

dr Monika Kalinowska

Politechnika Białostocka

Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska

Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii

ul. Wiejska 45A

15-351 Białystok

Załącznik 2A

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

w języku polskim

Białystok, 2018

I. IMIĘ I NAZWISKO: Monika Kalinowska

Adres służbowy

Politechnika Białostocka
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii
ul. Wiejska 45A
15-351 Białystok
tel. 667 972 217
e-mail: m.kalinowska@pb.edu.pl

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 07.2002 Tytuł magistra chemii
Uniwersytet w Białymstoku, Wydział Biologiczno-Chemiczny
Kierunek: chemia
Tytuł pracy magisterskiej: *Kompleksowe badanie związków ekstrahowanych z tkanek roślin metodami GC i GC-MS*
Promotor: prof. Valery Isidorov
- 12.2008 Stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk chemicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Chemii
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Fizykochemiczne i mikrobiologiczne badania wybranych aromatycznych kwasów karboksylowych i ich kompleksów z metalami*
Promotor: prof. zw. dr hab. Włodzimierz Lewandowski

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Okres zatrudnienia	Stanowisko	Instytucja
2003 – 2009	asystent	Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska, Katedra Chemii, Zakład Chemii
2006 – 2007	asystent	Państwowa Wyższa Szkoła Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży, Instytut Technologii Żywności
2009 – obecnie	adiunkt	Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska, Katedra Chemii /Zakład Chemii/Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii

IV. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA (PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA)

- Współautorstwo w 36 publikacjach z listy filadelfijskiej
- Współautorstwo w 6 publikacjach w czasopismach naukowych nieposiadających współczynnika IF
- Współautorstwo w 18 rozdziałach w monografiach
- Współautorstwo w 40 komunikatach na konferencjach międzynarodowych (zawsze z wystąpieniem lub posterem),
- Współautorstwo w 21 komunikatach na konferencjach krajowych
- Uczestnictwo w 7 projektach badawczych (grantach MNiSW lub NCN), w tym kierownictwo w 2 projektach
- Recenzowanie 13 prac w czasopismach z listy filadelfijskiej
- Promotor 13 prac dyplomowych (magisterskich lub inżynierskich)

Sumaryczny impact factor według Journal Citation Reports **IF= 89,296**
(zgodnie z rokiem publikowania)

Sumaryczny impact factor publikacji wchodzących w skład postępowania
habilitacyjnego **IF= 24,434** (zgodnie z rokiem publikowania)

Całkowita liczba cytowań według bazy Web of Science (bez autocytowań): **448**

Indeks Hirscha według Web of Science: **12**

V. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART.16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz.U. Nr 65, Poz. 595 ze zm.)

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Jednotematyczny cykl publikacji zatytułowany:

BADANIA SPEKTROSKOPOWE, STRUKTURALNE ORAZ BIOLOGICZNE WYBRANYCH KOMPLEKSÓW METALI ZE ZWIĄZKAMI FENOLOWYMI POCHODZENIA NATURALNEGO

5.2. Spis publikacji będących podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego

H1. M. Kalinowska, B. Laderiere, P. Champagne, M. Kowczyk-Sadowy, W. Lewandowski, „Mn(II), Cu(II) and Cd(II) *p*-coumarates: FT-IR, FT-Raman, ¹H and ¹³C NMR and thermogravimetric studies”, *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 103 (2013) 264-271. *

IF₂₀₁₃=2,129**

H2. M. Kalinowska, L. Mazur, J. Piekut, Z. Rzączyńska, B. Laderiere, W. Lewandowski, „Synthesis, crystal structure, spectroscopic properties and antimicrobial studies of zinc(II) complex of *p*-coumaric acid”, *Journal of Coordination Chemistry*, 66 (2013) 334-344. *

IF₂₀₁₃=2,224

H3. M. Kalinowska, J. Piekut, A. Bruss, C. Follet, J. Sienkiewicz-Gromiuk, R. Świśłocka, Z. Rzączyńska, W. Lewandowski, „Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H, ¹³C NMR, UV/VIS), thermogravimetric and microbiological studies of Ca(II), Mn(II), Cu(II), Zn(II) and Cd(II) complexes of ferulic acid”, *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 122 (2014) 631-638. *

IF₂₀₁₄=2,353

H4. E. Regulska, M. Kalinowska, S. Wojtulewski, A. Korczak, J. Sienkiewicz-Gromiuk, Z. Rzączyńska, R. Świśłocka, W. Lewandowski, „Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H and ¹³C NMR), thermogravimetric and theoretical studies of gentisic acid and sodium, copper(II) and cadmium(II) gentisates”, *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 132 (2014) 713-725.

IF₂₀₁₄=2,353

H5. M. Kalinowska, L. Mazur, E. Regulska, A. Korczak, G. Świdorski, W. Lewandowski, “Calcium complex of 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid): synthesis, crystal structure, and spectroscopic properties”, *Journal of Coordination Chemistry*, 69 (2016) 2415-2421. *

IF₂₀₁₆= 1,795

H6. M. Kalinowska, L. Mazur, A. Jabłońska-Trypuć, W. Lewandowski, “A new calcium 2,5-dihydroxybenzoate: Synthesis, characterization and antioxidant studies and stress mediated cytotoxicity in MCF-7 cells”, *Journal of Saudi Chemical Society*, 22 (2018) 742-756. *

IF₂₀₁₈=2,456

* Oznaczone publikacje powstały w ramach realizacji grantów, których byłam kierownikiem (tj. nr 2013/11/D/NZ9/02774 lub nr N N305 384538).

** IF podawany zgodnie z rokiem ukazania się publikacji. W przypadku artykułów opublikowanych w roku 2018 podano IF czasopism z roku 2017.

H7. E. Bajko, **M. Kalinowska**, P. Borowski, L. Siergiejczyk, W. Lewandowski, "5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity", *LWT - Food Science and Technology* 65 (2016) 471-479. *

IF₂₀₁₆=2,329

H8. **M. Kalinowska**, A.M. Wróblewska, K. Gryko, „Kwasy chlorogenowe w produktach naturalnych oraz ich właściwości antyutleniające i przeciwdrobnoustrojowe”, *Przemysł Chemiczny* 96 (11) (2017) 2259-2264. *

IF₂₀₁₇=0,399

H9. **M. Kalinowska**, E. Bajko, M. Matejczyk, P. Kaczyński, B. Łozowicka, W. Lewandowski, "The study of anti-/pro-oxidant, lipophilic, microbial and spectroscopic properties of new alkali metal salts of 5-O-caffeoylquinic acid", *International Journal of Molecular Science*, 19 (2018) 1-20. doi:10.3390/ijms19020463 *

IF₂₀₁₇=3,687

H10. **M. Kalinowska**, G. Świdorski, M. Matejczyk, W. Lewandowski, „Spectroscopic, thermogravimetric and biological studies of Na(I), Ni(II) and Zn(II) complexes of quercetin", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 126 (2016) 141-148.

IF₂₀₁₆=1,953

H11. **M. Kalinowska**, A. Bielawska, H. Lewandowska-Siwkiewicz, W. Priebe, W. Lewandowski, "Apple: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties", *Plant Physiology and Biochemistry*, 84 (2014) 169-188. *

IF₂₀₁₄=2,756

STRESZCZENIE

6.1. Cel, zakres i spójność tematu

Wybrany cykl publikacji obejmuje:

- a) syntezę kompleksów metali z wybranymi roślinnymi związkami fenolowymi,
- b) określenie składu zsyntezowanych związków za pomocą analizy elementarnej i termograwimetrycznej,
- c) badania struktury molekularnej ligandów i kompleksów oraz rozkładu ładunku elektronowego za pomocą metod spektroskopowych (FT-IR, FT-Raman, ^1H i ^{13}C NMR, UV) i metod obliczeniowych (na poziomie B3LYP/611++G(d,p); optymalizacja struktury, rozkład ładunku atomowego NBO, APT, energia orbitali HOMO i LUMO) oraz rentgenowskiej analizy monokryształu,
- d) badania aktywności biologicznej kompleksów metali i ligandów (pro-/antyoksydacyjnych, przeciwdrobnoustrojowych, lipofilowych, cytotoksycznych),
- e) badania (oraz zebranie danych do przyszłych badań) zależności między strukturą związków a ich aktywnością biologiczną.

Do badań wybrano pięć następujących ligandów będących roślinnymi związkami fenolowymi:

- kwas gentyzynowy (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy, 2,5-dHB) – związek z grupy kwasów fenolowych, pochodna kwasu benzoesowego,
- kwasy ferulowy (4-hydroksy-3-metoksycynamonowy), p-kumarowy (4-hydroksycynamonowy) i chlorogenowy (5-kawoilochoinowy, 5-CQA) – związki z grupy kwasów fenolowych, pochodne kwasu cynamonowego,
- kwercetyna – związek z grupy polifenoli (flawonoidów).

Wyżej wymienionymi ligandami kompleksowano następujące metale:

- pierwszej (Li, Na, K, Rb, Cs) oraz drugiej (Ca) grupy układu okresowego,
- wybrane metale przejściowe [Mn(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ni(II)].

Do badań wybrałam 5 roślinnych związków fenolowych jako substancje nietoksyczne, bezpieczne dla środowiska naturalnego oraz wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową i antyoksydacyjną. Właściwości te są ściśle skorelowane ze strukturą tych związków, dlatego synteza związków kompleksowych spowodowała zmianę właściwości fizykochemicznych i biologicznych ligandów. Dobór kationów metali do badań był również celowy. Stanowiły je (a) mikro- i makroelementy (Ca, K, Na), (b) metale przejściowe, których związki posiadają znane właściwości przeciwdrobnoustrojowe (Cu, Zn), (c) metale pierwszej grupy układu okresowego (co pozwoliło badać zależność między strukturą molekularną związków, ich aktywnością biologiczną a zmianą parametru kationów metali

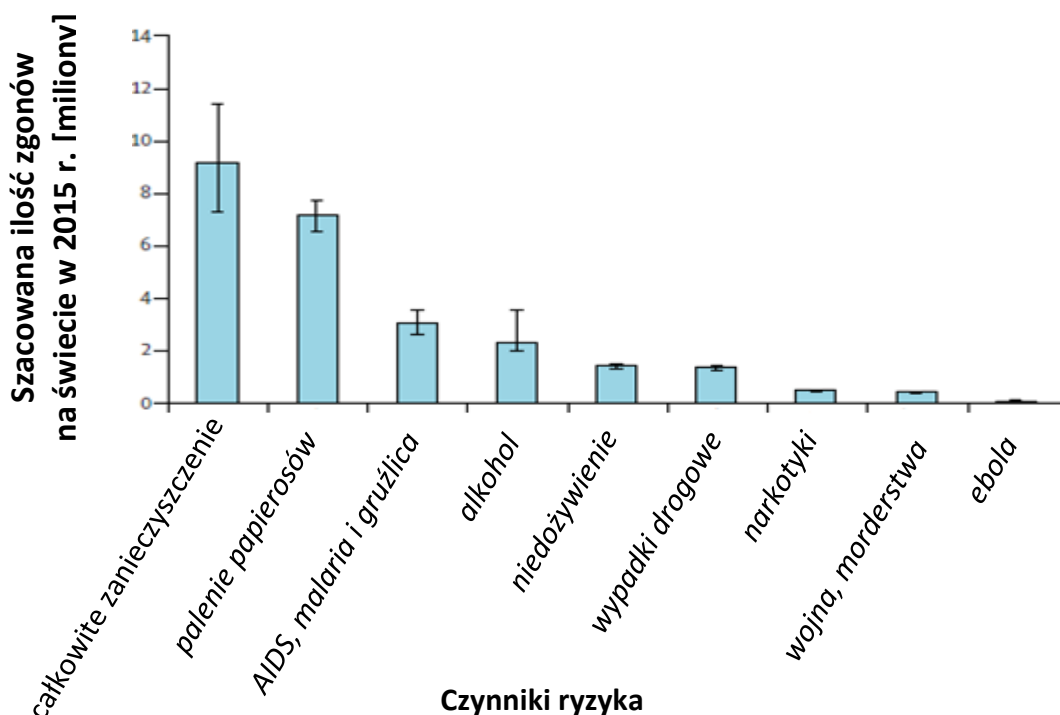
takimi są potencjał jonowy, promień jonowy, elektroujemność). Strukturę związków fenolowych oraz ich kompleksów i soli szczegółowo zbadałam przy użyciu różnych, wzajemnie komplementarnych metod spektroskopowych oraz obliczeniowych. Wprowadzenie nowego związku do powszechnego użycia (np. jako substancja przeciwdrobnoustrojowa czy antyoksydant) musi być poprzedzone jego dokładnymi badaniami fizykochemicznymi. Ponadto otrzymane dane analityczne będą służyły poszukiwaniu zależności pomiędzy strukturą molekularną związków a ich aktywnością biologiczną. Aby uzyskane wyniki odzwierciedlały ogólne zależności, koniecznym jest przeprowadzenie analizy na bardzo dużej, zróżnicowanej strukturalnie grupie związków.

6.2. Motywacja i znaczenie podjętego tematu

W 2018 r. Komisja ds. Zanieczyszczeń i Zdrowia powołana przez „Lancet” wydała raport będący efektem 2-letniego projektu, w którym brało udział ponad 40 ekspertów z różnych krajów [1]. Wyniki ich badań wskazują, że zanieczyszczenie środowiska gwałtownie wzrasta. W 2015 r. dziewięć milionów ludzi zmarło przedwcześnie z powodu zanieczyszczenia środowiska na skutek astmy, nowotworów oraz chorób neurorozwojowych, serca i płuc (rys. 1.). Wg. Komisji zanieczyszczenie środowiska może być także przyczyną cukrzycy, przedwczesnych porodów oraz zaburzeń neurologicznych (takich jak autyzm czy demencja starcza). Szokujące jest, że ciągle trwają badania nad oceną wpływu na zdrowie człowieka neurotoksyn środowiskowych, odpadów farmaceutycznych, nanomateriałów, nowych chemicznych środków chwastobójczych i owadobójczych, których toksyczność nie została jeszcze uwzględniona w opublikowanym raporcie.

Ww. powody zmuszają nas, naukowców, do poszukiwania rozwiązań ograniczających zanieczyszczenie środowiska naturalnego. Jednym z takich sposobów mogą być nowe, nietoksyczne substancje o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i antyoksydacyjnych, które mogłyby mieć zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym i innych. Duże nadzieje budzą roślinne związki fenolowe. To ogromna i strukturalnie zróżnicowana grupa związków chemicznych, która jest intensywnie badana ze względu na ich cenne właściwości biologiczne. Pomysł otrzymywania pochodnych roślinnych związków fenolowych, jako bioaktywnych substancji o niskiej toksyczności, nie jest nowy. Jak podają dane literaturowe, 60% leków przeciwbakteryjnych oraz 51% antyrakowych odkrytych w ciągu ostatnich kilku dekad jest pochodzenia roślinnego [2]. Np. alvocidib, pochodna związku fenolowego, będąca na etapie badań klinicznych jako potencjalny lek antyrakowy [3]. Innym przykładem jest resweratrol i jego pochodna SRT501, które badane były jako potencjalne leki w leczeniu szpiczaka mnogiego [4]. Częstym ograniczeniem w badaniach związków fenolowych jest ich niska rozpuszczalność w wodzie oraz mała biodostępność. Dlatego podejmuje się próby otrzymania

syntetycznych pochodnych o większej aktywności biologicznej, przy zachowaniu braku lub niskiej toksyczności.



Rys. 1. Szacowana ilość zgonów na świecie w 2015 r. spowodowana zanieczyszczeniem środowiska oraz innymi czynnikami [1].

W ramach swoich badań podjęłam się syntezy nowych kompleksów wybranych roślinnych związków fenolowych, które różniłyby się właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi w porównaniu do wyjściowych ligandów. Synteza soli litowców z kwasami fenolowymi doprowadziła do otrzymania związków o wysokiej rozpuszczalności w wodzie. Ułatwiło to dalsze badania aktywności biologicznej oraz stworzyło większe szanse na praktyczne zastosowanie otrzymanych związków jako środków przeciwdrobnoustrojowych lub antyutleniaczy. W przypadku kompleksów metali przejściowych, zakładałam, że mogą posiadać wyższą aktywność biologiczną (np. przeciwdrobnoustrojową, pro-/antyoksydacyjną) niż wyjściowy ligand. Ogólnie wiadomo, że kationy m.in. miedzi(II), cynku(II) charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową, a w wielu przypadkach kompleksowanie tymi metalami zwiększa aktywność pro-/antyoksydacyjną ligandu. Kompleksy kadmu zostały celowo uwzględnione w badaniach jako związki o potencjalnie bardzo silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, które mogłyby mieć zastosowanie w stosunku do wysoce opornych linii komórkowych. Synteza kompleksów dawała szansę na poprawę aktywności biologicznej ligandu.

W wyniku prowadzonych badań uzyskałam szereg danych spektroskopowych (doświadczalnych i teoretycznych), obliczeniowych

(parametry strukturalne, rozkład ładunku, energie orbitali HOMO i LUMO) oraz parametrów określających aktywność biologiczną dla 25 związków (5 ligandów i 20 kompleksów lub soli). Zebranie dużej liczby parametrów do badania zależności struktura – aktywność pozwoli na poszukiwania nowych związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych lub pro-/antyoksydacyjnych nie metodą prób i błędów, ale na podstawie ustalonych ogólnych zależności.

6.3. Zastosowane metody badawcze

Otrzymałam 20 związków kompleksowych i soli. Skład i stopień uwodnienia zsyntezowanych związków określiłam za pomocą analizy elementarnej i termogravimetrycznej. W przypadku kompleksów w postaci krystalicznej zastosowano rentgenowską analizę monokryształów. Badania fizykochemiczne oraz rozkładu ładunku elektronowego w ligandach i kompleksach wykonałam stosując: (a) spektroskopię w zakresie podczerwieni (FT-IR); (b) spektroskopię ramanowską (FT-Raman); (b) absorpcyjną spektroskopię elektronową (UV); (d) spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C NMR); (e) metody obliczeniowe z wykorzystaniem programu Gaussian 98W i Gaussian 09W.

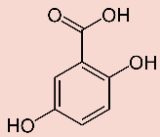
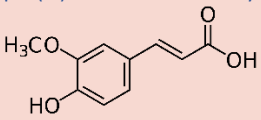
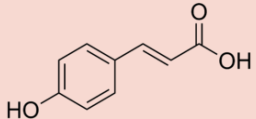
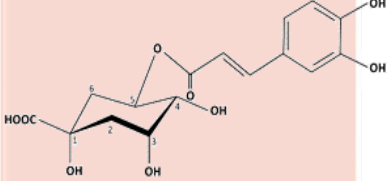
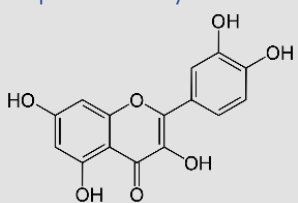
Badania właściwości antyoksydacyjnych wykonałam w stosunku do wybranych trwałych rodników w oparciu o popularne metody: DPPH, FRAP i CUPRAC. Aktywność pro-oksydacyjną określiłam w reakcji utleniania troloksu. Wykonałam analizę właściwości przeciwdrobnoustrojowych związków w stosunku do wybranej grupy drobnoustrojów stosując metodę turbidymetryczną lub wyznaczając minimalne stężenie hamujące rozwój drobnoustroju (MIC). Dyskutowałam właściwości lipofilowe określone metodą chromatograficzną w pięciu różnych układach chromatograficznych. Badania cytotoksyczności związków wykonano na liniach MCF-7 (hormonozależny gruczolakorak piersi). W celu statystycznej oceny uzyskanych wyników zastosowałam program Statistica13 oraz Excel.

VI. OMÓWIENIE BADAŃ

Wprowadzenie

Wszyscy stajemy się coraz bardziej świadomi skutków życia w zanieczyszczonym środowisku, spożywania wysoko przetworzonej żywności, wszechobecności konserwantów, nadużywania antybiotyków, stosowania środków ochrony roślin czy masowej hodowli zwierząt. Dlatego istnieje ogromna potrzeba społeczna, uzasadniona ww. czynnikami, powrotu do produktów bazujących na produktach naturalnych. Do powszechnie stosowanych substancji należy zaliczyć związki przeciwdrobnoustrojowe i antyutleniające, które używane są jako konserwanty, kosmetyki czy leki. Mimo, że jest to stosunkowo duża i dobrze zbadana grupa związków chemicznych, ciągle podejmuje się próby uzyskania nowych bezpiecznych dla człowieka i środowiska naturalnego związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antyoksydacyjnej. Do podjęcia tego typu badań zmuszają: (1) zanieczyszczenie środowiska naturalnego wynikające ze zwiększającego się stosowania konserwantów, leków, dezynfekantów nie ulegających biodegradacji lub powodujących powstawanie toksycznych produktów, a przez to negatywnie wpływających na organizmy wodne, a w dalszej konsekwencji na człowieka, (2) wzrastająca odporność drobnoustrojów na obecnie stosowane środki (leki, konserwanty, środki dezynfekujące), (3) występowanie reakcji alergicznych oraz jednostek chorobowych powodowanych częstym kontaktem z ww. preparatami, (4) wzrastająca świadomość konsumentów i potrzeba stworzenia nowych związków przeciwdrobnoustrojowych oraz antyoksydacyjnych jako alternatywę do obecnie stosowanych preparatów. Obiecującą grupą związków są roślinne związki fenolowe, jako nietoksyczne dla środowiska, ale jednocześnie wykazujące wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową i antyoksydacyjną.

Związki fenolowe to wtórne metabolity roślinne, których obecność stwierdzono we wszystkich organach roślin. W roślinach pełnią funkcje regulacyjne, sygnalizacyjne, antyoksydacyjne. Stanowią naturalną ochronę przed patogenami, chronią przed szkodliwym promieniowaniem UV oraz dzięki właściwościom chelatującym metale nadają odpowiednią barwę kwiatom [5-7]. Wspólną cechą budowy roślinnych związków fenolowych jest obecność pierścienia aromatycznego oraz przyłączonej do niego grupy hydroksylowej. Różnorodność strukturalna tej liczącej ponad 8000 związków decyduje o szerokim zakresie właściwości biologicznych i pełnionych funkcjach. Schemat przedstawiający podział związków fenolowych z uwzględnieniem tych objętych badaniami znajduje się na rys. 2.

kwasy fenolowe	flawonoidy	inne polifenole
- kwasy benzoesowe np. kwas gentyzynowy  - kwasy cynamonowe np. (a) kwas ferulowy  (b) kwas <i>p</i>-kumarowy  - estry kwasów fenowych np. kwas chlorogenowy 	- flawonole np. kwercetyna  - flawony - flawanole - flawanony - izoflawony - antocyjany	- stilbeny - lignany - taniny

Rys. 2. Ogólny podział związków fenolowych z uwzględnieniem tych objętych badaniami [6,7].

Wybrane przeze mnie do badań ligandy są zróżnicowane strukturalnie. Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (gentyzynowy) to pochodna kwasu benzoesowego. Dwa kolejne ligandy (kwasy 4-hydroksy- i 4-hydroksy-5-metoksycynamonowe) to pochodne kwasu cynamonowego, który w porównaniu do kwasu benzoesowego posiada dodatkowy układ $-C=C-$ pomiędzy pierścieniem a grupą karboksylową. Czwarty ligand to kwas 5-kawoilochinowy (chlorogenowy), ester kwasu hydroksycynamonowego i kwasu chinowego. Ostatnim ligandem jest najbardziej złożona strukturalnie – kwercetyna. Wybrane ligandy posiadają grupy wiążące kationy metali, tj. grupę karboksylową, hydroksylową i metoksyłową. Ponieważ grupa karboksylowa wykazuje różną dędatność, koordynacja kationów metali odbywa się w sposób mono-, bi-, tri- lub tetradentatny. Dodatkowa (lub alternatywna) koordynacja przez grupy hydroksylową i/lub metoksyłową stwarza możliwość otrzymania różnych strukturalnie kompleksów [7]. Typ wiązania metal-ligand wpływa na lokalne zmiany w rozkładzie ładunku elektronowego kompleksu w porównaniu z wyjściowym ligandem. Konsekwencją tego są globalne zmiany właściwości fizykochemicznych i biologicznych związku. Kompleksowanie metali to jeden ze

sposobów modyfikacji tzw. struktury wiodącej. Cel badań zostaje osiągnięty, jeśli w wyniku modyfikacji poprawione zostają cechy struktury wiodącej. Niezbędnym etapem poszukiwań związków chemicznych o pożądanych właściwościach jest określenie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną. Dlatego szczegółowa strukturalna i fizykochemiczna analiza związków jest niezbędna. W końcowym efekcie badań otrzymuje się szereg parametrów, które mogą charakteryzować lipofilowość związków, ich właściwości spektroskopowe, cząstkowy ładunek zgromadzony na atomach, moment dipolowy, obecność wiązań wodorowych i inne [8]. Konieczność zgromadzenia dużej ilości danych wynika z faktu, że aktywność biologiczna związków chemicznych jest wypadkową wielu parametrów fizykochemicznych.

Prowadzone przeze mnie badania biologiczne dotyczyły aktywności przeciwdrobnoustrojowych i pro-/antyoksydacyjnych związków, które w świetle najnowszych badań są ściśle ze sobą powiązane. Na przełomie kilku ostatnich lat zaistniała intensywna dyskusja dotycząca roli wolnych rodników w mechanizmach działania przeciwdrobnoustrojowego związków chemicznych. Według Kohanski'ego i współpracowników istnieje ogólny mechanizm działania związków przeciwdrobnoustrojowych polegający na generowaniu wolnych rodników hydroksylowych w komórce bakteryjnej, które zapoczątkowują różne procesy prowadzące do śmierci komórki [9, 10]. Następne prace potwierdziły udział wolnych rodników w mechanizmach przeciwdrobnoustrojowych związków chemicznych [11, 12]. Pojawiły się też głosy krytykujące metodykę badań oraz osiągnięte wyniki [13]. Związki fenolowe mogą powodować oksydatywne zmiany w komórkach drobnoustrojów. To czy wykazują właściwości antyoksydacyjne (wstrzymują lub opóźniają proces utleniania substancji) czy pro-oksydacyjne (indukują wytwarzanie wolnych rodników) zależy m.in. od kilku czynników takich jak obecność jonów metali, właściwości chelatujące, pH, typ rozpuszczalnika [14]. Mając na uwadze wyniki prac, które wskazują, że mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego związków fenolowych może być związany z ich aktywnością pro-oksydacyjną, podjęcie takich badań może być pomocne w (a) badaniach mechanizmu działania przeciwdrobnoustrojowego związków fenolowych i ich pochodnych, (b) projektowaniu związków o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej na bazie roślinnych związków fenolowych.

Szczegółowe cele:

- 1) synteza, badania strukturalne, spektroskopowe oraz przeciwdrobnoustrojowe kompleksów manganu(II), miedzi(II), kadmu(II) oraz cynku(II) z kwasem p-kumarowym [H1, H2],
- 2) synteza, badania strukturalne, spektroskopowe oraz przeciwdrobnoustrojowe kwasu ferulowego oraz jego kompleksów z wapniem(II), manganem(II), miedzią(II), kadmem(II) oraz cynkiem(II) [H3],

- 3) synteza, badania strukturalne, obliczeniowe, spektroskopowe oraz przeciwdrobnoustrojowe kwasu gentyzynowego oraz jego soli z sodem i kompleksów z miedzią(II) i kadmem(II) [H4],
- 4) badania spektroskopowe, obliczeniowe oraz strukturalne monokryształu gentyzynianu wapnia oraz określenie jego cytotoksyczności na liniach MCF-7 (hormonozależny gruczolakorak piersi) [H5, H6],
- 5) badania spektroskopowe, obliczeniowe oraz przeciwdrobnoustrojowe kwasu chlorogenowego [H7, H8],
- 6) badania spektroskopowe, obliczeniowe oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowych, lipofilowych oraz pro-/antyoksydacyjnych chlorogenianów litu, sodu, potasu, rubidu i cezu [H9],
- 7) synteza, badania strukturalne, spektroskopowe oraz antyutleniające kompleksów sodu, niklu(II) i cynku(II) z kwercetyną [H10],
- 8) szczegółowy przegląd danych literaturowych dotyczący pozyskiwania ekstraktów roślinnych bogatych w związki fenolowe o wysokiej aktywności biologicznej [H11].

Zakres badań:

- a) określenie składu, stopnia uwodnienia i struktury kompleksów na podstawie analizy elementarnej, termogravimetrycznej oraz rentgenowskiej analizy monokryształu,
- b) badania spektroskopowe ligandów i kompleksów za pomocą: (a) spektroskopii w zakresie podczerwieni (FT-IR); (b) spektroskopii ramanowskiej (FT-Raman); (c) absorpcyjnej spektroskopii elektronowej (UV); (d) spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C NMR),
- c) obliczenia wykonane w programie Gaussian 98W i Gaussian 09W (optymalizacja struktury; teoretyczne widma IR, NMR; rozkład ładunku NBO, APT; energie orbitali HOMO i LUMO),
- d) badania aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem metod DPPH, FRAP, CUPRAC,
- e) badania aktywności pro-oksydacyjnej określone w reakcji utleniania troloksu,
- f) badania lipofilowości związków na podstawie analizy chromatograficznych parametrów lipofilowości wyznaczonych w pięciu układach chromatograficznych,
- g) analiza aktywności przeciwdrobnoustrojowej ligandów i kompleksów w stosunku do wybranej grupy drobnoustrojów na podstawie gęstości optycznej roztworów lub minimalnego stężenia hamującego rozwój drobnoustroju (MIC).

Prowadzone przeze mnie badania mają wyraźny aspekt aplikacyjny polegający na poszukiwaniu związków pochodzenia naturalnego o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i pro-/antyoksydacyjnej, a ponadto charakteryzujących się brakiem toksyczności, dobrą rozpuszczalnością w wybranych rozpuszczalnikach, stabilnością i małą masą cząsteczkową. Otrzymane związki mogłyby mieć zastosowanie jako konserwanty lub antyutleniacze w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym i innych. Uzyskane obszerne dane analityczne (spektroskopowe, strukturalne, obliczeniowe) mają istotny aspekt poznawczy i są niezbędne do ustalenia ogólnych zależności między strukturą związków a ich aktywnością biologiczną.

6.1. Synteza, badania strukturalne, spektroskopowe oraz przeciwdrobnoustrojowe kompleksów wybranych metali z kwasami p-kumarowym [H1, H2] i ferulowym [H3]

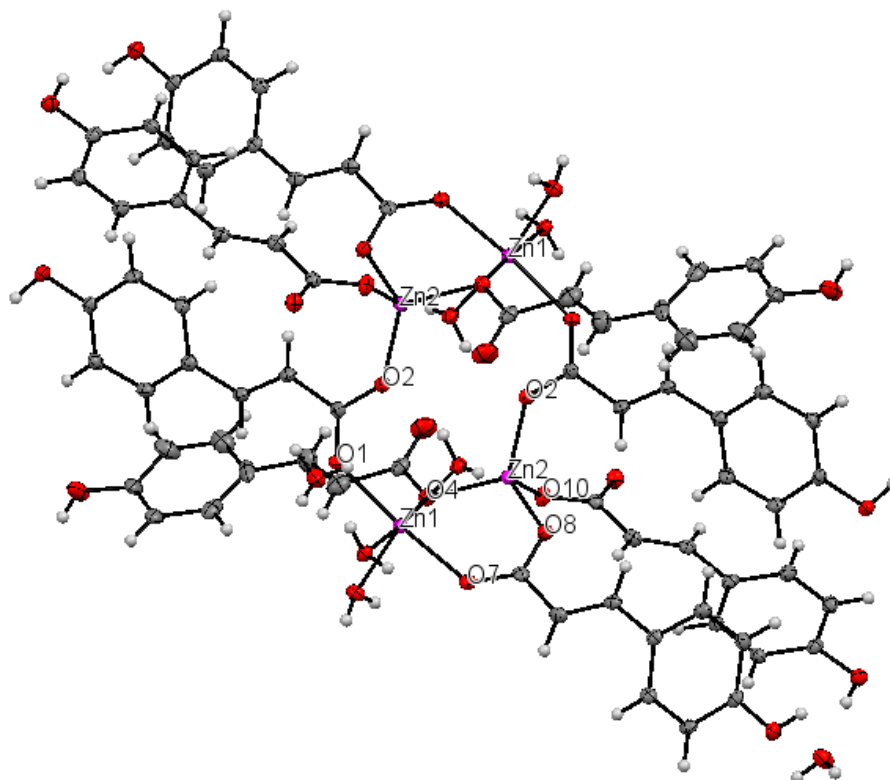
Kwas p-kumarowy [kwas 3-(4-hydroksyfenilo)-prop-2-enowy; p-CA] to powszechny w przyrodzie izomer kwasu kumarowego obecny m.in. w zbożach, wybranych owocach i warzywach, w miodzie, piwie, winie. Kwas p-kumarowy wykazuje właściwości antyoksydacyjne [15, 16], przeciwnowotworowe w stosunku do komórek linii komórkowych, m.in. Caco-2 (ludzkiego gruczolaka okrężnicy) [17], HT-29 (raka okrężnicy) [18], SW480 (raka jelita grubego) [19], MDA-MB-231 (rak piersi) [20] oraz przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do *Bacillus subtilis* (MIC=15,75 µg/ml, MBCC=37,50 µg/ml), *Bacillus megaterium* (MIC=18,75 µg/ml, MBCC=37,50 µg/ml) [21], *Shigella dysenteriae* (MIC=10 µg/ml), *Escherichia coli* (MIC=80 µg/ml) oraz *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* (MIC=20 µg/ml) [23]. Kwas ferulowy [kwas 3-(4-hydroksy-3-metoksyfenilo)-prop-2-enowy], powszechny roślinnych związek fenolowy, która posiada aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* [24]. Ze względu na właściwości antybakteryjne, przeciwrzybicze i antyutleniające, kwas ferulowy ma zastosowanie jako składnik aktywnych powłok polimerowych [25].

Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego kwasów p-kumarowego i ferulowego polega na niszczeniu bakteryjnej błony komórkowej i bezpośrednim oddziaływaniu z bakteryjnym DNA, co w konsekwencji powoduje zahamowanie funkcji życiowych komórki i jej śmierć [23]. Inne badania wykazały, że kwas p-kumarowy może być inhibitorem quorum sensing (zjawiska porozumiewania się drobnoustrojów za pomocą związków chemicznych) u bakterii *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis* [26]. W przypadku kompleksów kwasów fenolowych, wyżej wspomnianemu

mechanizmowi może towarzyszyć przenikanie do wnętrza komórki jonów metali i ich oddziaływanie ze składnikami cytoplazmy lub/i organellami komórki bakteryjnej.

W publikacjach **H1**, **H2**, **H3** przedstawiono wyniki badań strukturalnych, spektroskopowych oraz przeciwdrobnoustrojowych kompleksów manganu(II), miedzi(II), kadmu(II) i cynku(II) z kwasem p-kumarowym oraz kompleksów manganu(II), miedzi(II), kadmu(II), cynku(II) i wapnia(II) z kwasem ferulowym. p-Kumaryniany miedzi i manganu oraz wszystkie ferulany otrzymano w postaci trudno rozpuszczalnych osadów. Natomiast w przypadku kompleksów kadmu i cynku z kwasem p-CA otrzymano bezbarwne kryształy w wyniku powolnego odparowania rozpuszczalnika. Struktura krystaliczna p-kumarynianu kadmu(II) była identyczna jak opublikowana już poprzednio [27]. W celu ustalenia składu kompleksów wykonano analizę elementarną, termogravimetryczną lub dyfrakcyjną analizę monokryształu. Ustalony skład kompleksów kwasu p-kumarowego jest następujący: $\text{Mn}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cu}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cd}(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [**H1**], natomiast ferulanów: $\text{Mn}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cu}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cd}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{Zn}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Ca}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4)_2 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ [**H3**]. Wymienione kumaryniany ulegają stopniowemu rozkładowi termicznemu, który w pierwszej kolejności (w zakresie temperatur od 30 do 120-140°C) związany jest z procesem dehydratacji, a następnie z degradacją bezwodnego kompleksu (w zakresie temperatur od 120-160 do 370-480°C). Końcowymi produktami rozkładu termicznego badanych związków są odpowiednie tlenki metali. Rozkład termiczny ferulanów związany z procesem dehydratacji przebiega w zakresie temperatur, tj. od 30°C do 135-150°C (podobnie jak w przypadku kumarynianów). Utworzone bezwodne ferulany są niestabilne termicznie i ulegają dalszemu rozkładowi do końcowych produktów (tlenków metali) w wyższym zakresie temperatur niż to miało miejsce w przypadku kumarynianów, czyli 440-700°C.

Strukturę p-kumarynianu cynku określono na podstawie analizy dyfrakcyjnej monokryształu [**H2**]. Kompleks cynku o sumarycznym wzorze $[\text{Zn}_4(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_6] \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ to centrosymetryczny agregat zbudowany z czterech kationów cynku (II), ośmiu anionów p-kumarynianu oraz sześciu cząsteczek wody (rys. 3). Jony cynku koordynowane są przez grupy karboksylanowe: dwie mostkujące typu *syn,syn*, dwie mostkujące typu *syn,anti* oraz cztery mostkujące jednoatomowe. Sferę koordynacyjną kationu Zn1 uzupełniają trzy cząsteczki wody, dzięki czemu otoczenie jonu centralnego ma geometrię zniekształconego oktaedru. Natomiast wokół jonu Zn2 ligandy tworzą otoczenie tetraedryczne. Grupy hydroksylowe przy pierścieniu nie biorą udziału w koordynacji metalu, ale zaangażowane są w tworzenie silnych międzycząsteczkowych wiązań wodorowych.



Rys. 3. Struktura krystaliczna $[Zn_4(C_9H_7O_3)_8(H_2O)_6] \cdot 4(H_2O)$ [H2].

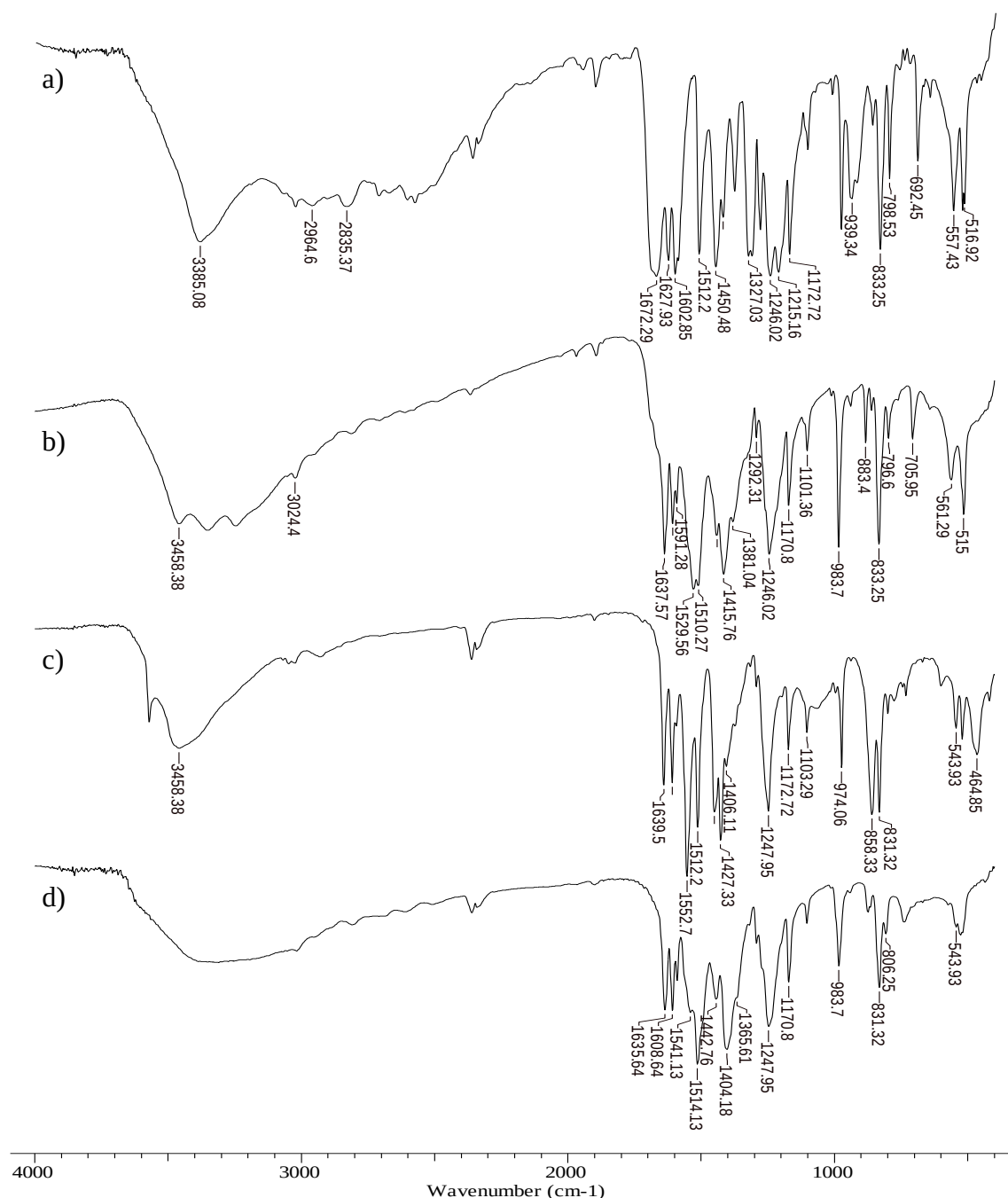
Zarejestrowano widma w podczerwieni (FT-IR), ramanowskie (FT-Raman) oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (1H i ^{13}C NMR) w celu oceny poprawności syntezy oraz wpływu wybranych jonów metali na strukturę molekularną p-kumarynianu i ferulanu (rys. 4).

W porównaniu z widmami FT-IR i FT-Raman kwasów p-kumarowego (p-CA) i ferulowego (FA), w widmach kompleksów pojawiają się dodatkowe pasma pochodzące od drgań grupy karboksylanowej ($-COO^-$) oraz zanikają pasma przypisane drganiom grupy karbonylowej ($C=O$) (tabela 1). Świadczy to o koordynacji metalu przez grupę $-COO^-$. Stosując znane kryterium spektroskopowe¹ można próbować przewidzieć typ koordynacji kationu metalu przez grupę karboksylanową. Wartości parametru $\Delta\nu$ wynoszą: 133 cm^{-1} (p-

¹ Na podstawie położenia w widmie IR pasm pochodzących od drgań asymetrycznych i symetrycznych grupy karboksylanowej badanego kompleksu w porównaniu do położenia tych pasm na widmie IR soli sodowej można ocenić typ koordynacji metalu. Mianowicie: (a) w przypadku dwupozycyjnej chelatującej grupy karboksylowej pasmo $\nu_{as}(COO^-)$ jest przesunięte w stronę niższych liczb falowych a $\nu_s(COO^-)$ w stronę wyższych liczb falowych w porównaniu do położenia odpowiednich pasm w widmie soli sodowej; lub $\Delta\nu(COO^-)_{\text{badany kompleks}} << \Delta\nu(COO^-)_{\text{sól sodowa}}$; [$\Delta\nu(COO^-)$ – różnica pomiędzy liczbami falowymi pasm pochodzących od drgań asymetrycznych i symetrycznych grupy karboksylanowej]; (b) obecność grupy dwupozycyjnej mostkującej potwierdza przesunięcie pasm $\nu_{as}(COO^-)$ i $\nu_s(COO^-)$ w stronę wyższych liczb falowych w porównaniu do położenia odpowiednich pasm w widmie soli sodowej; lub $\Delta\nu(COO^-)_{\text{badany kompleks}} \leq \Delta\nu(COO^-)_{\text{sól sodowa}}$; (c) typ koordynacji jest jednopozycyjny gdy pasma $\nu_{as}(COO^-)$ jest przesunięte w stronę wyższych liczb falowych a $\nu_s(COO^-)$ w stronę niższych liczb falowych w porównaniu do położenia odpowiednich pasm w widmie soli sodowej; lub $\Delta\nu(COO^-)_{\text{badany kompleks}} > \Delta\nu(COO^-)_{\text{sól sodowa}}$ [28, 29].

kumarynian sodu), 126 cm^{-1} (p-kumarynian miedzi), 110 cm^{-1} (p-kumarynian kadmu), 114 cm^{-1} (p-kumarynian manganu), 137 cm^{-1} (p-kumarynian cynku). Sugeruje to chelatującą oraz jednopozycyjną lub mostkującą grupę karboksylanową odpowiednio w przypadku kompleksów kadmu (II) i cynku (II), co zgodne jest ze strukturami krystalicznymi tych związków [H2, 27]. Pozwala to stwierdzić, że zastosowane kryterium spektroskopowe jest wystarczające do wstępnej oceny typu koordynacji metalu w p-kumarynianach. Jednocześnie można przypuszczać chelatujący typ koordynacji w przypadku p-kumarynianu manganu oraz chelatujący lub mostkujący w przypadku kompleksu miedzi. Policzony parametr $\Delta\nu$ dla ferulanów znajduje się w zakresie $106\text{--}110\text{ cm}^{-1}$. Biorąc pod uwagę wartość $\Delta\nu=170\text{ cm}^{-1}$ uzyskaną dla soli sodowej kwasu ferulowego, pozwala to przypuszczać, że badane ferulany mogą posiadać chelatującą grupę karboksylanową.

Rozpatrując zmiany w położeniu pasm na widmach ligandów i kompleksów przypisanych drganiom grup metoksylowej ($-\text{OCH}_3$) oraz hydroksylowej przy pierścieniu można dyskutować zaangażowanie tych grup w wiązanie metalu. W widmie Zn p-CA pasmo $\nu(\text{OH})$ znajduje przy wyższych liczbach falowych (3514 cm^{-1}) niż w widmach pozostałych kumarynianów, co może sugerować zaangażowanie grupy $-\text{OH}$ w tych kompleksach w oddziaływania z jonem centralnym. Struktura krystaliczna Zn p-CA (przedstawiona wyżej) wskazuje na brak wiązania kationu cynku przez grupę hydroksylową, natomiast w strukturze krystalicznej Cd p-CA (identyczna z literaturową [27]) grupa $-\text{OH}$ uczestniczy w oddziaływaniach z kationem kadmu. Podobna sytuacja może mieć miejsce w przypadku kumarynianów manganu i miedzi. W cząsteczkach ferulanów, oprócz grupy $-\text{OH}$ przy pierścieniu, w pozycji orto do niej znajduje się grupa $-\text{OCH}_3$. Wyraźne przesunięcia pasm pochodzących od drgań $-\text{OCH}_3$ [np. $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ i $\beta\text{O}-(\text{CH}_3)$] w widmach kompleksów w porównaniu do FA, sugeruje udział tej grupy w wiązaniu kationów metali. Ma to miejsce w przypadku literaturowej struktury ferulanu sodu, w której to zarówno grupa $-\text{COO}^-$ jak i $-\text{OCH}_3$ i $-\text{OH}$ biorą udział w wiązaniu kationu sodu [30].



Rys. 4. Widma w podczerwieni rejestrowane techniką prasowania substancji w pastylce z KBr zarejestrowane dla: (a) kwasu *p*-kumarowego oraz *p*-kumarynianów (b) manganu(II), (c) miedzi(II) i (d) kadmu(II) [H1].

Różnice w widmach FT-IR i FT-Raman *p*-CA i FA oraz ich kompleksów metali dotyczą również pasm przypisanych drganiom pierścienia i wiązania podwójnego -C=C- pomiędzy grupą karboksylanową a pierścieniem. Największe różnice ($>5\text{ cm}^{-1}$) widoczne są w przypadku pasm nr 20a, 7b, $\nu(\text{CC})_{\text{C}=\text{C}}$, 8a, 19b, 14, 10a, 1, 16a, $\beta(\text{CH})_{\text{C}=\text{C}}$, $\gamma(\text{CH})_{\text{C}=\text{C}}$. Niektóre z nich ulegają przesunięciu w stronę wyższych lub niższych liczb falowych w porównaniu do odpowiadających sobie pasm w widmie ligandu. Większe różnice widoczne są w położeniach pasm przypisanych drganiom układu -C=C- [np. $\nu(\text{CC})_{\text{C}=\text{C}}$, $\beta(\text{CH})_{\text{C}=\text{C}}$, $\gamma(\text{CH})_{\text{C}=\text{C}}$] niż

pierścienia aromatycznego (np. charakterystyczne pasma 8a, 8b, 19a, 19b). Oznacza to, że kationy metali bardziej wpływają na rozkład gęstości elektronowej wiązania $-C=C-$ niż odleglejszego pierścienia. Generalnie wiadomo, że przesunięcie w widmach kompleksów pasm pochodzących od drgań rozciągających w stronę niższych liczb falowych w porównaniu do odpowiadających sobie pasm w widmie ligandu spowodowane jest spadkiem stałych siłowych wiązań i zmniejszeniem gęstości elektronowej wokół oscylujących atomów w kompleksach [28, 29]. Dlatego wyraźne przesunięcie pasm $\nu(CC)_{C=C}$ w kierunku wyższych liczb falowych w widmach kumarynianów i ferulanów w porównaniu do widma ligandu, świadczy o wzroście gęstości elektronowej wokół atomów $-C=C-$ w kompleksów.

Tabela 1. Liczby falowe [cm^{-1}] i przypisanie wybranych pasm z widm w podczerwieni p-kumarynianów i ferulanów manganu(II), kadmu(II), miedzi(II) i cynku(II) oraz kwasów p-kumarowego (p-CA) i ferulowego (FA)

p-KUMARYNIANY				p-CA	FERULANY				FA	Przypisanie**
Zn(II)	Mn(II)	Cd(II)	Cu(II)		Zn(II)	Mn(II)	Cd(II)	Cu(II)		
3514m	3458s*	3435s	3458m	3383s	3426s	3426s	3418s	3219s	3437s	$\nu(OH)_{ar}$
1640s	1638s	1636s	1640s	1628s	1638m	1634s	1636s	1641s	1620vs	$\nu(CC)_{C=C}$
1605s	1607s	1609m	1608s	1603vs	1553w	1557s	1554sh	1550sh	1552w	$\nu(CC)_{ar}$ 8a
1589s	1591m	1592m	1593m	1591s	1595m	1597s	1595s	1574s	1601vs	$\nu(CC)_a$ 8b
1510vs	1510vs	1514s	1512s	1512s					1516vs	$\nu(CC)_a$ 19a
1545s	1530vs	1514s	1553vs		1510s	1510vs	1514vs	1516vs		$\nu(COO^-)_{as}$
					1450m	1450s	1449s	1449w	1466s	$\delta_{as}(CH_3)$
1458m	1440s	1442s	1450s	1450vs	1425w	1425vs	1427s	1433s	1433s	$\nu(CC)_{ar}$ 19b
1408s	1416vs	1404vs	1427s		1404s	1402vs	1399vs	1406vs		$\nu(COO^-)_s$
1319m			1315w	1327s						$\beta(CH)_{C=C} + \beta(OH)_{ar}$
1292m	1292m	1292m	1292w	1283m	1273s	1267vs	1273vs	1275vs	1277vs	$\beta(CH)_{C=C}$
989m	984s	984w	974m	984s	982m	982m	980m	980m	972w	$\gamma(CH)_{C=C}$
866m	883s	874w	858s	860w	853m	860m	853m	866w	853m	$\gamma(CH)$ 10a
					523m	527w	517m	511w	521m	$\beta O-(CH_3)$

* skróty oznaczają intensywność pasm: s – silne, vs – bardzo silne, m – średnie, sh – na zboczu, w – słabe

** numeracja drgań normalnych pierścienia aromatycznego [31]

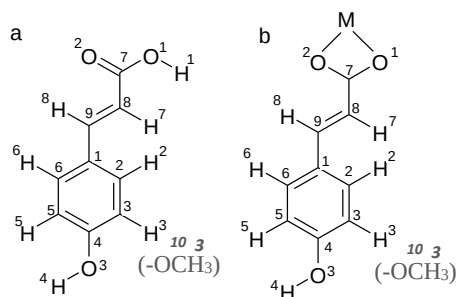
Potwierdza to analiza widm 1H i ^{13}C NMR (tabela 2). Największa różnica w położeniu sygnałów na widmach ^{13}C NMR ligandów p-CA i FA oraz ich kompleksów dotyczy sygnałów pochodzących od C9, C7, C8 (C8 – w przypadku ferulanów) – czyli atomów węgla ugrupowania $-C9=C8-COO^-$, oraz sygnałów od węgla pierścienia C3 i C5. Utworzenie kompleksów znacznie bardziej wpływa na zmianę rozkładu ładunku elektronowego atomów ugrupowania $-C9=C8-COO^-$ ferulanów niż kumarynianów. W kompleksach następuje wzrost gęstości elektronowej wokół atomów C8 i C9 oraz spadek wokół C7. W przypadku kumarynianów gęstość elektronowa wokół C3 maleje, ale w przypadku ferulanów rośnie w porównaniu z odpowiednim ligandem. Spowodowane jest to obecnością przy atomie C3 grupy metoksyłowej w cząsteczkach ferulanów, która dodatkowo może brać udział w koordynacji kationu metalu. Porównując widma samych

ligandów, można zauważyć, że dodatkowa obecność grupy -OCH₃ przy pierścieniu kwasu ferulowego powoduje znaczny spadek gęstości elektronowej wokół atomu C3 i wzrost wokół C2 i C4 w porównaniu z cząsteczką kwasu p-kumarowego. W widmach ¹H NMR kompleksów sygnały pochodzące od H8 i H7 (ugrupowania –CH=CH-COO⁻) oraz H6, H2 ulegają pewnym przesunięciom w porównaniu z odpowiadającymi sobie sygnałami w widmach ligandów.

Tabela 2. Chemiczne przesunięcia sygnałów z widm ¹H and ¹³C NMR kwasów p-kumarowego (p-CA), ferulowego (FA) oraz ich kompleksów, δ [ppm]; brak danych NMR dla kompleksów manganu spowodowany jest ich rozkładem podczas dokonywania pomiaru; znaczące różnice pogrubiono

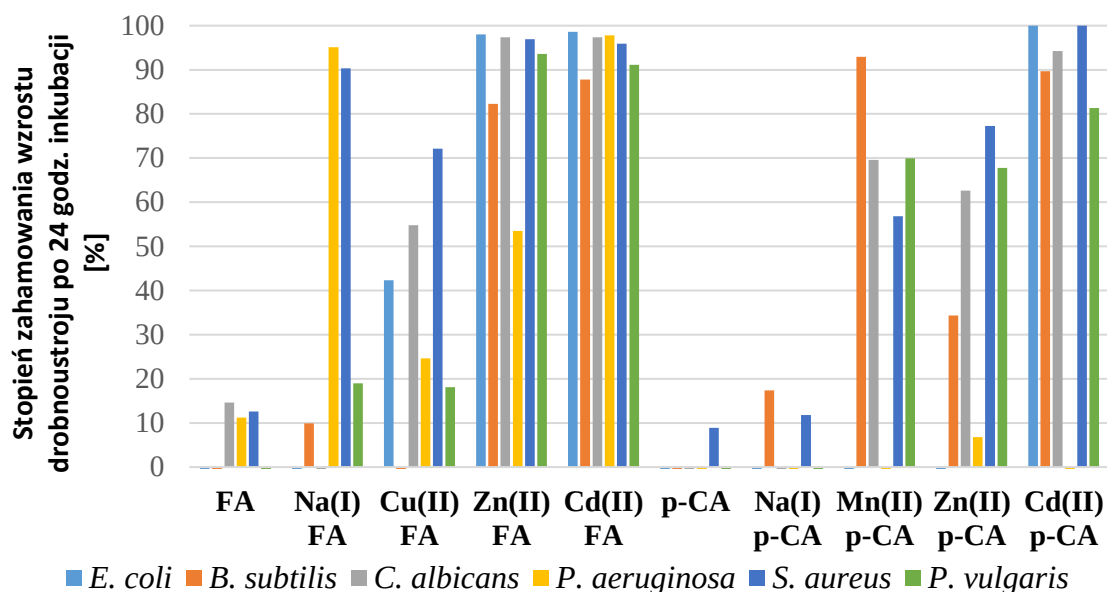
Numeracja atomu	p-KUMARYNIANY			p-CA	FERULANY				FA
	Zn(II)	Cd(II)	Cu(II)		Zn(II)	Cd(II)	Cu(II)	Ca(II)	
H1 *				12,13					12,11
H2	7,33	7,34		7,49	7,23	7,18		7,10	7,27
H3	6,75	6,76	6,78	6,79	3,79	3,81		3,76	3,82
H4	9,93	9,79	10,03	9,96					
H5	6,75	6,76	6,78	6,79	6,75	6,76		6,75	6,79
H6	7,33	7,34		7,49	7,04	6,96		6,93	7,08
H7	6,30	6,32	6,46	6,29	6,34	6,39		6,27	6,37
H8	7,38	7,42	7,50	7,52	7,40	7,34		7,30	7,50
C1	126,11	126,22		125,36	126,17	126,53	124,14	119,12	124,62
C2	129,24	129,23	130,80	130,17	111,02	110,71	113,15	110,59	111,00
C3	120,65	119,29	117,77	115,83	147,89	148,51	149,89	147,83	151,40
C4	158,85	158,72	158,87	159,67	147,70	147,88	149,71	147,44	149,40
C5	120,65	119,29	117,77	115,83	119,52	119,39	117,98	115,53	117,78
C6	129,24	129,23	130,80	130,17	122,35	121,87	123,45	119,05	122,55
C7	172,12	173,78		168,05		173,67			169,94
C8	115,71	115,63	115,80	115,41	111,02	115,62	113,15	115,38	117,58
C9	140,96	141,14		144,27	136,69	141,65	130,34	121,45	148,95
					55,56	55,66	55,53	55,56	57,42

* numeracja atomów ligandów (a) i kompleksów (b); M-kation metalu; w przypadku kwasu ferulowego i ferulanów grupa OCH₃ znajduje się przy węglu C3 (w miejscu wodoru H3)

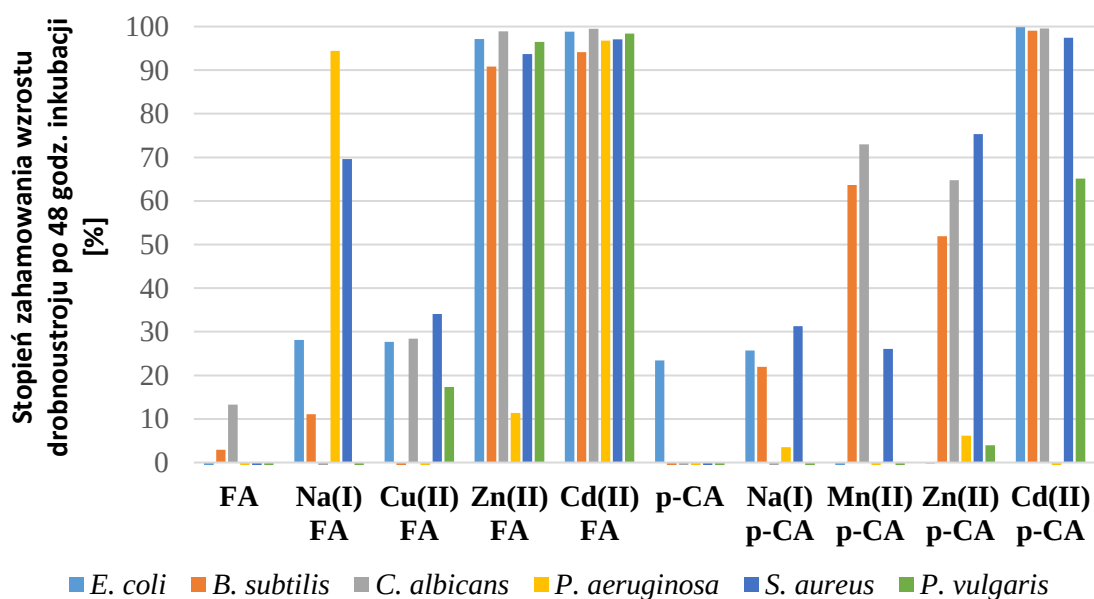


Kolejnym etapem badań była ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej kwasów p-kumarowego i ferulowego oraz ich wybranych kompleksów metali i soli sodowej. Kompleksy kadmu zostały celowo uwzględnione w badaniach jako związki o potencjalnie bardzo silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, które mogłyby mieć zastosowanie w stosunku do wysoce opornych linii komórkowych. Związki, których aktywności nie badano, wykazywały ograniczoną rozpuszczalność w stosowanych rozpuszczalnikach. Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków wykonano metodą pomiaru gęstości optycznej roztworów bulionowych, w których stężenie związku wynosiło 0,1%. Otrzymane wyniki gęstości optycznej roztworów przeliczano na stopień zahamowania wzrostu drobnoustrojów zgodnie ze wzorem: $I = [(A_c - A_s) / A_c] \cdot 100\%$, gdzie „I” to stopień zahamowania wzrostu drobnoustrojów [%], A_c - gęstość optyczna hodowli bulionowej bez dodatku próby i A_s - gęstość optyczna próby. Uzyskane wyniki wskazują, że utworzenie kompleksów z jonami metali przejściowych oraz soli sodowej zwiększa aktywność przeciwdrobnoustrojową ligandów (rys. 5 i 6). Najbardziej aktywne w stosunku do wybranych drobnoustrojów ($I > 80\%$) okazały się ferulan sodu, cynku i kadmu oraz p-kumaryniany manganu i kadmu. Silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe kompleksów z kadmem wynikają z wysokiej toksyczności kadmu, dlatego w dalszej dyskusji nie będą brane pod uwagę. Z punktu widzenia praktycznego zastosowania, największe nadzieje rokuje Na(I) FA przeciwko *P. aeruginosa* i *S. aureus*, Zn(II) FA – jako substancja hamująca rozwój wszystkich badanych drobnoustrojów z wyjątkiem *P. aeruginosa*, Mn(II) p-CA przeciwko *B. subtilis* oraz Zn(II) p-CA przeciwko *E. coli*. Żaden z badanych p-kumarynianów nie wykazywał aktywności przeciwko *P. aeruginosa* (z wyjątkiem Zn p-Ca, którego aktywność była znikoma $I < 10\%$).

Generalnie ferulany posiadają lepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe niż p-kumaryniany (sole sodowe i kompleksy cynku). Sugeruje to, że obecność dodatkowej grupy metoksyłowej przy pierścieniu zwiększa aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych związków.



Rys. 5. Stopień zahamowania wzrostu drobnoustrojów [%] przez badane kwasy ferulowy (FA) i p-kumarowy (p-CA) oraz ich kompleksy i sole po 24 godzinach inkubacji.



Rys. 6. Stopień zahamowania wzrostu drobnoustrojów [%] przez badane kwasy ferulowy (FA) i p-kumarowy (p-CA) oraz ich kompleksy i sole po 48 godzinach inkubacji.

Uzyskane wyniki badań wyraźnie wskazują, że utworzenie związków kompleksowych powoduje wzrost aktywności przeciwdrobnoustrojowej ligandu. Jednym z czynników wpływających na właściwości przeciwdrobnoustrojowe substancji jest lipofilowość. Wzrost lipofilowości związku ułatwia jego transport

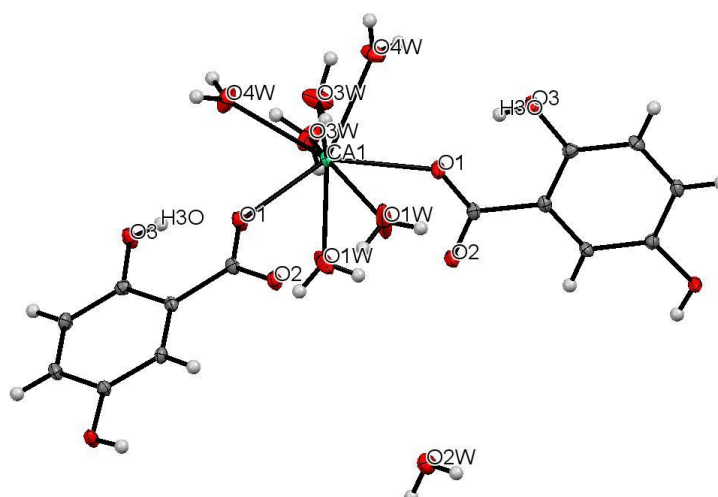
do błony komórkowej. Utworzenie związku kompleksowego zwiększa lipofilowość. Ułatwia to penetrację przez błonę komórkową i oddziaływanie z komponentami bakteryjnych lub grzybowych komórek, czego efektem jest zahamowanie wzrostu drobnoustrojów.

6.2. Synteza, badania strukturalne, spektroskopowe, teoretyczne oraz biologiczne kompleksów wybranych metali z kwasem gentyzynowym [H4, H5, H6]

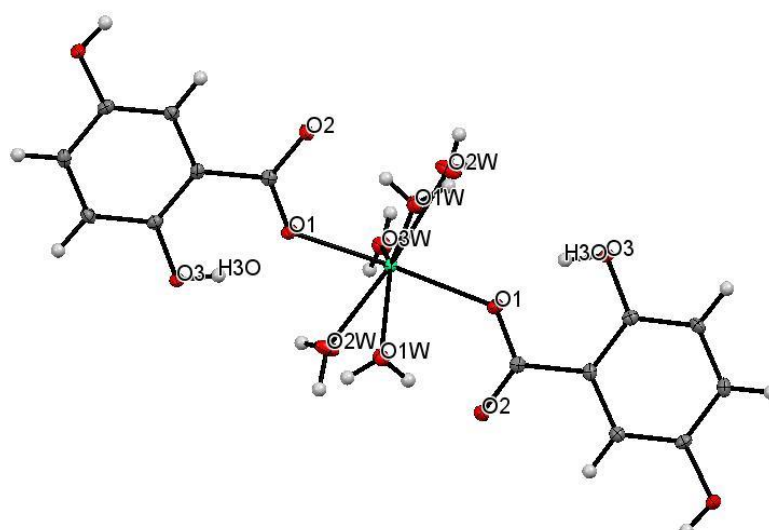
Kolejny etap prac dotyczył badań kompleksów miedzi(II), kadmu(II), wapnia(II) z kwasem gentyzynowym (2,5-dihydroksybenzoesowym; 2,5-dHB), które zostały opisane w publikacjach **H4**, **H5** i **H6**. Kwas gentyzynowy to roślinny związek fenolowy oraz aktywny metabolit przemian kwasu salicylowego. Wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznej takie jak przeciwzapalne, przeciwrheumatyczne, przeciwutleniające i przeciwbakteryjne.

Skład kompleksów określono metodą analizy elementarnej i termogravimetrycznej [**H4**]. Natomiast w przypadku Ca 2,5-dHB uzyskano dwie formy monokryształów, które poddano analizie rentgenograficznej [**H5** i **H6**]. Kompleksy miedzi(II) i kadmu(II) są czterowodne o sumarycznym wzorze $M(C_7H_5O_4)_2 \cdot 4H_2O$ (gdzie M - metal). Kompleks miedzi(II) ulega dehydratacji w zakresie temperatur 30-150°C, a następnie całkowitemu rozpadowi do CuO w temperaturze 150-410°C. Czterowodny kompleks kadmu(II) jest stabilny do 30°C, w wyższej temperaturze ulega dehydratacji tracąc 2,5 (30-140°C) i 1,5 cząsteczek wody (140-180°C). Stopniowy termiczny rozkład Cd(II) 2,5-dHB następuje w zakresie 180-415°C do CdO jako końcowego produktu rozpadu.

Gentyzynian wapnia występuje w dwóch formach krystalicznych o wzorze sumarycznym: struktura I - $[Ca(C_7H_5O_4)_2(H_2O)_6] \cdot H_2O$ [**H5**] (rys. 7) oraz struktura II - $Ca(C_7H_5O_4)_2(H_2O)_5$ [**H6**] (rys. 8). W obu przypadkach kation wapnia(II) jest koordynowany przez dwa ligandy gentyzynianu za pomocą jednopozycyjnych grup karboksylowych oraz pięciu [**H6**] lub sześciu [**H5**] cząsteczek wody. Grupy hydroksylowe nie biorą udziału w koordynacji kationu metalu, ale zaangażowane są w tworzenie szeregu wiązań wodorowych $O-H \cdots O$, które stabilizują strukturę. Oprócz międzycząsteczkowych wiązań wodorowych $O-H \cdots O$, grupa hydroksylowa O3-H3 uczestniczy w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu wodorowym z tlenem O1 grupy karboksylowej. Silne wiązania wodorowe z udziałem cząsteczek wody koordynacyjnej i sieciowej (w przypadku struktury I) pełnią główną rolę w tworzeniu struktury supramolekularnej, która dodatkowo stabilizowana jest słabymi oddziaływaniami $C-H \cdots O$ oraz oddziaływaniami warstwowymi typu π - π stacking pomiędzy pierścieniami fenyłowymi.

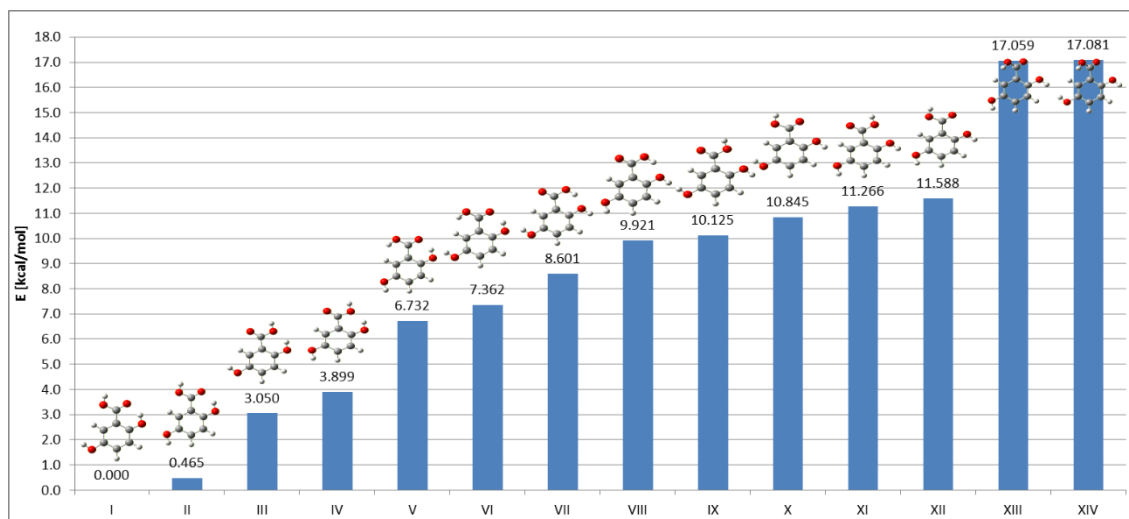


Rys. 7. Struktura krystaliczna $[Ca(C_7H_5O_4)_2(H_2O)_6] \cdot H_2O$ [H5].



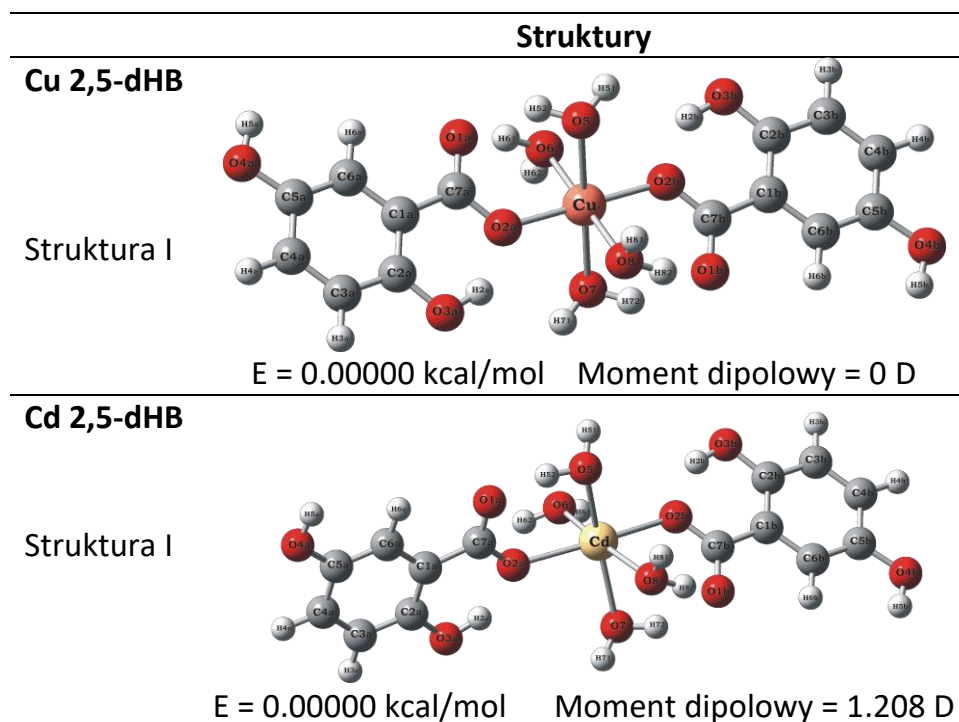
Rys. 9. Struktura krystaliczna $Ca(C_7H_5O_4)_2(H_2O)_5$ [H6].

W celu uzyskania parametrów strukturalnych dla kompleksów miedzi(II) i kadmu(II) przeprowadzono obliczenia w programie Gaussian 09W stosując metodę obliczeniową B3LYP/6-311++G(d,p). Obliczone struktury mają jednopozycyjny typ koordynacji przez grupę $-COO^-$. Dodatkowo kationy metali koordynowane są czterema cząsteczkami wody (zgodnie z wynikami analiz elementarnej i termogravimetrycznej), podobnie jak w przypadku literaturowej struktury Zn 2,5-dHB $[Zn(C_7H_5O_4)_2(H_2O)_4]$ [33]. W pierwszej kolejności policzono 14 struktur kwasu gentyzynowego (rys. 9).



Rys. 9. Policzone [B3LYP/6-311++G(d,p)] struktury kwasu gentyzynowego oraz ich energie w odniesieniu do energii konformeru o najniższej energii, tj. nr I [H4].

Struktury kwasu o najwyższej energii nie posiadały wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego (w.w.w.) (VII-XIV). Zaś te o najniższej energii (nr I i II) posiadały w.w.w., które stabilizowało struktury. Struktury I i II różniły się przestrzennym ułożeniem podstawnika -OH przy pierścieniu, przy atomie węgla nr 5. Konformer o najniższej energii posiada podstawniki -OH skierowane w kierunku grupy karboksylowej, tak jak to ma miejsce w przypadku struktury gentyzynianu wapnia (rys. 8 i 9) czy też eksperymentalnej struktury monokrystalicznej kwasu gentyzynowego [34]. Współczynnik korelacji liniowej pomiędzy teoretycznymi i eksperymentalnymi długościami wiązań wynosi $R=0,994$, natomiast dla wielkości kątów $R=0,962$. Chociaż w.w.w. zostały uwzględnione podczas obliczeń, to inne międzycząsteczkowe oddziaływania wodorowe zostały pominięte, co w dużej mierze wpłynęło szczególnie na różnicę między parametrami strukturalnymi grupy karboksylowej -COOH. W dalszej kolejności policzono struktury gentyzynianów kadmu(II), miedzi(II) i sodu(I) biorąc pod uwagę obydwa ligandy kwasu gentyzynowego o najniższej energii (I i II) (rys. 10). Typ kationu metalu decyduje o strukturze przestrzennej cząsteczki, parametrach geometrycznych i rozkładzie ładunku atomowego. Mimo takiego samego stopnia uwodnienia i sposobu koordynacji kationu metalu, gentyzyniany kadmu(II) i miedzi(II) różniły się przestrzennym ułożeniem obu ligandów. W przypadku Cu(II) 2,5-dHB oba ligandy leżą w jednej płaszczyźnie oraz parametry strukturalne (długości wiązań, wielkości kątów), rozkład ładunku NBO są identyczne dla obu cząsteczek (zarówno dla struktury I i II). W przypadku Cd(II) 2,5-dHB oba ligandy leżą w płaszczyźnie wzajemnie do siebie skróconej (o $121,10^\circ$ - struktura I; o $67,36^\circ$ - struktura II). Ponadto parametry strukturalne, rozkład ładunku atomowego NBO różnią się w przypadku obu ligandów w cząsteczkach Cd 2,5-dHB.



Rys. 10. Policzone [metodą B3LYP/6-311++G(d,p)] struktury przykładowych gentyzynyń [H4].

Zmiana kationu metalu w grupie karboksylanowej ligandu wpływa też na siłę wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych (w.w.w) O-H2...O2, których długość rośnie w serii: Na(I) 2,5-dHB→Cd(II) 2,5-dHB→Cu(II) 2,5-dHB→2,5-dHB (tj. 1,68Å→1,69-1,71Å→1,73Å→1,77Å; struktury I; rys. 10). Wielkość kąta C2-O3-H2 rośnie w serii: Cd(II)→Na(I)→Cu(II) 2,5-dHB→2,5-dHB. Obecność kationu metalu zwiększa siłę w.w.w. Najsilniejsze O-H2...O2 posiada sól sodowa (o jonowym typie wiązania metal-ligand). Rodzaj kationu metalu decyduje również o strukturze anionu karboksylanowego. Wielkość kąta O1-C7-O2 rośnie w serii: 2,5-dHB→Na(I)→Cd(II)→Cu(II) 2,5-dHB (tj. 108,0°→105,8°→105,5°→106,9°; struktury I, podobne zależności w przypadku struktur II), a sumaryczny ujemny ładunek atomowy NBO grupy COO⁻ rośnie w serii: 2,5-dHB→Cu(II)→Cd(II)→Na(I) 2,5-dHB (tj.-0,534e→-0,706e→-0,816e→-0,881e).

Wpływ metali na strukturę gentyzynyń widoczny jest również w różnicach pomiędzy widmami w podczerwieni (FT-IR), ramanowskimi (FT-Raman) oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H i ¹³C NMR) kwasu gentyzynowego i gentyzynyń. W widmach FT-IR i FT-Raman gentyzynyń pasma nr 8a, 8b, 7a, 13, 18b, 16a, 6a ulegają przesunięciu w stronę wyższych liczb falowych w porównaniu z widmem kwasu (tabela 3; rys. 11). Natomiast pasma 19a, 19b (z wyj. kompleksów wapnia), ν(CC) ~1420 cm⁻¹, 17b, 11, 12, 6b przesuwają się w stronę niższych liczb falowych w porównaniu do odpowiadających sobie pasm w widmie ligandu. Największym przesunięciom ulegają pasma pochodzące od drgań rozciągających pierścienia aromatycznego znajdujące się w zakresie 1650-1458

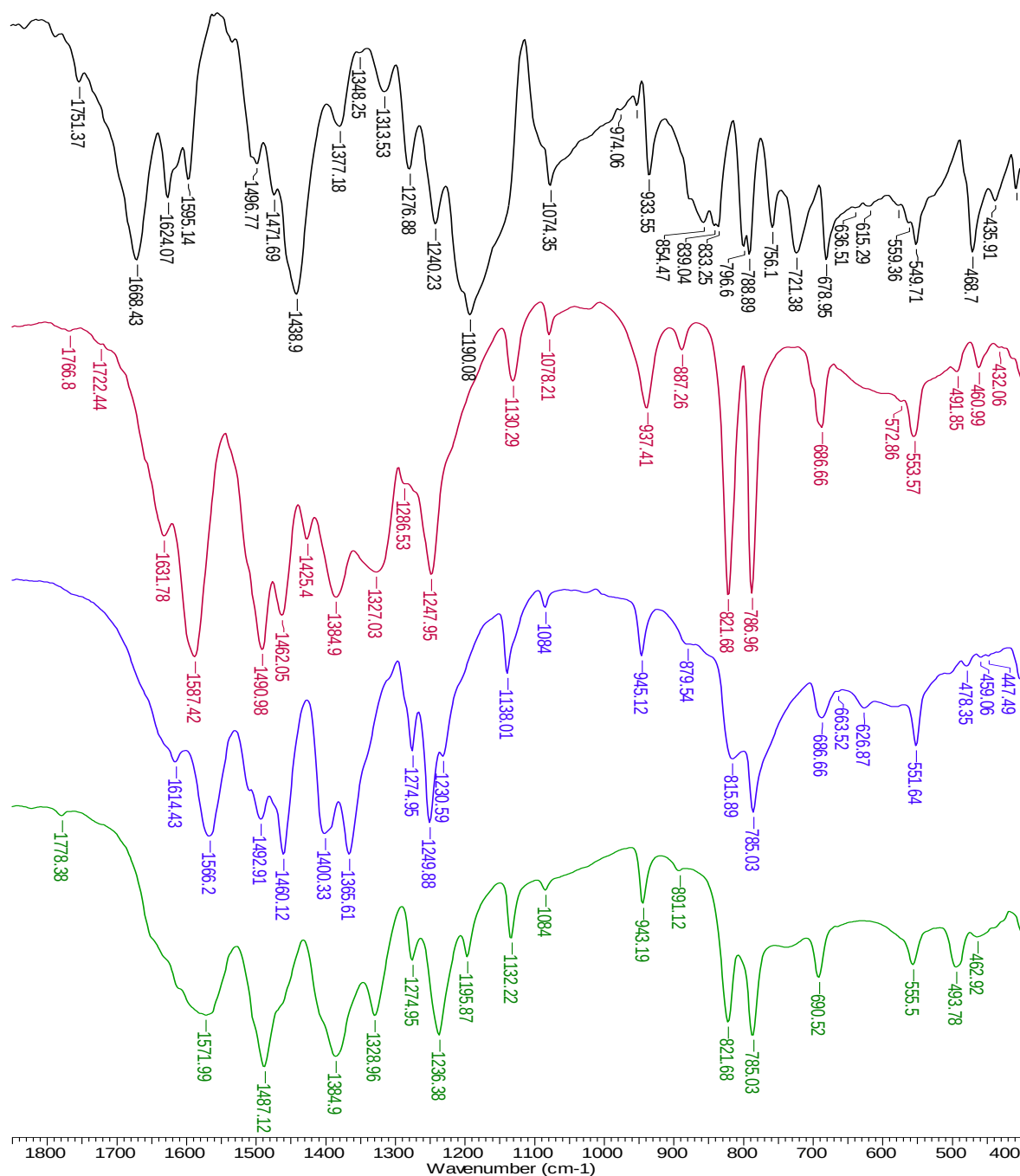
cm^{-1} (FT-IR), $1651\text{--}1455\text{ cm}^{-1}$ (FT-Raman), maksymalnie do 20 cm^{-1} . Obecność wody koordynacyjnej (na przykładzie gentyzynianów wapnia [**H5** i **H6**]) również wpływa na zmianę położenia pasm na widmach oscylacyjnych. Różnice w położeniu odpowiadających sobie pasm są maksymalnie $\sim 10\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 3. Liczby falowe [cm^{-1}], intensywności i przypisanie wybranych pasm z widm podczerwieni (IR) i ramanowskich (R) kwasu gentyzynowego (2,5-dHB) i gentyzynianów

2,5-dHB	Gentyzyniany					Przypisanie	
	Na(I)	Cu(II)	Cd(II)	Ca(II) [H8]	Ca(II) [H7]		
IR 1624 m*	1632 s		1650 sh	1632 m	1643 m	v(CC)	8b**
R	1642 w	1642 m	1651 vw	1640 w	1642 w		
IR 1595 m		1614 m	1611 sh	1612 w		v(CC)	8a
R 1609 m		1611 w			1611 w		
IR 1497 s	1491 vs	1493 s	1487 vs	1510 m	1506 m	v(CC)	19b
R 1473 m	1498 vw				1511 vw		
IR 1472 vs	1462 m	1460 vs	1462 sh	1460 m	1458 s	v(CC)	19a
R	1455 w	1459 vw		1459 m	1459 m		
IR 1314 w	1327 m	1326 sh	1329 s	1341 m	1352 s	v(CC)	14
R 1307 s		1329 w	1325 vw	1342 w	1343m		
IR 1074 m	1078 w	1084 s	1084 w		1088 vw	β (CH)	18b
R 1080 w	1083 w	1087 w	1090 vw	1087 vw	1087 vw		
IR 951 w	951 sh	945 m	943 m		947 vw	γ (CH)	17b
R 957 w	942 m		944 vw	945 w	945 vw		
IR 839 m	822 s	816 m	822 s	821 m	824 m	γ (CH)	11
R 834 w	817 vs	821 m	826 vw	823 m	825 s		
IR 797 s	787 s	785 s		783 m	785 m	α (CCC)	12
R 802 s	798 w	785 s		792 vw	793 vw		
IR 469 s	461 w	459 w				α (CCC)	6b
R 457 s	466 w	463 w					

* oznaczenie intensywności pasm: s – silne, m – średnie, w – słabe, vw – bardzo słabe, sh – na zboczu

** numeracja pasm według [31]



Rys. 11. Widma w podczerwieni dla (kolejno od góry): kwasu gentyzynowego, gentyzynianu sodu(I), gentyzynianu miedzi(II), gentyzynianu kadmu(II) w zakresie 1850-400 cm⁻¹ [H4].

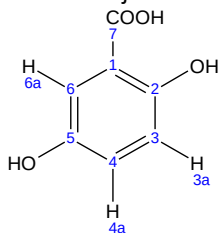
W przypadku widm ¹H i ¹³C NMR rejestrowanych w DMSO, stopień uwodnienia kompleksów nie odgrywa znaczącej roli (tabela 4). Maksymalna różnica w położeniu sygnałów na widmach ¹H NMR wynosi Δδ=0,08 ppm, natomiast na widmach ¹³C NMR Δδ=0,82 ppm i dotyczy atomu węgla C7. Wzrost wartości sygnałów pochodzących od C1, C3, C6 i C7 na widmach gentyzynianów

w porównaniu z widmem kwasu oznacza spadek gęstości elektronowej wokół tych atomów w cząsteczkach gentyzynianów. Największy spadek gęstości elektronowej następuje wokół atomu C1 w kompleksach w porównaniu z ligandem. Biorąc pod uwagę obliczony teoretycznie rozkład ładunku atomowego NBO dla cząsteczek kwasu gentyzynowego oraz jego kompleksów z kadmem(II) i miedzią(II) zauważalny jest spadek gęstości elektronowej wokół atomów C1 (tj. 2,5-dHB: -0,235e; Cu 2,5-dHB: -0,215e; Cd 2,5-dHB: -0,216e), C6 (tj. 2,5-dHB: -0,228e; Cu 2,5-dHB: -0,189e; Cd 2,5-dHB: -0,190e) i C7 (tj. 2,5-dHB: 0,796; Cu 2,5-dHB: 0,810e; Cd 2,5-dHB: 0,810e). W przypadku pozostałych atomów węgla zaobserwowano wzrost gęstości elektronowej w cząsteczkach kompleksów w porównaniu z ligandem.

Tabela 4. Wartości sygnałów [ppm] na widmach ^1H i ^{13}C NMR kwasu gentyzynowego (2,5-dHB) i gentyzynianów wapnia

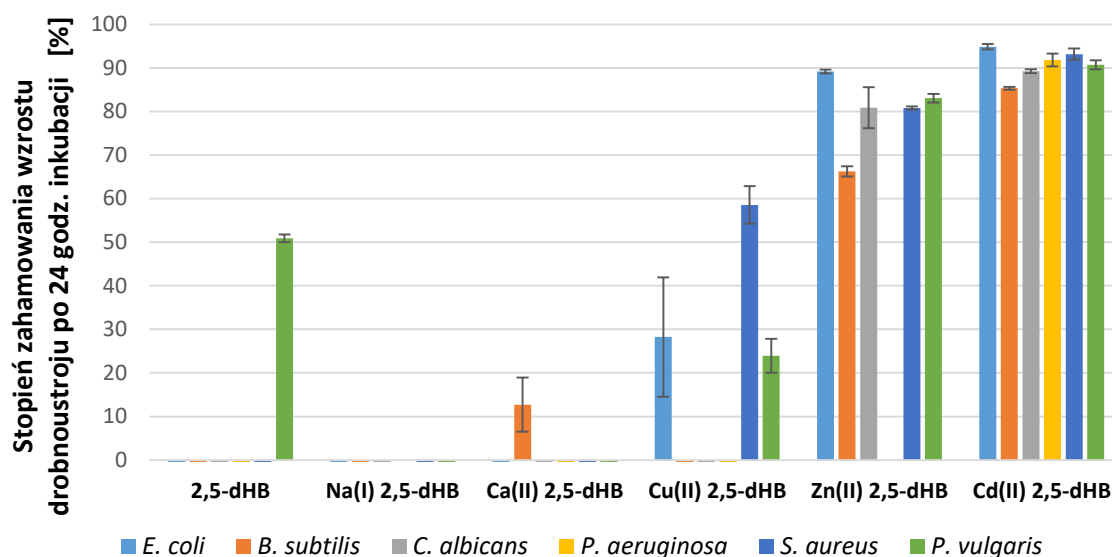
	Ca 2,5-dHB [H5]	Ca 2,5-dHB [H6]	2,5- dHB		Ca 2,5-dHB [H5]	Ca 2,5-dHB [H6]	2,5- dHB
H6a *	6,51	6,47	6,78	C7	172,88	172,06	171,82
H4a	6,67	6,63	6,96	C5	154,56	154,76	154,22
H3a	7,21	7,18	7,17	C2	147,99	147,76	149,48
C5-OH			10,70	C4			123,85
C2-OH	8,64	8,56	9,15	C6	119,67	120,29	117,86
COOH			13,30	C1	119,55	119,10	114,67
				C3	115,91	115,72	112,69

* numeracja atomów

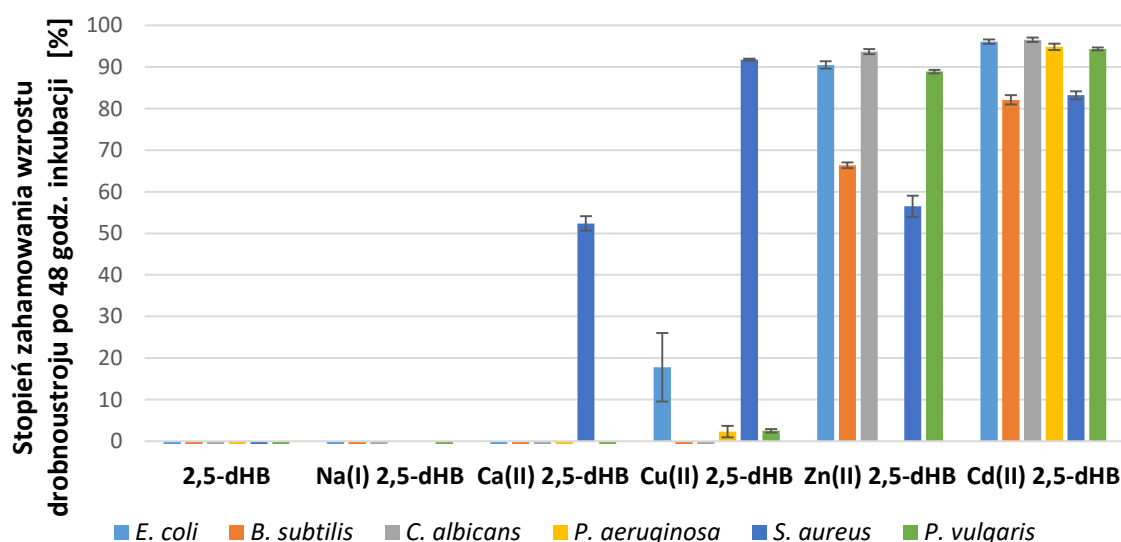


Przeprowadzono badania aktywności mikrobiologicznej kwasu gentyzynowego i jego związków z metalami (rys. 12 i 13). Spośród badanych związków tylko gentyzyniany cynku i kadmu wykazywały wyraźnie właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze. Stopień zahamowania wzrostu drobnoustrojów po 24 godzinach inkubacji był na poziomie $I_{24h}=57-94\%$ w przypadku gentyzynianu cynku oraz $I_{24h}=82-97\%$ w przypadku gentyzynianu kadmu. Oba związki najslabiej działały przeciwko *B. subtilis* i *S. aureus*. Gentyzynian miedzi posiadał silne właściwości bakteriobójcze w stosunku do *S. aureus* (po 24 godzinach inkubacji $I_{24h}=59\%$; po 48 godzinach inkubacji $I_{24h}=92\%$). Gentyzynian wapnia wykazywał najsilniejszą aktywność biologiczną również przeciwko *S. aureus* po 48 godzinach

inkubacji ($I_{48h}=52\%$). Kwas gentyzynowy jedynie w przypadku *P. vulgaris* wykazywał właściwości hamujące wzrost drobnoustrojów na poziomie około 50% w porównaniu do hodowli bulionowej bez dodatku testowanego związku. Gentyzynian sodu nie posiadał właściwości bakteriobójczych i grzybobójczych przeciwko użytym w badaniach mikroorganizmom.



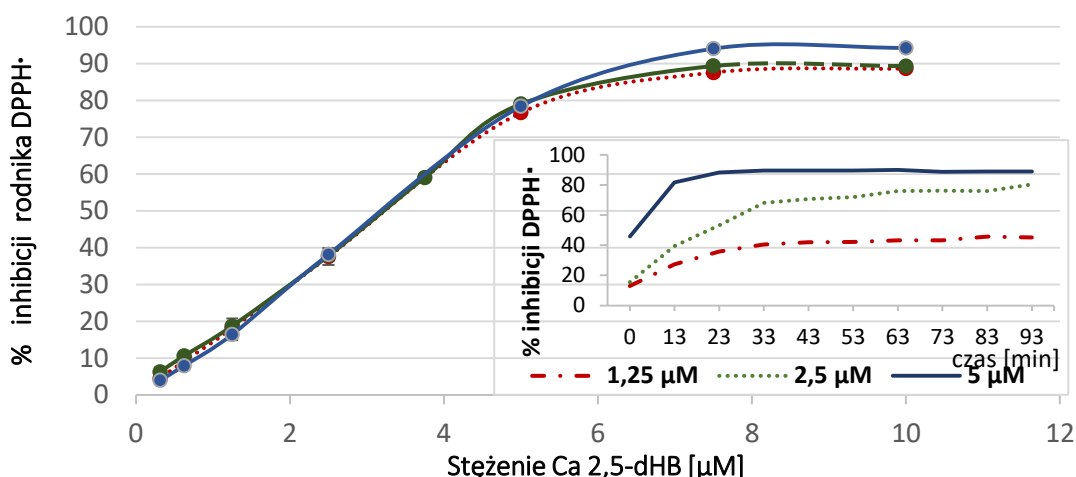
Rys. 12. Stopień zahamowania wzrostu drobnoustrojów [%] przez kwas gentyzynowy (2,5-dHB) oraz jego kompleksy i sól sodową po 24 godzinach inkubacji.



Rys. 13. Stopień zahamowania wzrostu drobnoustrojów [%] przez kwas gentyzynowy (2,5-dHB) oraz jego kompleksy i sól sodową po 48 godzinach inkubacji.

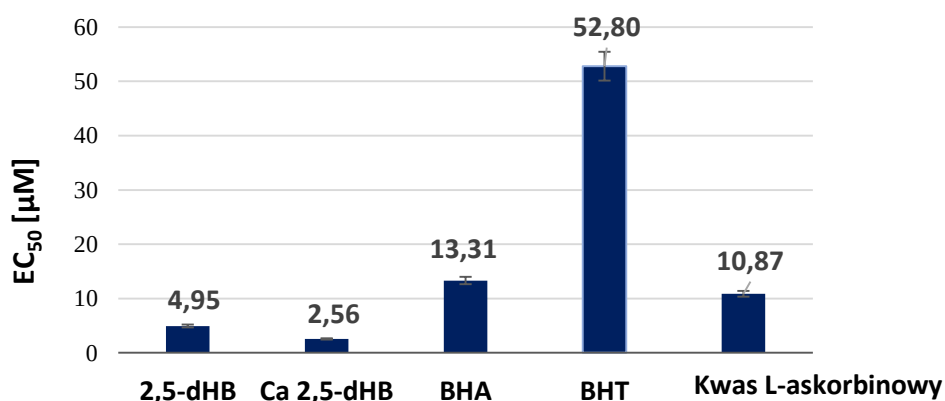
Biorąc pod uwagę wyraźną, choć nie do końca poznaną, zależność pomiędzy aktywnością przeciwdrobnoustrojową a pro-/antyoksydacyjną roślinnych związków fenolowych, rozszerzyłam swoje badania o metodyki pozwalające na ocenę właściwości antyoksydacyjnych, a w dalszej kolejności pro-oksydacyjnych związków kompleksowych. W pierwszej kolejności wybrałam kwas gentyzynowy i jego kompleks z wapniem ze względu na jego dobrą rozpuszczalność w wodzie. Sam kwas gentyzynowy wykazuje lepsze właściwości antyrodnikowe w stosunku do rodników ponadtlenkowych niż inne kwasy dihydroksybenzoesowe [35]. Równie dobre właściwości co 2,5-dHB posiadają również kwasy 2,3- i 3,4-dHB, ponieważ wzajemne ułożenie podstawników OH w pozycji *orto* oraz obecność wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy grupami -OH ułatwia przeniesienie protonu z grupy hydroksylowej do rodnika. Natomiast jony wapnia pełnią ważną rolę w regulacji funkcji życiowych komórki. Wykazują dużą reaktywność w stosunku do składników komórki, reagując zarówno z drobno- jak i wielkocząsteczkowymi związkami (w tym z białkami, DNA, jonami fosforanowymi) [36]. Jony wapnia wpływają na wiele szlaków metabolicznych komórki, w tym biorą udział w procesach oddychania komórkowego, którym towarzyszą reakcje wolnorodnikowe. Zależność pomiędzy stężeniem jonów wapnia w komórce a reaktywnymi formami tlenu są intensywnie badane ze względu na zaangażowanie jonów Ca^{2+} w procesy powstawania i rozwoju nowotworu. Badania literaturowe dowodzą, że kompleksy wapnia mogą mieć potencjalne znaczenie jako substancje antyrakowe. Np. 2-, 3- i 4-hydroksybenzoesany wapnia przy stężeniu $0,5 \text{ mmol/dm}^3$ indukują apoptozę komórek rakowych MCF-7, MCF-10A, MDA-MB231 [37]. Kompleksowanie jonami wapnia kwasu ibandronowego zwiększa jego stężenie wewnątrzkomórkowe oraz działanie przeciwrakowe w stosunku do linii komórek MCF-7 oraz innych [38, 39]. Dlatego zarówno rodzaj ligandu jak i kation metalu decydują o właściwościach fizykochemicznych jak i biologicznych utworzonego kompleksu. Podjęte badania dawały szansę na zmianę właściwości antyoksydacyjnych ligandu w wyniku jego kompleksowania jonami Ca (II).

Aktywność antyoksydacyjną kwasu gentyzynowego i gentyzynianu wapnia oceniono stosując metody: a) z rodnikiem DPPH $\cdot$ (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu), (b) FRAP (ang. *ferric reducing antioxidant power*) polegającą na ocenie zdolności redukcji jonów Fe (III) oraz (c) CUPRAC (ang. *cupric ion reducing antioxidant capacity*) – poprzez oznaczenie zdolności do redukcji jonów Cu (II) przez antyutleniacze [H6]. Pierwsza metodyka przebiega z użyciem roztworu rodnika DPPH $\cdot$, którego maksimum absorpcji występuje przy długości fali 516 nm. Reakcja rodnika z antyoksydantem powoduje redukcję DPPH $\cdot$, co zmienia barwę roztworu z fioletowej na żółtą. Doświadczenie przeprowadza się dla kolejnych dobranych stężeń badanych związków, dokonując pomiaru absorpcji roztworu po określonych czasie. Wyniki przedstawia się w postaci graficznej jak na rys. 14, wykreślając zależność stężenia związku od $\%I = [(A_{\text{kontrola}} - A_{\text{próbna}}) / A_{\text{kontrola}}] \cdot 100\%$.



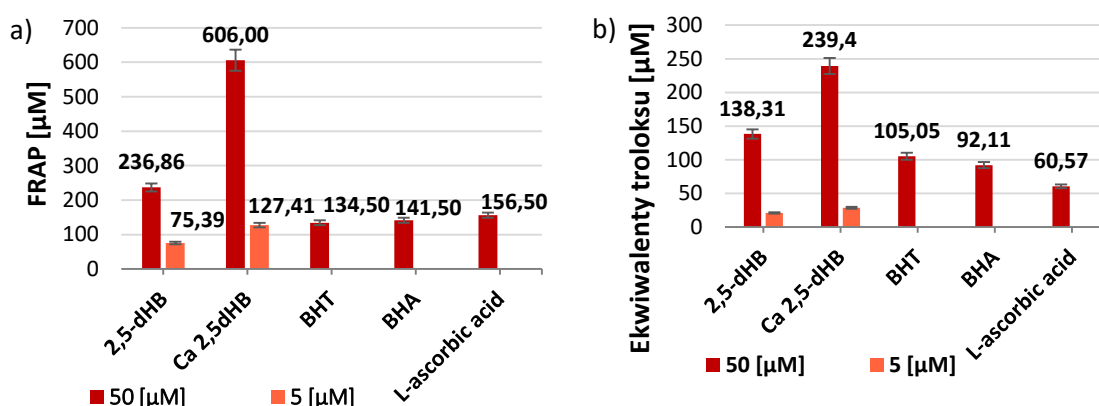
Rys. 14. Wykres aktywności przeciwrodnikowej gentyzyny wapnia (Ca 2,5-dHB) wyrażonej procentem inhibicji rodnika DPPH• [H6].

Na podstawie krzywych zależności %I od stężenia związku oblicza się parametr EC_{50} wskazujący stężenie antyoksydantu, które powoduje spadek początkowego stężenia DPPH• o 50% (rys. 14, 15). Im niższa wartość EC_{50} tym lepsze właściwości antyrodnikowe wykazuje dany związek. Spośród badanych substancji najniższą wartość EC_{50} uzyskałam dla Ca 2,5-dHB ($EC_{50}=2,56 \mu\text{mol/dm}^3$). Świadczy to, że związek ten posiada lepsze właściwości antyrodnikowe niż pozostałe badane substancje [w tym kwas gentyzynowy; BHA (mieszanina 3-*tert*-butylo-4-hydroksyanizolu i 2-*tert*-butylo-4-hydroksyanizolu; butylowany hydroksyanizol); BHT (2,6-di-*tert*-butylo-6-metylofenol; butylowany hydroksytoluen) i kwas L-askorbinowy].



Rys. 15. Aktywność antyrodnikowa kwasu gentyzynowego (2,5-dHB), gentyzyny wapnia (Ca 2,5-dHB) oraz syntetycznych antyutleniaczy BHA, BHT i kwasu L-askorbinowego w stosunku do DPPH• wyrażona parametrem EC_{50} [H6].

Metodyki FRAP i CUPRAC również opierają się zmianie barwy roztworów reakcyjnych. FRAP polega na redukcji przez antyoksydanty jonów Fe(III) do Fe(II), które koordynacyjnie połączone z 2,4,6-tri(2-pirydylo)-s-1,3,5-triazyną (TPTZ) tworzą kompleks o barwie niebieskiej. W teście CUPRAC wykorzystuje się reakcję redukcji jonów Cu(II) do Cu(I) w postaci kompleksu z neokuproiną (2,9-dimetylo-1,10-fenantroliną) o barwie pomarańczowo-żółtej. Wynik końcowy oznaczenia przelicza się ilość jonów Fe(II) lub na ekwiwalenty troloksu (kwasu 6-hydroksy-2,3,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowego) wyrażony w jednostkach stężenia molowego. Im wyższe są uzyskane parametry, tym lepsze właściwości redukcyjne posiada dany antyutleniacz. Wyniki obu metod wskazały, że Ca 2,5-dHB wykazał lepsze właściwości antyutleniające niż 2,5-dHB (rys. 16) oraz inne powszechnie stosowane antyutleniacze.



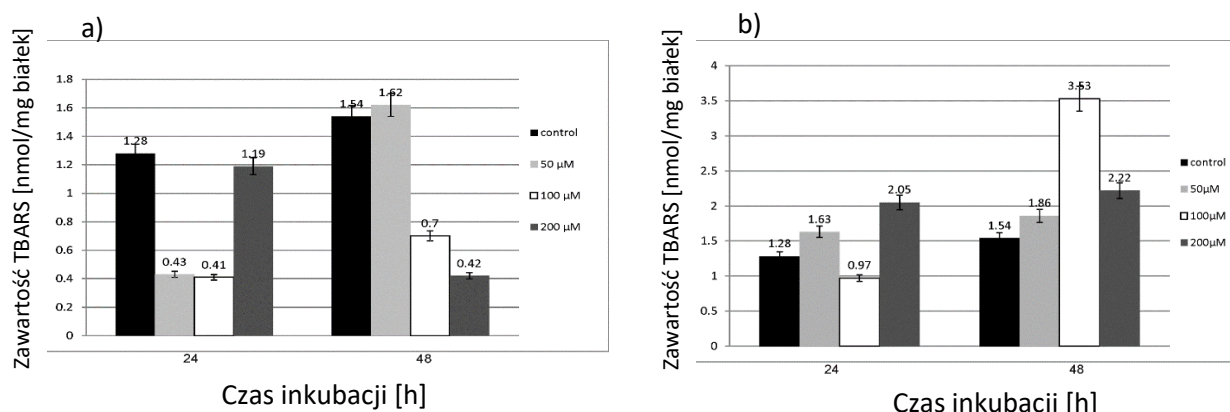
Rys. 16. Aktywność antyoksydacyjna badanych związków określona jako zdolność redukcji (a) jonów Fe(III) (zgodnie z metodyką FRAP), (b) jonów Cu(II) (zgodnie z metodyką CUPRAC) [H6].

Biorąc pod uwagę, że mechanizmy działania antyoksydantów związane są z przeniesieniem atomu wodoru lub/i pojedynczego elektronu, podejmowane są próby przewidywania aktywności związków fenolowych na podstawie liczonych parametrów takich jak, np. potencjał jonizacji, czy też energia orbitali HOMO (najwyższy obsadzony orbital molekularny) i LUMO (najniższy nieobsadzony orbital molekularny), które opisują reaktywność związku [40, 41]. Wyższa wartość energii orbitalu HOMO oznacza większą zdolność cząsteczki do oddania elektronu. Natomiast, mniejsza wartość energii LUMO oznacza większą łatwość przyjęcia elektronu. Stosując przybliżenie można policzyć potencjał jonizacji jako ujemną wartość energii orbitalu HOMA, oraz powinowactwo elektronowe jako ujemną wartość energii LUMO. Parametry te często używane są w celu wstępnego oszacowania aktywności antyutleniającej związków fenolowych oraz miejsc aktywnych w strukturach cząsteczek zaangażowanych w reakcje wolnorodnikowe [42]. Policzone dla Ca 2,5-dHB orbitale HOMO są w większym stopniu zlokalizowane na podstawnikach hydroksylowych przy pierścieniu niż orbitale LUMO, co sugeruje ich zaangażowanie w reakcjach przebiegających z

przeniesieniem elektronu. Wykonane obliczenia wskazują, że kompleks wapnia posiada wyższą energię orbitalu HOMO (-5.7054 eV), niższy potencjał jonizacji (5,7054 eV) niż kwas gentyzynowy (-8.1909 eV i 8.1909 eV, odpowiednio). Niższy potencjał jonizacji policzony dla Ca 2,5-dHB wskazuje, że jest on lepszym donorem elektronów w porównaniu do 2,5-dHB.

W literaturze brak jest jednoznacznych zależności między wpływem metali na wzrost lub spadek aktywności antyoksydacyjnej ligandu. Generalnie zmiany aktywności antyoksydacyjnej ligandu pod wpływem kompleksowania, tłumaczy się wpływem kationu metalu na: (a) rozkład gęstości elektronowej ligandu, w tym na takie parametry ligandu jak np. potencjał jonizacji, powinowactwo elektronowe, energia wiązania -OH, które określają łatwość oderwania elektronu od cząsteczki antyutleniacza; (b) potencjał redoks ligandu, a zatem i na jego zdolność do zmiatania wolnych rodników [6,7]; (c) kinetykę reakcji związku kompleksowego z rodnikiem np. DPPH• [43, 44].

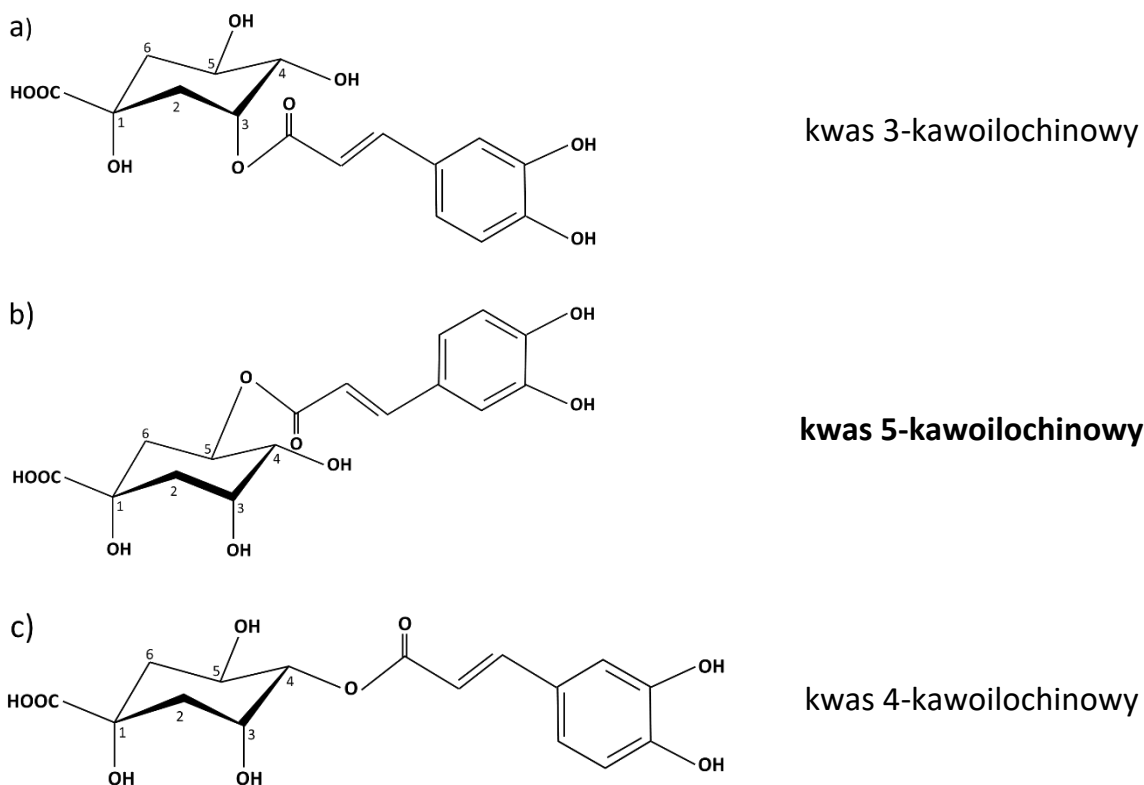
Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki wskazujące, że obecność kationu wapnia zwiększa aktywność antyoksydacyjną 2,5-dHB wykonano badania *in vitro* na liniach komórek rakowych ludzkiego gruczołakoraka piersi MCF-7. W badaniach wzięto pod uwagę stężenia związków w zakresie 50-400 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Ze wzrostem stężenia wzrastał stopień zahamowania proliferacji komórek w zakresie od 3 do 86%. Przy stężeniu 400 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ badane związki znacząco zmniejszały żywotność komórek w porównaniu do próby kontrolnej, tj. o 82% (po 24 godz. inkubacji) i 92% (po 48 godz. inkubacji) w przypadku Ca 2,5-dHB, oraz o 86% (po 24 godz. inkubacji) i 91% (po 48 godz. inkubacji) w przypadku 2,5-dHB. Określono parametry stresu oksydacyjnego w komórkach mierząc poziom peroksydacji lipidów oraz oksydacyjnych uszkodzeń białek. Poziom peroksydacji lipidów oznaczono spektrofotometrycznie jako stężenie dialdehydu malonowego – związku, który jest końcowym produktem peroksydacji lipidów – tworzącego z kwasem tiobarbiturowym (TBA) barwny kompleks (TBARS). Stopień uszkodzenia białek w komórkach określono oznaczając zawartość grup tiolowych białek (-SH). Reakcja ta polegała na reakcji kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego) z grupami tiolowymi białek. W wyniku tej reakcji uwalnia się anion 5-tio-2-nitrobenzoesanowy o barwie żółtej, który oznaczono spektrofotometrycznie. Badania wykazały, że o ile 2,5-dHB zmniejszał poziom peroksydacji lipidów (zachowując się jak antyoksydant), o tyle Ca 2,5-dHB zwiększał poziom peroksydacji lipidów (rys. 17). Badane związki spowodowały zmniejszenie zawartości grup tiolowych białek, co oznacza wzrost poziomu ich uszkodzeń w komórkach. Szczególnie istotne zmniejszenie zawartości grup tiolowych spowodowane zostało przez Ca 2,5-dHB po 48 godz. inkubacji przy stężeniu 50 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (spadek o 32% w odniesieniu do próby kontrolnej), 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (spadek o 40%), a zwłaszcza 200 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (spadek o 64%). Badania wykazały, że przy badanych stężeniach powodujących zahamowanie proliferacji komórek MCF-7, oba związki zwiększają stres oksydacyjny w komórkach. Kompleksowanie kwasu gentyzynowego jonami wapnia zwiększyło jego właściwości pro-oksydacyjne.



Rys. 17. Wpływ 2,5-dHB (a) oraz Ca 2,5-dHB (b) na zawartość TBARS w komórkach MCF-7 po 24 i 48 godzinach inkubacji [nmol/mg białka] [H6].

6.3. Kwas chlorogenowy (kwas 5-kawoilochinowy; 5-CQA) - badania strukturalne, spektroskopowe oraz przeciwdrobnoustrojowe [H7, H8]

Kwas 5-kawoilochinowy, zwyczajowo nazywany kwasem chlorogenowym (5-CQA,) jest jednym z najobficiej występujących fenolokwasów roślinnych w diecie człowieka. Kwasy 3-kawoilochinowy (3-CQA) i 4-kawoilochinowy (4-CQA) występują w mniejszych ilościach. Kwasy kawoilochinowe są estrami kwasów chinowego i kawowego (rys. 18). Wszystkie trzy kwasy (rys. 19) nazywa się ogólnie kwasami chlorogenowymi (CGA), chociaż nazwa ta dotyczy grupy znacznie bardziej zróżnicowanej strukturalnie, tj. mono-, di-, tri- lub tetraestrów jednej lub kilku cząsteczek kwasów hydroksycynamonowego i chinowego. Kwasy CGA posiadają liczne korzystne dla zdrowia właściwości biologiczne, w tym antyoksydacyjne [45-47], przeciwdrobnoustrojowe [48], neuroprotektoryjne [49], przeciwrakowe [50, 51] i przeciwzapalne [52.]. Kwas 5-CQA wykazuje szerokie spektrum działania w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz grzybów i drożdży (tabela 2 z [H8]). Kwas 5-CQA jest również skutecznym zmiataczem rodnika hydroksylowego $\cdot\text{OH}$ (stała szybkości reakcji z rodnikiem $\cdot\text{OH}$ $k = 7,73 \cdot 10^9 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{s})$), jednego z najbardziej reaktywnych rodników tlenowych, który powoduje uszkodzenia błony komórkowej, kwasów nukleinowych, utlenianie lipidów, a także zaburzenia metaboliczne [53]. Kwas 5-CQA okazał się również skuteczny w stosunku do anionorodnika ponadtlenkowego $\text{O}_2^{\cdot-}$ oraz nadktlenoazotanu(III) (ONOO^-) [54]. W tabeli 3 artykułu [H8] przedstawiono właściwości antyrodnikowe 5-CQA w stosunku do wybranych rodników.



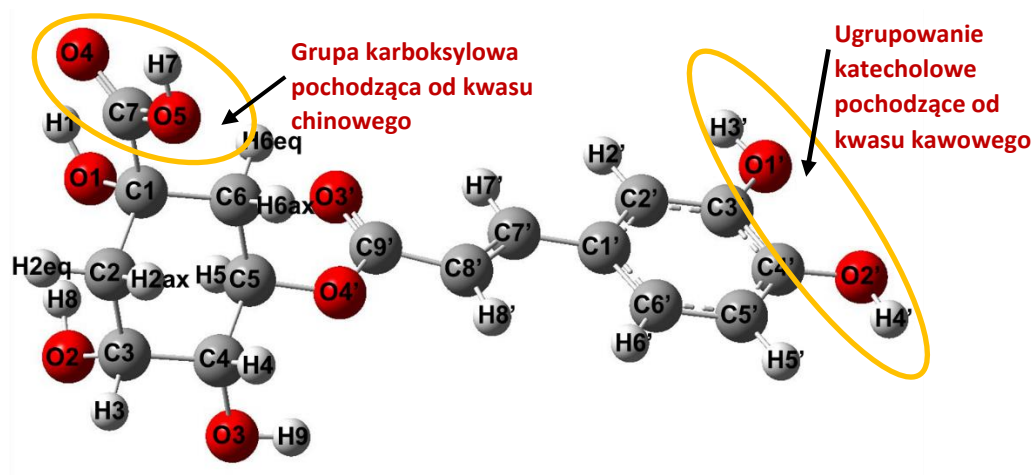
Rys. 18. Struktury kwasów chlorogenowych (CGA).

Biorąc pod uwagę cenne właściwości biologiczne oraz naturalne pochodzenie kwasu chlorogenowego, został on wybrany do dalszych badań strukturalnych, spektroskopowych i biologicznych [H7]. W dalszej kolejności utworzono sole litowców w kwasem chlorogenowym i porównano ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne z wyjściowym ligandem [H9].

W literaturze jest sporo danych dotyczących przypisania widm spektroskopowych kwasu chlorogenowego. Ich interpretacja i użyteczność jest jednak ograniczona ze względu na pewne nieporozumienie wynikające ze zmiany numeracji pierścienia chinowego ogłoszone w 1976 r. przez IUPAC [55]. Nowa nomenklatura różni się od poprzedniej tylko zamienną numeracją dwóch atomów węgla w pierścieniu kwasu chinowego (tj. C3 i C5). Dlatego dawniej nazywany kwas 3-CQA od 1976 r. jest kwasem 5-CQA (i na odwrót). Pomimo zaleceń IUPAC nadal istnieją nieporozumienia dotyczące terminologii kwasów kawoilochinowych. To prowadzi do wielu niespójności i błędów przy porównywaniu danych literaturowych. Wciąż istnieją artykuły, w których izomer 3-CQA nazywa się kwasem chlorogenowym, a numeracja i opis zawarty w tych artykułach wskazuje na izomer 5-CQA [56, 57]. Niektórzy autorzy używają tylko nazwy zwyczajowej: kwas chlorogenowy i nie precyzują do którego izomeru odnoszą się publikowane dane [58, 59]. Ze względu na błędy w nomenklaturze i stereochemii kwasu chlorogenowego przeprowadziłam jego badania spektroskopowe [tj. ^1H i ^{13}C NMR, 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR, FT-IR, FT-IR_{ATR},

FT-Raman, UV]. Dane eksperymentalne zostały poparte obliczeniami (optymalizacja struktury, obliczenia ładunków atomowych NBO i APT, teoretyczne widma IR i NMR) w B3LYP/6-311++G(d,p). Ww. metody spektroskopowe są zwykle używane w identyfikacji i analizie strukturalnej biologicznie czynnych związków izolowanych z ekstraktów roślinnych bogatych w izomery kwasu chlorogenowego. Dlatego prawidłowe przypisanie widm spektroskopowych 5-CQA pozwala na jego prawidłową identyfikację. Policzona struktura 5-CQA znajduje się na rys. 19. Obliczenia przeprowadzono na wyższym poziomie [tj. B3LYP / 6-311 ++ G (d, p)] w porównaniu do danych opublikowanych dotychczas dla 5-CQA [60].

W strukturze 5-CQA pierścień chinowy i pierścień kwasu kawowego są ustawione w pozycji trans względem siebie i wiązania podwójnego C7'=C8'. Obliczenia przeprowadzone były dla izolowanej cząsteczki, podczas gdy w układzie rzeczywistym struktura krystaliczna stabilizowana jest oddziaływaniami międzycząsteczkowymi, głównie o charakterze wiązań wodorowych.

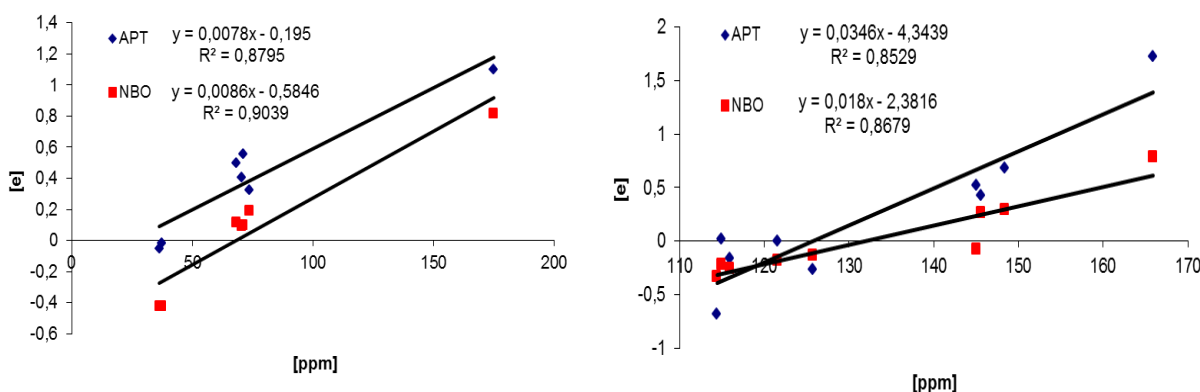


Rys. 19. Policzona struktura kwasu 5-CQA (kwasu chlorogenowego) metodą B3LYP / 6-311 ++ G (d, p); energia: -1297,95259 Hartree (-814477.43930 kcal/mol) [H7].

W przypadku obliczonej struktury 5-CQA istnieje możliwość tworzenia się wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy atomami O-H...O, tj. O2-H8...O1 (1,978 Å), O1-H1...O4 (2,042 Å). Te dwa wiązania wodorowe różnią się wartościami ładunków atomowych zgromadzonych na atomach wodoru i tlenu, tj. O1 (NBO: -0,789 e; APT: -0,644 e), O4 (NBO: -0,628 e; APT: -0,771 e) i H8 (NBO: 0,488 e; APT: 0,327 e), H1 (NBO: 0,502 e; APT: 0,325 e). Natomiast policzona różnica pomiędzy ładunkami atomowymi (Δe) zgromadzonymi na tlenach i wodorach obu wiązań wodorowych jest sobie bliska i wynosi: 1,277 e (NBO), 0,971 e (APT) dla wiązania O2-H8...O1 i 1,13 e (NBO), 1,096 e (APT) dla O1-H1...O4. Słabe wiązania wodorowe typu C-H...O prawdopodobnie występują pomiędzy atomami C3-H3...O2 (2,009 Å), C4-H4...O3 (2,067 Å). Ładunki

zgrupowane na O2 i O3 są sobie bliskie i wynoszą odpowiednio: -0,770 e (NBO), -0,639 e (APT) i -0,750 e (NBO), -0,634 e (APT). To samo dotyczy wodorów H3 (NBO: 0,195 e; APT: -0,055 e) i H4 (NBO: 0,180 e; APT: -0,071 e). To wskazuje, że siła i symetria tych dwóch wiązań są podobne. Kąt pomiędzy atomami O2-C3-H3 (105,54°) jest mniejszy (wiązanie C3-H3...O2 jest krótsze, silniejsze niż C4-H4...O3) niż pomiędzy O3-C4-H4 (109,72°).

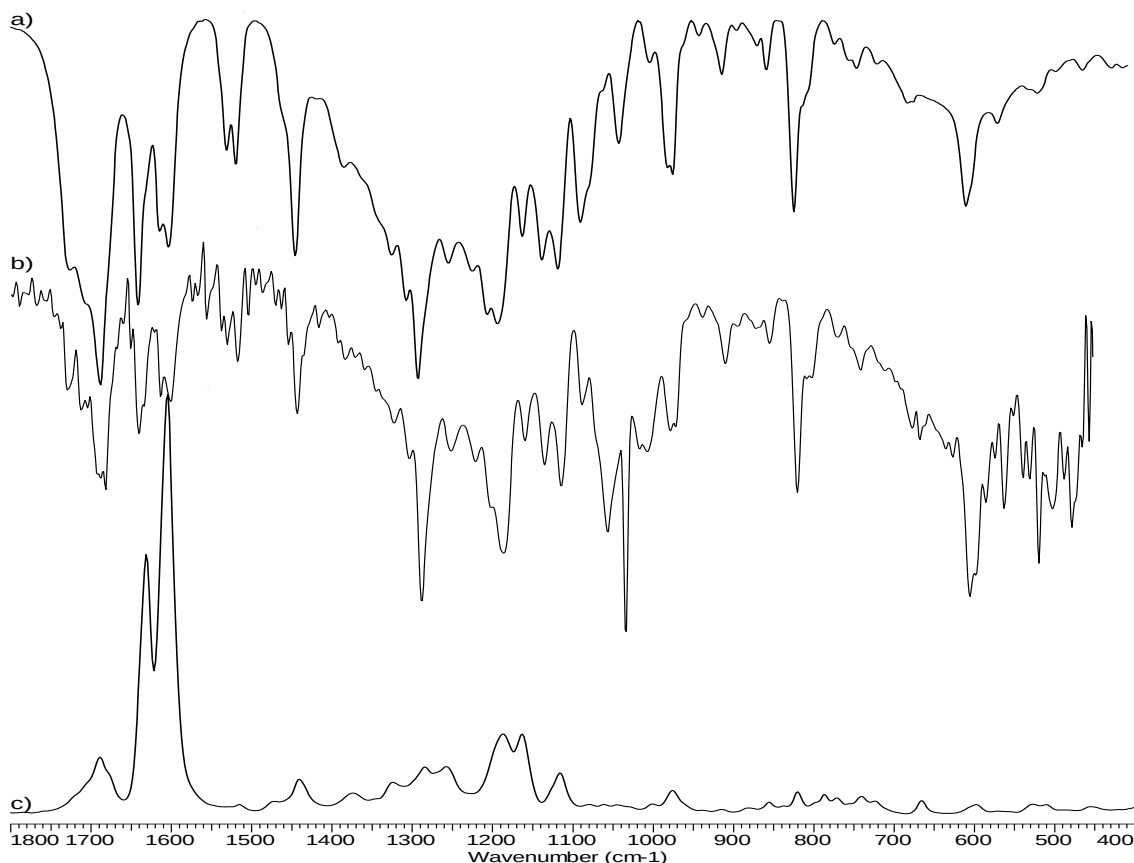
Ładunki atomowe policzone metodami APT i NBO dobrze korelują z wartościami przesunięć chemicznych z widm eksperymentalnych ^{13}C NMR kwasu chlorogenowego (rys. 20). Najlepszą liniową korelację uzyskano dla ładunków obliczonych metodą NBO. Sugeruje to, że wyniki rozkładu ładunku atomowego uzyskano metodą NBO lepiej (niż APT) odzwierciedlają rozkład ładunku na atomach węgla. Obecność międzycząsteczkowych wiązań wodorowych w rzeczywistej strukturze powoduje różnice pomiędzy obliczonymi i doświadczalnie uzyskanymi danymi strukturalnymi i spektralnymi, zwłaszcza dla protonów grup hydroksylowych. Dlatego też nie przeprowadzono korelacji pomiędzy eksperymentalnymi przesunięciami chemicznymi z widm ^1H NMR a teoretycznymi ładunkami atomowymi.



Rys. 20. Liniowa korelacja pomiędzy policzonymi ładunkami atomowymi APT i NBO dla węgla pierścienia kwasu chinowego (po lewej) i dla węgla pierścienia kwasu kawowego (po prawej) a wartościami przesunięć chemicznych z eksperymentalnych widm ^{13}C NMR kwasu chlorogenowego [H7].

W dalszej kolejności zarejestrowano widma w podczerwieni i ramanowskie dla 5-CQA przypisując je głównie na podstawie policzonych widm w podczerwieni (rys. 21). Uzyskano dobrą zgodność pomiędzy teoretycznymi skalowanymi i eksperymentalnymi liczbami falowymi. Szczegółowa analiza widm znajduje się w tabeli 2 publikacji [H7]. Pasma przy 1733 (teor.), 1725 (IR_{KBr}) i 1723 (IR_{ATR}) cm^{-1} przypisano drganiom rozciągającym C=O grupy karboksylowej. Następne pasmo [1704 (teor.), 1687 (IR_{KBr}), 1687 (IR_{ATR}) i 1689 (Raman) cm^{-1}] pochodzi od drgań rozciągających C=O grupy estrowej. Te dwa oscylacje są „czyste”, ponieważ wkład tych pojedynczych drgań jest na poziomie 80%. Następne pasma przy 1629 (teor.), 1640 (IR_{KBr}), 1638 (IR_{ATR}) i 1630 (Raman) cm^{-1}

przypisane są drganiom rozciągającym pierścienia aromatycznego. Poniżej tego zakresu trudno jest znaleźć pasma, które można przypisać konkretnym częstościom grupowym – drgania są albo mocno zdelokalizowane na całej cząsteczce, albo wkład drgań lokalnych w drganie normalne nie przekracza 25%. Jest to typowe dla zakresu daktyloskopowego, który z tego powodu jest trudnym do interpretacji obszarem widma.



Rys. 21. Eksperymentalne widma FT-IR (KBr) (a), FT-IR ATR (b) and FT-Raman (c) kwasu chlorogenowego [H7].

Uzyskałam dobrą korelację pomiędzy eksperymentalnymi i teoretycznymi widmami ^1H i ^{13}C NMR kwasu chlorogenowego. Współczynniki korelacji liniowej wyniosły $R^2 = 0,997$ (w przypadku ^{13}C NMR) oraz $R^2 = 0,991$ (^1H NMR). W korelacji nie uwzględniłam przesunięć chemicznych protonów H7, H3' i H4' ze względu na ich udział w wiązaniach wodorowych. Chociaż istnieje kilka doniesień literaturowych dotyczących interpretacji widm NMR 5-CQA najczęstsze błędy dotyczą przypisania sygnałów pochodzących od trzech par węgli C-2/C-6, C-4/C-5, C-2'/C-8'). Natomiast przypisania protonów H7, H3' i H4' rzadko pojawiają się w literaturze ze względu na ich udział w wewnątrzcząsteczkowych wiązaniach wodorowych i wpływ rozpuszczalników na położenie i intensywność sygnałów. Ponadto zastosowanie różnych rozpuszczalników wpływa na konformację cząsteczkową oraz na przesunięcia i sprzężenia w widmach NMR. Dlatego przypisanie widm NMR dla 5-CQA jest skomplikowane i może być nieprawidłowe, zwłaszcza w oparciu tylko o dane literaturowe.

Tabela 5. Eksperymentalne i teoretyczne przesunięcia chemiczne z widm ^1H i ^{13}C NMR kwasu chlorogenowego (5-CQA), δ [ppm]; numeracja atomów na rys. 19

Nr protonu	NMR eksp.	NMR teor.	Nr węgla	NMR eksp.	NMR teor.
H1		3,777	C1	73,6	83,38
H2eq	1,80	2,086	C2	37,3	44,29
H2ax	2,03	2,293	C3	68,2	76,92
H3	3,94	4,349	C4	70,5	80,26
H4	3,58	4,013	C5	71,0	78,64
H5	5,08	5,115	C6	36,4	43,28
H6eq	1,96	2,453	C7	175,0	185,86
H6ax	2,01	1,961	C1'	125,7	133,86
H7	12,41	6,737*	C2'	114,9	127,09
H8		3,357	C3'	145,6	152,49
H9		2,086	C4'	148,4	155,41
H2'	7,04	6,969	C5'	115,9	122,37
H3'	9,13	4,549	C6'	121,5	125,30
H4'	9,56	4,998	C7'	145,0	154,90
H5'	6,77	6,969	C8'	114,4	118,89
H6'	6,98	7,591	C9'	165,9	176,17
H7'	7,43	7,860			
H8'	6,16	6,624			

* protony H7, H3' i H4' zaangażowane są w wiązania wodorowe. Wiązanie wodorowe powoduje odślanianie co powoduje zwiększenie przesunięcia chemicznego od protonu zaangażowanego w wiązanie wodorowe; obecność wiązań wodorowych nie została uwzględniona w obliczeniach

Oceniono aktywność przeciwdrobnoustrojową kwasu chlorogenowego w stosunku do bakterii Gram-ujemnych (*E. coli* PCM 2561, *P. vulgaris* PCM 542, *P. aeruginosa* PCM 2563, *K. pneumoniae* PCM 65542), Gram-dodatnich (*S. aureus* PCM 1932, *E. faecium* PCM 1859) i drożdży (*C. albicans* ATCC 10231). Wartości MIC₈₀ zestawione są w tabeli 6. Najlepsze właściwości przeciwbakteryjne 5-CQA wykazuje w stosunku do *K. pneumonia* z wartością MIC₈₀=5 mg/ml. W przypadku pozostałych drobnoustrojów MIC₈₀=10 mg/ml.

Tabela 6. Minimalne stężenie 5-CQA hamujące wzrost drobnoustrojów w 80% [MIC₈₀; mg/ml]

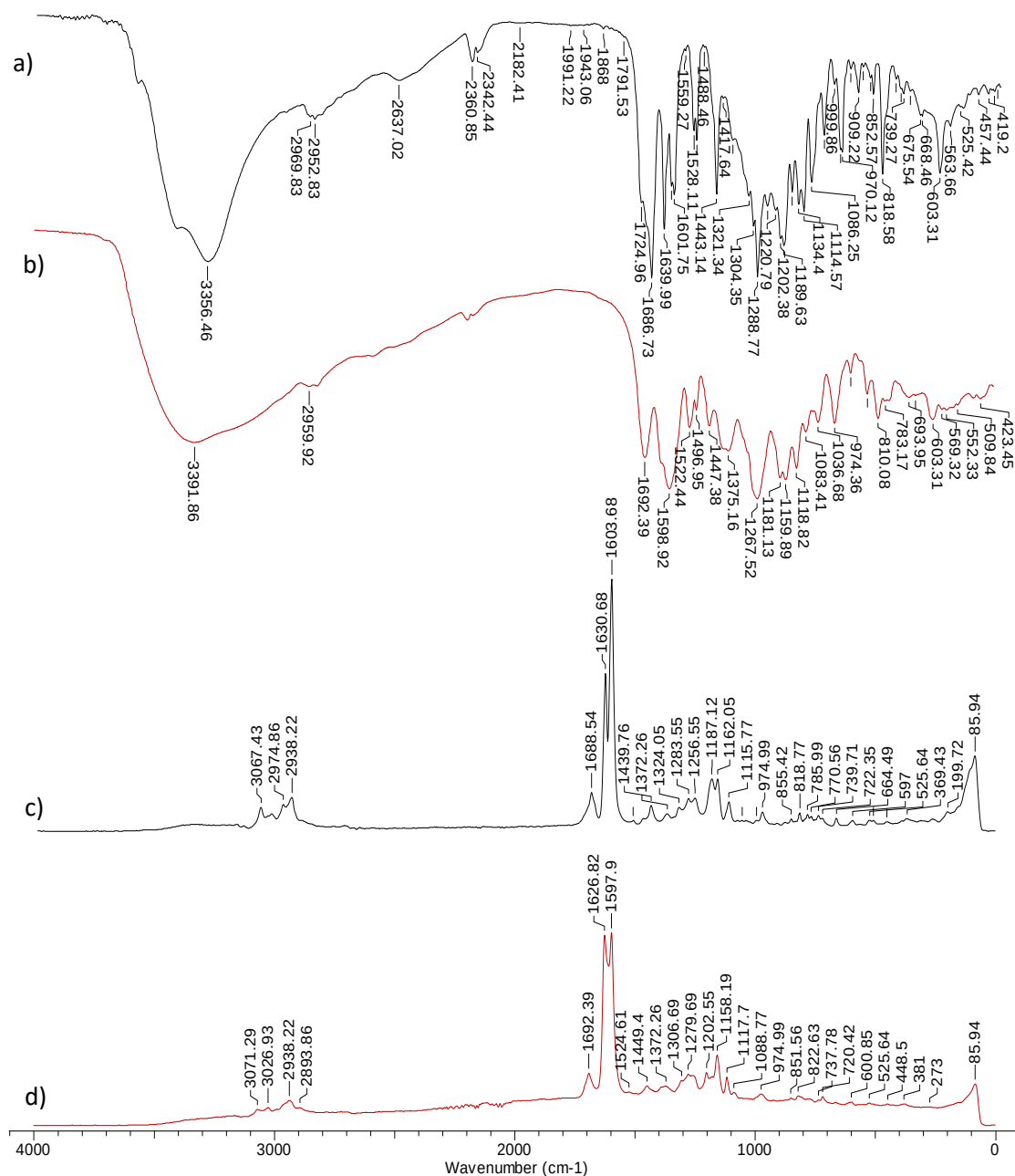
Drobnoustroje	MIC ₈₀ [mg/ml]
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,00
<i>Enterococcus faecium</i>	10,00
<i>Escherichia coli</i>	10,00
<i>Proteus vulgaris</i>	10,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,00
<i>Candida albicans</i>	10,00

7.4. Badania spektroskopowe, teoretyczne oraz właściwości biologicznych (pro-/antyoksydacyjnych, lipofilowych, przeciwdrobnoustrojowych) soli litowców z kwasem 5-kawoilochoinowym [H9]

Dalsze badania dotyczyły soli litowców z kwasem 5-kawoilochoinowym (5-CQA) [H11]. Tworzenie pochodnych miało na celu zmianę właściwości fizykochemicznych i biologicznych wyjściowego ligandu. Utworzenie soli metali pierwszej grupy układu okresowego z kwasami fenolowymi znacznie zwiększa ich rozpuszczalność w wodzie. Ułatwia to przeprowadzenie badań aktywności biologicznej i zwiększa szansę na praktyczne zastosowanie takich substancji. Opublikowane w literaturze dane dotyczą badań składu i trwałości wodnych roztworów kompleksów kwasu 5-CQA głównie z metalami przejściowymi. Badania wykazały, że zarówno grupa karboksylowa kwasu jak i ugrupowanie katecholowe (rys. 20) mogą być zaangażowane w koordynację metalu tworząc kompleksy o molowym stosunku stechiometrycznym metal : ligand 1:1, 1:2 lub 2:1 [61, 62]. Kompleksy te wykazywały inne niż ligand właściwości antyoksydacyjne. Np. zsyntezowany w postaci stałej kompleks wanadu z 5-CQA, którego strukturę określono stosując metody spektroskopowe, charakteryzował się dobrymi właściwościami antyoksydacyjnymi oraz cytotoksycznymi w stosunku do linii SKBR3 (nowotwór sutka) [63]. W literaturze brak było danych fizykochemicznych i biologicznych dla soli kwasu chlorogenowego z litowcami. Dlatego zbadałam właściwości spektroskopowe (FT-IR, FT-Raman, UV, ^1H i ^{13}C NMR), wykonałam obliczenia teoretyczne [na poziomie B3LYP/6-311++G(d,p); optymalizacja struktury, widma IR, ładunki atomowe NBO, energie orbitali HOMO, LUMO] oraz testy właściwości biologicznych (pro-/antyoksydacyjnych, lipofilowych i mikrobiologicznych) chlorogenianów Li, Na, K, Rb i Cs.

Wyniki analizy elementarnej wskazują, że chlorogeniany litowców wykazują różny stopień uwodnienia: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9\text{M}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ – dla soli Li, Na i K oraz $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9\text{M}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – dla Rb i Cs chlorogenianów (gdzie M oznacza metal). Analiza widm FT-IR, FT-Raman (rys. 22) dostarczyła informacji na temat wpływu metali na układ elektronowy ligandu oraz sposobu wiązania kationów metali. Przypisanie pasm z widm wykonałam na podstawie teoretycznych widm IR oraz wcześniejszych danych uzyskanych dla kwasu chlorogenowego [H7]. W porównaniu z widmem ligandu, w widmach soli brak jest pasm pochodzących od drgań C=O grupy karboksylowej, co świadczy o udziale anionu karboksylanowego w wiązaniu kationów metali. W widmach soli pojawiają się silne pasma przypisane drganiom asymetrycznym i symetrycznym anionu karboksylanowego, tj. $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$: 1596-1603 cm^{-1} (IR), 1598-1606 cm^{-1} (R), $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$: 1385-1395 cm^{-1} (IR), $\text{oop}(\text{COO}^-)$: 613-615 cm^{-1} (IR). Ponadto widma kwasu chlorogenowego i jego soli różnią się położeniem pasm pochodzących od drgań zarówno ugrupowania pochodzącego od kwasu chinowego jak i kawowego. Szczególne różnice widoczne są w położeniu pasm pochodzących od drgań układu aromatycznego i wiązania C=C [$\nu(\text{CC})_{\text{ar}}$, $\nu(\text{C}=\text{C})$], które w widmie kwasu obecne są przy 1640 cm^{-1} (IR), 1530

cm⁻¹ (IR), a w widmach soli ulegają przesunięciu w stronę niższych liczb falowych. Natomiast pasma przy 1602 i 1613 cm⁻¹ (IR) zanikają w widmach soli. Wyraźnym przesunięciom ulegają również pasma przy 1289 cm⁻¹ (IR) ν(C4'-O2')+δ(C-H)_{ar} [w widmach soli 1281-1266 cm⁻¹ (IR)], które częściowo pochodzą od drgań C-OH przy pierścieniu aromatycznym. Sugeruje to, że ugrupowanie katecholowe może brać udział w oddziaływaniu z kationem litowca. Inne pasma przy: 1382, 1190, 1086, 977, 854, 819, 670 cm⁻¹ ulegają również przesunięciu w stronę niższych liczb falowych, a niektóre w stronę wyższych liczb falowych przy 1143, 1114, 768, 564 cm⁻¹.



Rys. 22. Widma FT-IR (a) 5-CQA, (b) Na 5-CQA oraz FT-Raman (c) 5-CQA i (d) Na 5-CQA [H9].

Przesunięcia chemiczne sygnałów z widm ^1H i ^{13}C NMR kwasu chlorogenowego i jego soli zestawiono w tabeli 6. Wartości prawie wszystkich sygnałów z widm ^1H NMR soli maleją w porównaniu z odpowiadającymi sobie sygnałami w widmie ligandu. Najbardziej wyraźne zmiany dotyczą sygnałów pochodzących od protonów części chinowej 5-CQA, tj. H2eq, H4, H6eq, i H6ax. Pozostałe sygnały pochodzące od protonów ulegają mniejszym przesunięciom. Widoczna jest regularność w przesunięciach sygnałów H2eq (z wyjątkiem Li 5-CQA), H3, H6ax i H5 w serii $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$ 5-CQA wraz ze zmianą parametrów kationów litowców takich jak np. potencjał jonowy, elektroujemność, promień jonowy. W widmach ^{13}C NMR chlorogenianów, w porównaniu z widmem kwasu, obserwowany jest wzrost wartości przesunięć chemicznych w przypadku sygnałów pochodzących węgli C1-C7 (o ~ 2 ppm), co sugeruje spadek gęstości elektronowej wokół tych atomów w cząsteczkach soli. Sygnały pochodzące od węgli pierścienia aromatycznego pozostają praktycznie bez zmian. Wskazuje to, że w roztworze DMSO wpływ litowców na układ elektronowy ligandu jest głównie ograniczony do części chinowej ligandu.

Tabela 6. Przesunięcia chemiczne z widm ^1H i ^{13}C NMR kwasu chlorogenowego (5-CQA) i jego soli, δ [ppm] (numeracja atomów na rys. 19)

	5-CQA	sole 5-CQA					5-CQA	sole 5-CQA				
		Li	Na	K	Rb	Cs		Li	Na	K	Rb	Cs
H2eq	1,80	1,68	1,73	1,72	1,61	1,60	C1	73,6	75,8	75,2	75,2	75,2
H2ax	2,03	1,99	1,99	1,98	1,98	1,97	C2	37,3	39,5	39,5	39,5	39,5
H3	3,94	3,92	3,91	3,90	3,88	3,88	C3	68,2	71,4	71,4	71,5	71,6
H4	3,58	3,48	3,49	3,48	3,47	3,48	C4	70,5	71,5	71,6	71,6	71,7
H5	5,08	5,17	5,17	5,17	5,16	5,16	C5	71,0	73,2	73,3	73,4	73,5
H6eq	1,96	1,81	1,81	1,81	1,90	1,81	C6	36,4	38,0	38,1	38,2	38,2
H6ax	2,01	1,85	1,87	1,87	1,94	1,94	C7	175,0	176,5	176,7	176,5	176,2
H7	12,41						C1'	125,7	125,4	125,5	125,4	124,4
H2'	7,04	7,06	7,07	7,08	7,01	7,02	C2'	114,9	114,5	114,7	114,7	114,0
H3'	9,13						C3'	145,6	145,8	145,8	145,9	146,3
H4'	9,56						C4'	148,4	148,8	148,5	148,8	150,2
H5'	6,77	6,75	6,75	6,72	6,69	6,70	C5'	115,9	115,9	115,8	115,9	115,6
H6'	6,98	6,97	6,97	6,96	6,93	6,93	C6'	121,5	121,2	121,2	121,2	121,5
H7'	7,43	7,46	7,44	7,44	7,44	7,44	C7'	145,0	144,7	144,6	144,7	144,9
H8'	6,16	6,22	6,22	6,22	6,21	6,22	C8'	114,4	114,5	114,6	114,5	113,7

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykazały, że sole litowców kwasu chlorogenowego posiadają lepszą aktywność niż sam ligand. Spośród badanych związków Rb 5-CQA wykazuje najwyższą aktywność w stosunku do *Escherichia coli* i *Streptococcus pyogenes* oraz K 5-CQA w stosunku do *Staphylococcus epidermidis*. Obecność kationów litowców oraz formy zdysocjowanej kwasu chlorogenowego może wpływać na sposób ich oddziaływania z błoną komórkową drobnoustroju w porównaniu z

niezdysocjowanym ligandem i powodować większą aktywność przeciwdrobnoustrojową soli w porównaniu z kwasem.

Tabela 7. Wartości minimalnego stężenia kwasu chlorogenowego (5-CQA) i jego soli hamującego rozwój drobnoustroju MIC [mmol/dm³]

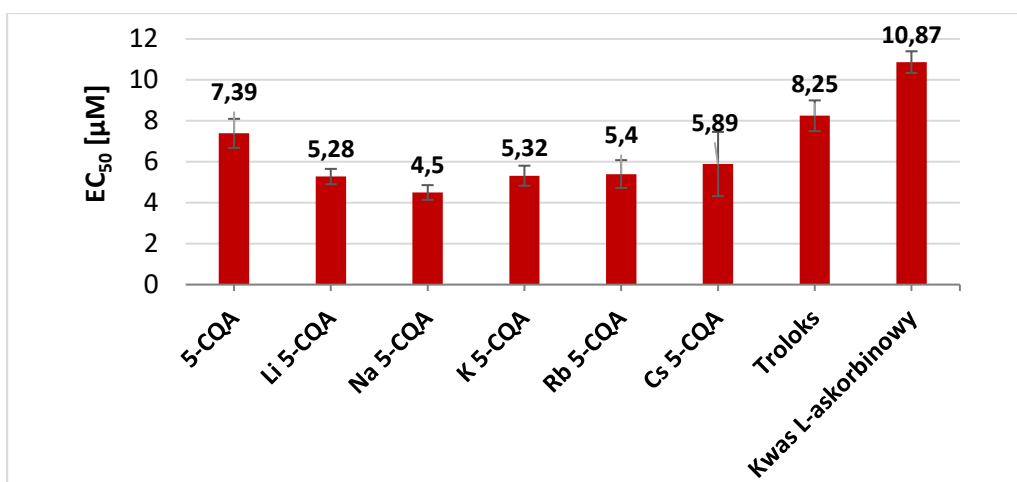
Związki	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Candida sp.</i>
5-CQA	7.06 (2.5 mg/mL)	> 7.06 (2.5 mg/mL)	> 7.06 (2.5 mg/mL)	> 7.06 (2.5 mg/mL)	> 14.11 (5 mg/mL)
Li 5-CQA	6.46	> 6.46	> 6.46	> 6.46	> 12.91
Na 5-CQA	6.20	> 6.20	> 6.20	> 6.20	> 12.40
K 5-CQA	5.96	5.96	2.98	> 5.96	5.96
Rb 5-CQA	2.63	5.27	5.27	2.63	5.27
Cs 5-CQA	4.79	> 4.79	> 4.79	> 4.79	> 9.58
Kanamycyna (kontrola pozytywna)	0.21	0.21	0.21	0.21	0.41
Ampicylina (kontrola pozytywna)	0.43	0.57	0.57	0.57	0.57

Ze względu na istniejące i dyskutowane w literaturze zależności pomiędzy aktywnością przeciwdrobnoustrojową i pro-/antyoksydacyjną oraz lipofilowością związków wykonałam kolejne badania dla kwasu chlorogenowego i jego soli polegające na wyznaczeniu: (a) aktywności antyoksydacyjnej (metodami DPPH, FRAP), (b) aktywności pro-oksydacyjnej (w reakcji utleniania troloksu), (c) lipofilowości związków na podstawie chromatograficznych parametrów, (d) obliczeń energii orbitali HOMO i LUMO, których wartości odzwierciedlają reaktywność związków.

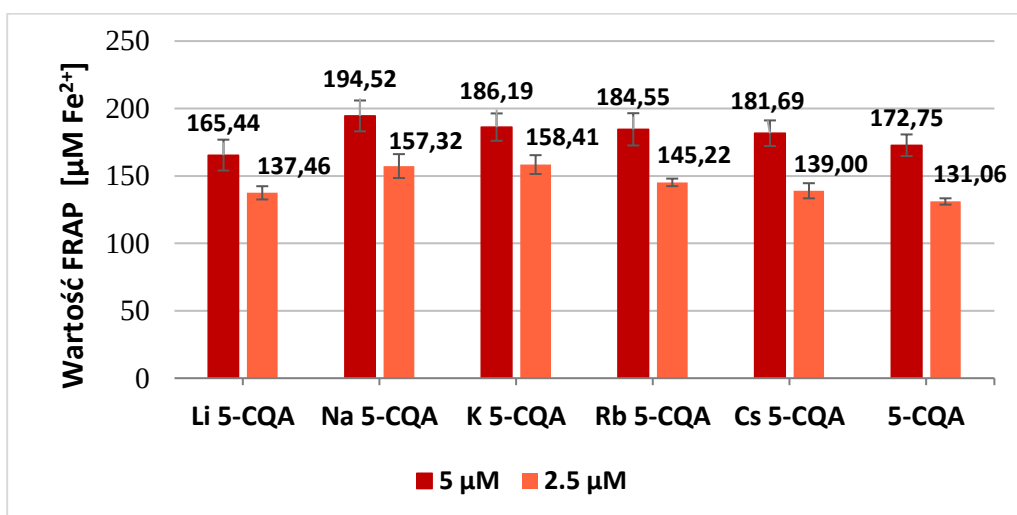
Wyniki badań aktywności antyoksydacyjnej zostały przedstawione na rys. 23 i 24. Chlorogeniany charakteryzują się większą aktywnością antyoksydacyjną (mierzoną testami DPPH i FRAP) niż sam ligand. Uzyskany parametr EC₅₀ (metodyka DPPH) dla kwasu chlorogenowego wynosi 7,39 µmol/dm³, natomiast dla chlorogenianów litowców mieści się w zakresie 4,50-5,80 µmol/dm³. Ponadto badane związki posiadają wyższą aktywność antyoksydacyjną (w teście DPPH) niż popularne antyutleniacze, tj. troloks (EC₅₀ = 8,25 µmol/dm³), kwas L-askorbinowy (EC₅₀ = 10,87 µmol/dm³) i BHT (EC₅₀ = 52,80 µmol/dm³). Zauważalna jest tendencja wzrostu aktywności antyutleniającej w serii kwas chlorogenowy→Cs→Rb→K→Li→Na chlorogeniany (mierzona testem DPPH). Badania aktywności za pomocą testu FRAP wykazały, że ze wzrostem stężenia badanych związków ich właściwości antyoksydacyjne wzrastają. Dla badanych

stężeń 5 i 2,5 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ wartości FRAP wynoszą odpowiednio 114,22 i 72,53 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Fe}^{2+}$ dla kwasu chlorogenowego, a dla soli 106,92–141,13 i 78,93–132,00 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Fe}^{2+}$. W serii $\text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$ chlorogenianów $\rightarrow$ kwas chlorogenowy widoczny jest spadek zdolności redukcyjnych związków. Wyniki uzyskane dla chlorogenian litu wyłamują się z tych tendencji (biorąc pod uwagę obie metodyki pomiaru). Jego aktywność w teście FRAP jest nawet niższa niż dla kwasu chlorogenowego (przy stężeniu 5 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Oznaczenia testem FRAP wykonuje się w prawie wodnym środowisku (11% obj. stanowi metanol), podczas gdy oznaczenia testem DPPH wykonuje się w metanolowym środowisku. Szczególnie w teście FRAP wyniki uzyskane dla Li 5-CQA odbiegają od tych uzyskanych dla pozostałych soli. Może to sugerować, że podczas oznaczeń metodyką FRAP zachodzą dodatkowe oddziaływania w roztworze wodnym, np. różnice w hydratacji jonów litowców, które wpływają na wynik końcowych oznaczeń. Kation litu jest mniejszym jonem niż pozostałe kationy litowców. Powoduje to, że tworzona powłoka hydratacyjna kationu litu jest większych rozmiarów i silniej związana niż w przypadku reszty kationów litowców. Dane literaturowe potwierdzają, że hydratacja kationów litu, która zachodzi w wodnym roztworze soli litu, wpływa na jego właściwości i powoduje, że wyniki uzyskane dla soli litu odbiegają od tych, które uzyskano dla pozostałych soli metali pierwszej grupy układu okresowego [64, 65].

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że chlorogeniany litowców wykazują lepsze właściwości antyoksydacyjne niż kwas chlorogenowy (zarówno w teście DPPH jak i FRAP). Oznacza to, że badane związki są efektywnymi zmiataczami rodników DPPH $\cdot$ oraz wykazują właściwości redukcyjne w stosunku do jonów Fe (III). Produktami utlenienia kwasu chlorogenowego i chlorogenianów są semi-chinony lub chinony. Generalnie mechanizm działania antyoksydantów z DPPH $\cdot$ może odbywać się na drodze określonej jako: (a) HAT (transfer atomu wodoru; ang. *hydrogen atom transfer*), (b) SPLET (przeniesienie elektronu poprzedzone deprotonacją grupy -OH, ang. *sequential proton – loss electron – transfer*) and (c) ET-PT (przeniesienie protonu poprzedzone transferem elektronu, ang. *electron – transfer proton – loss*) [66-68], ale w polarnych rozpuszczalnikach (woda, metanol, etanol) mechanizm HAT jest pomijalny. Natomiast przebieg reakcji podczas oznaczenia FRAP określany jest jako głównie SET (transfer pojedynczego elektronu, ang. *single electron transfer*) – pojedynczy elektron przenoszony jest z antyutleniacza na kation metalu w celu jego redukcji. Biorąc pod uwagę powyższe mechanizmy, potencjał jonizacji i deprotonacja, wymieniane są jako dwa ważne czynniki mające wpływ na aktywność antyoksydacyjną badanych związków [69].



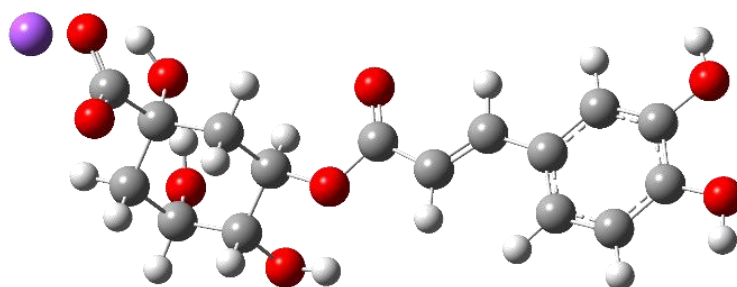
Rys. 23. Aktywność antyrodnikowa kwasu chlorogenowego (5-CQA) i chlorogeanów oraz troloksu i kwasu L-akorbinowego w stosunku do DPPH· wyrażona parametrem EC₅₀ [H9].



Rys. 24. Aktywność antyoksydacyjna kwasu chlorogenowego (5-CQA) i chlorogeanów (przy stężeniach badanych związków 5 i 2,5 μmol/dm³) określona jako zdolność redukcji jonów Fe (III) (zgodnie z metodyką FRAP) [H9].

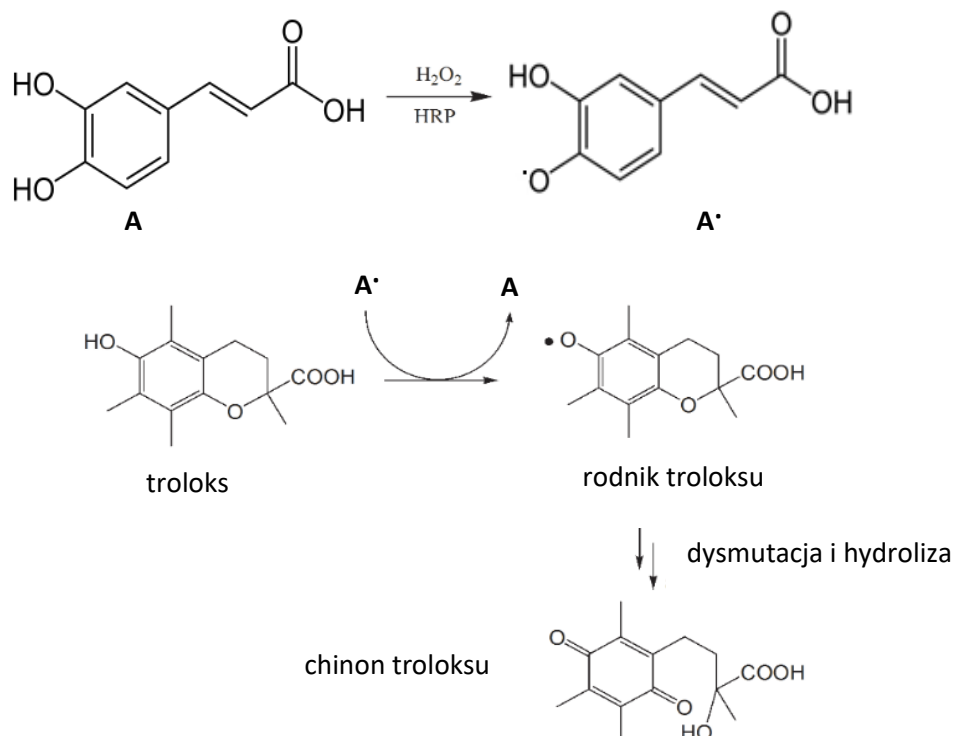
Im niższy potencjał jonizacji tym łatwiej zachodzi proces oderwania elektronu. W celu określenia potencjału jonizacyjnego cząsteczek wykonano obliczenia teoretyczne optymalizacji struktur oraz energii orbitali HOMO i LUMO dla kwasu chlorogenowego oraz jego soli litu, sodu i potasu w fazie gazowej i w metanolu (rys. 25). Uzyskane wyniki wskazują, że sole litu, sodu i potasu posiadają wyższą energię orbitali HOMO i mniejszy potencjał jonizacji niż kwas chlorogenowy. Sugeruje to, że chlorogeniany litowców są lepszymi donorami elektronu niż kwas chlorogenowy, co może częściowo wyjaśniać ich lepsze właściwości antyutleniające. Planuję poszerzyć badania mechanizmów działania

antyutleniaczy stosując metody obliczeniowe do wyznaczenia parametrów termodynamicznych, takich jak np. entalpię dysocjacji wiązania -OH, adiabatyczny potencjał jonizacji i entalpię dysocjacji protonu.



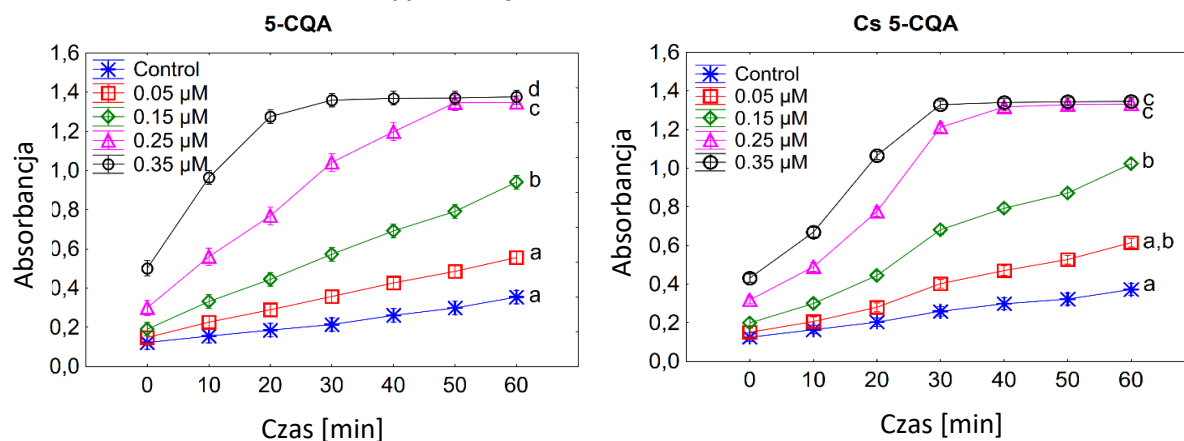
Rys. 25. Policzona struktura chlorogianu sodu [B3LYP/6-311++G(d,p)] (kolory oznaczają: szary – atomy węgla; biały – wodory; czerwony – tlenu; fioletowy – sodu [H9]).

W kolejnym etapie badań chlorogianów litowców oceniłam ich właściwości pro-oksydacyjne w reakcji utleniania troloksu zgodnie z metodyką zaproponowaną w publikacji [70]. Rodniki fenoksyłowe tworzone są w reakcji z H_2O_2 katalizowanej przez enzym peroksydazę chrzanową (rys. 26). Utworzone rodniki mogą przekształcać się w stabilne formy o małej reaktywności lub powodować utlenienie troloksu do chinonów, które wykazują absorpcję przy 272 nm.



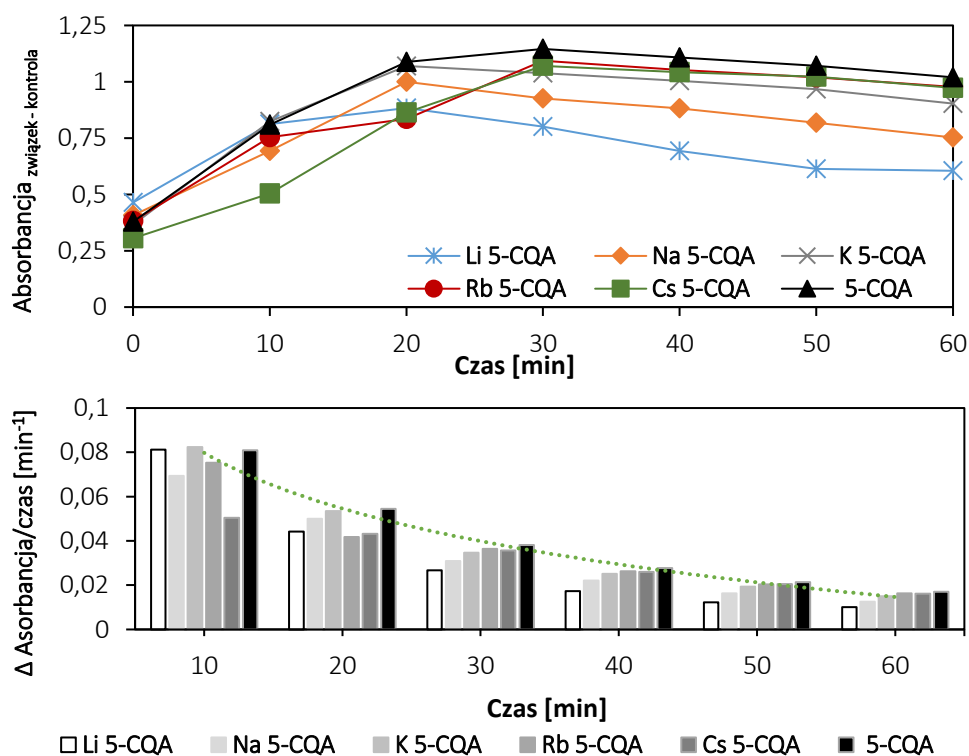
Rys. 26. Schemat reakcji wykorzystanej podczas badania właściwości pro-oksydacyjnych na przykładzie kwasu kawowego (**A**), zgodnie z metodyką z publikacji [70] (HRP – peroksydaza chrzanowa).

Uzyskane badania wykazały, że pro-oksydacyjne właściwości zależą od rodzaju i stężenia związków. Ze wzrostem stężenia 5-CQA i jego soli wzrasta ich aktywność pro-oksydacyjna (rys. 27). Badania przeprowadzone zostały dla czterech stężeń badanych związków (0,05; 0,015; 0,25 i 0,35 $\mu\text{mol/dm}^3$). Dla stężeń 0,25 i 0,35 $\mu\text{mol/dm}^3$ reakcja utleniania troloksu zakończyła się po 20-30 minutach w zależności od typu związku.



Rys. 27. Wpływ kwasu chlorogenowego (5-CQA) i jego soli cezu (Cs 5-CQA) na reakcję utlenienia troloksu [H9].

Szczególne dla tych dwóch najwyższych stężeń widoczny jest wyraźny trend: właściwości pro-oksydacyjne związków rosną w serii $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$ chlorogeniany $\rightarrow$ kwas chlorogenowy (rys. 28) (w serii następuje wzrost różnicy w wielkościach absorbancji związku i kontroli).



Rys. 28. Porównanie wpływu kwasu chlorogenowego (5-CQA) i chlorogenianów litowców o stężeniu 0,35 $\mu\text{mol/dm}^3$ na przebieg reakcji utleniania troloksu [H9].

Właściwości pro-/antyoksydacyjne związków fenolowych są często wiązane z ich właściwościami lipofilowymi [64, 71, 72]. Dlatego dalszy etap moich prac polegał na ocenie właściwości lipofilowych badanych związków i ich dyskusji w kontekście wcześniejszych wyników badań. Chromatograficzne parametry lipofilowości badanych związków wyznaczono w pięciu układach chromatograficznych zróżnicowanych pod względem rodzaju fazy stacjonarnej oraz składu fazy ruchomej. Dane retencyjne uzyskane na kolumnie IAM (ang. immobilized artificial membrane) odzwierciedlają procesy transportu substancji przez błony biologiczne [73, 74]. Natomiast użycie różnych wypełnień typu RP HPLC, bazujących na krzemionce dają szansę modelowania specyficznych właściwości podziałowych różnych układów. Dlatego zastosowano kolumny wypełnione żel krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi (C18), oktylowymi (C8), cyjanopropylowymi (CN) i fenylowymi (PHE).

Tabela 8. Chromatograficzne parametry lipofilowości i literaturowe wartości współczynników podziału oktanol/woda dla kwasu chlorogenowego (5-CQA) i chlorogenianów

Związek	log k_w					logP
	C18	C8	CN	IAM	PHE	
5-CQA	3,88	1,11	2,09	0,74	1,45	Eksp. 0,6
						Teoret. -0,45
						0,07
						0,69
Li 5-CQA	1,84	0,21	0,84	1,24	1,23	
Na 5-CQA	2,24	1,11	1,35	1,84	1,43	
K 5-CQA	2,36	1,24	1,84	1,91	1,84	
Rb 5-CQA	3,21	1,84	2,23	2,84	2,24	
Cs 5-CQA	3,74	2,13	2,64	3,84	2,64	

Otrzymane parametry różnią się znacznie między sobą biorąc pod uwagę rodzaj kolumny na jakiej były wyznaczane (tabela 8). Najbardziej zbliżone do eksperymentalnej wartości współczynnika podziału logP (0,6) i teoretycznego logP (0,69) dla 5-CQA jest log k_w wyznaczone przy użyciu kolumny IAM (log k_w =0,74). Wartości log k_w wyznaczone dla 5-CQA na innych kolumnach można uszeregować C8 (1,11)<PHE (1,45)<CN (2,09)<C18 (3,88). Tak szeroki zakres wartości jaki uzyskano wynika z charakteru oddziaływań między wypełnieniem kolumny a kwasem chlorogenowym, który ma charakter polarny i hydrofilowy. Dobra korelacja parametru lipofilowości określona na kolumnie IAM z doświadczalną wartością logP pozwala założyć, że wyznaczone na tej kolumnie wartości log k_w lepiej odzwierciedlają oddziaływania związku z membraną fosfolipidową. Uzyskane log k_w dla chlorogenianów różnią się również między sobą biorąc pod uwagę rodzaj kolumny, ale niezależnie od typu kolumny wartości

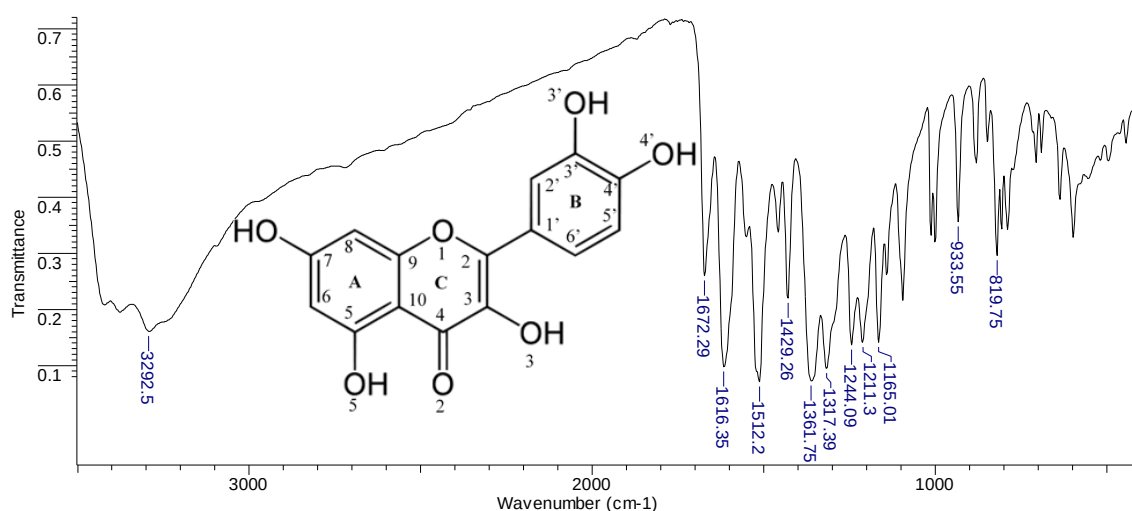
$\log k_w$ wzrastają w serii $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$ chlorogeniany. Sugeruje to wzrost lipofilowości w tej samej serii. Jednocześnie wskazuje to na możliwą zależność pomiędzy wzrostem właściwości lipofilowych i pro-oksydacyjnych chlorogenianów litowców. Podobne rezultaty opisano w literaturze dla soli litowców z warfaryną, których właściwości lipofilowe wzrastały ze zmianą kationu litowca ww. serii [64].

7.5. Synteza, badania strukturalne, spektroskopowe oraz antyutleniające kompleksów sodu, niklu (II) i cynku (II) z kwercetyną [H10]

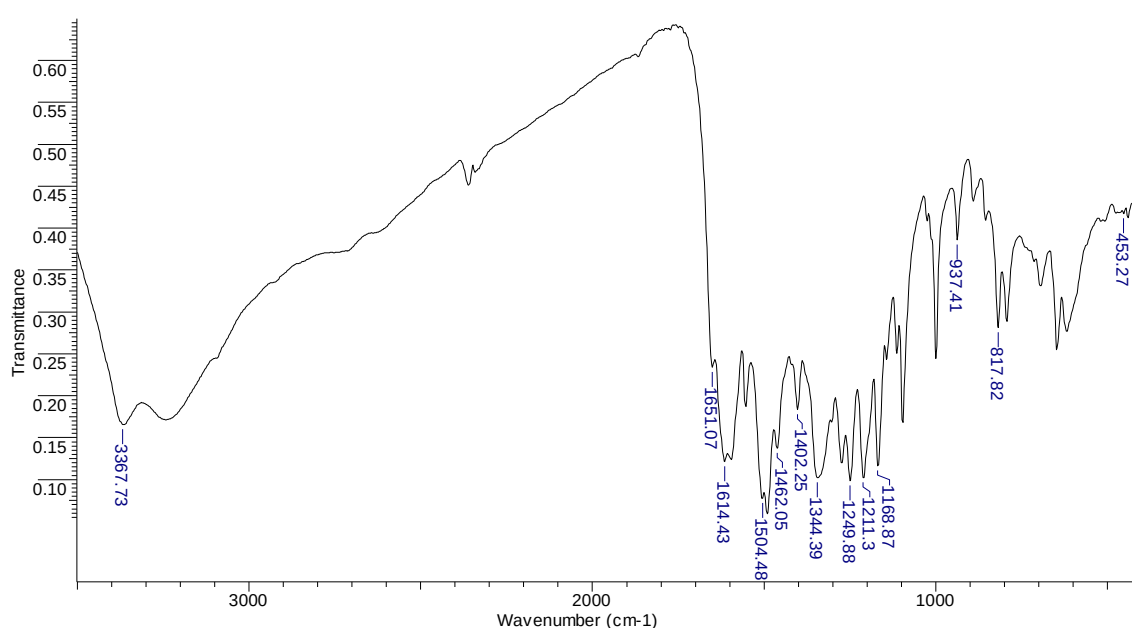
Badaniami objęłam bardziej złożony strukturalnie polifenol jakim jest kwercetyna. Jest ona jednym z najbardziej powszechnych flawonoidów w diecie człowieka. Posiada właściwości przeciwdrobnoustrojowe [75], przeciwwirusowe [76], antyoksydacyjne [77, 78], antyrakowe [79]. Dane literaturowe dostarczają dużo informacji na temat kompleksów kwercetyny i ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Ponieważ kwercetyna posiada 3 różne miejsca koordynacji kationów metali, powstające kompleksy zwykle charakteryzuje stosunek molowy ligand:metal 1:1, 1:2 lub 2:1. W zależności od warunków syntezy kwercetyna może tworzyć kompleksy z jednym kationem metalu o różnym stosunku stechiometrycznym ligand:metal przy udziale różnych grup wiążących. Wiele badań wskazuje, że kompleksy posiadają lepsze właściwości biologiczne niż sama kwercetyna. Kompleksy kwercetyny z Mn(II) , Co(II) , Ni(II) , Zn(II) , Cu(II) [80] wykazywały większe, natomiast z Cd(II) [81] czy Sn(II) [82] mniejsze właściwości antyoksydacyjne niż kwercetyna.

W ramach prowadzonych badań otrzymałam sól sodową oraz kompleksy Ni(II) i Zn(II) z kwercetyną, które charakteryzują się stosunkiem metalu do ligandu 1:1 [H10]. Związki te wykazują różny typ uwodnienia, tj. $\text{Na(C}_{15}\text{H}_9\text{O}_7) \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni(C}_{15}\text{H}_8\text{O}_7) \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ i $\text{Zn(C}_{15}\text{H}_8\text{O}_7) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oraz różną stabilność termiczną. Zarejestrowałam i przypisałam widma FT-IR, FT-Raman oraz UV kwercetyny i jej związków z wybranymi metalami (rys. 29 i 30). Utworzenie kompleksów i soli zmienia położenie odpowiadających sobie pasm w ich widmach FT-IR, FT-Raman w porównaniu z widmem kwercetyny. Szczególnie dotyczy to pasm przypisanych drganiom C-OH. W środowisku alkalicznym, kwercetyna wykazuje tendencję do koordynacji kationów metali przez ugrupowanie katecholowe pieścienia B (3',4'-OH; rys. 29). Dowodem na to są zmiany położenia pasm przypisanych drganiom katecholowej grupy C-OH [tj. $\beta(\text{C-OH})$; kwercetyna: 1362 cm^{-1} , kompleksy $1344\text{--}1346\text{ cm}^{-1}$] oraz pojawienie się pasm przy 1402 i 1421 cm^{-1} przypisanych drganiom rozciągającym $\nu(\text{C-O})$. W widmach UV kompleksów w porównaniu z widmem kwercetyny zaobserwowano batochromowe przesunięcie pasma przy $\sim 370\text{ nm}$. Obecność tego pasma jest wynikiem przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ w pierścieniu B. Wstępne badania aktywności antyoksydacyjnej (w teście z rodnikiem DPPH $\cdot$) wykazały, że

kompleksowanie jonów Zn(II) i Ni(II) nie powoduje wzrostu aktywności antyoksydacyjnej kwercetyny. Uzyskane dane nie są zgodne z literaturowymi [80]. Różnice wyjaśnić można innym typem wiązania kationów metali w przypadku otrzymanych przez mnie i literaturowych kompleksów. Dane literaturowe wskazują na tworzenie kompleksów typu kompleksy $ML_2 \cdot xH_2O$ (M-metal; L-ligand), w których jon centralny wiązany jest przez dwie cząsteczki kwercetyny za pomocą tlenów O2 i O3. W przypadku tworzenia takich kompleksów, ugrupowanie katecholowe nie bierze udziału w koordynacji jonu metalu i może być zaangażowane w reakcje z rodnikami [83]. W ten sposób typ koordynacji metalu wpływa na właściwości antyoksydacyjne kompleksu.



Rys. 29. Widmo FT-IR kwercetyny oraz jej struktura wraz z numeracją atomów [H10].



Rys. 30. Widmo FT-IR kompleksu cynku(II) z kwercetyną [H10].

Uzyskane wyniki prowadzonych prac wskazują, że synteza kompleksów i soli związków fenolowych zmienia właściwości fizykochemiczne, rozkład ładunku elektronowego oraz właściwości biologiczne wyjściowych ligandów. Niewielkie zmiany w rozkładzie gęstości elektronowej ligandu, które można ocenić na podstawie subtelnych przesunięć pasm z widm spektroskopowych lub zmian parametrów teoretycznych (strukturalnych, wartości ładunków, energii orbitali HOMO i LUMO), wpływają na globalne zmiany we właściwościach biologicznych związków. Jednym z celów prowadzonych przeze mnie badań jest zebranie danych dotyczących struktury (eksperymentalnych i teoretycznych) oraz aktywności biologicznej (przeciwdrobnoustrojowej, pro-/antyoksydacyjnej) bardzo dużej liczby związków fenolowych i ich kompleksów z metalami. Pozwoli to badać ogólne zależności pomiędzy strukturą związków a ich aktywnością biologiczną. Określenie ogólnych zależności ułatwi projektowanie nowych bezpiecznych dla człowieka i środowiska związków biologicznie czynnych bazujących na naturalnych i nietoksycznych dla środowiska roślinnych związkach fenolowych.

Poszukując nowych związków chemicznych, które byłyby cennym obiektem badań w przyszłości, postanowiłam sięgnąć do ich źródła jakim są ekstrakty roślinne. Dostępnych jest szereg danych literaturowych dotyczących ekstrakcji, składu i aktywności biologicznej ekstraktów. Moją uwagę przykuły artykuły opisujące skład chemiczny i właściwości biologiczne jabłek, szczególnie skórek i pestek z jabłek. Te części jabłek są niezwykle bogate w roślinne związki fenolowe, ale ich skład jakościowy i ilościowy jest uzależniony od wielu czynników, w tym od odmiany, warunków uprawy, sposobu przechowywania oraz metodyki prowadzenia oznaczeń. Dane literaturowe oraz własne badania wykazują, że ekstrakty uzyskane ze skórek i pestek jabłek charakteryzują się wysokimi właściwościami antyoksydacyjnymi i przeciwdrobnoustrojowymi. Za koncepcją badania i zastosowania ekstraktów z jabłek, bądź związków fenolowych obecnych w jabłkach, przemawiają również liczne patenty (US6620452, WO 2011140655 A1, US 7285298 B2, US7041322 i wiele innych) bazujące na ww. produktach i opisujące ich zastosowanie jako różne bioaktywne substancje. Skład ekstraktów z jabłek, sposoby ich otrzymywania oraz właściwości biologiczne wyczerpująco opisałam w publikacji przeglądowej [H11]. Publikacja stała się inspiracją do podjęcia dodatkowych badań, których celem było: (1) poszukiwanie nowych bezpiecznych dla człowieka i środowiska naturalnego substancji przeciwdrobnoustrojowych uzyskanych z ekstraktów jabłek oraz (2) badanie zależności między aktywnością przeciwdrobnoustrojową a pro-oksydacyjną ekstraktów z jabłek oraz wybranych roślinnych związków fenolowych i ich pochodnych. Badania te były jednym z etapów prac, które prowadziłam jako kierownik w ramach dwóch grantów: MNiSW nr N N305 384538 oraz NCN nr 2013/11/D/NZ9/02774.

Podsumowanie:

- 1) Zarejestrowałam oraz analizowałam widma spektroskopowe FT-IR, FT-Raman, UV, ^1H i ^{13}C NMR kwasów p-kumarowego, ferulowego, gentyzynowego, chlorogenowego i kwercetyny oraz ich 20 kompleksów lub soli. Analiza widm pozwoliła ocenić wpływ metali na strukturę molekularną ligandów oraz sposób wiązania kationów metali w kompleksach i solach. Utworzenie kompleksów powoduje wyraźny wzrost gęstości elektronowej wokół atomów ugrupowania $-\text{C}=\text{C}-$ w cząsteczkach p-kumarynianów i ferulanów w porównaniu do ligandów. Zaobserwowałam mniejszy wpływ kationów metali na rozkład gęstości elektronowej pierścienia p-kumarynianów i ferulanów niż gentyzynianów. Sugeruje to, że obecność $-\text{C}=\text{C}-$ osłabia wpływ kationów metali na rozkład gęstości elektronowej pierścienia. W przypadku chlorogenianów wiązanie kationów metali następuje przez grupę karboksylanową części kwasu chinowego oraz przez ugrupowanie katecholowe. Widoczna jest regularność przesunięć wybranych sygnałów w serii widm chlorogenianów $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$ 5-CQA wraz ze zmianą parametrów kationów litowców takich jak np. potencjał jonowy, elektroujemność, promień jonowy.

Przypisanie pasm z widm FT-IR, FT-Raman oraz ^1H i ^{13}C NMR dostarcza ogromną liczbę danych analitycznych, które będą wykorzystane w badaniach zależności struktura – aktywność. W trakcie takiej analizy struktura związku może zostać opisana parametrami spektroskopowymi, czyli wartościami liczb falowych z widm FT-IR, FT-Raman lub przesunięć chemicznych z widm NMR.

- 2) Wykonałam obliczenia [na poziomie B3LYP/6-311++G(d,p)] dla kwasu gentyzynowego oraz gentyzynianów sodu(I), kadmu(II) i miedzi(II) celem uzyskania parametrów strukturalnych, dyskusji obecności wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, rozkładu ładunku cząstkowego (metodami NBO i APT). Obecność wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych stabilizuje cząsteczki kwasu gentyzynowego i gentyzynianów oraz wpływa na strukturę przestrzenną kompleksów.
- 3) Skład, stopień uwodnienia oraz stabilność termiczną kompleksów scharakteryzowałam za pomocą analizy elementarnej i termogravimetrycznej.
- 4) Otrzymałam kryształy kompleksów p-kumarynianów cynku(II) i kadmu(II) oraz gentyzynianów wapnia, dla których została wykonana analiza rentgenostrukturalna. W kompleksie p-kumarynianu cynku $[\text{Zn}_4(\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3)_8(\text{H}_2\text{O})_6] \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ kationy metalu koordynowane są mostkującymi grupami karboksylanowymi, które tworzą oktaedryczne i tetraedryczne otoczenie jonu centralnego. Otrzymana struktura p-kumarynianu kadmu została już opisana w literaturze. Gentyzynian wapnia występuje w dwóch formach krystalicznych o wzorach $[\text{Ca}(\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$ i $\text{Ca}(\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_5$. W obu przypadkach kation wapnia (II) jest koordynowany przez dwa ligandy gentyzynianu za pomocą jednopozycyjnych grup

karboksylanowych oraz pięciu lub sześciu cząsteczek wody. We wszystkich otrzymanych kompleksach grupy hydroksylowe przy pierścieniu nie biorą udziału w koordynacji kationów metalu, ale zaangażowane są w tworzenie szeregu wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych $O-H\cdots O$, które stabilizują struktury.

- 5) Kompleks wapnia kwasu gentyzynowego oraz sole litowców z kwasem chlorogenowym wykazują wyższą aktywność antyutleniającą mierzoną w testach DPPH, FRAP i CUPRAC niż odpowiednie ligandy oraz popularnie stosowane antyutleniacze: BHA, BHT i kwas askorbinowy. W serii kwas chlorogenowy $\rightarrow Cs \rightarrow Rb \rightarrow K \rightarrow Na$ chlorogeniany widoczny jest wzrost aktywności antyutleniającej związków. W przypadku mechanizmów działania antyoksydantów, które polegają na przeniesieniu elektronu, potencjał jonizacji jest ważnym czynnikiem mającym wpływ na aktywność antyoksydacyjną związków. W wyniku obliczeń uzyskałam niższe wartości potencjałów jonizacji dla gentyzynianu wapnia i chlorogenianów litowców w porównaniu do samych ligandów, co sugeruje, że są one lepszymi donorami elektronu.

Kompleksy $Zn(II)$ i $Ni(II)$ z kwercetyną wykazują słabsze właściwości antyoksydacyjne niż kwercetyna. Prawdopodobnie ugrupowanie katecholowe bierze udział w koordynacji kationu metalu i nie może być zaangażowane w reakcje z rodnikami. Sposób koordynacji kationu metalu wpływa na właściwości antyoksydacyjne kompleksu.

- 6) Chlorogeniany litowców wykazują słabsze właściwości pro-oksydacyjne (mierzone w reakcji utleniania troloksu) niż kwas chlorogenowy. Właściwości te rosną regularnie w serii $Li \rightarrow Na \rightarrow K \rightarrow Rb \rightarrow Cs$ chlorogeniany $\rightarrow$ kwas chlorogenowy. Natomiast kompleks gentyzynianu wapnia wykazuje silniejsze właściwości pro-oksydacyjne niż kwas gentyzynowy mierzone poziomem peroksydacji lipidów w liniach komórkowych MCF-7. Nie tylko obecność i ilość podstawników hydroksylowych (i innych) przy pierścieniu, ale również rodzaj kationu metalu związanego przez grupę karboksylanową, decyduje o aktywności pro-/antyoksydacyjnej kompleksu. Właściwości pro-/antyoksydacyjne soli i kompleksów metali mogą być związane z ich lipofilowością.
- 7) Badane kompleksy generalnie charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową niż wyjściowe ligandy. Szczególnie aktywne są kompleksy cynku(II), które hamowały rozwój prawie wszystkich testowanych drobnoustrojów. Gentyzynian miedzi(II) posiadał silne właściwości bakteriobójcze w stosunku do *S. aureus*. Z punktu widzenia praktycznego zastosowania, największe nadzieje rokuje dobrze rozpuszczalny w wodzie ferulan sodu przeciwko *P. aeruginosa* i *S. aureus*.

Prowadzone przeze mnie spektroskopowe oraz strukturalne badania wybranych związków fenolowych i ich kompleksów z metalami są niezwykle cenne oraz dostarczają szereg danych analitycznych. Dane te opisują strukturę

molekularną związków, wpływ metali na rozkład gęstości elektronowej, sposób koordynacji kationów metali. Dzięki temu są dobrymi parametrami, które mogą być wykorzystane w badaniach zależności między strukturą a aktywnością biologiczną związków. Aby wyniki takiej analizy dobrze odzwierciedlały rzeczywiste zależności, badania należy wykonać na bardzo dużej, podobnej strukturalnie grupie związków. Uzyskane zależności pozwolą na bardziej efektywne planowanie badań/syntez mających na celu otrzymanie związków o wysokiej aktywności biologicznej, a jednocześnie bezpiecznych dla człowieka i środowiska naturalnego. W wyniku prowadzonych przeze mnie badań udało się uzyskać związki o wysokiej aktywności biologicznej, które mogą mieć zastosowanie w przemyśle. Na uwagę zasługuje chlorogenician sodu – dobrze rozpuszczalny w wodzie, o najsilniejszych właściwościach antyutleniających oraz najsłabszych pro-oksydacyjnych w porównaniu z samym ligandem (kwasem chlorogenowym). Ponadto posiada lepsze właściwości antyutleniające niż popularnie stosowane antyutleniacze: BHA, BHT i kwas askorbinowy. Wśród substancji o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, największe nadzieje rokuje dobrze rozpuszczalny w wodzie ferulan sodu przeciwko *P. aeruginosa* i *S. aureus*.

Literatura

- [1] F. Landrigan, R. Fuller, N.J.R. Acosta, i in., *Lancet* 391 (2018) 462-512.
- [2] D.J. Newman, G.M. Cragg, *Journal of Natural Products* 79 (2016) 629–661.
- [3] A. Cimini, M. D’Angelo, E. Benedetti i in., *Journal of Cellular Physiology* 9999 (2016) 1-11.
- [4] R. Popat, T. F. Davies, G. Cook, i in., *British Journal of Haematology* 160 (2013) 714-717.
- [5] R. Watson, *Polyphenols in plants*, 1st Edition, Academic Press, Elsevier, 2014.
- [6] M. Samsonowicz, E. Regulska, M. Kalinowska, *Chemico-Biological Interactions* 273 (2017) 245-256.
- [7] M. Samsonowicz, E. Regulska, *Spectrochimica Acta Part A* 173 (2017) 757–771.
- [8] K. Roy, S. Kar, R.N. Das, *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*, 1st Edition, Academic Press, Elsevier, 2015.
- [9] M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, B. Hayeta, i in., *Cell* 130 (2007) 797-810.
- [10] D.J. Dwyer, M.A. Kohanski, J.J. Collins, *Current Opinion in Microbiology* 12 (2009) 482.
- [11] J. Foti, B. Devadoss, J.A. Winkler, i in., *Science* 336 (2012) 315–319.
- [12] S.S. Grant, B.B. Kaufman, N.S. Chand, i in., *Proceedings of the National Academy of Science USA* 109 (2012) 12147-12152.
- [13] Y. Liu, X. Liu, Y. Qu, i in., *Antimicrobial Agents in Chemotherapy* 56 (2012) 6048-6050.
- [14] I. Keren, Y. Wu, J. Inocencio, i in., *Science* 339 (2013) 1213-1216.
- [15] Y. Sakihama, M.F. Cohen, S.C. Grace, H. Yamasaki, *Toxicology* 177 (2002) 67-80.
- [16] Y. Kadoma, S. Fujisawa, *Molecules* 13 (2008) 2488-2499.
- [17] I. Kiliç Y. Yesiloğlu, *Spectrochimica Acta A*, 115 (2013) 719-724.
- [18] B. Janicke, C. Hegardt, M. Krogh, i in., *Nutrition and Cancer* 63 (2011) 611-622.
- [19] S.K. Jaganathan, E. Supriyanto, M. Mandal, *World Journal of Gastroenterology* 19 (2013) 7726-7734.
- [20] E.A. Hudson, P.A. Dinh, T. Kokubun, i in., *Biomarkers and Prevention*, 9 (2000) 1163-1170
- [21] M. Yamaguchi, T. Murata, M. Shoji, i in., *International Journal of Oncology* 47 (2015) 1563-1571.

- [22] B.N. Lenta, B. Weniger, C. Antheaume, i in., *Phytochemistry*, 68 (2007) 1595-1599.
- [23] Z. Lou, H. Wang, S. Rao, i in., *Food Control* 25 (2012) 550-554.
- [24] L. Panizzi, C. Caponi, S. Catalano, i in., *Journal of Ethnopharmacology* 79 (2002) 165–168.
- [25] F. Iemma, F. Puoci, M. Curcio, i in., *Journal of Applied Polymer Science* 115 (2010) 784–789.
- [26] S.F. Bodini, S. Manfredini, M. Epp, i in., *Letters in Applied Microbiology*, 49 (2009) 551-555.
- [27] J.-Y. Mao, H.-X. Fang, Q.-F. Xu, i in. *Wuji Huaxue Xuebao (Chin.) (Chin. J. Inorg. Chem.)* 24 (2008) 1046.
- [28] W. Lewandowski, M. Kalinowska, H. Lewandowska, *Inorganica Chimica Acta* 358 (2005) 2155-2166.
- [29] W. Lewandowski, M. Kalinowska, H. Lewandowska, *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (2005) 1407-1423.
- [30] A. Kula, L. Mazur, Z. Rzączyńska, *Journal of Coordination Chemistry* 60 (2007) 843-850.
- [31] G. Varsányi, *Assignments for Vibrational Spectra of 700 Benzene Derivatives*, Akademiai Kiado, Budapest, 1973.
- [32] S.A. Patil, V.H. Naik, A.D. Kulkarni, P.S. Badami, *Spectrochimica Acta Part A* 75 (2010) 347–354.
- [33] G. Micera, L.S. Erre, P. Piu, ii in. *Inorganica Chimica Acta* 107 (1985) 223–227.
- [34] M.S. Adam, M.J. Gutmann, C.K. Leech, i in., *New Journal of Chemistry* 34 (2010) 85–91.
- [35] B. Velika, I. Kron, *Free Radicals and Antioxidants* 2 (2012) 62-67.
- [36] K. Zabłocki, J. Bendorowicz-Pikuła, *Postępy Biochemii* 58 (2012) 387-392.
- [37] N.M. Merghani, A.A. Hazza, E.J.G. Mahdi, i in. *Advances in Modern Oncology Research* 1 (2015) 122-131.
- [38] F. Jauré, N. Kheddoumi, C. Chaboteaux, i in., *Breast Cancer Research* 10 (2008) 1-11.
- [39] J. Monkkonen, M. Taskinen, S.O. Auriola, A. Urtii, *Journal of Drug Targeting* 2 (1994) 299-308.
- [40] M.C. Foti, C. Daquino, I.D. Mackiei in., *Journal of Organic Chemistry* 73 (2008) 9270-9282.
- [41] K. Yoshida, V. Cheynier, S. Quideau, *Recent advances in polyphenol research. Volume 5*, Wiley-Blackwell, 2017.
- [42] Y. Chen, H. Xiao, J. Zheng, G. Liang, *PLoS ONE* 10 (2015) e0121276.
- [43] A.L. Dawidowicz, M. Olszowy, *Talanta* 97 (2012) 312–317.
- [44] I. Nakanishi, K. Ohkubo, Y. Ogawa Y., i in., *Organic & Biomolecular Chemistry* 14 (2016) 7956-7961.
- [45] E. Bajko, M. Kalinowska, P. Borowski, i in., *LWT Food Science and Technology* 65 (2016) 471-479.
- [46] R. Jiang, J.M. Hodgson, E. Mas, i in., *Journal of Nutritional Biochemistry* 27 (2016) 53-60.
- [47] S.A. Erdem, F.S. Senol, E. Budakoglu, i in., *Journal of Food Drug Analysis* 24 (2016) 112-120.
- [48] (a) M. Zhao, H. Wang, B. Yang, *Food Chemistry* 120 (2010) 1138-1142.; (b) F.M. Da Silva, N.L.P. Iorio, L.A. Lobo, *Advance in Microbiology* 4 (2014) 978-985
- [49] Y. Mikami, T. Yamazawa, *Life Science* 139 (2015) 69-74.
- [50] R. Xu, K.S. Kang, J. Ren, i in., *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2013 (2013) 1, doi: 10.1155/2013/951319.
- [51] L.G. Naso, M. Valcarcel, M. Roura-Ferrer, i in., *Journal of Inorganic Biochemistry* 135 (2014) 86-99.
- [52] P.M. de Magalhaes, I. Dupont, A. Hendrickx, i in., *Food Chemistry* 134 (2012) 864- 871.
- [53] N. Liang, D.D. Kitts, *Molecules* 19 (2014) 19180-19208.
- [54] Y. Kono, K. Kobayashi, S. Tagawa, i in., *Biochimica et Biophysica Acta* 1335 (1997) 335-342.
- [55] IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPACIUB Commission in Biochemical Nomenclature (CBN). (1976). *Nomenclature of cyclitols. Recommendations. Biochemical Journal*, 153, 23-31.
- [56] R.M. El-Abassy, P. Donfack, A. Materny, *Food Chemistry* 126 (2011) 1443-1448.
- [57] Y. Kono, S. Kashine, T. Yoneyama, *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 62 (1998) 22-27.
- [58] Z. Lou, H. Wang, S. Zhu, i in. *Journal of Food Science* 76 (2011) M398-M403.

- [59] M. Zhao, H. Wang, B. Yang, H. Tao, *Food Chemistry* 120 (2010) 1138-1142.
- [60] P.J. Eravuchira, R.M. El-Abassy, S. Deshpande, *Vibrational Spectroscopy* 61 (2012) 10-16.
- [61] J. Ameziane, M. Aplincourt, L. Dupont, i in., *Bulletin de la Societe Chimique de France* 133 (1996) 243-249.
- [62] S.Z. Milić, N.I. Potkonjak, S.Ž. Gorjanović i in., *Electroanalysis* 23 (2011) 2935-2940.
- [63] L.G. Naso, M. Valcarcel, M. Roura-Ferre, i in., *Journal of Inorganic Biochemistry* 135 (2014) 86-99.
- [64] M. Ohnishi, R. Sugawara, T. Kusano, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56 (1995) 995-1001.
- [65] J. Mähler, I.A. Persson, *Inorganic Chemistry* 2 (2012) 425-438.
- [66] K. Yoshida, V. Cheynier, S. Quideau, *Recent advances in polyphenol research. Volume 5*, Wiley-Blackwell, 2017.
- [67] G. Litwinienko, K.U. Ingold, K.U. *Accounts of Chemical Research* 40 (2007) 222-230.
- [68] E. Kowalewska, G. Litwinienko, *Postępy Biochemii* 56 (2010) 274-283.
- [69] R.L. Prior, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53 (2005) 4290-4302.
- [70] M.L. Zeraik, M.S. Petrono, D. Coelho i in., *PLoS ONE* 9 (2014) e 110277.
- [71] P.B. Pertuzatti, M.T. Barcia, D. Rodriguez, i in., *Food Chemistry* 164 (2014) 81-88.
- [72] D. Chavarria, T. Silva, D. Martins, i in., *Medicinal Chemistry Communication* 6 (2015) 1043-1053.
- [73] D. Cohen, J. Blaney, C. Humblet i in., *Journal of Medicinal Chemistry* 33 (1990) 883-894.
- [74] J. Polański, R. Gieleciak, T. Magdziarz i in., *Journal of Chemical Information and Computer Science* 44 (2004) 1423-1435.
- [75] I. Hirai, M. Okuno, R. Katsuma i in., *International Journal of Food Science and Technology* 45 (2010) 1250-1254.
- [76] H.-J. Choi, J.-H. Kim, Ch.-H. Lee i in., *Antiviral Research* 81 (2009) 77-81.
- [77] A.T. Jan, M.R. Kamli, I. Murtaza, *Food Reviews International* 26 (2010) 302-317.
- [78] E. Moretti, L. Mazzi, G. Terzuoli, i in., *Reproductive Toxicology* 34 (2012) 651-657.
- [79] S.Y. Zheng, Y. Li, D. Jiang, *Molecular Medicine Reports* 5 (2012) 822-826.
- [80] J. Zhou, L.F. Wang, J.Y. Wang, N. Tang, *Transition Metal Chemistry* 26 (2001) 57-63.
- [81] R. Ravichandran, M. Rajendran, D. Devapiriam, *Food Chemistry* 146 (2014) 472-478.
- [82] G. Dehghan, Z. Khoshkam, *Food Chemistry* 131 (2012) 101- 104.
- [83] W. Chen, S. Sun, W. Cao, *Journal of Molecular Structure* 918 (2009) 194-197.

VIII. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

8.1. Prace naukowo-badawcze

Mój całkowity dorobek naukowych przedstawia się następująco:

- łączna liczba publikacji znajdujących się w bazie JCR wynosi 48,
- łączna liczba publikacji spoza bazy JCR wynosi 26,
- sumaryczny impact factor wynosi 89,296,
- całkowita liczba cytowań bez autocytowań wynosi 448.

Szczegółowe zestawienie dorobku naukowego osiągniętego przed i po doktoracie zestawiałam w tabeli poniżej.

Dorobek naukowo-badawczy	Przed doktoratem	Po doktoracie	Σ
Liczba publikacji znajdujących się w bazie JCR	12	36	48
Liczba publikacji spoza bazy JCR (artykuły i rozdziały w monografiach)	2	24	26
Uczestnictwo w konferencjach zagranicznych	3	11	14
Uczestnictwo w konferencjach krajowych	3	9	12
Udział w projektach KBN/MNiSW/NCN (w tym kierownictwo)	7 -	7 (2)	14 (2)
Promotorstwo prac magisterskich	-	3	3
Promotorstwo pracy inżynierskich	-	10	10

Pracę magisterską wykonałam w 2002 r. pod kierunkiem prof. V. Isidorova na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku. Temat pracy obejmował zastosowanie technik ekstrakcyjnych do wydzielania związków fenolowych z tkanek roślinnych oraz analizę ekstraktów za pomocą chromatografii gazowej oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Realizując badania zapoznałam się z metodami i problemami ekstrakcji oraz chromatograficzną techniką analizy składu ekstraktów roślinnych. Był to też czas, w którym zapoznałam się literaturą dotyczącą występowania i znaczenia roślinnych związków fenolowych.

W 2002 r. rozpoczęłam pracę w Katedrze Chemii Politechniki Białostockiej. Pod kierunkiem prof. Włodzimierza Lewandowskiego rozpoczęłam badania karboksylowych kwasów aromatycznych (głównie pochodnych kwasu benzoowego) i ich kompleksów z metalami stosując techniki spektroskopowe. Biorąc pod uwagę wcześniejsze zainteresowanie roślinnymi związkami fenowymi, rozszerzyłam badania o wybrane z nich, tj. o kwasy anyżowe

(metoksybenzoesowe) i cynamonowy oraz ich kompleksy i sole z metalami. Dzięki współpracy z Akademią Medyczną oraz Uniwersytetem w Białymstoku możliwe było wykonanie badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Badając zależności między strukturą związków a ich właściwościami biologicznymi, wprowadziłam statystyczną metodę analizy składowych głównych i analizę regresji. W badaniach stosowałam też geometryczne indeksy aromatyczności w celu opisu wpływu metali na aromatyczność ligandów. Zbadałam też użyteczność geometrycznych indeksów aromatyczności w ocenie aromatyczności kompleksów metali z kwasami benzoesowym, salicylowym i nikotynowym oraz pochodnymi benzenu. Wyniki badań stanowiły rozprawę doktorską, którą została obroniona z wyróżnieniem w 2008 r. na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Omówione publikacje [**H1-H3, H5-H9, H11**] są efektem realizacji projektów MNiSW nr N N305 384538 oraz NCN nr 2013/11/D/NZ9/02774, których byłam kierownikiem. W ramach ww. projektów prowadziłam równolegle badania, których celem było: (a) badania strukturalne, spektroskopowe i biologiczne wybranych roślinnych związków fenolowych i ich kompleksów z metalami, (b) pozyskanie nowych, nietoksycznych substancji przeciwdrobnoustrojowych z ekstraktów jabłek wybranych odmian oraz (c) poszukiwania zależności między właściwościami pro-/antyoksydacyjnymi a przeciwdrobnoustrojowymi ekstraktów roślinnych i związków fenolowych. W ramach projektu otrzymałam ekstrakty ze skórek i pestek z jabłek wybranych odmian stosując różne techniki ekstrakcyjne. Zastosowałam metody chromatograficzne (HPLC-DAD, GC-MS, TLC) celem rozdzielenia i oznaczenia jakościowego i ilościowego związków fenolowych w ekstraktach. Zastosowałam również HPLC do ilościowego oznaczenia terpenów (kwasów ursolowego, oleanolowego i betulinowego) oraz kwasów jabłkowego, winowego, chinowego, cytrynowego i askorbinowego. Określiłam zawartość w skórkach makro- i mikroelementów, cukrów redukujących. Przeprowadziłam badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz pro-/antyoksydacyjnej ekstraktów ze skórek i pestek jabłek. Uzyskane wyniki badań zostały wykorzystane do poszukiwania zależności pomiędzy składem ekstraktów a ich właściwościami biologicznymi. Wyniki badań prezentowałam na konferencjach naukowych oraz opublikowałam w 4 rozdziałach w monografiach (w latach 2012-2017) lub artykułach niebędących na liście JRC oraz jednej publikacji wysłanej do recenzji w *Journal of Food Composition and Analysis* (M. Kalinowska, K. Gryko, A.M. Wróblewska, A. Jabłońska-Trypuć, “Phenolic content, chemical composition, anti-/pro-oxidant activity and the influence on basic oxidative stress parameters in cultured human skin fibroblasts of Gold Milenium and Papierowka apple peel”).

Realizując projekty podjęłam się również syntezy kompleksów kwasów chlorogenowego i syryngowego z metalami oraz ich połączeń z β -cyklodekstryną. Celem badań było zwiększenie rozpuszczalności oraz aktywności biologicznej związków. Wyniki badań opublikowałam w 2 rozdziałach w monografii (z 2018 r.).

8.2. Kierowanie projektami badawczymi lub udział w tych projektach

(działalność naukowa w latach 2010-2018, tj. po doktoracie):

a) granty KBN/MNiSW/NCN

- jako kierownik projektów

1. **grant Narodowego Centrum Nauki, nr 2013/11/D/NZ9/02774**, „Badanie zależności między aktywnością przeciwdrobnoustrojową a pro-oksydacyjną ekstraktów z jabłek oraz wybranych roślinnych związków fenolowych i ich pochodnych”, kierownik: dr Monika Kalinowska, okres realizacji: 2014-2017,
2. **grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr N N305 384538**, „Nowe bezpieczne dla człowieka i środowiska naturalnego substancje przeciwdrobnoustrojowe uzyskane z ekstraktów jabłek odmian *Gold Milenium* i *Melfree*. Badania fizykochemiczne i mikrobiologiczne”, kierownik: dr Monika Kalinowska, termin realizacji: 2010-2013,

- jako wykonawca projektów

3. **grant Narodowego Centrum Nauki, nr 2015/17/B/NZ9/03581**, „Badania wpływu wybranych metali na zmianę właściwości antyoksydacyjnych związków naturalnych występujących w produktach żywnościowych pochodzenia roślinnego kierownik: prof. Włodzimierz Lewandowski, okres realizacji: 2015-2018, wykonawca,
4. **grant Narodowego Centrum Nauki, nr 2014/13/B/NZ7/02352** „Badania nad poprawą selektywności i aktywności wybranych leków i naturalnych związków o właściwościach przeciwnowotworowych pod wpływem kompleksowania metalami”, kierownik: prof. Włodzimierz Lewandowski, okres realizacji: 2015-2018, wykonawca,
5. **grant Narodowego Centrum Nauki, nr 2011/01/B/NZ9/06830**, „Badania fizykochemiczne wybranych polifenoli oraz ich kompleksów z kationami metali. Poszukiwanie nowych preparatów antyoksydacyjnych jako dodatków do żywności, kierownik: dr Mariola Samsonowicz, termin realizacji 2011-2014, wykonawca,
6. **grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr N N312 111838**, „Badanie zależności między strukturą molekularną i właściwościami mikrobiologicznymi wybranych związków biologicznie czynnych pochodzenia naturalnego oraz ich syntetycznych analogów”, kierownik: dr Renata Świsłocka, termin realizacji: 2010-2013, wykonawca,
7. **grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr N N312 427639**, „Badania nowych, bezpiecznych dla człowieka i środowiska naturalnego substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz przeciwutleniających pochodzenia roślinnego. Zależność między strukturą molekularną a

właściwościami biologicznymi”, kierownik: prof. dr hab. Włodzimierz Lewandowski, termin realizacji: 2010-2013, wykonawca.

b) projekty naukowo-badawcze PB (prace własne i statutowe Zakładu Chemii/Katedry Chemii, Biologii i Biotechnologii):

- jako kierownik

1. **praca własna, nr W/WBiIS/6/2010**, „Nowe substancje przeciwdrobnoustrojowe uzyskane z ekstraktów jabłek odmian *Gold Milenium*”, kierownik: dr Monika Kalinowska, okres realizacji: 2010-2012,

- jako wykonawca

2. **praca statutowa Katedry Chemii, Biologii i Biotechnologii, nr S/WBiIS/3/2017**, „Badania nad zastosowaniem wybranych materiałów, preparatów organicznych i mineralnych w biotechnologii, inżynierii środowiska, budownictwie i technologii żywności”, kierownik: prof. Włodzimierz Lewandowski, okres realizacji 2017-2021.
3. **praca statutowa Zakładu Chemii PB, nr S/IIŚ/21/07**, „Badanie fizykochemiczne (spektroskopowe i strukturalne), mikrobiologiczne oraz ocena możliwości biodegradacji wybranych soli i kompleksów homo- i heterocyklicznych kwasów karboksylowych. Poszukiwanie nowych zastosowań badanych związków w ochronie środowiska, inżynierii środowiska oraz technologii żywności”, kierownik: prof. Włodzimierz Lewandowski, okres realizacji: 2007-2011, wykonawca.

8.3. Nagrody i wyróżnienia

a) Nagrody Rektora Politechniki Białostockiej

1. Nagroda zespołowa III stopnia za wyróżniającą się działalność naukową przyznana przez rektora Politechniki Białostockiej, 2018 r.,
2. Nagroda zespołowa III stopnia za wyróżniającą się działalność naukową przyznana przez rektora Politechniki Białostockiej, 2017 r.,
3. Nagroda zespołowa II stopnia za wyróżniającą się działalność naukową przyznana przez rektora Politechniki Białostockiej, 2012 r.,
4. Nagroda zespołowa III stopnia za wyróżniającą się działalność naukową przyznana przez rektora Politechniki Białostockiej, 2011 r.,
5. Nagroda zespołowa III stopnia za wyróżniającą się działalność naukową przyznana przez rektora Politechniki Białostockiej, PB, 2010 r.,

6. Nagroda indywidualna III stopnia J. M. Rektora Politechniki Białostockiej za rozwój naukowy uhonorowany uzyskaniem stopnia naukowego doktora, PB, 2009 r.

b) Odznaczenia

- Medal Brązowy za Długoletnią Służbę nadany przez Prezydenta RP, 2014,
- Medal Komisji Edukacji Narodowej za szczególne zasługi dla oświaty i wychowania, 2013.

c) Stypendia

- Stypendium dla młodych doktorów uzyskane w ramach projektu „Podniesienie potencjału uczelni wyższych jako czynnik rozwoju gospodarki opartej na wiedzy” finansowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w latach 2010-2011.

d) Inne

- Wyróżnienie rozprawy doktorskiej decyzją Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie, 2008 r.

M. Kalinowska