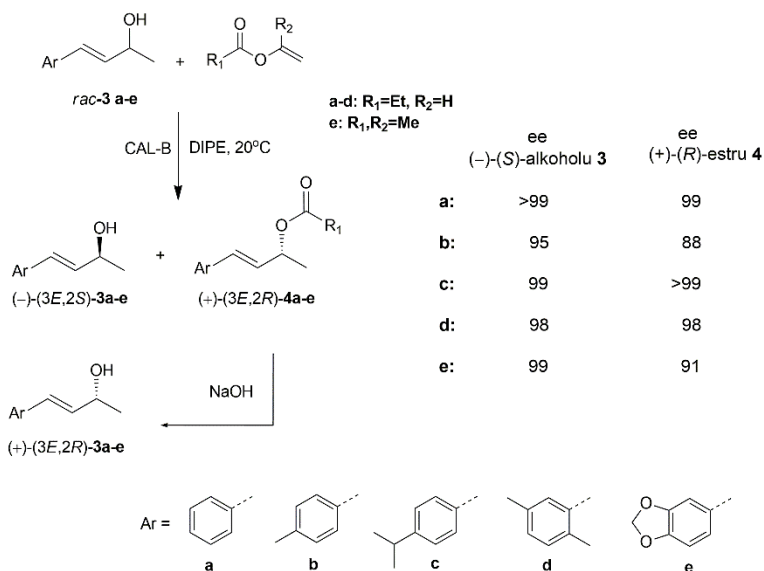
Związkami wyjściowymi w syntezie serii laktonów z podstawnikiem aromatycznym w pozycji β były naturalne, aromatyczne aldehydy: aldehyd benzoesowy, *p*-metylobenzoesowy, kuminowy, 2,5-dimetylobenzoesowy i piperonal (**1a-e**), które w pierwszym etapie poddano kondensacji krzyżowej Claisena-Schmidta z acetonem w środowisku zasadowym, otrzymując odpowiednie α,β -nienasycone ketony **2a-e**. Uzyskane ketony zredukowano następnie przy użyciu borowodoru sodu do odpowiednich alkoholi allilowych z układem 4-arylobut-3-en-2-olu (**3a-e**) (Rys. 1) [22,23].



Rysunek 1. Synteza racemicznych alkoholi allilowych **3a-e**

Figure 1. Synthesis of racemic allyl alcohols **3a-e**

Celem uzyskania jako końcowych produktów optycznie czynnych laktonów, w kolejnym etapie syntezy dokonano kinetycznego rozdziału enancjomerów otrzymanych alkoholi **3a-e** w procesie transestryfikacji. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej w środowisku eteru diizopropylowego (DIPE), z zastosowaniem propionianu winylu lub octanu izopropenyłu jako donorów grupy acylowej. Spośród testowanych w tym procesie lipaz najbardziej efektywnym biokatalizatorem okazała się lipaza CAL-B, w przypadku której już po 1-2 h reakcji uzyskano enancjomerycznie wzbogacone (*S*)-alkohole **3a-e** i (*R*)-estry **4a-e** z bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (88-99%) i blisko 50%-owymi wydajnościami izolowanymi. Produkty reakcji enzymatycznych rozdzielono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, a wydzielone estry zhydrolizowano w środowisku zasadowym uzyskując (*R*)-alkohole **3a-e**. (Rys.2) [22,24,25].

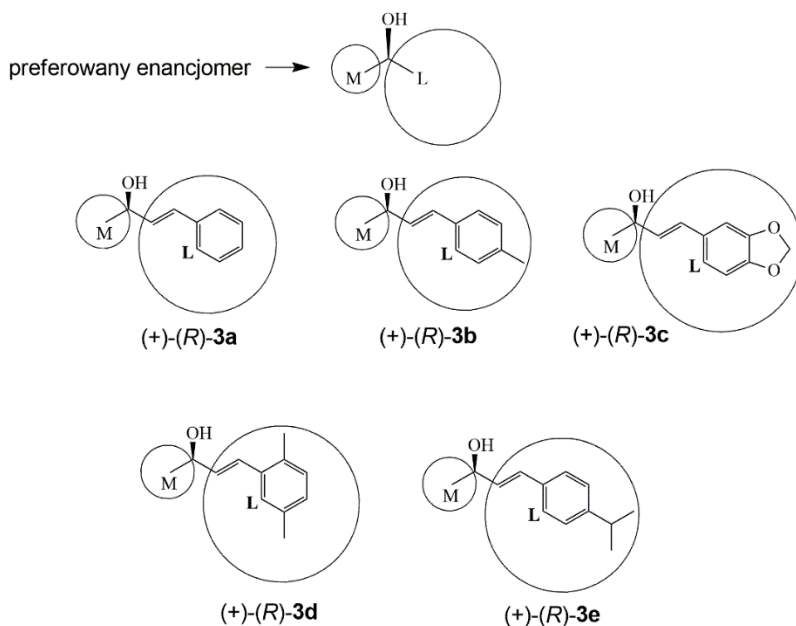


Rysunek 2. Kinetyczny rozdziel racemicznych alkoholi allilowych **3a-e** w procesie enzymatycznej transestryfikacji

Figure 3. Kinetic resolution of racemic allyl alcohols **3a-e** by enzymatic transesterification

Konfiguracje absolutne uzyskanych alkoholi ustalono w oparciu o znaną, empiryczną regułę Kazlauskasa, która pozwala przewidzieć, który z enancjomerów alkoholu reaguje szybciej w reakcjach transestryfikacji katalizowanych przez lipazy. Zgodnie z tą regułą, mającą zastosowanie w przypadku, gdy podstawniki wokół centrum asymetrii różnią się wyraźnie wielkością i przy założeniu kolejności

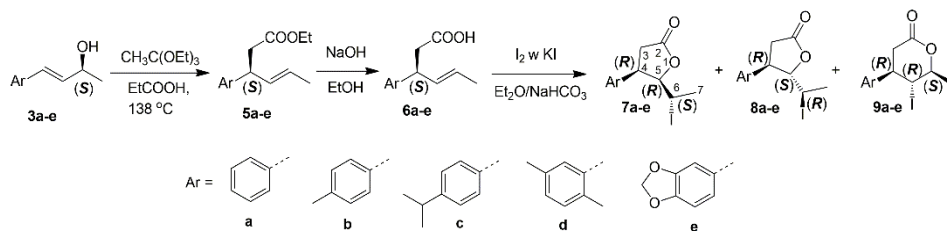
podstawników ustalonej wg reguł pierwszeństwa w porządku: grupa OH > większy podstawnik (L) > średni podstawnik (M), większość lipaz katalizuje preferencyjnie reakcje transestryfikacji (*R*)-alkoholi (Rys. 3). W efekcie przypisano konfiguracje *R* szybciej reagującym enancjomeroom alkoholi **3a-e** i ich estrom **4a-e** oraz przeciwne konfiguracje nieprzereagowanym enancjomeroom alkoholi **3a-e**. W przypadku znanych związków **3a**, **3b** i **3e** ustalenia te potwierdzono porównując dodatnie znaki skręcalności właściwej otrzymanych izomerów z danymi literaturowymi. Regułę zastosowano również dla nieopisanych wcześniej w literaturze alkoholi **3c** i **3d**, biorąc pod uwagę ich dużą analogię strukturalną do alkoholi **3a,b,e** (Rys. 3), dodatni znak skręcalności właściwej wszystkich enancjomerów uzyskanych po hydrolizie optycznie czynnych estrów **4a-e** oraz fakt, iż estry te otrzymano w reakcjach z udziałem tego samego enzymu w praktycznie tych samych warunkach reakcji [22].



Rysunek 3. Enancjomery (*E*)-4-arylobut-3-en-2-oli preferowane w reakcjach transestryfikacji katalizowanych przez lipazę CAL-B zgodnie z regułą Kazlauskasa

Figure 3. Enantiomers of (*E*)-4-arylbut-3-en-2-ols preferred in CAL-B-catalyzed transesterification according to the Kazlauskas' rule

Kolejnym kluczowym ze stereochemicznego punktu widzenia etapem syntezy było przegrupowanie Claisena w ortoocctanowej modyfikacji Johnsona, w wyniku którego z enancjomerów alkoholi **3a-e** otrzymano estry **5a-e**. Stereochemia tej reakcji skutkuje przeniesieniem chiralności z atomu C-2 alkoholu allilowego na atom C-3 w pozycji benzylowej tworzącego się estru z pełną retencją konfiguracji. Produktami przegrupowania enancjomerów *S* alkoholi **3a-e** były zatem estry **5a-e** o konfiguracji *S*, a z alkoholi o konfiguracji *R* otrzymano estry o konfiguracji *R*. Otrzymane (*S*)-estry **5a-e** zhydrolizowano w środowisku zasadowym otrzymując kwasy **6a-e** o identycznych konfiguracjach i nadmiarach enancjomerycznych w stosunku do substratów. Kwasy te w końcowym etapie poddano reakcji jodolaktonizacji za pomocą jodu w jodku potasu, w układzie dwufazowym: eter dietylowy-nasycony roztwór NaHCO₃ (Rys.4). Identyczną ścieżkę syntetyczną zastosowano w przypadku (*R*)-alkoholi **3a-e** [24,25].

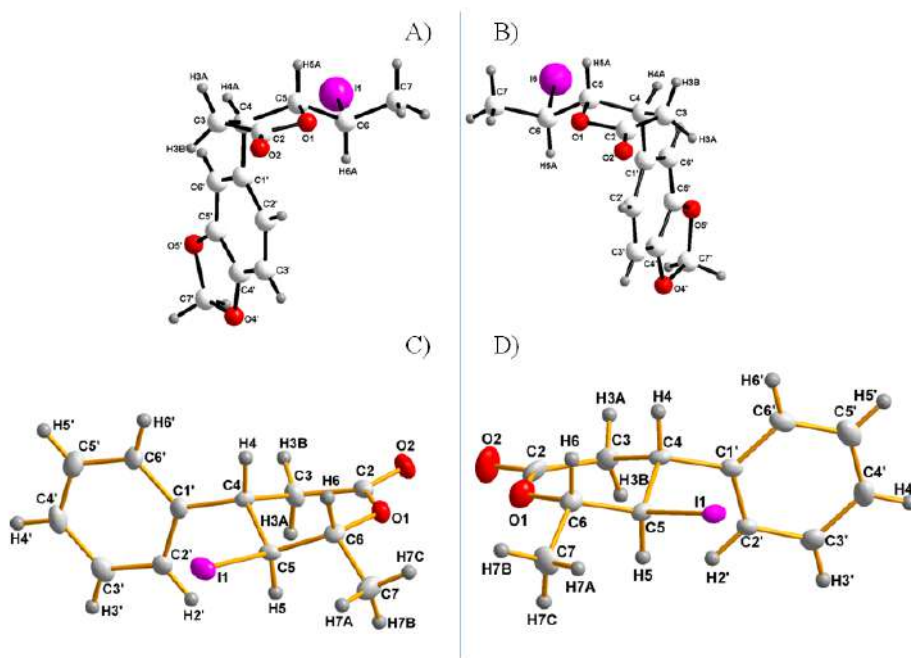


Rysunek 4. Trzyetapowa synteza jodolaktonów **7-9a-e** z (*S*)-alkoholi **3a-e**

Figure 4. Three-step synthesis of iodolactones **7-9a-e** from (*S*)-alcohols **3a-e**

W mieszaninach produktów jodolaktonizacji zdecydowanie dominowały produkty 5-*exo*-cyklizacji, najwyższą zawartością (40-56%) charakteryzowały się *cis*-δ-jodo-γ-laktony **7a-e**, ich izomery *trans* (**8a-e**) identyfikowano w ilościach 23-35%. Reakcja jest kontrolowana kinetycznie, a etapem determinującym szybkość całego procesu jest atak anionu karboksylanowego na kompleks jod-wiązanie podwójne. Preferencja tworzenia izomeru *cis* wynika z dążenia do minimalizacji sił odpychania elektrostatycznego w stanie przejściowym reakcji między pierścieniem aromatycznym a szybko tworzoną w pierwszym etapie jonem jodoniowym. Powstałe w wyniku 6-*endo*-cyklizacji *trans,cis*-γ-jodo-δ-laktony **9a-e** stanowiły 15-24% mieszaniny produktów. Wszystkie jodolaktony otrzymano z bardzo dużymi

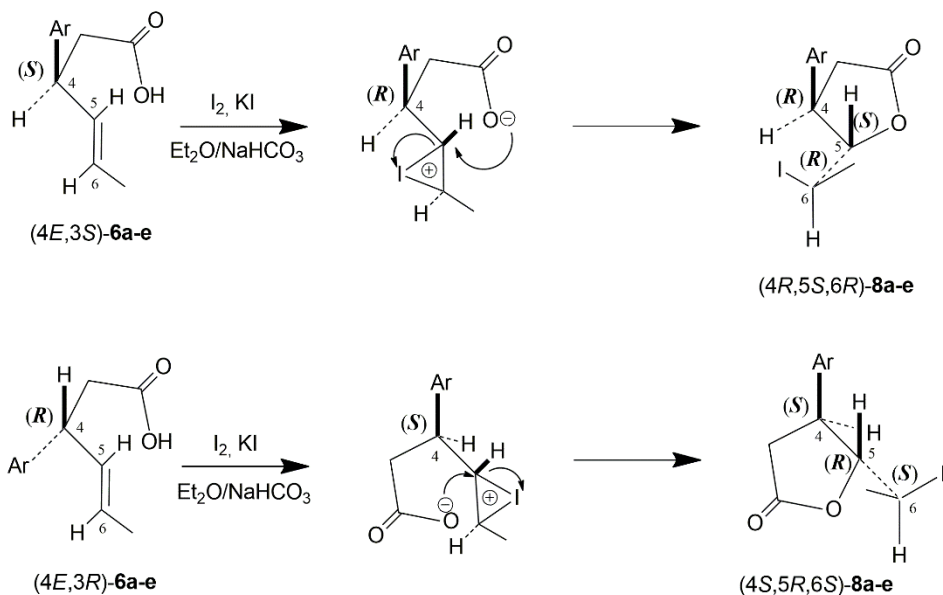
nadmiarami enancjomerycznymi (93-99%), a konfiguracje absolutne ich centrów chiralności potwierdziły analizy rentgenograficzne. Wyniki tej analizy wykazały, że *cis*- δ -jodo- γ -laktony **7a-e** oraz wyizolowane *trans,cis*- γ -jodo- δ -laktony **9a,b** otrzymane z *S*-enancjomerów kwasów posiadały konfiguracje *4R,5R,6S*, natomiast ich enancjomery uzyskano jako produkty laktonizacji kwasów o konfiguracji *R*. Przykładowe struktury krystaliczne enancjomerycznych par otrzymanych jodolaktonów przedstawiono na rysunku 5 [24,25].



Rysunek 5. Wybrane struktury krystaliczne enancjomerycznych par jodolaktonów: *cis*- δ -jodo- γ -lakton (*4R,5R,6S*)-**7e** (A) i jego enancjomer (*4S,5S,6R*)-**7e** (B) oraz *trans,cis*- γ -jodo- δ -lakton (*4S,5S,6R*)-**9a** (C) oraz jego enancjomer (*4R,5R,6S*)-**9a** (D)

Figure 5. Selected crystal structures of enantiomeric pairs of iodolactones: *cis*- δ -iodo- γ -lactone (*4R,5R,6S*)-**7e** (A) and its enantiomer (*4S,5S,6R*)-**7e** (B) and *trans,cis*- γ -iodo- δ -lactone (*4S,5S,6R*)-**9a** (C) and its enantiomer (*4R,5R,6S*)-**9a** (D)

Z uwagi, iż nie udało się uzyskać monokryształów *trans*- δ -jodo- γ -laktonów **8a-e**, konfiguracje ich centrów stereogenicznych ustalono w oparciu o mechanizm jodolaktonizacji (Rys.6).



Rysunek 6. Mechanizm powstawania stereozomerów *trans* δ -jodo- γ -laktonów w reakcji jodolaktonizacji enancjomerycznych kwasów **6a-e** pokazujący konfigurację centrów stereogenicznych powstałych produktów

Figure 6. The mechanism of formation of *trans* δ -jodo- γ -lactones in the iodolactonization of enantiomeric acids **6a-e** showing the configuration of stereogenic centers of the resulting products

Stosując wyżej opisaną ścieżkę syntetyczną z racemicznych alkoholi allilowych **3a-e** otrzymano także racemiczne *cis* δ -jodo- γ -laktony **7a,b,c,e**, *trans* δ -jodo- γ -laktony **8a,b,c,e** oraz γ -jodo- δ -laktony **9a,b** [23].

1.2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA RACEMICZNYCH I OPTYCZNIE CZYNNYCH β -ARYLO- δ -JODO- γ -LAKTONÓW

Otrzymane z racemicznych alkoholi allilowych **3a-e** racemiczne *cis* δ -jodo- γ -laktony z podstawnikiem fenylovym (**7a**), *p*-metylofenylovym (**7b**) i *p*-izopropylofenylovym (**7c**) wykazywały działanie bakteriobójcze przeciwko *Proteus mirabilis*, laktony **7b** i **7c** były dodatkowo aktywne przeciwko *Bacillus cereus*. Spośród testowanych laktonów najwyższą cytotoksyczność wobec linii komórek nowotworowych HeLa i MCF7 oraz normalnej linii komórkowej NHDF wykazywał lakton **7c**, który również w największym stopniu zaburzał równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną w komórkach linii NHDF. W przeciwieństwie do laktonu **7c**, laktony **7a** i **7b** nie wywoływały hemolizy erytrocytów po 48 h inku-

bacji. Odmienna aktywność laktonów z grupami alkilowymi była konsekwencją ich różnego wpływu na właściwości fizykochemiczne błony komórkowej skorelowanego z budową podstawnika aromatycznego. Obecność dużej objętościowo grupy izopropylowej w pierścieniu benzenowym powodowała głębszą penetrację lipidu dwuwarstwy przez lakton **7c** i bardziej znaczące zmiany w organizacji błony takie jak wzrost upakowania w obszarze hydrofilowym oraz nieznaczny wzrost płynności łańcuchów węglowodorowych [26]. W innych badaniach lakton **7c** wykazał wysoką aktywność antyproliferacyjną względem linii Jurkat (linia białaczki T komórkowej człowieka) [23].

Interesujące zależności wykazano w badaniach aktywności antyproliferacyjnej enancjomerycznych jodolaktonów. Badania przeprowadzono na czterech wybranych liniach komórek nowotworowych: Jurkat (białaczka T komórkowa człowieka), D17 (kostniakomięsak psa), GL-1 (ostra białaczka B-komórkowa) i CLBL-1 (chłoniak B-komórkowy). W 42 spośród 48 przeprowadzonych testów badane związki wykazały znaczącą aktywność antyproliferacyjną. Największy stopień zahamowania proliferacji w stosunku do wszystkich badanych linii komórkowych odnotowano dla obu enancjomerów laktonu **8d** oraz izomeru *trans*-(4*S*,5*R*,6*S*)-**8e**. Izomery *trans* były bardziej aktywne od izomerów *cis*, zależność ta była wyraźnie widoczna dla związków z pierścieniem 2,5-dimetylofenylowym oraz 1,3-benzodioxolowym. Oba enancjomery *trans*-laktonu wywodzącego się z 2,5-dimetylobenzaldehydu (**8d**) wykazały porównywalnie wysoką aktywność, natomiast wśród pozostałych izomerów *trans* aktywniejsze były enancjomery o konfiguracji 4*S*,5*R*,6*S*. W przypadku izomerów *cis* obserwowane relacje między aktywnościami enancjomerów były zmienne w zależności od rodzaju podstawnika aromatycznego i testowanej linii komórkowej [24].

W kolejnych badaniach wybrane aktywne jodolaktony poddano kolejnym testom celem poznania mechanizmu działania tych związków. Cztery stereoizomery δ -iodo- γ -laktonu z podstawnikiem *p*-izopropylfenylowym wykazały wyższą aktywność względem komórek nowotworów układu limfatycznego w porównaniu z nowotworami sutka. Również w tym przypadku stereoizomery o konfiguracji 4*S*

posiadały większą aktywność, a najbardziej aktywny okazał się izomer *cis*-(4*S*,5*S*,6*R*)-**7c**. Badane związki indukowały apoptozę komórek poprzez szlak zależny od mitochondriów i aktywację kaspaz [27]. Z kolei oba enancjomery *trans*-5-(1-jodoetylo)-4-(2',5'-dimetylofenylo)dihydrofuran-2-onu (**8d**) powodowały apoptozę komórek nowotworowych poprzez obniżenie poziomu ekspresji białek anty-apoptotycznych: Bcl-2 i Bcl-xL. W zastosowanych w badaniu psich liniach testowane związki angażowały także receptorową ścieżkę apoptozy poprzez powodowanie fragmentacji białka Bid, co dodatkowo wzmacniało proapoptyczne działanie tych związków [28].

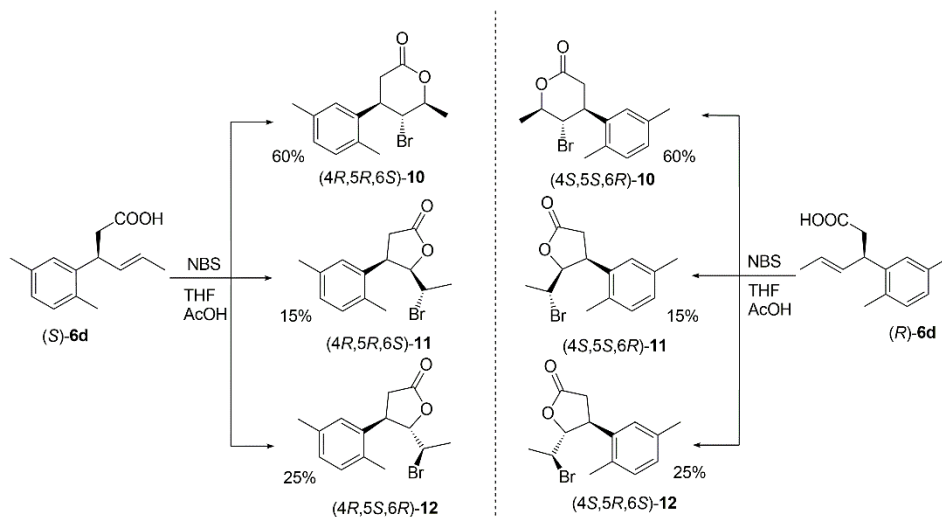
2. OPTYCZNIE CZYNNIE β -ARYLO- δ -BROMO- γ -LAKTONY I β -ARYLO- γ -BROMO- δ -LAKTONY

2.1 SYNTEZA

Z uwagi na wysoką aktywność jodolaktonów otrzymanych z 2,5-dimetylobenzaldehydu, w kolejnych badaniach przedmiotem zainteresowania stały się ich analogi z atomem bromu [29]. Reakcje bromolaktonizacji enancjomerycznych kwasów **6d** wykonano z stosując jako reagent *N*-bromoimid kwasu bursztynowego (NBS) w tetrahydrofuranie (THF) w środowisku kwaśnym. W przeciwieństwie do reakcji jodolaktonizacji, w mieszaninie poreakcyjnej dominowały (ok.60%) produkty 6-*endo* cyklizacji czyli *trans,cis*- γ -bromo- δ -laktony **10** (Rys. 7).

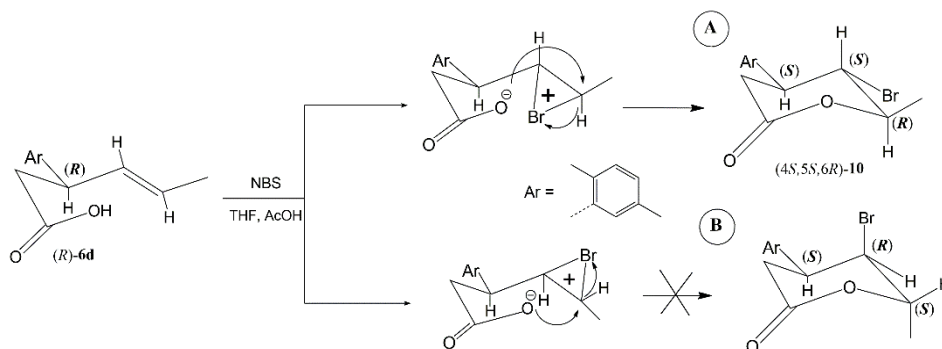
Odmierna w porównaniu z opisaną wcześniej jodolaktonizacją regioselektywność bromolaktonizacji manifestująca się przewagą δ -laktonów w mieszaninach poreakcyjnych wynika z faktu, iż jej najwolniejszym etapem, determinującym szybkość reakcji jest w tym przypadku addycja bromu do wiązania podwójnego. W drugim etapie reakcji odpychanie steryczne i elektronowe między podstawnikiem arylowym przy C-3 i jonem karboksylanowym utrudnia atak nukleofila na C-4, sprzyjając w ten sposób szybszemu tworzeniu pierścienia sześciocząłowego. Podczas otwarcia jonu bromoniowego (Rys. 8) tworzy się tylko jeden stereoizomer γ -bromo- δ -laktonu **10** (A). Brak drugiego teoretycznie możliwego stereoizomeru (B) wyjaśnia analiza jego struktury konformacyjnej. Wy-

nika z niej, że w tym stereoizomerze brom i podstawnik metylowy musiałyby zająć energetycznie niekorzystne pozycje pseudoaksjalne.



Rysunek 7. Bromolaktonizacja enancjomerycznych kwasów **6d**

Figure 7. Bromolactonization of enantiomeric acids **6d**

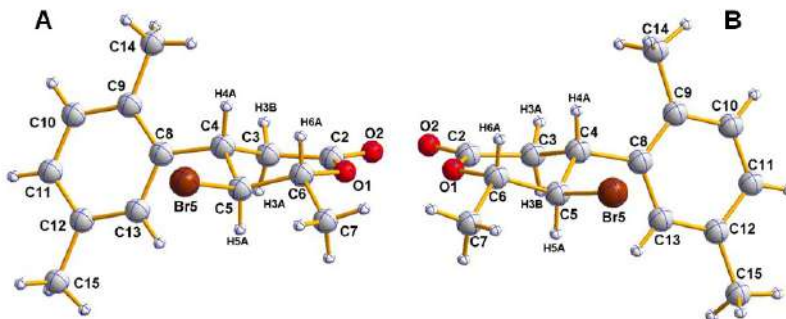


Rysunek 8. Mechanizm bromolaktonizacji wyjaśniający tworzenie tylko jednego stereoizomeru δ -laktonu na przykładzie reakcji kwasu (R)-**6d** z NBS

Figure 8. The mechanism of bromolactonization explaining the formation of only one stereoisomer of δ -lactone on the example of the reaction of (R)-**6d** acid with NBS

Przewidywane na podstawie mechanizmu bromolaktonizacji konfiguracje centrów chiralności enancjomerycznych γ -bromo- δ -laktonów **10** potwierdzono badaniami krystalograficznymi (Rys.9), natomiast dla δ -bromo- γ -laktonów **11** i **12**

zostały one przypisane na podstawie mechanizmu bromolaktonizacji, analogicznie jak w opisanym wcześniej procesie jodolaktonizacji [29].



Rysunek 9. Struktury krystaliczne *trans,cis*- γ -bromo- δ -laktonu (4*S*,5*S*,6*R*)-**10** oraz jego enancjomeru 4*R*,5*R*,6*S*

Figure 9. Crystal structures of *trans,cis*- γ -bromo- δ -lactone (4*S*,5*S*,6*R*)-**10** and its enantiomer 4*R*,5*R*,6*S*

2.2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

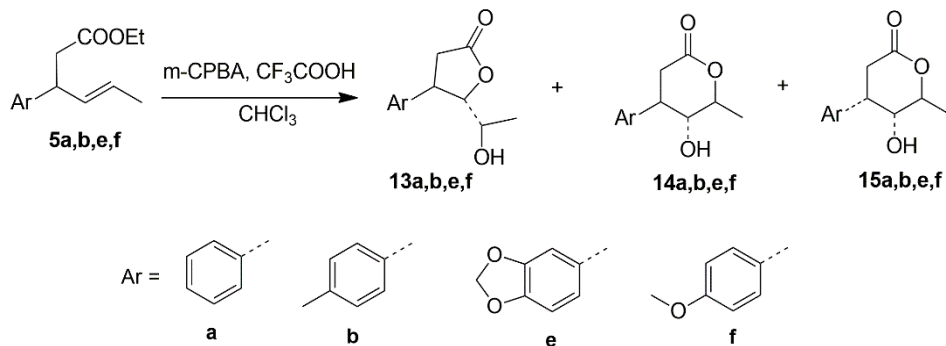
Testy *in vitro* wykazały znaczącą aktywność antyproliferacyjną uzyskanych związków względem linii D17, CLBL-1, CLB70, GL-1 oraz Jurkat, przy czym najbardziej aktywne były enancjomery *trans* δ -bromo- γ -laktonu **12**. Wyższą aktywność obserwowano każdorazowo w przypadku enancjomerów o konfiguracji *S* na atomie C-4. W badaniach interakcji uzyskanych enancjomerów z błonami biologicznymi nie stwierdzono efektu cytotoksycznego tych związków względem erytrocytów. Testy przeprowadzone metodami fluorymetrycznymi wykazały, iż związki te oddziałują z błoną erytrocytów lokując się w jej części hydrofilowej, natomiast nie wykazują praktycznie żadnego wpływu na obszar hydrofobowy [29].

3. TRANS β -ARYLO- δ -HYDROKSY- γ -LAKTONY

3.1. SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Otrzymane wcześniej z odpowiednich aldehydów aromatycznych w toku syntezy racemicznych jodo- i bromolaktonów racemiczne γ,δ -nienasycone estry z pierścieniem fenylovym (**5a**), *p*-metylofenylovym (**5b**) oraz 1,3-benzodioxolo-

wym (**5e**) oraz ester zawierający podstawnik *p*-metoksyfenylowy (**5f**) poddano laktonizacji z zastosowaniem kwasu *m*-chloronadbenzoesowego (*m*-CPBA) oraz katalitycznej ilości kwasu trifluorooctowego (Rys.10) [30].



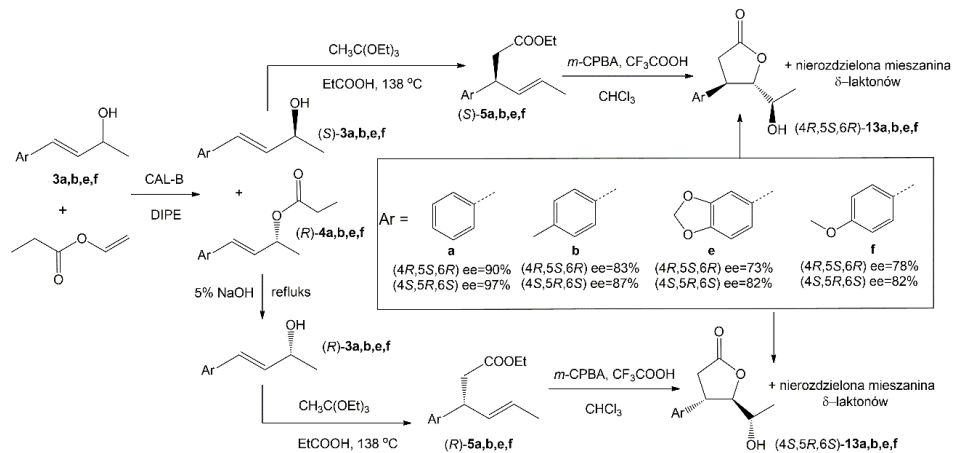
Rysunek 10. Synteza hydroksylaktonów z estrów **5a, b, e, f**
 Figure 10. Synthesis of hydroxylactones from esters **5a, b, e, f**

W trakcie reakcji następowała epoksydacja podwójnego wiązania, a powstały produkt pośredni był natychmiast przekształcany do mieszaniny hydroksylaktonów. W każdym przypadku w postaci czystej otrzymano jedynie izomery *trans* β-arylo-δ-hydroksy-γ-laktonów (**13a, b, e, f**), które poddano testom na aktywność antyfidantną i antyproliferacyjną. Dobrą aktywność deterentną wobec owadzych szkodników magazynowych (wołka zbożowego, skórka zbożowego, trojszyka ulca) wykazały hydroksylaktony z podstawnikami fenylowym i *p*-metylofenylowym (**13a** i **13b**). Z kolei ich analogi z pierścieniem dioksolowym (**13e**) lub grupą metoksyową w pierścieniu aromatycznym (**13f**) wykazywały zauważalną aktywność antyproliferacyjną wobec linii komórkowej kostniakomięsaka człowieka (U2-OS)[30].

3.2. OTRZYMYWANIE OPTYCZNIE CZYNNYCH *TRANS*-β-ARYLO-δ-HYDROKSY-γ-LAKTONÓW

Z uwagi na opisaną wyżej aktywność biologiczną, opracowano dwie metody otrzymywania enancjomerycznie wzbogaconych *trans*-β-arylo-δ-hydroksy-γ-laktonów **13a, b, e, f**. W pierwszej metodzie chemoenzymatycznej zsyntetyzowano oba enancjomery hydroksylaktonów **13a, b, e, f** z wysokimi nadmiarami enancjome-

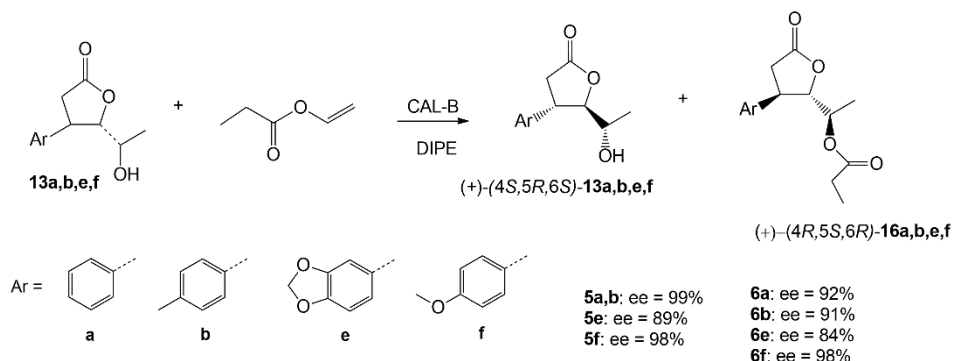
rycznymi (73-97%), wychodząc z odpowiednich enancjomerów γ,δ -nienasyconych estrów **5a,b,e,f** uzyskanych w wyniku przegrupowania Claisena z enancjomerycznych alkoholi allilowych otrzymanych przy udziale lipaz w procesie transestryfikacji (Rys.11). Konfiguracje centrów stereogenicznych zsyntetyzowanych związków wyznaczono na podstawie mechanizmu kwasowej laktonizacji estrów **5a,b,e,f** w obecności kwasu *m*-chloronadbenzoesowego [31].



Rysunek 11. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconych *trans*- β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów **13a,b,e,f**

Figure 11. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically enriched *trans*- β -aryl- δ -hydroxy- γ -lactones **13a,b,e,f**

Alternatywną metodą otrzymywania optycznie czynnych *trans*- β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów **13a,b,e,f** był katalizowany lipazą kinetyczny rozdział ich mieszanin racemicznych w procesie transestryfikacji propionianem winylu jako donorem grupy acylowej. Najbardziej efektywnym biokatalizatorem tego procesu okazała się lipaza B z *Candida antarctica*, której zastosowanie w skali preparatywnej po 6h pozwoliło na otrzymanie nieprzereagowanych (4*S*,5*R*,6*S*)-enancjomerów hydroksylaktonów **13a,b,e,f** oraz propionianów ich enancjomerów (**16a,b,e,f**) o konfiguracjach 4*R*,5*S*,6*R*. Większość z uzyskanych związków charakteryzowała się wysokimi lub bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (84-98%) (Rys.12) [31].



Rysunek 12. Kinetyczny rozdział *trans*- β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów **13a,b,e,f** w procesie enzymatycznej transestryfikacji

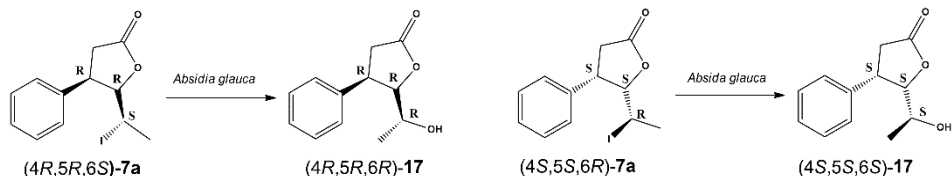
Figure 12. Kinetic resolution of *trans*- β -aryl- δ -hydroxy- γ -lactones **13a,b,e,f** by the enzymatic transesterification

Obie opracowane metody otrzymania enancjomerów *trans*- β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów **13a,b,e,f** o określonych konfiguracjach absolutnych centrów stereogenicznych, są kluczowe z punktu widzenia badań zależności: struktura przestrzenna-aktywność biologiczna.

3.3. OTRZYMYWANIE OPTYCZNIE CZYNNYCH *CIS*- β -ARYLO- δ -HYDROKSY- γ -LAKTONU W WYNIKU MIKROBIOLOGICZNEJ DEHALOGENACJI

Atrakcyjnym uzupełnieniem opisanych powyżej metod otrzymywania optycznie czynnych hydroksylaktonów z pierścieniem aromatycznym jest proces mikrobiologicznej dehalogenacji odpowiednich jodolaktonów. W ten sposób można otrzymać niedostępne opisaną wcześniej metodą laktonizacji z udziałem *m*-CPBA izomery *cis* β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów. W badaniach Mazur i wsp. [32] enancjomeryczne *cis*-5-(1-jodoetylo)-4-fenylodihydrofuran-2-ony (**7a**) zostały przekształcone w kulturze grzyba strzępkowego *Absidia glauca* do enancjomerycznie czystych *cis* δ -hydroksy- γ -laktonów **17** (ee=99%) w procesach hydrolitycznej dehalogenacji (Rys.13). Reakcja zachodzi zgodnie z mechanizmem substytucji nukleofilowej typu S_N2 , zakładającym atak cząsteczki wody na atom węgla związany z jodem z przeciwnej strony w stosunku do przyłączonego chlorowca, co prowadzi do odwrócenia konfiguracji na atomie C-6. W efekcie, z enancjomeru (4*R*,5*R*,6*S*)-jodolaktonu **7a** otrzymano (4*R*,5*R*,6*R*)-hydroksylakton

17, a z enancjomeru 4*S*,5*S*,6*R* jodolaktonu **7a** tworzył się enancjomer 4*S*,5*S*,6*S* hydroksylaktonu **17**.



Rysunek 13. Mikrobiologiczna dehalogenacja enancjomerycznych jodolaktonów **7a** prowadząca do otrzymania obu enancjomerów hydroksylaktonu **17**

Figure 13. Microbial dehalogenation of enantiomeric iodolactones **7a** leading to both enantiomers of hydroxylactone **17**

Racemiczny substrat był transformowany z najwyższą enancjoselektywnością w kulturze *Absidia cylindrospora*, a optymalizacja warunków biotransformacji stwarza nadzieję na możliwy całkowity rozdzielny kinetyczny enancjomerów jodolaktonów w reakcji hydrolytycznej dehalogenacji.

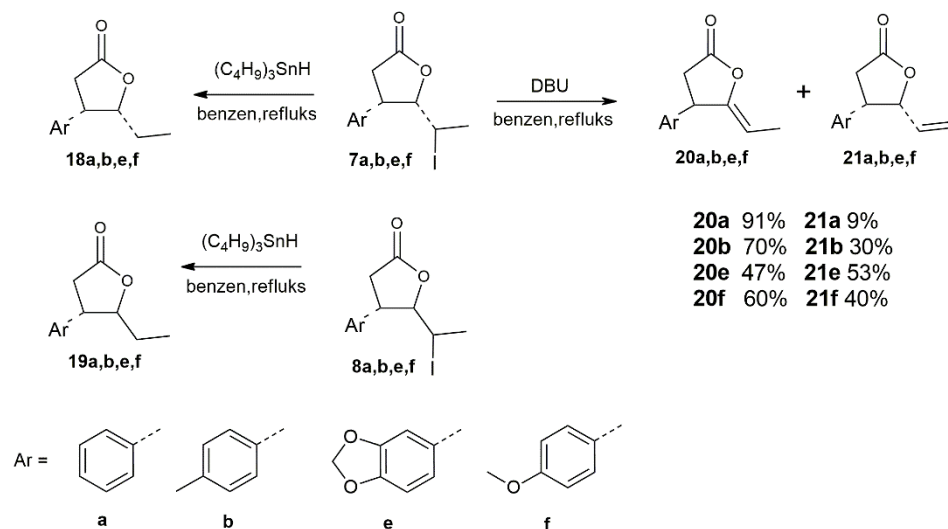
4. β -ARYLO- γ -ALKILO- γ -LAKTONY – PRODUKTY DEHALOGENACJI JODOLAKTONÓW

4.1. SYNTEZA RACEMICZNYCH β -ARYLO- γ -ALKILO- γ -LAKTONÓW I ICH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Kolejną grupą β -arylo- γ -laktonów otrzymaną w naszym zespole badawczym były produkty dehalogenacji uzyskanych wcześniej racemicznych *cis* i *trans* δ -jodo- γ -laktonów (**7a,b,e,f** i **8a,b,e,f**) (Rys.14).

Pierwszą grupę stanowiły *cis* i *trans* β -arylo- γ -etylo- γ -laktony **18a,b,e,f** i **19a,b,e,f** uzyskane jako jedyne produkty redukcyjnej dehalogenacji odpowiednich substratów przy udziale tributylowodorku cyny. Reakcja *cis* δ -jodo- γ -laktonów **7a,b,e,f** z DBU dostarczyła każdorazowo dwóch produktów: β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów **20a,b,e,f** oraz β -arylo- γ -winylo- γ -laktonów **21a,b,e,f**, których proporcje w mieszaninie reakcyjnej różniły się w zależności od budowy części aromatycznej substratu. Były one wynikiem przebiegu przestrzennego eliminacji cząsteczki HI z udziałem dużej objętościowo zasady jaką jest DBU. Ten rodzaj eliminacji przebiega zgodnie z mechanizmem E2 i generalnie preferuje powstanie bardziej

trwałego termodynamicznie produktu z egzocyklicznym wiązaniem podwójnym (laktony **20a,b,e,f**). Jednocześnie jednak reakcja wymaga konformacji antyperiplanarnej atomu jodu i odszczepianego atomu wodoru, co w przypadku atomu H-5 wymusza rotację wokół wiązania C-5-C-6 i przyjęcie konformacji powodującej elektrostatyczne odpychanie atomu jodu i podstawnika aromatycznego przy C-4. Te niekorzystne oddziaływanie zwiększa się, gdy pierścień fenylový zawiera podstawniki przekazujące elektrony do pierścienia. W związku z tym udział w mieszaninie reakcyjnej drugiego produktu, γ -winylo- γ -laktonu (**21a,b,e,f**), którego powstanie nie wymaga wspomnianych zmian konformacyjnych, zwiększał się tym bardziej, im silniej aktywujący podstawnik znajdował się w pierścieniu aromatycznym. W przypadku reakcji jodolaktanu z pierścieniem dioksolowym (**7e**) γ -winylo- γ -lakton **21e** nieznacznie przeważał nad γ -etylideno- γ -laktonem **20e** (Rys.14). Wymagania eliminacji typu E2 skutkowały również konfiguracją *E* podwójnego wiązania w γ -etylideno- γ -laktonach **20a,b,e,f** [33,34].



Rysunek 14. Synteza nasyconych i nienasyconych β -arylo- γ -alkilo- γ -laktonów z jodolaktanów w reakcjach redukcyjnej dehalogenacji oraz eliminacji

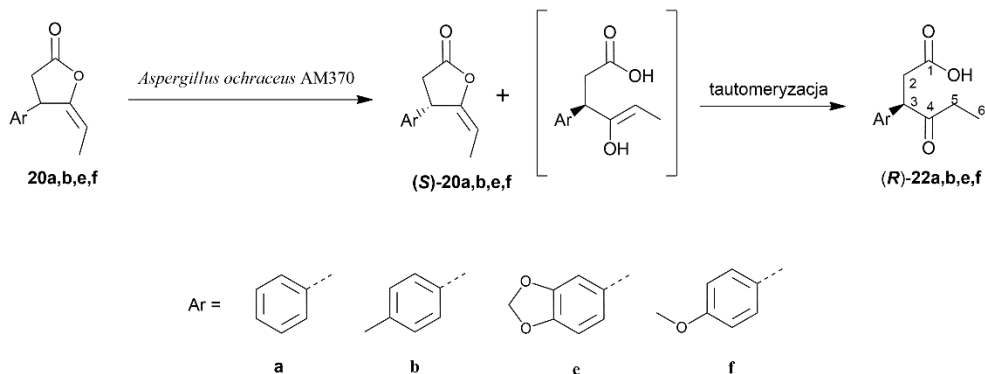
Figure 14. Synthesis of saturated and unsaturated β -aryl- γ -alkyl- γ -lactones from iodolactones by reductive dehalogenation and elimination

Nasycone β -arylo- γ -etylo- γ -laktony **18a,b,e,f** i **19a,b,e,f** uzyskane w wyniku redukcijnej dehalogenacji jodolaktonów oraz nienasycone laktony **20a,b,e,f** oraz **21a,b,e,f**, powstałe w reakcji eliminacji testowano pod kątem aktywności antyfidantnej względem szkodników magazynów zbożowych. Produkty dehalogenacji były z reguły bardziej aktywnymi antyfidantami od wyjściowych jodolaktonów. Szczególnie aktywny okazał się *cis* γ -winylo- γ -lakton z podstawnikiem *p*-metoksyfenylowym (**21f**) oraz *trans* γ -etylo- γ -lakton z niepodstawionym pierścieniem benzenowym (**19a**) [33,34].

Związki z podstawnikiem fenylowym, *p*-metylofenylowym i benzodiolowym (**18a,b,e-21a,b,e**) badano także pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem szczepów grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium*. Kluczowym elementem strukturalnym decydującym o aktywności fungistatycznej okazał się pierścień benzodiolowy, a największą aktywnością charakteryzował się *trans* γ -etylo- γ -lakton **19e** który ograniczał wzrost szczepów *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. solani* i *F. culmorum* [34]. Grupę laktonów z podstawnikiem *p*-metoksyfenylowym (**18f-21f**) poddano testom na aktywność przeciwbakteryjną. W tej grupie jedynie *cis* γ -etylo- γ -lakton **18f** znacząco hamował wzrost Gram-dodatnich bakterii *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* [33].

4.2. MIKROBIOLOGICZNA HYDROLIZA β -ARYLO- γ -ETYLIDENO- γ -LAKTONÓW

Skrobiszewski i wsp. [35] przeprowadzili również hydrolizę β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów **20a,b,e,f** stosując jako biokatalizator szczep *Aspergillus ochraceus* AM370. Szybciej hydrolizowane były (*R*)-enancjomery substratów, pozwalając na otrzymanie enancjomerycznie wzbogaconych nieprzereagowanych (*S*)-enancjomerów laktonów. Uzyskane produkty hydrolizy, (*R*)-hydroksykwasy **22** z nietrwałym ugrupowaniem enolowym tautomeryzowały do odpowiednich (*R*)-ketokwasów (Rys.15).



Rysunek 15. Mikrobiologiczna hydroliza β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów **20a,b,e,f**
 Figure 15. Microbial hydrolysis of β -aryl- γ -ethylidene- γ -lactones **20a,b,e,f**

Enancjomeryczna czystość nieprzereagowanych laktonów była ściśle związana z rodzajem podstawnika arylowego, przy czym najwyższy nadmiar enancjomeryczny ($ee=77\%$) otrzymano dla związku posiadającego niepodstawiony pierścień benzenowy (**20a**). Wszystkie laktony, zarówno racemiczne, jak i enancjomerycznie wzbogacone, a także produkty ich hydrolizy wykazywały różną aktywność deterentną wobec pleśniakowca lśniącego, co było uzależnione od budowy związku i stadium rozwojowego owada. Szczególnie silnym antyfidantem okazał się γ -etylideno- γ -lakton z *p*-metoksyopodstawionym pierścieniem fenylowym (**20f**), zarówno w postaci racemicznej, jak i enancjomerycznie wzbogaconego izomeru *S*. W przypadku laktonu **20a** stwierdzono wpływ konfiguracji centrum stereogenicznego na aktywność, względem osobników dorosłych pleśniakowca lśniącego bardziej aktywny był lakton racemiczny niż jego (*S*)-enancjomer, wobec larw tego owada zależność była odwrotna. Można zatem przypuszczać, że w tym przypadku (*S*)-enancjomer jest bardziej aktywny wobec larw, a (*R*)-enancjomer jest lepszym antyfidantem wobec postaci dorosłych [35].

UWAGI KOŃCOWE

Opracowane ścieżki syntezy laktonów zawierających podstawnik aromatyczny w pozycji β pozwalają na otrzymanie nie tylko racemicznych, lecz również optycznie czynnych laktonów o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Wykazują one akty-

wność antyfidantną, przeciwdrobnoustrojową, jednak największe nadzieje wiązać należy z ich aktywnością antyproliferacyjną w kontekście potencjalnego zastosowania jako składników preparatów przeciwnowotworowych. Z tego względu badania tych związków obejmują również ich interakcje z błonami komórkowymi. Szczęólnego znaczenie nabiera także możliwość badania zależności aktywności biologicznej tych związków od konfiguracji ich centrów stereogenicznych. Należy więc spodziewać się dalszych badań zarówno nad otrzymaniem poszczególnych enancjomerów β -arylolaktonów metodami biotechnologicznymi (biotransformacje z udziałem oczyszczonych enzymów lub całych komórek drobnoustrojów), jak i kompleksowych badań odziaływań: aktywny związek-docelowa komórka.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Chadwick, H. Trewin, F. Gawthrop, C. Wagstaff, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 12780.
- [2] S. Basu, R. E. Clark, Z. Fu, B. W. Lee, D. W. Crowder, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2021, **128**, 103514.
- [3] L. Küppers, W. Ebrahim, M. El-Neketi, F. C. Özkaya, A. Mándi, T. Kurtán, R. S. Orfali, W. E. G. Müller, R. Hartmann, W. Lin, W. Song, Z. Liu, P. Proksch, *Mar. Drugs*, 2017, **15**, 359.
- [4] J. Wang, C. Quan, X. Wang, P. Zhao, S. Fan, *Microb. Biotechnol.*, 2011, **4**, 479.
- [5] G. D. Dumitriu, N. López de Lerma, C. I. Zamfir, V. V. Cotea, R. A. Peinado, *LWT-Food Sci., Technol.* 2017, **86**, 643.
- [6] H. Zia, U. Von Ah, Y. H. Meng, R. Schmidt, J. Kerler, P. Fuchsmann, *Food Chem. X*, 2022, **13**, 100220.
- [7] A. Grudniewska, M. Kłobucki, K. Dancewicz, M. Szczepanik, B. Gabryś, C. Wawrzęńczyk, *PLoS One*, 2015, **10**, e0131028.
- [8] B. M. Fraga, C. E. Díaz, M. Bailén, A. González-Coloma, *Plants*, 2021, **10**, 891.
- [9] D. F. Dalla Lana, A. R. Carvalho, W. Lopes, M. H. Vainstein, L. S. P. Guimarães, M. L. Teixeira, L. F. S. de Oliveira, M. M. Machado, S. F. de Andrade, M. M. Sá, T. V. C. Russo, G. P. Silveira, A. M. Fuentesfria, *Folia Microbiol.*, 2019, **64**, 509.
- [10] M. Mazur, D. Masłowicz, *Antibiotics* 2022, **11**, 1327.
- [11] M. F. García Manzano, M. B. Joray, J. Laiolo, S. M. Palacios, M. C. Carpinella, *J. Nat. Prod.*, 2020, **83**, 1909.
- [12] M. Kamio, M. Schmidt, M. W. Germann, J. Kubanek, C. D. Derby, *J. Exp. Biol.*, 2014, **217**, 1286.
- [13] V. Būda, L. Blažytė-Čereškienė, S. Radžiūtė, V. Apšegaitė, P. Stamm, S. Schultz, D. Aleknavičius, R. Mozūraitis, *Insects*, 2020, **11**, 138.
- [14] S. Schulz, S. Höfling, *Nat. Prod. Rep.*, 2015, **32**, 1042.
- [15] W. Shen, H. Mao, Q. Huang, J. Dong, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **97**, 747.
- [16] W. Gładkowski, M. Siepka, T. Janeczko, E. Kostrzewa-Susłow, M. Mazur, B. Żarowska, W. Łaba, *Molecules*, 2019, **24**, 4151.
- [17] F. Jun-Tao, W. De-Long, W. Yong-Ling, Y. He, Z. Xing, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 4393.
- [18] C. Zhao, K. P. Rakesh, S. Mumtaz, B. Moku, A. M. Asiri, H. M. Marwani, H. M. Manukumar, H. L. Qin, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 9487.
- [19] B. H. Alizadeh, A. Foroumadi, S. Emami, M. Khoobi, F. Panah, S. K. Ardestani, A. Shafiee, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 5979.
- [20] G. Benedeković, I. Kovačević, M. Popsavin, J. Francuz, V. Kojić, G. Bogdanović, V. Popsavin, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**, 3318.
- [21] Y. Ren, D. D. Lantvit, Y. Deng, R. Kanagasabai, J. C. Gallucci, T. N. Ninh, H. B. Chai, D. D. Soejarto, J. R. Fuchs, J. C. Yalowich, J. Yu, S. M. Swanson, A. D. Kinghorn, *J. Nat. Prod.*, 2014, **77**, 1494.

- [22] W. Gładkowski, A. Gliszczyńska, M. Siepka, M. Czarnecka, G. Maciejewska, *Tetrahedron Asymmetry*, 2015, **26**, 702.
- [23] W. Gładkowski, A. Skrobiszewski, M. Mazur, M. Siepka, A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, A. Białońska, D. Poradowski, A. Drynda, M. Urbaniak, *Tetrahedron*, 2013, **69**, 10414.
- [24] W. Gładkowski, A. Skrobiszewski, M. Mazur, A. Gliszczyńska, M. Czarnecka, A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, G. Maciejewska, A. Białońska, *Tetrahedron Asymmetry*, 2016, **27**, 227–237.
- [25] W. Gładkowski, A. Skrobiszewski, M. Mazur, M. Siepka, A. Białońska, *European J. Org. Chem.*, 2015, 605.
- [26] A. Włoch, D. Stygar, F. Bahri, B. Bażanów, P. Kuroпка, E. Chełmecka, H. Pruchnik, W. Gładkowski, *Biomolecules*, 2020, **10**, 1594.
- [27] A. Pawlak, W. Gładkowski, M. Mazur, M. Henklewska, B. Obmińska-Mrukowicz, A. Rapak, *Chem. Biol. Interact.*, 2017, **261**, 18.
- [28] A. Pawlak, W. Gładkowski, J. Kutkowska, M. Mazur, B. Obmińska-Mrukowicz, A. Rapak, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2018, **28**, 1171.
- [29] W. Gładkowski, A. Włoch, A. Pawlak, A. Sysak, A. Białońska, M. Mazur, P. Mituła, G. Maciejewska, B. Obmińska-Mrukowicz, H. Kleszczyńska, *Molecules*, 2018, **23**, 3035.
- [30] Skrobiszewski A., Gładkowski W., Lis M., Gliszczyńska A., Maciejewska G., T. Klejdysz, Obmińska-Mrukowicz B., Nawrot J., Wawrzeńczyk C., *Przem. Chem.*, 2014, **93**, 1637.
- [31] A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, G. Maciejewska, C. Wawrzeńczyk, *Molecules*, 2016, **21**, 1552.
- [32] M. Mazur, A. Kudrynska, A. Pawlak, B. Hernandez-Suarez, B. Obmińska-Mrukowicz, W. Gładkowski, *Catalysts*, 2020, **10**, 1313.
- [33] M. Mazur, A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, M. Podkowik, J. Bania, J. Nawrot, T. Klejdysz, C. Wawrzeńczyk, *Pest Manag. Sci.*, 2016, **72**, 489.
- [34] A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, P. Walczak, A. Gliszczyńska, G. Maciejewska, T. Klejdysz, J. Nawrot, C. Wawrzeńczyk, *J. Chem. Sci.*, 2015, **127**, 687.
- [35] A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, M. Mazur, M. Szczepanik, G. Maciejewska, C. Wawrzeńczyk, *Molecules*, 2018, **23**, 1516.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 lutego 2023 r.

SYNTEZA ORAZ AKTYWNOŚĆ ANTYFIDANTNA LAKTONÓW

SYNTHESIS AND ANTIFEEDANT ACTIVITY OF LACTONES

Marcelina Mazur

*Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
e-mail: marcelina.mazur@upwr.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. α -Metylenolaktony
2. Fosfonianowe pochodne laktonów
3. Arylowe pochodne laktonów
4. Alkilowe pochodne laktonów
5. Laktony z układem *p*-mentanu
 - 5.1. Laktonowe pochodne piperytolu
 - 5.2. Laktonowe pochodne pulegonu

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Marcelina Mazur Od 2011 roku pracownik naukowo-dydaktyczny w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy. Doświadczenie naukowe zdobywała między innymi podczas staży zagranicznych na Uniwersytecie w Zagrzebiu oraz na Uniwersytecie w Poitiers. Zainteresowania naukowe Autorki znajdują się na pograniczu chemii i biotechnologii. W pracy naukowej skupia się na biokatalizie i jej zastosowaniu do otrzymywania związków biologicznie aktywnych. Swoją uwagę kieruje w szczególności na związki chlorowcoorganiczne oraz zawierające w swojej strukturze pierścień laktonowy.



<https://orcid.org/0000-0002-6192-5248>

ABSTRACT

Antifeedants, or food deterrents, are substances that, by acting on the sense of taste of insects, entirely or partially inhibit their feeding and can be used to reduce the population of harmful species. Antifeedants have the advantage of low toxicity and high selectivity towards selected groups of pests, providing an alternative to the classically used insecticides, which usually have a broad spectrum of action and greater toxicity, even towards vertebrates. Among their numerous activities, lactones can exhibit antifeedant properties. However, the use of natural lactones as antifeedants is limited due to their low isolation yields from natural sources and complex chemical synthesis. Therefore accessible synthetic compounds are of great interest. This work presents the synthesis pathways and the deterrent activities of the lactones obtained in convenient transformations, often from natural terpene precursors.

Keywords: lactones, antifeedants, food deterrents, insect pests

Słowa kluczowe: laktony, antyfidanty, deterenty pokarmowe, szkodniki owadzie

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DI	– relatywny współczynnik deterentności
NCS	– <i>N</i> -chloroimid kwasu bursztynowego
<i>m</i> -CPBA	– kwas <i>m</i> -chloroperoksybenzoesowy
T	– sumaryczny współczynnik deterentności
THF	– tetrahydrofuran

WPROWADZENIE

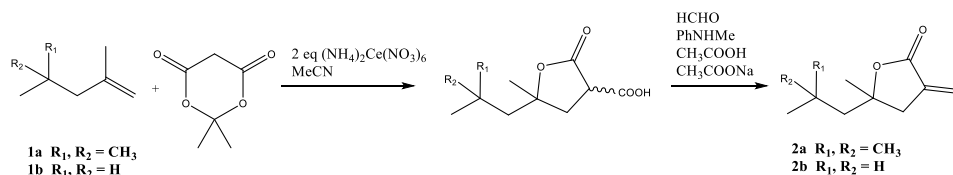
Laktony to wewnątrzcząsteczkowe estry hydroksykwasów. Z uwagi na wielkość pierścienia laktonowego oraz możliwości jego połączenia z różnorodnymi podstawnikami alkilowymi lub aryłowymi, stanowią one niezwykle zróżnicowaną grupę związków. Dzięki tej różnorodności laktony wykazują szereg interesujących właściwości biologicznych np. właściwości przeciwbakteryjne [1], przeciwnowotworowe [2], przeciwzapalne [3], przeciwwirusowe [4] lub przeciwmalaryczne [5]. Mogą być otrzymywane ze źródeł naturalnych, jak kumaryna o zapachu siana lub wyizolowany z kocimiętki nepetalakton. Z uwagi na możliwości ich wykorzystania ze względu m.in. na atrakcyjne właściwości zapachowe, otrzymywane są również na skalę przemysłową, zarówno na drodze syntezy chemicznej jak i metodami biotechnologicznymi. Przykładem jest δ -dekalakton, który charakteryzuje się olejowo-brzoskwińowym aromatem wyczuwalnym już przy stężeniu 5 mg/dm³ [6].

Spśród licznych aktywności, związki z ugrupowaniem laktonowym mogą wykazywać właściwości antyfidantne. Antyfidanty, czyli deterenty pokarmowe, to substancje, które oddziałując na narządy smaku owadów, całkowicie lub częściowo hamują ich żerowanie i mogą służyć do ograniczania populacji ich szkodliwych gatunków [7]. Zaletą antyfidantów jest ich niska toksyczność oraz selektywność względem wybranej grupy szkodników, co stanowi alternatywę względem klasycznie stosowanych insektycydów, które zwykle cechują się szerokim spektrum działania i większą toksycznością nawet w stosunku do kręgowców [8].

Jednym z najbardziej znanych naturalnych antyfidantów jest azadirachtyna [9]. Natomiast liczne laktony seskwiterpenowe, izolowane ze źródeł naturalnych, również wykazują ten rodzaj aktywności [10]. Jako przykład może posłużyć między innymi helenalina - aktywny składnik arniki górskiej od wieków stosowanej w medycynie ludowej, znana ze swojego silnego działania przeciwzapalnego. Alantolakton i izoalantolakton są również znane z uwagi na swoją aktywność przeciwnowotworową, przeciwzapalną i przeciwutleniającą. Każdy z wymienionych powyżej laktonów jest aktywnym antyfidantem względem szkodników magazynów zbożowych takich jak skórek zbożowy i trojszyk ulec [11]. Zastosowanie naturalnych laktonów jako antyfidantów jest jednak ograniczone z uwagi na ich niewielką wydajność izolowania ze źródeł naturalnych oraz skomplikowaną syntezę chemiczną. W związku z tym dużym zainteresowaniem cieszą się związki syntetyczne, które łatwo otrzymać na drodze syntezy chemicznej często stosując naturalne prekursorzy terpenowe.

1. α -METYLENOLAKTONY

Laktony zawierające w swojej strukturze ugrupowanie α -metylenowe znane są powszechnie ze swoich właściwości cytotoksycznych, przeciwbakteryjnych, przeciwpasożytniczych i przeciwnowotworowych [12]. Seskwiterpenowe laktony z ugrupowaniem α -metylenowym, to związki powszechnie izolowane z roślin, głównie z rodziny *Compositae* i stosowane w medycynie ludowej, zwłaszcza do leczenia stanów zapalnych [13]. Również właściwości antyfidantne tych połączeń budzą zainteresowanie. α -Metylenolaktony można otrzymać m.in. w dwuetapowej syntezie chemicznej z alkenów lub cykloalkenów, zgodnie ze schematem przedstawionym poniżej (Rys. 1). W pierwszym kroku następuje wprowadzenie grupy karboksylowej w reakcji z kwasem Meldruma, a uzyskane α -karboksylaktony poddaje się metylenacji połączonej z dekarboksylacją.



Rysunek 1. Synteza α -metylenolaktonów

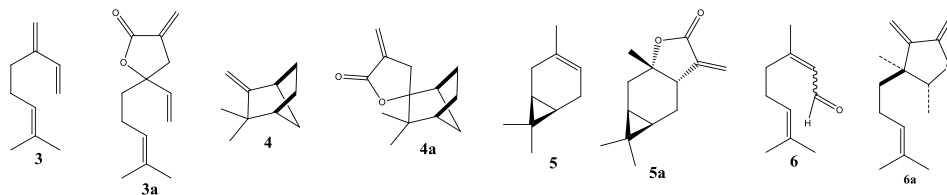
Figure 1. Synthesis of α -methylene lactones

Szereg otrzymanych na tym szlaku syntezy α -metylenolaktonów poddano testom biologicznym w celu określenia ich aktywności antyfidantnej. Związki testowane były względem takich szkodników jak stonka ziemniaczana (*Leptinotarsa decemlineata* Say) oraz pleśniakowiec lśniący (*Alphitobius diaperinus* Panzer). Miarą aktywności deterentnej w badaniach prowadzonych z udziałem tych szkodników jest sumaryczny współczynnik deterentności (T) będący sumą względnego współczynnika deterentności (wyznaczonego w testach z wyborem) oraz bezwzględnego współczynnika deterentności (wyznaczonego w teście bez wyboru). Kiedy wartość sumarycznego współczynnika deterentności mieści się w granicach 200-150 substancja wykazuje bardzo silną aktywność deterentną, w przedziale 150-100 dobrą aktywność deterentną, 100-50 średnią aktywność deterentną, 50-0 słabą, natomiast poniżej zera uważana jest za atraktant [14].

L. decemlineata jest jednym z najbardziej powszechnych szkodników owadziach ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) w Europie i Ameryce Północnej. Chemiczne zwalczanie tego owada stało się trudne ze względu na szybki rozwój odporności populacji chrząszczy na większość insektycydów. Spośród szeregu laktonów z podstawnikiem α -metylenowym najwyższą aktywność zarówno względem larw

(T=160) jak i osobników dorosłych stonki ziemniaczanej (T=136) wykazywał lakton **2a**. Natomiast jego prekursor – 2,4,4-trimetylo-pent-1-en (**1a**) wykazywał właściwości atraktanta pokarmowego. W szeregu przeprowadzonych testów biologicznych można zauważyć, że wprowadzenie funkcji laktonowej zwiększało aktywność deterentną względem tego gatunku szkodnika [15].

Podobne zależności można było zaobserwować w testach prowadzonych na pleśniakowcu lśniącym (*A. diaperinus*). Szkodnik ten zamieszkujący ściółkę w kurnikach oraz fermach drobiu, jest potencjalnym rezerwuarem wielu patogenów ptaków w tym bakterii *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, wirusów wywołujących białaczkę u drobiu, chorobę Mareka, chorobę Gumboro, chorobę Newcastle oraz ptasią grypę [16]. Testowane laktony w większości przypadków wykazywały wyższą aktywność deterentną niż ich prekursorzy. Przykładem mogą być laktony **3a** i **4a** otrzymane z myrcenu (**3**) i kamfenu (**4**), dla których sumaryczny współczynnik deterentności względem osobników dorosłych szkodnika wynosił odpowiednio T=109 i 103. Jednak spośród wszystkich testowanych związków, najwyższą aktywność deterentną charakteryzował się 2,4,4-trimetylo-pent-1-en (**1a**), dla którego sumaryczny współczynnik deterentności wynosił T= 161 [17].



Rysunek 2. α -Metylenolaktony otrzymane z myrcenu, kamfenu, karenu i citralu

Figure 2. α -Methylene lactones derived from myrcene, camphene, carene and citral

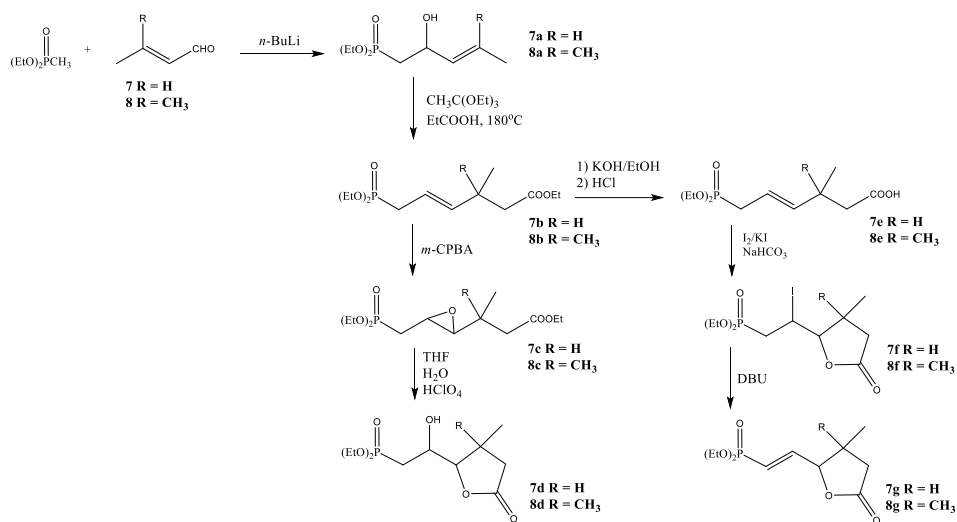
Z goła odmienne wnioski wyciągnięto z badań prowadzonych dla analogicznych par związków w testach aktywności deterentnej względem mszycy grochowej *Acyrtosiphon pisum* (Harris) oraz mszycy brzoskwiowo-ziemniaczanej *Myzus persicae* (Sulzer). Mszyca grochowa i mszyca brzoskwiowo-ziemniaczana to dwa gatunki mszyc, które mogą powodować poważne szkody w różnego typu uprawach roślin użytkowych. *M. persicae* jest uważany za najbardziej polifagiczny gatunek mszycy z żywicielami wtórnymi w ponad 40 różnych rodzinach roślin. Jest także najważniejszym wektorem owadzi ponad 100 wirusów roślinnych. *A. pisum*, choć raczej oligofagiczny (ograniczony głównie do roślin strączkowych), jest gatunkiem szkodnika, który może przenosić ponad 30 chorób wirusowych [18,19]. Dla testowanych par alkenów i cyklicznych terpenów oraz ich pochodnych laktonowych w większości przypadków nie zaobserwowano znacznych różnic w aktywności.

α -Metylenolaktony **2b** i **5a** otrzymane z 2-metylopent-1-enu (**1b**) i (\pm)-3-karenu (**5**) wykazywały aktywność antyfidantną wobec *M. persicae*, podczas gdy związki wyjściowe nie były aktywne. Natomiast (\pm)-kamfen (**4**), który był silnym deterentem względem mszycy brzoskwińowo-ziemniaczanej, stracił aktywność wraz z wprowadzeniem pierścienia laktonowego (**4a**) [19]. Laktonowe pochodne citralu (**6**) także wykazywały aktywność deterentną względem mszycy brzoskwińowo-ziemniaczanej. Citral odznaczał się najszerszym działaniem modyfikującym zachowanie mszyc i działał jako repelent oraz antyfidant przed i po spożyciu. Relatywny współczynnik deterentności (DI) oznaczony w teście z wyborem dla swobodnie przemieszczających się mszyc był najwyższy dla citralu i α -metylenolaktonu **6a** i osiągał odpowiednio 0,7 i 0,8 po 24 godzinach od uzyskania przez mszycę dostępu do liści. Wartości tak oznaczonego współczynnika wahają się od 1 (idealny deterent) do -1 (idealny atraktant) [20].

2. FOSFONIANOWE POCHODNE LAKTONÓW

Grupa fosfonianowa występuje w wielu naturalnych i syntetycznych związkach biologicznie czynnych. Niektóre fosfoniany pochodzenia naturalnego, jak fosmidomycyna, wykazują działanie przeciwbakteryjne [21]. Przykładami syntetycznych biologicznie aktywnych fosfonianów jest alafosfalina o działaniu przeciwbakteryjnym lub herbicyd *N*-fosfonometyloglicyna [22]. Natomiast niektóre pochodne fosfonianowe laktonów wykazują właściwości antyfidantne. Jako przykład mogą posłużyć laktony, które udało się otrzymać w kilkustopniowej syntezie chemicznej rozpoczynającej się od reakcji metylofosfonianu dietylolitu odpowiednio z aldehydem krotonowym (**7**) lub 3-metylo-2-buten-1-alem (**8**).

Produkty tych reakcji, którymi były pochodne alkoholi allilowych **7a** i **8a**, zostały poddane następnie przegrupowaniu Claisena w modyfikacji ortoocetawej. Otrzymane nienasycone estry **7b**, **8b** utleniono kwasem *m*-chloroperoksybenzoesowym w celu otrzymania epoksyestrów **7c** i **8c**. Te natomiast stanowiły substraty w reakcji laktonizacji prowadzonej w środowisku kwaśnym, w wyniku której otrzymano fosfonohydroksylaktony **7d** i **8d** [23]. Otrzymane na tym samym szlaku przekształceń estry stanowiły również substraty do otrzymywania jodolaktonów **7f** i **8f** oraz ich nienasyconych pochodnych **7g** i **8g**. W tym wypadku estry poddawane były zasadowej hydrolizie, a produkty hydrolizy, którymi były nienasycone kwasy karboksylowe **7e**, **8e**, jodolaktonizowano i poddawano dehydrohalogenacji z udziałem 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU) (Rys. 3) [24].



Rysunek 3. Synteza fosfonolaktonów
 Figure 3. Synthesis of phosphonolactones

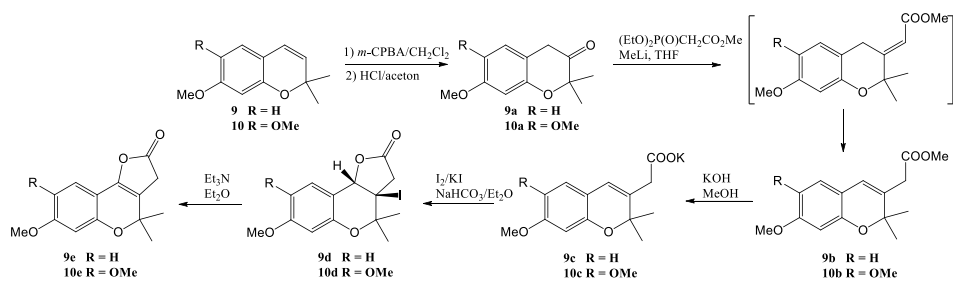
Wszystkie otrzymane pochodne fosfonianowe laktonów zostały poddane badaniom aktywności antyfidantnej względem szkodników magazynów zbożowych takich jak: chrząszcze wołka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.), larwy skórka zbożowego (*Trogoderma granarium* Ev.) oraz chrząszcze i larwy trojszyka ulca (*Tribolium confusum* Duv.). Najbardziej aktywne okazały się jodolaktony zawierające resztę kwasu fosfonowego **7f**, **8f**. Dla wszystkich testowanych szkodników sumaryczny współczynnik deterentności tych związków przekroczył wartość 100 [24], a w przypadku pochodnej **7f** dla larw skórka zbożowego wyniósł 155. Laktony nienasycone **7g**, **8g** i hydroksylaktony **7d**, **8d** wykazywały większą selektywność względem larw trojszyka ulca oraz larw skórka zbożowego [23].

3. ARYLOWE POCHODNE LAKTONÓW

Prekoceny, metoksylowe pochodne 2,2-dimetylochromenu, wyizolowane z roślin z rodzaju *Ageratinae*, znane są ze swojej aktywności do indukowania przedwczesnej metamorfozy u niedojrzałych pluskwiaków [25]. Dowiedziono, że prekoceny wykazują również działanie antyfidantne. Obecność prekocenu II w diecie *Rhodnius prolixus* ogranicza jego żerowanie, co związane jest ze zmniejszeniem ilości krwi pobieranej przez tego owada [26]. Mimo, iż prekoceny wykazują właściwości antyjuwenilne i antyfidantne, charakteryzują się również właściwościami hepatotoksycznymi i nefrotoksycznymi w stosunku do kręgowców [27]. W związku z tym chemiczne mo-

dyfikacje ich struktury prowadzone były w celu otrzymania pochodnych o potencjalnie mniejszej toksyczności.

Transformację prekocenów **9** i **10** w odpowiednie 3-chromanony **9a** i **10a** przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Jenningsa [28] (hydrolizę i przegrupowanie 3,4-diolu przeprowadzono jednoetapowo przy użyciu kwasu chlorowodorowego w acetonie). Otrzymane w ten sposób chromanony **9a** i **10a** poddano reakcji Hornera-Wadswortha-Emmons. Bezpośrednie produkty olefinowania chromanonów, estry z egzocyklicznym wiązaniem podwójnym, izomeryzowały w środowisku reakcji do bardziej trwałych β,γ -nienasyconych estrów **9b** i **10b**. Kolejnym etapem była ich zasadowa hydroliza oraz jodolaktonizacja. Nienasycone laktony **9e** i **10e** otrzymano w reakcji odpowiednich jodolaktonów **9d** i **10d** z trietyloaminą w eterze dietylowym w temperaturze pokojowej (Rys. 4).



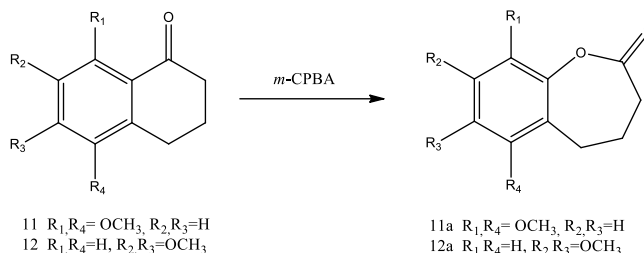
Rysunek 4. Synteza laktonowych pochodnych prekocenów

Figure 4. Synthesis of lactone derivatives of precocenes

Prekoceny, zwłaszcza prekocen II (**10**), wykazywały bardzo silne działanie antyfidantne na wszystkie testowane szkodniki magazynów zbożowych (chrząszcze i larwy *T. confusum*, chrząszcze *S. granarius*, larwy *T. granarium*). Wprowadzenie ugrupowania laktonowego spowodowało spadek aktywności antyfidantnej wobec tych gatunków. Oba prekoceny były umiarkowanie aktywne wobec stonki ziemniaczanej (*L. decemlineata*). Najlepszymi antyfidantami dla tego gatunku były jodolaktony. Wprowadzenie jodu do cząsteczki miało pozytywny wpływ na zwiększenie aktywności antyfidantnej testowanych laktonów względem stonki ziemniaczanej w porównaniu do nienasyconych analogów [29].

Porównując właściwości antyfidantne aromatycznych ϵ -laktonów, otrzymanych w reakcji utlenienia Baeyera-Villigera (Rys. 5) z metoksy- i dimetoksy pochodnych tetralonu, również w większości przypadków można zauważyć, że wykazywały one wyższą aktywność od karbonylowych prekursorów. Najbardziej aktywny spośród puli testowanych związków okazał się 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-on (**11a**) względem larw trojszyka ulca (*T. confusum*) z całkowitym współczynnikiem deterentności na poziomie T=146 oraz 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-on (**12a**), dla którego sumaryczny współczynnik deterentności wynosił T=142. Wszystkie testowane w tym badaniu zwią-

zki wykazywały dość słabą aktywność względem larw skórka zbożowego (*T. granarium*) [30]. W przypadku badań aktywności deterentnej względem mszycy brzoskwińniowo-ziemniaczanej *M. persicae*, to właśnie 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-on (**12a**) charakteryzował się najwyższą aktywnością [31].

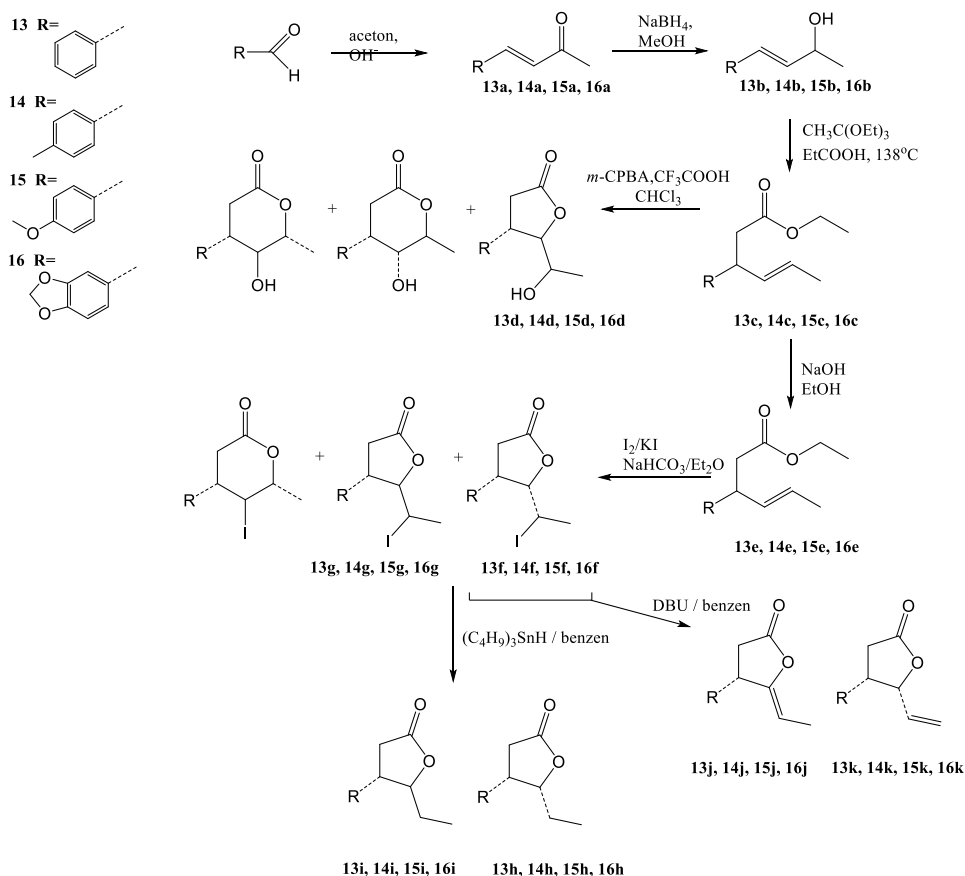


Rysunek 5. Reakcja utlenienia Baeyera-Villigera pochodnych tetralonu do ϵ -laktonów
 Figure 5. Baeyer-Villiger oxidation reactions of tetralone derivatives to ϵ -lactones

Liczne β -arylo- γ -laktony zawierające, dodatkowo w swojej strukturze, grupy hydroksylowe, atomy chlorowca oraz wiązania olefinowe stanowiły grupę związków testowych, wśród których udało się znaleźć substancje o wysokiej aktywności antyfidantnej, porównywalnej nawet z azadirachtyną. Bezpośrednimi substratami w syntezie laktonów były γ, δ -nienasycone estry **13c-16c**, zawierające podstawnik fenylowy **13c**, *p*-metylofenylowy **14c**, *p*-metoksyfenylowy **15c** oraz benzo[1,3]dioksolowy **16c**. Otrzymano je na szlaku przekształceń wychodząc z odpowiednich aldehydów aromatycznych **13-16**, które w pierwszym etapie poddano kondensacji Claisena-Schmidta z acetonem w środowisku zasadowym. Produkty tej reakcji **13a-16a** następnie selektywnie zredukowano z udziałem NaBH_4 , w wyniku czego otrzymano odpowiednie alkohole allilowe **13b-16b**. Kolejnym etapem było przegrupowanie Johnsona-Claisena z zastosowaniem ortoocetanu etylu i katalitycznej ilości kwasu propionowego. Otrzymane γ, δ -nienasycone estry poddano laktonizacji przy użyciu kwasu *m*-chloroperoksybenzoesowego oraz katalitycznej ilości kwasu trifluoroctowego. W toku reakcji następowała epoksydacja podwójnego wiązania, a powstałe epoksyestry były natychmiast przekształcane w mieszaninę hydroksylaktonów. Alternatywnie estry hydrolizowano w środowisku zasadowym, do γ, δ -nienasyconych kwasów karboksylowych **13e-16e**, które w dalszej kolejności poddawano jodolaktonizacji oraz dehydrohalogenacji z udziałem DBU lub reakcji z wodorkiem tributylowy, w wyniku której otrzymano γ -etylo pochodne **13i-16i**, **13h-16h** (Rys. 6).

Spśród testowanych hydroksylaktonów najwyższą aktywnością, względem szkodników magazynów zbożowych, charakteryzował się laktan z podstawnikiem *p*-metylofenylowym **14d**. Całkowity współczynnik deterentności wynosił w tym wypadku $T=132$ względem larw trojszyka ulca (*T. confusum*), $T=124$ względem larw skórka zbożowego (*T. granarium*) i $T=104$ względem chrząszczy wołka zbożowego

(*S. granarius*) [32]. Lakton z podstawnikiem fenylowym **13i** wykazywał wysoką aktywność (T=162) względem larw trojszyka ulca, natomiast lakton z podstawnikiem *p*-metylofenylowym **14i** wykazywał wysoką aktywność (T=167) względem larw skórka zbożowego [33]. Spośród laktonów z podstawnikiem *p*-metoksyfenylowym największą aktywność antyfidantną wobec wszystkich testowanych szkodników, porównywalną z azadirachtyną, zaobserwowano dla laktonu z podstawnikiem winylowym **15k**, który okazał się bardzo silnym deterentem żerowania osobników dorosłych i larw trojszyka ulca (*T. confusum*, T = 171 i 184) oraz skórka zbożowego (*T. granarium*, T = 172). W testach prowadzonych z udziałem wołka zbożowego (*S. granarius*), zaobserwowano silną aktywność tego związku (T=143) [34].

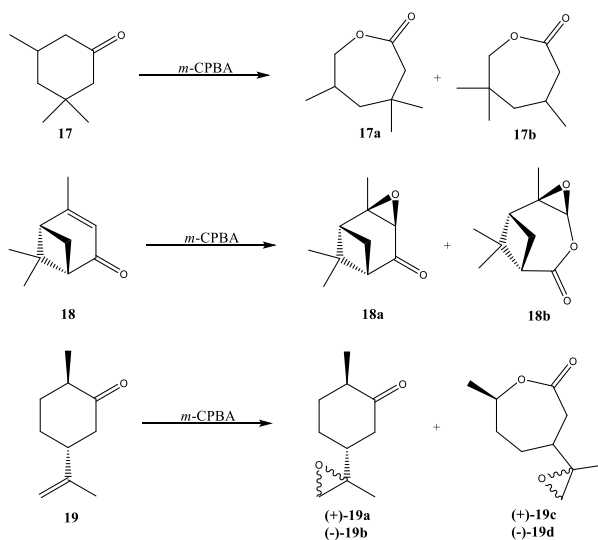


Rysunek 6. Synteza laktonów z podstawnikiem aromatycznym
Figure 6. Synthesis of lactones with aromatic substituent

4. ALKILOWE POCHODNE LAKTONÓW

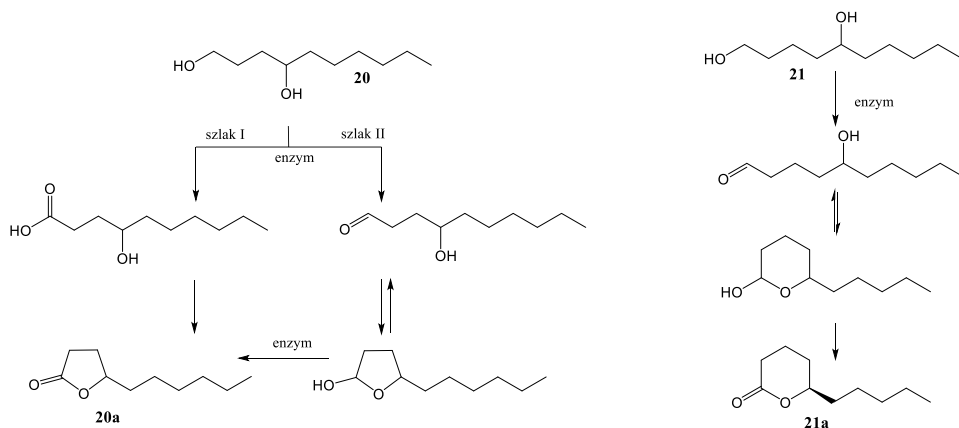
Alkilopodstawione ϵ -laktony można otrzymać jako produkty reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera odpowiednich metylopodstawionych cykloheksanonów (Rys. 7).

Dodatkowo obecność w cząsteczce substratu wiązania C=C powoduje, że produkty syntezy, obok pierścienia laktonowego, mogą również zawierać funkcję epoksydową. Co ciekawe, występowanie pierścienia oksiranowego zwiększało aktywność deterentną niektórych pochodnych ϵ -laktonów względem szkodników magazynów zbożowych. Spośród licznych testowanych metylopodstawionych ϵ -laktonów najwyższą aktywnością (T=109) charakteryzował się 4,4,6-trimetylooksepan-2-on (**17a**), względem chrząszczy trojszyka ulca. Jednak zdecydowanie wyższe aktywności deterentne uzyskano testując epoksydowe pochodne werbenonu **18b** (chrząszcze wołka zbożowego T=164) i dihydrokarwonu **19c** i **19d** (trojszyk ulec larwy **19c** T=117, a **19d** T=145) [35]. W przypadku badania aktywności antyfidantnej podobnej grupy związków względem mszycy brzoskwińowo-ziemniaczanej najwyższą aktywnością charakteryzowały się epoksydylaktony otrzymane z dihydrokarwonu [36].

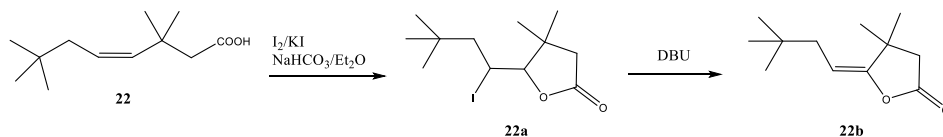


Rysunek 7. Reakcje utlenienia Baeyera-Villigera cyklicznych ketonów do ϵ -laktonów
Figure 7. Baeyer-Villiger oxidation reactions of cyclic ketones to ϵ -lactones

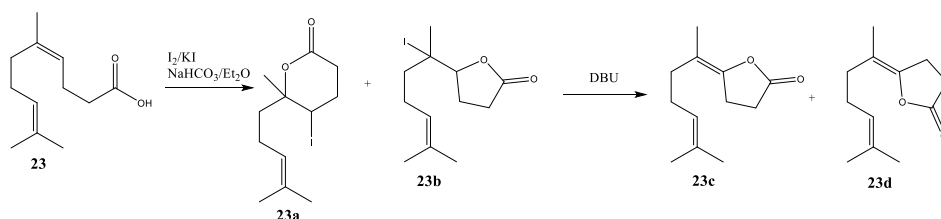
Wzbogacone enancjomerycznie γ - i δ -dekalaktony **20a** i **21a** otrzymano z odpowiednich racemicznych dioli **20** i **21**, jako produkty enzymatycznego utleniania katalizowanego przez różne dehydrogenazy alkoholowe w tym dehydrogenazę alkoholową (HLADH) wyizolowaną z wątroby końskiej, jak i rekombinowaną w *E. coli* (Rys. 8). Działanie deterentne dekalaktonów **20a** i **21a** przeciwko mszycy brzoskwińowo-ziemniaczanej *M. persicae* zależało od wielkości pierścienia laktonowego i czystości enancjomerycznej związków. Dekalakton **21a** zawierający sześcioczłonowy pierścień okazał się nieaktywny wobec *M. persicae*, podczas gdy lewoskrętny izomer dekalaktonu **20a** z pięcioczłonowym pierścieniem wykazywał właściwości deterentne [37].

Rysunek 8. Enzymatyczna synteza γ - i δ -dekalaktonuFigure 8. Enzymatic synthesis of γ - and δ -decalactone

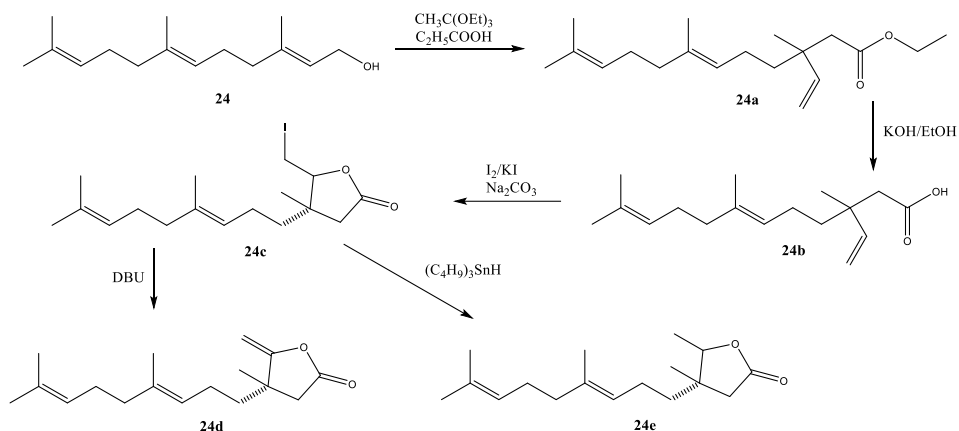
Alkilpodstawione laktony zawierające egzocykliczne wiązanie C=C otrzymano również w sekwencji reakcji wychodząc z odpowiednich γ,δ -nienasyconych kwasów, które poddano jodolaktonizacji i dehydrohalogenacji z udziałem DBU (Rys. 9 i 10). Ich aktywność wyznaczono m.in. dla stonki ziemniaczanej (*L. decemlineata*) oraz mszycy brzoskwińiowo-ziemniaczanej (*M. persicae*). Najdłużej efekty deterentne względem mszyc wywoływał nienasycony lakton **22b**. W tym wypadku zmniejszenie liczby owadów zasiedlających liście obserwowano od rozpoczęcia do końca trwania eksperymentu, to jest do 24 godzin po zastosowaniu laktonu **22b** [38].

Rysunek 9. Synteza γ -laktonu **22b**Figure 9. Synthesis of γ -lactone **22b**

Laktony **23c** i **23d** były skuteczniejszymi deterrentami względem chrząszczy niż larw stonki ziemniaczanej. Szczególnie dobre właściwości antyfidantne wobec chrząszczy stwierdzono w przypadku laktonu **23c** o konfiguracji *E* wiązania podwójnego. W teście z wyborem całkowicie hamował on żerowanie, a w teście bez wyboru chrząszcze zjadały o 60% mniej pokarmu, w porównaniu z kontrolą. Był on również dobrym deterrentem względem larw tego szkodnika, ale działanie to było widoczne tylko w teście z wyborem. W sytuacji braku wyboru potraktowany badanym związkiem pokarm był akceptowany przez larwy, a poziom żerowania tylko nieznacznie różnił się od kontroli [39].

Rysunek 10. Synteza γ -laktonów **23c** i **22d**Figure 10. Synthesis of γ -lactones **23c** and **22d**

Wychodząc od farnezolu (**24**), seskwiterpenowego alkoholu allilowego, w podobnej sekwencji reakcji otrzymano szereg związków, których aktywność antyfidantną określono względem szkodników magazynów zbożowych, stonki ziemniaczanej oraz mszyce brzoskwińowo-ziemniaczanej. Szlak przekształceń obejmował w tym wypadku przegrupowanie Johnsona-Claisena, zasadową hydrolizę otrzymanych estrów, jodolaktonizację nienasyconych kwasów karboksylowych, a następnie przekształcenie laktonowych pochodnych z udziałem DBU i wodoru tributylocyny (Rys. 11). Spośród uzyskanych związków z ugrupowaniem laktonowym, najwyższą aktywność wykazywał lakton **24e** względem larw i chrząszczy trojszyka ulca, sumaryczny współczynnik deterentności osiągnął wartości odpowiednio $T=152$ i 144 . Dobrymi deterentami względem tego szkodnika okazały się także lakton **24d** ($T=142$ i 114) oraz jodolakton **24c** ($T=138$ i 112). Jednak podkreślić należy, że związek wyjściowy – farnezol, miał zdecydowanie szerszy wachlarz aktywności i wykazywał właściwości antyfidantne względem: larw trojszyka ulca ($T=185$), chrząszczy wołka zbożowego ($T=149$), larw skórka zbożowego ($T=128$) oraz chrząszczy pleśniakowca lśniącego ($T=121$) [40]. Podobnie w badaniach deterentności względem stonki ziemniaczanej najbardziej aktywny okazał się farnezol. Natomiast dobre właściwości deterentne względem larw tego szkodnika wykazywał także γ -metylenolakton **24d** [41]. Farnezol okazał się też najbardziej aktywnym deterentem względem mszyce brzoskwińowo-ziemniaczanej. Stosowanie tego terpenoidu powodowało unikanie potraktowanych nim roślin przez mszyce. Laktonowe pochodne farnezolu **24d** i **24e** były aktywnymi deterentami (wartości relatywnego współczynnika deterentności wynosiły odpowiednio $DI: 0,4$ i $0,3$), jednak ich niekorzystny wpływ na zasiedlanie roślin przez mszyce był widoczny dopiero po 24h trwania eksperymentu. Testowany jodolakton **24c** nie wykazywał aktywności deterentnej w przeprowadzonych eksperymentach [42].



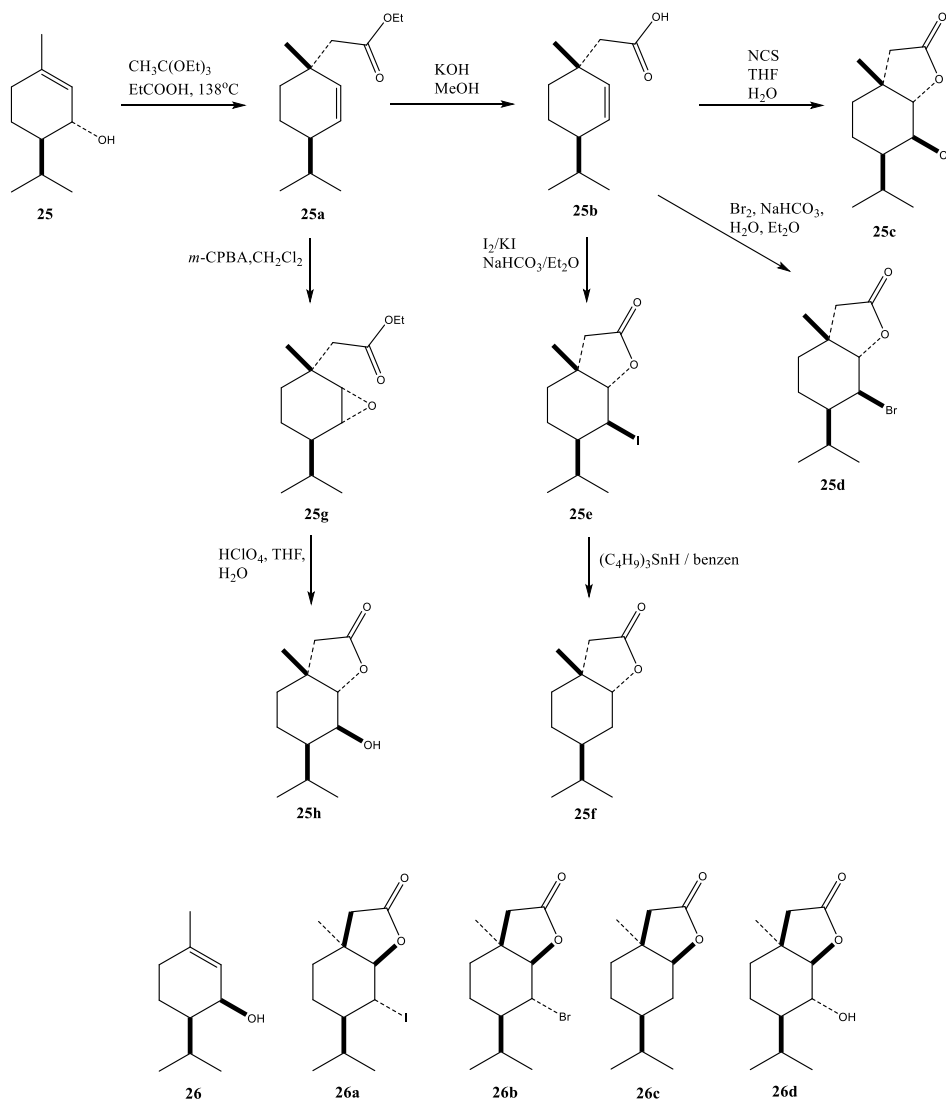
Rysunek 11. Synteza laktonowych pochodnych farnesolu

Figure 11. Synthesis of lactone derivatives of farnesol

5. LAKTONY Z UKŁADEM *p*-MENTANU

5.1. LAKTONOWE POCHODNE PIPERYTOLU

Liczne związki z ugrupowaniem laktonowym otrzymano w wyniku syntezy chemicznej, która rozpoczynała się od terpenowych prekursorów z układem *p*-mentanu. Jako przykład mogą tu posłużyć laktony, które otrzymano w trzy i czteroetapowej syntezie z racemicznych *trans*- (**25**) oraz *cis*-piperytolu (**26**), jak i enancjomerów poszczególnych alkoholi (Rys. 12) [43]. Synteza obejmowała przegrupowanie Johnsona-Claisena oraz zasadową hydrolizę estrów. Nienasycone kwasy były substratem w trzech różnych reakcjach halolaktonizacji. Pierwsza prowadzona była w środowisku zasadowym z zastosowaniem roztworu jodu w jodku potasu, a jej produktami były odpowiednie jodolaktony **25e** i **26a**. W wyniku laktonizacji γ,δ -nienasyconych kwasów karboksylowych z użyciem bromu jako czynnika elektrofilowego otrzymano odpowiednie bromolaktony **25d** i **26b**. Aby otrzymać chlorolaktony, przeprowadzono reakcję γ,δ -nienasyconych estrów z *N*-chloroimidem kwasu bursztynowego (NCS). W reakcji estrów otrzymanych z *cis*-piperytonu z NCS powstała mieszanina produktów, których niestety nie udało się rozdzielić i w konsekwencji określić ich struktury. W reakcji *trans*- γ,δ -nienasyconego estru z NCS, otrzymano odpowiadający mu chlorolakton **25c**. W reakcji jodolaktonów z wodorkiem tributylowy otrzymywano nasycone laktony **25f** i **26c** [44]. Utlenianie γ,δ -nienasyconych estrów kwasem *m*-chloroperoksybenzoesowym pozwoliło na otrzymanie epoksyestrów i następnie, w reakcji laktonizacji prowadzonej w środowisku kwaśnym, odpowiednich hydroksylaktonów **25h** i **26d** [45].



Rysunek 12. Synteza laktonowych pochodnych z *trans*-piperytolu oraz ich odpowiedniki otrzymane z *cis*-piperytolu

Figure 12. Synthesis of lactone derivatives of *trans*-piperitol and their analogues derived from *cis*-piperitol

Wszystkie laktonowe pochodne wykazywały aktywność deterentną względem mszycy brzoskwińniowo-ziemniaczanej. Jodo-, bromo- i chlorolaktony wpływały negatywnie na żerowanie wstępne oraz właściwe i osiadanie *M. persicae*. Aktywność deterentna poszczególnych związków różniła się w zależności od rodzaju atomu chloro-

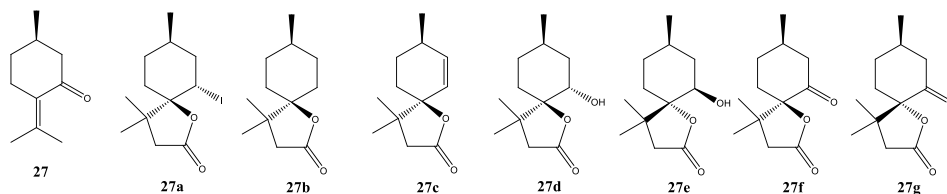
wca obecnego w cząsteczce oraz od struktury przestrzennej laktonu.

W odniesieniu do epidemiologicznego znaczenia mszyc jako wektorów wirusów, bromolaktony, zwłaszcza (+)-**25d** i (+)-**26b**, byłyby najbardziej obiecującymi substancjami deterentnymi, które potencjalnie mogą zapobiegać przenoszeniu wirusów roślinnych [43]. Laktony (+)-**25f** i (±)-**25f** wykazały szeroki zakres i długość działania deterentnego wobec *M. persicae*: związki te działały natychmiast po zastosowaniu i powodowały zaprzestanie żerowania wstępnego testowanych owadów [44]. Wszystkie hydroksylaktony wpływały negatywnie na osiadanie *M. persicae*. Lakton (–)-**26d** był spośród nich najsilniejszym deterentem żerowania wstępnego oraz właściwego dla tych szkodników [45].

Laktonowe pochodne piperytoli testowano również względem pleśniakowca lśniącego *A. diaperinus*. Praktycznie wszystkie laktonowe pochodne były znacznie silniejszymi antyfidantami dla osobników dorosłych niż dla larw, co jest zjawiskiem dość powszechnym. Spowodowane jest to tym, że osobniki dorosłe posiadają większą liczbę chemoreceptorów w części głębowej i wybierają określone rośliny, na których żerują i składają jaja. Najbardziej aktywnymi związkami były hydroksylaktony (–)-**25h** i (±)-**25h**. Sumaryczny współczynnik deterentności wynosił w tym wypadku odpowiednio $T=172$ i 180 , co stanowi wartość porównywalną do azadirachtyny. W obecności tych laktonów, pokarm spożywany przez osobniki dorosłe tego owada w teście bez wyboru, stanowił jedynie około 3% pokarmu spożywanego w kontroli. Z pochodnych laktonowych zawierających atom chlorowca na uwagę zasługuje wysoka aktywność joodolaktonu (±)-**25a** zarówno względem larw ($T=164$) jak i osobników dorosłych ($T=159$) pleśniakowca lśniącego [46]. Testowane laktony wykazywały jednak słabe właściwości deterentne względem stonki ziemniaczanej *L. decemlineata* [45].

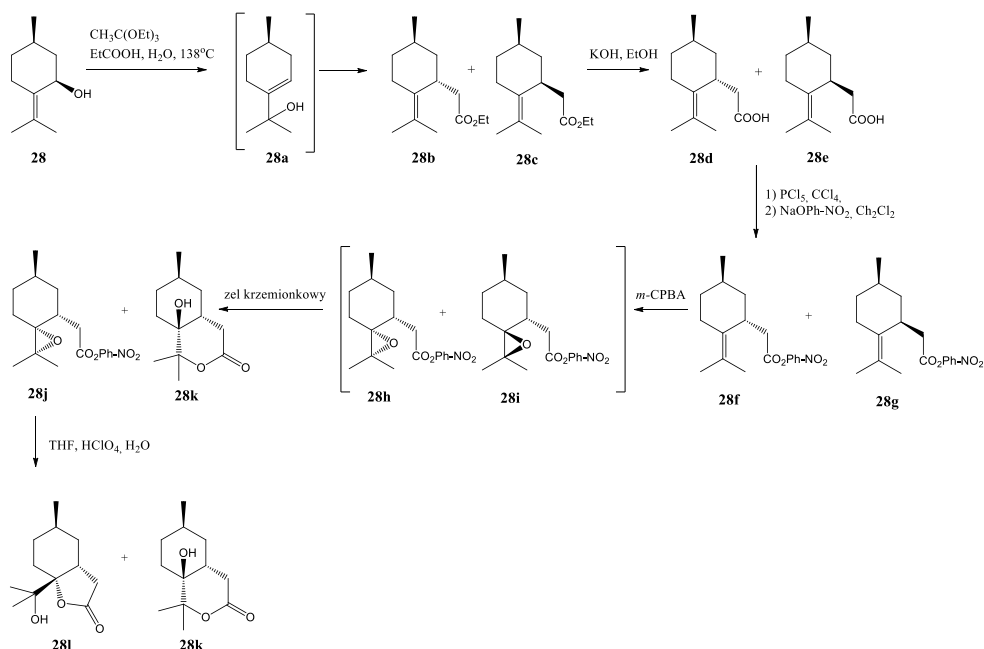
5.2. LAKTONOWE POCHODNE PULEGONU

Szereg laktonowych pochodnych otrzymano również stosując jako substrat w syntezie pulegon (**27**). Laktonowe pochodne otrzymano na dwóch szlakach przekształceń jednym klasycznym, rozpoczynającym się redukcją grupy karbonylowej ketonu z udziałem NaBH_4 i dalej prowadzonym w sposób analogiczny do przedstawionego wyżej dla piperytolu. Produktami tych reakcji były odpowiednie jodo- (**27a**), hydroksy- (**27d**, **27e**) nienasycone (**27c**) i nasycone laktony (**27b**). Hydroksylaktony otrzymane na tym szlaku utleniało również, stosując dichromian pirydyny w dichlorometanie, do odpowiednich ketonowych pochodnych **27f**, **27g** (Rys.13) [47,48].



Rysunek 13. Laktony otrzymane z pulegonu
Figure 13. Lactones derived from pulegone

Drugi szlak przekształceń rozpoczynał się od reakcji przegrupowania allilowego połączonego z przegrupowaniem Claisena enancjomerów *cis*-pulegolu (**28**). W obecności katalitycznych ilości wody otrzymano mieszaniny γ,δ -nienasyconych estrów etylowych **28b** i **28c**. Taki przebieg reakcji był spowodowany przegrupowaniem *cis*-pulegolu do bardziej stabilnych alkoholi trzeciorzędowych, które ulegały przegrupowaniu Claisena. Mieszaninę estrów następnie zhydrolizowano oraz przeprowadzono w *p*-nitrofenylowe pochodne **28f** i **28g**, które rozdzielono metodami chromatograficznymi. Następnie prowadzono reakcję epoksydacji z *m*-CPBA, a otrzymane epoksyestry **28h**, **28i** rozdzielono i poddano reakcji laktonizacji w środowisku kwaśnym, jako produkty otrzymując γ - i δ -hydroksylaktyny **28k** i **28l** (Rys. 14) [49].



Rysunek 14. Przykładowy schemat syntezy laktonowych pochodnych *cis*-pulepolu
Figure 14. Example for the synthesis of *cis*-pulepol lactone derivatives

Otrzymane w powyższych szlakach syntezy związki poddane zostały testom aktywności antyfidantnej względem szkodników magazynów zbożowych (*S. granarius*, *T. granarium*, *T. confusum*). Większość syntetycznych połączeń wykazywała średnią aktywność deterrentną w porównaniu z wzorcami, którymi były azadirachtyna czy bakkenolid. Spośród badanych związków najbardziej aktywne były spirolaktony z grupami hydroksylowymi (+)-27d i (-)-27d lub ketonowymi (+)-27g i (-)-27g, które wykazywały silną oraz bardzo silną aktywność deterrentną względem osobników dorosłych oraz larw trójczyka ulca. Dla hydroksylaktonu (+)-27g sumaryczny współczynnik deterrentności wynosił $T=172$ względem larw oraz $T=162$ względem osobników dorosłych tego szkodnika. Ketolaktony wykazywały również silną aktywność deterrentną względem larw skórka zbożowego. Sumaryczny współczynnik deterrentności wynosił odpowiednio $T=143$ dla (+)-27g oraz $T=135$ dla (-)-27g. Aktywność biologiczna względem testowanych szkodników w sposób istotny zależała zatem od konfiguracji centrów chiralności związków. Porównanie aktywności antyfidantnej par enancjomerów wykazało, że w większości przypadków laktony syntetyzowane z (*R*)-(+)-pulegonu były bardziej aktywnymi antyfidantami niż te otrzymane z (*S*)-(-)-pulegonu [50].

δ -Hydroksy- γ -spirolaktony (+)-27d i (-)-27d wykazywały również znaczną aktywność wobec osobników dorosłych pleśniakowca lśniącego (*A. diaperinus*), ale zastąpienie grupy hydroksylowej grupą ketonową znacznie zmniejszyło działanie deterrentne δ -keto- γ -spirolaktonów (+)-27f i (-)-27f. Bicykliczne γ -hydroksy- δ -laktony ze skondensowanymi pierścieniami (+)-28k i (-)-28k oraz δ -hydroksy- γ -lakton (+)-28l były bardzo silnymi antyfidantami zarówno dla larw jak i osobników dorosłych pleśniakowca lśniącego [51].

UWAGI KOŃCOWE

Szkodniki owadzie są głównym źródłem strat w uprawach, powodują zarówno obniżenie plonów, jak i spadek ich jakości. Dodatkowo mogą również powodować poważne straty w trakcie przechowywania produktów spożywczych. Do ograniczania ich populacji powszechnie stosowane są chemiczne środki ochrony roślin – pestycydy. Jednak nadmierne stosowanie pestycydów tj. większe niż jest to konieczne do osiągnięcia wzrostu wydajności, może mieć szkodliwy wpływ na środowisko przez zmniejszenie różnorodności biologicznej, jak i toksyczny wpływ na organizmy żywe. Pestycydy, w czasie ich aplikacji, mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia rolników. Zastosowanie pestycydów prowadzi również do zanieczyszczenia gleb i zasobów wodnych oraz stwarza niebezpieczeństwo związane z utylizacją ich pustych opakowań. Ważnym aspektem jest również pojawianie się odporności u szkodników owadzych [52]. Liczne zagrożenia, które związane są z zastosowaniem pestycydów, a jednocześnie konieczność ochrony plonów sprawiają, że proponowanych i rozwija-

nych jest coraz więcej rozwiązań alternatywnych. Zastosowanie związków laktonowych o aktywności deterentów pokarmowych, które często otrzymywane są z naturalnych prekursorów i wykazują selektywną i bardzo wysoką aktywność, może być jedną z możliwych perspektyw na drodze do rozwiązania tych problemów.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Mazur, D. Masłowiec, *Antibiotics*, 2022, **11**, 1327.
- [2] C. Bailly, *Nat. Products Bioprospect.*, 2020, **10**, 367.
- [3] A. Paço *et al.*, *Molecules*, 2022, **27**, 1142.
- [4] B. Ivanescu, A. Miron, A. Corciova, *J. Anal. Methods Chem.*, 2015, **2015**, 247685.
- [5] K. Libiszewska, *Biotechnol. Food Sci.*, 2011, **75**, 45.
- [6] J. Krzyczkowska, E. Białecka-Florjańczyk, I. Stolarzewicz, *Zywność. Nauk. Technol. Jakość*, 2009, **16**, 5.
- [7] J. Nawrot, J. Harmatha, *Phytochem. Rev.*, 2012, **11**, 543.
- [8] E. Paruch, J. Nawrot, C. Wawrzeczyk, *Pest Manag. Sci.*, 2001, **57**, 776.
- [9] J. Kowalska, *J. Res. Appl. Agric. Eng.*, 2007, **52**, 78.
- [10] J.R. Ahern, K.D. Whitney, *Chemoecology*, 2013, **24**, 35.
- [11] T. Olejniczak *et al.*, *Biotechnologia*, 2000, **3**, 106.
- [12] L. Moujir *et al.*, *Appl. Sci.*, 2020, **10**, 3001.
- [13] J. M. A. Martínez *et al.*, *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 2012, **37**, 43.
- [14] M. Mazur *et al.*, *Pest Manag. Sci.*, 2014, **70**, 286.
- [15] C.W. M. Szczepanik, A. Szumny, *Polish J. Environ. Stud.*, 2009, **18**, 1107.
- [16] T. Mituniewicz, S. Dzik, 2020, **76**, 145.
- [17] M. Szczepanik *et al.*, *Pestycydy*, 2005, **4**, 25.
- [18] M. Verbeek *et al.*, *Ann. Appl. Biol.*, 2010, **156**, 39.
- [19] K. Dancewicz *et al.*, *Pol. J. Natur. Sc.*, 2006, **20**, 23.
- [20] K. Dancewicz *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 8029.
- [21] M.E. Falagas *et al.*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2016, **29**, 321.
- [22] P. Kafarski, *RSC Adv.*, 2020, **10**, 25898.
- [23] B. Gawdzik *et al.*, *Chem. Agric.*, 2004, **5**, 119.
- [24] B. Gawdzik *et al.*, *Chem. Agric.*, 2005, **6**, 162.
- [25] W.S. Bowers *et al.*, *Science (80-)*, 1957, **193**, 542.
- [26] P. De Azambuja, E.S. Garcia, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1991, **86**, 113.
- [27] M.T. Stephen Hsia, S. Grossman, K.R. Schrankel, *Chem. Biol. Interact.*, 1981, **37**, 265.
- [28] R.C. Jennings, Anthony P. Ottridge, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1984, 1733.
- [29] M. Szczepanik *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 5905.
- [30] D. Masłowiec *et al.*, *Przem. Chem.*, 2012, **91**, 883.
- [31] K. Dancewicz *et al.*, *Postępy w Ochr. Roślin*, 2009, **49**, 1175.
- [32] A. Skrobiszewski *et al.*, *Przem. Chem.*, 2014, **93**, 1637.
- [33] A. Skrobiszewski *et al.*, *J. Chem. Sci.*, 2015, **127**, 687.
- [34] M. Mazur *et al.*, *Pest Manag. Sci.*, 2016, **72**, 489.
- [35] R. B. *et al.*, *Przem. Chem.*, 2009, **88**, 557.
- [36] K. Dancewicz *et al.*, *J. Plant Prot. Res.*, 2011, **51**, 23.
- [37] F. Boratyński *et al.*, *PLoS One*, 2016, **11**, 1.
- [38] K. Dancewicz *et al.*, *Postępy w Ochr. Roślin*, 2006, **46**, 305.
- [39] B. Gabrys *et al.*, *Polish J. Environ. Stud.*, 2006, **15**, 549.
- [40] A. Gliszczyńska *et al.*, *Przem. Chem.*, 2011, **90**, 759.
- [41] M. Szczepanik, A. Gliszczyńska, C. Wawrzeczyk, *Postępy w Ochr. Roślin*, 2011, **51**, 1.
- [42] K. Dancewicz *et al.*, *Pestycydy*, 2010, **1–4**, 51.
- [43] A. Grudniewska *et al.*, *RSC Adv.*, 2011, **1**, 498.
- [44] A. Grudniewska *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 3364.
- [45] A. Grudniewska *et al.*, *PLoS One*, 2015, **10**, e0131028.
- [46] M. Szczepanik *et al.*, *Pest Manag Sci*, 2013, **70**, 953.

- [47] I. Dams *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 1630.
- [48] I. Dams *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2004, 2662.
- [49] I. Dams *et al.*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **15**, 2087.
- [50] J. Nawrot, I. Dams, C. Wawrzeńczyk, *J. Stored Prod. Res.*, 2009, **45**, 221.
- [51] M. Szczepanik, I. Dams, C. Wawrzeńczyk, *Entomol. Exp. Appl.*, 2008, **128**, 337.
- [52] N. Ghimire, R.T. Woodward, *Ecol. Econ.*, 2013, **89**, 73.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 marca 2023 r.

SYNERGISTYCZNE DZIAŁANIE FLUKONAZOLU I LAKTONÓW FTALIDOWYCH JAKO CZYNNIK OGRANICZAJĄCY STOSOWANIE LEKÓW AZOLOWYCH W LECZENIU KANDIDOZ

SYNERGISTIC EFFECT OF FLUCONAZOLE AND PHTALIDE LACTONES AS A FACTOR LIMITING THE USE OF AZOLE DRUGS AGAINST CANDIDIASIS

Teresa Olejniczak

*Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
ul. C. K. Norwida 25,
50-375 Wrocław
e-mail: teresa.olejniczak@upwr.edu.pl*

Abstract

1. Wprowadzenie

- 1.1. *Candida albicans* jako czynnik potencjalnie zakaźny
- 1.2. Farmakologiczne zastosowanie flukonazolu i związane z nim ryzyko
- 1.3. Laktony ftalidowe, izolowane z roślin z rodziny *Apiaceae* Lindl
- 1.4. Mechanizm działania 3-n-butyloftalidu na komórki *Candida albicans*
2. Synergistyczne działanie flukonazolu i laktonów ftalidowych wobec *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390
3. Studia *in silico* w analizie wpływu struktury chemicznej na aktywność biologiczną

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. Teresa Olejniczak ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Wrocławskim. Od 1991 roku jest zatrudniona na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Pracę doktorską pt. „Chemiczna i mikrobiologiczna synteza laktonów” obroniła 1998 przed Radą Wydziału Uniwersytetu Wrocławskiego, uzyskując stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii organicznej. Promotorem pracy był profesor dr hab. Czesław Wawrzeńczyk. Odbyła roczny staż na Uniwersytecie w Gandawie (Belgia) w zespole prof. J. Van Beeumena, zapoznając się z wieloma technikami biologii molekularnej. W 2011 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego, a w 2019 roku nadano jej tytuł profesora nauk biologicznych. Jej badania naukowe mają charakter interdyscyplinarny i obejmują syntezę chemiczną, enzymatyczne i mikrobiologiczne transformacje związków chemicznych oraz ocenę ich aktywności biologicznej.



<https://orcid.org/0000-0001-6156-5820>

ABSTRACT

The resistance of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts to azole antifungal drugs has increased rapidly in recent years and is a significant problem in clinical therapy. The current state of pharmacological knowledge precludes the withdrawal of azole drugs, as no other active substances have yet been developed that could effectively replace them. Therefore, one of the anti-yeast strategies may be therapies that can rely on the synergistic action of natural compounds and azoles, limiting the use of azole drugs against candidiasis. Synergy assays performed *in vitro* were used to assess drug interactions Fractional Inhibitory Concentration Index. The synergistic effect of fluconazole (1) and three synthetic lactones identical to those naturally occurring in celery plants—3-n-butylphthalide (2), 3-n-butylidene-phthalide (3), 3-n-butyl-4,5,6,7-tetrahydrophthalide (4)—against *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, and *C. guilliermondii* KKP 3390 was compared with the performance of the individual compounds separately. MIC₉₀ (the amount of fungistatic substance (in µg/mL) inhibiting yeast growth by 90%) was determined as 5.96–6.25 µg/mL for fluconazole (1) and 92–150 µg/mL for lactones 2–4. With the simultaneous administration of fluconazole (1) and one of the lactones 2–4, it was found that they act synergistically, and to achieve the same effect it is sufficient to use 0.58–6.73 µg/mL fluconazole (1) and 1.26–20.18 µg/mL of lactones 2–4. Based on biological research, the influence of the structure on the fungistatic activity and the synergistic effect were determined.

Keywords: synergistic effect, *Candida albicans*, phthalide lactones, fluconazole

Słowa kluczowe: efekt synergistyczny, *Candida albicans*; laktony ftalidowe; flukonazol

1. WPROWADZENIE

1.1. *Candida albicans* jako czynnik potencjalnie zakaźny

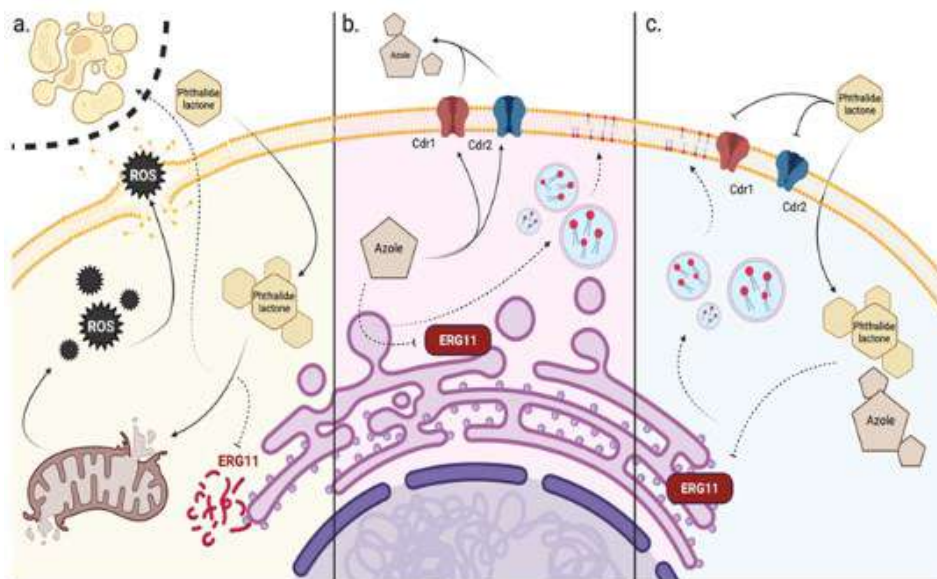
Kandydoza jest infekcją wywołaną zarówno przez *Candida albicans*, jak i gatunki *Candida non-albicans* (NAC). Infekcje te są najczęściej endogennie, ponieważ głównym źródłem zakażenia jest przewód pokarmowy [1, 2]. Inwazyjne procedury medyczne stwarzają możliwość przenoszenia zakażenia z człowieka na człowieka w środowisku szpitalnym. *C. albicans* i *C. glabrata* są obecnie najczęstszymi patogenami grzybiczymi u ludzi. W Stanach Zjednoczonych w latach 2013-2017 [3] drożdżaki *Candida* były odpowiedzialne za jedną czwartą zgonów spowodowanych przypadkami fungemi w szpitalach. Drożdże z rodzaju *Candida* odpowiadają za kandydozę rozsianą, kandydozę wewnątrzczyniową, a nawet infekcje ośrodkowego układu nerwowego. W krajach wysoko rozwiniętych, takich jak USA, Norwegia czy Wielka Brytania, coraz częściej obserwuje się wzrost śmiertelności z powodu ogólnego zakażenia oportunistycznymi szczepami *Candida* [4, 5]. Przewiduje się, że 75% kobiet na całym świecie zachoruje na kandydozę przynajmniej raz w życiu. Problem ten z roku na rok staje się coraz poważniejszy i stanowi niepokojące zagrożenie dla zdrowia publicznego, dlatego tak ważne jest podjęcie działań w kierunku jego ograniczenia [6].

1.2. Farmakologiczne zastosowanie flukonazolu i związane z nim ryzyko

Wiadomo, że flukonazol jest jednym z najczęściej stosowanych leków w terapii kandydozy [7]. Jest związkiem należącym do grupy azoli. Lek ten hamuje wzrost większości drożdżaków *Candida*, *Cryptococcus* i innych dermatofitów odpowiedzialnych za ogólnoustrojowe i powierzchniowe zakażenia grzybicze u ludzi. W farmakologii jest stosowany jako lek pierwszego wyboru od 1990 roku.

Flukonazol, ze względu na obecność w swojej strukturze dwóch triazoli oraz pierścienia difluorofenylowego, zaburza syntezę steroli [8]. Przy dłuższej terapii stosowanie flukonazolu może prowadzić do hepatotoksyczności, co stanowi istotny problem dla osób z obniżoną odpornością i immunosupresją. Najbardziej narażone grupy stanowią pacjenci z AIDS, w trakcie chemioterapii oraz osoby z chorobami układu oddechowego, w tym z ostrym COVID-19 [9-11]

1.3. Mechanizm działania flukonazolu na komórki drożdżaków z rodzaju *Candida*
Mechanizm działania flukonazolu opiera się na hamowaniu aktywności produktu genu *ERG11*, zaangażowanego w biosyntezę ergosterolu. Enzym 14 α -lanosterolu odpowiada za konwersję lanosterolu do 4,4-dimetylocholesta-8(9), 14,14-trien-3 β -olu, ważnego etapu biosyntezy steroli. Hamowanie syntezy ergosterolu zwiększa przepuszczalność błony komórkowej, ponieważ jest on kluczowym jej składnikiem. Zaburzenie biosyntezy ergosterolu powoduje także gromadzenie się toksycznych 14-metylosteroli w komórkach grzybów. W związku z tym zaburzona jest również synteza wybranych komponentów ściany komórkowej oraz adhezja komórek. Działanie to ma charakter grzybostatyczny [12–16] (Rys. 1b).



Phthalide lactone -lakton ftalidowy; azole- związki azolowe, ROS- reaktywne formy tlenu (RFT)

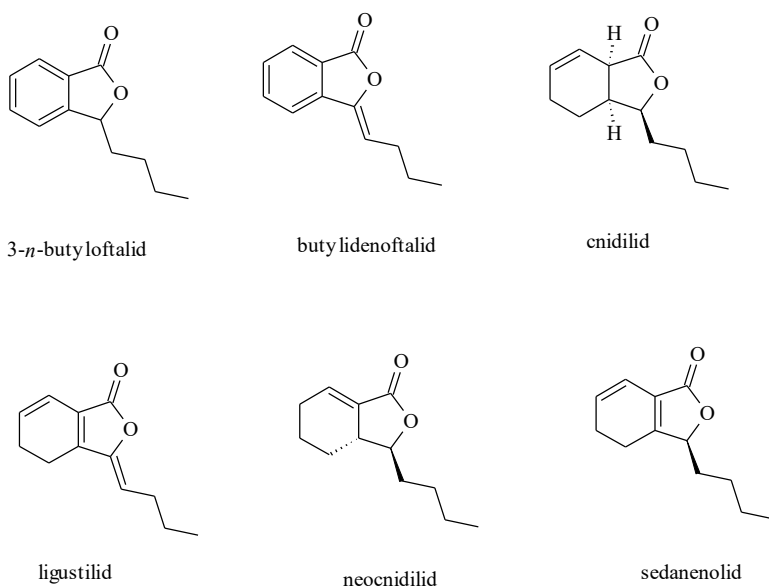
Rysunek 1. (a) Mechanizm działania 3-butyloftalidu na metabolizm komórek drożdży (b) Mechanizm działania związków azolowych na komórki drożdży (c). Mechanizm synergistycznego działania związków azolowych i laktonów ftalidowych. (utworzony w BioRender).

Figure 1. (a) Mechanism of action of 3-butylphthalide on yeast cell metabolism (b) Mechanism of effect of azole compounds on yeast cell (c). Mechanism of synergistic action of azole compounds and phthalide lactones. (created in BioRender).

Fenotypy oporności u szczepów z rodzaju *Candida* najczęściej generują związki azolowe stosowane w medycynie i ochronie roślin [17]. Istnieje kilka mechanizmów oporności szczepów *Candida* na leki azolowe. Pierwszy z nich jest związany z nadekspresją genów kodujących białka z rodziny ABC transporterów w komórce grzyba, dzięki którym lek może zostać usunięty z komórki i jego działanie jest ograniczone. Wpływ na ekspresję genów *CDR1/CDR2* i *MDR1* niewątpliwie mają mutacje punktowe w genach, pod których kontrolą znajdują się te transportery [18, 19] (Rys. 1b). Innym mechanizmem prowadzącym do lekooporności są mutacje w genie *ERG11*, którego produkt jest celem działania leków azolowych. Mutacje zmieniają miejsce wiązania azolu i obniżają skuteczność leku [20]. Badania *in vitro* wykazały, że w szczepach *C. albicans* oprócz zwiększonego poziomu ekspresji genu występują mutacje punktowe w genie *ERG11*. Są to mutacje typu substytucji w pozycjach 143 (zamiana lizyny na argininę), 266 (zamiana kwasu glutaminowego na kwas asparaginowy), 404 (zamiana waliny na leucynę) oraz 488 (zamiana waliny na izoleucynę). W izolowanych szczepach *C. albicans*, odkryto zmianę konformacyjną 14 α -demetylasy lanosterolu, która zmniejsza skuteczne wiązanie cząsteczek flukonazolu, osłabiając jego działanie [20]. Komórki grzybów mogą również być zdolne do rozwijania alternatywnych szlaków syntezy ergosterolu, na które nie wpływają leki azolowe. W związku z tym skuteczność leku jest obniżona, a grzyby zachowują funkcjonalność błon komórkowych. Ze względu na coraz częstsze nabywanie lekooporności przez szczepy grzybów, w wielu ośrodkach naukowych prowadzi się badania nad nowymi lekami azolowymi, o zmienionej strukturze chemicznej i właściwościach fizykochemicznych, na które grzyby nie są odporne [3, 21, 22].

1.3. Laktony ftalidowe, izolowane z roślin z rodziny Apiaceae Lindl

Laktony ftalidowe, uważa się za główne składniki odpowiedzialne za bioaktywność roślin z rodziny Apiaceae. Obecnie, opisano około 180 naturalnie występujących ftalidów wyizolowanych z około 137 roślin [23-26]. Popularnie stosowane w Tradycyjnej Medycynie Chińskiej rośliny z tej rodziny zawierają ich mieszaniny w różnych ilościach. *Angelica sinensis* zawierająca 27 ftalidów, stosowana jest głównie w zaburzeniach ginekologicznych takich jak nieregularne czy bolesne miesiączki, a także w przypadku ich braku. Ekstrakty z *Ligusticum chuanxiong* zawierające 36 różnych ftalidów są natomiast stosowane podczas migren oraz bólów głowy. Obie te rośliny stosuje się również w przypadku astmy [27-28]. Zarówno wyizolowane i oczyszczone ftalidy, jak i ekstrakty z roślin z rodziny *Apiaceae* wykazują szeroką aktywność biologiczną, w tym również silne działanie grzybobójcze [29]. Na Rysunku 2 przedstawiono przykładowe struktury laktonów występujących w roślinach z rodziny *Apiaceae*.



Rysunek 2. Struktury laktonów występujących w roślinach z rodziny Apiaceae

Figure 2. Structures of lactones found in plants of the Apiaceae family

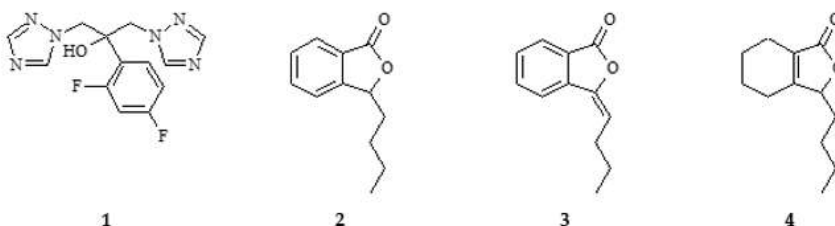
Najbardziej znanym i najczęściej opisywanym ftalidem jest 3-n-butyloftalid, naturalny związek zatwierdzony przez Chińską Narodową Administrację Produktów Medycznych, wykorzystywany do leczenia udaru niedokrwiennego mózgu [30–34]. Wieloletnie badania wykazały, że 3-butyloftalid działa neuroprotekcynie w stanach niedokrwiennych i zmniejsza obrzęk mózgu, poprawiając mikrokrążenie w obszarze niedokrwienia. Wykazano również, że hamuje on stres oksydacyjny i apoptozę komórek nerwowych [35–38].

1.4. Mechanizm działania 3-n-butyloftalidu na komórki *Candida albicans*

Obecność 3-n-butyloftalidu w cytozolu (Ryc. 1a) generuje w komórce większą ilość reaktywnych form tlenu (RFT) tworzonych w mitochondrium. Ilość RFT wyznacza się poprzez pomiar potencjału błony mitochondrialnej ($\Delta\psi_m$). Nagromadzenie RFT przyczynia się do zniszczenia błony mitochondrium i uwolnienia dużych ilości reaktywnych form tlenu do cytozolu. RFT zaburza homeostazę komórkową, oddziałuje negatywnie na kwasy nukleinowe, hamują aktywność enzymów oraz powoduje peroksydację lipidów. Wszystkie te procesy prowadzą do zniszczenia błony komórkowej i inicjują proces apoptozy. Ponadto, 3-n-butyloftalid wpływa na ograniczenie ekspresji genów *CDR1* i *CDR2*, powstaje mniej pomp transportujących, co przyczynia się do kumulacji 3-n-butyloftalidu wewnątrz komórki ($\log P = 2,8$) [33, 39, 40].

2. SYNERGISTYCZNE DZIAŁANIE FLUKONAZOLU I LAKTONÓW FTALIDOWYCH WOBEC *CANDIDA ALBICANS* ATCC 10231, *C. ALBICANS* ATCC 2091, *C. GUILLERMONDII* KKP 3390

Do testów użyto flukonazolu (1) i trzech syntetycznych racemicznych laktonów o strukturach identycznych z naturalnie występującymi w roślinach selerowatych:– 3-n-butyloftalidu (2), 3-n-butyldenofthalidu (3), 3-n-butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalidu (4) (Rys. 3). Laktony 2-4 syntezowano według metody opisanej przez A. Leon i inni [22].



Rysunek 3. Struktury chemiczne: flukonazol (1), 3-n-butyloftalid (2), 3-n-butyldenofthalid (3), 3-n-butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalid (4)

Figure 3. Chemical structures of: fluconazole (1), 3-n-butylphthalide (2), 3-n-butylidenephthalide (3), 3-n-butyl-4,5,6,7-tetrahydrophthalide (4)

Istnieją trzy rodzaje interakcji między związkami biologicznie czynnymi: synergia, działanie neutralne i antagonizm. Można określić je wyznaczając frakcjonalne stężenie hamujące (FIC). Współczynnik ten pozwala określić charakter interakcję między związkami obecnymi w mieszaninie.

$$FIC = \frac{MIC_A \text{ w mieszaninie}_{AB}}{MIC_A} + \frac{MIC_B \text{ w mieszaninie}_{AB}}{MIC_B}$$

Obliczany jest on w oparciu o minimalne stężenia hamujące MIC wyznaczone dla składników oddzielnie i w mieszaninach. W oparciu o stopień zahamowania można dla każdego związku wyznaczyć MIC_{50} (MIC_{90}) czyli stężenie związku hamujące wzrost i proliferację komórek mikroorganizmu w 50% (90%).

$$\text{Stopień zahamowania wzrostu (\%)} = \frac{OD_{\text{kontroli}} - OD_{\text{badanego związku}}}{OD_{\text{kontroli}}} \times 100\%$$

OD_{kontroli} – gęstość optyczna wyznaczona dla hodowli mikroorganizmu bez dodatku związku

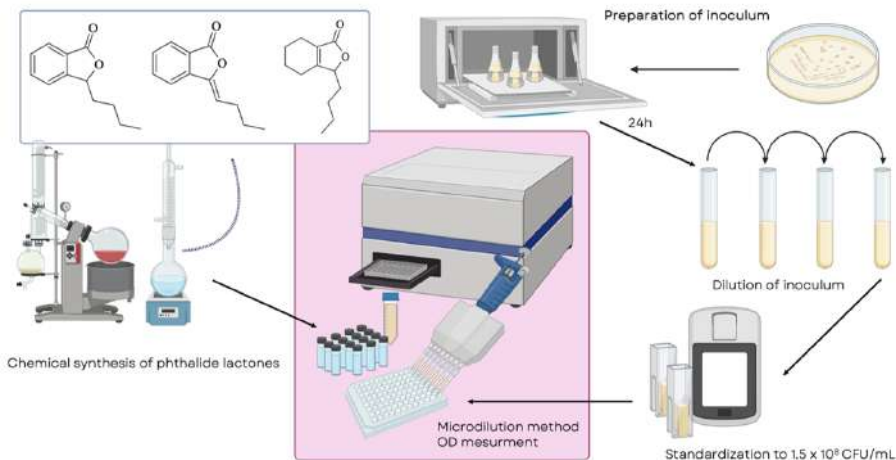
$OD_{\text{badanego związku}}$ – gęstość optyczna wyznaczona dla hodowli z dodatkiem badanego związku

Synergizm ($\Sigma FIC \leq 0,5$) to stan, w którym dwa istniejące związki poprzez wspólne występowanie w mieszaninie wzajemnie wzmacniają swoje działanie, a tym samym ich łączny efekt jest większy niż suma efektów ich osobnego działania.

Najczęściej obserwuje się jednak działanie neutralne, czyli takie, w którym obecność obu związków nie wpływa na komórki w układzie ($0,5 < \Sigma FIC \leq 4, 0$). Z kolei, gdy $\Sigma FIC > 4,0$, występuje antagonizm, czyli stan, w którym dwa istniejące związki przez wspólne występowanie w mieszaninie wzajemnie osłabiają swoje działanie. Ich łączny efekt jest zatem mniejszy niż suma efektów ich oddzielnych działań [41].

Aby określić interakcje między flukonazolem a laktonami **2-4**, przeprowadzono testy na dwóch szczepach referencyjnych *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091 oraz szczepie *C. guilliermondii* KKP 3390. Równocześnie wyznaczano wartości MIC₅₀, MIC₉₀ (minimalne stężenia hamujące wzrost i proliferację komórek w 50% i 90%) dla związków **1-4** oddzielnie (Tabela 1) i mieszaninach flukonazolu z poszczególnymi laktonami **2-4** (Tabela 2).

W tym celu wykorzystano opisany wcześniej w literaturze protokół szachownicy [42].



Rysunek 4. Ilustracja eksperymentu oznaczania aktywności biologicznej laktonów ftalidowych. (utworzony w BioRender)

Figure 4. Illustration of an experiment to determine the biological activity of phthalide lactones (created in BioRender)

Przed przeprowadzeniem testów flukonazol (**1**) i laktony **2-4** rozpuszczono w DMSO w stężeniu 10 mg/mL dodano do 96-dółkowej płytki titracyjnej i rozcieńczono metodą podwójnych rozcieńczeń w celu uzyskania kombinacji obu związków w różnych stężeniach. Następnie dodano standaryzowane inokulum jednego z trzech testowanych mikroorganizmów: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390. Przygotowane w ten sposób płytki umieszczono w inkuba-

torze do osiągnięcia gęstości optycznej ($OD = 1$). Uzyskane wartości OD pozwoliły na wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego poszczególnych kombinacji flukonazolu i laktonu oraz frakcjonalnego stężenia hamującego (FIC) określającego ilościowo interakcję między związkami obecnymi w mieszaninie) (Rys. 4, Tabela 1, 2).

Tabela 1. Eksperymentalne określenie działanie fungistatycznego flukonazolu (1) i laktonów 2-4 wobec *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390. Wartości MIC podano w $\mu\text{g/mL}$

Table 1. Experimentally determined fungistatic activity of fluconazole (1) and 2-4 lactones against *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390. MIC values are in $\mu\text{g/mL}$

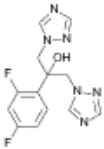
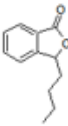
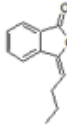
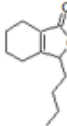
		Związki			
					
		1	2	3	4
Testowane szczepy					
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	MIC ₅₀	1,56	45,55	48,90	62,72
	MIC ₉₀	6,25	137,72	150,12	150,0
<i>C. albicans</i> ATCC 2091	MIC ₅₀	2,19	30,79	17,61	20,10
	MIC ₉₀	5,57	92,34	110,0	120,10
<i>C. guilliermondii</i> KKP 3390	MIC ₅₀	-	55,0	36,96	46,15
	MIC ₉₀	$\geq 18,00$	80,0	58,95	80,34

Tabela 2. Wyznaczenie MIC w kombinacji i wartości FIC dla laktonów 2,3,4 i flukonazolu w systemie hodowlanym *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390. Wartości MIC podano w $\mu\text{g/mL}$

Table 2. Determination of the MIC in the combination and the FIC values for the lactones 2,3,4 and fluconazole in *Candida albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. guilliermondii* KKP 3390 culture system. MIC values are in $\mu\text{g/mL}$

Związek	ATCC 10231				ATCC 2091				KKP 3390			
	MIC _{mieszaniny}		FIC		MIC _{mieszaniny}		FIC		MIC _{mieszaniny}		FIC	
	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%
1	0,78	1,56			0,78	1,56			1,56	0,78		
2	0,78	3,13	1,41	0,27	25	25	1,17	0,50	3,13	1,26	0,31	0,28
1	0,62	1,59			0,55	1,41			1,27	0,58		
3	1,20	4,47	0,42	0,28	3,72	22,25	0,42	0,47	4,32	20,18	0,32	0,35
1	0,42	1,43			0,70	1,48			1,22	6,73		
4	1,32	15,27	0,41	0,34	4,45	20,27	0,55	0,49	11,58	24,86	0,43	0,65

Ocena działania przeciwwgrzybiczego *in vitro* wykazała, że laktony ftalidowe mają niższą aktywność grzybobójczą niż flukonazol (Tabela 1), a badane szczepy nie wykształciły mechanizmów oporności na azole. W przypadku laktonów ftalidowych zaobserwowano 50% zahamowanie wzrostu mikroorganizmów przy stężeniach w zakresie 30,79–62,72 µg/mL. Jednak 3-n-butyliidenoftalid (3), posiadający podwójne wiązanie przy C-3, wykazuje wysoką aktywność wobec szczepu *C. albicans* ATCC 2091; zahamowanie wzrostu tego organizmu w 50% uzyskano przy stężeniu 17,61 µg/ml. Stężenie potrzebne do uzyskania 50% redukcji wzrostu szczepu *C. guilliermondii* KKP 3390 wynosiło z kolei około 37 µg/ml. Zahamowanie wzrostu grzybni o 90% wymagało 3-4-krotnego wzrostu stężenia flukonazolu i laktonów 2-4 w testach wobec *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091 i mniej niż dwukrotności dawki związków 1-5, potrzebnej do redukcji wzrostu grzybni o 50%, w przypadku *C. guilliermondii* KKP 3390. We wszystkich testach zaobserwowano również wysoką swoistość poszczególnych laktonów wobec szczepów *Candida*.

Wyniki przedstawione w Tabeli 2 obrazują MIC₅₀, MIC₉₀ flukonazolu (1) i laktonów 2-4 w mieszaninach. Na podstawie danych z tabeli 1 i tabeli 2 wyznaczono frakcjonalne stężenia hamujące FIC₅₀, FIC₉₀. Mieszaniny, w których wartości FIC są równe 0,5 lub mniejsza, oznaczają, że flukonazol i lakton dodane razem działają silniej niż dodawane oddzielnie, a sumaryczna ilość związków potrzebna na osiągnięcie tego samego efektu jest wielokrotnie mniejsza.

Pośród 18 wartości ułamkowych stężeń hamujących FIC, 13 ma wartości poniżej 0,5, a tylko dwukrotnie wyznaczono wartości FIC powyżej 1 (Tabela 2).

W przypadku 3-butyloftalidu (2) stężenie potrzebne do osiągnięcia 90% redukcji wzrostu *C. albicans* ATCC 109231 było około 45-krotnie mniejsze, a w przypadku flukonazolu około 2-krotnie mniejsze niż stężenie tych związków działające oddzielnie, a nie w mieszaninie. Podobne zjawisko można zaobserwować w przypadku 3-n-butyliidenoftalidu (3) w mieszaninie z flukonazolem, którego stężenie potrzebne do zahamowania wzrostu grzybni o 90% zmalało z 150 µg/mL do 4,47 µg/mL. Także stężenie niearomatycznego laktonu 4 w mieszaninie z flukonazolem potrzebne do znacznego zahamowania wzrostu szczepów *Candida* była kilkadziesiąt razy mniejsza niż w przypadku zastosowania laktonów bez dodatku flukonazolu. Należy również zaznaczyć, że aktywność flukonazolu we wszystkich przypadkach wzrastała wraz z obecnością laktonów ftalidowych, zatem do uzyskania pożądanego efektu potrzebne było stężenie kilkakrotnie niższe niż przy stosowaniu samego flukonazolu.

Mechanizm synergistyczny między laktonami 2-4 i flukonazolem (1) opiera się na promowaniu wchłaniania leków i hamowaniu ich wpływu poprzez obniżenie transkrypcji transporterów leków CDR1 i CDR2 [39, 40]. Dzięki takiemu działaniu przy mniejszych stężeniach flukonazolu jak i laktonów ftalidowych obserwujemy działanie fungistatyczne (Rys. 1c).

3. STUDIA *IN SILICO* W ANALIZIE WPLYWU STRUKTURY CHEMICZNEJ NA AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ

Badając aktywność biologiczną staramy się przeanalizować wpływ na nią ma struktura chemiczna testowanych związków. Wielokrotnie taka strategia nie pozwala na jednoznaczne wnioski.

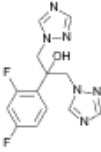
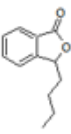
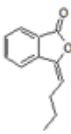
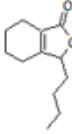
Dlatego w rozważaniach uwzględniono dane z analiz *in silico* wykonanych przy wykorzystaniu oprogramowania ADME. Lipofilowość, toksyczność dla komórek szczu-

ra, oraz hamowanie enzymów odpowiedzialnych za biotransformację i detoksykację leków są niezwykle ważne (Tabela 3) [43, 44, 45–48].

Przewidywanie toksyczności oparto na obliczeniach z algorytmu opracowanego przez Szwajcarski Instytut Bioinformatyki na Uniwersytecie w Lozannie. Algorytm wspomaganego komputerowo projektowania leków (CADD) oparty na uczeniu maszynowym może z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć właściwości biologiczne badanej substancji chemicznej [43]. Szczegółową metodologię programu opisują autorzy szwajcarskiego ADME. Toksyczność doustna u szczurów została opracowana przy użyciu modelu way2drug stworzonego przez Zakład Bioinformatyki Laboratorium Projektowania Leków w oparciu o strukturę i funkcję Instytutu Chemii Biomedycznej (IBMC) w Moskwie [44].

Tabela 3. Określenie *in silico* lipofilowości (Log P), toksyczności doustnej u szczurów (LD₅₀) i przewidywanie hamowania CYP dla flukonazolu i laktonów 2-4 na podstawie algorytmów Swiss ADME i way2drug algorytmy

Table 3. In silico determination of lipophilicity (Log P), rat oral toxicity (LD₅₀), and CYP inhibition prediction of fluconazole and 2-4 lactones from Swiss ADME and way2drug algorithms

	Związki			
				
	1	2	3	4
Log P	0,88	2,81	2,93	2,93
Toksyczność pokarmowa wobec szczura (mg/kg)	584,4	4872	1865	5184
CYP inhibitor	CYP2C19	CYP1A2	CYP1A2 CYP2C9	-

Do powyższych programów wprowadzono struktury wszystkich użytych w pracy związków chemicznych, w tym flukonazolu i laktonów ftalidowych, co pozwoliło uzyskać informacje dotyczące lipofilowości powyższych związków oraz prawdopodobnego hamowania kluczowych enzymów cytochromu P450 odpowiedzialnych za metabolizm w organizmie człowieka oraz toksyczności pokarmowej wobec szczura (Tabela 3)

Otrzymane laktony ftalidowe 2–4 (Rys. 3), czyli estry wewnętrzne, mają podobną budowę i różnią się liczbą oraz położeniem wiązań podwójnych. 3-n-Butyloftalid (2) i 3-n-butylidenoftalid (3) są związkami aromatycznymi i dlatego mają płaską strukturę. 3-n-Butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalid (4) ma tylko jedno wiązanie podwójne między w bicyklicznym układzie pierścieni, który nie jest płaski; jego konformacja może się zmieniać w zależności od środowiska. Laktony 2–4 mają masę cząsteczkową 188-194 g/mol. Flukonazol ma odmienną budowę chemiczną, jest to trzeciorzędowy alkohol, z dwoma azolowymi pierścieniami i difluorofenolem, czego konsekwencją stanowi odmienna lipofilowość (Tabela 3). Flukonazol (1) lepiej rozpuszcza się w wodzie a laktony 2–4 i w tłuszczach. Związki te różnią się toksycznością (Tabela 3). Flukonazol jest od 3 do 10 razy bardziej toksyczny niż przedstawione laktony. Zaobserwowano

zaskakującą różnicę w toksyczności poszczególnych laktonów – obecność wiązania podwójnego przy trzecim atomie węgla drastycznie zmniejsza dawkę śmiertelną.

Kolejne analizowane dane dotyczą enzymów należących do kompleksu cytochromu P450, które w swojej budowie mają wspólną cząsteczkę hemu. Odgrywają one kluczową rolę w metabolizmie ksenobiotyków u wszystkich przedstawicieli eukariontów [49]. Jednym z ich podstawowych zadań jest detoksykacja organizmu. Trzy rodziny enzymów cytochromu P450 (CYP1, CYP2 i CYP3), które są odpowiedzialne za biotransformację dużej części leków powszechnie stosowanych w farmakologii, mają największe znaczenie w określaniu farmakokinetyki i wpływu chemikaliów na ssaki i organizmy ssaków. Flukonazol jest silnym inhibitorem enzymu CYP2C19, odpowiedzialnego w wątrobie ssaków za detoksykację nawet 20% leków. 3-n-Butyloftalid hamuje enzymy CYP1A2 i CYP2C9, a trzykrotnie bardziej toksyczny 3-butyliidenoftalid tylko CYP1A2. Najmniej toksyczny 3-n-butylo-4,5,6,7-tetrahydroftalid (4) – nie jest silnym inhibitorem enzymów CYP.

UWAGI KOŃCOWE

Istnieje pilna potrzeba ograniczenia ilości antybiotyków, szczególnie tych z układami azolowymi. Mechanizm synergistyczny między laktonami 2–4 i azolami opiera się na promowaniu wchłaniania leków i hamowaniu ich wpływu poprzez obniżenie poziomu transkrypcji białek z rodziny transporterów ABC, w szczególności Cdr1 i Cdr2 w komórkach drożdży z rodzaju *Candida*. We wszystkich analizowanych przypadkach zastosowanie flukonazolu i niewielkich ilości laktonów występujących w roślinach selerowatych pozwala na ograniczenie ilości flukonazolu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Mishra, A.K. Mishra, S. Kumar, S.K. Mandal, Kumar, K.-H. Baek, Y.K. Mohanta, *Metabolites* 2021, **12**, 12.
- [2] D.K. Singh, R. Tóth, A. Gácsér, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020, **10**, 94.
- [3] M. Staniszewska, Ł. Kuryk, A. Gryciuk, J. Kawalec, M. Rogalska, J. Baran, E.Łukowska-Chojnacka, Kowalkowska, A. *Molecules* 2021, **26**, 5008.
- [4] R.A. Smego, H. Ahmad, *Medicine* 2011, **90**, 237.
- [5] M.E. Akler, H.Vellend, D.M. McNeely, S.L. Walmsley, W.L. Gold, *Clin. Infect. Dis.* 1995, **20**, 657.
- [6] D.F. Bavaro, F. Balena, L. Ronga, F. Signorile, F. Romanelli, S. Stolfa, E. Sparapano, C. de Carlo, A. Mosca, L. Monno, i inni. *J. Med. Mycol.* 2022, **32**, 101206.
- [7] J.C.R. Corrêa, H.R.N. Salgado, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2011, **41**, 124.
- [8] N. Fattouh, D. Hdayed, G. Geukgeuzian, S. Tokajian, R.A. Khalaf, *Fungal Genet. Biol.* 2021, **153**, 103575.
- [9] M.A. Jacobson, D.K. Hanks, L.D. Ferrell, *Am. J. Med.* 1994, **96**, 188.
- [10] T. Bühler, M. Medinger, J. Bouitbir, S. Krähenbühl, A. Leuppi-Taegtmeier, *Front. Pharmacol.* 2019, **10**, 645.
- [11] K.R. Beck, A. Odermatt, *Mol. Cell. Endocrinol.* 2021, **524**, 111168.
- [12] S. Bhattacharya, S. Sae-Tia, B.C. Fries, *Antibiotics* 2020, **9**, 312.
- [13] A. Agrawal, A. Singh, R. Verma, A. Murari, *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2014, **18**, 81.
- [14] K. Spettel, W. Barusch, A. Makristathis, I. Zeller, M. Nehr, B. Selitsch, M. Lackner, P.-M. Rath, J. Steinmann, B. Willinger, *PLOS ONE* 2019, **14**, e0210397.
- [15] M.T. Yassin, A.A. Mostafa, A.A. Al-Askar, R. Bdeer, *Eur. J. Med. Res.* 2020, **25**, 1.
- [16] Becher, R.; Wirsal, S.G.R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, **95**, 825.
- [17] P.-Y. Chen, Y.-C. Chuang, U.-I. Wu, H.-Y. Sun, J.-T. Wang, W.-H. Sheng, Y.-C. Chen, S.-C. Chang, S.-C. J. *Fungi* 2021, **7**, 612.
- [18] A. Arastehfar, F. Daneshnia, A. Hafez, S. Khodavaisy, M.J. Najafzadeh, A. Charsizadeh, H. Zarrinfar, [23] *Med. Mycol.* 2020, **58**, 766.

- [19] X. Fan, M.Xiao, D. Zhang, J.J. Huang, H. Wang, X. Hou, L. Zhang, F. Kong, S.C Chen, Z.H. Tong, *i inni Clin. Microbiol. Infect.* 2019, **25**, 885.
- [20] S.A. Flowers, B Colón, S.G. Whaley, M.A. Schuler, P.D. Rogers, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, **59**, 450.
- [21] K.E. Pristov, M.A. Ghannoum, *Clin. Microbiol. Infect.* 2019, **25**, 792.
- [22] A. León, M. Del-Ángel, J.L. Ávila, G. Delgado, *Prog Chem. Org. Nat. Prod.* 2017, **104**, 127.
- [23] C. Ding, Y. Sheng, Y. Zhang, J. Zhang, G. Du, *Planta Med.* 2008, **74**, 1684.
- [24] R.M. Spréa,; Â. Fernandes,; T.C. Finimundy,; C. Pereira,; M.J. Alves,; R.C. Calhelha,; C. Canan,; L. Barros, J.S. Amaral, I.C.F.R. Ferreira, *Resources* 2020, **9**, 81.
- [25] A. León, R.A. Toscano, J. Tortoriello, G. Delgado, *Nat. Prod. Res.* 2011, **25**, 1234.
- [26] J.J. Beck, S.-C Chou, *J. Nat. Prod.* 2007, **70**, 891.
- [27] R.A. Momin, M.G. Nair, *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**, 142.
- [28] J. Pannek, J. Gach, F. Boratyński, T.Olejniczak, *Phytother. Res.* 2018, **32**, 1459.
- [29] L. Fan,; B. Luo,; Z. Luo,; L. Zhang,; J. Fan,; W. Xue,; L.Tang,; Y. Li, *Für Nat. B* 2019, **74**, 811.
- [30] B. Xiao,; J. Yin,; M. Park,; J. Liu,; J.L. Li,; E. Kim,; J. Hong,; H.Y. Chung,; J.H. Jung, *Bioorg. Med. Chem.* 2012, **20**, 4954
- [31] J. Jia, C. Wei, J. Liang, A. Zhou, X. Zuo, H. Song, L. Wu, X. Chen, S. Chen, J. Zhang, *i inni Alzheimer's Dement.* 2016, **12**, 89.
- [32] X. Wang, L. Wang, X. Sheng, Z. Huang, T. Li, M. Zhang, J. Xu, H. Ji, J. Yin, Y. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* 2014, **12**, 5995.
- [33] X. Diao, P. Deng, C. Xie, X. Li, D. Zhong, Y. Zhang, X. Chen, *Drug Metab. Dispos.* 2013, **41**, 430.
- [34] J. Gach, T. Olejniczak, P. Krężel, F. Boratyński, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**, 7600.
- [35] X. Chen, S. Deng, Q. Lei, Q. He, Y. Ren,; Y. Zhang, J. Nie,; W. Lu, *Front. Cell Dev. Biol.* 2020, **8**, 598020
- [36] X. Li, X. Wang, L. Miao, Y. Guo, R. Yuan, H. Tian, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021, **556**, 99.
- [37] Liu, X.; Liu, R.; Fu, D.; Wu, H.; Zhao, X.; Sun, Y.; Wang, M.; Pu, X. *Aging* 2021, **13**, 3763.
- [38] B. Wang, C. Wu, Z. Chen, P. Zheng, Y. Liu, J. Xiong, J. Xu, P. Li, A.A. Mamun, L. Ye, *i inni Acta Pharmacol. Sin.* 2021, **42**, 347
- [39] Y. Gong, W Liu, X. Huang, L. Hao, Y. Li, S. Sun, *Front. Microbiol.* 2019, **10**, 1461.
- [40] Z. Yan, H. Hua, Y. Xu,; L.P. Samaranyake, *Altern. Med.* 2012, **12**, 1.
- [41] J. Meletiadis, S. Pournaras, E. Roilides, T.J. Walsh, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, **54**, 602.
- [42] V. Lorian, *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 200545
- [43] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, *SwissADME: Sci. Rep.* 2017, **7**, 42717.
- [44] D.S. Druzhilovskiy, A.V. Rudik, D.A. Filimonov, T.A. Glorizova, A.A. Lagunin, A.V. Dmitriev, P.V. Pogodin, V.I. Dubovskaya, S.M. Ivanov, O.A. Tarasova, *i inni. Computational platform Way2Drug: Russ. Chem. Bull.* 2017, **66**, 1832.
- [45] R. Tamaian, A. Moț, R. Silaghi-Dumitrescu, I. Ionuț, A. Stana, O. Oniga, C. Nastasă, DBenedec, B. Tiperciuc, *Molecules* 2015, **20**, 22188.
- [46] Lipinski, C.A. *Drug Discov. Today Technol* 2004, **1**, 337.
- [47] T. Chmiel, A. Mieszkowska, D. Kempńska-Kupczyk, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, Z. Mazerska, *Microchem. J.* 2019, **146**, 393.
- [48] G.A. Norman, *JACC Basic Transl. Sci.* 2020, **5**, 387.
- [49] S. Kumar, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2010, **6**, 11.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 marca 2023 r.

WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNE I BIOMEDYCZNE ZWIĄZKÓW ZAWIERAJĄCYCH JONY RUTENU(II) ORAZ RUTENU(III)

CATALYTIC AND BIOMEDICAL PROPERTIES
OF COMPOUNDS CONTAINING RUTHENIUM(II)
AND RUTHENIUM(III) IONS

**Kacper Pobłocki¹, *, Marta Pawlak¹, Juliusz
Walczak², Joanna Drzeżdżon¹, Dagmara Jacewicz¹**

¹*Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego Katedra Technologii Środowiska,
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk*

²*Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, Katedra Chemii Organicznej,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
e-mail: k.poblocki.316@studms.ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Reakcje z udziałem materiałów katalitycznych rutenu(II) oraz rutenu(III)

1.1. Metateza olefin

1.2. Polimeryzacja olefin

1.3. Epoksydacja olefin

1.4. Depolimeryzacja

2. Właściwości biomedyczne związków rutenu(II) oraz rutenu(III)

2.1. Wiązanie DNA przez związki rutenu(II) oraz rutenu(III)

2.2. Właściwości przeciwbakteryjne

2.3. Właściwości antyoksydacyjne

2.4. Właściwości przeciwnowotworowe

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Lic. Kacper Pobłocki – pracę magisterską wykonuje w Katedrze Technologii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jego tematyka badawcza ogniskuje się wokół projektowania syntez nowych związków metaloorganicznych oraz wykorzystywaniem ich jako „zielonych” prekatalizatorów w reakcji polimeryzacji olefin. Finalista Złotego Medalu Chemii organizowanego przez Instytut Chemii Fizycznej PAN w Warszawie oraz firmę DuPont. Za swoje osiągnięcia naukowe został nagrodzony wielokrotnie przez Rektora Uniwersytetu Gdańskiego, Marszałka Województwa Pomorskiego oraz Ministra Edukacji i Nauki. Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Naukowego Koła Chemików oraz Koła Naukowego Biznesu Chemicznego.



<https://orcid.org/0000-0001-6428-1495>

Mgr Marta Pawlak – doktorantka Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w 2022 roku ukończyła studia magisterskie z Chemii ze specjalnością chemia biomedyczna na Uniwersytecie Gdańskim. Projekt doktorski realizuje w Katedrze Technologii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Jej tematyka badań skupia się na projektowaniu syntez związków koordynacyjnych, opartych na metalach grup dalszych oraz wykorzystanie ich w reakcjach oligomeryzacji. Członkini Polskiego Towarzystwa Chemicznego.



<https://orcid.org/0000-0002-3871-1313>

Mgr inż. Juliusz M. Walczak – inżynier technologii chemicznej, specjalność: technologia organiczna (2019), magister chemii, specjalność: chemia biologiczna i medyczna (2020). Swój doktorat wykonuje w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej pod opieką dr. hab. inż. Grzegorza Cholewińskiego. Jego badania skupiają się na syntezie nowych pochodnych kwasu mykofenolowego o właściwościach antyproliferacyjnych, które mogą w przyszłości posłużyć jako potencjalne leki o właściwościach immunosupresyjnych (stosowane w profilaktyce odrzutu organów po przeszczepie lub chorobach autoimmunologicznych) i przeciwnowotworowych. Jego zainteresowania naukowe dotyczą szeroko pojętej optymalizacji syntezy organicznej z wyszczególnieniem reakcji otrzymywania amidów, chemii związków heterocyklicznych, chemii siarkoorganicznej, a także zagadnień dotyczących luminescencji.



<https://orcid.org/0000-0003-4226-6731>

Dr Joanna Drzeżdżon – jest pracownikiem Katedry Technologii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Ukończyła studia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii UG w 2012 roku, tam również otrzymała w 2017 r. stopień doktora. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badań nad syntezą oraz właściwościami fizykochemicznymi, katalitycznymi oraz antyoksydacyjnymi związków koordynacyjnych jonów metali przejściowych. Prowadzi badania naukowe nad katalizatorami polimeryzacji olefin, w tym z zastosowaniem zasad „zielonej chemii”. Jest współautorką ponad 50 publikacji naukowych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, a także 2 patentów. Członkini Polskiego Towarzystwa Chemicznego.



<https://orcid.org/0000-0002-9964-3027>

Dr hab. Dagmara Elżbieta Jacewicz, prof. nadzw. - UG urodziła się 30 września 1976 roku w Bolesławcu. Po ukończeniu szkoły podstawowej kontynuowała tamże edukację w I Liceum Ogólnokształcącym im. Władysława Broniewskiego. Studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, gdzie w 2001 roku obroniła pracę magisterską. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (UG). Pracę doktorską obroniła w 2005 roku, za którą otrzymała nagrodę Oddziału Gdańskiego Polskiego Towarzystwa Chemicznego. W lipcu 2015 roku uzyskała stopień naukowy doktora habilitowanego na Wydziale Chemii UG. Od 2004 roku pracuje na Wydziale Chemii jako asystent, adiunkt i profesor nadzwyczajny (od 2016). Jej zainteresowania badawcze koncentrują się na chemii związków kompleksowych, kinetyce reakcji oraz na biosensorach molekularnych, a w szczególności na ich zastosowaniach do oznaczania tlenu azotu(IV) i tlenu węgla(IV) w materiale biologicznym jak również bada właściwości fizykochemiczne, katalityczne oligomeryzacji olefin oraz antyoksydacyjne nowo otrzymanych związków koordynacyjnych jonów metali przejściowych. Jej dorobek naukowy obejmuje ponad 100 prac naukowych, z czego 102 to publikacje wydane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Jest współautorką ponad 100 komunikatów naukowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.



<https://orcid.org/0000-0002-6266-5193>

ABSTRACT

Ruthenium complexes appear in scientific publications mainly as catalysts in the olefins metathesis process. In this review, we want to indicate the research niche regarding the use of ruthenium(II) and ruthenium(III) complexes in other catalytic processes, i.e. polymerization or epoxidation of olefins and depolymerization.

We would like to combine the catalytic properties of ruthenium(II,III) complex compounds with their biomedical activity due to the growing problem of drug resistance (including antibiotic resistance). Scientists have been designing new metallopharmaceuticals exhibiting biological activity for several years, therefore this requires a critical review of the literature. The main goal of designing new metallodrugs is to create compounds with new or stronger biological properties compared to free ligands. Ruthenium compounds are considered potential substitutes for known drugs. In particular, Ru(II) and Ru(III) based complexes have reduced toxicity and can be tolerated *in vivo*. In addition, a wide spectrum of ruthenium oxidation states, a different mechanism of action and the kinetics of ligand substitution increase the advantage over coordination complex compounds based on platinum.

In conclusion, in this review, we will focus on the latest reports from the literature on the catalytic properties and biomedical activity of ruthenium(II) and ruthenium(III) chemical compounds.

Keywords: Ru(II) complex compounds, Ru(III) complex compounds, biomedical properties, catalytic properties

Słowa kluczowe: związki kompleksowe Ru(II), związki kompleksowe Ru(III), właściwości biomedyczne, właściwości katalityczne

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

5-idip	–2-indol-[4,5-f][1,10]fenantrolina
ADMET	–polimeryzacja metatetyczna dienów acyklicznych
AlMe ₂ Cl	–chlorek dietyloglinu
bpy	–2,2'-bipirydyna
bpm	–2,2'-bipirymidyna
BHB	–polihydroksymaślan
CM	– (ang. <i>cross metathesis</i>) metateza krzyżowa
DMSO	– dimetylosulfotlenek
dpz	–dipyridofenazyna
dpqC	–dipirydo[3,2-a:2',4'-c](6,7,8,9-tetrahydro)fenazyna
dpq	–dipirydo[3,2-d:2',3'-f]chinoksalina))
EtAlCl ₂	–dichlorek etyloglinu
Et	–grupa etylowa
EC ₅₀	–miara stężenia substancji, przy którym następuje osiągnięcie 50% zamierzonej odpowiedzi biologicznej
ee	–nadmiar enancjomeryczny
IC ₅₀	–miara stężenia substancji, przy którym następuje zahamowanie funkcji biologicznej o 50%
KO ^t Bu	– <i>tert</i> -butanolan potasu
Lit.	–literatura
NHC	–N-heterocykliczny karben
Mes	–mezytylen
OM	– metateza olefin katalizowana metalem przejściowym
p	–ciśnienie
pip	–2-fenylimidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina
phpy	–2-fenylpirydyna
PET	–poli(tereftalan etylenu)
PPC	–poli(węglan propylenu)
PEC	–poliwęglan etylenu
PLA	–kwas polioctowy
P3HP	–poli(3-hydroksypropionian)
Ph	–grupa fenylowa
RCM	– (ang. <i>ring closing metathesis</i>) metateza z zamknięciem pierścienia
ROM	– (ang. <i>ring opening metathesis</i>) metateza z otwarciem pierścienia
ROMP	– (ang. <i>ring opening metathesis polymerisation</i>) metatetyczna polimeryzacja z otwarciem pierścienia
t-BuOOH	– wodoronadtlenek <i>tert</i> -butylu
TDL*	– glukozowa pochodna trójzębnego liganda chiralnego opartego na bazie zasad Schiffa
T	–temperatura
THF	–tetrahydrofuran
tBu	–grupa <i>tert</i> -butylowa

WPROWADZENIE

Materiały katalityczne zawierające jony rutenu(II) lub rutenu(III) wykazują zdolność przenoszenia elektronów, właściwości kwasowo-zasadowe, niski potencjał redoks oraz wysoką stabilność chemiczną. Wszystkie te cechy powodują, że związki koordynacyjne rutenu mogą być wykorzystane jako katalizatory w różnego rodzaju reakcjach chemicznych np. polimeryzacji oraz epoksydacji olefin [1]. Kompleksy rutenu dzięki szerokiemu zakresowi stopni utlenienia, wysokiej trwałości kinetycznej oraz wykazywaniu podobnych zależności, co związki koordynacyjne żelaza(II), w oddziaływaniu z biomolekułami, stanowią interesującą grupę środków terapeutycznych. Dodatkowo możliwość dostosowania wielkości cząstek, właściwości termodynamicznych, kinetycznych, kwasowo-zasadowych oraz aktywności redoks stanowi możliwość projektowania nowych metalofarmaceutyków o ściśle określonym mechanizmie działania, wykazujących pożądane właściwości biomedyczne [2].

1. REAKCJE Z UDZIAŁEM MATERIAŁÓW KATALITYCZNYCH RUTENU(II) ORAZ RUTENU(III)

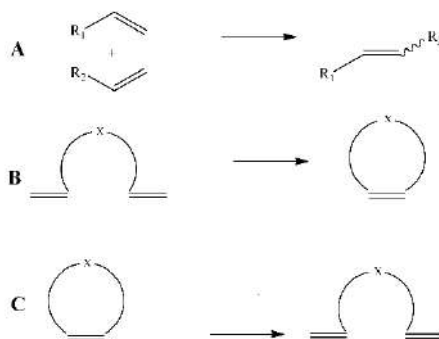
1.1. METATEZA OLEFIN

Metatezę olefin katalizowaną metalem przejściowym (OM), możemy zdefiniować jako katalityczny proces wymiany wiązań podwójnych pomiędzy atomami węgla. W literaturze wyróżnia się 3 najważniejsze rodzaje tego procesu: metatezę z otwarciem pierścienia (ROM), metatezę z zamknięciem pierścienia (RCM) oraz metatezę krzyżową (CM) (Rys. 1). Ponadto bardzo ważne miejsce w przemyśle znajdują również polimeryzacja z otwarciem pierścienia (ROMP) oraz polimeryzacja acyklicznych dienów (ADMET) [3,4].

Historia metatezy olefin sięga lat 50. Kiedy Anderson i Merckling przedstawili reakcje przegrupowania wiązania podwójnego węgiel-węgiel podczas prowadzenia katalizowanej tytanem polimeryzacji norbornenu. Od czasu tego wydarzenia reakcja metatezy olefin służy jako podstawa w syntezie chemicznej i cieszy się dużym zainteresowaniem zarówno w przemyśle jak i w nauce [5,6].

Pierwsze katalizatory metatezy były układami wieloskładnikowymi, w których skład wchodził halogenek metalu przejściowego oraz metal z grupą alkilową np. $WCl_6/EtAlCl_2$, $WCl_6/BuSn_4$. Jednak wady układów wieloskładnikowych skłoniły naukowców do badań nad jednoskładnikowymi katalizatorami metatezy opartymi na jonach metali przejściowych takich jak tytan czy wolfram np. niejednorodny katalizator Calderona ($WCl_6/EtAlCl_2/EtOH$), a w późniejszym czasie pojawiły się również katalizatory na bazie molibdenu. Niestety pomimo wysokiej aktywności

katalitycznej tych związków, posiadały one ograniczoną tolerancję na tlen i wilgoć utrudniając tym samym ich zastosowanie w wielu reakcjach [7,8].



Rysunek 1. Schematy przebiegu trzech najważniejszych rodzajów metatezy olefin. (A) CM (B) RCM (C) ROM (X= CH₂, R₁,R₂= reszta łańcucha alifatycznego) [3, 4]

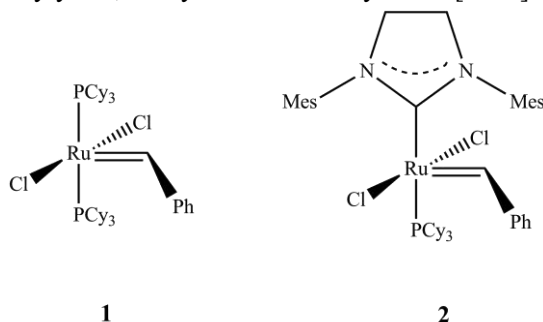
Figure 1. Schemes of the three most important types of olefin metathesis. (A) CM (B) RCM (C) ROM X = CH₂, R₁,R₂= rest of the aliphatic chain) [3, 4]

Rosnące znaczenie w procesie metatezy olefin zyskują katalizatory na bazie rutenu(II). Związane jest to z ich zwiększoną tolerancją na tlen atmosferyczny i wodę oraz znacznie wyższą reaktywność względem olefin w porównaniu z kompleksami innych metali przejściowych takich jak tytan, molibden czy wolfram.

Dotychczas najpopularniejszymi katalizatorami na bazie rutenu jest seria katalizatorów Grubbsa oraz pochodne tych katalizatorów (Rys. 2). Katalizatory Grubbsa I generacji są kompleksami szeroko stosowanym w syntezie organicznej. W skład katalizatora wchodzi ruten na II stopniu utlenienia oraz ligand tricykloheksylofosfinowy. Reakcja otrzymywania tego katalizatora jest stosunkowo prostą i jednoetapową syntezą dichlorotris(trifenylofosfiny) rutenu(II) [RuCl₂(PPh₃)₃] z fenylodiazometanem i tricykloheksylofosfiną. Katalizatory tego typu są względnie stabilne na powietrzu i wobec wilgoci, oprócz tego wykazują dużą aktywność w obecności olefin. Kompleksy te są aktywne we wszystkich rodzajach metatezy. Powodują przyspieszenie reakcji metatezy krzyżowej oraz metatezy z zamknięciem pierścienia. Takie układy posiadają również wady, ponieważ wykazują niską stabilność termiczną oraz ciężko je użyć w przypadku olefin posiadających grupy funkcyjne [9,10].

Katalizatory Grubbsa II generacji, różnią się od swoich poprzedników zamianą liganda fosfiny na *N*-heterocykliczny ligand karbenowy (NHC). Dzięki tej zmianie następuje zwiększenie zasadowości, a tym samym wpływ na poprawę aktywności katalitycznej. „Nowy ligand” powoduje zwiększenie stabilności termicznej katalizatora oraz tolerancji na obecność grup funkcyjnych, również zmniejsza

wrażliwość na tlen i wilgoć. Katalizator II generacji przede wszystkim jest bardziej aktywny w reakcjach metatezy krzyżowej oraz w reakcji metatezy z zamknięciem pierścienia. Otrzymuje się go w reakcji katalizatora I generacji z alkoksylołą pochodną 1,3-dimezitylo-4,5-dihydroimidazol-2-ylidenu [8–10].



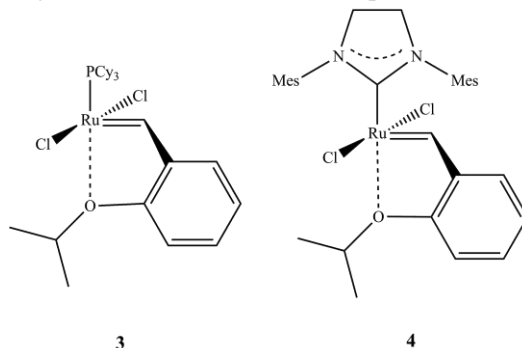
Rysunek 2. Katalizatory Grubbsa (1) I generacji i (2) II generacji [8–10]

Figure 2. Grubbs catalysts (1) first generation and (2) second generation [8–10]

Użyteczność katalizatorów odkrytych przez Grubbsa zmotywowała badaczy do dalszego rozwoju katalizatorów rutenowych wyposażonych w różne typy podstawników. Doprowadziło to do powstania katalizatorów Hoveydy-Grubbsa (Rys. 3), które znacznie rozszerzyły zakres stosowania reakcji metatezy. Katalizatory Hoveydy-Grubbsa charakteryzują się wysoką stabilnością i tolerancją wobec wielu grup funkcyjnych. Wykazują ponadto aktywność katalityczną w polimeryzacji metatetycznej z otwarciem pierścienia cykloolefin (ROMP). Dużą zaletą katalizatorów Hoveydy-Grubbsa jest wysoka stabilność na powietrzu, łatwość przechowywania oraz możliwość ponownego wykorzystania. Dzięki tym właściwościom możliwe jest prowadzenie reakcji bez konieczności stosowania ściśle bezwodnych i beztlenowych warunków, a następnie odzyskanie katalizatora np. przy pomocy chromatografii kolumnowej, co w przypadku katalizatora Grubbsa jest niemożliwe, ponieważ ulega on rozkładowi w obecności nawet śladowych ilości tlenu. Jednakże, związki te posiadają również wady, mianowicie wykazują małą aktywność katalityczną w reakcjach metatezy krzyżowej i cyklizacji metatetycznej substratów posiadających zawadę sterczyną w pobliżu wiązania podwójnego. Do niedoskonałości katalizatora Hoveydy-Grubbsa można również zaliczyć wolniejszą inicjację w porównaniu z katalizatorem Grubbsa II generacji, która prawdopodobnie wynika z właściwości sterycznych oraz elektronodonorowych grupy izopropoksylowej [6,9].

Aktywność katalizatorów I generacji nie napawała optymizmem, w związku z tym poddano je modyfikacjom wprowadzając trwałe *N*-heterocykliczny ligand karbenowy (NHC) w miejsce tricykloheksylofosfiny, otrzymując w ten sposób katalizator Hoveydy-Grubbsa II generacji. Katalizatory te charakteryzują się jeszcze wyższą efektywnością w reakcji metatezy krzyżowej z olefinami zawierającymi

grupy elektronoakceptorowe. Katalizator wykazuje również aktywność w reakcjach cyklizacji metatycznej oraz metatezie z otwarciem pierścienia [4,9-11].



Rysunek 3. Katalizatory Hovey-Grubbsa (3) I generacji i (4) II generacji [6-11]

Figure 3. Hovey-Grubbs catalysts (3) 1st generation and (4) 2nd generation [6-11]

W 2020 Zhang i współpracownicy [12] zsyntetyzowali makrocykliczny katalizator Ru-karbenowy. Nowo powstały związek kompleksowy składał się z N,N'-bis(2,6-dimetylo-4-(4,4,5,5-tetrametylo-1,3,2-dioksaborolan-2-yl)fenylo)etano-1,2-diaminy i 4,6-dijododibenzofuranu jako ligandów. Oceniono jego aktywność katalityczną w RCM diallilomalonianu dietylu (DEDAM). Reaktywność katalizatora była znacznie mniejsza niż związku 4, gdzie nowy rutenowy katalizator potrzebował 90 h, aby osiągnąć 85% konwersji, czyli był 160 razy wolniejszy niż katalizator 4 [12].

Aktualnie badania dotyczące katalizatorów metatezy olefin opartych na jonach rutenu(II) i rutenu(III) dotyczą głównie modyfikacji i ulepszania dotychczas poznanych katalizatorów. Modyfikacje te najczęściej polegają na substytucji liganda lub wprowadzeniu podstawnika do jego struktury. W literaturze z roku na rok możemy znaleźć coraz więcej artykułów [10-14] dotyczących syntezy nowych materiałów katalitycznych opartych na jonach rutenu(II) oraz rutenu(III), które wykazują bardzo zadowalające wartości aktywności katalitycznej.

1.2. POLIMERYZACJA OLEFIN

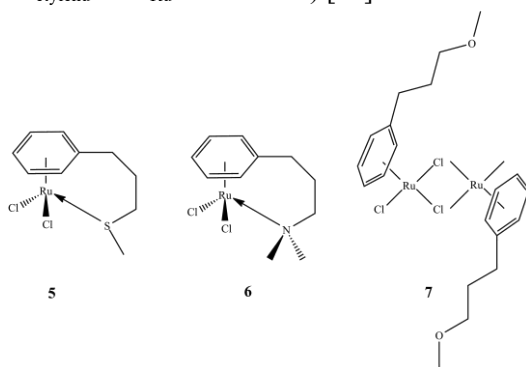
Ogromny sukces jaki odniosły katalizatory na bazie jonów rutenu(II) w metatezie olefin, skłoniły naukowców do poszukiwania potencjalnego zastosowania tych związków jako katalizatorów innych reakcji. Dzięki temu w literaturze możemy znaleźć kilka doniesień na temat wykorzystania związków kompleksowych rutenu(II) oraz rutenu(III) w procesie polimeryzacji oraz oligomeryzacji olefin.

Polimeryzacja i oligomeryzacja olefin jest tematem cieszącym się wielkim zainteresowaniem w ostatnim czasie. Poliolefiny charakteryzują się wysoką stabilno-

ścią mechaniczną, co wyróżnia je na tle innych polimerów. Od czasu odkrycia katalizatorów postmetalocenowych przez Brookharta [14] oraz jego współpracowników, są one najczęściej wykorzystywanymi materiałami używanymi do polimeryzacji olefin. Katalizatory te składają się z jonów metali przejściowych w połączeniu z ligandami organicznymi. Jony metali takie jak nikiel(II), pallad(II), kobalt(II) oraz żelazo(II) występują często w strukturze katalizatorów [15].

W latach 70. XX wieku w publikacjach naukowych pojawiły się informacje o wykorzystaniu związków kompleksowych rutenu jako katalizatorów w polimeryzacji etylenu oraz kopolimeryzacji z innymi polarnymi cząsteczkami np. akrylonitrylem.

Co ciekawe, przez kolejne 30 lat nikt nie opublikował manuskryptu dotyczącego użycia prekatalizatorów rutenu w procesie polimeryzacji olefin. Dopiero w 2014 roku grupa Camacho Fernandez przedstawiała arenowe związki kompleksowe rutenu(II) (Rys. 4), które zostały wykorzystane w procesie polimeryzacji etylenu, przy użyciu AlMe_2Cl jako aktywatora. Okazało się że kompleks 5 zawierający atom siarki w swojej strukturze oraz kompleks 6 zawierający atom azotu są aktywne w procesie polimeryzacji olefin, natomiast kompleks 7 zawierający atom tlenu jest nieaktywny. Ponadto kompleks 2 ($1295 \text{ mol}_{\text{etylenu}} \cdot \text{mol}_{\text{Ru}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$) jest bardziej aktywny niż kompleks 1 ($836 \text{ mol}_{\text{etylenu}} \cdot \text{mol}_{\text{Ru}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$) [16].

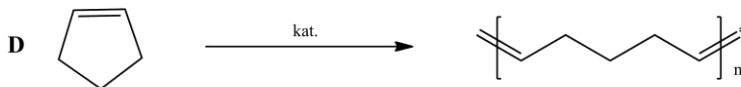


Rysunek 4. Arenowe związki kompleksowe rutenu(II) [16]

Figure 4. Arene complex compounds of ruthenium(II) [16]

Wspominając o katalizatorach na bazie jonów rutenu, używanych w procesie polimeryzacji, nie można zapomnieć o ich udziale w metatetycznej polimeryzacji cykloolefin z otwarciem pierścienia (ROMP) (Rys. 5). Reakcja ta jest ważną metodą syntezy związków wielkocząsteczkowych. Katalizatory na bazie rutenu najczęściej wykorzystywane są do polimeryzacji norbornenu. Często występują jako układy bimetaliczne w połączeniu z palladem lub niklem. Popularnymi przykładami są wspomniane wcześniej katalizatory Hoveydy-Grubbsa oraz grupa związków rute-

nu(II) zawierających ligand oparty na *N*-heterocyklicznym karbenie oraz DMSO [17].



kat- katalizator na bazie jonów rutenu(II) lub rutenu(III)

Rysunek 5. (D) Schemat metatycznej polimeryzacji norbornenu z otwarciem pierścienia [17]

Figure 5. (D) Schematic of the metathesis polymerization of norbornene with ring opening [17]

Niestety nadal jest bardzo niewiele publikacji dotyczących wykorzystania związków kompleksowych rutenu(II) oraz rutenu(III) jako prekatalizatorów w polimeryzacji olefin. Patrząc na wysoką stabilność termodynamiczną umiarkowanie aktywnych prekatalizatorów Ru(II/III), próby syntezy związków koordynacyjnych opartym na tym jonie metalu oraz wykorzystaniu takich układów w procesie polimeryzacji i oligomeryzacji powinny być podejmowane znacznie częściej, ze względu na duży potencjał tego typu indywidualności chemicznych.

1.3. EPOKSYDACJA OLEFIN

Epoksydy inaczej zwane epitenkami lub oksiranami są heterocyklicznymi związkami organicznymi zawierającymi w swojej strukturze trójczołowy pierścień złożony z dwóch atomów węgla i tlenu. Związki te powstają podczas reakcji epoksydacji. Metod ich syntezy jest wiele jednak jedną z podstawowych jest metoda z udziałem olefin i czynników utleniających np. nadtlaniem wodoru, organicznych lub nieorganicznych nadkwasów lub wysoce reaktywnych dioksiranów [18–20].

Katalityczne epoksydowanie olefin jest zarówno istotną technologią przemysłową, jak i podstawową metodą syntetyczną, ponieważ epoksydy są bardzo użytecznymi półproduktami oraz blokami budulcowymi (fragment cząsteczki lub związku chemicznego, który posiada reaktywne grupy funkcyjne). Mogą zostać wykorzystane w produkcji chemikaliów, dodatków do żywności, a nawet jako półproduktu do produkcji leków [18-23].

Podczas reakcji epoksydowania niezbędny jest zarówno katalizator jak i utleniacz końcowy, a całość reakcji prowadzona jest w obecności rozpuszczalnika. Odpowiedni utleniacz powoduje powstawanie epoksydów z większą wydajnością. Dobór rozpuszczalnika zależy od substratu, jednakże w większości przypadków reakcje przebiegają sprawnie w rozpuszczalnikach niepolarnych, natomiast zastosowanie polarnych rozpuszczalników takich jak aceton, octan etylu i acetonitryl opóźnia epoksydację [23]. Bardzo ważny w tej reakcji jest również katalizator, który może być nośnikiem tlenu. Dobór odpowiedniego metalu w katalizatorze pozwala również na sterowanie selektywnością reakcji. Od dawna prowadzonych jest wiele

badań w celu opracowania chiralnych katalizatorów, które mogą skutecznie przeprowadzać asymetryczną reakcję epoksydowania. Istnieje jednak wiele problemów dotyczących katalizatorów epoksydacji olefin, w szczególności charakteru utleniacza i wpływu na selektywność produktu [25, 26].

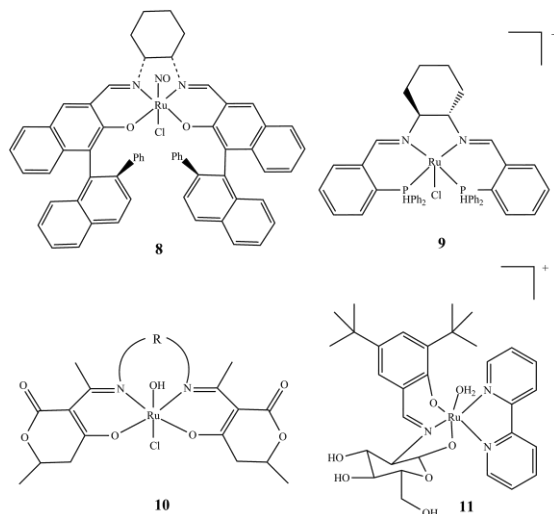
W literaturze możemy znaleźć wzmianki na temat wykorzystania związków kompleksowych manganu(II/III/IV/V), wanadu(V), wolframu(IV) oraz kompleksów żelaza(II/III) i oksyżelaza(IV) [25, 26]. Pojawiają się również doniesienia na temat wykorzystania związków kompleksowych rutenu(II/III) jako katalizatorów.

Jeden z pierwszych katalizatorów tego typu opisał Katsuki [26] wraz ze współpracownikami. Był to związek rutenu(II) zawierającego chiralny tetrakoordynacyjny ligand (N_2O_2) – związek 8 (Rys. 6). Kompleks okazał się być wydajnym katalizatorem do asymetrycznej epoksydacji sprzężonych olefin w obecności różnych utleniaczy. Katalizator w obecności optymalnego utleniacza jest zdolny do uzyskania wysokiej indukcji asymetrycznej niezależnie od użytego rozpuszczalnika. Wydajność reakcji epoksydacji wynosi 64%, a wartość nadmiaru enancjomerycznego (ee) to 75% [20, 26].

Kolejnym przykładem jest nowa rodzina kompleksów rutenu(II) zawierająca tetrakoordynacyjne chiralne ligandy z donorami N_2P_2 – związek 9 (Rys. 6). Jest to pierwszy przykład asymetrycznej epoksydacji przez kompleksy rutenu z wykorzystaniem nadtlenu wodoru jako utleniacza. Wydajność reakcji epoksydacji sprzężonych olefin w przypadku tego kompleksu wynosi 62%, natomiast nadmiar enancjomeryczny wynosi 25% [27].

Przykładem katalizatora, w którym ruten występuje na III stopniu utlenienia może być kompleks zawierający ligand oparty na bazie zasad Schiffa otrzymany poprzez oddziaływanie kwasu dehydrooctowego z różnymi aminami - związek 10 (Rys. 6). Katalizator ten bierze udział w epoksydacji styrenu oraz jego podstawionych pochodnych. Najlepszą wydajność epoksydacji (90%) możemy zaobserwować przy użyciu *N*-tlenku pirydyny jako utleniacza, powoduje on również poprawę wartości nadmiaru enancjomerycznego (18%) [27].

Kolejnym przykładem może być katalizator składający się z rutenu(III) oraz tridentnego, chiralnego liganda opartego na zasadzie Schiffa (TDL*) pochodzącego z kondensacji chiralnej aminy d-glukozowej z 3,5 ditertylobutylosalicylaldehydem – związek 11 (Rys. 6). Wyniki badań nad epoksydacją ujawniły zdolność katalityczną tych związków w procesie epoksydacji niesfunkcjonalizowanych alkenów z wysoką enancjoselektywnością przy zastosowaniu *t*-BuOOH jako utleniacza końcowego. Wydajność reakcji wynosi 84%, a nadmiar enancjomeryczny 42% [28].



Rysunek 6. Przykładowe katalizatory wykorzystywane w katalitycznej epoksydacji olefin [20-26]
 Figure 6. Examples of catalysts used in catalytic epoxidation of olefins [20-26]

Porównując wartości wydajności katalitycznej oraz nadmiaru enancjomerycznego (Tab. 1) można stwierdzić że najbardziej wydajnym katalizatorem epoksydacji jest związek 10, natomiast nadmiar enancjomeryczny wynosi tylko 18%, co oznacza że otrzymany epoksyd wykazują małą czystość optyczną. Natomiast pozostałe związki są mniej wydajnymi katalizatorami, ale wartość nadmiaru enancjomerycznego jest dużo wyższa co oznacza, że z pomocą tych katalizatorów możemy otrzymać czyste optycznie związki. Pomimo kilku doniesień o katalizatorach epoksydacji olefin opartych na jonach rutenu, w świecie nauki dalej istnieje miejsce na syntezę nowych związków tego typu [24].

Tabela 1. Porównanie wydajności epoksydacji oraz nadmiaru enancjomerycznego katalizatorów przedstawionych w rozdziale

Table 1. Comparison of epoxidation efficiency and enantiomeric excess of catalysts presented in the chapter

Katalizator	Wydajność epoksydacji	Nadmiar enancjomeryczny
Związek 8	64%	75%
Związek 9	62%	25%
Związek 10	90%	18%
Związek 11	84%	42%


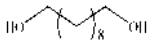

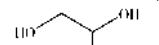
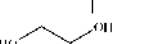
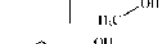
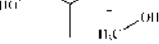


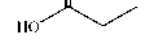
1.4. DEPOLIMERYZACJA

Syntetyczne tworzywa sztuczne stały się podstawowym materiałem funkcjonalnym w niemal każdym aspekcie otaczającego nas świata. Ich wielkotonażowa produkcja wynosi około 368 milionów ton rocznie, a do 2050 roku

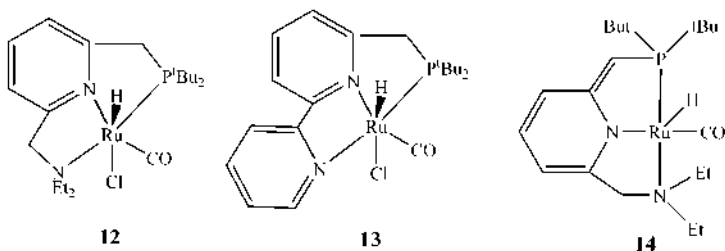
ma wzrosnąć do około 800 milionów ton [29]. Niestety ponad połowa odpadów z tworzyw sztucznych jest składowana na wysypiskach śmieci, a część z nich trafia do oceanów, mórz i jezior, co prowadzi do poważnych problemów środowiskowych, w tym zanieczyszczenia wód gruntowych. Innowacyjnym podejściem jest proces upcyklingu tworzyw sztucznych, który ma na celu przekształcenie odpadów w wartościowe chemikalia np. dodatki do paliw oraz cenne węglowodory w tym monomery i oligomery. Jedną z możliwości jest zastosowanie katalizatorów rutenu(II) w procesie hydrogenolizy tworzyw sztucznych [30]. W tabeli 2 przedstawiono kilka przykładów użycia katalizatorów rutenu(II) (Rys. 7) w procesie depolimeryzacji.

Tabela 2. Katalityczne uwodornianie poliesterów i poliwęglanów przez kompleksy Ru(II)^a

Table 2. Catalytic hydrogenation of polyesters and polycarbonates by Ru(II) complexes

Polimer	Katalizator	Optymalizacja ^b	Rozpuszczalnik	P _{wodoru} [atm]	T [°C]	Produkt	Konwersja [%]	Lit.
	12	100:1:1	Anizol	13,6	120		80	[31]
PET	13	50:1:2	Anizol/THF	54,4	160		>99	[31]
PLA	13	50:1:2	Anizol/THF	54,4	160		>99	[31]
PPC ^c	12/13	100:1:2	Anizol/THF	54,4	160		>99	[31]
PEC ^c	12/13	100:1:2	Anizol/THF	54,4	160		91	[31]
PHB	13	50:1:2	Anizol/THF	54,4	160		88	[31]
P3HP	13	50:1:2	Anizol/THF	54,4	160		90	[31]
poli(węglan bisfenolu A) ^c	14	20:1:0,8	THF	44,41	140		99	[32]
poli(węglan bisfenolu A) ^c	14	20:1:0	THF	44,41	140		95	[32]

^aprekursor katalizatora aktywowany za pomocą KO^tBu przez 5 min. w atmosferze N₂ przed przeniesieniem do reaktora ciśnieniowego zawierającego polimer. Mieszanie reakcyjną ogrzewano przez 48 godzin. ^b Stosunek molowy polimeru:prekursora katalizatora:KO^tBu (aktywator). ^cczas reakcji 24 h.



Rysunek 7. Przykładowe katalizatory rutenu(II) wykorzystywane w procesie depolimeryzacji [31, 32]
 Figure 7. Examples of ruthenium(II) catalysts used in the depolymerization process [31, 32]

Reasumując, badania nad grupą związków kompleksowych zastosowanych jako katalizatory w reakcji depolimeryzacji nie są zbyt rozwinięte. Niemniej jednak, najnowsze doniesienia naukowców są potwierdzeniem, skutecznego użycia związków koordynacyjnych na bazie rutenu(II) z ligandami *N*-, *P*- donorowymi jako prekursorami katalizatorów w procesie depolimeryzacji poliwęglanów, poliestrów oraz poliamidów [32]. Wysoce selektywne rozszczepianie wiązań C-O i C-N w procesie hydrogenolizy jest jednym z najbardziej obiecujących podejść recyklingu chemicznego. Ta strategia prowadzi do bezpośredniego przetwarzania odpadów z tworzyw sztucznych lub ich mieszanek w cenne chemikalia takie jak alkohole, diole i aminy. Jak dotąd, większość zgłoszonych metod wymagało użycia kompleksów metali szlachetnych, których synteza jest kosztowna, przy stosunkowo dużym obciążeniu katalizatora. Jednak obiecujące badania wstępne wskazują na możliwość zastosowania zamienników tj. kompleksów Ru(II), Mn(II) lub Fe(II) [33]. Co więcej, ewentualne użycie takich indywidualów chemicznych w przemyśle wydają się atrakcyjną propozycją ponieważ możliwe jest wyodrębnienie katalizatora z mieszaniny, oczyszczenie oraz jego ponowne użycie - co zmniejsza niewątpliwie koszty procesu. Jednak do tej pory nie udowodniono aktywności katalitycznej związków kompleksowych, czy szkieletów metaloorganicznych (ang. *metal-organic frameworks*, MOFs) w procesie depolimeryzacji poliolefin tj. polietylenu, polistyrenu, polipropylenu lub polichlorku winylu, które są odporne na rozkład enzymatyczny, co stanowi pole do rozwoju badań naukowych [34].

2. WŁAŚCIWOŚCI BIOMEDYCZNE ZWIĄZKÓW RUTENU(II) ORAZ RUTENU(III)

2.1. WIĄZANIE DNA PRZEZ ZWIĄZKI RUTENU(II) ORAZ RUTENU(III)

Sposób wiązania metalofarmaceutyków, w tym kompleksów rutenu(II) lub rutenu(III) z kwasem deoksyrybonukleinowym (DNA) można zilustrować poprzez wgląd w mechanizm działania pomiędzy tymi komponentami [35]. W biologii molekularnej interkalację definiuje się jako proces wprowadzenia płaskich cząste-

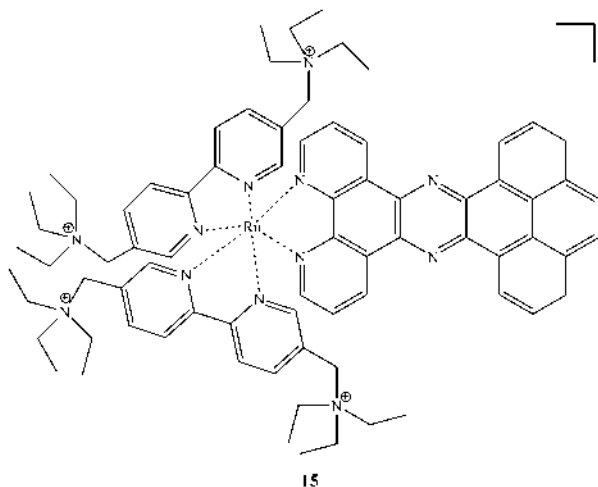
czek o odpowiedniej wielkości i charakterze chemicznym pomiędzy sąsiadujące pary zasad podwójnej helisy DNA, z jednoczesnym rozwijaniem i wydłużaniem helisy. Różnorodność właściwości fizykochemicznych związków koordynacyjnych rutenu(II/III), polimorfizm chemiczny i konformacyjny kwasów nukleinowych oferują dużą liczbę możliwości oddziaływania pomiędzy sobą np. między innymi poprzez wiązanie koordynacyjne. Stabilne addukty składające się z DNA i Ru(II) mogą się tworzyć ze względu na niedobór elektronów na atomach metali oraz nukleofilowy charakter DNA. Dodatkowo, ruten występujący w związkach metaloorganicznych może wiązać się z DNA poprzez interakcję z ligandami aromatycznymi, oddziaływanie między parami zasad DNA, wiązania rowków, rozpoznawanie molekularne na podstawie kształtu i rozmiaru oraz oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe. Interesująca jest możliwość projektowania nowych, skutecznych i selektywnych metalofarmaceutyków, które mogą w ściśle określony sposób oddziaływać z DNA. Efektem wiązania DNA z metalolekami może być zmiana konformacji kwasu deoksyrybonukleinowego – zapewniając tym samym, szereg alternatywnych mechanizmów reakcji dla różnych procesów molekularnych, prowadzących do śmierci komórek nowotworowych [36].

Interesującym przykładem jest oddziaływanie kompleksów Ru(II) z ligandami na bazie polipirydyłu (np. polipirydyna, 1,10-fenantrolina = phen) z DNA. Takie związki koordynacyjne wykazują silne właściwości biologiczne wynikające z ich dużej reaktywności oraz wykazywania potencjału redoks [37]. Sztandarowym przykładem kompleksu rutenu, który oddziałuje z DNA wyłącznie poprzez interkalację jest $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (bpy = 2,2'-bipirydyna, dppz = dipirydofenazyna), który wykazuje luminescencję po związaniu z DNA. Z kolei, kompleks $[\text{Ru}(\text{dppz})_2(\text{pip})]^{2+}$ (pip = 2-fenylimidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina) poprzez oddziaływanie z DNA, hamuje progresję w komórkach nowotworowych. Takie działanie jest możliwe poprzez aktywację replikacyjnych odpowiedzi sygnalizacyjnych i wzrost komórek deregulacyjnych w cyklu komórkowym [37].

Badania Yu i współpracowników [37] udowodniły stabilizację telomerowego DNA poprzez formację kwadrupleksów G, w związku z oddziaływaniem z $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{-idip})]^{2+}$ i $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-idip})]^{2+}$ (5-idip = 2-indol-[4,5-f][1,10]fenantrolina), które uniemożliwiają dostęp telomerazie do biomolekuły, prowadząc do apoptozy. Dalsze badania naukowców ujawniły, że $[\text{Ru}(\text{phen})_2(5\text{-idip})]^{2+}$ indukuje apoptozę w komórkach rakowych linii HeLa (rak piersi). Dowiedziono, że w mechanizmie pośredniczą mitochondria oraz hamowana jest aktywność telomerazy [38].

Wiele leków przeciwnowotworowych i leków przeciwdrobnoustrojowych hamuje transkrypcję DNA. Związek kompleksowy rutenu(II) z polipirydyłowymi

ligandami (Rys. 8) wykazał aktywności podczas hamowania transkrypcji [38]. Kompleks z wysokim powinowactwem interkalował w pary zasad DNA poprzez blokowanie wiązania T7 polimerazy RNA (kwas rybonukleinowy), do matrycy DNA. Jako wydajny inhibitor transkrypcji, związek koordynacyjny wykazał aktywność przeciwnowotworową *in vitro* w stosunku do kilku nowotworowych linii komórkowych: HeLa (rak piersi), Hep-G2 i BEL-7402 (rak wątroby) oraz MCF-7 (rak piersi) [39].



Rysunek 8. Przykład kompleksu rutenu(II), który hamuje polimerazę RNA [39]
Figure 8. An example of a ruthenium(II) complex that inhibits RNA polymerase [39]

Zsyntezowano również dwa związki kompleksowe $[(\eta^6\text{-p-cymen})\text{Ru}(\text{bpm})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (bpm = 2,2'-bipirydyna) i $[(\eta^6\text{-p-cymen})\text{Ru}(\text{phen})\text{Cl}][\text{PF}_6]$, w celu zbadania aktywności hamowania transkrypcji DNA [39]. Wyniki potwierdzają oddziaływanie kompleksów z DNA poprzez wiązania koordynacyjne, niekowalencyjne i oddziaływania interkalacyjne. Hamowanie syntezy RNA przez polimerazę RNA T7 na matrycowym, plazmidowym DNA zawierającym addukty badanych kompleksów arenowych rutenu(II) zbadano elektroforezą żelową [38]. Wyniki wskazują, że synteza RNA na ich matrycy jest przedwcześnie zakończona. Główne miejsca zatrzymania występują wyłącznie w resztach guaniny, dla obu kompleksów arenowych Ru(II) [40].

Kolejnym kompleksem rutenu(II) przebadanym pod kątem interkalacji z DNA jest $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{phpy})(\text{dppz})]^+$ (phpy = 2-fenylopirydyna). Związek rutenu(II) wykazał wysokie powinowactwo do wiązania DNA, czego skutkiem było zahamowanie transkrypcji kwasu nukleinowego [40]. Badanie polegało na porównaniu ilości wytwarzanych mRNA przez polimerazę RNA T7, a ilości kiedy cykl molekularny został przerwany przez czynnik transkrypcyjny, co doprowadziło do zahamowania

transkrypcji komórkowej i apoptozy komórek nowotworowych. Efekty cytotoksyczne $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{phpy})(\text{dppz})]^+$ zostały powiązane z hamowaniem transkrypcji DNA, co skutkowało obniżeniem poziomu genu regulowanego przez czynniki transkrypcyjne [41].

Podsumowując, kompleksy Ru(II/III) z ligandami *N*-donorowymi z powodzeniem oddziałują z DNA, przyczyniając się do śmierci komórek nowotworowych i hamowania aktywności transkrypcji DNA.

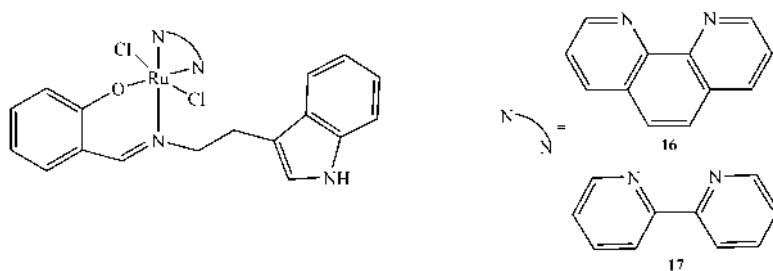
2.2. WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWBAKTERYJNE

W 1952 roku Dwyer i in. [42] opisali swoje pionierskie badania dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej obojętnych kompleksów rutenu(II) z ligandami polipirydyłowymi oraz z koligandami tj. bpy, phen i ich pochodne. Aktywność przeciwbakteryjną tych kompleksów zbadano wobec różnych komórek bakteryjnych, w tym bakterii gram dodatnich, gram ujemnych i bakterii kwasoodpornych. Okazało się, że $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ był nieaktywny wobec wszystkich szczepów bakteryjnych. Natomiast wprowadzenie grupy metylowej do ligandów phen znacznie zwiększyło jego aktywność wobec wszystkich badanych bakterii, co można przypisać wzrostowi lipofilowości. Z kolei, Collins i współpracownicy [43] udowodnili, że kompleks $[\text{Ru}(2,9\text{-Me}_2\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ wykazywał wysoką aktywność bakteriobójczą wobec szczepów *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*. Aktywność przeciwbakteryjna badanych kompleksów rutenu rosła zgodnie z zależnością $\text{dppz} > \text{dpqC} > \text{dpq}$ (dpqC = dipirydo[3,2-a:2',4'-c](6,7,8,9-tetrahydro)fenazyne, dpq = dipirydo[3,2-d:2',3'-f]chinoksalina), co również pokrywa się z kolejnością ich powinowactwa do wiązania DNA. Oprócz badań *in vitro* autorzy przeprowadzili badania *in vivo*. Okazało się, że $[\text{Ru}(2,9\text{-Me}_2\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ był nietoksyczny wobec *Caenorhabditis elegans*, co sugeruje, że nie wykazuje aktywności biologicznej wobec komórek eukariotycznych [43]. Dowodem był eksperyment, w którym związek kompleksowy rutenu(II) zapobiegł śmierci nicieni *Caenorhabditis elegans* zakażonych *S. aureus*. Działanie przeciwdrobnoustrojowe związku rutenu(II) skorelowano z lipofilowym charakterem kompleksu.

Grupa Liao [44] odkryła, że dwa typowe oktaedryczne kompleksy rutenu(II) mogą selektywnie hamować wzrost *Mycobacterium smegmatis*. Wyniki ujawniły, że $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})(\text{PF}_6)_2]$ może znacząco hamować wzrost *Mycobacterium smegmatis* przy wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) wynoszącej 2 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy kompleks $[\text{Ru}(\text{phen})_3](\text{PF}_6)_2$ wykazał mniejszą aktywność bakteriobójczą (MIC = 26 $\mu\text{g/ml}$). Ponadto te dwa kompleksy powinny posiadać różne mechanizmy przeciwdrobnoustrojowe, ponieważ aktywność bakteriobójcza $[\text{Ru}(\text{phen})_3](\text{PF}_6)_2$ była zależna od produkcji reaktywnych form tlenu (ROS). Odkry-

cia te sugerują, że kompleksy rutenu mogą służyć jako innowacyjne, przeciwbakteryjne metalofarmaceutyki.

W 2019 roku grupa Malika [45] zsyntezowała zasadę Schiffa na bazie tryptaminy, a następnie użyto jej jako liganda w syntezie związku 16 i 17 (Rys. 9), używając RuCl_3 jako soli metalu i metanolu jako rozpuszczalnika. Oktaedryczne kompleksy rutenu(III) zostały zbadane pod względem aktywności antibakteryjnych wobec szczepów bakterii gram dodatnich (*S. pneumoniae* i *E. faecalis*) i gram ujemnych (*P. aeruginosa*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* i *E. coli*). Kompleksy wykazały umiarkowany potencjał antibakteryjny (MIC = 250 $\mu\text{g/ml}$). Żaden ze związków chemicznych nie wykazał aktywności wobec *S. enterica* i *K. pneumoniae*. W tabeli 3 przedstawiono szczegółowe dane dotyczące aktywności przeciwbakteryjnej związku 16, 17, liganda oraz cyprofloksacyny, która została użyta jako próba odniesienia [45].



Rysunek 9. Struktury chemiczne 16 i 17 związku kompleksowego rutenu(III) [45]

Figure 9. Chemical structures of 16 and 17 of the ruthenium(III) complex compound [45]

Tabela 3. Działanie przeciwbakteryjne *in vitro* ligandu i jego kompleksów (16 i 17) na niektóre szczepy bakterii. Wyniki przedstawiono jako minimalne hamujące stężenie (MIC) w $\mu\text{g/ml}$

Table 3. *In vitro* antibacterial activity of the ligand and its complexes (16 and 17) on some bacterial strains. The results have been presented as minimum inhibitory concentration (MIC) in $\mu\text{g/mL}$

Związek	<i>P. aurogenosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
16	250	1000	250	250	1000	250
17	250	1000	250	250	1000	250
Zasada Schiffa [44]	1000	1000	>1000	1000	1000	>1000
Cyprofloksacyna	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5	<7,5

Reasumując, metaloleki na bazie jonów Ru(II/III) z ligandami *O*-, *N*-donorowymi mogą skutecznie hamować wzrost *Mycobacterium smegmatis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus* oraz *Bacillus subtilis*.

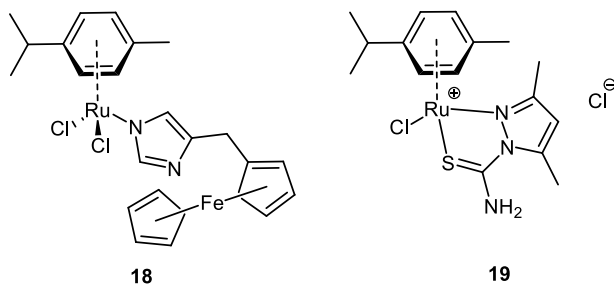
2.3. WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE

Stres oksydacyjny i stany zapalne są często spotykanymi czynnikami leżącymi u podstaw powszechnie występujących chorób przewlekłych, które w istotny sposób obciążają system opieki zdrowotnej w krajach rozwiniętych [46]. Schorzenia te to między innymi choroby nowotworowe (czerniak, rak płuc), neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera lub Parkinsonizm), a także nadciśnienie tętnicze. Ich występowanie wiąże się z procesami utleniania białek, tłuszczów, czy DNA, które generują szereg produktów ubocznych, np. nadtlenków, alkoholi, ketonów i tlenków cholesterolu, które upośledzają transport biomolekuł, szlaki sygnalizacyjne oraz rozregulowują funkcjonowanie enzymów, przyczyniając się do np. uruchomienia przyspieszonego mechanizmu apoptozy zdrowych komórek [47]. Stres oksydacyjny upośledza funkcjonowanie mięśni osób uprawiających sport wyczynowo, co związane jest z aktywnością reaktywnych form tlenu lub azotu i wolnych rodników [48], a także przyspiesza procesy starzeniowe skóry, upośledzając regenerację i odtwarzanie nabłonka, osłabiając naturalną barierę przeciw promieniowaniu UV, równocześnie pogarszając gojenie się ran i obrzęków [49]. Stale poszukuje się nowych środków o właściwościach antyoksydacyjnych, które mogłyby zredukować ryzyko występowania długo- i krótkoterminowych powikłań pojawiających się w przypadku użycia klasycznych środków, bądź terapii, przeciwwzapalnych i przeciwutleniających [46].

Choć pojęcie antyoksydacji najczęściej kojarzy się ze związkami pochodzenia naturalnego, np. glutationem, kwasem askorbowym, czy też kwasem liponowym, to związki oparte na jonach rutenu(II) lub rutenu(III) również wykazują tego typu aktywność biologiczną. Może to wynikać z faktu, że jony rutenu(II) bezpośrednio wpływają na łatwość generowania rodnika wodorowego z otaczających ich ligandów (np. piperydynowych), a tym samym na zmiatanie wolnych rodników [50]. W przypadku jonów rutenu(III), sugeruje się, iż niskospinowa konfiguracja elektronowa orbitalu d^5 w jonie Ru^{3+} oraz obsadzona na nim nieparzysta liczba elektronów wzmacnia zdolność do stabilizacji niesparowanych elektronów, tym samym wymiatając wolne rodniki [51]. Te właściwości układów $Ru(II)$ oraz $Ru(III)$ skłaniają do dalszych badań nad kompleksami tych metali w kontekście poszukiwania nowych antyoksydantów, dzięki czemu poszerzony zostaje wachlarz potencjalnych leków o takim profilu działania. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że związki rutenu mają zdolność do naśladowania jonów żelaza pod kątem wiązania z albuminami, dzięki czemu ulegają rozpuszczeniu i aktywnemu transportowi w osoczu, sugerując, że nie będą ulegać zjawisku depozycji (proces stopniowego przemieszczania się i osadzania) w ustroju, tym samym generując wtórną toksyczność [52].

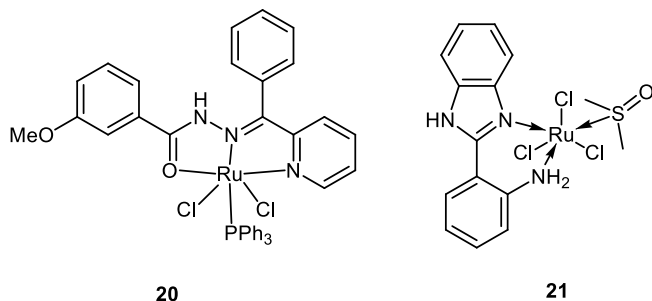
Aktywność przeciwutleniająca związków opartych na jonie Ru(II) została zmierzona na podstawie kolorymetrycznego testu DPPH wykorzystującego 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl, czyli stabilny rodnik nitroksylowy, który w obecności substancji o potencjalnym charakterze antyoksydacyjnym zmienia barwę z ciemnofioletowej na bezbarwną lub bladożółtą, umożliwiając ilościowe określenie aktywności przeciwutleniającej. Kompleksy Ru(II)-cymen, stabilizowane sfunkcjonalizowanymi ligandami opartymi na układzie ferrocenowym (lub fragmentem pozbawionym go) (Związek 18), wykazywały właściwości antyoksydacyjne wyrażone parametrem EC_{50} mieszczącym się w zakresie 2-1282 μM . Zauważono, że do wykazania wyższej aktywności antyoksydacyjnej konieczna jest obecność układu ferrocenowego lub ruchliwego atomu wodoru na atomie azotu w strukturze liganda [50].

Innym przykładem układu opartego na jonie Ru^{2+} jest kompleks Ru(III)-cymen, stabilizowany ligandem karbatioamidopirazolowym (Związek 19) [53]. Pomiar jego aktywności przeciwutleniających został wykonany na podstawie wcześniej wspomnianego testu DPPH, a także metody TPTZ wykorzystującej 2,4,6-tris(piryd-2-ylo)-1,3,5-triazynę w obecności jonów żelaza(III), w której kolorymetrycznie mierzy się stężenie jonów żelaza(II) powstałych w wyniku utlenienia badanego związku wobec wzorca (Trolox). Istotną aktywność przeciwutleniającą wykazywały te pochodne, których ligandy stabilizujące sfunkcjonalizowane były jedynie grupą metylową lub etylową, zaś obecność grupy hydroksylowej jednoznacznie obniżała ten parametr. Przetestowano również wpływ obecności przeciwjonów: anionów chlorkowych lub heksafluorofosforanowych na aktywność antyoksydacyjną. Właściwość ta była wyższa w porównaniu do wartości dla jonów chlorkowych. Najbardziej aktywne związki wykazały inhibicję DPPH na poziomie 30-50%, zaś parametr FRAP, wyliczony na podstawie testu TPTZ, na poziomie 13-30 μM liczone w stosunku do Trolox (równoważnik Troloxu (μM) obliczony na podstawie krzywej kalibracyjnej) [53]. Przykłady wzorów strukturalnych związków kompleksowych opartych na jonie Ru(II) znajdują się na rysunku 10.



Rysunek 10. Przykłady kompleksów Ru(II) wykazujących właściwości antyoksydacyjne [50-53]
Figure 10. Examples of Ru(II) complexes demonstrating antioxidant properties [50-53]

Związki Ru(III) skompleksowane ligandem hydrazonowym oraz koligandem trifenylfosfinowym lub trifenylarsanowym (Związek 20) wykazują lepsze właściwości przeciwutleniające niż referencyjny kwas askorbinowy lub sam ligand hydrazonowy, w warunkach testu DPPH. Wskazuje to na fakt, iż jon Ru(III) odpowiedzialny jest bezpośrednio za te właściwości [50]. Kolejnym przykładem układu zawierającego w swej budowie jony Ru(III) jest konglomerat Ru(III)/2-(1H-benzo[d]imidazo-2-ilo)anilina/DMSO (Związek 21). Kompleks ten został przebadany pod kątem właściwości przeciwutleniających na podstawie generowania wzrostu aktywności wobec następujących protein znajdujących się w surowicy krwi myszy: dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase*, SOD), katalazy (ang. *catalase*, CAT) oraz glutationu (ang. *reduced glutathione*, GSH). Wykazano, że jedynie ten kompleks (pośród samego ligandu oraz odpowiednika zawierającego Ru(II)) obniża stres oksydacyjny oraz podwyższa stężenie enzymów antyoksydacyjnych wzmagających naprawę normalnych komórek, upośledzonych wskutek rakowacenia [54]. Przykłady wzorów strukturalnych związków kompleksowych opartych na jonie Ru(III) znajdują się na rysunku 11.



Rysunek 11. Przykłady kompleksów Ru(III) wykazujących właściwości antyoksydacyjne [50, 54]
 Figure 11. Examples of Ru(III) complexes demonstrating antioxidant properties [50, 54]

Podsumowując, kompleksy Ru(II)-cymen, stabilizowane sfunkcjonalizowanymi ligandami opartymi na układzie ferrocenowym oraz Ru(III)/2-(1H-benzo[d]imidazo-2-ilo)anilina/DMSO są wysoce aktywnymi przeciwutleniaczami.

2.4. WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWE

Choroby nowotworowe to główne czynniki zagrażające życiu ludzkiemu w XXI wieku. W 2020 roku odnotowano 19 300 000 nowych przypadków zachorowań na różne rodzaje raka oraz szacuje się, iż około 10 000 000 osób zmarło na skutek tej choroby. Istnieje stale niezaspokojona potrzeba poszukiwania nowych chemoterapeutyków mogących posłużyć w walce z tym schorzeniem [55]. Istnieje wiele mechanizmów pozwalających na walkę z rakiem i zakładają one między

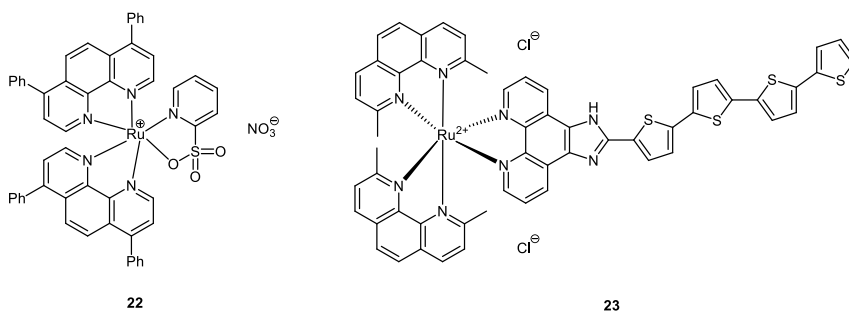
innymi: hamowanie poprawnej proliferacji komórek, metastazy i angiogenezy, indukowanie procesów apoptozy oraz odwrócenie oporności wielolekowej. Efekty te można osiągnąć dzięki dwóm podstawowym typom terapii celowanych wykorzystujących przeciwciała monoklonalne (ang. *monoclonal antibodies*, mAbs) oraz małowcząsteczkowe inhibitory kinaz (ang. *small molecule kinase inhibitors*, SMKIs). Celem tych pierwszych są: proteiny zewnątrzkomórkowe, receptory membranowe oraz białka zakotwiczone w membranach, działając na zasadzie: blokowania wiązania liganda, neutralizowania oddziaływania ligand-receptor oraz internalizacji/degradacji celu molekularnego. Większość SMKIs hamuje kinazy białkowe zaangażowane w transformowanie, wzrost, proliferację oraz przeżywalność komórek rakowych [56].

Związki rutenu(II) oraz rutenu(III) stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych poszukiwań chemoterapeutyków opartych na w tych kationach metali, ze względu na: wysoką stabilność kinetyczną (powolna wymiana liganda), selektywność wobec ligandów *S*- donorowych (w stosunku do znacząco obniżonego powinowactwa wobec ligandów *N*- oraz *O*- donorowych), wysokie powinowactwo do ubogich w tlen komórek nowotworowych utrzymujących niskie wartości pH, naśladowanie jonów żelaza (dzięki temu ulegają podobnemu wiązaniu do białek osocza oraz transportowi w ustroju), a także obniżonej toksyczności wobec zdrowych komórek porównując ze związkami platyny o podobnym profilu działania. Szczególnie obiecującą cechą związków chemicznych opartych na jonach Ru(II) lub Ru(III) jest selektywność wobec hipoksemicznych komórek nowotworowych. Może to w znaczący sposób zredukować skutki uboczne potencjalnych leków ze względu na ograniczoną interakcję ze zdrowymi komórkami, tym samym wyróżniając tego typu układy na tle wielu klasycznych, nieselektywnych leków przeciwnowotworowych [57].

Kompleksy zawierające jon Ru^{2+} oraz ligandy bipirydylowe/1,10-fenantrolinowe i pirydylosulfonianowe (Związek 22) wykazują zdolność do wiązania z DNA w warunkach chemioterapii aktywowanej światłem (ang. *photoactivated chemotherapy*, PACT), czyli metodzie bazującej na fotoaktywacji, której mechanizm, w odróżnieniu od klasycznej terapii fotodynamicznej (ang. *photodynamic therapy*, PDT), jest niezależny od obecności tlenu cząsteczkowego rozproszonego w ustroju [58]. Stanowi ona uzupełnienie klasycznych metod PDT i jest bardziej odpowiednia dla niedotlenionych komórek nowotworowych, często niewrażliwych na radioterapię i chemioterapię, mających skłonność do przerzutów. Metoda ta polega na fotolizie liganda pirydylosulfonianowego ($\lambda = 470 \text{ nm}$) i następczego kowalencyjnego wiązania pozostałej części kompleksu do struktury DNA. Największą aktywność przeciwnowotworową wobec szeregu linii komórek nowotworowych: A549 (rak płuca), SKOV-3 (raka jajnika), HeLa (rak szyjki maci-

cy), SKOV-3/DDP (rak jajnika) oraz A549/DDP (rak płuc), wykazał kompleks zawierający 1,10-fenantrolinę z podstawnikami fenyłowymi, demonstrując wartość współczynnika IC_{50} (wyrażonego w μM), o 2-3 rzędy wielkości niższej niż dla związku referencyjnego — cisplatyny (pomiar bez dostępu światła). Sugeruje się, iż dzięki wysokiej lipofilowości kompleksu 22, jego absorpcja do guza (w warunkach *in vivo*) jest większa, czyniąc go bardziej skutecznym w zwalczaniu nowotworu [58].

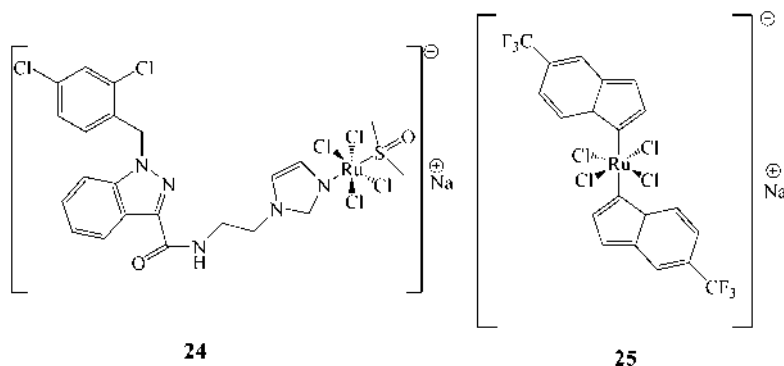
Podobną metodologię opartą na PACT przebadano dla innego kompleksu Ru(II), w którym ligandy stanowiły ponownie układy bipyrydylowe lub 1,10-fenantrolinowe sfunkcjonalizowane grupami metylowymi oraz z dobudowanym fragmentem czterotiofenowym (ang. *quaterthiophene*) (Związek 23), który skłonny jest do fotolizy. Związki te przebadano w warunkach *in vitro* na czterech różnych liniach komórek nowotworowych (A549, B16F10 — czerniak myszy, MCF7 — rak piersi, SKMEL28 — czerniak ludzki) i wykazano, że konglomerat Ru(II)/1,10-fenantrolina/1,10-fenantrolina-czterotiofen jest niezwykle skuteczny wobec linii komórkowej SKMEL28, demonstrując wartość współczynnika EC_{50} na poziomie 170 pM [59]. Wzory strukturalne wyżej wymienionych kompleksów rutenu(II) przedstawiono na rysunku 12.



Rysunek 12. Przykłady kompleksów Ru(II) wykazujących właściwości przeciwnowotworowe [58, 59]
Figure 12. Examples of Ru(II) complexes exhibiting anticancer properties [58, 59]

Związki oparte na kompleksach rutenu(III), w których rolę liganda pełni sfunkcjonalizowana Ionidamina (lek stosowany w leczeniu raka mózgu, demonstrujący zachęcające właściwości przeciwrakowe w warunkach testów *in vitro*) oraz dimetylosulfotlenek (Związek 24), wykazują cytotoksyczność wobec linii komórek nowotworowych (np. A549, MCF-7, SW480 (ludzki gruczolakorak okrężnicy)) na poziomie 6,1-9,6 μM (dla najbardziej obiecującego związku), często przewyższając aktywność referencyjnej cisplatyny oraz Ionidaminy. Sugeruje się, że kompleksy te wprowadzają komórki linii nowotworowej HCT116 (raka jelita grubego) na drogę śmierci komórkowej według mechanizmu apoptozy indukowanej aktywacją kaspaz 3/7 [60]. Aktywność przeciwnowotworowa innych kompleksów

rutenu(III), do których dołączone zostały, funkcjonalizowane grupą trifluorometylową, ligandy pirydynowe, imidazolowe, bądź indazolowe (Związek 25), została określona w warunkach testów *in vitro* na liniach komórek nowotworowych HT-29 (ludzki rak okrężnicy) oraz A549. Związki te wykazały aktywność, wyrażoną parametrem IC_{50} , na poziomie 21 i 24 μM , dla najbardziej obiecującego przypadku. Badanie to pokazało, że lipofilowość liganda jest kluczowa dla tej bioaktywności. Dodatkowo zauważono, że podstawnik trifluorometylowy zwiększa potencjał redukcyjny kompleksu, ze względu na elektronoakceptorowy charakter tego ugrupowania, co może wskazywać na istotność redukcji jonu Ru^{3+} w mechanizmie aktywacji liganda w ustroju, szczególnie z tego względu, iż wartość tego potencjału mieści się w granicach osiągalnych w warunkach fizjologicznych i koncepcja ta jest spójna z tymi wcześniej opracowanymi w literaturze [61]. Wzory strukturalne wcześniej wymienionych kompleksów rutenu(III) zostały przedstawione na rysunku 12.



Rysunek 13. Przykłady kompleksów Ru(III) wykazujących właściwości przeciwnowotworowe [60, 61]
Figure 13. Examples of Ru(III) complexes exhibiting anticancer properties [60, 61]

Podsumowując, Ru(II) z ligandami tj. bipirydył, 1,10-fenantrolina i pirydylsulfonian są wysoce skuteczne w leczeniu rak płuc, jajnika i szyjki macicy. Kompleksy wykazały 3 razy większą cytotoksyczność wobec guzów w porównaniu z cisplatyną. Z kolei, Ru(II)/1,10-fenantrolina/1,10-fenantrolina-czterotiofen jest niezwykle skuteczny wobec czerniaka ludzkiego.

UWAGI KOŃCOWE

Badania poświęcone kompleksom rutenu(II) i rutenu(III) dowodzą szerokiej gamie zastosowań tych indywidualności chemicznych w procesach katalitycznych tj. polimeryzacja, epoksydacja i metateza olefin oraz depolimeryzacja. Kompleksy rutenu wykazują również aktywność biomedyczną ze względu na silne właściwości przeciugrzybiczne, przeciwbakteryjne, antywirusowe, antyoksydacyjne oraz antynowo-

tworowe. Wzrastający problem antybiotykooporności będzie determinował działania naukowców, w celu dalszego intensywnego projektowania metalofarmaceutyków na bazie rutenu(II) i rutenu(III), ze względu na ich selektywne działanie. Dodatkowo badania nad aktywnością metalointerkalatorów mogą prowadzić do poznania nowych interakcji z DNA, które mogą wpłynąć na wysoką aktywność biologiczną tych struktur. Jony rutenu(II/III) są trwałe w środowisku biologicznym dlatego z pewnością jeszcze przeczytamy o interesujących wynikach badań nowych, innowacyjnych związków chemicznych Ru(II/III).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Zhu, L. Cai, Y. Tu, L. Zhang, W. Zhang, *J. Mater. Chem.*, 2022, **10**, 15370.
- [2] Y. Xu, C. Li, S. Lu, Z. Wang, S. Liu, X. Yu, Y. Sun, *Nat. Commun.*, 2022, **13**, 2009.
- [3] K.M. Dawood, K. Nomura, *Adv. Synth. Catal.*, 2021, **363**, 1970
- [4] C. Deraedt, M. d'Halluin, D. Astruc, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2013, **2013**, 4881
- [5] H. Clavier, K. Grela, A. Kirschning, M. Mauduit, S.P. Nolan, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 6786
- [6] T. Matsuo, *Catalysts*, 2021, **11**, 359
- [7] T.P. Montgomery, A.M. Johns, R.H. Grubbs, *Catalysts*, 2017, **7**, 87
- [8] O.M. Ogba, N.C. Warner, D.J. O'Leary, R.H. Grubbs, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 4510
- [9] M. Retajczyk, A. Wróblewska, *Wiad. Chem.*, 2017, **71**, 323
- [10] S.G. Patra, N.K. Das, *Polyhedron*, 2021, **200**, 115096
- [11] G.C. Vougioukalakis, R.H. Grubbs, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 1746
- [12] Y. Zhang, S. T. Diver, *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 3371.
- [13] M Scholl, S Ding, CW Lee, RH Grubbs, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 953
- [14] L.K. Johnson, C.M. Killian, M. Brookhart, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6414
- [15] D.W. Sauter, M. Taoufik, C. Boisson, *Polymers*, 2017, **9**,
- [16] M. Chen, C. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **132**, 1222
- [17] X. Wang, G.-X. Jin, *Chem. Eur. J.*, 2005, **11**, 5758
- [18] K. Nomura, W. Sidokmai, Y. Imanishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2000, **73**, 599
- [19] T.R. Cruz, R.A.N. Silva, A.E.H. Machado, B.S. Lima-Neto, B.E. Goi, V. P. Carvalho, *New J. Chem.*, 2019, **43**, 6220
- [20] R.M. Stoop, A. Mezzetti, *Green Chem.*, 1999, **1**, 39
- [21] P. Zawadzki, W. Czardybon, A. Chrobok, *Wiad. Chem.*, 2017, **70**, 289
- [22] Z. Gross, S. Ini, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 5514
- [23] M. Bressan, A. Morvillo, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 950.
- [24] D. Chatterjee, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 176
- [25] R.M. Stoop, A. Mezzetti, *Green Chem.*, 1999, **1**, 39
- [26] T. Takeda, R. Irie, Y. Shinoda, T. Katsuki, *Synlett*, 1999, **1999**, 1157
- [27] R.I. Kureshy, N.H. Khan, S.H.R. Abdi, P. Iyer, *J. Mol. Catal. A Chem.*, 1997, **124**, 91
- [28] D. Chatterjee, S. Basak, A. Mitra, A. Sengupta, J. le Bras, J. Muzart, *Inorganica Chim. Acta.*, 2006, **359**, 1325
- [29] S. P. áMc Ilrath, *Chem. Comm.*, 2014, **50**, 4884.
- [30] S. Su, L. P. Xiao, X. Che, S. Wang, X. H. Chen, Y. Guo, S. R. Zhai, *ChemSusChem*, 2022, **15**, e202200365.
- [31] C. Wang, O. El-Sepelgy, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2021, **32**, 100547.
- [32] C. Alberti, S. Eckelt, S. Enthaler, *ChemistrySelect.*, 2019, **4**, 12268.
- [33] T. O. Kindler, C. Alberti, J. Sundermeier, S. Enthaler, *ChemistryOpen*, 2019, **8**, 1410.
- [34] Y. Miao, A. von Jouanne, A. Yokochi, *Polymers*, 2021, **13**, 449.
- [35] V. Brabec, J. Kasparkova, *Coord. Chem. Rev.*, 2018, **376**, 75.

- [36] M. R. Gill, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3179.
- [37] J. K. Barton, A. Danishefsky, J. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 2172.
- [38] Q. Yu, Y. Liu, L. Xu, C. Zheng, F. Le, X. Qin, J. Liu, *Eur. J. Med. Chem.* 2014, **82**, 82.
- [39] F. Gao, X. Chen, J. Q. Wang, Y. Chen, H. Chao, J. N. Ji., *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 5599.
- [40] S. Betanzos-Lara, O. Novakova, R. J. Deeth, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, B. Liskova, A. Habtemariam, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2012, **17**, 1033.
- [41] H. Huang, P. Zhang, B. Yu, Y. Chen, J. Yang, L. Ji, H. Chao, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 8971.
- [42] F. P. Dwyer, E. C. Gyarfas, W. P. Rogers, J. H. Koch, *Nature*, 1952, **170**, 190.
- [43] A. Greguric, I. D. Greguric, T. W. Hambley, J. R. Aldrich-Wright, J. G. Collins, *Dalton Trans.*, 2002, **6**, 849.
- [44] G. Liao, Z. Ye, Y. Liu, B. Fu, C. Fu, *C. PeerJ*, 2017, **5**, e3252.
- [45] M. A. Malik, M. K. Raza, O. A. Dar, M. Abid, M. Y. Wani, A. S. Al-Bogami, A. A. Hashmi, *Bioorg. Chem.*, 2019, **87**, 773.
- [46] M. Vasarri, *Mar. Drugs*, 2023, **21**, 26.
- [47] X. Chen, *Neural Regen. Res.*, 2012, **7**, 376.
- [48] J. Kruk, *J. Physiol. Sci.*, 2022, **72**, 19.
- [49] A. Jezierska, A. Sykuła, *Biotechnol. Food Sci.*, 2023, **85**, 34.
- [50] C. Mu, K. E. Prosser, S. Harrypersad, G. A. MacNeil, R. Panchmatia, J. R. Thompson, C. J. Walsby, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 15247.
- [51] S. Kanchanadevi, F. R. Fronczek, V. Mahalingam, *Inorganica Chim. Acta*, 2021, **526**, 120532.
- [52] E. S. Antonarakis, A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2010, **66**, 1.
- [53] E. Namiecińska, M. Grazul, B. Sadowska, M. Więckowska-Szakiel, P. Hikisz, B. Pasternak, E. Budzisz, *Molecules*, 2022, **27**, 468.
- [54] S. A. Elsayed, S. Harrypersad, H. A. Sahyon, M. A. El-Magd, C. J. Walsby, *Molecules*, 2020, **25**, 4284.
- [55] J. Li, R. Wang, J. Gao, *Drug Discov. Ther.*, 2021, **15**, 44.
- [56] H.-Y. Min, H. Y. Lee, *Exp. Mol. Med.*, 2022, **54**, 1670.
- [57] U. Śliwińska-Hill, J. Celmer, *Nowotwory*, 2015, **65**, 517.
- [58] N. Tian, Y. Feng, W. Sun, J. Lu, S. Lu, Y. Yao, Q. Zhou, *Dalton Trans.*, 2019, **48**, 6492.
- [59] H. D. Cole, J. A. Roque III, G. Shi, L. M. Lifshits, E. Ramasamy, P. C. Barrett, S. McFarland, *A.J. Am. Chem. Soc.*, 2022, **144**, 9543.
- [60] I. A. Shutkov, Y. N. Okulova, V. Y. Tyurin, E. V. Sokolova, D. A. Babkov, A. A. Spasov, A. A. Nazarov, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 13468.
- [61] S. W. Chang, A. R. Lewis, K. E. Prosser, J. R. Thompson, M. Gladkikh, M. B. Bally, C. J. Walsby, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 4850.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 lutego 2023 r.

CEMIS

TECH



Firma CEMIS-TECH Sp. z o.o. powstała w celu promowania ekologicznych rozwiązań firm SOAPY-EUROPE i GETINGE na rynku polskim i rynkach Środkowej Europy. Jednakże energiczne poczynania naszego profesjonalnego zespołu, zaowocowały rozszerzeniem działalności na szeroko pojęty segment laboratoryjny.

W chwili obecnej CEMIS-TECH Sp. z o.o. jest wyłącznym i autoryzowanym przedstawicielem w Polsce tak uznanych firm jak CEM Corporation, Syrris Ltd, Teledyne ISCO Inc., ThalesNano Inc. czy MANTECH Inc.



Reaktor mikrofalowy Discover 2.0 firmy CEM Corp.

Ambicją CEMIS-TECH Sp. z o.o. jest dostarczenie Państwu nie tylko zamówionego sprzętu. Nasi specjaliści pomogą w wyborze urządzeń i dostosują ofertę do Państwa specyficznych wymagań aplikacyjnych.

Proponujemy też grupowe lub indywidualne szkolenia w naszym laboratorium aplikacyjnym w Kamp-Lintfort lub w Poznaniu. Ułatwi to Państwu szybkie opracowanie własnych metodyk analitycznych lub przygotowania próbek do analizy.

Wyspecjalizowane biuro serwisowe pomaga w realizacji wymagań instalacyjnych, zapewnia profesjonalne szkolenia poinstalacyjne oraz rzetelną i sprawną obsługę gwarancyjną i pogwarancyjną.

Nie zostaniecie Państwo pozostawieni sami sobie. CEMIS-TECH Sp. z o.o. zaprasza wszystkich użytkowników na kilkudniowe spotkania w formie zbliżonej do sympozjum. Wykłady, zajęcia grupowe, poznanie innych użytkowników, ich sukcesów i problemów oraz dostosowanie tematyki spotkań do problemów zgłaszanych przez Państwa – to niewątpliwie przełomowe i niespotykane podejście w relacjach Użytkownik-Firma.



MARS 6 Synthesis firmy CEM Corp.

CEMIS-TECH Sp.z o.o. organizuje we współpracy z Uniwersytetem Jana Kochanowskiego w Kielcach coroczne Sympozjum na Łysej Górze. Możecie tam Państwo zapoznać się z najnowszymi osiągnięciami polskiej i światowej chemii, a także indywidualnie skonsultować swoje problemy z najwybitniejszymi postaciami polskiej chemii.

Serdecznie zapraszamy do zapoznania się z naszą ofertą i do kontaktu z naszym zespołem.



WYŁĄCZNY AUTORYZOWANY PRZEDSTAWICIEL HANDLOWY I SERWISOWY
W POLSCE, ŚWIATOWYCH PRODUCENTÓW APARATURY LABORATORYJNEJ –
TELEDYNE ISCO INC., CEM CORPORATION, SYRRIS LTD, MANTECH INC.,
SOAPY-EUROPE LTD, ZEULAB, THALESNANO INC.

W szerokiej ofercie naszej firmy znajdują Państwo między innymi:

Systemy chromatograficzne firmy TELEDYNE ISCO Inc.

Urządzenia laboratoryjne firmy CEM Corporation:

- reaktory mikrofalowe
- syntezatory peptydów
- mineralizatory mikrofalowe
- piece muflowe
- analizatory składu

Reaktory i pompy strzykawkowe firmy SYRRIS Ltd.

Analizatory elektrochemiczne firmy MANTECH Inc.

Zmywarki laboratoryjne firmy GETINGE

Inteligentne urządzenia do mycia rąk firmy SOAPY-EUROPE Ltd.

Komory rękawicowe firmy JACOMEX



Serdecznie zachęcamy do kontaktu. Nasi specjaliści pomogą w wyborze urządzeń i dostosują ofertę do Państwa wymagań aplikacyjnych.

Zapraszamy również do korzystania z usług autoryzowanego serwisu.

CEMIS - TECH Sp. z o.o.
ul. Rydygiera 8/24 lok. 1015
01-793 Warszawa

tel. +48 22 412 49 13

www.cemis.tech

cemis@cemis.tech



Reaktor ATLAS firmy Syrris Ltd.



*Mineralizator mikrofalowy BLADE
firmy CEM Corp.*



*Chromatografy CombiFlash EZ Prep
firmy Teledyne ISCO Inc.*



Firma CEMIS-TECH Sp. z o.o. jest wyłącznym autoryzowanym przedstawicielem firm:

CEM CORPORATION



Wszechstronne zastosowanie promieniowania mikrofalowego w laboratorium:

- unikatowe systemy mikrofalowe Mars 6 oraz Blade do roztworzenia w kwasach,
- system do ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganej mikrofalowo – Mars 6,
- zautomatyzowany system ekstrakcji rozpuszczalnikowej – EDGE,
- mikrofalowy piec mułowy Phoenix Black redukujący czas spoielenia nawet o 90%,
- niezawodne suszarki mikrofalowe (SAM 255),
- reaktory mikrofalowe do syntezy związków organicznych (Discover 2.0, Mars 6),
- szybkie i niezawodne mikrofalowe zestawy do syntezy peptydów (Discover Bio, Liberty 2.0, Liberty Blue 2.0, Liberty Prime 2.0),
- synteza peptydów w małej skali (MultiPep1, MultiPep2),
- automatyczne systemy do hybrydyzacji in situ (InsituPro) oraz systemy do trawienia enzymatycznego (DigestPro),
- ultraszybkie analizatory wilgoci i suchej masy (Smart 6 i Smart Q),
- szeroka gama analizatorów tłuszczu i suchej masy (Oracle),
- analizatory białka (Sprint).

TELEDYNE ISCO INC.



Systemy chromatograficzne:

- chromatografy FLASH serii NextGen,
- chromatografy FLASH/prep serii EZPrep,
- chromatografy preparatywne ACCQPrep 150,
- systemy SFC, detektory masowe,
- kolumny chromatograficzne,
- pompy strzykawkowe i chromatograficzne.

SYRRIS LTD

Producent reaktorów wsadowych i przepływowych:



- Atlas HD – zautomatyzowany reaktor wsadowy,
- Orb i Orb Pilot reaktory wsadowe (naczynia o pojemności od 500ml do 50L),
- pompy strzykawkowe Atlas z zaawansowaną techniką dozowania,
- Atlas Cryo Reactor – wysokowydajny, reaktor chłodzący do temperatury nawet -80°C,
- Atlas Potassium 3 Bar Pressure System – reaktor ciśnieniowy do 3 bar,
- Atlas Sodium 200 Bar Pressure – system dla reakcji wysokociśnieniowych (200 bar),
- Reaktory przepływowe Asia, Asia Photochemistry Reactor | Asia Flow Chemistry Syringe Pump.

CEMIS-TECH Sp. z o.o.
ul. Rydygiera 8/24 lok. 1015
01-793 Warszawa

Tel: +48 22 41 24 913
Fax: +48 22 41 68 617

www.cemis.tech
cemis@cemis.tech

THALESNANO INC.**Producent innowacyjnych reaktorów przepływowych:**

- reaktory przepływowe H-Cube do prowadzenia reakcji uwodarniania/ deuterowania bez konieczności stosowania gazu z butli, wytwarzanie wodoru in situ,
- reaktory przepływowe Phoenix - reakcje wysokotemperaturowe nawet do 450°C,
- dodatkowe akcesoria: stacja CatCart Packer, autosampler, automatyczny zmienniacz CatCart, przystawka GasModule do prowadzenia reakcji z innymi gazami,
- bogata oferta ponad 100 mini-reaktorów CatCart z różnymi katalizatorami.

JACOMEX SAS**Francuski producent z ponad 70 letnią tradycją:**

- komór rękawicowych (Glovebox),
- izolatorów.

MANTECH INC.**Innowacyjne urządzenia do monitorowania parametrów wody, ścieków, gleby, żywności w wersjach zautomatyzowanych i manualnych systemów gotowych do pracy:**

- analizatory BZT (seria BOD,) analizatory ChZT – seria PeCOD – bez użycia chromianów,
- zestawy do pomiarów: pH, kwasowość, zasadowość, chlorki, fluorki itd.

SOAPY EUROPE SRL**System mycia rąk zasilany sztuczną inteligencją, oferujący:**

- bezdotykowy proces mycia, pomiar temperatury użytkownika,
- ocenę jakości mycia i raportowane w SoapyWisdom™ (zgodnie z GLP i GMP),
- oszczędność zasobów: wody (95% mniej), mydła (60% mniej), energii oraz ograniczenie ilości ścieków mydlnych trafiających do środowiska,
- rozpoznawanie użytkownika, możliwość zintegrowania z kartą dostępu do pomieszczenia.

W naszej ofercie znajdują Państwo także produkty firm:**LABTECH SRL**

- wysokiej jakości wyparki próżniowe pionowe i diagonalne,
- mieszadła magnetyczne, płyty grzewcze, bloki do mineralizacji próbek,
- cyrkulatory i łaźnie wodne o szerokim zakresie zastosowania,
- generatory wodoru i generatory azotu, wielostanowiskowy reaktor (Xelsius).

Zapraszamy do kontaktu!**Nasi specjaliści pomogą w wyborze.**

CEMIS-TECH Sp. z o.o.
ul. Rydygiera 8/24 lok. 1015
01-793 Warszawa

Tel: +48 22 41 24 913
Fax: +48 22 41 68 617

www.cemis.tech
cemis@cemis.tech

INFORMACJE

MECENASI WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH



Hydrolab to polska firma z ponad 20-letnim doświadczeniem na rynku. Jesteśmy dobrze zorganizowanym, nowoczesnie zarządzanym przedsiębiorstwem.

Produkujemy laboratoryjne demineralizatory, zaprojektowane zgodnie z wytycznymi polskich i europejskich norm, wykorzystując najnowsze technologie oczyszczania wody.

Jesteśmy w stanie zaplanować całą gospodarkę wodną w laboratorium, z pełną dokumentacją kwalifikacyjną.

Hydrolab aktualnie posiada w swojej ofercie ponad sto modeli urządzeń do oczyszczania wody.



Firma CEMIS-TECH Sp. z o.o. powstała w celu promowania ekologicznych rozwiązań firmy SOAPY-EUROPE na rynku polskim i rynkach środkowej Europy. Jednakże energiczne poczynania naszego profesjonalnego zespołu, zaowocowały rozszerzeniem działalności na segment laboratoryjny.

W chwili obecnej CEMIS-TECH Sp. z o.o. jest wyłącznym i autoryzowanym przedstawicielem w Polsce tak uznanych firm jak: CEM Corporation, Teledyne ISCO Inc., Syrris Ltd, JACOMEX SAS, ThalesNano Inc, SOAPY Europe SRL, Mantech Inc., ZUELAB.

Ambicją naszej firmy jest dostarczenie Państwu nie tylko zamówionego sprzętu. Nasi specjaliści pomogą w wyborze urządzeń i dostosują ofertę do Państwa specyficznych wymagań aplikacyjnych. Proponujemy też grupowe bądź indywidualne szkolenia w naszym laboratorium aplikacyjnym w Kamp-Lintfort lub w Poznaniu. Ułatwi to Państwu szybkie opracowanie własnych metodyk analitycznych lub przygotowania próbek do analizy.

CEMIS-TECH Sp. z o.o. organizuje we współpracy z Uniwersytetem Jana Kochanowskiego w Kielcach coroczne Sympozjum na Łysej Górze. Możecie tam Państwo zapoznać się z najnowszymi osiągnięciami polskiej i światowej analityki chemicznej, a także indywidualnie skonsultować swoje problemy z najwybitniejszymi postaciami polskiej chemii.

Uroczyste wręczenie Medalu PTChem im. Bogusławy i Włodzimierza Trzebiatowskich Pani profesor Annie Trzeciak z Uniwersytetu Wrocławskiego

Dnia 27 marca na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego odbyło się uroczyste wręczenie Medalu PTChem im. Bogusławy i Włodzimierza Trzebiatowskich Pani prof. dr hab. Annie Trzeciak z Uniwersytetu Wrocławskiego (UWr). Pani Profesor Trzeciak z uwagi na inne obowiązki zawodowe nie mogła odebrać Medalu osobiście podczas 64 Zjazdu Naukowego PTChem, który odbył się w Lublinie w dniach 11-16 września 2022 roku. Uroczystość wręczenia Medalu we Wrocławiu została zorganizowana przez Oddział Wrocławski PTChem, reprezentowany przez Przewodniczącą Oddziału dr. hab. inż. Tomasza Olszewskiego, prof. PWr oraz Wiceprzewodniczącą Oddziału dr. hab. Mariolę Kuczer i dr. Barbarę Łydźba-Kopczyńską Członka Zarządu Oddziału Wrocławskiego PTChem, we współpracy z Dziekanem Wydziału Chemii UWr, dr. hab. Sławomirem Berskim, prof. UWr. Na uroczystość przybili także Prorektor ds. finansów i rozwoju UWr prof. dr. hab. Robert Wieczorek oraz Prodziekan ds. innowacji i rozwoju (WCh UWr) dr. hab. Marcin Sobczyk, prof. UWr. Ponadto uroczystość zaszczycili swoją obecnością Pani Prezes Prezydium Zarządu Głównego PTChem prof. dr. hab. Izabela Nowak oraz Członek Prezydium Zarządu Głównego PTChem prof. dr. hab. Rafał Latajka.

Po przywitaniu gości przez dr. hab. Mariolę Kuczer, Dziekana Wydziału Chemii dr. hab. Sławomira Berskiego, prof. UWr oraz Prorektora ds. finansów i rozwoju UWr prof. dr. hab. Roberta Wieczorka nastąpiło przedstawienie historii Medalu im. Trzebiatowskich przez dr. hab. inż. Tomasza Olszewskiego, prof. PWr. Dr. Olszewski powiedział: *„Medal Polskiego Towarzystwa Chemicznego imienia Bogusławy i Włodzimierza Trzebiatowskich jest przyznawany od 2017 roku i przyznaje się go za wybitne osiągnięcia naukowe w zakresie chemii nieorganicznej. Na medalu z posrebrzanego brązu wybita jest po jednej stronie podobizna Bogusławy Jeżowskiej-Trzebiatowskiej, rok jej urodzenia i śmierci (1908-1991) oraz logo PTChem, a po drugiej – podobizna Włodzimierza Trzebiatowskiego, rok jego urodzenia i śmierci (1906-1982) oraz logo PTChem. Do medalu dołączony jest dyplom. Medal zwyczajowo wręczany jest na Zjeździe Naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Dzięki uprzejmości Pani Agnieszki Płóciennik, Dyrektora Biura Zarządu Głównego PTChem oraz Pana profesora Rafała Latajki Członka Prezydium Zarządu Głównego PTChem udało mi się ustalić, że wniosek o ustanowienie Medalu im. Trzebiatowskich został złożony przez Oddział Wrocławski w 2008 roku. Na posiedzeniu Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które odbyło się dnia 16 czerwca 2008 roku w Warszawie wniosek ten przedstawił profesor Florian Pruchnik, z Uniwersytetu Wrocławskiego, ówczesny Przewodniczący Oddziału Wrocławskiego. Zgodnie z protokołem z tego posiedzenia, wniosek został przyjęty większością głosów a Medal miał być przyznawany za wybitne osiągnięcia z zakresu chemii, fizyki i technologii materiałów. Projekt Medalu został zamówiony i wykonany w pracowni Medalierstwa i Małej Formy Pana Jacka Dworskiego. Realizacja zakończyła się 31 maja 2010 roku. Następnie, Medal został wybity w mennicy w 2010 roku. Kolejna wzmianka o Medalu pochodzi z dnia 9 maja 2016 roku. W tym dniu w Warszawie miało miejsce posiedzenie Zarządu Głównego PTChem, na którym Profesor Rafał Latajka przedstawił wniosek z prośbą Oddziału Wrocla-*

wskiego o powrót do rozpatrywania i zatwierdzenia zakresu merytorycznego Medalu im. Trzebiatowskich. Jak wynika z protokołu tego posiedzenia, w trakcie dyskusji, na wniosek ówczesnego Prezesa PTChem profesora Jerzego Błażejowskiego ustalono, że Medal powinna przyznawać ogólnopolska Komisja Wyróżnień i Medali Polskiego Towarzystwa Chemicznego a sam Medal powinien zostać włączony do puli Medalii przyznawanych przez PTChem i wręczanych na dorocznych Zjazdach Naukowych Towarzystwa. Ostatnia wzmianka dotycząca historii ustanowienia Medalu im. Trzebiatowskich pochodzi z dnia 5 grudnia 2016 roku. W tym dniu w budynku H14 Politechniki Wrocławskiej odbyło się posiedzenie Prezydium i Zarządu Głównego PTChem. Posiedzenie to było bezpośrednio związane z przygotowaniem do organizacji przez Oddział Wrocławski w 2017 roku 60 Zjazdu Naukowego PTChem a Przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego był profesor Rafał Latajka. Na tym posiedzeniu podjęto dwie ważne dla historii Medalu im. Trzebiatowskich uchwały: mianowicie Uchwałę numer 4 z dnia 5 grudnia 2016 roku o zmianie zakresu merytorycznego przyznawania Medalu im. Trzebiatowskich, Medal miał być przyznawany za wybitne osiągnięcia z zakresu chemii nieorganicznej (w takiej formie funkcjonuje on do dziś), oraz uchwałę numer 5 z dnia 5 grudnia 2016 roku o jednorazowym wydłużeniu terminu składania wniosków o Medal do 28 lutego 2017 roku (zwyczajowo wnioski o Medale i wyróżnienia PTChem składa się w terminie do 1 października roku poprzedzającego przyznanie wyróżnienia lub medalu). Zmiana terminu składania wniosków o Medal im. Bogusławy i Włodzimierza Trzebiatowskich pozwoliła na przyznanie po raz pierwszy tego zaszczytnego Medalu właśnie w 2017 roku we Wrocławiu podczas 60 Zjazdu Naukowego PTChem. Pierwszym laureatem Medalu im. Bogusławy i Włodzimierza Trzebiatowskich został profesor Henryk Kozłowski. W roku 2021 Medal ten otrzymał prof. Piotr Sobota. [...] Jest mi niezmiernie miło widzieć dzisiaj tak wielu znakomitych gości Pana Dziekana Wydziału Chemii UWr, dr. hab. Sławomira Berskiego, prof. UWr, Pana Prorektora UWr prof. dr. hab. Roberta Wieczorka, Panią Prezes PTChem profesor Izabelę Nowak, Laureata Medalu Pana prof. Piotra Sobotę, współpracowników Laureatki oraz wszystkich Państwa, którzy z nami dzisiaj jesteście w tym uroczystym dniu.”

Następnie zebrani goście wysłuchali laudacji Laureatki Medalu. Działalność naukową Laureatki przedstawiła dr hab. Alina Bieńko, prof. UWr. Dr Bieńko powiedziała: „Działalność naukową Pani Prof. Anna Trzeciak prowadzi w ramach Zespołu Katalizy i Chemii Koordynacyjnej, którego jest kierownikiem. Specjalnością naukową Pani Profesor jest chemia koordynacyjna i kataliza z udziałem związków metali i nanocząstek metali. W swojej pracy koncentruje się głównie na badaniach struktury metaloorganicznych kompleksów rodu i palladu, ich aktywności katalitycznej w reakcjach hydroformylacji, izomeryzacji i uwodornienia związków nienasyconych. W tej dziedzinie opublikowała ponad 195 prac, z których wiele jest często cytowanych w literaturze. O uznaniu Pani Prof. Trzeciak w świecie międzynarodowej nauki świadczy wysoki indeks Hirscha równy 34, właściwy dla szeroko rozpoznawalnych badaczy. Na szczególne podkreślenie zasługuje wyróżniająca działalność Pani Profesor w obszarze organizacji nauki. Po utworzeniu w 1995 roku Wydziału Chemii UWr została koordynatorem programu SOCRATES. Działalność ta pozwoliła na rozwinięcie w tej jednostce naukowo-dydaktycznej kształcenia studentów zagranicznych. W latach 1999–2005 pełniła funkcję pełnomocnika Dziekana ds. studiów doktoranckich i zagranicznych. W latach 2005–2012 była Prodziekanem Wydziału

Chemii UW r. ds. naukowych i współpracy z zagranicą, a w 2012 roku została wybrana Dziekanem tego Wydziału pełniąc tę funkcję aż do 2020 roku. Jest również Kierownikiem Zakładu Chemii Nieorganicznej. Ponadto jest Członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Komisji Katalizy i Fizykochemii PAN, członkiem Royal Society of Chemistry oraz American Chemical Society. W latach 2013-2020 była Członkiem Zarządu Europejskiego Towarzystwa Chemicznego (EuChemS) oraz Przewodniczącą Sekcji Chemii Nieorganicznej EuChemS. Za swoje osiągnięcia naukowe i dydaktyczne była nagradzana nagrodami Ministra Edukacji Narodowej (1981, 1982, 1986), Sekretarza Naukowego PAN (1983) oraz wielokrotnie nagrodami Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego.”

Działalność dydaktyczną przedstawił dr hab. Marcin Sobczyk, prof. UW r. Pan dr Sobczyk powiedział: *„Lista pełnionych funkcji na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego przez Panią Profesor Trzeciak jest bardzo długa i świadczy o Jej ogromnym zaangażowaniu, w którym umiejętnie łączy od blisko 27 lat, działalność naukową, dydaktyczną z organizacyjną. Pani Profesor pełniła między innymi funkcje Wydziałowego Koordynatora programu Erasmus, Pełnomocnika Dziekana ds. studiów doktoranckich i współpracy z zagranicą, Prodziekana Wydziału Chemii ds. naukowych, i Dziekana Wydziału Chemii. Od przejścia na emeryturę prof. Józefa Ziółkowskiego w 2004 roku Pani Profesor Anna Trzeciak łączy funkcje kierownika Zespołu Naukowego Katalizy i Chemii Koordynacyjnej oraz Zakładu Dydaktycznego Chemii Nieorganicznej. Dzisiaj, kiedy w Polsce i w Europie dużo mówi się o Zielonym Ładzie, konieczności budowania tak zwanego Przemysłu 4.0, czyli przemysłu opartego na ekologicznym podejściu do syntezy, a termin Zielona Chemia jest odmieniany przez wszystkie przypadki, działalność Pani Profesor Trzeciak w latach 90 ubiegłego wieku znacznie wyprzedza obecne czasy. Była to działalność, którą można określić przewidywaniem przyszłości jako podejście do rzutowania przyszłych trendów. W latach 90 XX wieku na Wydziale Chemii otwierany jest kierunek studiów Chemia Środowiska, w którego powstanie angażuje się Prof. Trzeciak. W 1995 roku ukazuje się monografia Jej autorstwa pt. „Wstęp do chemii nieorganicznej środowiska”. Do programów studiów chemicznych wprowadzony jest przedmiot Zielona chemia, a wreszcie w 2022 roku kierunek studiów Zielona chemia, w prace nad którym Pani Profesor Trzeciak poświęciła dużo czasu i energii. Pani Profesor Trzeciak wypromowała kilkudziesięciu magistrów chemii i kilkunastu doktorantów, z którymi do dziś jest w stałym kontakcie.”*

Współpracę naukową Laureatki przedstawiła prof. dr hab. Grażyna Stochel z Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Po zakończeniu laudacji Pani prof. Anna Trzeciak otrzymała Medal PTChem im. Bogusławy i Włodzimierza Trzebiatowskich z rąk Pani Prezes ZG PTChem prof. Izabeli Nowak. Następnie Laureatka wygłosiła wykład naukowy zatytułowany „Katalizatory palladowe - molekularne czy nanocząstkowe?”. Ponadto uczestnicy uroczystości mieli możliwość wysłuchania drugiego wykładu naukowego wygłoszonego przez dr. Adama Augustyniaka z UW r i zatytułowanego „Od sieci metaliczno-organicznych MOF ku materiałom węglowym - wschodzące gwiazdy katalizy”.

Następnie została przedstawiona informacja o programie „Każdego dnia tworzymy historię chemii” zainicjowanym przez dr Barbarę Łydzbę-Kopczyńską i wspólnie realizowanym z Panią dr hab. Mariolą Kuczer z UW. Cele projektu zreferował Prodziekan ds. innowacji i rozwoju (WCh UW) dr hab. Marcin Sobczyk, prof. UW mówiąc: *„Celem projektu „Każdego dnia tworzymy historię Chemii” jest upowszechnienie wśród pracowników, doktorantów i studentów wydziału Chemii UW wiedzy o osiągnięciach pracowników Wydziału i wieloletnich tradycjach naukowych kontynuowanych przez kolejne pokolenia badaczy. Wszystkie te wydarzenia stanowią bogatą historię i tradycję Wydziału, która powinna być kultywowana. Promowanie tej wiedzy wśród społeczności akademickiej przyczynia się do zwiększenia postrzegalności Wydziału i budowania jego wizerunku wśród polskich uczelni na arenie krajowej i międzynarodowej wśród uczelni partnerskich zaangażowanych w projekty międzynarodowe realizowane z UW. Budowanie świadomości tradycji i osiągnięć wrocławskich chemików ma wpływ na podniesienie prestiżu i renomy uczelni wśród studentów oraz pozycji w rankingach uczelni akademickich najchętniej wybieranych przez absolwentów szkół średnich i studentów. Jednym z elementów tego projektu jest stworzenie galerii poświęconej naukowcom związanym z Wydziałem Chemii UW, którzy zostali nagrodzeni Medalami PTChem, uhonorowani tytułem Honoris Causa oraz zostali wybrani przez społeczność akademicką do pełnienia funkcji rektorskich na UW (...). Historia Instytutu Chemii a następnie Wydziału to również historia życia akademickiego i naukowego Wrocławia wyrażana poprzez prowadzone tutaj badania, organizację licznych spotkań naukowych, szkół i konferencji krajowych i międzynarodowych z wieloletnią tradycją, uroczystości łączących nauczycieli akademickich, pracowników wydziału, doktorantów i studentów (...). Potrzeba zatrzymania wspomnień tych wydarzeń i podzielenia się nimi z kolejnymi generacjami wrocławskich chemików stała się motywacją do podjęcia kolejnego zadania w ramach wspomnianego już projektu. Jest nim stworzenie albumu zarówno w formie tradycyjnej jak i elektronicznej zatytułowanego „Historia Wydziału Chemii UW zapisana w obrazach” opartego na dokumentacji fotograficznej wydarzeń związanych z historią Wydziału Chemii UW, począwszy od stworzenia Instytutu Chemii UW, (...) powstania Auditorium Chemii wpisanego w roku 2012 do rejestru zabytków, jako wartościowe dzieło architektury późnego modernizmu (...) aż do dziś oraz Planów Nowej Chemii.”*

Spotkanie zakończyło otwarcie galerii portretów pracowników Wydziału Chemii UW nagrodzonych Medalami PTChem powstałej z inicjatywy dr hab. Marioli Kuczer, Wiceprzewodniczącej Oddziału oraz dr Barbary Łydzby-Kopczyńskiej z UW, Członka Zarządu Oddziału Wrocławskiego PTChem. Uroczystego otwarcia galerii dokonali wspólnie Pani Prezes Prezydium Zarządu Głównego PTChem prof. dr hab. Izabela Nowak oraz Dziekan Wydziału Chemii UW, dr hab. Sławomir Berski, prof. UW. Na przestrzeni lat niemal dwudziestokrotnie przyznano medal PTChem pracownikom Wydziału Chemii UW. Medal im. Bogusławy i Włodzimierza Trzebiatowskich w 2017 roku został nadany Prof. Henrykowi Kozłowskiemu, następnie w roku 2021 jego laureatem został Prof. Piotr Sobota a następnego roku Medal został przyznany Pani Profesor Annie Trzeciak. Wśród laureatów Medalu im. Jędrzeja Śniadeckiego przyznawanego chemikowi pracującemu w Polsce za wybitne osiągnięcia naukowe o światowym znaczeniu w chemii, czterokrotnie znaleźli się

przedstawiciele Chemii UW: w 1986r nagrodzono Prof. Lucjana Sobczyka, w 1988 roku Prof. Bogusławę Trzebiatowską. W 2014 roku medal przyznano Prof. Cyryłowi L. Latosowi-Grażyńskiemu a w 2022 roku medal został nadany prof. Henrykowi Kozłowskiemu. Natomiast laureatami Medalu im. Jana Zawidzkiego przyznawanego za wybitne osiągnięcia naukowe w zakresie chemii fizycznej zostali: Prof. Lucjan Sobczyk w 1979 oraz Prof. Aleksander Koll w 2007 r. W roku 2020 Prof. Zbigniew Szewczuk za wybitne osiągnięcia naukowe w zakresie chemii organicznej został nagrodzony Medalem im. Stanisława Kostaneckiego. Dostrzeżone i docenione zostały również działania pracowników Wydziału Chemii UW intensywnie wspierających działalność Polskiego Towarzystwa Chemicznego zarówno w kraju i za granicą. Medal Okolicznościowy a od 2007 roku - Medal 75-lecia Towarzystwa został przyznawany dwukrotnie Prof. Ignacemu Siemionowi w 1998 i 2011. Następnie w 2003 r. medal przyznano Prof. Józefowi Ziółkowskiemu, w 2014 uhonorowany został Prof. Henryk Kozłowski. Kolejnym laureatem medalu w 2017 roku został Prof. Florian Pruchnik, dwa lata później w 2019 roku - Prof. Zdzisław Latajka a w roku 2022 medal przyznano Prof. Henrykowi Ratajczakowi. Polskie Towarzystwo Chemiczne przykłada również ogromną uwagę do pracy dydaktycznej i wychowawczej wspierającej młodych adeptów nauk chemicznych. W roku 2013 Pani dr Ludmiła Szerenberg z Wydziału Chemii UW została nagrodzona Medalem imienia Zofii Matysikowej przyznawanym nauczycielom chemii, członkom Polskiego Towarzystwa Chemicznego, za wybitne osiągnięcia dydaktyczno-wychowawcze.

Uroczystość zakończyła część nieformalna, podczas której na gości czekał poczęstunek oraz rozmowy z Laureatką i pozostałymi uczestnikami spotkania.

Prof. PWr dr hab. inż. Tomasz Olszewski
Politechnika Wroclawska, Katedra Chemii Fizycznej i Kwantowej, Wydział Chemiczny

dr hab. Mariola Kuczer
Uniwersytet Wroclawski, Zakład Chemii Organicznej, Wydział Chemii

Prof. UW dr Barbara Łydzba-Kopczyńska
Uniwersytet Wroclawski, Laboratorium Badań Dziedzictwa Kulturowego,
Zakład Analityki Stosowanej, Wydział Chemii

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPISMIĘ „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne wartościowe materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkowa ofertę Wydawnictwa stanowi seria, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, gdzie publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informacje na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” wydawane są zarówno w wersji drukowanej jak i elektronicznej. Wersja elektroniczna udostępniana jest bezpłatnie w Internecie.

Czasopismo jest indeksowane/abstraktowane w kilku bazach danych: Chemical Abstracts, Polska Bibliografia Naukowa, BazTech, Polska Bibliografia Lekarska, Index Copernicus, Baza ARIANTA.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.

- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216_MNISW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czasopisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.
- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. stron nadliczbowych tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej- kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”.

Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również za strony drukowane w kolorze (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).

- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.

- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, nie numerujemy działów: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane.

Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych).

- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).

- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.

- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).

- Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:

- tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
- pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
- pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
- spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

- Kolejne strony pracy powinny zawierać:

- notki o autorach pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji),

- obszernie streszczenie pracy w języku angielskim (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz słowa kluczowe – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy haseł przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,

- wykaz stosowanych skrótów – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać

i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI

– selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor),

– dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.

- Tabele, rysunki, fotografie

Tabele i rysunki powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczotki) dołączone w postaci osobnych plików zapisanych w formacie pdf, doc, jpg, tiff.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.

- Piśmiennictwo cytowane

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku artykułów z czasopism tradycyjnych, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, 61, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, 51, 3.

W przypadku książek najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.

[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-

20]. Dostępny w Internecie: <http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać jeden plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);
- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szrotki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie stron, które w formie druku mają być kolorowe. Brak tej czynności będzie skutkowało czarno-białym wydrukiem wersji papierowej. W przypadku zmian w wersji drukowanej kolorowych rysunków na czarno-białe, prosimy o przesłanie dostosowanych do tego celu rysunków.

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: czasopisma@ptchem.pl, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Paweł KAFARSKI: Profesorowi Czesławowi Wawrzeńczykowi w 80. rocznicę urodzin	401
Patrycja LEDWOŃ, Michał JEWGIŃSKI, Rafał LATAJKA: Peptydy i peptydomimetyki jako inhibitory tyro- zynazy	411
Alicja WZOREK, Magdalena KWIATKOWSKA, Mariusz URBANIAK, Barbara GAWDZIK: Proces samo- dysproporcjonowania enancjomerów podczas chromatografii kolumnowej	425
Anna CHOJNACKA, Natalia NIEZGODA: Enzymatyczne i chemiczne modyfikacje fosfolipidów	449
Monika DYMARSKA, Dagmara FILIP, Martyna PERZ, Tomasz JANECZKO, Edyta KOSTRZEWA-SUSŁOW: Dihydrochalkony jako naturalna alternatywa dla obecnie stosowanych słodzików.....	479
Witold GŁADKOWSKI: Otrzymywanie i właściwości biologiczne racemicznych i optycznie czynnych la- ktonów z pierścieniem aromatycznym w pozycji β	509
Marcelina MAZUR: Synteza oraz aktywność antyfidantna laktonów	533
Teresa OLEJNICZAK: Synergiczne działanie flukonazolu i laktonów ftalidowych jako czynnik ogranicza- jący stosowanie leków azolowych w leczeniu kandydoz	555
Kacper POBŁOCKI, Marta PAWLAK, Juliusz WALCZAK, Joanna DRZEŹDŻON, Dagmara JACEWICZ: Wła- ściwości katalityczne i biomedyczne związków zawierających jony rutenu(II) oraz ru- tenu(III).....	569
CEMIS-TECH	597
Informacje	603