

Dorota Masłowicz

**CHEMICZNE I MIKROBIOLOGICZNE PRZEKSZTAŁCENIA  
POCHODNYCH 1-TETRALONU**

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu  
pod kierunkiem **prof. dr. hab. Czesława Wawrzeńczyka**

WROCŁAW 2011

*Składam serdeczne podziękowania promotorowi niniejszej pracy  
Panu prof. dr hab. Czesławowi Wawrzeńczykowi  
za opiekę naukową, a także za życzliwość i wyrozumiałość,  
których doświadczałam w trakcie realizacji pracy doktorskiej.*

*Wyrazy podziękowania składam Pani prof. Beacie Gabryś  
i Panu prof. Janowi Nawrotowi oraz pracownikom ich zespołów za  
wykonanie testów biologicznych.*

*Dziękuję mgr. inż. Pawłowi Dąbrowskiemu za wykonanie analiz  
NMR oraz dr Agacie Białońskiej i prof. Zbigniewowi Ciunikowi  
za określenie struktur krystalicznych.*

*Pracę dedykuję osobie najważniejszej,  
która zawsze wspiera i nadaje sens każdej  
chwili - mężowi Bartoszowi.*

*Składam również podziękowania rodzicom,  
bez pomocy których nie byłoby możliwe  
zrealizowanie tej pracy.*

***Ut ager, quamvis fertilis, sine cultura fructuosus esse non potest, sic sine doctrina animus.***

Jak rola chociaż żyzna, nie może być płodna bez uprawy, tak i umysł bez nauki.

Cycon



## SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	7
<b>1. STRESZCZENIE.....</b>	<b>8</b>
<b>2. WPROWADZENIE I CEL PRACY.....</b>	<b>11</b>
<b>3. PRZEGLĄD LITERATURY.....</b>	<b>13</b>
3.1 Związki fenolowe – charakterystyka i znaczenie.....	13
3.1.1 Kwasy fenolowe.....	15
3.1.2 Flawonoidy.....	16
3.1.3 Resweratrol.....	20
3.1.4 Naturalne laktony z ugrupowaniem fenolowym.....	21
3.1.5 Kumaryny.....	24
3.2 Enzymatyczna hydroksylacja pierścienia aromatycznego.....	30
3.2.1 Cykl katalityczny cytochromu P450.....	33
3.2.2 Biotransformacje polegające na hydroksylacji pierścienia aromatycznego.....	34
3.2.3 Mikrobiologiczna hydroksylacja flawonoidów .....	47
<b>4. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH.....</b>	<b>51</b>
4.1 Synteza laktonów ze skondensowanym pierścieniem aromatycznym.....	51
4.1.1 Utlenianie 1-tetralonu (1).....	51
4.1.2 Utlenianie 5-metoksy-1-tetralonu (6) .....	58
4.1.3 Utlenianie 6-metoksy-1-tetralonu (8) .....	61
4.1.4 Utlenianie 7-metoksy-1-tetralonu (11) .....	62
4.1.5 Utlenianie 5,8-dimetoksy-1-tetralonu (14) .....	65
4.1.6 Utlenianie 6,7-dimetoksy-1-tetralonu (16) .....	67
4.1.7 Utlenianie 2-metylo-1-tetralonu (18) .....	69
4.1.8 Utlenianie 4-metylo-1-tetralonu (20) .....	72
4.1.9 Utlenianie indanonu (22) .....	74
4.2 Synteza 9-metoksybenzoksepan-2-onu (24) w reakcji Williamsona.....	76
4.3 Biotransformacje 1-tetralonów.....	78
4.3.1 Biotransformacje 1-tetralonu (1) .....	79
4.3.2 Biotransformacje 5-metoksy-1-tetralonu (6) .....	81
4.3.3 Biotransformacje 6- metoksy-1-tetralonu (8).....	86
4.3.4 Biotransformacje 7- metoksy-1-tetralonu (11) .....	87
4.3.5 Biotransformacje 5,8-di metoksy-1-tetralonu (14) .....	89
4.3.6 Biotransformacje 6,7- dimetoksy-1-tetralonu (16) .....	90
4.3.7 Biotransformacje 2-metylo-1-tetralonu (18) i 4-metylo-1-tetralonu (20) .....	91
4.3.8 Biotransformacje 1-tetralonu (1) i jego mono- i dimetoksypochodnych z zastosowaniem monooksygenazy cykloheksanonu z <i>Acinetobacter sp.</i> rekombinowanej w <i>E. coli</i> .....	92
4.4 Biotransformacje pochodnych benzoksepan-2-onu .....	95
4.4.1 Biotransformacje benzoksepan-2-onu (2) .....	95
4.4.2 Biotransformacje 6-metoksybenzoksepan-2-onu (7) .....	98
4.4.3 Biotransformacje 7-metoksybenzoksepan-2-onu (9) .....	101
4.4.4 Biotransformacje 8-metoksybenzoksepan-2-onu (12) .....	103
4.4.5 Biotransformacje 9-metoksybenzoksepan-2-onu (24) .....	105
4.4.6 Biotransformacje 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-onu (15).....	106
4.4.7 Biotransformacje 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-onu (17).....	108
4.5 Biotransformacje kumaryny (37).....	110
4.6 Badania biologiczne.....	114

---

4.6.1 Testy biologiczne na aktywność deterentną wobec mszycy brzoskwiowej ( <i>Myzus persicae</i> Sulz.).....	114
4.6.2 Testy biologiczne na aktywność deterentną wobec szkodników magazynów zbożowych.....	117
<b>5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....</b>	<b>124</b>
<b>6. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....</b>	<b>127</b>
6.1 Metody analityczne.....	127
6.2 Synteza laktonów skondensowanych z pierścieniem aromatycznym.....	128
6.3 Hydroksylacja pierścienia aromatycznego z wykorzystaniem.....	134
6.3.1 Pocięda ogólna hydroksylacji z wykorzystaniem kwasu <i>m</i> -chloroperoksybenzoesowego ( <i>m</i> -CPBA).....	134
6.4 Biotransformacje.....	135
6.4.1 Materiał biologiczny.....	135
6.4.2 Ogólne procedury procesów biotransformacji.....	136
6.4.3 Biotransformacje tetralonów.....	138
6.4.4 Biotransformacje pochodnych benzoksepan-2-onu.....	142
6.4.5 biotransformacje kumaryny ( <b>37</b> ).....	145
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>147</b>

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

<b>BHA</b>	butylohydroksyanizol
<b>BVMOs</b>	monooksygenazy Baeyera-Viliigera
<b>BHT</b>	butylohydroksytoluen
<b>COSY</b>	spektroskopia korelacyjna ( <i>ang.</i> Correlation Spectroscopy)
<b>DHC</b>	3,4-dihydrokumaryna
<i>ee</i>	nadmiar enancjomeryczny
<b>FAD</b>	utleniona forma dinukleotydu flawinoadeninowego
<b>FDH</b>	dehydrogenaza mrówczanowa ( <i>ang.</i> formic dehydrogenase)
<b>FMO</b>	monooksygenazy flawinowe
<b>GSH</b>	glutation
<b>GSH-PX</b>	katalaza i peroksydaza glutationowa
<b>GSSG</b>	disulfid glutationu
<b>HAPMO</b>	rekombinowana monooksygenaza 4-hydroksy acetofenonu
<b>HC</b>	hydroksykumaryna
<b>HMQC</b>	( <i>ang.</i> Heteronuclear Single Quantum Coherence)
<b>HMBC</b>	( <i>ang.</i> Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
<b>HRP-VI</b>	peroksydaza chrzanowa
<b>LD<sub>50</sub></b>	( <i>ang.</i> Lethal Dose, 50%)
<b><i>m</i>-CPBA</b>	kwasy <i>m</i> -chloroperoksybenzoesowy
<b>NADH</b>	zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
<b>NADP<sup>+</sup></b>	utleniona forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
<b>NADPH</b>	zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
<b>PAMO</b>	rekombinowana monooksygenaza fenyloacetonu
<b>PHBH</b>	hydroksylaza kwasu <i>p</i> -hydroksybenzoesowego
<b>PheH</b>	hydroksylaza fenyloalaninowa
<b>RFT</b>	reaktywne formy tlenu
<b>SOD</b>	dysmutaza ndtlenkowa
<b>TDI</b>	tolerowana dzienna dawka
<b>TMO</b>	monooksygenaza toluenowa
<b>TS-1</b>	tytanosilikalit modyfikowany palladem
<b>VEGF</b>	śródbłonkowy czynnik wzrostu

## 1. STRESZCZENIE

Pierwszym celem niniejszej pracy było otrzymanie nowych  $\epsilon$ -laktonów skondensowanych z pierścieniem aromatycznym. Cel ten realizowałam m. in. na drodze chemicznej, w reakcji utlenienia Baeyera-Villigera. Reakcji z *m*-chloronadbenzoesowym poddałam 1-tetralon (**1**), jego 5-metoksy- (**6**), 6-metoksy- (**8**), 7-metoksypochodne(**11**), 5,8-dimetoksy- (**14**), 6,7-dimetoksypochodne (**16**) oraz 2-metylo- (**18**) i 4-metylopochodną (**20**). W wyniku tego otrzymałam z dobrą wydajnością (66-81%) osiem  $\epsilon$ -laktonów: benzoksepan-2-on (**2**) oraz jego monometoksy- (**7**, **9**, **12**) dimetoksy- (**15**, **17**) i metylopochodne (**19**, **21**). Wśród nich sześć (**7**, **12**, **15**, **17**, **19** i **21**) było związkami nowymi, nieopisanymi dotąd w literaturze. Reakcji z nadkwasem poddałam także indanon (**22**). W tym przypadku otrzymanym produktem był  $\delta$ -lakton – 3,4-dihydrokumaryna (**23**). Kontrolując przebieg powyższych reakcji zauważyłam, że w przypadku utleniania ketonów **1**, **8**, **11** prócz spodziewanych laktonów **2**, **9**, **12**, powstają produkty elektrofilowej hydroksylacji pierścienia aromatycznego: 9-hydroksybenzoksepan-2-on (**3**), 8-hydroksy-7-metoksybenzoksepan-2-on (**10**) i 7-hydroksy-8-metoksybenzoksepan-2-on (**13**). Laktony **10** i **13** są związkami nowymi, nieopisanymi dotąd w literaturze. Czynnikiem aktywującym pierścień benzenowy do elektrofilowej hydroksylacji był alkoksyłowy atom tlenu ugrupowania laktonowego. Powyższa obserwacja skłoniła mnie do poddania reakcji z nadkwasem laktonu **2** i podjęcia próby optymalizacji reakcji poprzez dobór odpowiedniego nadkwasu i określenie jego namiaru w stosunku do substratu. Optymalizacja nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. Wydajność reakcji wynosiła maksymalnie 15%.

Utlenienie typu Bayera-Villigera pochodnych tetralonu prowadziłam również na drodze biotransformacji w kulturach szczepów grzybów strzępkowych oraz na drodze enzymatycznej z wykorzystaniem monooksygenazy cykloheksanonu z *Acinetobacter sp.* rekombinowanej w *E. coli*. Spośród dwudziestu czterech szczepów drobnoustrojów udało mi się wyselekcjonować dwa zdolne do katalizowania tego typu utlenienia. Szczep *Penicillium chermesinum* (AM113) katalizował utlenienie 5-metoksy- (**6**), 7-metoksy- (**11**), 5,8-dimetoksy- (**14**) i 6,7-dimetoksytetralonu (**16**), natomiast *Penicillium frequentans* (AM359) 1-tetralonu (**1**), oraz jego 5-metoksy- (**6**), 6-metoksy- (**8**), 7-metoksy- (**11**), 6,7-dimetoksy- (**16**), 2-metylo- (**18**) i 4-metylopochodnych (**20**) do odpowiednich  $\epsilon$ -laktonów. Wydajność izolowana wynosiła od 18 do 56%. Ze względu na zbyt niski stopień przereagowania nie udało się wyizolować produktów utlenienia metylopochodnych 1-tetralonu (**18** i **20**). Stopień przereagowania reakcji prowadzonych na drodze enzymatycznej był znacznie niższy ( $\leq 9\%$ ). Zatem w przypadku pochodnych 1-tetralonu biotransformacje w kulturach całych komórek

grzybów strzępkowych są wydajniejszym i tańszym sposobem otrzymania produktów utlenienia typu Baeyera-Villigera niż biotransformacje z wykorzystaniem powyższego enzymu.

Poszukując szczepów, które wykazują zdolność katalizowania reakcji typu Baeyera-Villigera zauważyłam, że dwa szczepy drożdży *Rhodotorula marina* (AM77) i *Rhodotorula rubra* (AM82) katalizowały redukcję grupy karbonylowej 1-tetralonu (**1**), 5-metoksytetralonu (**6**) i 7-metoksytetralonu (**11**). Ze względu na wysoką enancjoselektywność reakcji zdecydowałam się na przeprowadzenie tych biotransformacji na skalę preparatywną. Keton **1** w kulturze szczepu *R. rubra* (AM82) redukowany był do alkoholu, a nadmiar enancjomeru *R* wynosił w tym przypadku aż 99%. Szczep *R. rubra* (AM82) katalizował także redukcję ketonu **11** do alkoholu. Nadmiar enancjomeryczny wynosił w tym przypadku 35%, z przewagą enanjiomeru *R*. Zarówno szczep *R. rubra* (AM82) jak i *R. marina* (AM77) wykazywały także zdolność do redukcji ketonu **6** do alkoholu z przewagą enancjomeru *S*. Wyższą enancjoselektywnością cechowała się biotransformacja w kulturze szczepu *R. rubra* (AM82)(99%*ee*), a stopień przereagowania był wyższy w biotransformacji w kulturze *R. marina* (AM77).

Kolejnym etapem prowadzonych przeze mnie badań było poddanie, otrzymanych w wyniku chemicznej syntezy  $\epsilon$ -laktonów, biotransformacjom w kulturach całych komórek mikroorganizmów. Za cel postawiłam sobie znalezienie szczepów grzybów strzępkowych zdolnych do hydroksylacji pierścienia aromatycznego. Spośród dwudziestu czterech testowanych szczepów tylko trzy wykazywały zdolność do katalizowania reakcji tego typu. Były to szczepy szczepy *Penicillium vermiculatum* (AM81), *Penicillium chermesinum* (AM113) i *Penicillium frequentans* (AM359), spośród których najaktywniejszym katalizatorem okazał się ten ostatni. W wyniku hydroksylacji  $\epsilon$ -laktonów: 5-metoksy- (**7**), 6-metoksy- (**9**) i 7-metoksybenzoksepan-2-onu (**12**) w kulturze *P. frequentans* (AM359), otrzymałam hydroksylaktony: 8-hydrokso-7-metoksybenzoksepan-2-on (**10**) i 7-hydrokso-8-metoksybenzoksepan-2-on (**13**), 7-hydrokso-6-metoksybenzoksepan-2-on (**26**) i 9-hydrokso-6-metoksybenzoksepan-2-on (**27**). Szczep ten wykazywał regioselektywność, katalizując hydroksylację w pozycjach *orto* (**10**, **13**, **26**) lub *para* (**27**) w stosunku do grupy metoksylowej, obecnej w cząsteczce substratu. Biotransformacji w kulturze szczepu *P. frequentans* (AM359) poddałam także kumarynę (**37**), co zaowocowało wprowadzeniem grupy hydroksylowej w pozycję C-5 i otrzymaniem 5-hydroksykumaryny (**38**).

Biotransformacje siedmioczłonowych laktonów: benzokepan-2-enu (**2**), oraz jego monometoksy- (**7**, **9**, **12**) i dimetoksy pochodnych (**15**, **17**) w kulturze szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112) prowadziły do otrzymywania produktów hydrolizy pierścienia laktonowego – kwasu 4-(2-hydroksyfenylo)masłowego (**31**) oraz jego monometoksy- (**32**, **33**, **34**), dimetoksy pochodnych (**35**, **36**) z których związki **32**, **35** i **36** nie były dotąd opisywane

w literaturze. Biotransformacji w kulturze tego szczepu poddana została także kumaryna (**37**). Transformacja ta przebiegała dwuetapowo. W pierwszym etapie następowała redukcja wiązania podwójnego prowadząca do powstania 3,4-dihydrokumaryny (**23**). W kolejnym etapie pierścień laktonowy ulegał hydrolizie, w wyniku czego powstawał kwas 3-(2-hydroksyfenylo)propionowy (**39**).

Otrzymane w wyniku syntezy chemicznej  $\epsilon$ -laktony oraz cykliczne katony będące substratami w ich syntezie poddano testom na aktywność antyfidantną w stosunku do wybranych gatunków owadów: mszycy brzoskwiowo-ziemniaczanej (*Myzus persicae* Sulz.), chrząszczach wołka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.), larw skórka zbożowego (*Trogoderma granarium* Ev.) oraz larw i chrząszczy trojszyka ulca (*Tribolium confusum* Duv.).  $\epsilon$ -Laktony wykazywały średnią lub dobrą aktywność w stosunku do wszystkich testowanych gatunków owadów. Testy w stosunku do mszycy oraz larw i chrząszczy trojszyka ulca wykazały, że wprowadzenie alkoksylowego atomu tlenu do cząsteczki ketonu skutkuje znacznym wzrostem aktywności antyfidantnej otrzymanego laktonu w porównaniu do aktywności wyjściowego ketonu.

## 2. WPROWADZENIE I CEL PRACY

Naturalne i syntetyczne związki z ugrupowaniem laktonowym znane są z szerokiego spektrum aktywności. Posiadają właściwości bakteriobójcze [1], grzybobójcze [2, 3, 4] i cytostatyczne [5]. Większość laktonów naturalnych, izolowanych z olejków roślinnych i syntetycznych posiada przyjemny zapach [6]. Dzięki temu znalazły zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym i spożywczym, jako składniki esencji spożywczych. Laktony pełnią również funkcję feromonów owadów [7] oraz deterentów pokarmowych w stosunku do owadów [8, 9, 10].

W zespole, w którym wykonywałam pracę doktorską, od wielu lat prowadzi się syntezę nowych laktonów jako potencjalnych deterentów pokarmowych owadów. Są one w mniejszym lub większym stopniu analogami naturalnych antyfidantów. Substratami do syntez były głównie związki izoprenoidowe. Ostatnio przeprowadzano również syntezę  $\epsilon$ -laktonów [11, 12]

Włączając się w tematykę tych badań, postanowiłam zbadać aktywność deterentną połączeń z siedmioczłonowym pierścieniem laktonowym względem wybranych gatunków owadów. Moje zainteresowania tą grupą związków nakierowane były na połączenia, w których pierścień laktonowy jest skondensowany z pierścieniem aromatycznym. W odróżnieniu od  $\gamma$ - i  $\delta$ -laktonów,  $\epsilon$ -laktony skondensowane z pierścieniem aromatycznym są stosunkowo rzadko spotykane w przyrodzie. Niemniej jednak źródła literaturowe donoszą o interesujących właściwościach również tego typu połączeń. Jednym z nich jest lakton posiadający właściwości przeciwnowotworowe – florezolid [13], innym – rozmanol [14] składnik wyciągu z rozmarynu (*Rosmarinus officinalis*).

**Pierwszym więc celem mojej pracy doktorskiej było otrzymanie nowych  $\epsilon$ -laktonów, w których pierścień laktonowy jest skondensowany z pierścieniem aromatycznym.**

Substratami były cykliczne ketony – tatalony. Wybór tej grupy związków podyktowany był ich strukturą i dostępnością. Powyższy cel miał być realizowany trzema różnymi metodami. Pierwsza polegała na chemicznym utlenieniu typu Baeyera- Villigera substratów, druga na biotransformacjach w kulturach całych komórek mikroorganizmów, trzecia na biotransformacjach z wykorzystaniem monooksygenazy cykloheksanonu.

**Drugim celem było określenie aktywności antyfidantnej pochodnych teteralonu wobec wybranych gatunków owadów i ustalenie wpływu obecności w pierścieniu alkoksylogowego atomu tlenu na tą aktywność.**

Ocenie aktywności antyfidantnej planowałam poddać zarówno otrzymane przeze mnie związki z ugrupowaniem laktonowym jak i substraty w ich syntezie (cykliczne ketony). Badania testowe miały być przeprowadzone w wyspecjalizowanych ośrodkach naukowych i obejmować następujące gatunki owadów: mszyca brzoskwiowa (Uniwersytet Zielonogórski), wołek zbożowy, skórek zbożowy, trojszyk ulec (Instytut Ochrony Roślin w Poznaniu).

**Trzecim celem mojej pracy była funkcjonalizacja otrzymanych  $\epsilon$ -laktonów na drodze biotransformacji mikrobiologicznych.**

Uzyskane  $\epsilon$ -laktony planowałam poddać również transformacjom mikrobiologicznym. Spodziewałam się uzyskać ich hydroksypochodne z grupą hydroksylową podstawioną do pierścienia aromatycznego. Uzasadnieniem do podjęcia tych badań jest fakt, że w przyrodzie znane są hydroksylowane układy aromatyczne charakteryzujące się wartościowymi właściwościami biologicznymi. Związki fenolowe pełnią między innymi funkcje przeciwutleniaczy. Znajdują zastosowanie w m. in. przemyśle spożywczym jako dodatki do żywności mające zapobiegać procesom utleniania [15, 16].

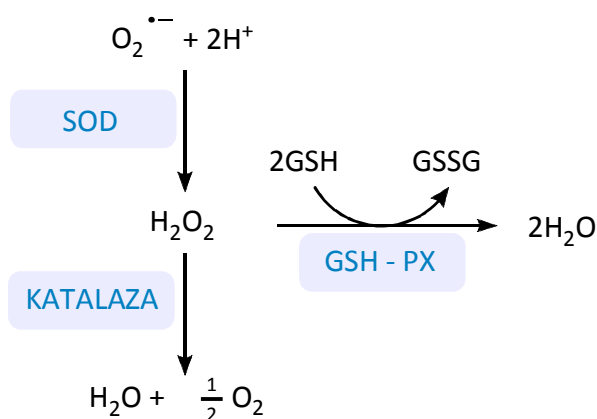


### 3. PRZEGLĄD LITERATURY

#### 3.1 Związki fenolowe – charakterystyka i znaczenie

W każdym żywym organizmie tlenowym, jako uboczny produkt metabolizmu powstają reaktywne formy tlenu (RFT), które odpowiadają za procesy starzenia się organizmu. Należą do nich tlen singletowy ( $\bar{O}=\bar{O}$ ), anionorodnik nadtlenny ( $\bar{O}=\bar{O}\cdot$ ), rodnik hydroksylowy ( $\cdot\bar{O}-H$ ), rodnik wodoronadtlenkowy ( $H-\bar{O}-\bar{O}\cdot$ ), nadtlenek wodoru. Badania wykazują, że RFT odpowiadają za procesy starzenia oraz przyczyniają się do powstawania wielu stanów chorobowych, m.in. zmian nowotworowych, chorób sercowo-naczyniowych, rozwoju schorzeń układu nerwowego, udaru mózgu, artretyzmu, oraz cukrzycy.

Każda komórka posiada system obrony przeciw RFT. Składają się na niego związki przeciwutleniające, czyli tzw. antyoksydanty (m. in. karotenoidy, witaminy C i E, glutation) oraz enzymy do których należą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza i peroksydaza glutationowa (GSH-PX)(Schemat 1). Funkcjonowanie układu enzymatycznego uzależnione jest od obecności jonów cynku, miedzi, manganu i selenu [17].



**Schemat 1.** Podstawowe enzymy usuwające reaktywne formy tlenu w komórkach; GSH – glutation, GSSG – disulfid glutationu (utleniona forma glutationu)

Zachwianie równowagi pomiędzy powstawaniem RTF a ich neutralizacją jest przyczyną tzw. szoku tlenowego. W badaniach epidemiologicznych wykazano, że poprawnie skomponowana dieta, bogata w produkty roślinne może zapobiegać powstawaniu pewnych chorób, np. nowotworowych.

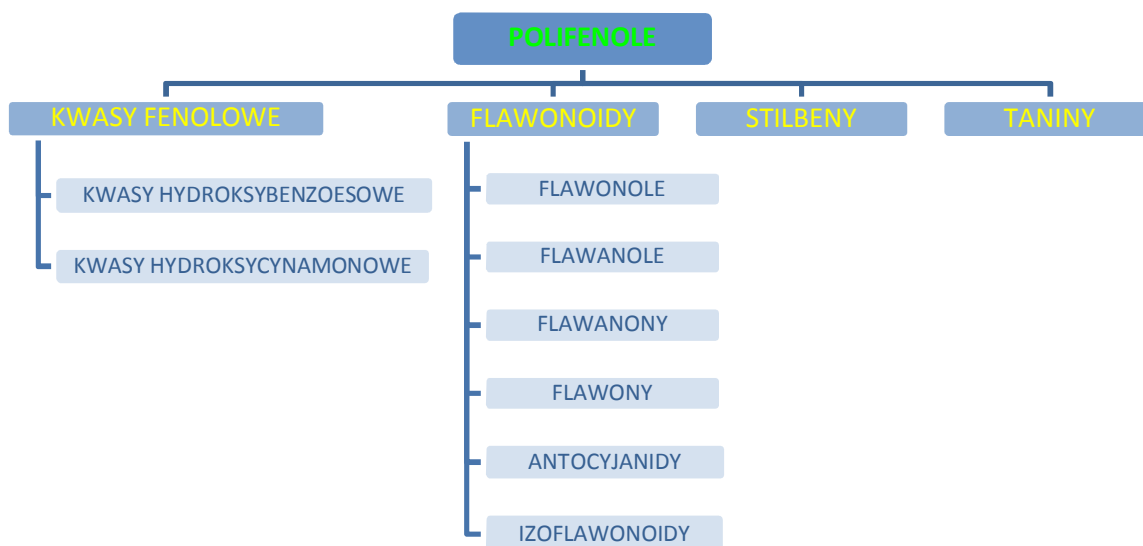
W przemyśle spożywczym, jako dodatek do żywności powszechnie stosuje się syntetyczne przeciwutleniacze fenolowe, które mają zapobiegać procesom utleniania i rozkładu zachodzącym

w żywności. Do najczęściej stosowanych związków należą butylohydroksytoluen (BHT) i butylohydroksyanizol (BHA). Jednak badania toksykologiczne na szczurach wykazały, że mogą one powodować zaburzenia pracy wątroby, płuc, nerek. Dlatego też obserwuje się tendencję do zastępowania przeciwutleniaczy syntetycznych naturalnymi. Do naturalnych przeciwutleniaczy należą między innymi związki polifenolowe.

Polifenole są wtórnymi metabolitami roślinnymi. Występują we wszystkich częściach roślin: korzeniach, łodygach, liściach, kwiatach i nasionach. Odgrywają one znaczącą rolę w ich wzroście, morfogenezie, oddychaniu, fotosyntezie, ekspresji genów, regulacji syntezy hormonów wzrostu i procesie rozmnażania. [18].

Mechanizmy aktywności przeciwutleniającej są różnorodne. Antyoksydanty pełnią funkcję inhibitorów oksydaz, wychwytywaczy wolnych rodników, czynników chelatujących jony metali, enzymów katalizujących reakcje utleniania, czy też związków o właściwościach redukujących [16]. Ponadto mogą one wzmacniać działanie innych przeciwutleniaczy obecnych w żywności, m. in. witamin rozpuszczalnych w tłuszczach.

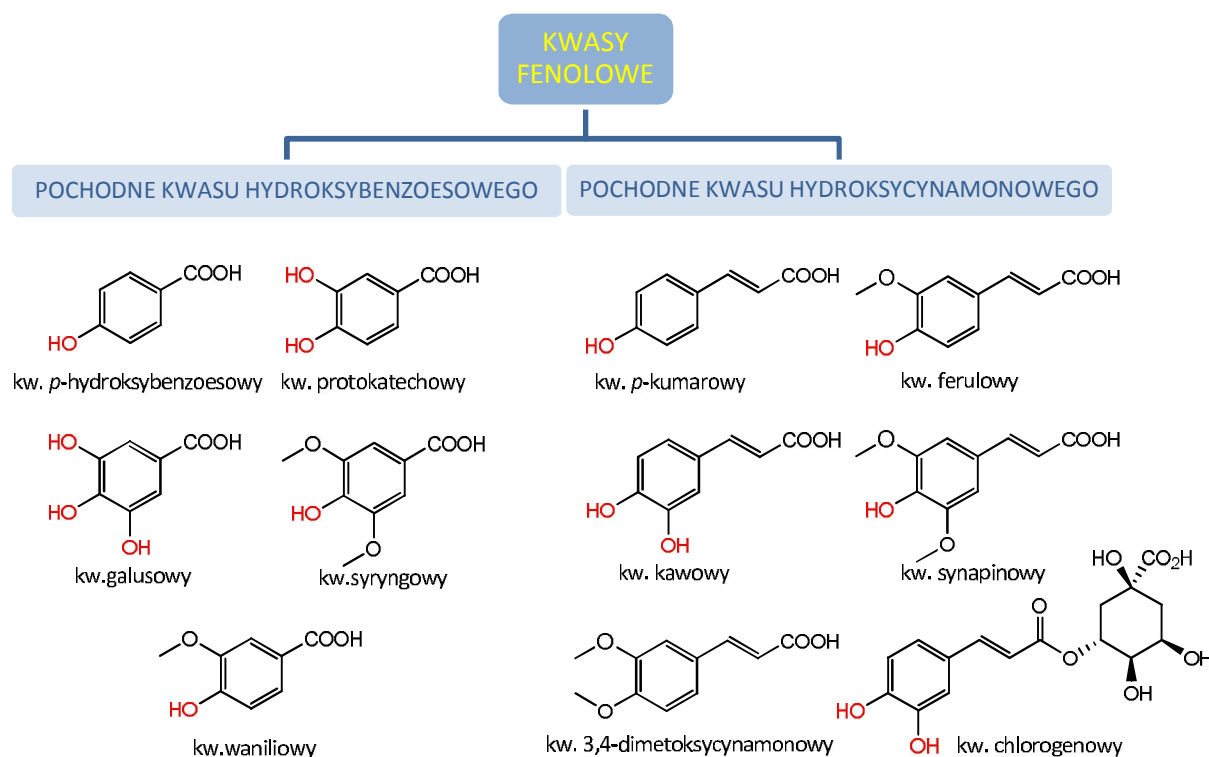
Związki fenolowe charakteryzuje duża różnorodność pod względem struktury i właściwości, dlatego usystematyzowanie ich jest dość trudne. Stosując strukturę szkieletu węglowego jako kryterium podziału, można jednak wyróżnić cztery grupy polifenoli, są to: fenolokwasy, flawonoidy, stilbeny i taniny (Schemat 2)[19, 20].



Schemat 2. Podział polifenoli

### 3.1.1 Kwasy fenolowe

Kwasy fenolowe w tkankach roślinnych występują głównie w postaci związanej jako składowe lignin i tanin hydrolizujących w postaci estrów bądź glikozydów [21]. Są hydroksylowymi pochodnymi kwasu cynamonowego lub benzoowego (Rysunek 1).



Rysunek 1. Kwasy fenolowe

Kwasy hydroxycynamonowe są najbardziej rozpowszechnionymi w tkankach roślinnych fenolokwasami. Są odpowiedzialne za kwaśny i gorzki smak niektórych produktów spożywczych. Nadają im również właściwości ściągające. Należący do tej grupy kwas kawowy występuje w kawie, jabłkach, ziemniakach, szpinaku, sałacie, kapuście, oliwie z oliwek, winie [22, 23].

Wysoka aktywność przeciwutleniająca kwasów fenolowych uwarunkowana jest ich budową chemiczną. Podstawienie grupy będącej donorem elektronów (np. metoksylowej) w pozycji *orto*- do grupy hydroksylowej, zwiększa właściwości przeciwutleniające kwasów fenolowych. Zależność ta tłumaczy różnice w poziomie aktywności kwasów synapinowego, ferulowego i *p*-kumarowego.

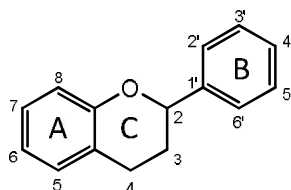
Kwas synapinowy z dwiema grupami metoksyłowymi w pozycjach *orto*- w stosunku do grupy hydroksylowej jest bardziej aktywny niż ferulowy, posiadający jedną grupę metoksyłową, a ten jest aktywniejszy niż kwas kumarowy [21].

Z właściwości przeciwutleniającej fenolokwasów wynika szereg właściwości prozdrowotnych. Poprzez ograniczenie oksydatywnej modyfikacji frakcji LDL (lipoprotein transportujących cholesterol z wątroby m.in. do śródłonka tętnic), hamują proces powstawania blaszek miażdżycowych w naczyniach wieńcowych. Kwasy ferulowy i kawowy obecne w jabłkach, śliwkach, gruszkach, kawie i miłorzębie, poza wysoką aktywnością przeciwutleniającą [24], posiadają właściwości przeciwnowotworowe. 5,8-Dihydrobenzofurany pochodzące od tych kwasów wykazują efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek raka sutka, okrężnicy i białaczki [25]. W doświadczeniach *in vivo* wykazano, że kwas chlorogenowy, obecny w kawie, herbacie, pomidorach chroni komórki wątroby przed skażeniem czterochlorkiem węgla oraz izotopami kobaltu i kadmu. Ponadto hamuje przemianę kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) w ośrodkowym układzie nerwowym [26]. Znane są również właściwości żółciopędne kwasów kawowego, chlorogenowego, syringowego, 3,4-dimetoksycynamonowego. Kwasy kawowy, waniliowy, *p*-kumarowy i *p*-hydroksybenzoowy działają przeciwbakteryjnie a kwas galusowy dodatkowo ściągająco i przeciwpotnie. Różnorodne właściwości farmakologiczne kwasów fenolowych tłumaczą powszechne wykorzystanie zawierających je surowców w tradycyjnej medycynie ludowej.

### 3.1.2 Flawonoidy

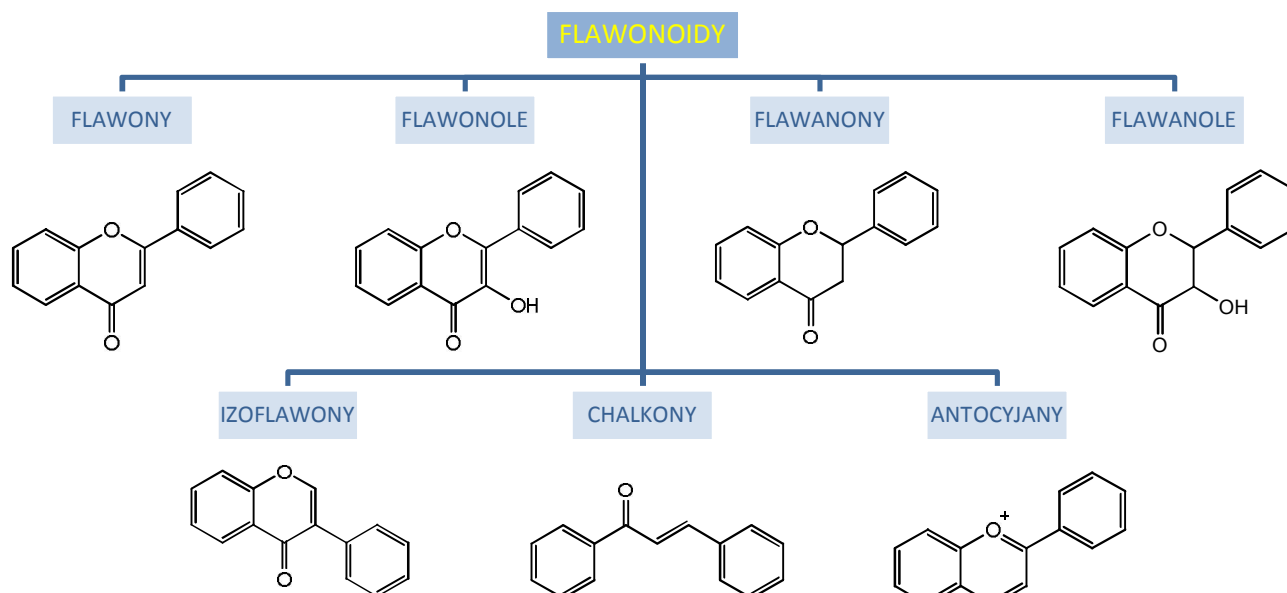
Flawonoidy są składnikami wielu roślin od setek lat stosowanych w medycynie ludowej. Dzięki wiedzy o właściwościach ziół, przekazywanej z pokolenia na pokolenie flawonoidy zastępowały leki. Wyciąg z korzenia lukrecji, stosowano już w starożytnej Grecji i Rzymie. Ma on działanie przeciwzapalne, a za jego właściwości odpowiadają m. in. likwirytygenina, izolikwirytygenina i ich glikozydyb (Rysunek 4). Jednak flawonoidami jako grupą określonych związków chemicznych zaczęto interesować się dopiero w latach trzydziestych ubiegłego wieku. Zaobserwowano wówczas, że wyciągi z cytryny i czerwonej papryki mają korzystny wpływ na świnki morskie dotknięte szkorbutem. Wpływ ten był silniejszy niż obserwowany podczas podawania preparatów czystego kwasu L-askorbinowego. Wkrótce z soku cytrynowego wyodrębniono substancję odpowiedzialną za tę aktywność i nazwano ją witaminą P (od ang. permeability, tzn. przepuszczalność) lub C2 (czynnik wspomagający witaminę C). Niedługo potem okazało się, że wyodrębnioną substancję stanowiła mieszanina flawonoidów, którą zaczęto nazywać bioflawonoidami. Do tej pory rozpoznano ponad 7000 różnych bioflawonoidów.

Flawonoidy stanowią największą i najbardziej zróżnicowaną grupę polifenoli pochodzenia roślinnego. Mają znaczący wpływ na kształtowanie smaku i barwy owoców, warzyw i produktów powstających w wyniku ich przetwarzania. Występują zarówno w postaci wolnej jak i glikozydów [27]. Struktura wszystkich flawonoidów oparta jest na szkielecie 2-fenylochromanu (Rysunek 2) jednak większość z nich posiada w pozycji 4 grupę karbonylową.



Rysunek 2. Szkielet 2-fenylochromanu

Flawonoidy podzielono na siedem klas w zależności od stopnia utlenienia pierścienia piranowego (C) oraz położenia pierścienia fenolowego (B). Wyróżniamy flawony, flawanony, flawonole, flawanole, izoflawony, antocyjany i chalkony (Rysunek 3).



Rysunek 3. Podział flawonoidów ze względu na budowę szkieletu

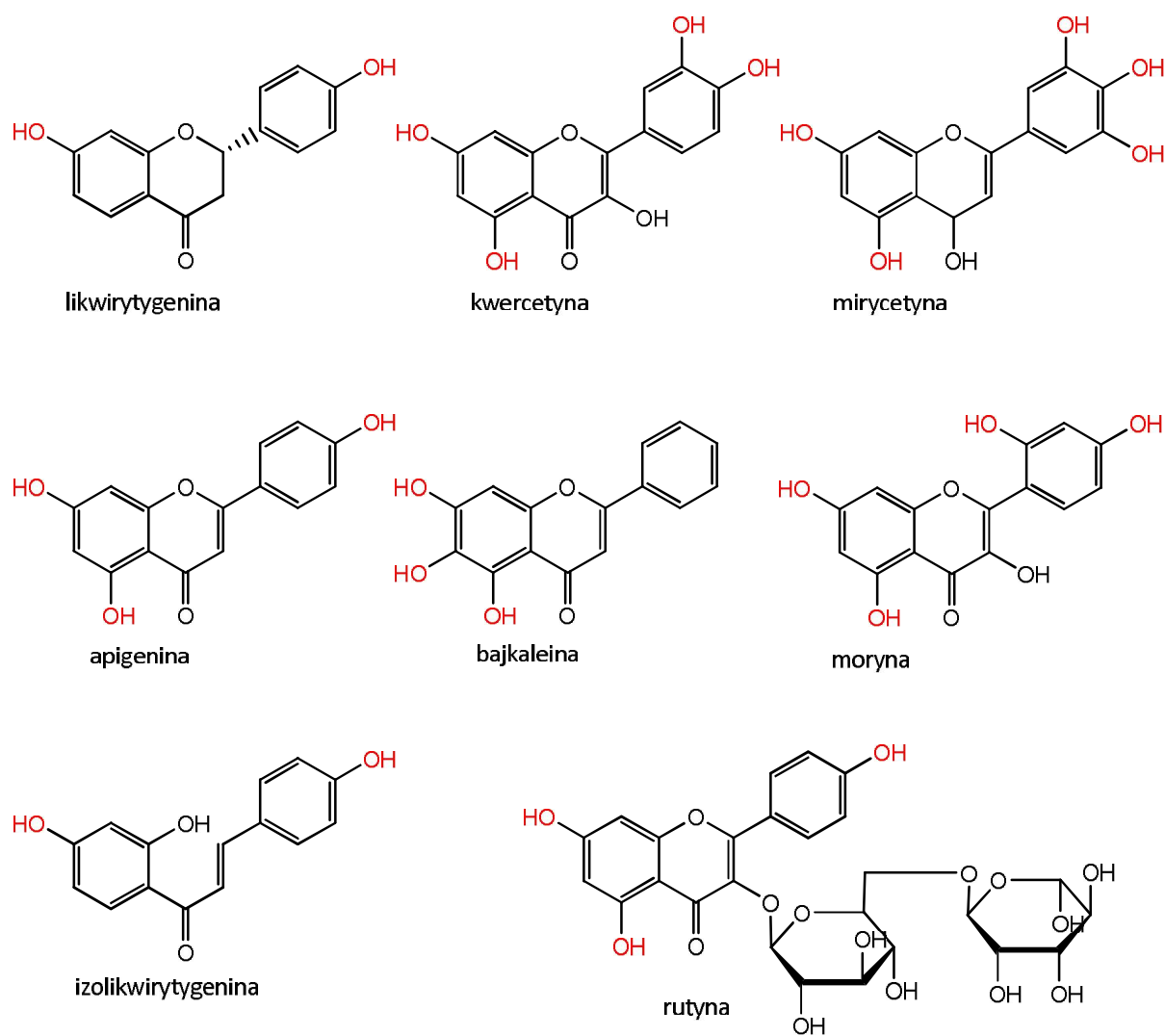
Ilość grup hydroksylowych i ich położenie mają znaczący wpływ na właściwości przeciwutleniające. Obecność dodatkowych grup hydroksylowych w pierścieniu B w pozycji *ortho*-względem siebie wzmacnia tę aktywność [28].

Związki flawonoidowe są od dawna wykorzystywane w terapii różnych schorzeń. Aktualne badania wskazują, że ich spożywanie może obniżyć śmiertelność wywołaną chorobami układu krążenia [29]. Rutyna (Rysunek 4) i jej półsyntetyczne pochodne są powszechnie stosowane jako środki regulujące przepuszczalność naczyń włosowatych i poprawiające krążenie obwodowe. Związki te współdziałają z witaminą C uelastyczniają i wzmacniają tkankę łączną m.in. naczyń krwionośnych.

Liście brzozy czy ziele nawłoci znalazły zastosowanie jako surowce w produkcji preparatów moczopędnych. Za aktywność tę w największym stopniu odpowiadają mirycetyna i moryna. Siła działania moczopędnego jest wprost proporcjonalna do ilości grup hydroksylowych w cząsteczce flawonoidu [27].

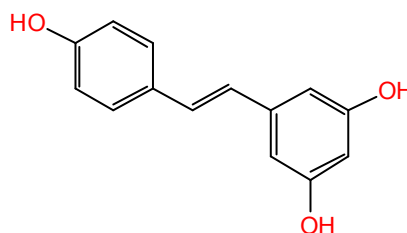
Związki fenolowe wykazują również wpływ na ośrodkowy i obwodowy układ nerwowy. Prawdopodobnie wynika to z ich powinowactwa do receptorów benzodiazepinowych GABA. Wykazano synergizm działania niskich stężeń epigeniny (występującej np. w koszyczkach rumianku) i galusanu (-)-epigalokatechiny (obecnego m.in. w zielonej herbacie) z diazepamem [30].

Niektóre flawonoidy wykazują działanie przeciwalergiczne. Surowce roślinne zawierające kwercetynę, rutynę, apigeninę, mirycetynę, bajkalinę i bajkaleinę znalazły zastosowanie w produkcji preparatów wspomagających leczenie alergii [31]. Kwiaty bławatka, liście i owoce czarnej porzeczki, owoce aroni, z uwagi na wysoką zawartość antocyjanów, wykorzystywane są w łagodzeniu objawów alergii ocznych [32].



Rysunek 4. Przykłady flawonoidów

### 3.1.3 Resweratrol



Rysunek 5. *trans*-Resweratrol

Naukowcy od dawna stawiali sobie pytanie: dlaczego we Francji, gdzie spożycie lipidów, np. masła jest duże, umieralność z powodu choroby niedokrwiennej serca jest mała? To nietypowe zjawisko nie znajdowało wytłumaczenia, do momentu, gdy wykazano, że cholesterol powodujący miażdżycę musi być utleniony. Resweratrol (Rysunek 5) przyczynił się do wyjaśnienia tzw. francuskiego paradoksu i zyskał tym swoją „popularność”. Jest on polifenolową pochodną stilbenu. Wraz z witaminami C i E hamuje, peroksydację lipidów błon komórkowych i tym samym chroni frakcję LDL lipoprotein przed utlenieniem [33]. Związki te występują w skórce czerwonych winogron i w czerwonym winie, którego spożycie we Francji jest bardzo duże. Poza tym obecny jest w mniejszych ilościach w orzeszkach ziemnych, w owocach, przede wszystkim w skórce, morwy i czarnej porzeczki [34].

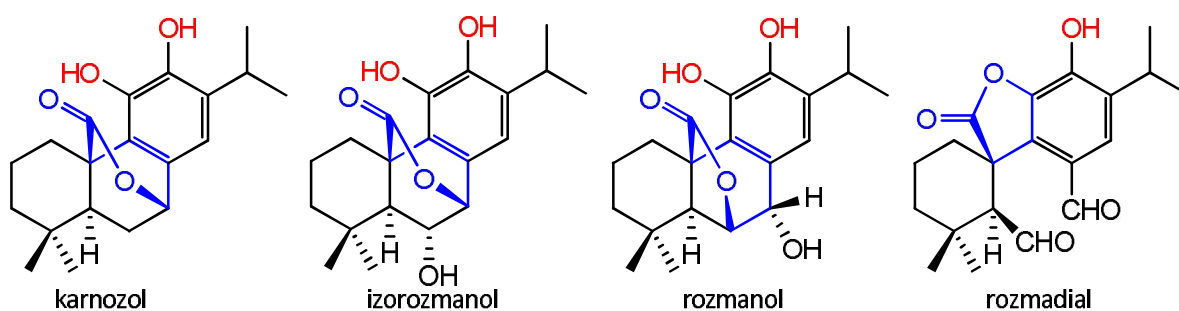
Badania prowadzone na hodowlach komórkowych wykazały, że resweratrol wpływa na proces transformacji czynników rakotwórczych. Wykazuje zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych i indukcji apoptozy. Hamuje także aktywność polimerazy DNA, czynników transkrypcyjnych i białkowych kinaz tyrozynowych [35]. Badania *in vivo* wskazują na wysoką skuteczność resweratrolu w hamowaniu miejscowego rozrostu guza w gruczole piersiowym oraz istotny wpływ na zmniejszenie częstości występowania przerzutów nowotworów rozwijających się w gruczole piersiowym transgenicznych myszy HER-2/neu. Jednak trudności w określeniu odpowiedniej dawki i wysokie koszty pozyskiwania sprawiają, że do tej pory nie zostały przeprowadzone badania kliniczne skuteczności działania resweratrolu [36].

Kontrowersyjne okazują się wyniki badań dotyczące wpływu resweratrolu na proces angiogenezy. Według prof. Shoji Fukuda (University of Connecticut Health Center), resweratrol hamuje agregację płytek krwi oraz może stymulować angiogenezę przez aktywację syntezy naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) oraz jego receptora (flt-1), jednego z receptorów kinazy tyrozynowej. Innego zdania jest prof. Beata Olas z Uniwersytetu Łódzkiego, według której resweratrol hamuje proces angiogenezy [37, 38].



### 3.1.4 Naturalne laktony z ugrupowaniem fenolowym

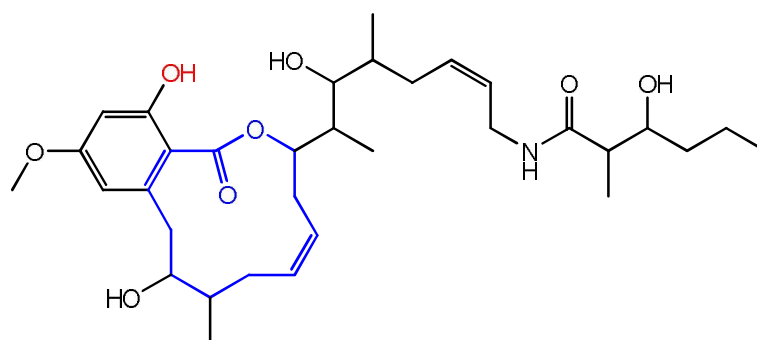
Wśród substancji izolowanych ze środowiska naturalnego, liczną grupę stanowią związki z ugrupowaniem laktonowym. Charakteryzują się różnorodnymi, wartościowymi aktywnościami biologicznymi. Dobrym przykładem takich aktywnych biologicznie połączeń są związki, w których pierścień laktonowy jest skondensowany z pierścieniem aromatycznym. Najbardziej znanym jest karnozol, aktywny składnik wyciągu z rozmarynu, w którym pierścień  $\delta$ -laktonowy skondensowany jest z pierścieniem 2,3-dihydroksi-3-izopropylbenzoesowym. W skład wyciągu z rozmarynu, poza karnozolem wchodzi także związki, w których z pierścieniem aromatycznym skondensowany jest pierścień  $\gamma$ -laktonowy (rozmadial) lub  $\epsilon$ -laktonowy (rozmanol) (Rysunek 6).



Rysunek 6. Składniki wyciągu z rozmarynu

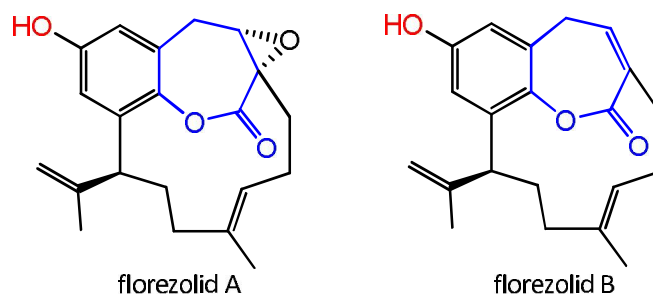
Rozmaryn (*Rosmarinus officinalis*) pochodzi z Europy południowej i ze względu na swój aromat jest powszechnie używaną przyprawą [39]. Ekstrakty z rozmarynu wykazują silne działanie antyoksydacyjne. Hamują peroksydację lipidów, wytwarzanie reaktywnych form tlenu. Ponadto wykazują działanie przeciwzapalne i przeciwrakowe [14, 40, 41, 42, 43, 44]. Ekstrakty okazały się również efektywnymi antyutleniaczami w żywności. Znalazły zastosowanie w produkcji majonezów, przetworów mięsnych, ziemniaczanych i sosów. Składniki ekstraktów zapobiegają oksydacji oleju sojowego i kukurydzianego [15]. Od lat rosło zapotrzebowanie na naturalne konserwanty, które mogłyby być stosowane w przemyśle spożywczym. W oficjalnym biuletynie Komisji europejskiej, dnia 20 października 2010 ekstrakt rozmarynu został ostatecznie uznany jako bezpieczny i skuteczny przeciwutleniacz nadający się do konserwowania żywności. Komisja Unii Europejskiej nadała mu nr E 392 na podstawie Dyrektywy Komisji 2010/67/UE. Zanim zaakceptowano E 392, używano ekstraktu z rozmarynu jako naturalnego aromatu bez oznaczania go jako środka konserwującego.

Kolejnym przykładem benzolaktonu o interesujących właściwościach biologicznych jest kruentaren (ang. cruentaren) (Rysunek 7), w którym pierścień dodekalaktonowy jest skondensowany z pierścieniem 2-hydroksy-4-metoksybenzenowym. Produkowany jest przez bakterie z rodzaju *Myxobacteria- Byssovorax cruenta* i posiada on właściwości przeciwgrzybicze. Okazał się być wysoce cytotoksyczny wobec różnych linii ludzkich komórek nowotworowych. Stosowany w ilościach nanomolarnych, hamuje proliferację różnych linii komórek nowotworowych, w tym odpornej na wiele leków linii KB. Wstrzymuje proces tworzenia tkanki przez komórki ludzkiego chłoniaka (U-937) w fazie G0/1, nie wywołując procesu apoptozy. W przeciwieństwie do innych leków przeciwnowotworowych o podobnej budowie, nie jest inhibitorem V-ATPazy, lecz hamuje działanie mitochondrialnej FOF1-ATPazy. Kruentaren lub jego syntetyczne pochodne mogą w przyszłości stanowić podstawę terapeutycznych strategii, gdyż właśnie ATP-azy mitochondrialne odgrywają kluczową rolę w patofizjologii wielu ludzkich chorób, w tym raka [45].

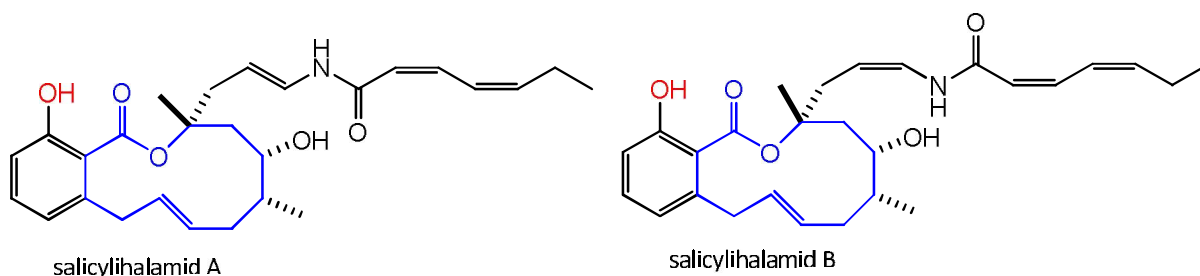


Rysunek 7. Kruentaren

W 1994 roku opisano lakton, w strukturze którego pierścień benzenowy skondensowany jest z pierścieniem nienasyconego  $\epsilon$ -laktonu - florezolid B (Rysunek 8). Wyizolowany został z osłonicy *Aplidium longithorax* wyłowionych w pobliżu Pungu Besar, (Morze Flores, zachodnia część Oceanu Spokojnego). Jest cytotoksyczny wobec komórek linii KB (raka jamy nosowo-gardłowej)[13].

Rysunek 8. Naturalne  $\epsilon$ -laktony ze skondensowanym pierścieniem benzenowym

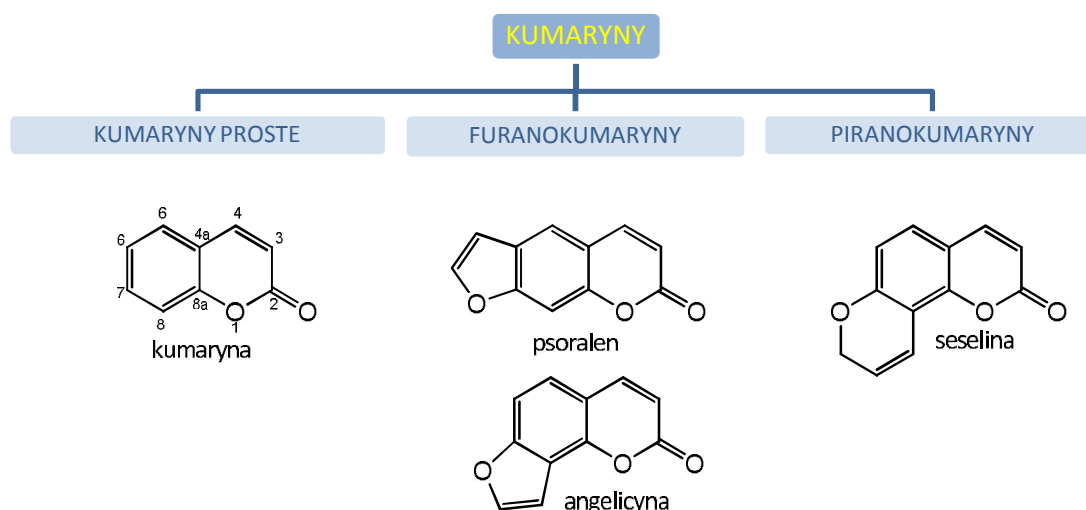
Salicylihalamidy A i B (Rysunek 9) zostały wyizolowane z gąbek z rodzaju *Haliclona* wyłowionych z wód otaczających wyspę Rottneest u wybrzeży Australii Zachodniej. Związki te posiadają w swojej strukturze dwunastocząłowy, nienasycony pierścień laktonowy skondensowany z pierścieniem benzenowym. Zostały zidentyfikowane jako wysoce cytotoksyczne. Wyniki badań prowadzonych w USA przez National Cancer Institute (NCI) nad salicylihalamidem A, na liniach ludzkich nowotworów sugerują, że związek ma nowy, nieznany mechanizm działania. Może on stać się punktem wyjścia dla syntezy nowej klasy związków przeciwnowotworowych [46, 47].



Rysunek 9. Naturalne makrolidowe laktony z pierścieniem benzenowym

### 3.1.5 Kumaryny

Kumaryny, pochodne  $\alpha$ -pironu, stanowią bogatą strukturalnie grupę naturalnych związków. Nazwa grupy wywodzi się od kumaryny - laktonu kwasu *cis-orto*-hydroksycynamonowego (kw. kumarynowego). Pod względem budowy możemy podzielić je na kumaryny proste (oparte na szkielecie  $\alpha$ -pironu), furanokumaryny i piranokumaryny (Rysunek 10). Zróżnicowanie związków kumarynowych wynika również z obecności dodatkowych grup funkcyjnych w strukturze cząsteczek. Najczęściej są to grupy hydroksylowe i metoksyłowe ułożone przy atomach węgla C-6, C-7, i C-8. Często dochodzi w tych pozycjach do przyłączania cząsteczek cukrów, w wyniku czego powstają glikozydy kumarynowe. Jednak w wyniku działania enzymów roślinnych, w procesie suszenia dochodzi do hydrolizy wiązań glikozydowych, dlatego też surowce stosowane w leczeniu zawierają najczęściej wolne kumaryny i ich dimeryczne postaci.



Rysunek 10. Struktury kumaryn

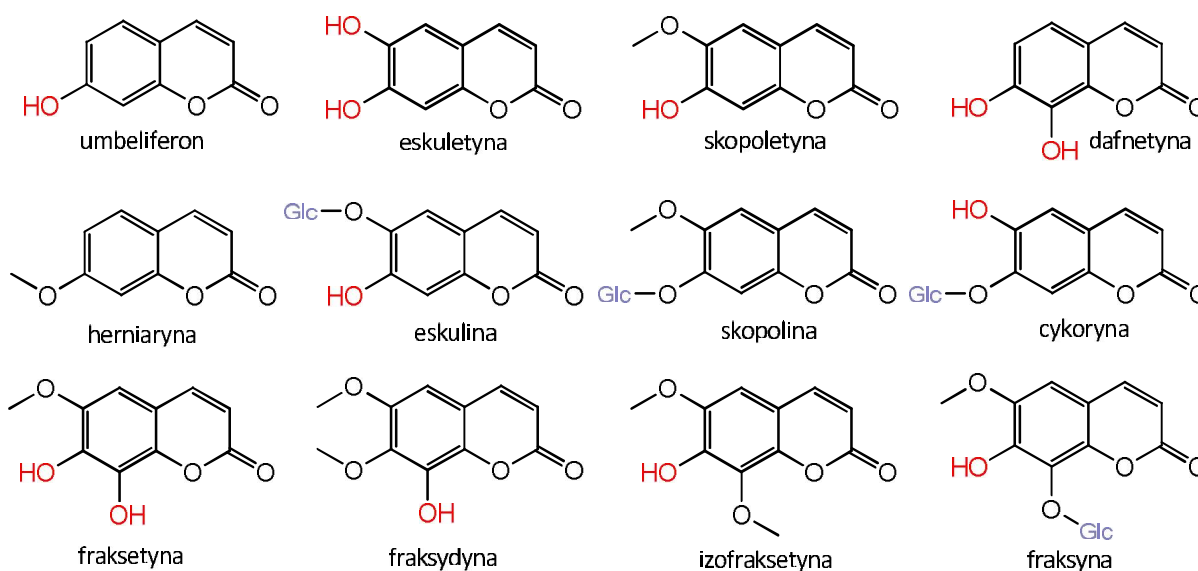
Odkryto i opisano już ponad 1800 naturalnych kumaryn. Dotychczas wykryto je w ponad dwustu gatunkach roślin, należących do trzydziestu różnych rodzin. Mogą występować w różnych ich częściach, najobficiej w młodych organach, najbardziej narażonych na czynniki stresowe. Zaliczane są do tzw. fitoaleksyn, związków będących odpowiedzią roślin na różnorodne czynniki stresowe. Przykładowo, kumaryny zawarte w nasionach roślin pełnią funkcję inhibitorów kiełkowania, pozwalając nasionom przetrwać zimę. Ponadto stanowią ważny element konkurencji międzygatunkowej, gdyż uwalniane z nasion, hamują rozwój innych roślin. Ważną funkcją tych związków jest także ochrona tkanek roślinnych przed nadmiernym naświetlaniem.

Kumaryna występuje w wielu gatunkach roślin i naturalnych przyprawach. Znalaziono ją m. in. w cynamonowcu wonnym (*Cinnamomum aromaticum*), tonce wonnej (*Anthoxanthum odoratum*), marzance wonnej (*Asperula odorata*), turówce wonnej (*Hierochloe odorata*), nostrzyku wonnym (*Melilotus officinalis*), miodowniku melisowatym (*Melittis melissophyllum*), pierwiosnku wyniosłym (*Primula elatior*). Nadaje intensywny, ale przyjemny zapach świeżemu sianu [48]. W trawach występuje głównie w postaci bezwonnego glukozydu kwasu kumarynowego. Dopiero po ścięciu kwas kumarynowy, uwolniony w procesie enzymatycznej hydrolizy ulega samoistnej cyklizacji do laktonu [49].

Tabela 1. Stężenie kumaryny w niektórych naturalnych źródłach

Źródło	Stężenie (ppm)
Olejek z liści cynamonowca gat. cassia	87300
Olejek z liści cynamonowca cejlońskiego	40600
Olejek z kory cynamonowca cejlońskiego	7000
Olejek miętowy	20
Zielona herbata	1.7
Czarna borówka	0.0005

Wśród bogatej rodziny kumaryn na szczególną uwagę zasługują hydroksykumaryny i ich glikozydy. Rysunek 11 pokazuje wybranych przedstawicieli tej grupy.



Rysunek 11. Hydroksykumaryny i ich glikozydy

Jedną z najczęściej spotykanych hydroksykumaryn jest umbeliferon. Wyizolowano go z roślin z rodzaju *Umbelifere*, *Solanaceae*, *Compositae* i innych. Jest jednym ze składników olejku eterycznego rumianku pospolitego. Posiada zdolność do absorpcji promieniowania w zakresie ultrafioletu (280-315 nm) [50]. Dzięki właściwościom fotochronnym, pochodne tego związku (np. octan umbeliferonu) znalazły zastosowanie przy produkcji kosmetyków przeciwśonecznych. Umberliferonowi często towarzyszy herniaryna, posiadająca podobne właściwości. Swoją nazwę zawdzięcza połonicznikowi nagiemu (*Herniaria glabra*), z którego została wyizolowana. Kolejnymi

przedstawicielami kumaryn o właściwościach fotochronnych są eskulina oraz fraksetyna, występujące przede wszystkim w korze kasztanowca (*Aesculum hippocastanum*). Posiadają zdolność hamowania aktywności hialuronidazy, dzięki czemu poprawiają szczelność i elastyczność drobnych naczyń krwionośnych. Wykazują więc działania podobne do witaminy P, zmniejszając lub zatrzymując krwawienia. Działają przeciwwysiękowo, przeciwzapalnie i przeciwobrzękowo. Właściwości eskuliny wykorzystuje się w leczeniu hemoroidów, żylaków i owrzodzeń [51]. Eskulina posiada także właściwości przeciwnowotworowe. W badaniach *in vivo* 1% roztwór eskuliny hamował rozwój guza nowotworowego u samców szczura, (indukowanego przez podskórne podanie 1,2-dimetylohydrazyny [52], natomiast 0,05% roztwór eskuliny zmniejszał tworzenie 8-okso-2'-deoksyguanozyny w jądrowym DNA komórek trzustki chomika, indukowane chemicznym karcynogenem [53].

Hydroksypochoodne kumaryn ze względu na właściwości spazmolityczne są wykorzystywane również w leczeniu schorzeń dróg żółciowych. Fraksydyna działa żółciopędnie natomiast 4-metylo-7-hydroksykumaryna charakteryzuje się silnym, zbliżonym do papaweryny, selektywnym działaniem rozkurczającym mięśnie gładkie dróg żółciowych oraz zwieracza Oddiego, regulujące napływ żółci i soku trzustkowego do dwunastnicy. Dzięki temu znajduje zastosowanie w leczeniu dyskinez dróg żółciowych, kamic żółciowych oraz innych schorzeniach związanych z niedoborem żółci [54]. Dafnetyna izolowana z wawrzyńka wilcze tyko (*Daphne mezereum*) poza działaniem przeciwbólowym wykazuje potwierdzone *in vivo* właściwości przeciwmalaryczne [55]

Pierwszą rośliną, z której została wyizolowana kumaryna był tonkowiec wonny (*Dipteryx odorata*), a dokładniej nasiona tej rośliny zwane „fasolą tonka” [56]. Jednak jej właściwości zapachowe doceniano znacznie wcześniej. W starożytności olejek cynamonowy pełnił funkcję perfum i świętego oleju używanego do namaszczenia [57]. A cytaty potwierdzające jego zastosowanie można znaleźć już w Biblii (Księga Wyjścia 30:23; Księga Przysłów 7: 17; Pieśń nad Pieśniami 4: 14; Apokalipsa św. Jana 18: 13). Stosowany był również ze względu na swoje właściwości terapeutyczne, gdyż działa uspokajająco na ośrodkowy układ nerwowy, rozkurczowo na mięśnie gładkie, przeciwbólowo i przeciwobrzękowo [58].

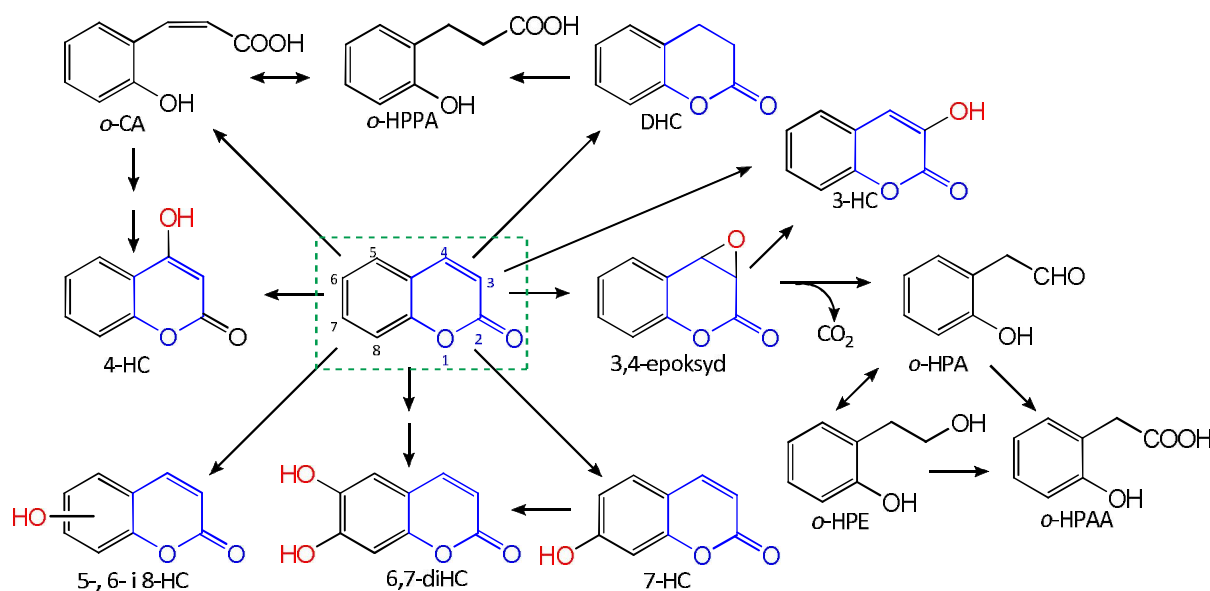
Obecnie kumaryna jest stosowana jako utrwalacz zapachu dodawany do perfum, mydeł toaletowych, detergentów, past do zębów, wyrobów tytoniowych oraz niektórych napojów alkoholowych (żubrówka). Znaczne ilości kumaryny używane są w materiałach plastikowych oraz gumowych, w farbách i sprayach, aby neutralizować nieprzyjemne zapachy. Kumaryna znalazła także zastosowanie w przemyśle spożywczym, jednak jej wykorzystywanie jako dodatku do żywności zostało zabronione w 1954 w USA przez FDA (Food and Drug Administration).

Powodem restrykcji stał się raport o hepatotoksyczności kumaryny u szczurów ( $LD_{50}$  dla szczurów wynosi 293 mg/kg ciała) [48].

Wprowadzono ograniczenia dotyczące maksymalnych dopuszczalnych dawek kumaryny w produktach spożywczych. Wynoszą one odpowiednio 2 mg/kg produktu dla żywności i napojów, 10 mg/kg, dla napojów alkoholowych oraz 50 mg/kg dla gum do żucia. Oszacowano, że człowiek narażony jest na przyjmowanie w diecie około 0,02 mg/kg pożywienia kumaryny dziennie, co stanowi 0,07 mg/kg masy ciała, a następnie ustalono tolerowaną dzienną dawkę (TDI) na poziomie 0,1 mg/kg masy ciała [59]

Wstępne badania *in vitro* wskazują, że toksyczność kumaryny na organizm szczura nie ma przełożenia na organizm człowieka. Wynika to z różnic w metabolizmie za pośrednictwem enzymu CYP2A6 [60]. Ponadto aktualne badania farmakokinetyczne u ludzi dowodzą, że kumaryna nie magazynuje się w tkankach i jest szybko wydalana po ustnym przyjmowaniu. Aż 83 % dawki wynoszącej 200 mg/kg znajduje się w moczu ludzkim już po upływie 24 godzin. Również w przypadku dostania się do organizmu człowieka przez skórę metabolizm i wydalanie następują szybko.

Metabolizm kumaryny w organizmach ssaków przedstawia Schemat 3.



Schemat 3. Metabolizm kumaryny w organizmach ssaków

Kumaryna jest przekształcana przede wszystkim do jej hydroksypochoodnych. Może ulegać hydroksylacji w sześciu możliwych pozycjach, mianowicie przy 3, 4, 5, 6, 7 i 8 atomie węgla, dając tym samym odpowiednio 3-, 4-, 5-, 6-, 7- oraz 8- hydroksykumaryny. Poza hydroksylacją, ważną ścieżkę

stanowi formowanie 3,4-epoksydu. Epoksyd ten jest nietrwały w środowisku wodnym. Okres półtrwania wynosi w przybliżeniu 4 sekundy. W wyniku jego rozpadu połączonego z usunięciem dwutlenku węgla z cząsteczki dochodzi do otwarcia pierścienia laktonowego, powstaje wówczas *o*-hydroksyfenyloacetaldehyd (*o*-HPA). Dalsze przemiany *o*-HPA prowadzą do utworzenia *o*-hydroksyfenyloetanolu (*o*-HPE) oraz kwasu *o*-hydroksyfenylooctowego (*o*-HPAA). Metabolizm kumaryny może polegać na redukcji podwójnego wiązania między 3 a 4 atomem węgla, czego rezultatem jest utworzenie 3,4- dihydrokumaryny. Pierścień laktonowy 3,4-dihydrokumaryny również może ulec hydrolizie, tworząc kwas *o*-hydroksyfenylopropionowy (*o*-HPPA).

Detoksykacja kumaryny poprzez hydroksylację w pozycji C-7 z udziałem cytochromu P450 2A6 (CYP2A6) jest wiodącą ścieżką jej metabolizmu u ludzi. Gen kodujący CYP2A6 jest najlepiej poznanym genem z rodziny CYP2A. Obok CYP2A7 i CYP2AB. CYP2A6 jest również odpowiedzialny za utleniający metabolizm nikotyny. Bierze także udział w metabolizowaniu leków np. fadrozoli, nitrozoamin czy czynników rakotwórczych takich jak aflatoksyna B1 [48, 59, 61, 62, 63]. 7-hydroksykumaryna jest jednocześnie jedynym metabolitem kumaryny u myszy i chomika. Z kolei metabolizm u szczurów sprowadza się głównie do tworzenia 3,4- epoksydu i formowania aldehydu (*o*-HPA), który jest odpowiedzialny za hepatotoksyczność kumaryny u tych gryzoni [Rietjens 2008]. Badania *in vitro* z wykorzystaniem mikrosomów komórek wątroby ludzkiej wykazały, że hydroksylacja w pozycji C-7 dominuje nawet w przypadku komórek z deficytem CYP2A6

Za metabolizm kumaryny u ludzi odpowiada cytochrom P450 (CYP), a dokładnie enzymy z rodziny CYP1, CYP2 oraz CYP3. Do tej pory u człowieka udało się zidentyfikować 57 różnych enzymów określanych jako cytochrom P450.

**Tabela 2.** Monooksygenazy cytochromu P450 odpowiedzialne za metabolizm kumaryny

CYP	Rodzaj metabolizmu
1A1	3,4- epoksydacja
1A2	3,4- epoksydacja
2A6	7- hydroksylacja
2E1	3,4- epoksydacja
3A4	3- hydroksylacja



### 3.2 Enzymatyczna hydroksylacja pierścienia aromatycznego

Selektywna hydroksylacja związków aromatycznych budzi coraz większe zainteresowanie naukowców z uwagi na właściwości ich hydroksypochodnych i ich wykorzystywanie jako prekursorów dla wielu leków. Bezpośrednia hydroksylacja związków aromatycznych jest jedną z najtrudniejszych do przeprowadzenia reakcji chemicznych. Znane są sposoby wprowadzania grupy hydroksylowej do prostych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, wykorzystujące nadtlarki. Jedną z nich jest opisana przed ponad stu laty metoda, oparta na generowaniu rodnika hydroksylowego (w układzie  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ), znana jako reakcja Fentona, która do dzisiaj jest najpopularniejszym sposobem utleniania zanieczyszczeń organicznych w procesie oczyszczania ścieków.[64]. Badane były także metody utleniania benzenu do fenolu, wykorzystujące jako katalizatory kompleksy metali (Fe, Pt, V) [65, 66, 67]. Miały one stanowić alternatywę do powszechnie wykorzystywanej do syntezy fenolu metody kumenowej. Aktywnym katalizatorem utleniania benzenu do fenolu, a także w dalszym utlenianiu fenolu do dihydroksybenzenów okazał się tytanosilikalit modyfikowany palladem (TS-1) w obecności nadtlarku wodoru jako utleniacza [68]. Metoda ta jednak nie znalazła zastosowania w przemyśle ze względu na zbyt niską wydajność reakcji. Oláh i współpracownicy przedstawili metodę hydroksylacji pierścienia aromatycznego, wykorzystującą nadtlarek wodoru oraz nadkwas w reakcji substytucji elektrofilowej. Reakcja przebiegała w niskiej temperaturze, jednak jej wydajność była dobra [69].

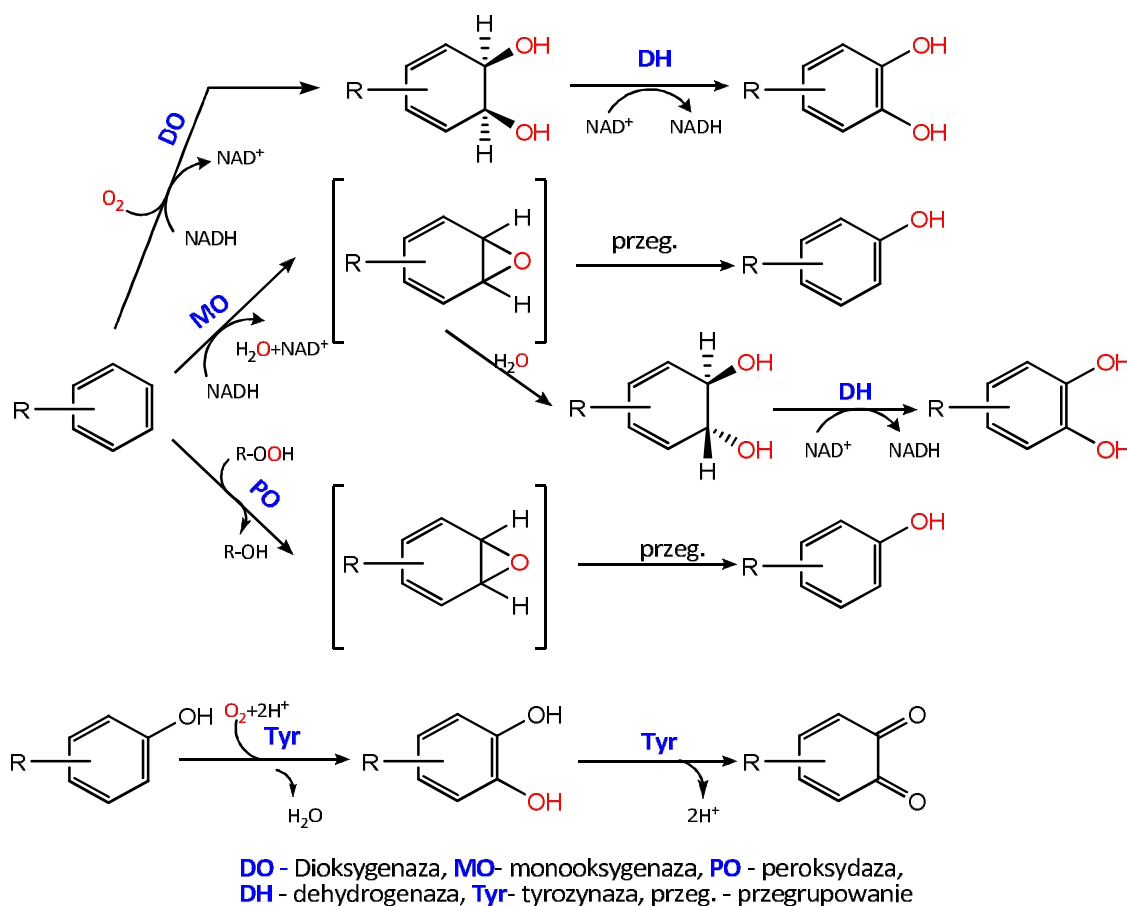
Chociaż wciąż dostrzegalny jest postęp w wykorzystywaniu nadtlarku wodoru i katalizatorów metalicznych (np. wanadu, palladu,  $\text{TiO}_2$ ) w utlenianiu benzenu, toluenu czy ksylenu, selektywność reakcji jest nadal ograniczona [70, 71]. Są to metody drogie i obciążające środowisko naturalne. Wykorzystanie nadkrytycznego dwutlenku węgla, skuteczne w utlenianiu cyklicznych alkanów i alkenów, również nie znalazło zastosowania w przypadku związków aromatycznych [72].

Alternatywną metodą otrzymywania hydroksypochodnych benzenu i innych związków aromatycznych jest hydroksylacja z zastosowaniem biokatalizatorów (biohydroksylacja). Na biohydroksylację zaczęto zwracać uwagę w 1952 roku, kiedy przeprowadzono pierwszą udaną próbę transformacji progesteronu do 11- $\alpha$ -hydroksypochodnej. Biokatalizatorem tej reakcji był grzyb *Rhizopus arrhizis* [73]. Trzy lata później dwie niezależne grupy badaczy, znakując atomy tlenu izotopem  $^{18}\text{O}_2$  wykazały, że obydwa atomy tlenu cząsteczkowego mogą być bezpośrednio włączane do pierścienia aromatycznego podczas enzymatycznego utleniania 3,4-dimetylofenolu przez fenolazę i katecholu przez pirokatechazę. Wśród tej grupy naukowców był również Osamu Hayaishi, uważany za twórcę pojęcia „oksygenazy”. Właśnie do oksygenaz zaklasyfikowane zostały zarówno fenolaza jak i pirokatechaza [74, 75]. Obecnie wiadomo, że oksygenazy występują we wszystkich formach życia,

od archeonów (zwanymi dawniej archebakteriami) do ssaków. Wyróżniamy wśród nich trzy klasy: monooksygenazy, dioksygenazy i lipooksygenazy.

- Monooksygenazy katalizują reakcje, w których jeden atom cząsteczki tlenu wbudowywany jest do substratu, podczas gdy drugi ulega redukcji przy użyciu NADH, w wyniku czego powstaje cząsteczka wody.
- Dioksygenazy katalizują reakcje, w których dwa atomy tlenu są regio- i stereoselektywnie wstawiane do cząsteczki substratu.
- Trzecią klasę stanowią lipooksygenazy, czyli dioksygenazy niezależne od kofaktorów.

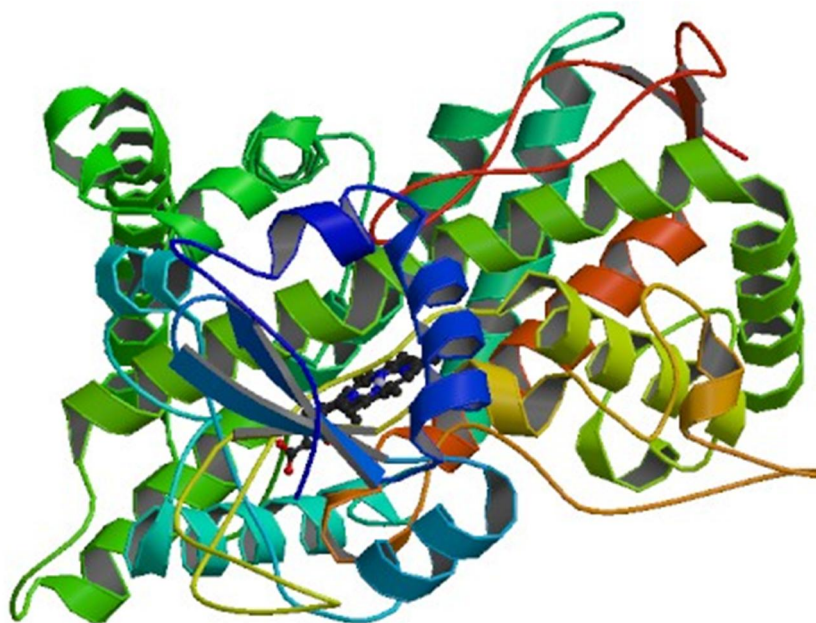
Do enzymów katalizujących hydroksylację w pierścieniu aromatycznym zaliczyć można również zewnątrzkomórkowe peroksydazy, katalizujące utlenianie nadtlenkiem wodoru i tyrozynazy - metaloenzymy glikoproteinowe (Schemat 4).



Schemat 4. Enzymy katalizujące hydroksylację w pierścieniu aromatycznym

Spośród przebogatej gamy monooksygenaz zaledwie kilka nie zawiera w swojej strukturze hemu. Dotychczas opisano ponad 5500 sekwencji monooksygenaz hemowych należących do przedstawicieli wszystkich królestw organizmów żywych. Katalizują reakcje hydroksylacji różnorodnych związków chemicznych, w tym także aromatycznych, od niepodstawionego pierścienia benzenu do złożonych struktur, takich jak flawonoidy, czy aromatyczne steroidy.

Pierwszą monooksygenazę hemową opisano jako barwnik wiążący tlenek węgla we frakcji komórek mikrosomalnych wątroby szczura. Otrzymała ona nazwę „cytochrom”. Nazwa Cytochrom oznacza białko, które w kompleksie z tlenkiem węgla wykazuje maksymalną absorbcję przy 450 nm. Jest ono hemoproteiną o masie cząsteczkowej 50 kDa. Centrum aktywne cytochromu P-450 stanowi grupa hemowa, w której żelazo na +3 stopniu utlenienia związane jest czterema wiązaniami kowalencyjnymi z pierścieniami pirolowymi porfiryny, piątym wiązaniem z grupą tiolową cysteiny. Szósta pozycja służy do przyłączenia cząsteczki tlenu. Z wyjątkiem niektórych cytochromów pochodzących od bakterii i grzybów, zdecydowana większość związana jest z błonami mitochondrialnymi lub błonami retikulum endoplazmatycznego.



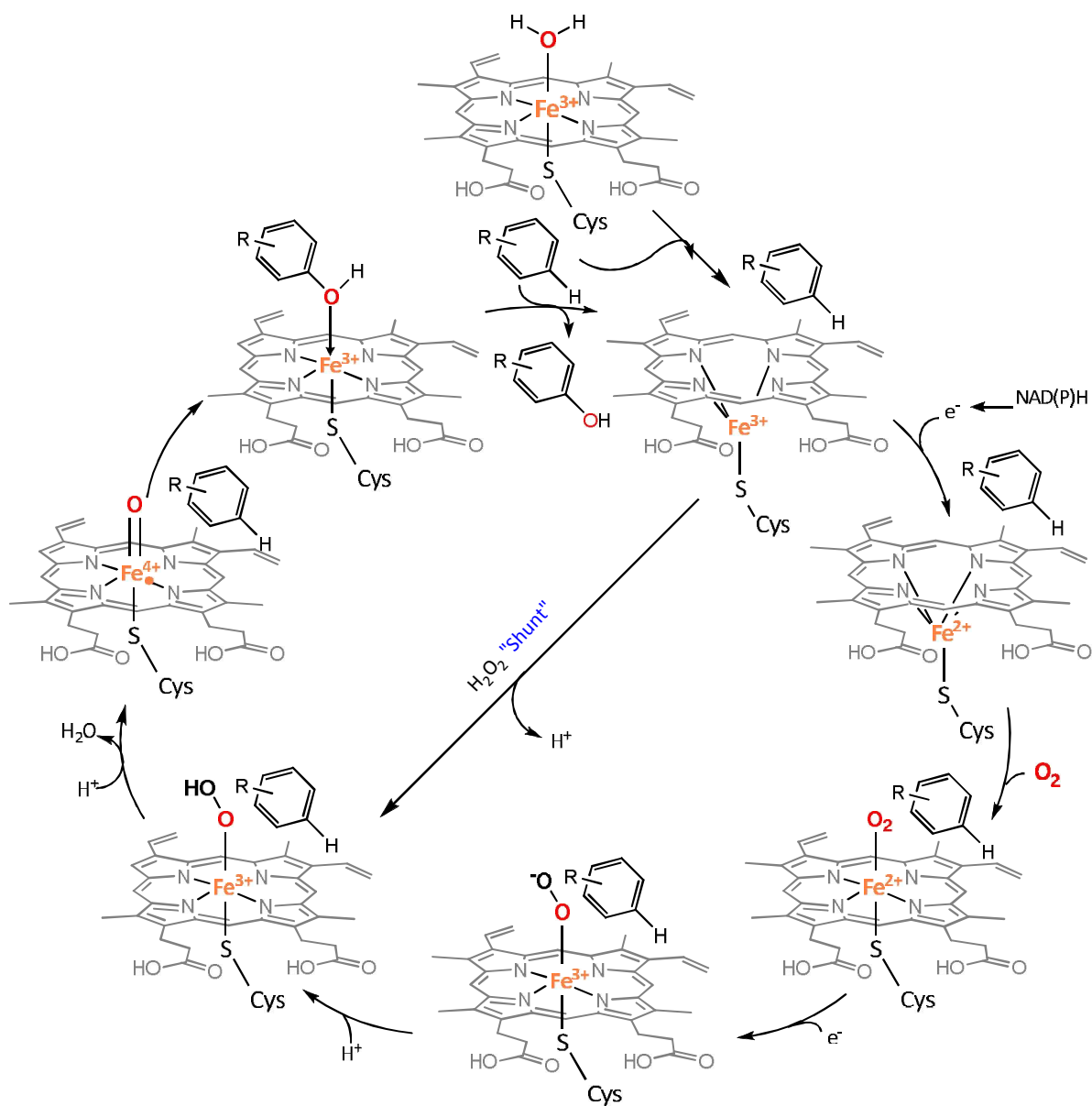
Rysunek 12. Cytochrom P450 (CYP2C9) [76]

### 3.2.1 Cykl katalityczny cytochromu P450

Badania nad mechanizmem działania cytochromu P450 trwały przez całe dekady. Poniżej przedstawiono obecnie akceptowaną wersję (Schemat 5) [77].

Cykl rozpoczyna się od jednoczesnego związania substratu (R-H) i uwolnienia hydroksylowanego produktu (lub cząsteczki wody w przypadku enzymu w stanie spoczynku). Związanie substratu prowadzi do utworzenia kompleksu enzym-substrat. Kompleks przyjmuje pierwszy elektron pochodzący od kofaktora NAD(P)H. Po przyjęciu elektronu, kation  $Fe^{2+}$  wiąże cząsteczkowy tlen, który staje się szóstym ligandem. Przyłączenie drugiego elektronu, prowadzi do powstania kompleksu żelazo-nadlenkowego, zwanego również „jednostką O”. Kompleks ten następnie ulega heterolitycznemu rozszczepieniu, w wyniku którego zostaje uwolniona cząsteczka wody. Usunięcie wodoru prowadzi do utworzenia wolnego rodnika. Powstaje produkt hydroksylacji, który przez krótki czas jest skoordynowany z żelazem porfiryty, poczym zostaje uwolniony a żelazo powraca do stanu wyjściowego.

W mechanizmach wielu typów cytochromów P450, ale nie we wszystkich, istnieje tzw. „shunt”, czyli w wolnym tłumaczeniu – przeciek. Jest to niezwykła ścieżka, na której substrat jest utleniany nadtlenkiem wodoru bezpośrednio do kompleksu żelazo-nadlenkowego, bez konieczności udziału kofaktorów NAD(P)H dostarczających elektrony. W warunkach naturalnych (dzikie P450), ścieżka ta nie jest efektywna, ale daje możliwość niezależności od NAD(P)H i białek pomocniczych i tworzenia samowystarczalnych „peroksygenaz P450” [78].

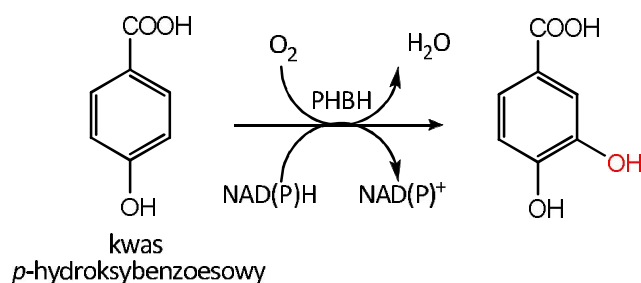


Schemat 5. Cykl katalityczny cytochromu P450 [79].

### 3.2.2 Biotransformacje polegające na hydroksylacji pierścienia aromatycznego

Atrakcyjną metodą selektywnej hydroksylacji związków aromatycznych stały się biotransformacje katalizowane przez wyizolowane enzymy lub całe komórki mikroorganizmów. W przeciwieństwie do chemicznych metod hydroksylacji, biotransformacje można zaliczyć do tzw. zielonej chemii. Umożliwiają ograniczenie zużycia szkodliwych dla środowiska związków chemicznych, a odpady (głównie biomasa i pozostałości podłoży hodowlanych) są łatwe do utylizacji. Biotransformacje cechują łagodne i bezpieczne warunki prowadzonych procesów. Biokatalizatory są w wielu przypadkach łatwe do odtworzenia. Ponadto enzymy katalizujące reakcje, wykazują wysoką chemoselektywność. Wynika to z trójwymiarowej struktury centrum katalitycznego, do której substrat musi się dopasować. Dzięki tej selektywności często możliwe jest otrzymanie produktów niemożliwych lub bardzo trudnych do uzyskania na drodze syntezy chemicznej. Poniżej przytoczono kilka przykładów transformacji, w wyniku których otrzymano produkty hydroksylacji pierścienia aromatycznego.

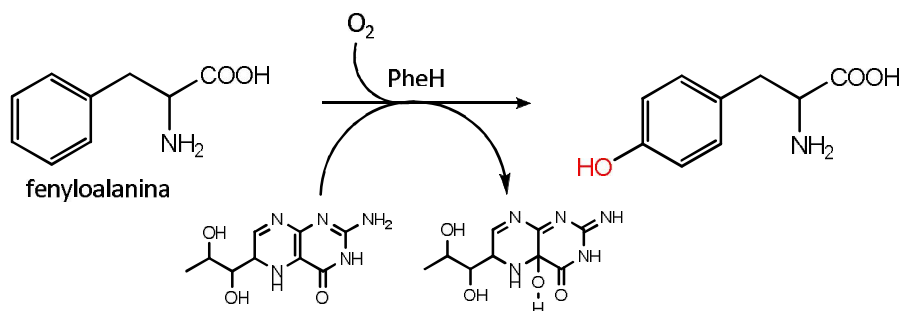
Wśród monooksygenaz zdolnych do hydroksylowania pierścienia aromatycznego wyróżnić można monooksygenazy flawinowe (FMO), które nie zawierają metalu w swoim centrum aktywnym. Przykładem takiej monooksygenazy jest hydroksylaza kwasu *p*-hydroksybenzoesowego (PHBH, EC 1.14.13.2) spotykana w mikroorganizmach prokariotycznych (np. *Pseudomonas putida*) i eukariotycznych (np. *Trichosporon cutaneum*), ale również w ludzkiej wątrobie (Schemat 6). Enzym ten posiada zdolność wstawiania grupy –OH w pozycję *orto* w stosunku do grupy hydroksylowej już obecnej w substracie [80, 81].



Schemat 6

Innym enzymem z grupy FMO jest hydroksylaza fenyloalaninowa (PheH), która katalizuje hydroksylację fenyloalaniny do tyrozyny (Schemat 7). Enzym ten wykryto w komórkach ludzkiej wątroby, komórkach centralnego układu nerwowego, ale również w komórkach kilku bakterii, np. *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas spp.* Enzym ten posiada w centrum aktywnym jon żelaza (Fe<sup>2+</sup>) związany dwiema resztami histydyny.

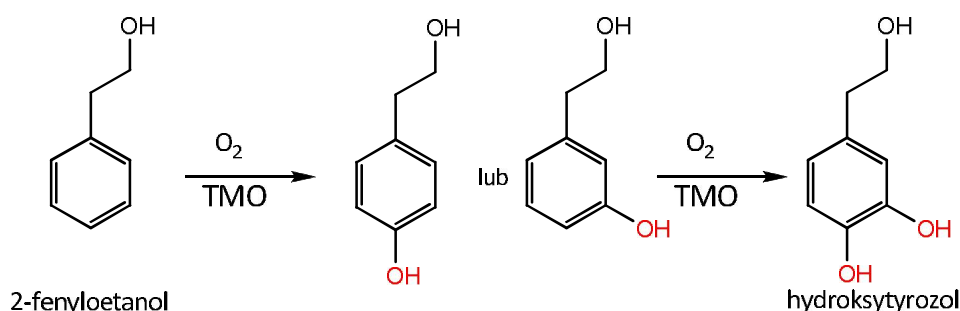
PheH jest hydroksylazą pteryno-zależną, tzn., że w trakcie cyklu katalitycznego wykorzystuje tetrahydro(bio)pterynę jako kosubstrat i przekształca ją w 4a-hydroksy(bio)pterynę [82]



Schemat 7.

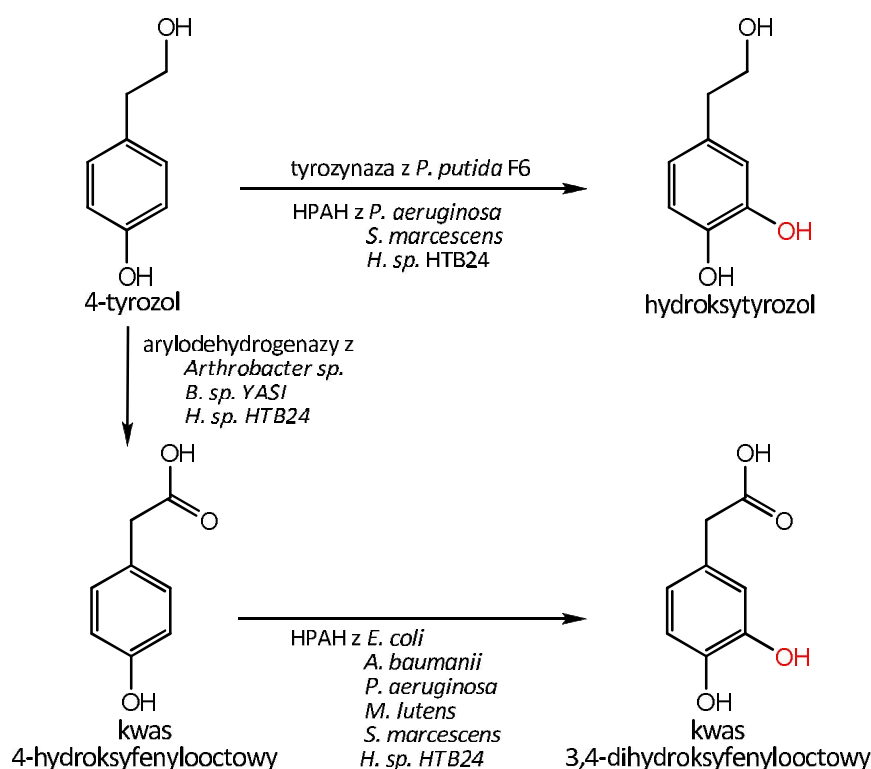
Hydroksytyrozol jest jednym z ważniejszych składników oliwy z oliwek [83, 84, 85]. Przewyższa swoją aktywnością aktywność przeciwutleniającą witaminy E i C a także wielu syntetycznych przeciwutleniaczy. Badania *in vitro* i *in vivo* potwierdziły jego działanie przeciwzapalne a także zdolność do hamowania agregacji płytek. Podobnie jak polifenole, hydroksytyrozol odgrywa dużą rolę w zapobieganiu procesom miażdżycowym poprzez hamowanie utleniania frakcji lipoprotein, zwanych potocznie frakcją LDL cholesterolu, oraz ograniczanie ich wychwytu przez makrofagi. Ponadto hamuje on procesy rakotwórcze[86] Niestety z uwagi na wysokie koszty pozyskania, nie jest on komercyjnie dostępny. Zatem poszukiwane są tańsze metody jego otrzymywania.

W pracy Morana Brouka opisano proces hydroksylacji 2-fenyletanolu, w wyniku którego otrzymano hydroksytyrozol (Schemat 8). Jako biokatalizatora użyto monooksygenazy toluenowej (TMO, wariant TmoA S395C) wyizolowanej z mutantu *Pseudomonas mendocina* KR1 [87].



Schemat 8.

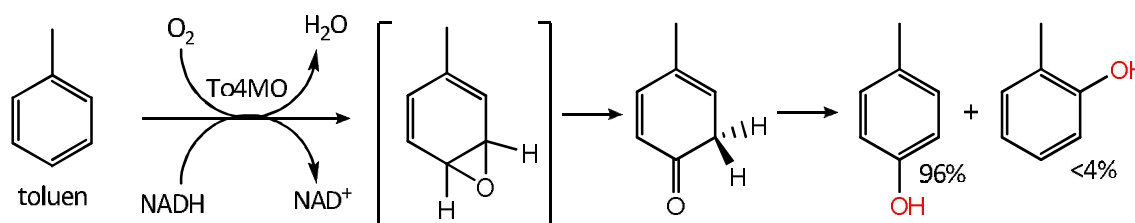
W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia na temat konwersji 4-tyrozolu do hydroksytyrozolu oraz do kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego prowadzonej przez różne bakterie, m.in. *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* czy *Halomonas sp.* HTB24 (Schemat 9). W tym drugim przypadku 4-tyrozol ulega najpierw przekształceniu do kwasu 4-hydroksyfenylooctowego a następnie hydroksylacji w pozycji C-3. Badania prowadzone przez Liebgotta i wsp. [88] wskazują, że zarówno reakcja hydroksylacji 4-tyrozolu jak i kwasu 4-hydroksyfenylooctowego katalizuje 3-hydroksylaza (HPAH, EC 1.14.13.3) z grupy monoooksygenaz. Enzym ten zbudowany jest z dwóch podjednostek: hydroksylazy (C2) i reduktazy (C1). Niestety wyizolowany enzym cechuje mała stabilność, dlatego wskazane jest prowadzenie transformacji z wykorzystaniem całych komórek mikroorganizmu. W przypadku szczepu *Pseudomonas putida* F6 za hydroksylację 4-tyrozolu odpowiada tyrozynaza. Zastosowanie ekstraktu komórek immobilizowanego w alginianie wapnia oraz zapewnienie obecności kwasu askorbinowego, zaowocowało 96% wydajnością procesu[89].



Schemat 9.

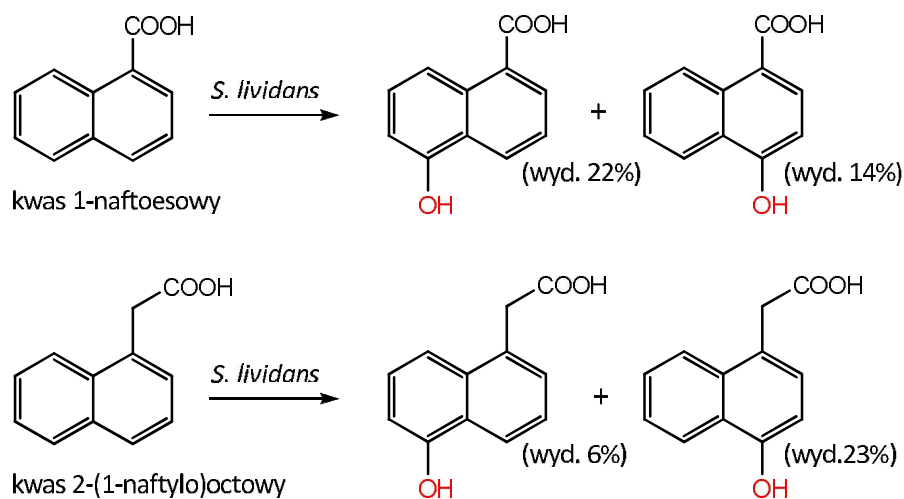


4-Monooksygenaza toluenowa (To4MO) z *Pseudomonas mendocina* katalizuje hydroksylację toluenu do *p*-krezolu (Schemat 10) (wyd. 96%). Szczep bakterii *Pseudomonas stutzeri* posiada podobną monooksygenazę toluenową (ToMO), z tą różnicą, że akceptuje ona jako substraty również ksyleny, krezole, benzen, styren i naftalen co czyni ją użytecznym narzędziem w procesach bioremediacji. Niedawno opisano ekspresję monooksygenazy toluenowej u *Pseudoalteromonas haloplanktis*, bakterii, których naturalnym środowiskiem są zimne wody Antarktyki. Celem tych badań było opracowanie szczepu bakterii, które mogłyby znaleźć zastosowanie w bioremediacji skażonych chemicznie środowisk morskich charakteryzujących się niskimi temperaturami [90, 91].



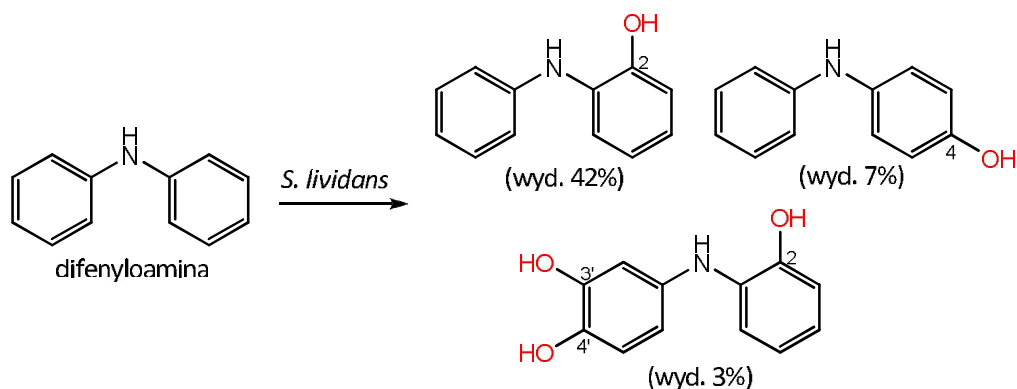
Schemat 10.

Shindo i wsp. [92] wykorzystali mutantą z gatunku *Streptomyces lividans* do przeprowadzenia biotransformacji dwóch kwasów, zawierających w strukturze ugrupowanie naftalenowe. Szczep posiadał wklonowany plazmid (pIJ6021-bphA1 (2072) A2A3A4), kodujący dioksygenazę bifenylową. Mutant ten posiadał zdolność transformacji kwasów 1-naftoesowego i 2-(1-naftylo)octowego. Produktami tej reakcji były monohydroksypochoodne substratów (Schemat 11).



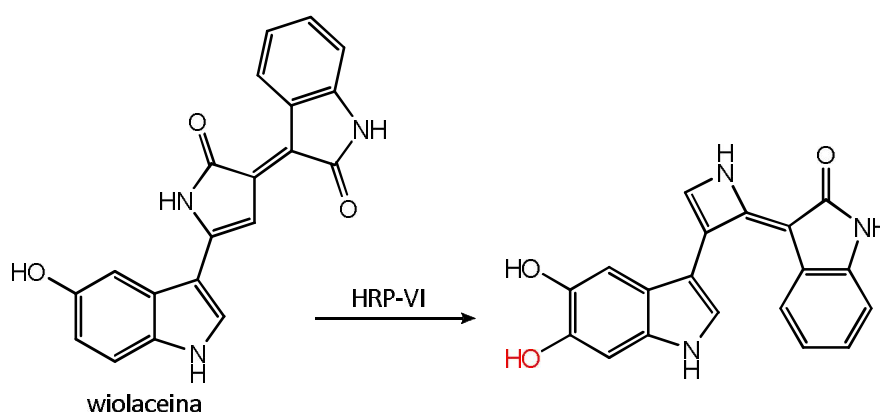
Schemat 11.

Ten sam zmodyfikowany szczep katalizował hydroksylację difenyloaminy. W rezultacie otrzymano z wysoką wydajnością dwie monohydroksypochodne. Trzeci produkt transformacji posiadał aż trzy grupy hydroksylowe ulokowane w pozycjach C-2, C-3' i C-4' (Schemat 12).



Schemat 12.

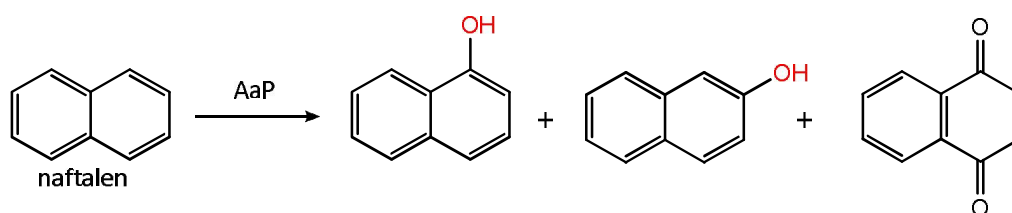
Wiolanceina jest pigmentem produkowanym przez *Chromobacterium violaceum*, nadającym tej bakterii fioletowo-purpurowe zabarwienie. Wykazuje działanie antybiotyczne, przeciwpierwotniakowe, przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe i cytotoksyczne. Zbudowana jest z trzech podjednostek strukturalnych: 5-hydroksyindolowej, 2-oksoindolowej i 2-pirolidonowej. Natália Bromberg i wsp. [93] wybrali peroksydazę chrzanową (HRP-VI) jako katalizator w biotransformacji wiolanceiny. W wyniku reakcji nastąpiła *orto*-hydroksylacja podjednostki 5-hydroksyindolowej a podjednostka pirolidonowa została przekształcona w czterocłonowy pierścień 1,2-dihydroazetu. Przemiany prowadziły do otrzymania 3-[1,2 dihydro-5(3,5-dihydroksy-1*H*-indol-3-yl)-2-azetyln-4-iliden]1,3 dihydro-2*H*-indol-2-onu z wydajnością 40% (Schemat 13). Badania wykazały, że otrzymany produkt wykazywał o cztery rzędy niższą cytotoksyczność względem fibroblastów linii V79 pochodzących z chomika chińskiego od substratu.



Schemat 13.

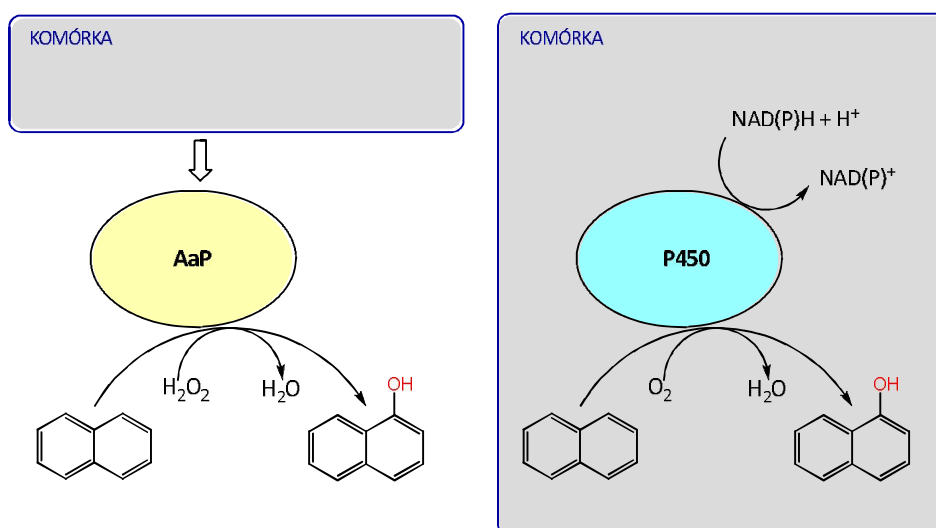
Selektywna hydroksylacja naftalenu prowadzona przez różne monooksygenazy cytochromu P450, włączając monooksygenazę pochodzącą z ludzkiej wątroby, była już wielokrotnie opisywana [26]. Znane są mechanizmy detoksykacji naftalenu i innych policyklicznych węglowodorów aromatycznych, prowadzone przez grzyby w środowisku naturalnym [94].

René Ullrich i Martin Hofrichter [79] opisali proces hydroksylacji pierścienia aromatycznego prowadzony przez zewnątrzkomórkową oksydazę z grzyba z gatunku *Agrocybe aegerita* (AaP) (Schemat 14). Głównym produktem biotransformacji był 1-naftol (wyd. 64%). Podczas reakcji powstawały także 1,4-naftochinon (wyd. 1,3%) oraz 2-naftol (wyd. 1,9%). Stosunek procentowy izomerów  $\alpha$  i  $\beta$  naftolu (36:1) potwierdza wysoką regioselektywność enzymu.



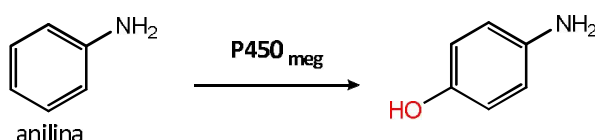
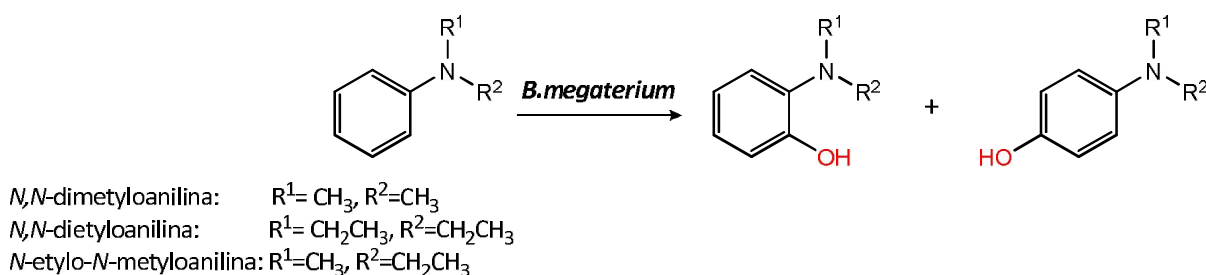
Schemat 14.

Na schemacie nr 18 przedstawiono mechanizmy hydroksylacji naftalenu katalizowane przez zewnątrzkomórkową oksydazę z *Agrocybe aegerita* (AaP) i wewnątrzkomórkową oksygenazę cytochromu P450 (Schemat 15).



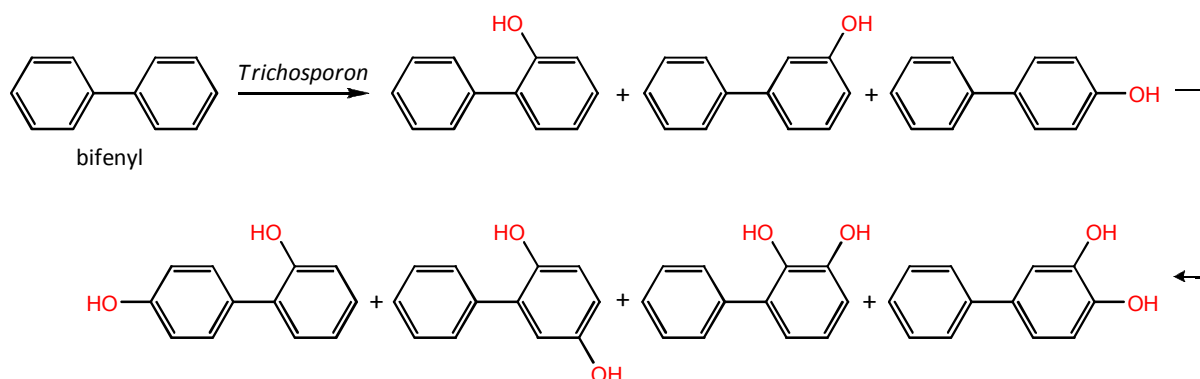
Schemat 15.

Taupp i wsp. [95] zastosowali szczep wyizolowany z gleby i zaklasyfikowany do gatunku *Bacillus megaterium* w celu wprowadzenia grupy hydroksylowej do pierścienia aromatycznego *N,N*-dialkiloaryloamin. Wyizolowany szczep posiadał zdolność hydroksylowania *N,N*-dimetyloaniliny, *N,N*-dietyloaniliny i *N*-etylo-*N*-metyloaniliny w pozycjach *orto* i *para*, z niewielką preferencją pozycji *orto*. Zaskakujący jest jednak fakt, że ów szczep nie wykazywał zdolności do biotransformacji aniliny. Wynik ten jest niezgodny z badaniami przeprowadzonymi wcześniej przez Berga i Raftera [96], którzy opisali hydroksylację aniliny w pozycji *para*. Hydroksylacja ta była wynikiem zastosowania monooksygenazy cytochromowej P450<sub>meg</sub> z *B. megaterium* ATCC 13368. W żadnym z eksperymentów nie zaobserwowano produktów dihydroksylacji (Schemat 16).



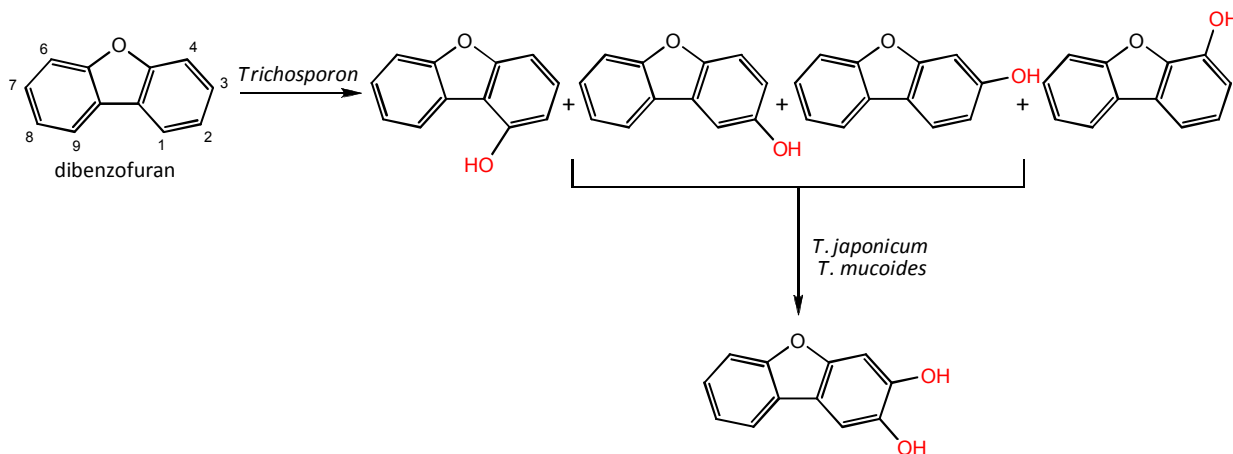
Schemat 16.

Wiele szczepów drożdży z rodzaju *Trichosporon* wykazuje zdolność biotransformacji bifenyli. Szczep *T. mucooides* SBUG 801 katalizował monohydroksylację w pozycjach C-2, C-3 lub C-4. Dalsza hydroksylacja prowadziła do powstania 2,3-dihydroksy-, 3,4-dihydroksy-, 2,5-dihydroksy-, i 2,4'-dihydroksybifenyli. Transformacje prowadzone przez większość szczepów należących to rodzaju *Trichosporon* przebiegały w podobny sposób. Spośród dwudziestu czterech szczepów przebadanych przez Sietmann i wsp. [97], aż dwadzieścia trzy były zdolne do przeprowadzania monohydroksylacji, głównie w pozycjach C-2 i C-4. Wiele produkowało także dihydroksypochoodne, ale tylko *T. mucooides* SBUG 801 i *T. asahii* CBS 8520 tworzyły jako produkt 2,3-dihydroksybifenyl (Schemat 17).



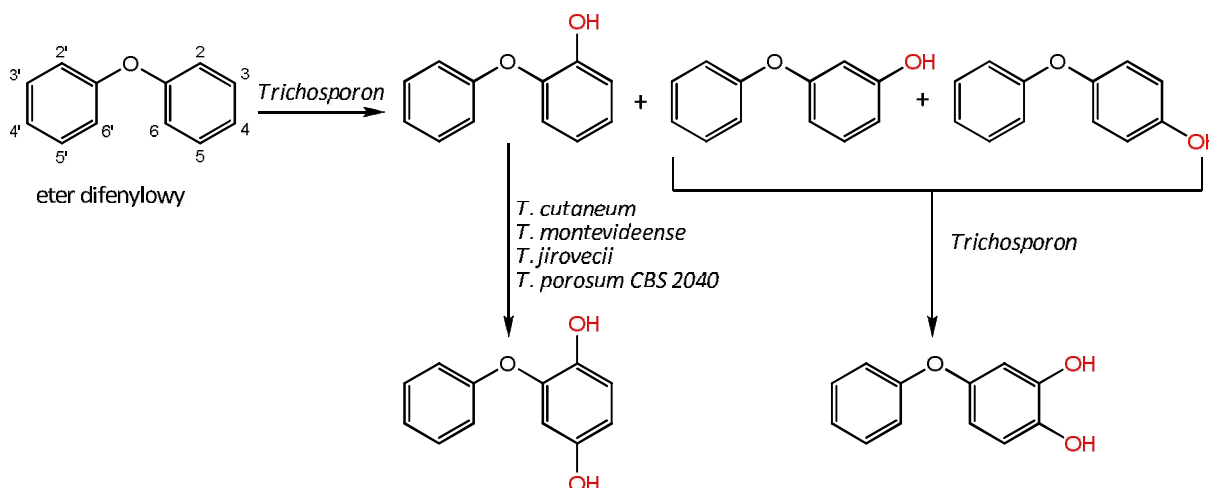
Schemat 17.

Szczepy z rodzaju *Trichosporon* przetestowano także pod kątem zdolności do biotransformacji dibenzofuranu. Początkowy etap reakcji z udziałem wszystkich badanych szczepów prowadził do powstania 1-, 2-, 3-, i 4-hydroksydibenzofuranu, przy czym głównymi produktami były pochodne z grupami hydroksylowymi w pozycjach C-2 i C-3. Tylko dwa spośród dwudziestu czterech: *T. japonicum* i *T. mucoides*, w dalszym etapie przekształcały 2-, i 3-hydroksydibenzofuran do 2,3-dihydroksydibenzofuranu (Schemat 18).



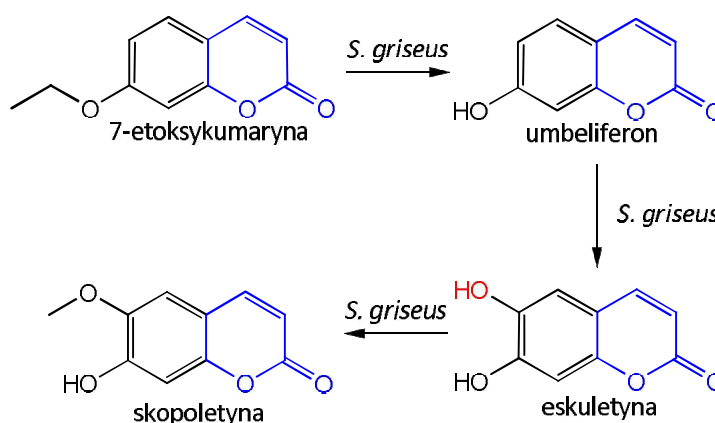
Schemat 18.

Biotransformacja eteru difenyłowego z zastosowaniem kultur drożdży *Trichosporon* prowadziła do hydroksylacji w pozycjach C-2, C-3 i C-4 [97]. Następnie 3- i 4-hydroksypochoodne ulegały dalszej hydroksylacji, w wyniku czego powstawał eter 3,4-dihydroksydifenyłowy. Jednak większość szczepów produkowała pochodną hydroksylovaną w pozycji C-2. Tylko szczepy *T. cutaneum*, *T. montevidense*, *T. jirovecii*, i *T. porosum* CBS 2040 były zdolne do dalszego przekształcania eteru 2-hydroksydifenyłowego, w wyniku czego otrzymano eter 2,5-dihydroksydifenyłowy (Schemat 19).



Schemat 19.

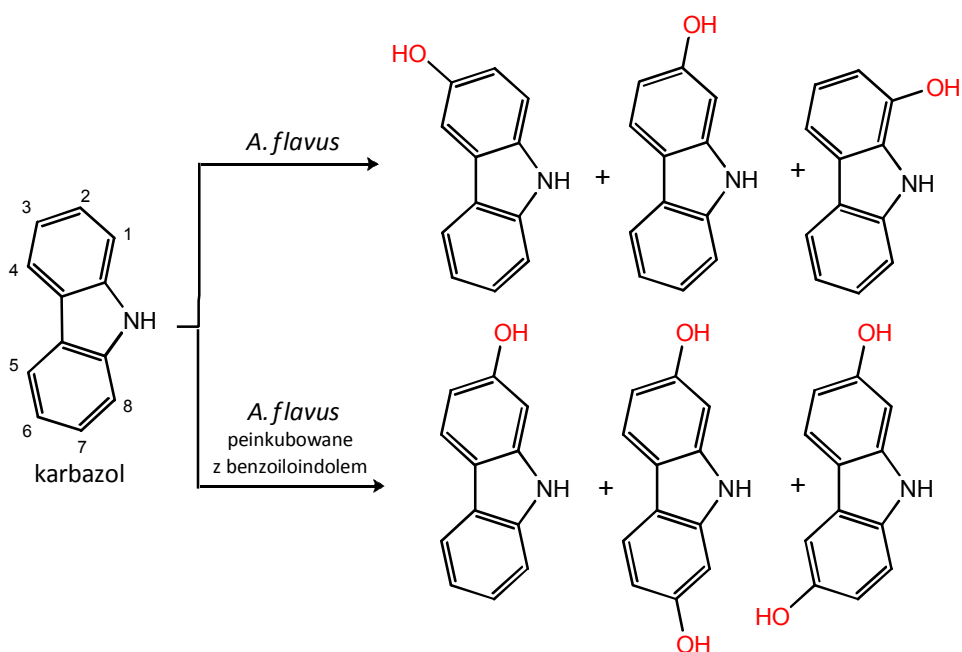
*Streptomyces griseus* katalizuje szereg reakcji utleniania związków aromatycznych, alkaloidów oraz substratów o budowie terpenowej. Metabolizm 7-etoksykumaryny przebiega poprzez O-deetylację, w wyniku której powstaje umbeliferon, hydroksylowany następnie do eskuletyny. W kolejnym etapie następuje metylacja grupy hydroksylowej w pozycji C-6 prowadząca do powstania skopoletyny (Schemat 20) [98].



Schemat 20.

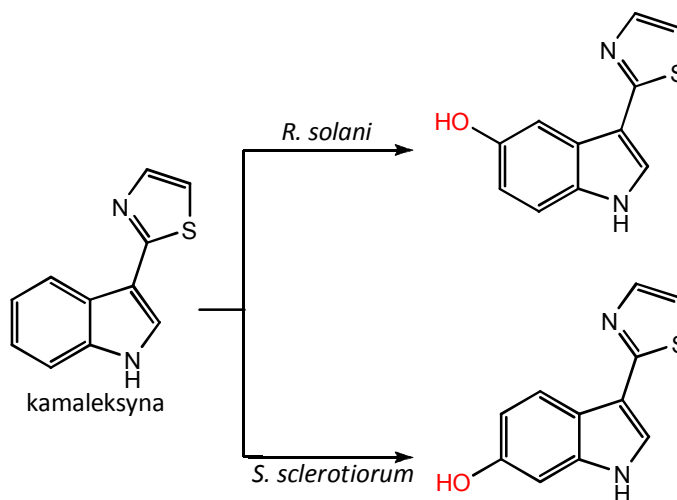
Grzyby strzępkowe zdolne są także do katalizowania reakcji hydroksylacji związków heterocyklicznych, trudnych do przeprowadzenia na drodze syntezy chemicznej.

Karbazol jest dobrze znanym związkiem zanieczyszczającym wody gruntowe [99], natomiast jego hydroksylowane pochodne posiadają silne właściwości przeciwutleniające i są szeroko wykorzystywane w terapii przeciwmiażdżycowej [100]. Znane są liczne przykłady hydroksylacji karbazolu (Schemat 21) [101, 102, 103]. Szczep *Aspergillus flavus* F-1024 posiada zdolność do jego monohydroksylacji w pozycjach C-3 (produkt główny), C-2 i C-1. Preinkubacja grzybni tego szczepu z 1-benzoilindolem prowadzi do zmiany pozycji hydroksylacji. Obok produktu monohydroksylacji w pozycji C-2 pojawiają się produkty dihydroksylacji w pozycjach C-2 i C-6 oraz C-2 i C-7 (Schemat 21). Prawdopodobnie 1-benzoilindol, który wykazuje wyższą specyficzność względem monooksygenazy wpływa korzystnie na specyficzność względem karbazolu [104].



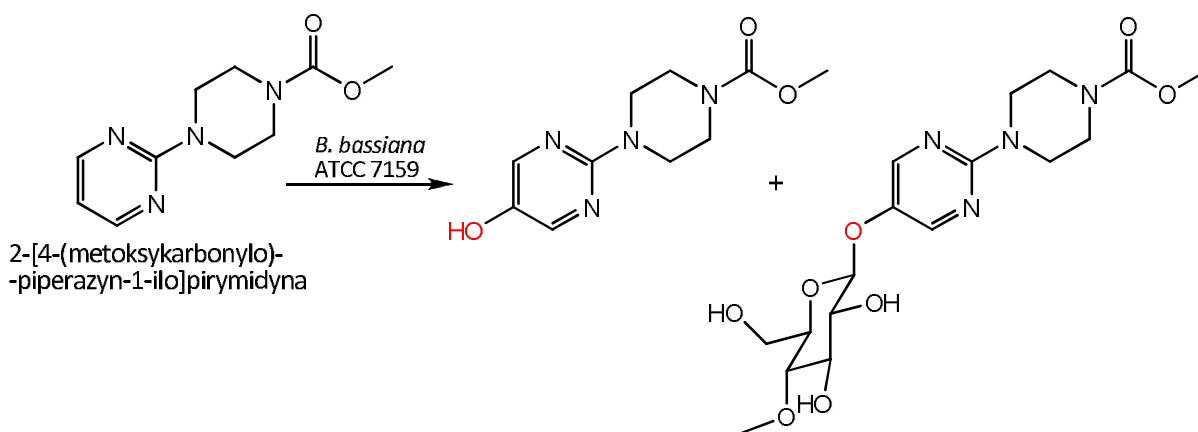
Schemat 21.

Kamaleksyna jest fitoaleksyną produkowaną przez rośliny z rodzaju krzyżowych takich jak Inicznik siewny (*Camelina sativa*) czy Tasznik pospolity (*Capsiella bursa pastoris*). Stanowi ważny element w procesach obronnych roślin przed patogenami. Ale również grzyby mogą wykształcić sposób na obronę przed fitoaleksynami. Szczepy grzybów *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum* wykształciły ścieżkę metabolizmu umożliwiającą detoksykację kamaleksyny poprzez jej hydroksylację (Schemat 22) [105, 106].



Schemat 22.

Biotransformacja 2-[4-(metoksykarbonylo)piperazyn-1-ilo]pirymidyna jest pierwszym znanym przykładem hydroksylacji nieskondensowanego, heterocyklicznego pierścienia aromatycznego, katalizowanej przez szczep grzyba strzępkowego. 2-[4-(metoksykarbonylo)piperazyn-1-ilo]pirymidyna poddana działaniu enzymów zawartych w komórkach *B. bassiana* ATCC 7159 ulegała hydroksylacji w pozycji *para* (C-5) podjednostki pirymidynowej z wydajnością izolowaną 11%. W płynie pohodowlanym obecna była również 4-O-metylo-β-D-glukopiranozylowa pochodna produktu (8%)(Schemat 23) [107].



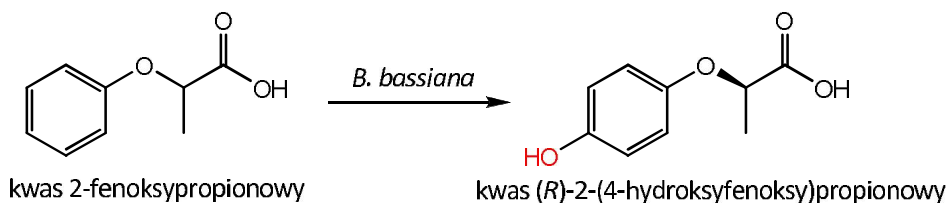
Schemat 23.



Grzyby z rodzaju *Beauveria* są użytecznym biokatalizatorem wielu różnorodnych reakcji utleniania, redukcji czy hydrolizy szerokiej gamy substratów [108, 109]. Zastosowanie kultur całych komórek tych grzybów umożliwia również wprowadzenie grupy hydroksylowej do pierścienia aromatycznego substratu.

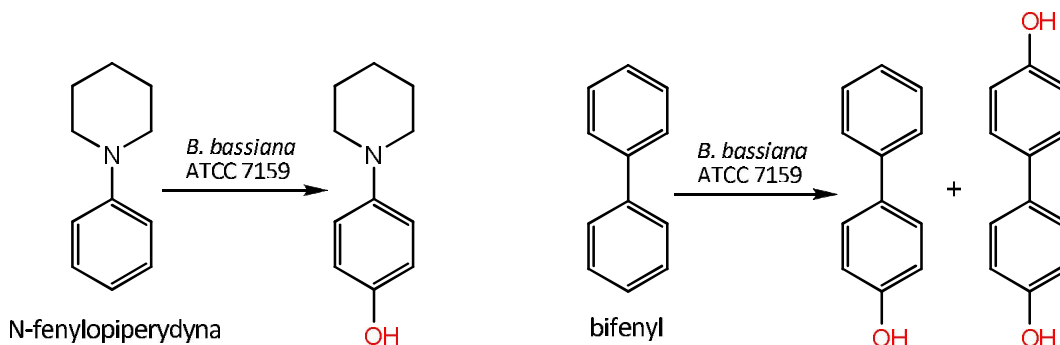
Od wielu lat naukowcy poszukiwali taniego, skutecznego sposobu *p*-hydroksylacji kwasu 2-fenoksypropionowego, prowadzącego do uzyskania *R*-enancjomeru, będącego prekursorem enancjomerycznie wzbogaconych herbicydów. Kinne i wsp. [110, 111]. opisali biotransformację kwasu 2-fenoksypropionowego z wykorzystaniem pozakomórowej peroksygenazy z *Agrocybe aegerita*, grzyba klasy *basidiomycetes*. W wyniku procesu otrzymywano kwas 2-(4-hydroksyfenoksy)propionowy z 60% nadmiarem enancjomeru *R*.

Koncern chemiczny BASF (Badische Anilin- und Soda-Fabrik) opracował metodę otrzymywania czystego enancjomeru *R* (Schemat 24). W tym przypadku zastosowano hodowle całych komórek mutantu *Beauveria bassiana* wyselekcjonowanego w szerokim skriningu. Aktywność szczepu była wynikiem dwóch mutacji [112].



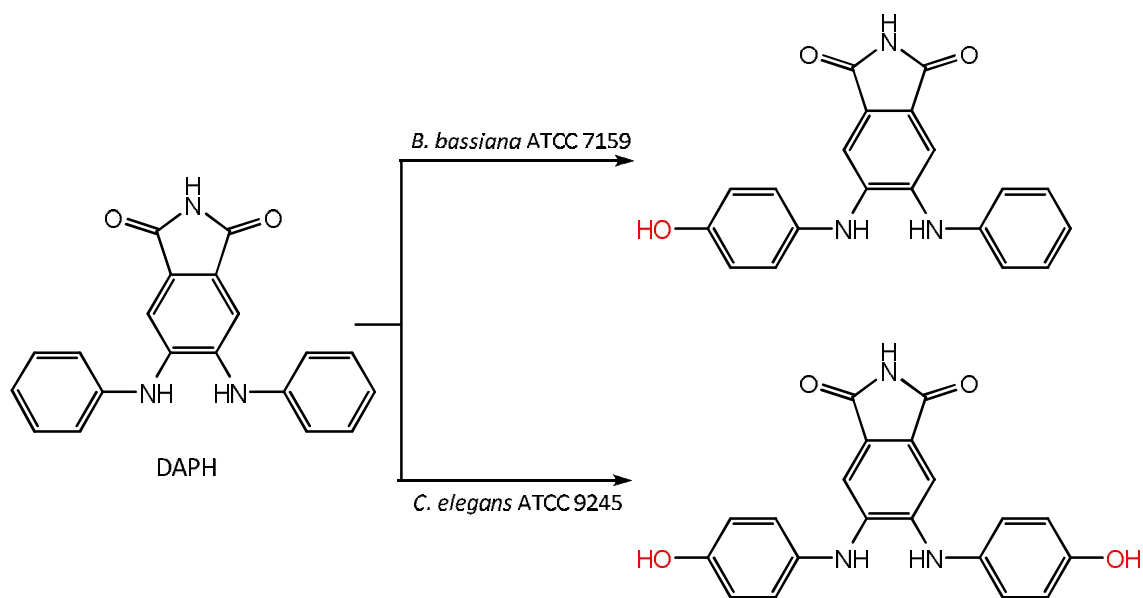
Schemat 24.

*Beauveria bassiana* ATCC 7159 posiada zdolność hydroksylacji *N*-fenylopiperydyny w pozycji *orto*. Wydajność tej biotransformacji wynosi 27% [113] (Schemat 25). Ten sam szczep zdolny jest do konwersji cykloheksylobenzenu, w wyniku której powstają jego mono- (wyd. 4%) i dihydroksypochozna (wyd. 3%). W obu przypadkach grupy hydroksylowe wprowadzane są w pozycję *para*. Obie biotransformacje przebiegają w podobnych rejonach cząsteczki, z porównywalną wydajnością [114].



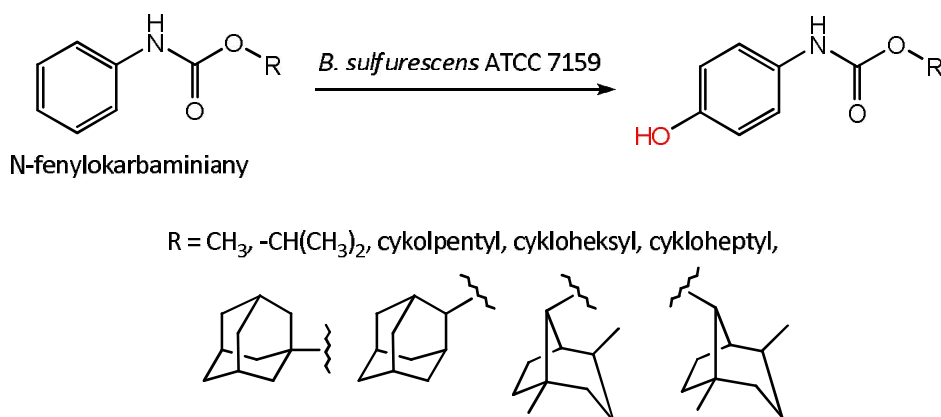
Schemat 25.

W wielu typach nowotworów nabłonkowych, np. w nowotworze kolczystokomórkowym - raku sutka i jajnika obserwuje się nadmierną ekspresję kinazy receptora EGF (ang. *epidermal growth factor*). Inhibitory wiążące się z centrum aktywnym tego enzymu mogłyby hamować rozwój tych nowotworów [115]. Dianilinoftalimid (DAPH) jest selektywnym inhibitorem kinazy receptora EGF. Szczep *Beauveria bassiana* ATCC 7159 jest zdolny do hydroksylacji jednej z grup anilinowych w pozycji *para*. *Cunninghamella elegans* ATCC 9245 katalizuje hydroksylację obu grup anilinowych. W rezultacie otrzymuje się hydroksypochodne posiadające jeszcze wyższą aktywność niż wyjściowy związek [116].



Schemat 26.

Fenylkarbaminiany znalazły zastosowanie w leczeniu lambliozy. Znane są również ich właściwości przeciwnowotworowe względem różnych postaci białaczek. Serię karbaminianów poddano biotransformacji za pomocą szczepu *Beauveria. sulfurescens* ATCC 7159. Przekształcenia zaowocowały wstawieniem grup hydroksylowych w pozycję *para* w pierścieniu substratów (Schemat 27). Wydajność przekształceń sięgała 40% [109].

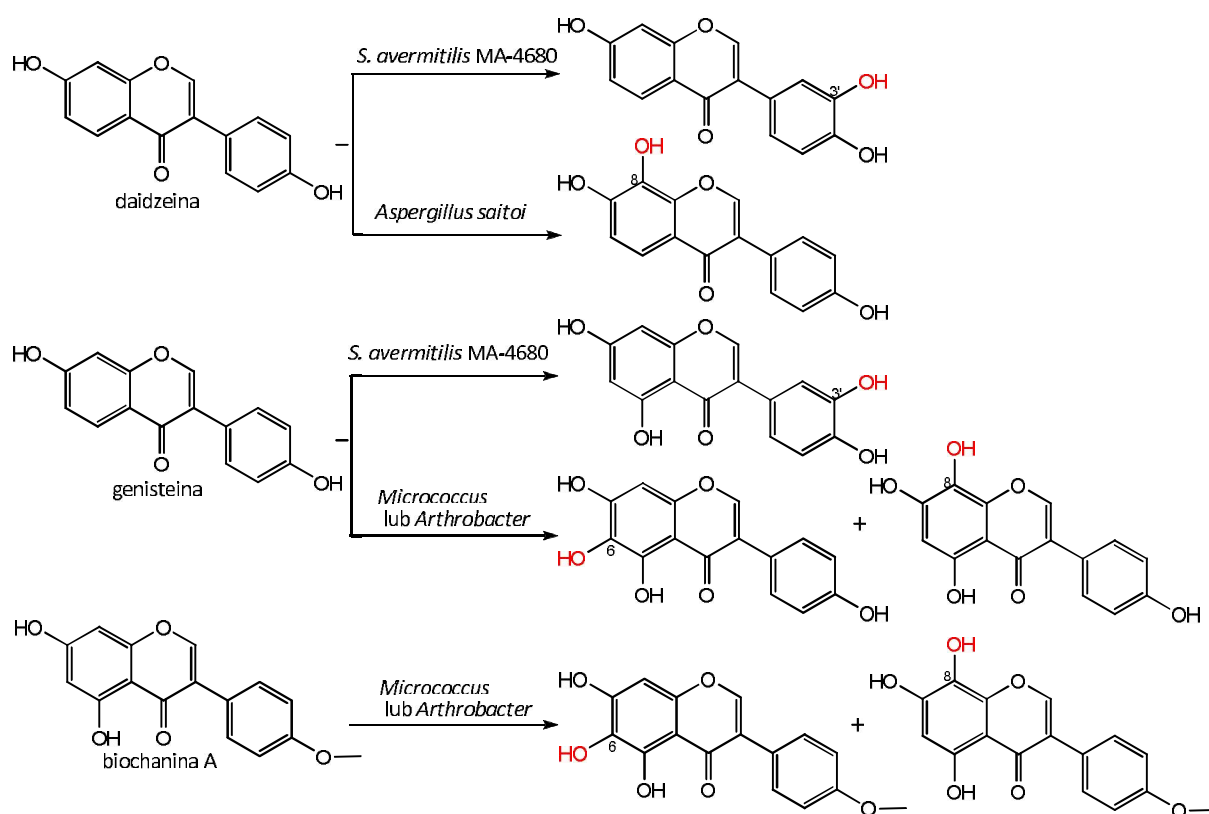


Schemat 27.

### 3.2.3 Mikrobiologiczna hydroksylacja flawonoidów

Daidzeina i genisteina należą do grupy izoflawonów i posiadają udokumentowane właściwości przeciwutleniające oraz przeciwdrobnoustrojowe, zwłaszcza przeciwbakteryjne. Produkty hydroksylacji tych związków mogą wykazywać silniejszy efekt przeciwutleniający, co może przyczynić się do wzrostu aktywności przeciwnowotworowej, i obniżania poziomu cholesterolu we krwi. *Streptomyces avermitilis* MA-4680 katalizuje konwersję daidzeiny do 3',4',7-trihydroksyizoflawonu i genisteinę do 3',4',5,7-tetrahydroksyizoflawonu (Schemat 28). Biotransformacje prowadzone były przy użyciu całych komórek mikroorganizmów. W przypadku obu związków uzyskano wydajność ok. 16% [117]. W przypadku gdy biokatalizatorem biotransformacji daidzeiny był szczep *Aspergillus saitoi*, hydroksylacja zachodziła przy atomie węgla C-8 [118]

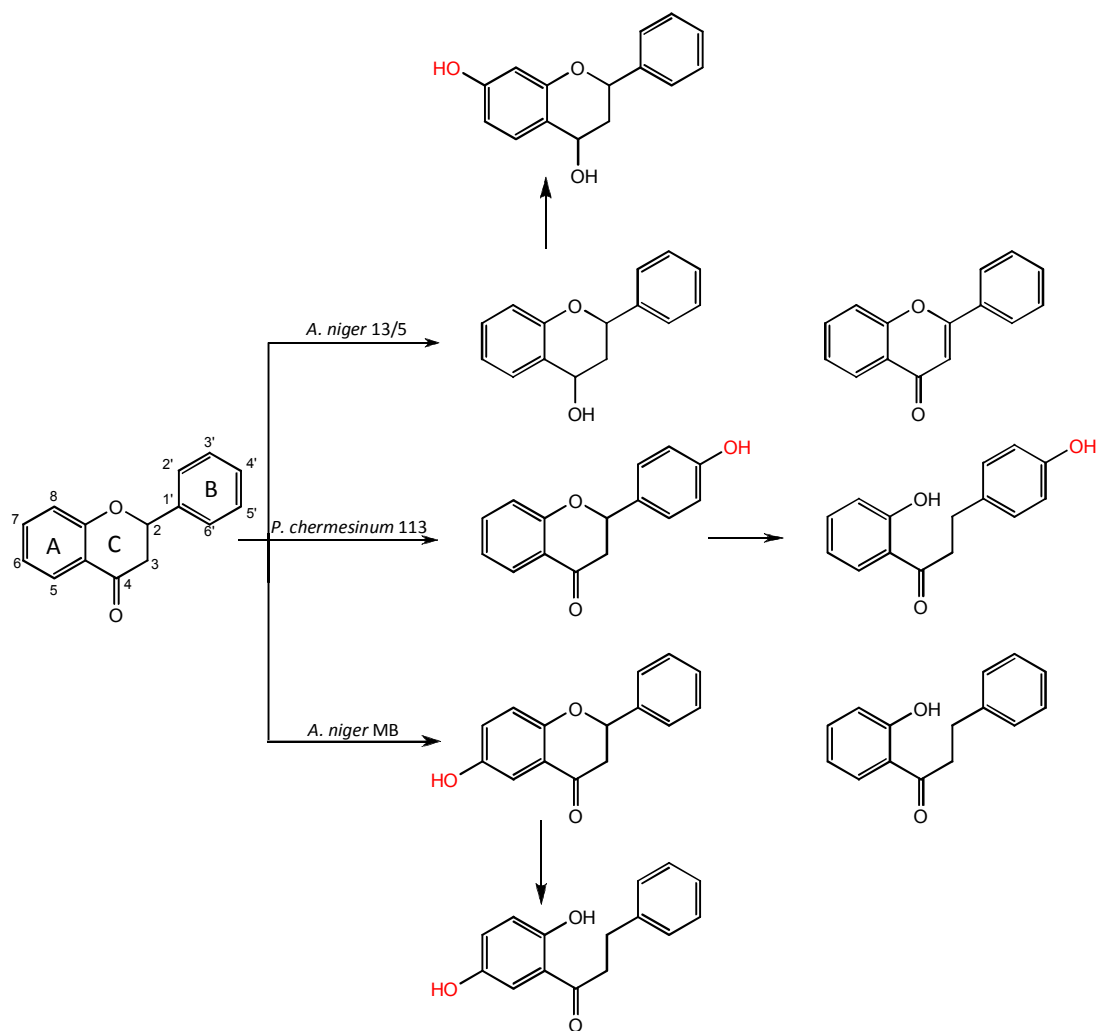
Klus i wsp. wyizolowali z gleby dwa szczepy bakterii, które zakwalifikowali do rodzaju *Micrococcus* lub *Arthrobacter*, niestety nie określając konkretnego gatunku. Oba szczepy posiadały zdolność hydroksylacji genisteiny w pierścieniu A, w wyniku czego otrzymywano dwa produkty: 6-hydroksygenisteinę (5,6,7,4'-tetrahydroksyizoflawon) i 8-hydroksygenisteinę (5,7,8,4'-tetrahydroksyizoflawon). Jeden z opisanych szczepów posiadał analogiczną zdolność hydroksylacji w pozycji C-6 i C-8 w stosunku do biochaniny A, podczas gdy drugi katalizował jedynie C-8-hydroksylację [119].



Schemat 28.

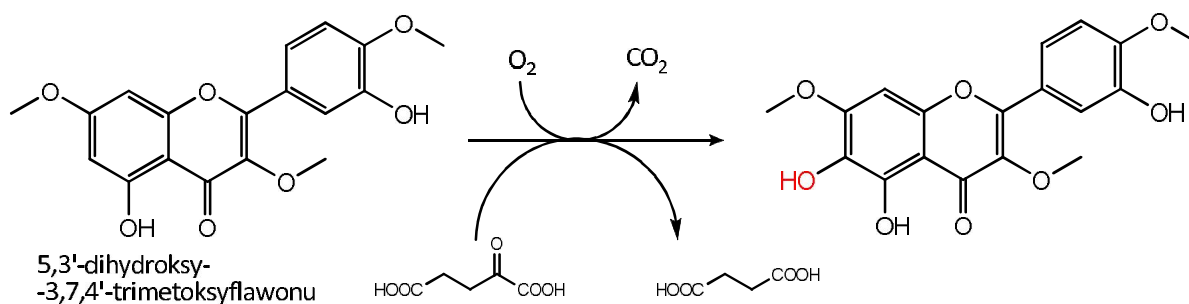
Proces hydroksylacji obserwowano również poddając biotransformacji flawanon (Schemat 29). Zastosowanie jako katalizatora hodowli szczepu *Aspergillus niger* (13/5) skutkowało otrzymaniem flakonu oraz flawan-4-olu – produktu redukcji grupy karbonylowej w pierścieniu C, który następnie ulegał hydroksylacji w pozycji C-7 w pierścieniu A do 7-hydroksyflawan-4-olu.[120]. W wyniku biotransformacji flawanonu przy udziale szczepu *Aspergillus niger* MB otrzymano produkty: hydroksylacji pierścienia A (3-hydroksyflawanon) oraz rozszczepienia pierścienia C (2-hydroksydihydrochalkon). W kolejnym etapie pierścień C 6-hydroksyflawanonu również ulegał rozszczepieniu, dając 2,5-dihydroksydihydrochalkon [121].

Szczep *Penicillium chermesinum* 113 posiadał zdolność hydroksylacji pierścienia aromatycznego w pozycji C-4'. W kolejnym etapie pierścień C produktu ulegał otwarciu, w wyniku czego otrzymano 2,4'-dihydroksydihydrochalkon.



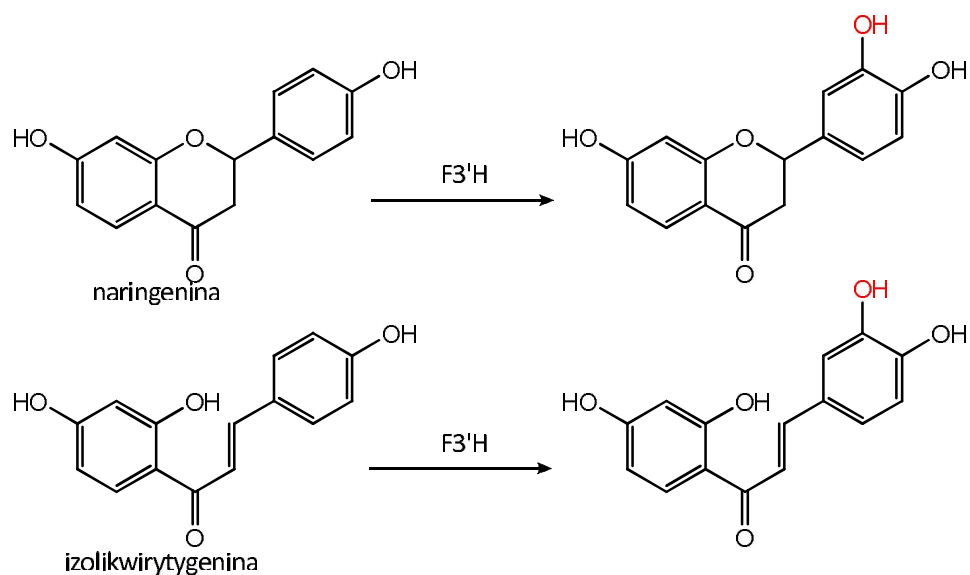
Schemat 29.

Dioksygenaza wyizolowana z rośliny *Chrysosplenium americanum* jest enzymem zależnym od obecności kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego – kosubstratu ulegającego oksydatywnej dekarboksylacji do kwasu bursztynowego. Enzym ten katalizuje regiospecyficzną 6-hydroksylację 5,3'-dihydroksy-3,7,4'-trimetoksyflawonu (pochodnej kwercetyny) (Schemat 30) [122].



Schemat 30.

Schlagen i wsp. wklonowywali do genomu drożdży geny 3'-hydroksylazy z roślin z rodziny *Asteraceae*. Rekombinanty z klonowanym genem posiadały zdolność katalizowania hydroksylacji pierścienia B naringeniny i izolikwirytygeniny w pozycji 3' (Schemat 31). Badania wykazały, że wyizolowany enzym należy do grupy enzymów cytochromu P450 [123]



Schemat 31.

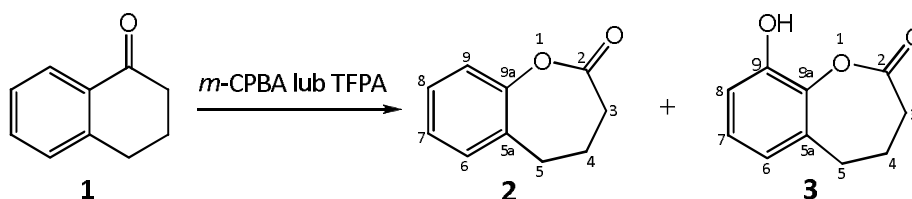
## 4. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH

### 4.1 Synteza laktonów ze skondensowanym pierścieniem aromatycznym

Celem tej części badań było otrzymanie nasyconych laktonów ze skondensowanym pierścieniem aromatycznym w wyniku chemicznego utlenienia typu Baeyera-Villigera odpowiednich cyklicznych ketonów (**1**, **6**, **8**, **11**, **14**, **16**, **18**, **20**, **22**) za pomocą kwasu *m*-chloroperoksybenzoesowego (*m*-CPBA) lub kwasu trifluoroperoksyoctowego (TFPA).

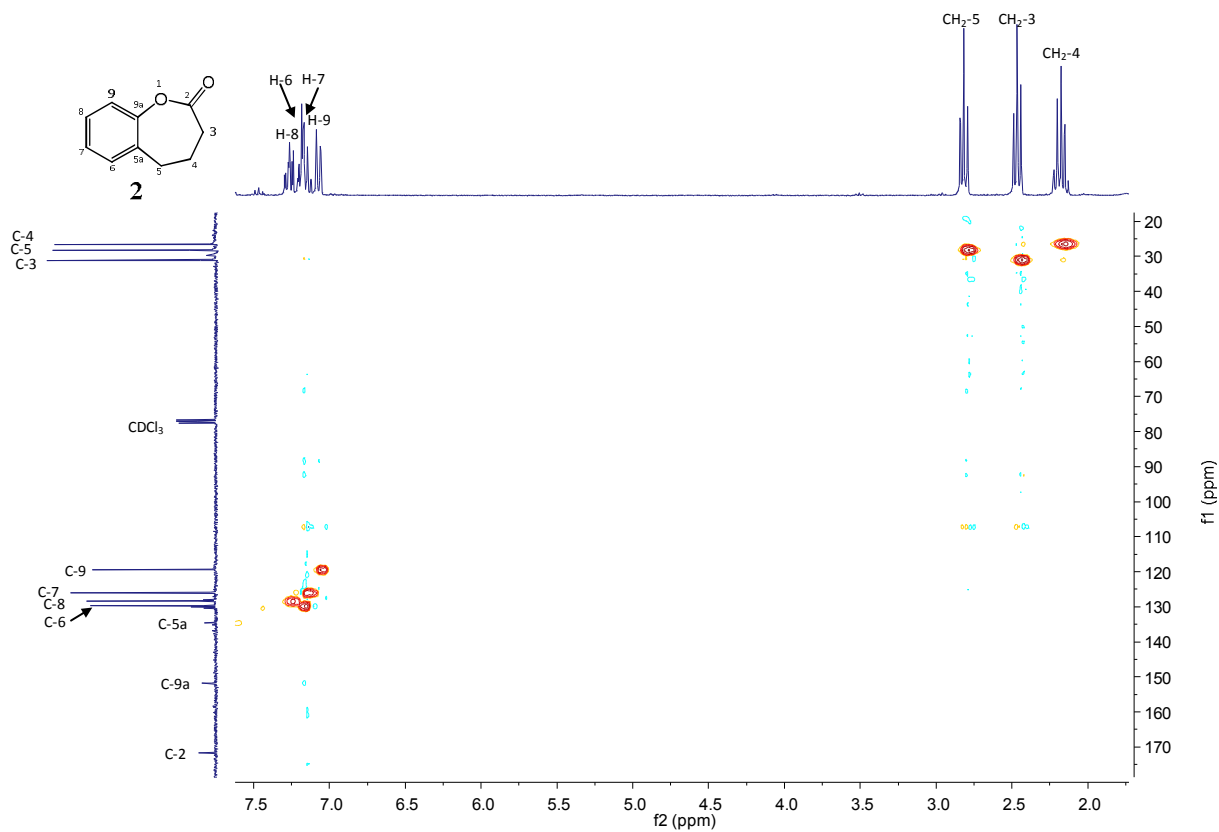
#### 4.1.1 Utlenianie 1-tetralonu (**1**)

W reakcji utlenienia 1-tetralonu (**1**) za pomocą *m*-CPBA w chlorku metylenu otrzymałam jako główny produkt benzoksepan-2-on (**2**). W mieszaninie reakcyjnej identyfikowałam również niewielkie ilości (5% według analizy GC) drugiego produktu. Wyniki analizy spektroskopowej tego ubocznego produktu były dość zaskakujące, gdyż sugerowały, że jest to produkt hydroksylacji pierścienia aromatycznego, 9-hydroksybenzoksepan-2-on (**3**) (Schemat 32).

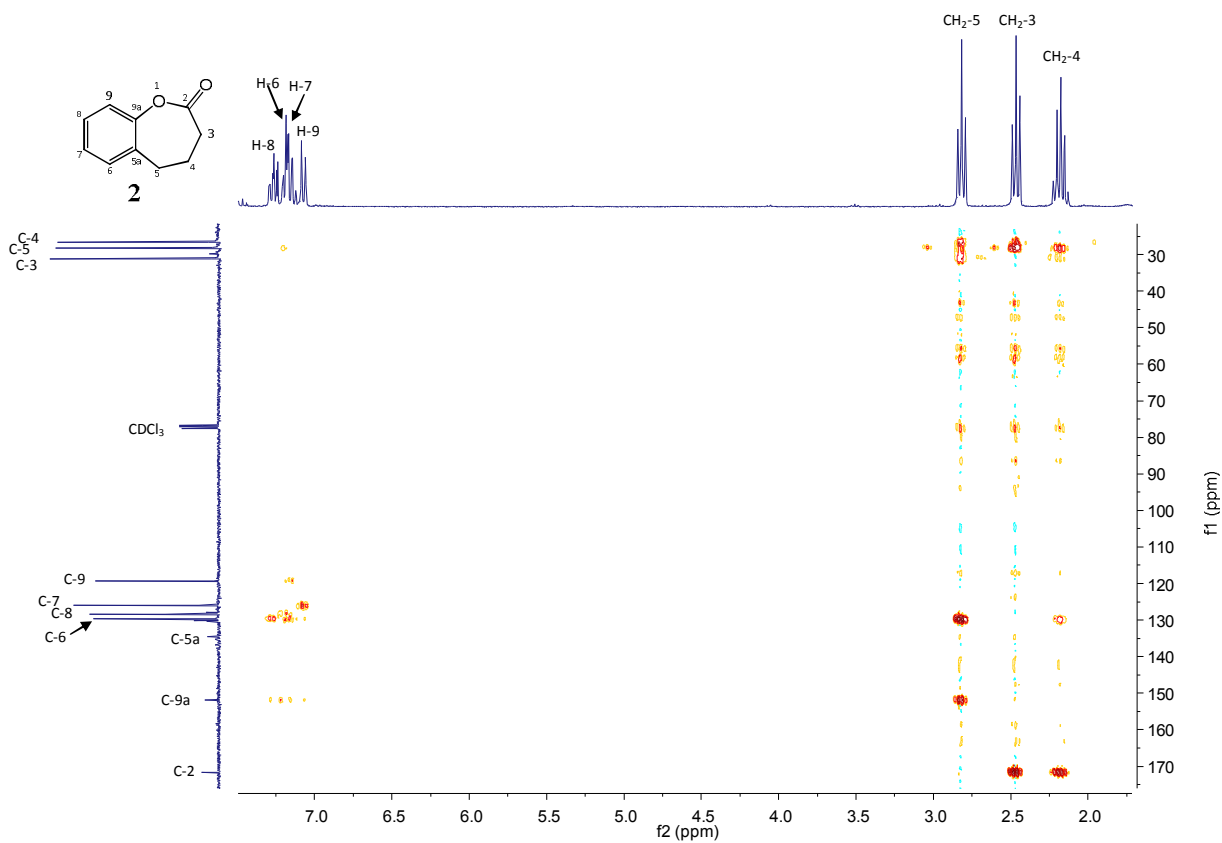


Schemat 32.

Budowę produktów **2** i **3** ustaliłam na podstawie danych spektroskopowych. Bardzo pomocne okazało się wykonanie widm korelacyjnych HSQC ( $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  NMR rejestrujących sprzężenia przez jedno wiązanie) oraz HMBC ( $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  NMR rejestrujących sprzężenia przez dwa i trzy wiązania). Widma HMQC i HMBC benzoksepan-2-onu (**2**) przedstawiono na rysunkach nr 13 i 14.



Rysunek 13. Widmo HMQC laktonu 2

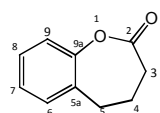
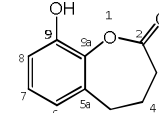


Rysunek 14. Widmo HMBC laktonu 2



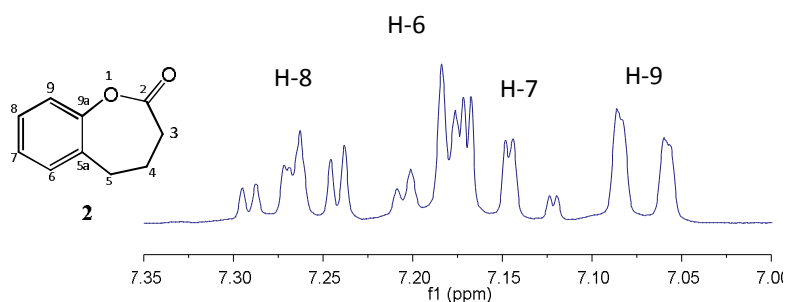
Tabela nr 3 pokazuje występowanie sprzężeń (znak +) lub ich brak (znak -) na widmach obu laktonów.

**Tabela 3.** Sprzężenia przez dwa i trzy wiązania pomiędzy jądrami atomów węgla i wodoru odczytane z widma HMBC laktonów **2** i **3**

	 <b>2</b>							 <b>3</b>					
	CH <sub>2</sub> -3	CH <sub>2</sub> -4	CH <sub>2</sub> -5	H-6	H-7	H-8	H-9	CH <sub>2</sub> -3	CH <sub>2</sub> -4	CH <sub>2</sub> -5	H-6	H-7	H-8
C-2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
C-3	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
C-4	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
C-5	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
C-5a	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
C-6	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
C-7	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
C-8	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
C-9	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
C-9a	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+

Na widmie <sup>1</sup>H NMR laktonu (**2**) przy przesunięciu chemicznym 2.18 ppm obecny jest sygnał w postaci kwintetu ( $J=7.2$  Hz) pochodzący od protonów grupy metylenowej CH<sub>2</sub>-4. Przy 2.47 i 2.82 ppm położone są dwa tryplety od protonów grup metylenowych przy atomach węgla C-3 i C-5. Jednoznaczne przypisanie sygnałów umożliwiło widmo korelacyjne HMBC, na którym widoczne jest sprzężenie przez dwa wiązania pomiędzy jądrem atomu węgla grupy karbonylowej C-2 (171.67 ppm) a protonami, które dają sygnał przy 2.47 ppm na widmie <sup>1</sup>H NMR. Sygnał przy 2.47 ppm pochodzi zatem od protonów grupy -CH<sub>2</sub>-3, natomiast sygnał od protonów grupy -CH<sub>2</sub>-5 przesunięty jest w kierunku niższego pola (2.82 ppm). Dzięki widmu korelacyjnemu <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C NMR możliwe jest przypisanie sygnałów odpowiadających protonom atomów węgla wszystkich trzech grup metylenowych na widmie <sup>13</sup>C NMR. Sygnały przy 25.58, 28.29 i 31.13 ppm pochodzą odpowiednio od atomów węgla C-4, C-5, C-3.

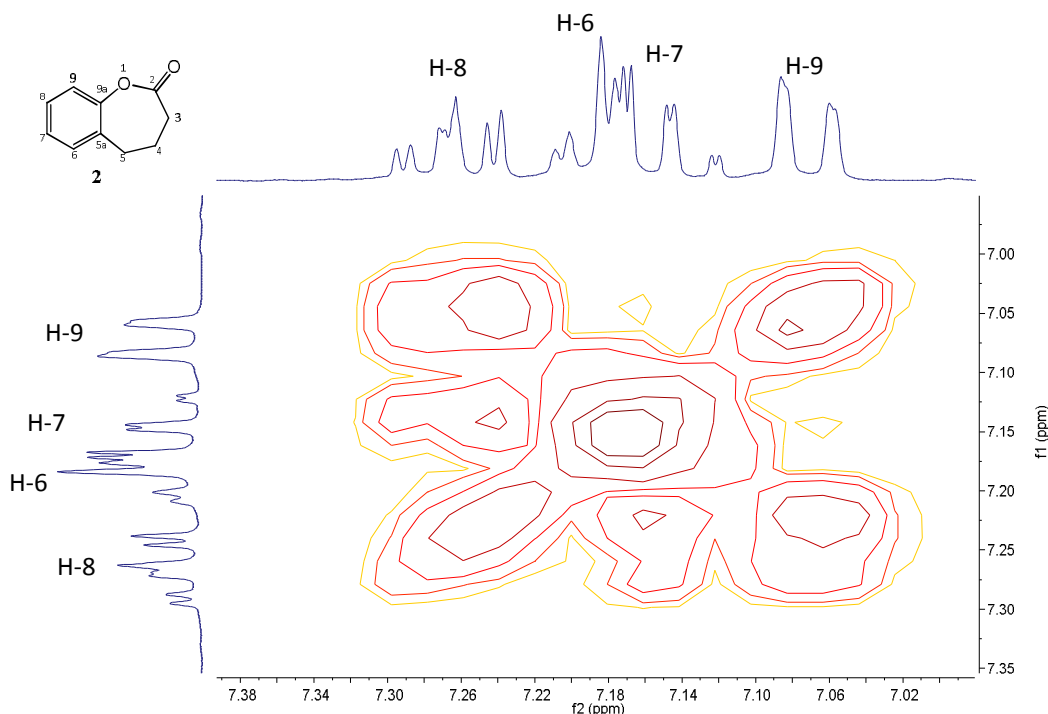
Większych trudności dostarczyło jednoznaczne przyporządkowanie sygnałów pochodzących od atomów węgla tworzących pierścień aromatyczny cząsteczki (Rysunek 15).



**Rysunek 15.** Fragment widma <sup>1</sup>H NMR laktonu **2** w zakresie 7.0-7.35 ppm

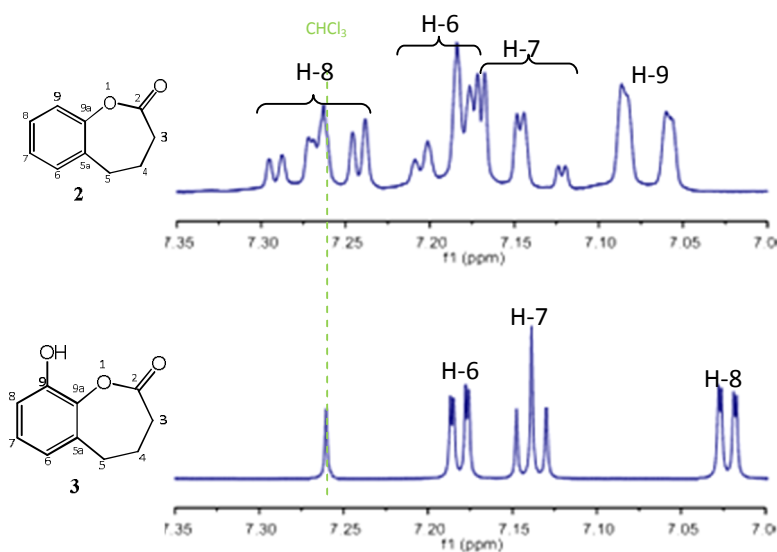
Za „punkt wyjścia” obrałam sygnał pochodzący od węgla C-9a (151.85 ppm). Mniejsza intensywność tego sygnału na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR oraz jego brak na widmie wykonanym metodą DEPT świadczą o tym, że pochodzi on od czwartorzędowego atomu węgla. Brak sprzężenia przez trzy wiązania pomiędzy tym atomem węgla a protonami grupy  $-\text{CH}_2-4$  (2.18 ppm) na widmie HMBC (Rysunek 14) wskazuje, że jest to sygnał od atomu węgla C-9a, a nie C-5a. Atomowi węgla C-5a przypisałam drugi sygnał pochodzący od jądra czwartorzędowego atomu węgla (130.11 ppm).

Widmo HMBC pozwoliło mi również przypisać sygnał od protonu H-6, gdyż pokazuje sprzężenie pomiędzy tym protonem a jądrem atomu węgla C-5. Przesunięcie sygnału od protonu H-6 wynosi 7.19 ppm. Sygnał ten jest dubletem dubletów o stałych sprzężenia 7.3 i 2.3 Hz. Z widma HMQC (Rysunek 13) wynika, że sygnał przy 129.70 ppm pochodzi od jądra atomu węgla C-6. Widmo korelacyjne  $^1\text{H}-^1\text{H}$  NMR (Rysunek 16) pokazuje sprzężenia atomów wodoru przy sąsiednich atomach węgla. Zatem na podstawie sprzężenia pomiędzy protonami H-6 i H-7 przypisałam tryplet dubletów ( $J=7.3$  i 1.0 Hz) o przesunięciu chemicznym 7.14 atomowi H-7. Widmo HMQC wskazuje, że atom węgla C-7 daje sygnał przy 125.95 ppm. Dublet dubletów dubletów ( $J=7.9$ , 7.3 i 2.3 Hz) przy 7.27 ppm przypisałam protonowi H-8 na podstawie sprzężenia z protonem H-7 na widmie COSY (Rysunek 16) oraz z jądrem atomu węgla C-6 na widmie HMBC. Sygnał pochodzący od jądra atomu węgla C-8 położony jest przy 128.36 ppm według widma HMQC (Rysunek 13). Dublet dubletów ( $J=7.9$  i 1.0 Hz) przy 7.07 ppm pochodzi od protonu H-9. Świadczy o tym obecność sprzężenia z protonem H-8 na widmie korelacyjnym  $^1\text{H}-^1\text{H}$  NMR oraz z jądrami atomów węgla C-9a, C-5a i C-7 na widmie korelacyjnym HMBC (Rysunek 14). Jądro atomu węgla C-9 daje sygnał przy 119.34 ppm.



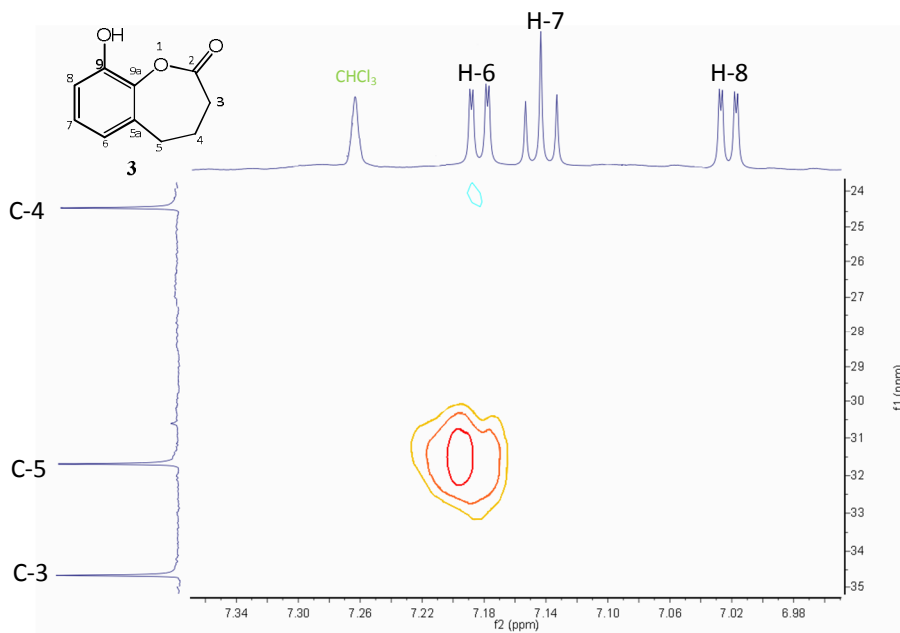
Rysunek 16. Fragment widma COSY laktonu 2 odpowiadający sygnałom od protonów tworzących pierścień aromatyczny

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR drugiego produktu - hydroksylaktonu (**3**) widoczny jest analogiczny jak na widmie laktonu **2**, układ sygnałów pochodzących od protonów grup metylenowych pierścienia laktonowego (kwintet i dwa tryplety). Również na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR nie ma istotnych różnic w części widma odpowiadającej atomom węgla grup metylenowych obu laktonów (**2** i **3**). Na widmie protonowym hydroksylaktonu pojawia się singlet (5.49 ppm) pochodzący od protonu grupy -OH. Obecność grupy hydroksylowej w cząsteczce potwierdza również intensywne pasmo absorpcji na widmie IR przy  $3493\text{ cm}^{-1}$ . Jednocześnie znacznemu przesunięciu w stronę niższego pola uległ sygnał od jądra atomu węgla C-9 ( $\delta=151.39$ ) na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR. Świadczy to o obecności grupy -OH właśnie przy tym atomie węgla. Zupełnie inaczej, w porównaniu z widmem protonowym laktonu **2**, wygląda część widma hydroksylaktonu **3** w zakresie 6.0-7.2 ppm, odpowiadająca sygnałom od protonów pierścienia aromatycznego (Rysunek 17).



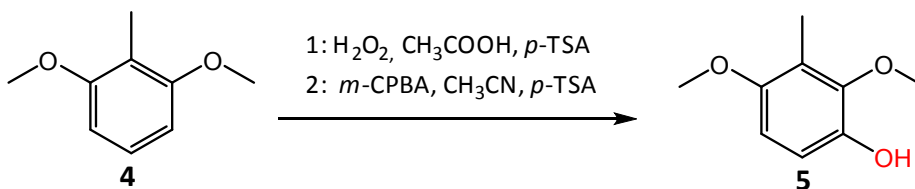
**Rysunek 17.** Porównanie fragmentów widma  $^1\text{H}$  NMR laktonu **2** i hydroksylaktonu **3** w zakresie 7.0-7.35 ppm

Na widmie hydroksylaktonu **3** widoczne są trzy sygnały: dublet dubletów ( $J=7.5$  i  $1.6$  Hz) przy 7.03 ppm, tryplet ( $J=7.5$  Hz) przy 7.14 ppm oraz dublet dubletów ( $J=7.5$  i  $1.6$  Hz) przy 7.18 ppm. Tryplet o stałej sprzężenia  $J=7.5$  Hz, sugerującej obecność atomów wodoru przy sąsiednich atomach węgla, przypisałam protonowi H-7. W jednoznacznym przypisaniu pozostałych sygnałów protonom H-6 i H-8 pomogło mi widmo korelacyjne HMBC (Rysunek 18).

Rysunek 18. Fragment widma HMBC hydroksylaktonu **3**

Na widmie tym widoczne jest sprzężenie pomiędzy jądrem atomu C-5 a protonem H-6, nie ma natomiast sprzężenia pomiędzy jądrem atomu C-5 a protonem H-8. Zatem sygnał przy 7.18 ppm musi pochodzić od atomu wodoru H-6. Na położenie sygnału od protonu H-8 miała wpływ obecność grupy hydroksylowej przy atomie C-9. Grupa hydroksylowa wpływa na wzrost gęstości elektronów  $\pi$  na atomie węgla C-8 i C-6 i powoduje osłabienie efektu odsłaniania protonów w pozycjach *ortho* i *para*. Zależność pomiędzy gęstością elektronów  $\pi$  na atomie węgla a przesunięciem chemicznym protonów ma charakter liniowy [124]. Dublet dubletów od atomu H-8 położonego w pozycji *ortho* w stosunku do grupy -OH uległ znacznemu przesunięciu w kierunku wyższego pola (7.03 ppm). Większa stała sprzężenia (7.5 Hz) odpowiada sprzężeniu z protonem H-7 a mniejsza (1.6 Hz) z protonem H-6.

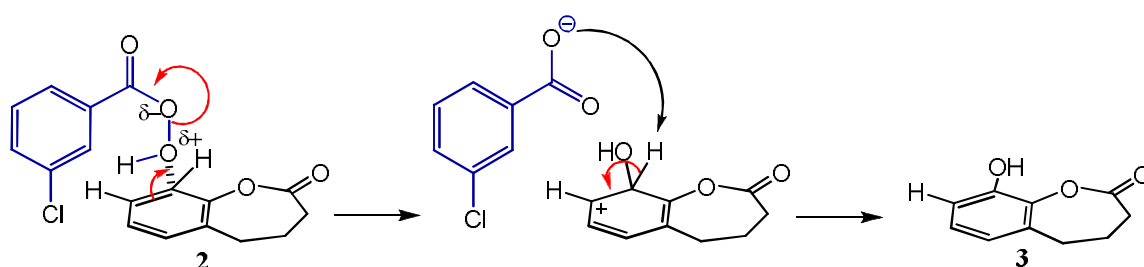
Powstawanie 9-hydroksybenzoksepan-2-onu (**3**) w reakcji utleniania benzoksepan-2-onu (**2**) jest wynikiem hydroksylacji tego drugiego za pomocą *m*-CPBA. Reakcję hydroksylacji pierścienia aromatycznego przy użyciu peroksy kwasów jako metodę otrzymywania metoksy-podstawionych fenoli opisują również Bjørsvik i wsp.[125]. Reakcję tę przedstawiają jako przykład substytucji elektrofilowej, w której elektrofilem jest grupa -OH nadkwasu. Grupa metoksylova działa silnie aktywująco i skierowuje elektrofil w pozycję *ortho* i *para* (Schemat 33).



Schemat 33.

Autorzy tej pracy badali przebieg reakcji stosując dwa warianty mieszaniny utleniającej. W pierwszym z nich w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: kwas *p*-toluenosulfonowy (*p*-TsA) i nadtlenek wodoru w lodowatym kwasie octowym (temp. 80°C), w drugim: *p*-TsA, *m*-CPBA w acetonitrylu (temp. 80°C). W takich warunkach reakcji *in situ* powstawał peroksykwas, który stawał się rzeczywistym czynnikiem hydroksylującym.

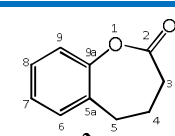
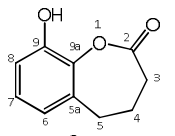
W oparciu o pracę Bjørsvika [125] przedstawiłam mechanizm hydroksylacji elektrofilowej prowadzącej do powstawania hydroksylaktonu **3**. Grupą aktywującą w przypadku utlenienia laktonu **2** jest alkoksylowy atom tlenu ugrupowania laktonowego (Schemat 34).



Schemat 34.

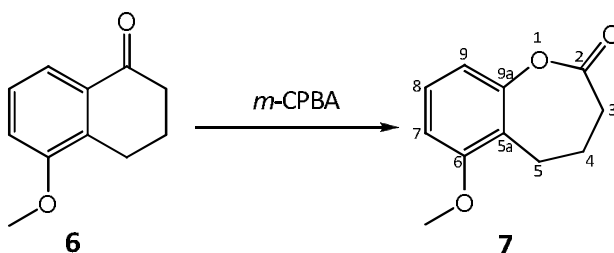
próbowałam również optymalizować warunki reakcji hydroksylacji laktonu **2**. W dodatkowych eksperymentach lakton **2** poddałam reakcjom z kwasem *m*-chloronadbenzoesowym (zakupionym w firmie Sigma-Aldrich) lub z kwasem trifluoronadocowym (otrzymywanym *in situ* w reakcji bezwodnika kwasu trifluorooctowego z 30% nadtlentkiem wodoru). Reakcje prowadziłam zarówno w temperaturze pokojowej jak i w łaźni lodowej, jednak nie zaobserwowałam istotnego wpływu temperatury na ich przebieg. Eksperyment ten potwierdził, że hydroksylakton **3** powstaje z laktonu **2**. Reakcja zachodziła z niewielką wydajnością (maksymalnie 15%). Efektywność reakcji uwarunkowana była wyborem peroksykwasu oraz jego molowym nadmiarem w stosunku do substratu (Tabela 4).

Tabela 4. Przebieg hydroksylacji benzoksepan-2-onu (2) (% na podstawie analizy GC), w różnych wariantach warunków reakcji

nadkwas	<i>m</i> -CPBA									TFPA								
	2			3			5			2			3			5		
Liczba moli nadkwasu na 1mol substratu																		
Czas [dni]	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6
 2 [%]	100	98	95	100	94	88	100	93	85	100	93	92	100	93	92	98	91	89
 3 [%]	0	2	5	0	6	12	0	7	15	0	7	8	0	7	8	2	9	11

#### 4.1.2 Utlenianie 5-metoksy-1-tetralonu (6)

Kolejnym substratem poddanym chemicznemu utlenieniu Baeyera-Villigera był 5-metoksytetralon (6). W wyniku reakcji i procesu izolowania otrzymałam czysty 6-metoksybenzoksepan-2-on (7), z wydajnością 70%. Nie obserwowałam produktu hydroksylacji pierścienia aromatycznego (Schemat 35).

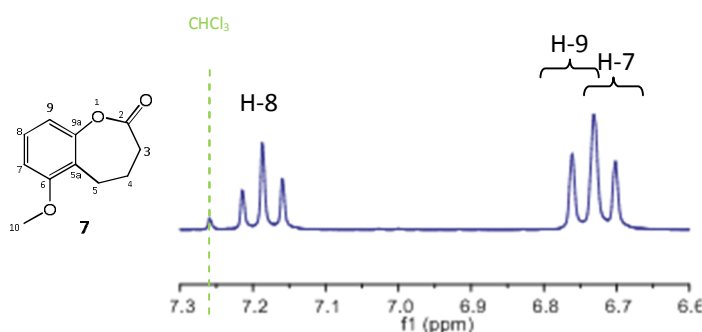


Schemat 35.

Dane z widma magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR) oraz widma w zakresie podczerwieni (IR) w pełni potwierdzają spodziewaną strukturę produktu. Układ trzech sygnałów (kwintetu i dwóch trypletów) w zakresie od 2.00 do 3.00 ppm na widmie  $^1\text{H}$  NMR odpowiada protonom trzech grup metylenowych pierścienia laktonowego. Kwintet ( $J=7.2$  Hz) przy 2.12 ppm pochodzi od protonów grupy  $\text{CH}_2$ -4, tryplet ( $J=7.2$  Hz) o niższej wartości przesunięcia chemicznego (2.46 ppm) pochodzi od protonów grupy  $\text{CH}_2$ -3 a tryplet ( $J=7.2$  Hz) o wyższej wartości przesunięcia

chemicznego (2.88 ppm) odpowiada protonom grupy CH<sub>2</sub>-5. Widmo korelacyjne <sup>1</sup>H - <sup>13</sup>C NMR (HMQC) umożliwiło ustalenie przesunięć chemicznych atomów węgla grup metylenowych. Sygnały przy 19.87, 25.81 i 31.37 pochodzą odpowiednio od jąder atomów C-4, C-5 i C-3. Singlet przy 3.83 ppm na widmie protonowym pochodzi od protonów grupy metoksylowej. Atomowi węgla tej grupy odpowiada sygnał przy 55.87 ppm na widmie <sup>13</sup>C NMR laktonu **7**. Sygnały o niewielkiej intensywności i przesunięciu chemicznym 118.64 i 152.73 ppm przypisano odpowiednio mostkowym atomom węgla C-5a i C-9a. Rozróżnienie sygnałów umożliwiło widmo dwuwymiarowe <sup>1</sup>H - <sup>13</sup>C NMR (HMBC), na którym widać sprzężenie przez trzy wiązania pomiędzy protonami grupy CH<sub>2</sub>-4 a atomem węgla C-5a.

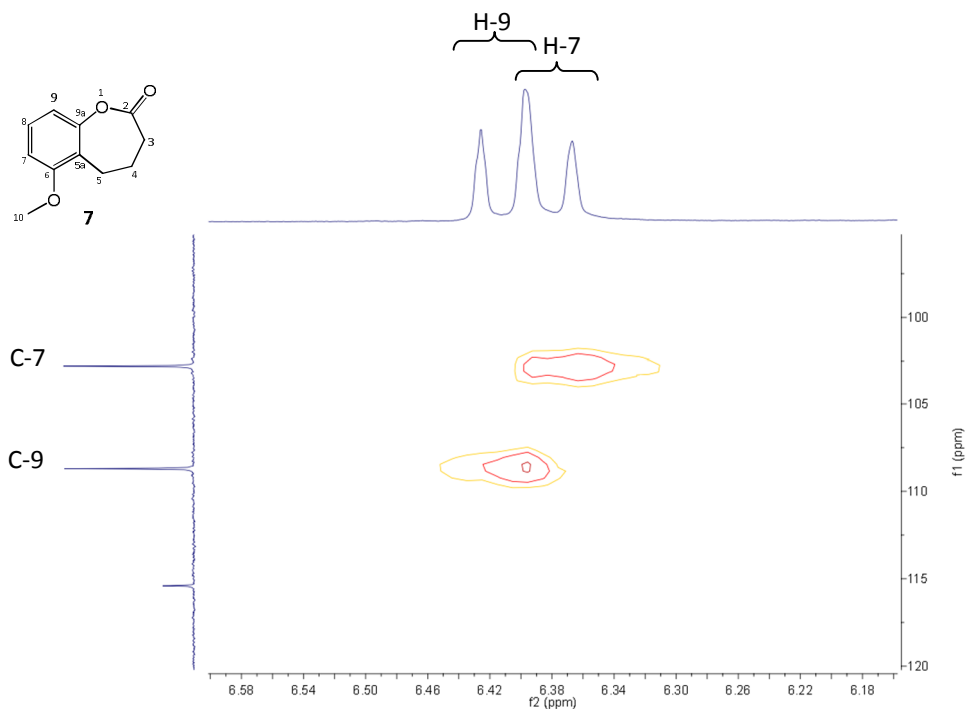
Na widmie protonowym w zakresie odpowiadającym sygnałom od atomów wodoru pierścienia aromatycznego widoczne są trzy sygnały: tryplet ( $J=8.3$  Hz) przy 7.19 ppm oraz dwa, częściowo nałożone na siebie, dublety ( $J=8.3$  Hz) przy 6.72 i 6.75 ppm (Rysunek 19).



**Rysunek 19.** Fragment widma <sup>1</sup>H NMR laktonu **7** odpowiadający protonom pierścienia aromatycznego

Nałożone dublety mają kształt zbliżony do trypletu, jednak widmo korelacyjne HMQC laktonu **7** w sposób jednoznaczny potwierdza, że są to dwa sygnały, gdyż pokazuje sprzężenie z jądrami dwóch atomów węgla: C-7 ( $\delta=107.98$ ) i C-9 ( $\delta=111.78$ ) (Rysunek 20).

O ile tryplet można jednoznacznie przypisać atomowi H-8, o tyle przypisanie dubletów atomom H-7 i H-9 nie jest takie łatwe, gdyż oba wodory posiadają bardzo podobne otoczenie chemiczne. W rozwiązaniu niejasności znowu pomocne okazało się widmo korelacyjne HMBC (Tabela 5). Na widmie tym widoczne są sygnały obrazujące sprzężenia pomiędzy jądrem atomu węgla C-5a i protonem H-7 oraz pomiędzy jądrem atomu węgla C-9a i protonem H-9. Na tej podstawie protonowi H-7 przypisałam dublet położony przy 6.72 ppm a protonowi H-9 dublet przy 6.75 ppm. Widmo korelacyjne <sup>1</sup>H - <sup>13</sup>C (HMQC) umożliwiło ustalenie położenia sygnałów od jąder atomów węgla pierścienia aromatycznego. Zatem sygnały od atomów C-6, C-7, C-8 i C-9 położone są odpowiednio przy przesunięciu chemicznym 157.21, 107.98, 127.74 oraz 111.78 ppm.



Rysunek 20. Fragment widma HMQC 6-metoksybenzoksepan-2-onu 7

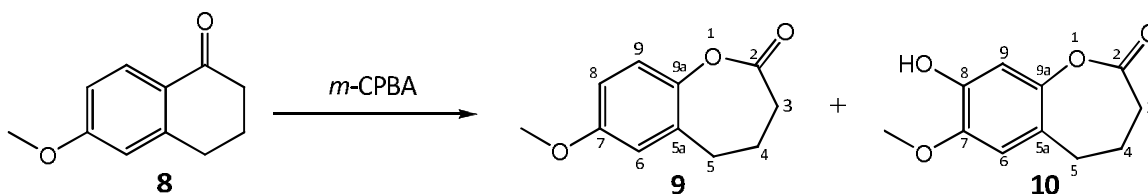
Tabela 5. Sprzężenia przez dwa i trzy wiązania pomiędzy jądrami atomów węgla i wodoru odczytane z widma HMBC laktonu 7

	CH <sub>2</sub> -3	CH <sub>2</sub> -4	CH <sub>2</sub> -5	H-7	H-8	H-9
C-2	+	+	-	-	-	-
C-3	-	+	+	-	-	-
C-4	+	-	+	-	-	-
C-5	+	+	-	-	-	-
C-5a	-	+	+	+	-	+
C-6	-	-	+	+	+	-
C-7	-	-	-	-	+	+
C-8	-	-	-	+	-	+
C-9	-	-	-	+	+	-
C-9a	-	-	+	-	+	+
C-10	-	-	-	-	-	-



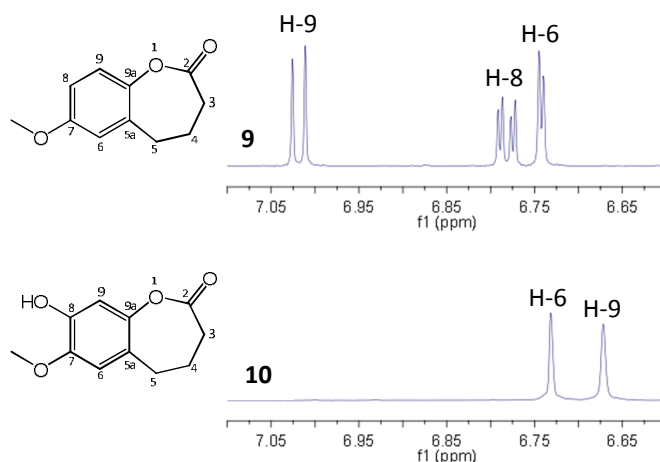
#### 4.1.3 Utlenianie 6-metoksy-1-tetralonu (8)

Podobnie jak w przypadku utleniania 1-tetralonu (1), również w przypadku utleniania 6-metoksy-1-tetralonu (8) za pomocą *m*-CPBA otrzymano dwa produkty. Produktem głównym, otrzymanym z wydajnością 67% był 7-metoksybenzoksepan-2-on (9). Drugim produktem otrzymanym z wydajnością 7% był 8-hydroksy-7-metoksybenzoksepan-2-on (10) (Schemat 36).



Schemat 36.

Ustalenie struktury produktów umożliwiła mi analiza danych z widm  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$  NMR oraz widma korelacyjnego HMQC. Protony grup metylenowych pierścieni laktonowych obu produktów dają sygnały w zakresie od 2.00 do 2.80 ppm. W obu przypadkach posiadają, charakterystyczny układ: kwintet dla protonów grupy  $\text{CH}_2\text{-4}$  oraz dwa tryplety dla protonów grup  $\text{CH}_2\text{-3}$  i  $\text{CH}_2\text{-5}$ . Stałe sprzężenia pomiędzy protonami tych grup wynoszą  $J=7.2$  Hz dla laktonu 9 i  $J=7.3$  Hz dla hydroksylaktonu 10. Singlet pochodzący od trzech protonów grupy metoksylowej laktonu 9 położony jest na widmie przy 3.78 ppm. W przypadku hydroksylaktonu 10, sygnał ten jest nieco przesunięty w kierunku niższego pola ( $\delta=3.89$ ) Spowodowane jest to bliskim sąsiedztwem grupy hydroksylowej w cząsteczce. O obecności grupy hydroksylowej w cząsteczce laktonu 10 świadczy jednoprotonowy singlet przy 5.65 ppm oraz obecność silnego pasma absorpcji przy  $3337\text{ cm}^{-1}$  na widmie IR, pochodzącego od drgań rozciągających wiązania O-H. Porównanie widm  $^1\text{H}$  NMR obu produktów w zakresie odpowiadającym przesunięciom chemicznym protonów aromatycznych pozwoliło określić położenie grupy hydroksylowej w hydroksylaktonie 10 (Rysunek 21).

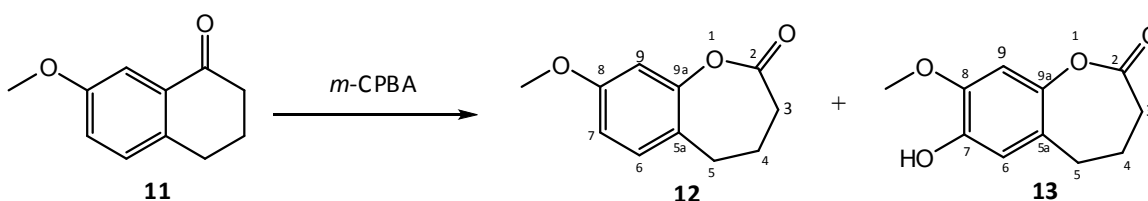


**Rysunek 21.** Fragment widm  $^1\text{H NMR}$  laktonów **9** i laktonu **10** w zakresie odpowiadającym położeniu sygnałów od protonów pierścienia aromatycznego

Atom H-6 laktonu **9** daje sygnał w postaci dubletu o niewielkiej stałej sprzężenia  $J=3.0$  Hz przy 6.75 ppm. Dublet dubletów przy 6.78 ppm pochodzi od protonu H-8. Większa stała sprzężenia ( $J=8.7$  Hz) świadczy o sprzęganiu z protonem H-9, a mniejsza (3.0 Hz) o sprzęganiu z protonem H-6. Dublet o stałej sprzężenia  $J=8.7$  Hz ( $\delta=7.02$ ) jest sygnałem pochodzącym od protonu H-9 laktonu **9**. Sygnał od protonu H-9 hydroksylaktonu **10** uległ przesunięciu na widmie w kierunku wyższego pola ( $\delta = 6.65$ ). Jest to spowodowane obecnością grupy hydroksylowej przy atomie węgla C-8, czyli w pozycji *orto* w stosunku do atomu C-9. Sygnał ten przybrał postać singletu, co również świadczy o substytucji atomu wodoru położonego przy sąsiednim atomie węgla. Przesunięciu nie uległ natomiast sygnał od atomu H-6, ale podobnie jak sygnał od H-9, jest singletem.

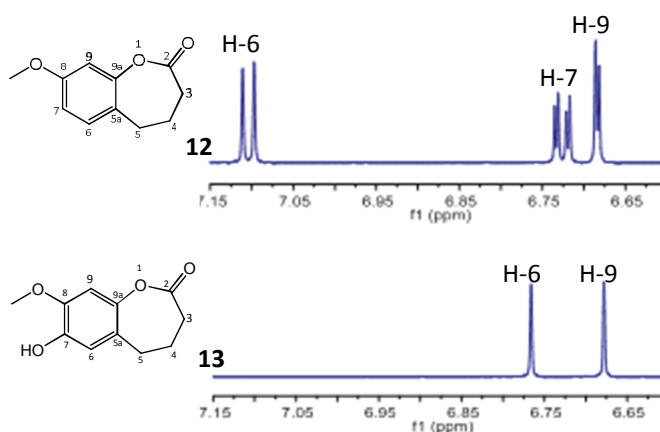
#### 4.1.4 Utlenianie 7-metoksy-1-tetralonu (**11**)

Analizując wyniki utleniania 7-metoksy-1-tetralonu (**11**), można zauważyć dużą analogię do utleniania 6-metoksy-1-tetralonu (**8**). Również w tym przypadku powstają dwa produkty: produkt główny (wyd. 70%) - 8-metoksybenzoksepan-2-on (**12**) oraz 7-hydrokso-8-metoksybenzoksepan-2-on (**13**), otrzymany z wydajnością 8% (Schemat 37).



**Schemat 37.**

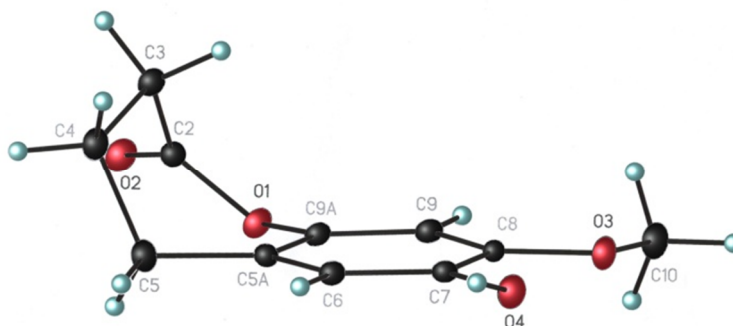
Analiza widm  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$  NMR oraz widm korelacyjnych HMQC umożliwiła mi ustalenie struktury produktów. Podobnie jak w przypadku poprzednio opisywanych laktonów, również w przypadku laktonów **12** i **13**, protony grupy metylenowych pierścieni laktonowych obu produktów dają sygnały o charakterystycznej dla takiego układu multipletowości: kwintetu oraz dwóch trypletów w zakresie od 2.00 do 2.80 ppm. Sygnały od protonów grup  $\text{CH}_2\text{-4}$  obu produktów są prawie identyczne. Obydwa są kwintetami położonymi przy 2.15 ppm i stałej sprzężenia  $J=7.2$  Hz. Protonom grupy  $\text{CH}_2\text{-3}$  obu produktów odpowiadają tryplety o stałych sprzężenia  $J=7.2$  Hz. Przesunięcia chemiczne tych sygnałów różnią się zaledwie o 0.002 ppm (2.466 ppm dla laktonu **12** oraz 2.464 ppm dla hydroksylaktonu **13**). Różnica w przesunięciu chemicznym trypletów grup  $\text{CH}_2\text{-5}$  jest nieco większa choć nadal bardzo mała: 2.75 ppm dla laktonu **12** oraz 2.71 ppm dla hydroksylaktonu **13**. Stałe sprzężenia odczytane z multipletów wynoszą 7.2 Hz. Sygnał pochodzący od trzech protonów grupy metoksylowej laktonu **12** ma postać singletu o przesunięciu chemicznym 3.78 ppm. W przypadku hydroksylaktonu **13**, sygnał ten z powodu bliskiego sąsiedztwa grupy hydroksylowej w cząsteczce, jest nieco przesunięty w kierunku niższego pola ( $\delta=3.87$ ). Obecność grupy hydroksylowej w cząsteczce laktonu **13**, potwierdza jednoprotonowy singlet przy 5.49 ppm oraz obecność silnego pasma absorpcji na widmie IR przy  $3393\text{ cm}^{-1}$  pochodzącego od drgań rozciągających wiązania O-H. Położenie grupy hydroksylowej w hydroksylaktonie **13** wnioskowałam porównując sygnały położone w zakresie odpowiadającym przesunięciom chemicznym protonów aromatycznych na widmach  $^1\text{H}$  NMR obu produktów. (Rysunek 22).



**Rysunek 22.**  $^1\text{H}$ NMR laktonów **12** i laktonu **13** w zakresie odpowiadającym położeniu sygnałów od protonów pierścienia aromatycznego

Atomowi wodoru H-9 laktonu **12** odpowiada dublet o stałej sprzężenia  $J=2.5$  Hz przy przesunięciu chemicznym 6.68 ppm. Dublet dubletów przy 6.73 pochodzi od protonu H-7 laktonu **12**. Większa stała sprzężenia ( $J=8.3$  Hz) świadczy o sprzężeniu z protonem H-6, a mniejsza (2.5 Hz) o sprzężeniu z protonem H-9. Na widmie hydroksylaktonu **13** nie obserwuje się sygnału od tego protonu. Dublet o stałej sprzężenia  $J=8.3$  Hz jest sygnałem pochodzącym od atomu H-6. Sygnał od tego protonu na widmie laktonu **13** uległ przesunięciu w kierunku wyższego pola ( $\delta=6.77$ ), co jest spowodowane obecnością grupy hydroksylowej w pozycji *orto* (przy atomie węgla C-7). Przybrał on postać singletu, co również świadczy o substytucji atomu wodoru położonego przy sąsiednim atomie węgla. Przesunięciu nie uległ natomiast sygnał od protonu H-9, ale podobnie jak sygnał od H-6, przybrał postać singletu.

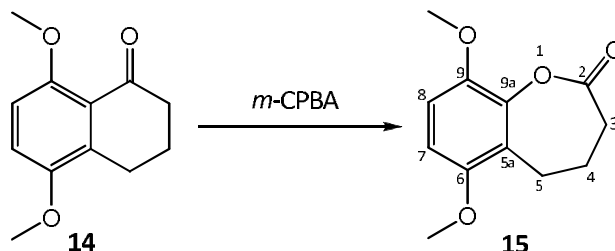
W przypadku hydroksylaktonu **13** możliwe było wykonanie analizy krystalograficznej, której wynik potwierdził strukturę produktu ustaloną na podstawie widm NMR (Rysunek 23). Zwraca uwagę konformacja łódkowa siedmioczłonowego pierścienia laktonowego.



Rysunek 23. Struktura krystaliczna hydroksylaktonu **13**

#### 4.1.5 Utlenianie 5,8-dimetoksy-1-tetralonu (**14**)

Kolejnym substratem poddanym chemicznemu utlenieniu Baeyera-Villigera był 5,8-dimetoksy-1-tetralon (**14**). W wyniku reakcji i procesu izolowania otrzymałam czysty 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-on (**15**), z wydajnością 72% (Schemat 38).

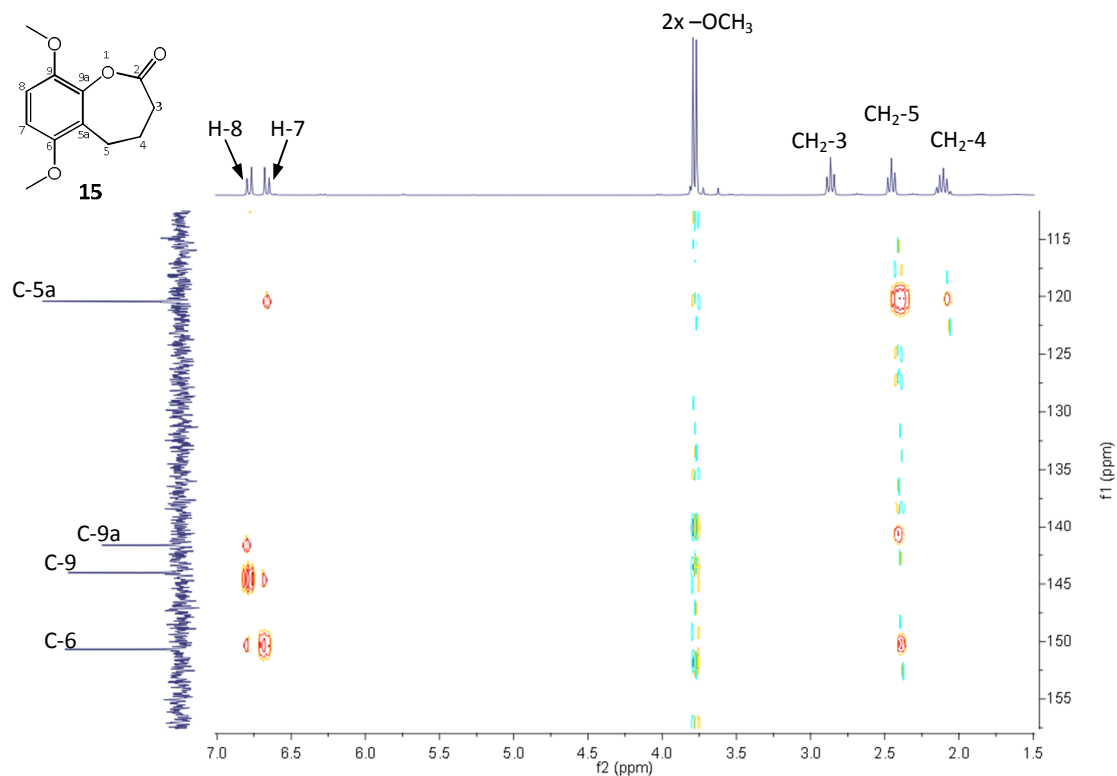


Schemat 38.

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego oraz widma w zakresie podczerwieni (IR) umożliwiły mi potwierdzić spodziewanej struktury produktu. Układ trzech sygnałów (kwintetu i dwóch trypletów) w zakresie od 2.00 do 3.00 ppm na widmie  $^1\text{H}$  NMR odpowiada protonom trzech grup metylenowych pierścienia laktonowego: kwintet ( $J=7.2$  Hz) przy 2.11 ppm pochodzi od protonów grupy  $\text{CH}_2$ -4, tryplet ( $J=7.2$  Hz) przy wyższym polu (2.46 ppm) odpowiada protonom grupy  $\text{CH}_2$ -3 a tryplet ( $J=7.2$  Hz) przy polu o niższym natężeniu (2.87 ppm) odpowiada protonom grupy  $\text{CH}_2$ -5.

Na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR laktonu **15** widoczne są cztery sygnały o małej intensywności, charakterystyczne dla czwartorzędowych atomów węgla. Ich rozróżnienie byłoby bardzo trudne bez widma korelacyjnego HMBC. Na widmie tym można zaobserwować, że każde z jąder sprzęga się z inną kombinacją protonów: jądro atomu C-5a ( $\delta=120.44$ ) z protonami grup  $\text{CH}_2$ -4,  $\text{CH}_2$ -5 oraz protonami H-7, jądro atomu C-6 ( $\delta=150.69$ ) z protonami grupy  $\text{CH}_2$ -5 oraz protonami H-7 i H-8, jądro atomu C-9 ( $\delta=144.03$ ) z protonami H-7 i H-8 a jądro atomu C-9a ( $\delta=141.64$ ) z protonami grupy  $\text{CH}_2$ -5 oraz protonem H-8. (Rysunek 24, Tabela 6).

Przy  $\delta = 3.77$  i  $\delta = 3.78$  na widmie  $^1\text{H}$  NMR widoczne są dwa trójprotonowe singlety pochodzące od protonów grup metoksyloowych. Niestety nie potrafię jednoznacznie przypisać sygnałów konkretnym grupom ze względu na zbyt małą różnicę w przesunięciu chemicznym.

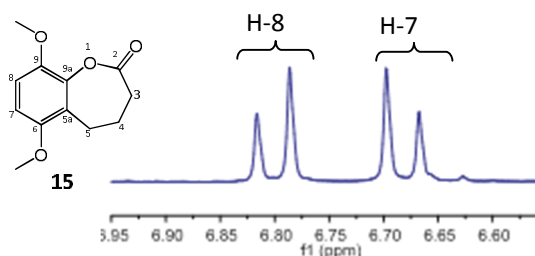


Rysunek 24. Widmo HMBC 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-onu **15**

Tabela 6. Sprzężenia przez dwa i trzy wiązania pomiędzy jądrami atomów węgla i wodoru odczytane z widma HMBC laktonu **15**

	 <b>15</b>					
	2H-3	2H-4	2H-5	H-7	H-8	2xO-CH <sub>3</sub>
C-2	+	+	-	-	-	-
C-3	-	+	+	-	-	-
C-4	+	-	+	-	-	-
C-5	+	+	-	-	-	-
C-5a	-	+	+	+	-	-
C-6	-	-	+	+	+	-
C-7	-	-	-	-	+	-
C-8	-	-	-	+	-	-
C-9	-	-	-	+	+	-
C-9a	-	-	+	-	+	-
2xO-CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-

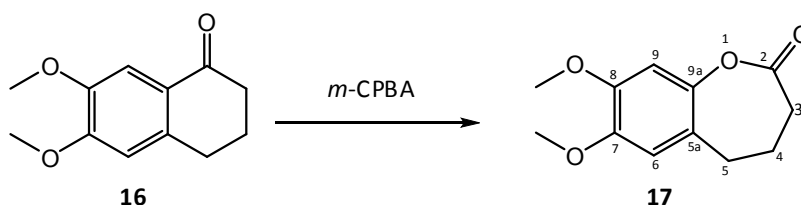
Widmo korelacyjne HMBC okazało się pomocne w przypisaniu sygnałów od protonów aromatycznych. Znając położenie sygnału od atomu węgla C-5a ( $\delta = 120.44$ , określone na podstawie obecności sprzężenia z CH<sub>2</sub>-4), mogłam odnaleźć, przesunięcie chemiczne sygnału od atomu H-7 (sprzężenie przez trzy wiązania). Zatem dublet ( $J=9.0$  Hz) przy 6.66 ppm przypisałam atomowi H-7, natomiast dublet ( $J=9.0$  Hz) przy 6.78 ppm – atomowi H-8. Znając położenie tych sygnałów, posługując się widmem korelacyjnym HMQC mogłam jednoznacznie przypisać sygnały atomom C-7 i C-8 na widmie <sup>13</sup>C NMR.



Rysunek 25. Fragment widma <sup>1</sup>H NMR odpowiadający sygnałom pochodzącym od protonów pierścienia aromatycznego laktonu **15**

### 3.1.6 Utlenianie 6,7-dimetoksy-1-tetralonu (**16**)

Chemicznemu utlenieniu Baeyera-Villigera poddany był również 5,8-dimetoksy-1-tetralon (**16**). W wyniku reakcji i procesu izolowania otrzymałam jedynie czysty 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-on (**17**), z wydajnością 72% (Schemat 39).

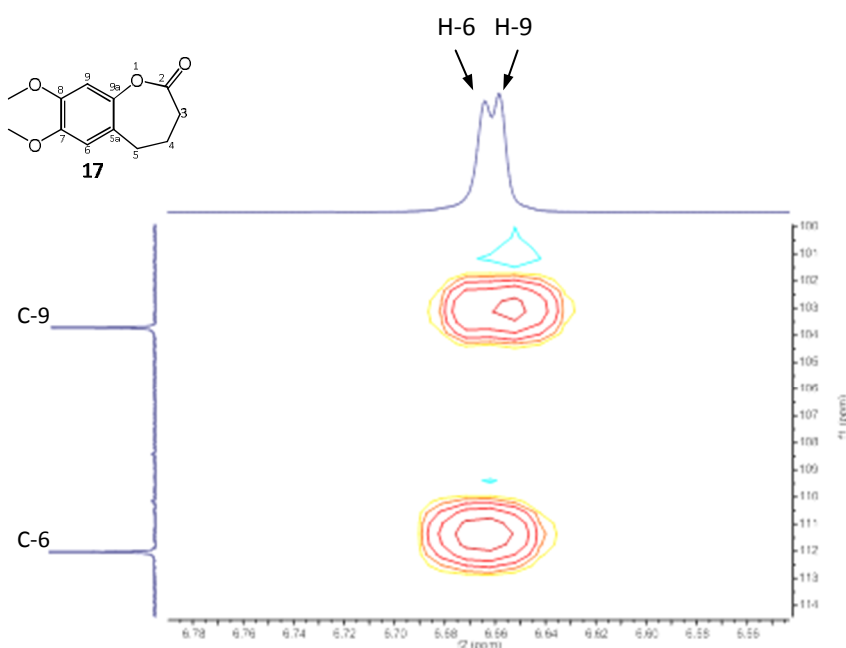


Schemat 39.

W przypadku widm magnetycznego rezonansu jądrowego laktonu **17**, sygnały pochodzące od protonów grup metylenowych tworzących pierścień laktonowy mogłam przypisać konkretnym atomom. Kwintet ( $J = 7.1$  Hz) przy 2.17 ppm odpowiada protonom grupy CH<sub>2</sub>-4, tryplet ( $J = 7.1$  Hz) przy 2.47 ppm – protonom grupy CH<sub>2</sub>-3, a tryplet ( $J = 7.1$  Hz) przy 2.74 ppm – protonom grupy CH<sub>2</sub>-5. Dwa trójprotonowe singlety ( $\delta = 3.84$  i  $\delta = 3.86$ ) odpowiadają atomom wodoru grup metoksyłowych. W przypadku grupy położonej przy atomie węgla C-7 występuje silniejszy efekt przesłaniania

spowodowany obecnością dwóch podstawników zwiększających gęstość elektronową w pozycjach *orto* (grupa metoksylova) i *para* (ugrupowanie laktonowe). Dlatego sygnał położony przy wyższym polu przypisałam protonom grupy metoksylova przy atomie węgla C-7.

Sygnały na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR pochodzące od jąder atomów węgla C-6 ( $\delta=112.03$ ) i C-9 ( $\delta=103.07$ ) udało mi się rozróżnić na podstawie danych z widma HMBC, na którym widoczne jest sprzężenie pomiędzy jądrem atomu C-6 a protonami grupy metylenowej  $\text{CH}_2$ -5. Znając przesunięcia chemiczne sygnałów od jąder atomów C-6 i C-9, mogłam na podstawie danych z widma korelacyjnego HMQC przypisać sygnały odpowiadające protonom aromatycznym H-6 i H-9 mimo, że różnica w przesunięciu chemicznym wynosi zaledwie 0.006 ppm. (Rysunek. 26)



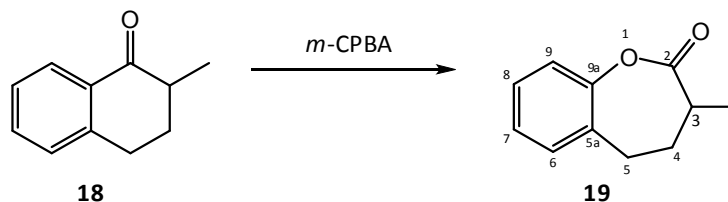
**Rysunek 26.** Fragment widma korelacyjnego HMQC 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-onu **17**

Sygnał od protonu H-9 jest przesunięty w kierunku niższych częstotliwości, ze względu na położenie dwóch podstawników aktywujących pierścień aromatyczny w pozycji *orto*. Atom H-6 położony jest względem tylko jednego podstawnika w pozycji *orto*.



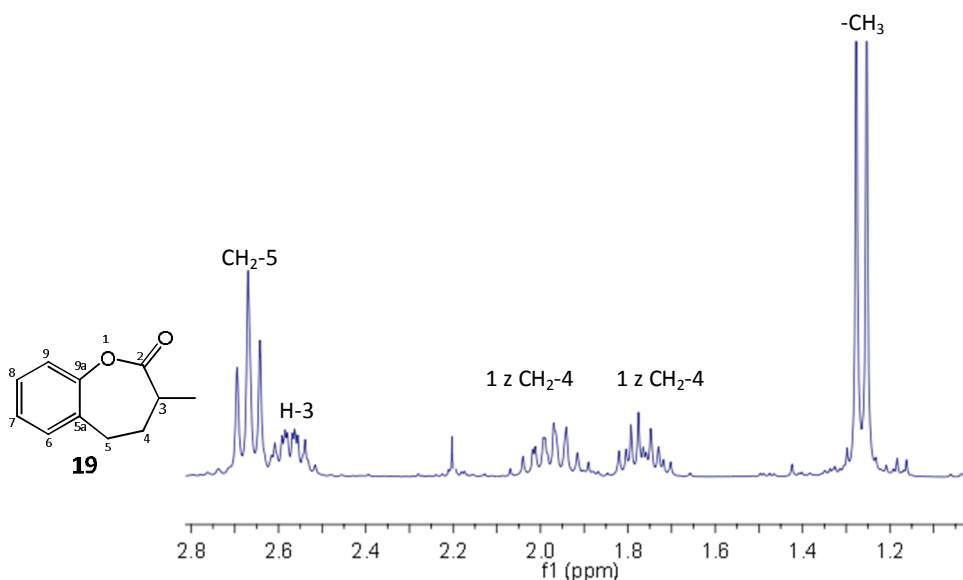
#### 4.1.7 Utlenianie 2-metylo-1-tetralonu (18)

Kolejnym substratem poddanym chemicznemu utlenieniu Baeyera-Villigera był 2-metylo-1-tetralon (18). W wyniku reakcji i procesu izolowania otrzymałam czysty 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-on (19), z wydajnością 73% (Schemat 40).



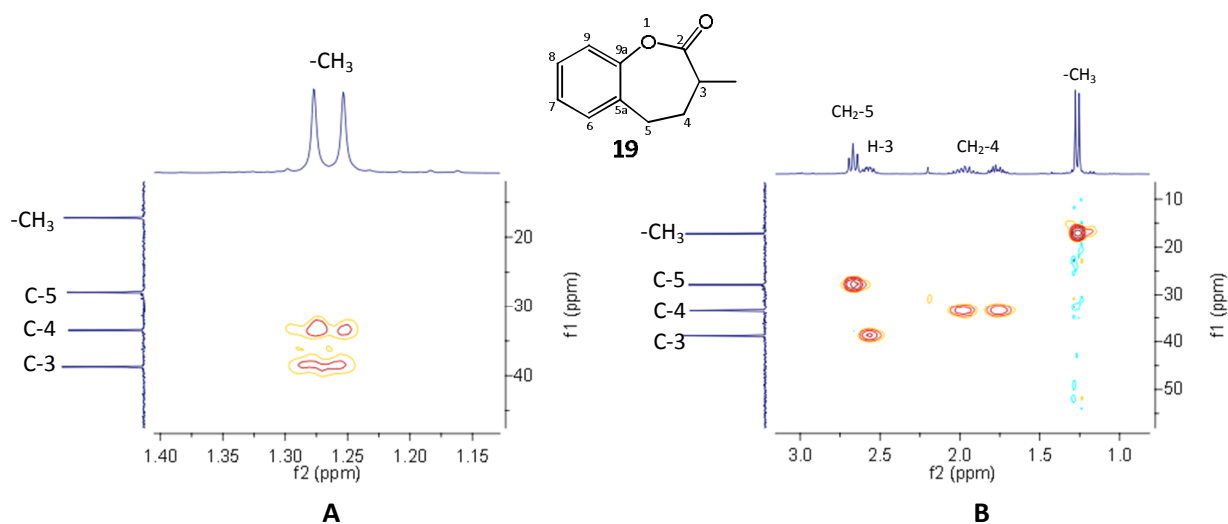
Schemat 40.

Interpretację danych spektroskopowych rozpocząłam od przyporządkowania sygnałów pochodzących od protonów pierścienia laktonowego na widmie  $^1\text{H}$  NMR laktonu 19 (Rysunek 27).

Rysunek 27. Fragment widma  $^1\text{H}$  NMR 3-metylobenzoksepan-2-onu 19

Trójprotonowy dublet ( $J=7.1$  Hz) pochodzi od protonów grupy metylowej. Atomowi węgla tej grupy odpowiada sygnał przy 17.23 ppm na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR. Te dwa sygnały stały się dla mnie punktem wyjścia do przypisania pozostałych sygnałów pochodzących od protonów pierścienia laktonowego. Na widmie dwuwymiarowym HMBC możliwe jest obserwowanie sprzężeń pomiędzy protonami grupy metylenowej a jądrami atomów węgla C-3 (przez dwa wiązania) oraz C-4 (przez trzy wiązania). Sprzężenie takie jest widoczne dla sygnałów położonych przy 33.49 i 38.75 ppm na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR (Rysunek 28). Z kolei widmo korelacyjne HMQC pokazuje, że sygnał przy 33.49 ppm

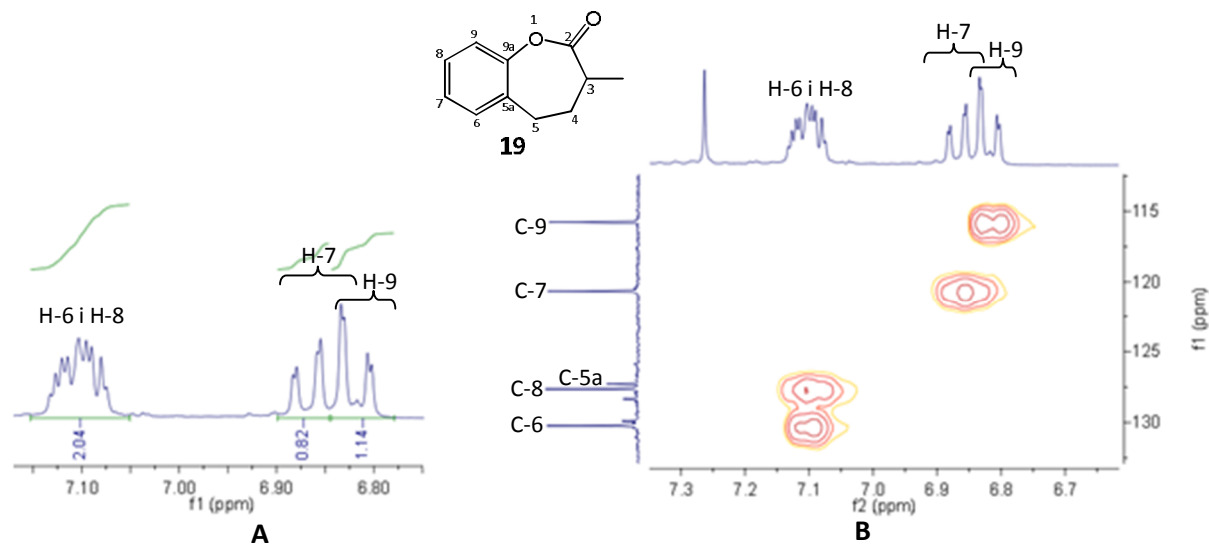
pochodzi od drugorzędowego atomu węgla C-4. Diastereotopowym protonom grupy CH<sub>2</sub>-4 odpowiadają dwa multiplety położone na widmie <sup>1</sup>H NMR przy 1.77 i 1.97 ppm. Sygnał przy 38.75 ppm na widmie <sup>13</sup>C NMR pochodzi zatem od jądra atomu węgla C-3, a protonowi H-3 odpowiada na widmie <sup>1</sup>H NMR multiplet przy 2.58 ppm. Na rysunku 34 ilustrującym widmo laktonu **19** widoczny jest również dwuprotonowy tryplet (*J*= 7.8 Hz) pochodzący od protonów grupy CH<sub>2</sub>-5. Krotność rozszczepienia wskazuje, że protony te sprzęgają się z protonami grupy CH<sub>2</sub>-4 taką samą stałą sprzężenia. Atomowi węgla C-5 odpowiada sygnał przy 27.89 ppm na widmie <sup>13</sup>C NMR.



Rysunek 28. Fragmenty widm korelacyjnych 3-metylobenzoksepan-2-onu **19**: A HMBC, B HMQC

Znając przesunięcia chemiczne sygnałów od protonów grup CH<sub>2</sub>-4 i CH<sub>2</sub>-5 na widmie <sup>1</sup>H NMR i posługując się danymi z widma korelacyjnego HMBC, mogłam przypisać sygnały na widmie <sup>13</sup>C NMR mostkowym atomom węgla. Atom węgla C-5a sprzęga się zarówno z protonami grupy CH<sub>2</sub>-4, jak i CH<sub>2</sub>-5, natomiast atom węgla C-9a tylko z protonami grupy CH<sub>2</sub>-5. Założenie to potwierdza widmo HMBC. Sygnał położony na widmie <sup>13</sup>C NMR przy 127.29 ppm pochodzi od atomu C-5a, a sygnał przy 153.98 ppm od atomu C-9a. Przesunięcie w kierunku niższego pola sygnału od atomu C-9a spowodowane jest bezpośrednim sąsiedztwem atomu tlenu ugrupowania laktonowego.

Na widmie <sup>1</sup>H NMR laktonu **19** w części widma odpowiadającej protonom pierścienia aromatycznego widoczne są dwie grupy sygnałów (Rysunek 29A). Przy niższym polu (7.09-7.14 ppm) położony jest dwuprotonowy multiplet. Przy wyższym polu położone są dwa sygnały. Wartości integracji wskazują, że sygnały te częściowo się na siebie nakładają, co potwierdza również kształt sygnałów na widmie HMQC (Rysunek 29B).



**Rysunek 29.** Fragmenty widm 3-metylobenzoksepan-2-onu **19** odpowiadające sygnałom od atomów tworzących pierścień aromatyczny: **A**  $^1\text{H}$  NMR, **B** HMQC

Na skutek położenia w pozycji *orto* względem tlenu ugrupowania laktonowego, najmniej odsłaniany jest dublet dubletów ( $J=8.3$  i  $1.1$  Hz) od protonu H-9. Większa stała sprzężenia jest skutkiem sprzężenia z sąsiednim protonem H-8, a mniejsza z H-7. Położenie sygnału potwierdzone jest występowaniem sprzężenia pomiędzy protonem H-9, a mostkowymi atomami węgla C-5a i C-9a na widmie HMBC. Sprzężenie z mostkowymi atomami węgla obecne jest również w przypadku atomu H-6, ale atom ten sprzęga dodatkowo z atomem C-5. Na tej podstawie ustaliłam, że sygnał od protonu H-6 położony jest w obrębie multipletu przy 7.09-7.14 ppm.

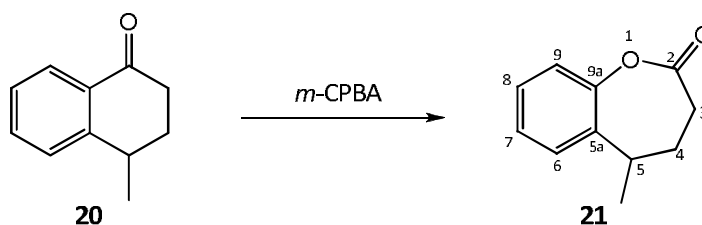
**Tabela 7.** Sprzężenia przez dwa i trzy wiązania pomiędzy jądrami atomów węgla i wodoru odczytane z widma HMBC laktonu **19**

	H-3	2H-4	2H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	-CH <sub>3</sub>
C-2	+	+	-	-	-	-	-	+
C-3	-	+	+	-	-	-	-	+
C-4	+	-	+	-	-	-	-	+
C-5	+	+	-	+	-	-	-	-
C-5a	-	+	+	+	+	-	+	-
C-6	-	-	+	-	+	+	-	-
C-7	-	-	-	+	-	+	+	-
C-8	-	-	-	+	+	-	+	-
C-9	-	-	-	-	+	+	-	-
C-9a	-	-	+	+	-	+	+	-
-CH <sub>3</sub>								

Sygnal położony przy 6.86 ppm opisałam jako tryplet dubletów ( $J=7.4$  i  $1.1$  Hz) pochodzący od protonu H-7. Większa stała sprzężenia jest wynikiem sprzężenia z sąsiednimi protonami H-8 i H-6, a mniejsza z protonem H-9. Proton H-7 sprzęga się z mostkowym atomem węgla C-5a na widmie HMBC, co odróżnia go od protonu H-8. Proton H-8 daje sygnał w zakresie od 7.09 do 7.14 ppm, razem z protonem H-6. W oparciu o dane z widma HMQC (Rysunek 29B), przypisałam sygnały atomom węgla tworzącym pierścień aromatyczny. Sygnał od atomu węgla C-6 mogłam przypisać posługując się widmem HMBC, na którym widoczne jest sprzężenie pomiędzy tym atomem węgla a protonami grupy  $\text{CH}_2$ -5.

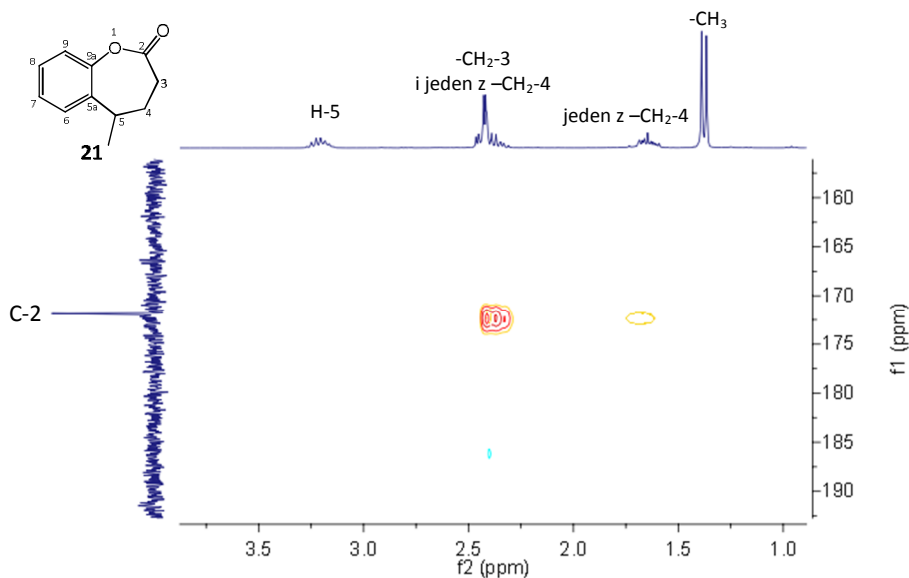
#### 4.1.8 Utlenianie 4-metylo-1-tetralonu (20)

W wyniku utlenienia Baeyera-Villigera 4-metylo-1-tetralonu (**20**) otrzymałam 5-metylobenzoksepan-2-on (**21**) z wydajnością 66% (Schemat 41). Strukturę produktu potwierdzają jego dane spektroskopowe.



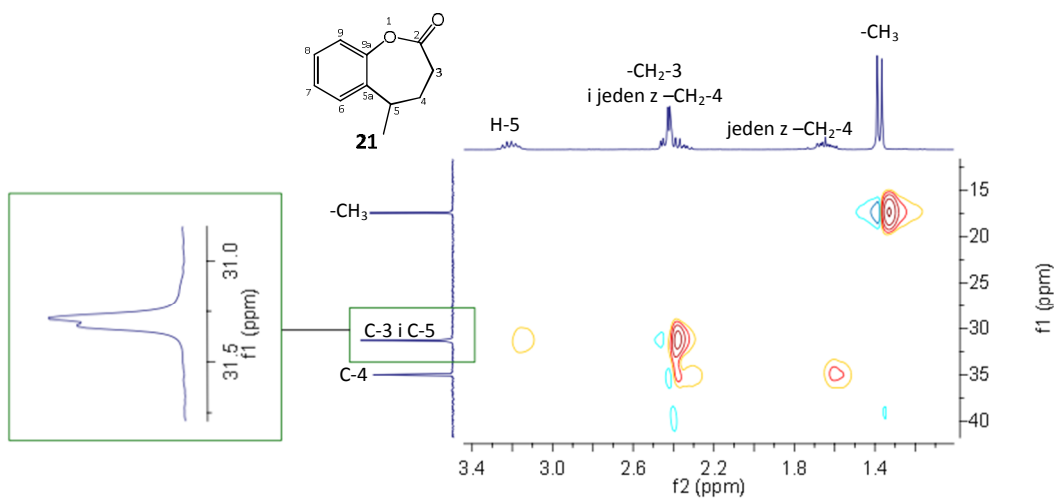
Schemat 41.

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR laktonu **21** widoczny jest trzyprotonowy dublet ( $J=6.8$  Hz) przy 1.38 ppm, pochodzący od protonów grupy metylowej. Atomowi węgla tej grupy odpowiada sygnał na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR położony przy 17.47 ppm. Na widmie  $^1\text{H}$  NMR w zakresie od 1.5 do 3.5 ppm wyróżnić można trzy multiplety. Najbardziej odsłaniany ( $\delta=3.21$ ) pochodzi od protonu H-5, czego potwierdzenie można odnaleźć analizując widmo korelacyjne HMBC. Na widmie tym widoczne są sprzężenia pomiędzy karbonylowym atomem węgla C-2 a protonami grup  $\text{CH}_2$ -3 (przez dwa wiązania) i  $\text{CH}_2$ -4 (przez trzy wiązania). Nie ma natomiast sprzężenia pomiędzy atomem węgla C-2 a protonem H-5 (Rysunek 30).



Rysunek 30. Fragment widma korelacyjnego HMBC 5-metylobenzoksepan-2-onu **21**

Protony grupy metylenowej  $\text{CH}_2\text{-4}$  są diastereotopowe i odpowiadają im dwa osobne multiplety na widmie  $^1\text{H}$  NMR. Widmo korelacyjne HMQC pokazuje, że z atomem węgla, któremu odpowiada sygnał przy 34.99 ppm, związane są dwa atomy wodoru dające dwa osobne sygnały na widmie  $^1\text{H}$  NMR (Rysunek 31). Zatem jednemu z protonów grupy  $\text{CH}_2\text{-4}$  przypisałam multiplet położony przy 1.65 ppm. Sygnał od drugiego z protonów nałożony jest na multiplet od protonów grupy  $\text{CH}_2\text{-3}$  w zakresie 2.31-2.46 ppm.

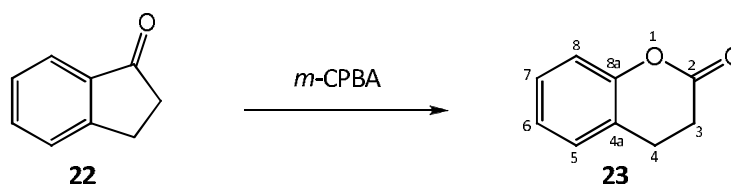


Rysunek 31. Fragment widma korelacyjnego HMQC 5-metylobenzoksepan-2-onu **21**

Trudna do interpretacji okazała się część widma  $^1\text{H}$  NMR odpowiadająca protonom pierścienia aromatycznego. W zakresie od 7.05 do 7.35 ppm widoczne są dwa multiplety. Pierwszy z nich (7.07-7.10 ppm) pochodzi od atomu H-9. Na położenie tego sygnału ma wpływ oddziaływanie grupy zawierającej atom tlenu, położonej w pozycji *orto*. Atomowi węgla C-9 odpowiada sygnał na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR przy 119.29 ppm. Sygnały pochodzące od pozostałych atomów wodoru (H-6, H-7 i H-8) nakładają się na siebie w zakresie 7.23-7.31 ppm.

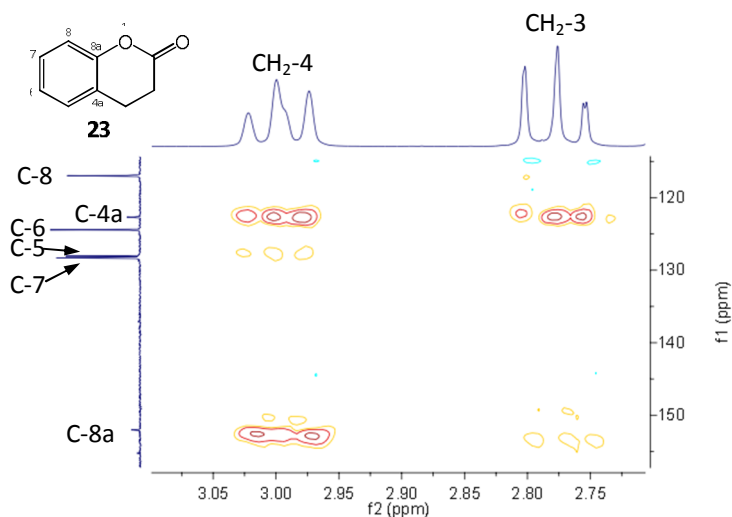
#### 4.1.9 Utlenianie indanonu (22)

Chemicznemu utlenieniu Baeyera-Villigera poddany był również indanon (22). W wyniku reakcji i procesu izolowania otrzymałam czystą 3,4-dihydrokumarynę (23), z wydajnością 77% (Schemat42).



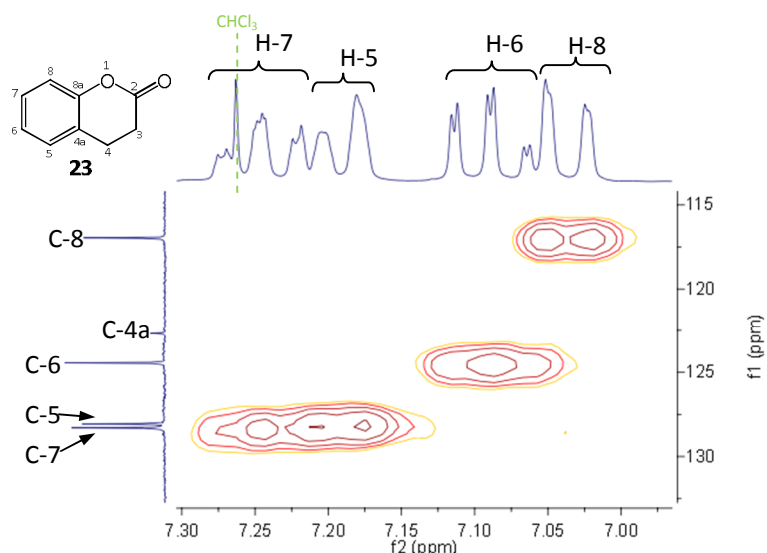
Schemat 42.

Struktura laktonu została potwierdzona danymi z widm  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR oraz widma korelacyjnego HMQC. Protonom grup metylenowych pierścienia laktonowego odpowiadają dwa tryplety ( $J=7.8$  Hz) położone przy 2.76 i 2.98 ppm. Ze względu na silniejszy efekt odsłaniania spowodowany sąsiedztwem pierścienia aromatycznego, przy niższym polu położony jest tryplet od protonów grupy  $\text{CH}_2$ -4. Potwierdzenie tego odnalazłam analizując widmo HMBC 3,4-dihydrokumaryny (23) (Rysunek 32). Na widmie tym widoczne są sprzężenia pomiędzy protonami grup metylenowych, a mostkowymi atomami węgla. Atom węgla C-4a sprzęga się zarówno z protonami grupy  $\text{CH}_2$ -3, jak i  $\text{CH}_2$ -4, podczas gdy atom węgla C-8a tylko z protonami grupy  $\text{CH}_2$ -4. Ponadto na widmie tym widoczne jest sprzężenie pomiędzy protonami grupy  $\text{CH}_2$ -4 i atomem węgla C-5.



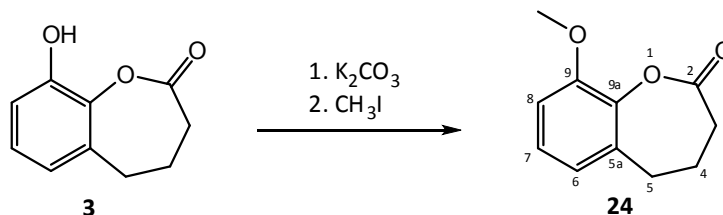
**Rysunek 32.** Fragment widma korelacyjnego HMBC 3,4-dihydroksykumaryny (**23**)

W części widma odpowiadającej sygnałom od protonów pierścienia aromatycznego widoczne są cztery sygnały (Rys. 40). Dublet dubletów ( $J=8.1$  i  $1.1$  Hz) przy najwyższym polu ( $\delta = 7.02$ ) przyporządkowałam atomowi H-8, ze względu na położenie *orto* względem grupy estrowej, mającej bezpośredni wpływ na przesunięcie chemiczne sygnału. Na podstawie takiej samej stałej sprzężenia występującej w tryplecie dubletów ( $J=8.1$  i  $1.1$  Hz) położonym przy 7.23 ppm określiłam, że odpowiada on sąsiadującemu z H-8 atomowi H-7. Multipletowość pozostałych sygnałów wskazuje, że dublet dubletów ( $J=7.5$  i  $1.1$  Hz) położony przy 7.17 ppm pochodzi od atomu H-5, natomiast sygnał przy 7.07 ppm (ddd,  $J=8.1$ , 7,5 i 1.1 Hz) pochodzi od atomu H-6. Położenie sygnału od atomu H-5 dodatkowo potwierdza obecność sprzężenia pomiędzy tym atomem a atomem węgla C-4 na widmie korelacyjnym HMBC. Sygnały pochodzące od atomów węgla tworzących pierścień aromatyczny mogłam przyporządkować w oparciu o dane z widma korelacyjnego HMQC (Rysunek 33).

Rysunek 33. Fragment widma korelacyjnego HMBC 3,4-dihydroksykumaryny **23**

#### 4.2 Synteza 9-metoksybenzoksepan-2-onu (**24**) w reakcji Williamsona

9-metoksybenzoksepan-2-on (**24**) otrzymałam w wyniku reakcji Williamsona. Substratem był 9-hydroksybenzoksepan-2-on (**3**) a czynnikiem alkilującym jodek metylu. Otrzymałam czysty lakton **24** z wydajnością 52% (Schemat 43).



Schemat 43.

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego oraz widma w zakresie podczerwieni (IR) umożliwiły mi potwierdzenie spodziewanej struktury produktu. Układ trzech sygnałów (kwintetu i dwóch trypletów) w zakresie od 2.00 do 3.00 ppm na widmie  $^1\text{H}$  NMR odpowiada trzem grupom metylenowym pierścienia laktonowego: kwintet ( $J=7.1$  Hz) przy 2.17 ppm pochodzi od protonów grupy  $\text{CH}_2$ -4, tryplet ( $J=7.1$  Hz) przy wyższym polu (2.48 ppm) odpowiada protonom grupy  $\text{CH}_2$ -3, a tryplet ( $J=7.1$  Hz) przy niższym polu (2.56 ppm) odpowiada protonom grupy  $\text{CH}_2$ -5. Widmo korelacyjne  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  NMR (HMBC) umożliwiło ustalenie przesunięć chemicznych węgli grup metylenowych. Sygnały przy 23.99, 27.88 i 34.99 ppm pochodzą odpowiednio od atomów C-4, C-5 i C-3. Singlet przy 3.81 ppm na widmie protonowym pochodzi od protonów grupy metoksylowej. Węglowi tej grupy odpowiada sygnał przy 56.78 ppm na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR. Sygnały o niewielkiej



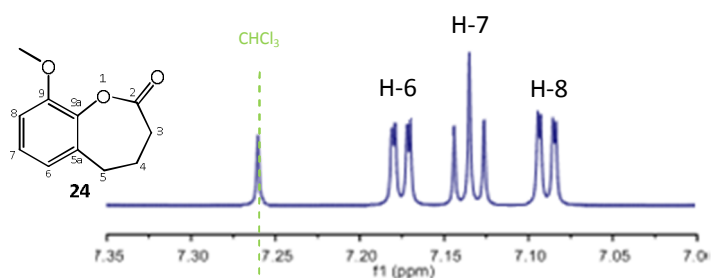
intensywności i przesunięciu chemicznym 120.14 i 140.98 przypisano odpowiednio mostkowym atomom węgla C-5a i C-9a.

Rozróżnienie sygnałów umożliwiło widmo dwuwymiarowe  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  NMR (HMBC) (Tabela 8), na którym widoczne jest sprzężenie przez trzy wiązania pomiędzy protonami grupy  $\text{CH}_2$ -4 a atomem węgla C-5a. Odległość czterech wiązań pomiędzy wodorami grupy  $\text{CH}_2$ -4 a atomem węgla C-9a uniemożliwia zaobserwowanie pomiędzy nimi takiego sprzężenia.

Tabela 8. Sprzężenia przez dwa i trzy wiązania pomiędzy jądrami atomów węgla i wodoru odczytane z widma HMBC laktonu **24**

	CH <sub>2</sub> -3	CH <sub>2</sub> -4	CH <sub>2</sub> -5	H-6	H-7	H-8
C-2	+	+	-	-	-	-
C-3	-	+	+	-	-	-
C-4	+	-	+	-	-	-
C-5	+	+	-	+	-	-
C-5a	-	+	+	+	+	-
C-6	-	-	+	-	+	+
C-7	-	-	-	+	-	+
C-8	-	-	-	+	+	-
C-9	-	-	-	-	+	+
C-9a	-	-	+	+	-	+
C-10	-	-	-	-	-	-

Na widmie protonowym w zakresie odpowiadającym sygnałom atomów wodoru pierścienia aromatycznego widoczne są trzy sygnały: dwa dublety dubletów ( $J=7.5$  i  $1.6$  Hz) przy 7.09 i 7.17 ppm oraz tryplet ( $J=7.5$  Hz) przy 7.14 ppm (Rysunek 34). Tryplet można jednoznacznie przypisać atomowi H-7, natomiast przypisanie dubletów atomom H-6 i H-8 wymaga posłużenia się widmem HMBC, na którym można się spodziewać sprzężenia pomiędzy atomami H-6 i C-5. Sprzężenie takie jest widoczne w dublecie dubletów przy niższym polu ( $\delta=7.17$ ). Zatem sygnał ten pochodzi od atomu H-6.



Rysunek 34. Fragment widma  $^1\text{H}$

#### 4.3 Biotransformacje 1-tetralonów

Celem tej części badań było znalezienie szczepów grzybów strzępkowych zdolnych do prowadzenia mikrobiologicznego utlenienia Baeyera-Villigera oraz porównanie wyników biotransformacji z wynikami transformacji enzymatycznej oraz reakcji prowadzonej na drodze chemicznej, z zastosowaniem peroksy kwasów. Substratami do biotransformacji były 1-tetralon (**1**) oraz jego metoksy- (**6**, **8**, **11**) i dimetoksy- (**14**, **16**) pochodne.

W pierwszym etapie przeprowadziłam skrining w celu wyselekcjonowania mikroorganizmów zdolnych do prowadzenia reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera. Mikroorganizmy poddane skriningowi pochodziły z kolekcji Katedry Chemii UP we Wrocławiu. Jako modelowy substrat wybrałam 1-tetralon (**1**), który poddałam działaniu dwudziestu czterech szczepów (Tabela 9). Hodowle całych komórek inkubowano w temperaturze pokojowej na podłożu Sabourauda na wytrząsarkach rotacyjnych. Procesy monitorowałam standardowymi technikami (GC i TLC).

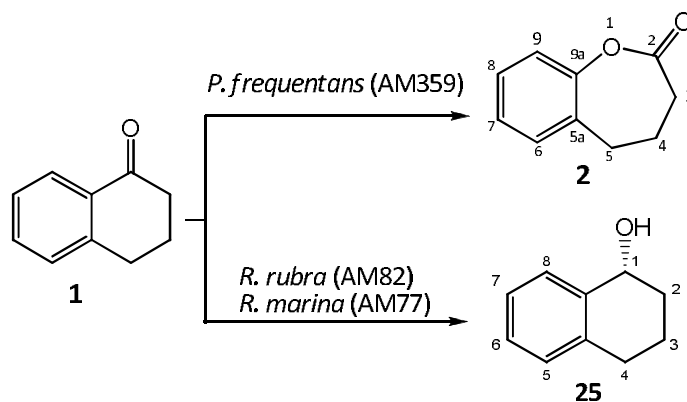
Tabela 9. Szczepy mikroorganizmów wykorzystane w badaniach skriningowych

Nazwa szczepu	Nazwa szczepu
<i>Fusarium culmorum</i> (AM7)	<i>Syncephalastrum racemosum</i> (105)
<i>Nigrospora oryzae</i> (AM8)	<i>Penicillium lilacinum</i> (AM111)
<i>Fusarium culmorum</i> (AM10)	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)
<i>Fusarium avenaceum</i> (AM11)	<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)
<i>Fusarium avenaceum</i> (AM12)	<i>Absidia glauca</i> (AM177)
<i>Fusarium oxysporum</i> (AM13)	<i>Fusarium scirpi</i> (AM199)
<i>Fusarium oxysporum</i> (AM21)	<i>Botrytis cinerea</i> (AM235)
<i>Penicillium vermiculatum</i> (AM81)	<i>Absidia glauca</i> (AM254)
<i>Rhodotorula marina</i> (AM77)	<i>Absidia cylindrospora</i> (AM336)
<i>Rhodotorula rubra</i> (AM82)	<i>Penicillium frequentans</i> (AM351)
<i>Penicillium camambertii</i> (AM83)	<i>Penicillium citrinum</i> (AM354)
<i>Penicillium thomi</i> (AM91)	<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)

Spośród badanych szczepów tylko cztery wykazywały zdolność do katalizowania biotransformacji 1-tetralonu (**1**). Były to: *Rhodotorula marina* (AM77), *Rhodotorula rubra* (AM82), *Penicillium chermesinum* (AM113), *Penicillium frequentans* (AM359). Te szczepy wykorzystywałam w dalszych badaniach.

#### 4.3.1 Biotransformacje 1-tetralonu (**1**)

Tylko jeden spośród wyselekcjonowanych czterech szczepów (*Penicillium frequentans* AM359) posiadał zdolność utlenienia Baeyera-Villigera 1-tetralonu (**1**). W wyniku biotransformacji otrzymywałam siedmioczłonowy lakton (**2**). Dwa kolejne szczepy (*Rhodotorula marina* (AM77) i *Rhodotorula rubra* Tabela 9 (AM82) katalizowały redukcję ketonu do alkoholu (**25**) (Schemat 44).



Schemat 44.

Tabela 10. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 1-tetralonu (**1**).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %*	Produkt %		
			Lakton <b>2</b>	Alkohol <b>25</b>	
				%	% ee
<i>Rhodotorula marina</i> (AM77)	2	38	-	62	65 (R)
	4	30	-	70	64 (R)
	6	28	-	72	65 (R)
	8	32	-	68	66 (R)
	10	30	-	70	65 (R)
	12	35	-	65	62 (R)
<i>Rhodotorula rubra</i> (AM82)	<b>2</b>	<b>48</b>	-	<b>52</b>	99 (R)
	4	46	-	54	99 (R)
	6	40	-	60	96 (R)
	8	39	-	61	96 (R)
	10	39	-	61	96 (R)
	12	40	-	60	96 (R)
<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)	2	79	21	-	-
	4	67	33	-	-
	<b>6</b>	<b>22</b>	<b>78</b>	-	-
	8	15	85	-	-
	10	15	85	-	-
	12	18	82	-	-

Do biotransformacji na skalę preparatywną wybrałam szczep *Penicillium frequentans* (AM359). Dane z chromatogramów GC pokazywały, że stopień konwersji substratu po sześciu dniach

biotransformacji wynosi 78%. Po ośmiu dniach był nieco wyższy (85%), ale znacząco zwiększał się również udział metabolitów własnych mikroorganizmu w płynie pohodowlanym, utrudniając tym samym proces izolowania i zmniejszając jego wydajność. W związku z tym ustaliłam, że najwłaściwszy czas prowadzenia biotransformacji wynosi sześć dni.

W wyniku sześciodniowej biotransformacji na skalę preparatywną otrzymałam benzoksepan-2-on (**2**) z wydajnością 56%. Strukturę produktu ustaliłam na podstawie danych spektroskopowych, które okazały się zgodne z laktonem **2** otrzymanym na drodze syntezy chemicznej.

Pomimo, że głównym celem tej części badań było wyselekcjonowanie szczepów zdolnych do katalizowania reakcji Baeyera-Villigera prowadzącej do powstania  $\epsilon$ -laktonu, to jednak ze względu na wysoki nadmiar enancjomeryczny powstającego 1-tetralolu **25**, zdecydowałam się również na przeprowadzenie biotransformacji preparatywnej z udziałem szczepu *Rhodotorula rubra* (AM82).

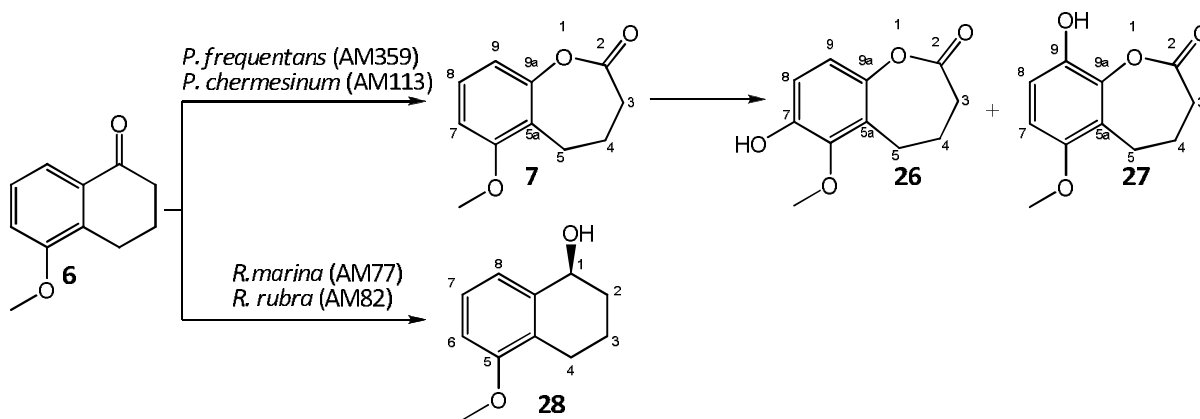
Wyniki biotransformacji wstępnej wskazywały, że po dwóch dniach procesu stopień przereagowania substratu wynosił 52%, a nadmiar enancjomeryczny powstającego produktu 99%. W kolejnych dniach obserwowałam niewielki wzrost stopnia przereagowania jednak zwiększał się udział drugiego enancjomeru. Uznałam zatem, że odpowiednim czasem prowadzenia biotransformacji na skalę preparatywną będą dwa dni. W wyniku transformacji otrzymałam (*R*)-1-tetralol (**25**) z wydajnością izolowaną 25%.

Strukturę produktu potwierdziłam analizując jego dane spektroskopowe i porównując je z danymi literaturowymi [126]. Redukcję grupy karbonylowej potwierdza obecność silnego pasma absorpcji pochodzącego od drgań rozciągających wiązania O-H przy  $3336\text{ cm}^{-1}$  na widmie IR oraz singlet przy 1.53 ppm pochodzący od protonu grupy hydroksylowej na widmie  $^1\text{H}$  NMR. Tryplet ( $J=7.6\text{ Hz}$ ) przy 4.92 ppm pochodzi protonu H-1. Przesunięcie w stronę niższego pola spowodowane jest sąsiedztwem grupy hydroksylowej w cząsteczce. Spośród sygnałów pochodzących od grup metylenowych, najbardziej odślaniany ( $\delta=2.67$ ) jest tryplet ( $J=5.9\text{ Hz}$ ) od grupy  $\text{CH}_2-4$ , położonej najbliżej pierścienia aromatycznego. Sygnały od pozostałych grup metylenowych występują na widmie  $^1\text{H}$  NMR w postaci dwóch multipletów przy 1.66-1.81 oraz 2.12-2.19 ppm. Protonom pierścienia aromatycznego odpowiada czteroprotonowy multiplet w zakresie 7.01-7.06 ppm.

Skręcalność właściwa uzyskanego produktu wynosi  $[\alpha]_D^{23} = -33.4^\circ$  (c 2.0,  $\text{CHCl}_3$ ). Literaturowa wartość skręcalności dla enancjomeru *R* wynosi  $[\alpha]_D^{22} = -34.9^\circ$ , (c 1.12,  $\text{CHCl}_3$ ) [127] a dla enancjomeru *S* przy nadmiarze enancjomerycznym 99%  $[\alpha]_D^{27} = +33.9^\circ$  [126]. Dane literaturowe wskazują jednoznacznie, że produktem przeprowadzonej przeze mnie biotransformacji jest (*R*)-1-tetralol (**25**).

#### 4.3.2 Biotransformacje 5-metoksy-1-tetralonu (**6**)

Spośród wyselekcjonowanych czterech szczepów, *Penicillium frequentans* (AM359) i *Penicillium chermesinum* (AM113) posiadały zdolność utlenienia typu Baeyera-Villigera 5-metoksy-1-tetralonu (**6**). Większą aktywnością cechował się szczep *P. frequentans* (AM359). W wyniku biotransformacji w kulturze tego szczepu otrzymałam siedmioczłonowy lakton – 6-metoksybenzoksepan-2-on (**7**) oraz dwa hydroksylaktony: 7-hydroksy-6-metoksybenzoksepan-2-on (**26**) i 9-hydroksy-6-metoksybenzoksepan-2-on (**27**), będące produktami hydroksylacji pierścienia aromatycznego (Schemat 48). Szczepy *Rhodotorula marina* (AM77) i *Rhodotorula rubra* (AM82) katalizowały redukcję ketonu **6** do alkoholu **28** (Schemat 45, Tabela 11)



Schemat 45.

Tabela 11. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 5-metoksy-1-tetralonu (**6**)

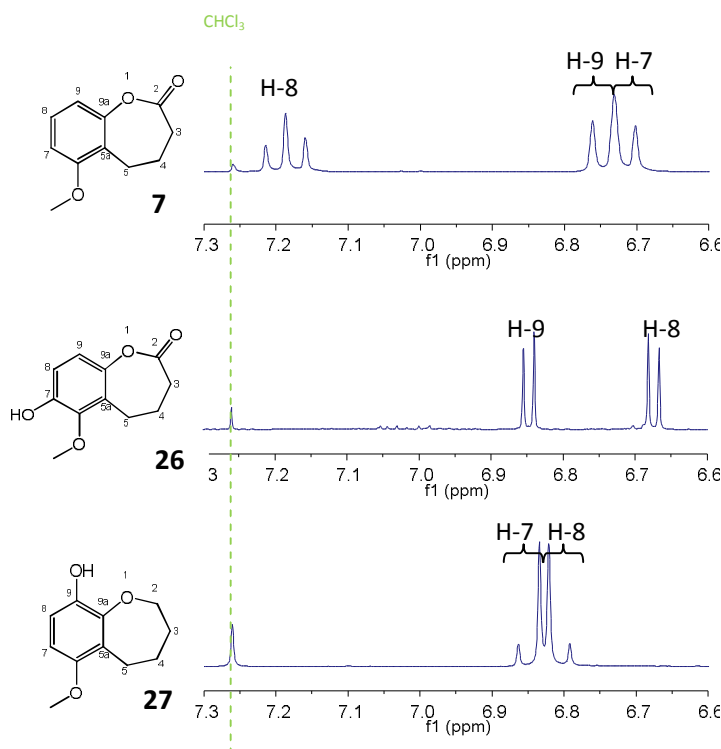
Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %				
			lakton <b>7</b>	lakton <b>26</b>	lakton <b>27</b>	alkohol <b>28</b>	
					alkohol <b>28</b>		
					%	% ee	
<i>Rhodotorula marina</i> (AM77)	2	97	-	-	-	3	99 (S)
	4	88	-	-	-	12	88 (S)
	6	54	-	-	-	46	86 (S)
	8	39	-	-	-	61	60 (S)
	10	40	-	-	-	60	49 (S)
	12	38	-	-	-	62	46 (S)
<i>Rhodotorula rubra</i> (AM82)	2	100	-	-	-	0	-
	4	100	-	-	-	0	-
	6	98	-	-	-	2	99 (S)
	8	96	-	-	-	4	99 (S)
	10	98	-	-	-	2	99 (S)
	12	96	-	-	-	4	99 (S)
<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)	2	100	0	0	-	-	-
	4	94	6	0	-	-	-
	6	94	6	0	-	-	-
	8	87	9	4	-	-	-
	10	85	8	7	-	-	-
	12	87	5	6	2	-	-
<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)	2	49	51	0	0	-	-
	4	43	43	12	2	-	-
	6	27	26	32	15	-	-
	8	25	30	29	16	-	-
	10	23	32	29	16	-	-
	12	23	31	30	16	-	-

Wyniki przebiegu biotransformacji z udziałem szczepu *Penicillium frequentans* (AM359) w czasie pokazały, że najpierw powstaje  $\epsilon$ -lakton (**7**), który następnie jest przekształcany do dwóch kolejnych produktów – hydroksylaktonów **26** i **27**.

W celu wyizolowania wszystkich trzech produktów zdecydowałam się na dwukrotne przeprowadzenie biotransformacji na skalę preparatywną. Za pierwszym razem wybrałam optymalny czas izolowania pierwszego produktu **7** - 2 dni. Po tym czasie nie obserwowałam jeszcze dwóch pozostałych produktów. Dane spektroskopowe okazały się zgodne z tymi otrzymanymi dla laktonu **7** uzyskanym na drodze syntezy chemicznej. Drugą biotransformację preparatywną prowadziłam przez sześć dni. Po rozdziale mieszaniny otrzymałam dwa kolejne produkty, których budowę ustaliłam na podstawie ich danych spektroskopowych.

Widma  $^1\text{H}$  NMR obu hydroksylaktonów w zakresie od 2.00 do 3.00 ppm wyglądają bardzo podobnie. W obu przypadkach widoczne są układy trzech sygnałów (kwintetu i dwóch trypletów o stałej sprzężenia  $J=7.2$  Hz) charakterystycznych dla protonów grup metylenowych pierścienia laktonowego benzoksepanonów. Na obu widmach widoczny jest także trzyprotonowy singlet pochodzący od protonów grupy metoksylowej (przy  $\delta=3.78$  dla hydroksylaktonu **26** oraz przy  $\delta=3.81$  dla hydroksylaktonu **27**). Przesunięcie chemiczne singletu pochodzącego od protonu grupy hydroksylowej wynosi 6.67 ppm dla hydroksylaktonu **26** i 5.55 ppm dla hydroksylaktonu **27**.

Część widma odpowiadająca sygnałom pochodzącym od protonów aromatycznych jest znacząco różna dla obu hydroksylaktonów (Rysunek 35).

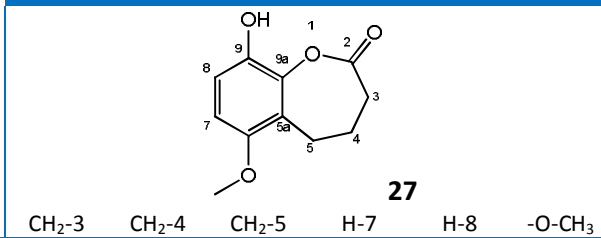


Rysunek 35. Fragmenty widm produktów biotransformacji 5-metoksytetralonu (**7**) odpowiadające sygnałom pochodzącym od protonów aromatycznych

W przypadku obu hydroksylaktonów wyraźnie widoczny jest wpływ grupy hydroksylowej obecnej w pierścieniu aromatycznym na przesunięcie chemiczne oraz multipletowość sygnałów od protonów aromatycznych. Na widmie laktonu **7** sygnał pochodzący od atomu H-8 jest trypletem ( $J=8.3$  Hz) położonym przy 7.19 ppm. Pojawienie się w cząsteczce laktonu **26** grupy hydroksylowej w pozycji *orto* w stosunku do tego atomu skutkowało po pierwsze: zmianą multipletowości sygnału pochodzącego od niego na dublet ( $J=8.9$  Hz), po drugie jego znacznym przesunięciem w kierunku wyższego pola ( $\delta=6.67$ ). Proton H-9 daje również dublet ( $J=8.9$  Hz) przy 6.85 ppm. Protony H-7 i H-8 hydroksylaktonu **27** tworzą układ AB i dają na widmie dwa dublety ( $J=8.8$  Hz) przy odpowiednio 6.85 i 6.81 ppm. Jednoznaczne przyporządkowanie sygnałów od protonów H-7 i H-8 było możliwe dopiero po przypisaniu wszystkich sygnałów na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR pochodzących od jąder atomów węgla tworzących pierścień aromatyczny cząsteczki. Przyporządkowanie ich umożliwiła mi analiza danych z widma HMBC (Tabela 12, Rysunek 36)..

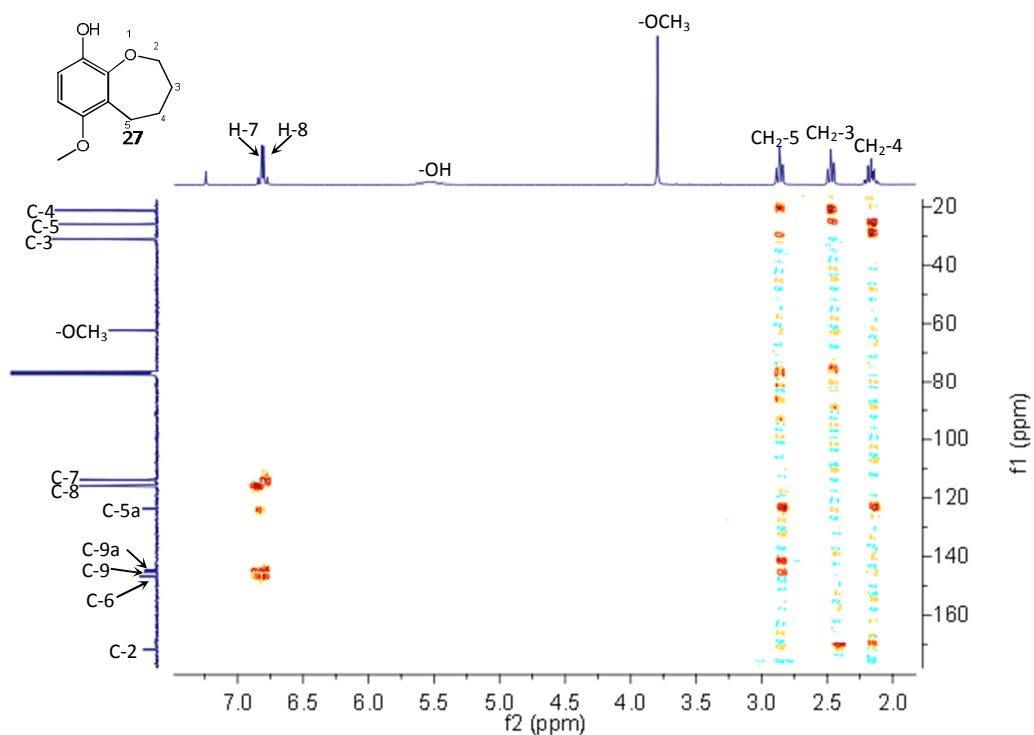
Na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR laktonu **27** widoczne są cztery sygnały o małej intensywności pochodzące od jąder czwartorzędowych atomów węgla. Spośród nich tylko jądro atomu C-5a ( $\delta=123.65$ ) sprzęga się z protonami grupy  $\text{CH}_2$ -4. Jądro atomu C-6 ( $\delta=146.76$ ) sprzęga się z protonami grupy  $\text{CH}_2$ -5 oraz protonami H-7 i H-8, jądro atomu C-9 ( $\delta=145.25$ ) z protonami H-7 i H-8, a jądro atomu C-9a ( $\delta=144.55$ ) z protonami grupy  $\text{CH}_2$ -5 oraz protonem H-8.

Tabela 12. Sprzężenia przez dwa i trzy wiązania pomiędzy jądrami atomów węgla i wodoru odczytane na widmie HMBC laktonu **27**



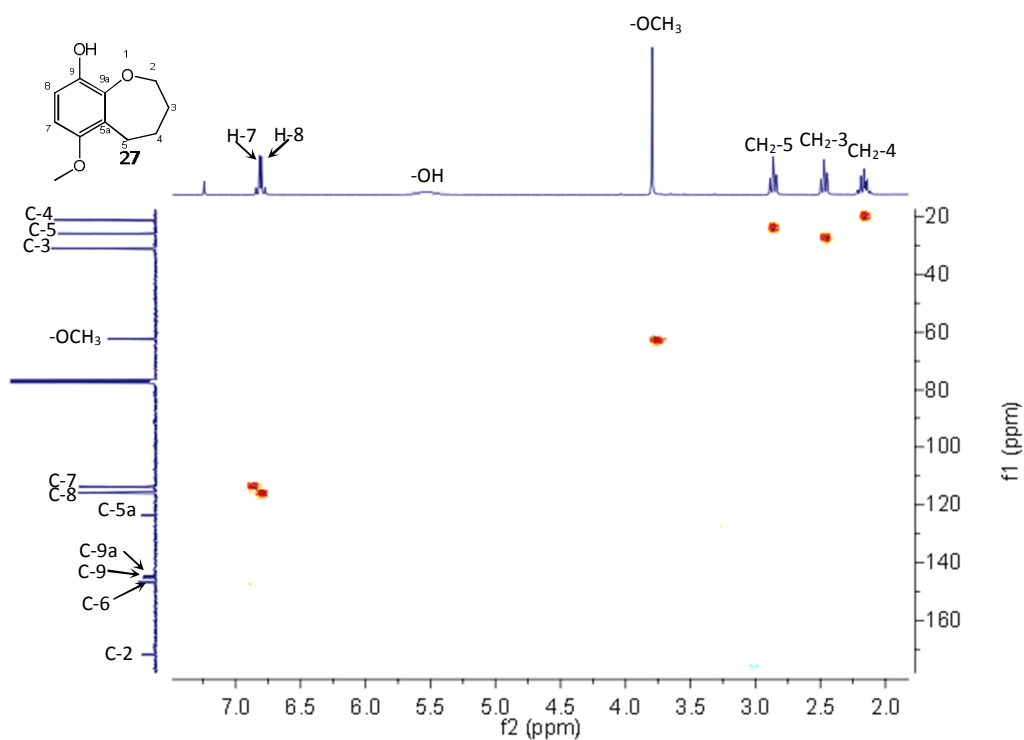
	CH <sub>2</sub> -3	CH <sub>2</sub> -4	CH <sub>2</sub> -5	H-7	H-8	-O-CH <sub>3</sub>
C-2	+	+	-	-	-	-
C-3	-	+	+	-	-	-
C-4	+	-	+	-	-	-
C-5	+	+	-	-	-	-
C-5a	-	+	+	+	-	-
C-6	-	-	+	+	+	-
C-7	-	-	-	-	+	-
C-8	-	-	-	+	-	-
C-9	-	-	-	+	+	-
C-9a	-	-	+	-	+	-
-O-CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-

Znak „+” oznacza obecność sprzężenia pomiędzy odpowiednimi atomami węgla i wodoru



Rysunek 36. Widmo HMBC hydroksylaktonu 27

Przyporządkowanie pozostałych sygnałów na widmie <sup>13</sup>C NMR odpowiednim atomom węgla umożliwiło mi widmo korelacyjne HMQC (Rysunek 37).



Rysunek 37. Widmo HMQC hydroksylaktonu 27

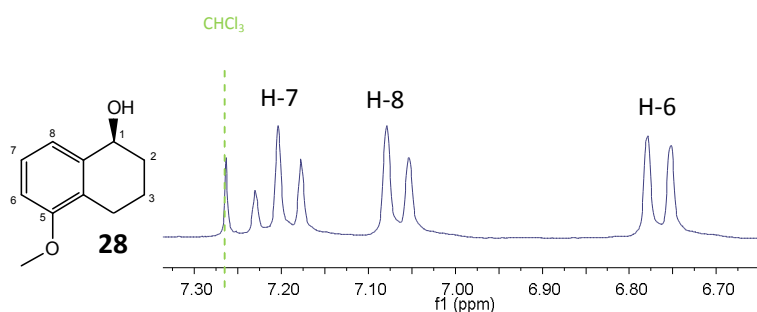


W wyniku biotransformacji preparatywnej 5-metoksy-1-tetralonu (**6**), w kulturze szczepu *Rhodotorula marina* (AM77), otrzymałam (S)-5-metoksy-1-tetralol **28** (Schemat 45)

Wyniki biotransformacji wstępnej wskazywały, że już po dwóch dniach powstawał produkt redukcji grupy karbonylowej z bardzo wysokim nadmiarem enancjomerycznym (99% *ee*) jednak stopień przereagowania był bardzo niski (3%). Wraz z postępowaniem reakcji spadał nadmiar enancjomeryczny powstającego produktu (Tabela 10). Analizując wyniki chiralnej chromatografii gazowej uznałam, że najbardziej optymalny czas biotransformacji wynosi 6 dni.

Strukturę produktu potwierdziłam analizując jego dane spektroskopowe i porównując je z danymi literaturowymi. Podobnie jak w doniesieniach literaturowych [128], część widma odpowiadająca sygnałom pochodzącym od protonów pierścienia cykloheksanu jest trudna do interpretacji. Sygnały opisałam jako cztery multiplety, gdyż nie udało mi się odczytać stałych sprzężenia w poszczególnych sygnałach. Multiplet pochodzący od protonu H-1 położony jest przy najniższym polu (4.77 ppm) ze względu na obecność grupy –OH przy tym samym atomie węgla (C-1).

O wiele czytelniej wygląda część widma odpowiadająca sygnałom pochodzącym od protonów pierścienia aromatycznego alkoholu **28**. (Rysunek 38)



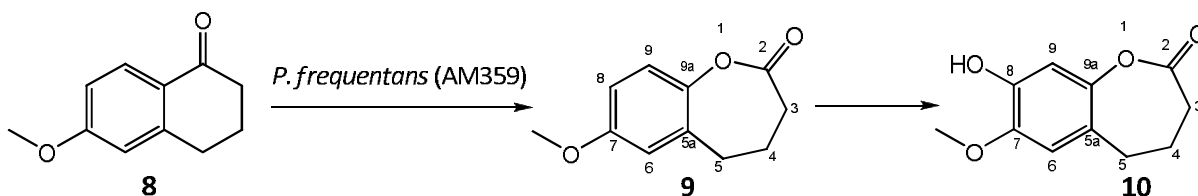
**Rysunek 38.** Część widma  $^1\text{H}$  NMR alkoholu **28** odpowiadająca sygnałom pochodzącym od protonów aromatycznych

Podobnie jak Ohkuma i wsp. [128], tryplet ( $J=7.9$  Hz) przy 7.20 ppm przypisałam protonowi H-7, dublet przy wyższym polu ( $\delta=6.76$ ) protonowi H-6, a dublet przy  $\delta=7.06$  protonowi H-8.

Skręcalność właściwa badanego produktu przy 86% nadmiarze enancjomerycznym wynosi  $[\alpha]_D^{23} = +11.9^\circ$  (c 1.2,  $\text{CHCl}_3$ ). Literaturowa wartość skręcalności dla enancjomeru *R* (98% *ee*) wynosi  $[\alpha]_D^{23} = -12.3^\circ$ , (c 1.2,  $\text{CHCl}_3$ ) [128], co wskazuje, że otrzymanym przeze mnie produktem jest (S)-5-metoksy-1-tetralol (**28**).

## 4.3.3 Biotransformacje 6-metoksy-1-tetralonu (8)

Zdolności do katalizowania reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera 6-metoksy-1-tetralonu (8) wykazywały dwa szczepy: *Penicillium chermesinum* (AM113) i *Penicillium frequentans* (AM359), spośród których efektywniejszy okazał się ten drugi (Tabela 13, Schemat 46). Po dwóch dniach jedynym produktem reakcji był 7-metoksybenzoksepan-2-on (9). W kolejnych dniach ulegał on hydroksylacji w pozycji C-8, w wyniku czego powstawał 8-hydrokso-7-metoksybenzoksepan-2-on (10).



Schemat 46.

Tabela 13. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 6-metoksy-1-tetralonu (8).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %			
			lakton 9	lakton 10	alkohol	
					%	% ee
<i>Rhodotorula rubra</i> (AM82)	2	100	-	-	0	-
	4	100	-	-	0	-
	6	98	-	-	2	86%
	8	94	-	-	6	60%
	10	94	-	-	6	63%
	12	93	-	-	7	58%
<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)	2	100	0	-	-	-
	4	79	19	2	-	-
	6	52	33	15	-	-
	8	50	35	15	-	-
	10	47	34	19	-	-
	12	43	32	25	-	-
<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)	2	28	72	0	-	-
	4	41	44	15	-	-
	6	27	36	37	-	-
	8	25	37	37	-	-
	10	23	40	37	-	-
	12	23	39	38	-	-

W celu wyizolowania obu produktów zdecydowałam się dwukrotnie przeprowadzić biotransformację na skalę preparatywną. Za pierwszym razem reakcję przerwałam po dwóch dniach, gdy jedynym produktem był lakton **9** (wyd. 51%). Drugą biotransformację przerwałam po sześciu dniach skupiając się głównie na wyizolowaniu hydroksylaktonu **10** (wyd. 21%). Strukturę obu produktów określiłam na podstawie widm  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR oraz IR, które okazały się identyczne z opisanymi wcześniej widmami tych związków otrzymanych na drodze syntezy chemicznej.

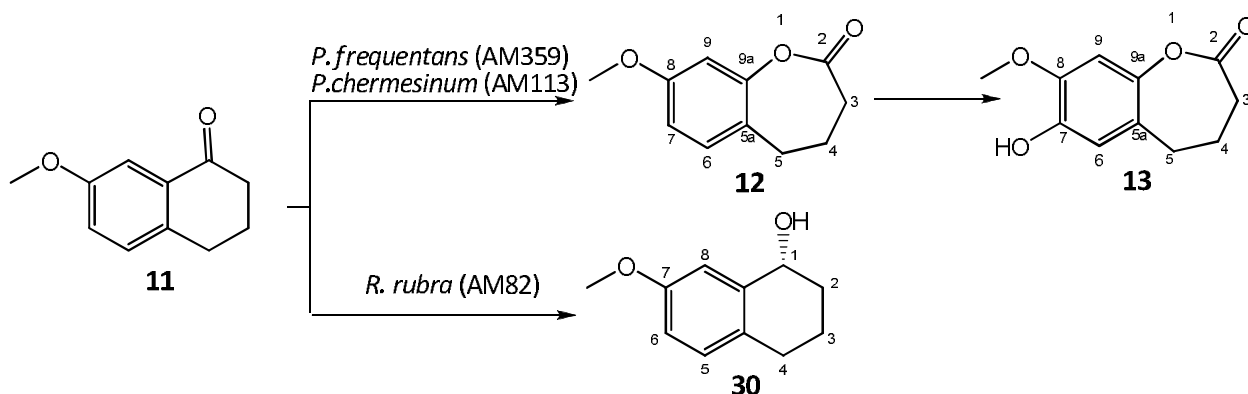
W kulturze szczepu *R. rubra* (AM82) 6-metoksy-1-tetralon (**8**) uległ redukcji do 6-metoksy-1-tetralolu (**29**). Mała efektywność tej reakcji i stosunkowo niewielki nadmiar enancjomeryczny spowodowały, że nie przeprowadziłam biotransformacji preparatywnej.

#### 4.3.4 Biotransformacje 7-metoksy-1-tetralonu (**11**)

Podobnie jak w przypadku ketonu **8**, również w przypadku 7-metoksy-1-tetralonu (**11**), zdolności do katalizowania reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera 6-metoksy-1-tetralonu wykazywały dwa szczepy: *Penicillium chermesinum* (AM113) i *Penicillium frequentans* AM359. Bardziej efektywny okazał się ten drugi. Po sześciu dniach jedynym produktem reakcji był 8-metoksybenzoksepan-2-on (**12**). W kolejnych dniach ulegał on hydroksylacji w pozycji C-7, w wyniku czego powstawał 7-hydroksy-8-metoksybenzoksepan-2-on (**13**). Szczep *Rhodotorula rubra* (AM82) katalizował redukcję grupy karbonylowej (Schemat 47, Tabela 14).

W wyniku dwóch niezależnych biotransformacji prowadzonych na skalę preparatywną wykorzystujących szczep *Penicillium frequentans* (AM359) jako biokatalizator, wyizolowałam oba produkty. Sześciodniowa biotransformacja prowadziła do powstania 8-metoksybenzoksepan-2-onu **12** z wydajnością 52%. Drugą biotransformację kończyłam po dwunastu dniach. W jej wyniku uzyskałam dwa produkty: lakton **12** (wyd. 11%) oraz hydroksylakton **13** (wyd. 15%). Strukturę obu produktów określiłam na podstawie widm  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR oraz IR, poprzez porównanie ich z wzorcami uzyskanymi na drodze syntezy chemicznej.

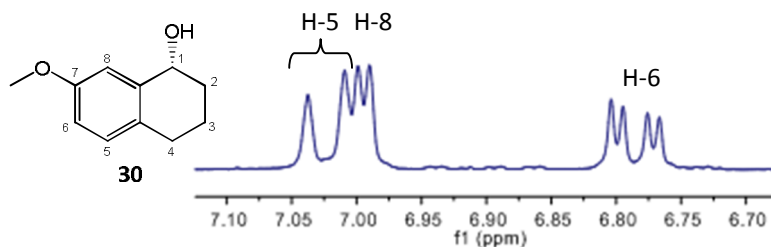
Biotransformacja preparatywna 7-metoksy-1-tetralonu (**11**), w której katalizatorem był szczep drożdży *Rhodotorula rubra* (AM82), dostarczyła (R)-7-metoksy-1-tetralolu (**30**) (Schemat 47). Wyniki chiralnej chromatografii gazowej próbek pochodzących z biotransformacji wstępnej wskazywały, że już po dwóch dniach powstawał produkt redukcji grupy karbonylowej z niewielkim nadmiarem enancjomerycznym ( $ee=36\%$ ) (Tabela 14). Przeprowadziłam biotransformację preparatywną trwającą dwa dni, w wyniku czego otrzymałam produkt redukcji grupy karbonylowej z wydajnością 22%. Strukturę produktu potwierdziłam analizując jego dane spektroskopowe i porównując je z danymi literaturowymi [129].

Tabela 14. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 7-metoksy-1-tetralonu (**11**).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %			
			lakton <b>12</b>	lakton <b>13</b>	alkohol <b>30</b>	
					%	% ee
<i>Rhodotorula rubra</i> (AM82)	2	67	-	-	33	36 (R)
	4	65	-	-	35	35 (R)
	6	66	-	-	34	35 (R)
	8	65	-	-	35	33 (R)
	10	58	-	-	42	27 (R)
	12	59	-	-	41	26 (R)
<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)	2	100	0	-	-	-
	4	79	19	2	-	-
	6	52	33	15	-	-
	8	50	35	15	-	-
	10	47	34	19	-	-
	12	43	32	25	-	-
<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)	2	93	7	0	-	-
	4	89	11	0	-	-
	6	27	73	0	-	-
	8	22	71	7	-	-
	10	17	45	38	-	-
	12	17	39	44	-	-

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR przy 7-metoksy-1-tetralolu (**30**) 1.65 ppm widoczny jest jednoprotonowy singlet pochodzący od protonu  $-\text{OH}$ . Tryplet ( $J=5.0$  Hz) od protonu H-1 jest przesunięty w stronę niższego pola ( $\delta=4.75$ ), co spowodowane jest silnym efektem odsłaniającym grupy  $-\text{OH}$ . Protonom grup metylenowych  $\text{CH}_2\text{-2}$  i  $\text{CH}_2\text{-3}$  odpowiadają multiplety położone w zakresie 1.71-2.06 ppm. Multiplety od protonów grupy metylenowej  $\text{CH}_2\text{-4}$  przesunięte są w stronę niższego pola (2.61-2.81 ppm). Wartość przesunięcia chemicznego trzyprotonowego singletu pochodzącego od protonów grupy metoksylowej wynosi 3.80 ppm. Sygnały odpowiadające protonom pierścienia aromatycznego można jednoznacznie przypisać na podstawie ich multipletowości (Rysunek 39). Przy 6.79 ppm położony jest dublet dubletów ( $J= 8.4$  i  $2.7$  Hz). Krtotność rozczepienia wskazuje, że w jego otoczeniu

położone są dwa nierównocenne atomy wodoru, pochodzi on zatem od protonu H-6. Większa stała sprzężenia odpowiada sprzężeniu z sąsiednim protonem H-5, a mniejsza z oddalonym o cztery wiązania jądrem atomu H-8. Identyczne stałe sprzężenia można odnaleźć analizując pozostałe sygnały na widmie  $^1\text{H}$  NMR. Dublet ( $J=2.7$  Hz) położony przy 6.99 ppm pochodzi od protonu H-8, a dublet ( $J=8.4$  Hz) przy 7.02 ppm od protonu H-5.

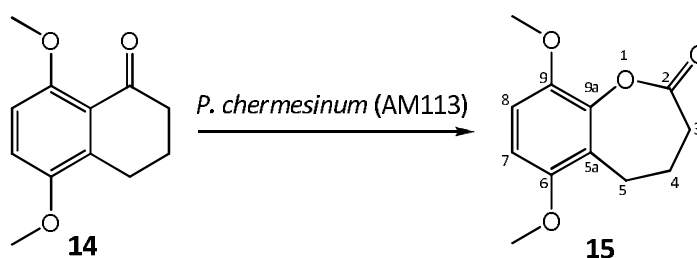


**Rysunek 39.** Część widma  $^1\text{H}$  NMR 7-metoksy-1-tetralolu **30** odpowiadająca sygnałom pochodzącym od protonów aromatycznych

Skręcalność właściwa uzyskanego produktu przy 36% nadmiarze enancjomerycznym wynosi  $[\alpha]_D^{23} = +11.9^\circ$  (c 1.2,  $\text{CHCl}_3$ ). Literaturowa wartość skręcalności enancjomeru *R* przy 99% nadmiarze enancjomerycznym wynosi  $[\alpha]_D^{23} = -45.4$ , (c 1.5,  $\text{CHCl}_3$ ) [129], co wskazuje, że otrzymanym przede wszystkim produktem jest 7-metoksy-1-tetralol (**30**) z przewagą enancjomeru *R*.

#### 4.3.5 Biotransformacje 5,8-dimetoksy-1-tetralonu (**14**)

Zdolność do katalizowania reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera 5,8-dimetoksy-1-tetralonu (**14**) do 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-onu (**15**) wykazywały dwa szczepy: *Penicillium chermesinum* (AM113) i *Penicillium frequentans* (AM359) (Schemat 48). Stopień przereagowania w obu przypadkach był niewielki. Nieco wyższy był on w biotransformacji katalizowanej szczepem *P. chermesinum* (AM113) (Tabela 15). Czas dwunastu dni uznałam za najbardziej optymalny do przeprowadzenia biotransformacji w kulturze tego szczepu na skalę preparatywną. Po tym czasie jedynym produktem reakcji był 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-on (**15**). Wydajność izolowana wyniosła 18%. Strukturę produktu ustalono poprzez porównanie jego danych spektroskopowych z danymi związku otrzymanego w wyniku syntezy chemicznej.



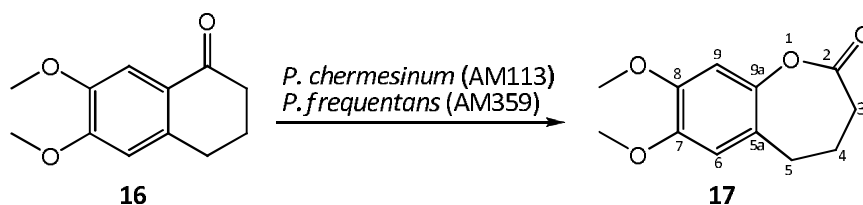
Schemat 48.

Tabela 15. Skład (% wg GC) mieszaniny w trakcie biotransformacji 5,8-dimetoksy-1-tetralonu (**14**).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt % lakton <b>15</b>
<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)	2	100	0
	4	100	0
	6	100	0
	8	82	18
	10	80	20
	<b>12</b>	<b>77</b>	<b>23</b>
<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)	2	100	0
	4	100	0
	6	100	0
	8	100	0
	10	94	6
	12	89	11

#### 4.3.6 Biotransformacje 6,7-dimetoksy-1-tetralonu (**16**)

Podobnie jak w przypadku poprzednio opisanego dimetoksytetralonu, zdolność do katalizowania reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera 6,7-dimetoksy-1-tetralonu (**16**) wykazywały dwa szczepy: *Penicillium chermesinum* (AM113) i *Penicillium frequentans* (AM359), z których efektywniejszy okazał się *P. chermesinum* (AM113). Po ośmiu dniach stopień przereagowania wynosił 26% a w kolejnych dniach biotransformacji nie następował jego istotny wzrost. Biotransformację preparatywną przerwałam po dziewięciu dniach (Tabela 16). W wyniku procesu izolowania otrzymałam 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-on (**17**) z wydajnością 21% jako jedyny produkt biotransformacji. Również w tym przypadku strukturę produktu ustaliłam poprzez porównanie jego danych spektroskopowych z danymi wzorca otrzymanego na drodze syntezy chemicznej.



Schemat 49.

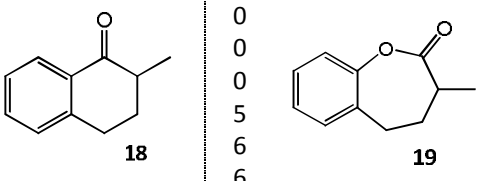
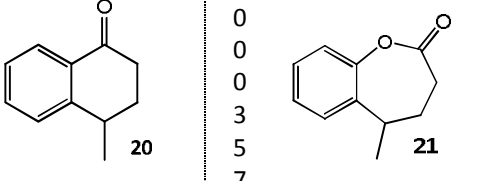
Tabela 16. Skład (% wg GC) mieszaniny w trakcie biotransformacji 6,7-dimetoksy-1-tetralonu (**16**).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt % lakton <b>17</b>
<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)	2	100	0
	4	100	0
	6	91	9
	<b>8</b>	<b>74</b>	<b>26</b>
	10	73	27
	12	73	27
<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)	2	100	0
	4	100	0
	6	100	0
	8	92	8
	10	93	7
	12	91	9

#### 4.3.7 Biotransformacje 2-metylo-1-tetralonu (**18**) i 4-metylo-1-tetralonu (**20**)

W przypadku obydwu metylo pochodnych 1-tetralonu (**18** i **20**) jedynie szczep *Penicillium frequentans* (AM359) był zdolny do ich transformacji, lecz stopień konwersji był bardzo niewielki (odpowiednio 6% i 7%), co uniemożliwiło przeprowadzenie transformacji na skalę preparatywną (Tabela 17). Na podstawie wyników chromatografii gazowej, poprzez porównanie czasów retencji z czasami wzorców otrzymanych drogą syntezy chemicznej ustaliłam, że produktami reakcji były odpowiednie  $\epsilon$ -laktony **19** i **21**. Dodatkowo próbki poddałam analizie za pomocą chiralnej chromatografii gazowej. Analiza ta wykazała, że transformacja nie przebiega w sposób enancjoselektywny. W obu przypadkach powstawały mieszaniny racemiczne produktów.

**Tabela 17.** Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 2-metylo-1-tetralonu (**18**) i 4-metylo-1-tetralonu (**20**) w kulturze szczepu *Penicillium frequentans* (AM359)

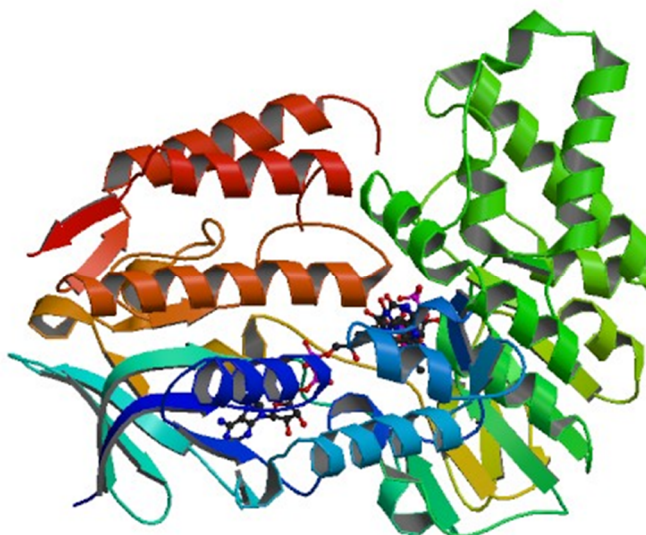
Czas [dni]	Skład mieszaniny reakcyjnej [%]	
	Substrat	produkt
2	100	0
4	100	0
6	100	0
8	95	5
10	94	6
12	94	6
		
2	100	0
4	100	0
6	100	0
8	97	3
10	95	5
12	93	7
		

#### 4.3.8 Biotransformacje 1-tetralonu (**1**) i jego mono- i dimetoksypochodnych z zastosowaniem monooksygenazy cykloheksanonu z *Acinetobacter sp.* rekombinowanej w *E. coli*

Celem tej części badań było sprawdzenie, czy możliwe jest uzyskanie  $\epsilon$ -laktonów skondensowanych z pierścieniem aromatycznym na drodze biotransformacji z zastosowaniem komercyjnie dostępnego preparatu enzymatycznego.

Za enzymatyczne utlenianie ketonów do estrów (laktonów) w reakcji Baeyera-Villigera, odpowiedzialne są monooksygenazy Baeyera-Villigera (BVMOs). Enzymy te należą do monooksygenaz flawinowych, silnie związanych z kofaktorem FAD i wymagających koenzymu: zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego NADPH. Kodowane są przez pojedynczy gen i zbudowane z dwóch podjednostek. Pierwszą opisaną monooksygenazą należącą do tej grupy była monooksygenaza cykloheksanonu (EC 1.14.13.22), wyizolowana z *Acinetobacter sp.* NCIB 9871 [130, 131] (Rysunek 40). Badania wykazały, że enzym ten jest zdolny do utleniania szerokiej gamy ketonów z wysoką chemio-, regio- i enancjoselektywnością [132, 133]. Rios-Martínez i wsp. [135] w celu przeprowadzenia enzymatycznego utlenienia Baeyera-Villigera cyklicznych ketonów ze skondensowanym pierścieniem aromatycznym, przetestowali trzy monooksygenazy: rekombinowaną monooksygenazę fenyloacetony (PAMO), jej zmutowany wariant M446G (M-PAMO) oraz rekombinowaną monooksygenazę 4-hydroksyacetofenonu (HAPMO). Spośród tych trzech enzymów tylko HAPMO była zdolna do katalizowania reakcji utlenienia 1-tetralonu (**1**). Ze względu na słabą rozpuszczalność substratu w wodzie, zastosowano 5% dodatek różnych rozpuszczalników organicznych do buforu Tris-HCl (pH 9.0), stanowiącego medium reakcji. Najwyższy stopień konwersji (26 %) uzyskano dodając do medium toluen.



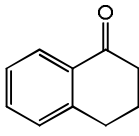
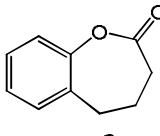
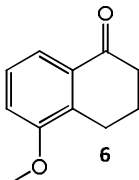
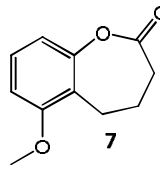
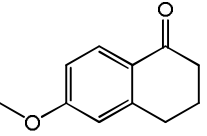
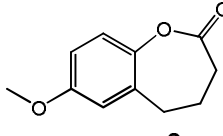
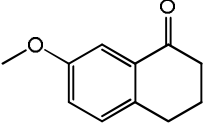
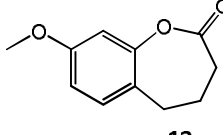
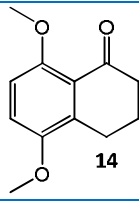
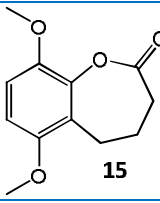
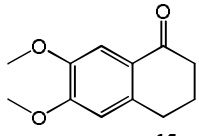
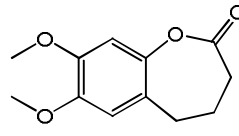


**Rysunek 40.** Model monooksygenazy cykloheksanonu wyizolowanej z *Acinetobacter sp.* (EC 1.14.13.22) [134]

Do moich doświadczeń wybrałam monooksygenazę cykloheksanonu z *Acinetobacter sp.* rekombinowaną w *E. coli*, produkowaną przez firmę Fluka oraz NADPH jako koenzym. Substratami były: 1-tetralon (**1**), 5-metoksy-1-tetralon (**6**), 6-metoksy-1-tetralon (**8**), 7-metoksy-1-tetralon (**11**), 5,8-dimetoksy-1-tetralon (**14**) i 6,7-dimetoksy-1-tetralon (**16**). Jako medium reakcji zastosowałam bufor glicynowy (pH 9.0) z 5% dodatkiem toluenu w celu zwiększenia rozpuszczalności substratów. W celu sprawdzenia stabilności substratów w środowisku reakcji, wykonałam dodatkowe próby kontrolne. W tym przypadku w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: bufor glicynowy z 5% dodatkiem toluenu, koenzym NADPH oraz substrat. Zgodnie z przypuszczeniami wszystkie ketony były stabilne w tych warunkach reakcji. Wyniki biotransformacji przedstawia tabela 18. Strukturę produktów reakcji ustalono poprzez porównanie czasów retencji GC z czasami wzorców otrzymanych drogą syntezy chemicznej.

Wyniki biotransformacji wstępnej pokazują, że zastosowana przeze mnie monooksygenaza cykloheksanonu z *Acinetobacter sp.* rekombinowana w *E. coli* nie jest wystarczająco efektywnym katalizatorem reakcji Baeyera-Villigera 1-tetralonu (**1**) i jego mono- (**6**, **8**, **11**) i dimetoksy- (**14**, **16**) pochodnych (Tabela 18). Dlatego nie zdecydowałam się na przeprowadzenie transformacji na skale preparatywnej. Lepsze wyniki można uzyskać stosując jako katalizator hodowle całych komórek wybranych szczepów grzybów strzępkowych z rodzaju *Penicillium*. Ponadto biotransformacje z wykorzystaniem enzymów wymagających regeneracji kofaktorów są znacznie bardziej kosztowne.

Tabela 18. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie enzymatycznej transformacji wybranych pochodnych 1-tetralonu.

Czas [godz.]	Skład mieszaniny reakcyjnej [%]	
	Substrat	produkt
2	100	0
24	100	0
48	96	4
96	89	11
120	89	11
		
	<b>1</b>	<b>2</b>
2	100	0
24	100	0
48	98	2
96	95	5
120	91	9
		
	<b>6</b>	<b>7</b>
2	100	0
24	100	0
48	100	0
96	96	6
120	92	8
		
	<b>8</b>	<b>9</b>
2	100	0
24	100	0
48	98	2
96	93	7
120	92	8
		
	<b>11</b>	<b>12</b>
2	100	0
24	98	2
48	97	3
96	95	5
120	95	5
		
	<b>14</b>	<b>15</b>
2	100	0
24	100	0
48	97	3
96	96	4
120	95	5
		
	<b>16</b>	<b>17</b>

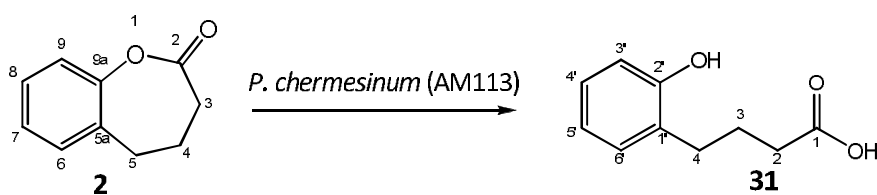
#### 4.4 Biotransformacje pochodnych benzoksepan-2-onu

Celem tej części badań było znalezienie szczepów grzybów strzępkowych zdolnych do prowadzenia mikrobiologicznej hydroksylacji pierścienia aromatycznego. Substratami biotransformacji były otrzymane na drodze chemicznego utlenienia typu Baeyera-Villigera pochodne benzoksepan-2-onu.

Biotransformację skriningową prowadziłam dla dwudziestu czterech szczepów mikroorganizmów (Tabela 8), dla wszystkich substratów, aby sprawdzić czy szczepy, które nie wykazywały zdolności do katalizowania reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera, posiadają zdolność transformacji  $\epsilon$ -laktonów. Hodowle całych komórek inkubowano w temperaturze pokojowej na podłożu Sabourauda na wytrząsarkach rotacyjnych. Przebieg procesów monitorowałam standardowymi technikami (GC i TLC).

##### 4.4.1 Biotransformacje benzoksepan-2-onu (2)

Spośród badanych szczepów tylko dwa posiadały zdolność transformacji benzoksepan-2-onu: *Penicillium chermesinum* (AM113) i *Penicillium chrysogenum* (AM112). Spośród nich większą aktywnością cechował się szczep *P. chermesinum* (AM113) (Tabela 19). Godny uwagi jest fakt, iż szczep ten nie wykazywał zdolności do katalizowania utlenienia Baeyera-Villigera.



Schemat 50.

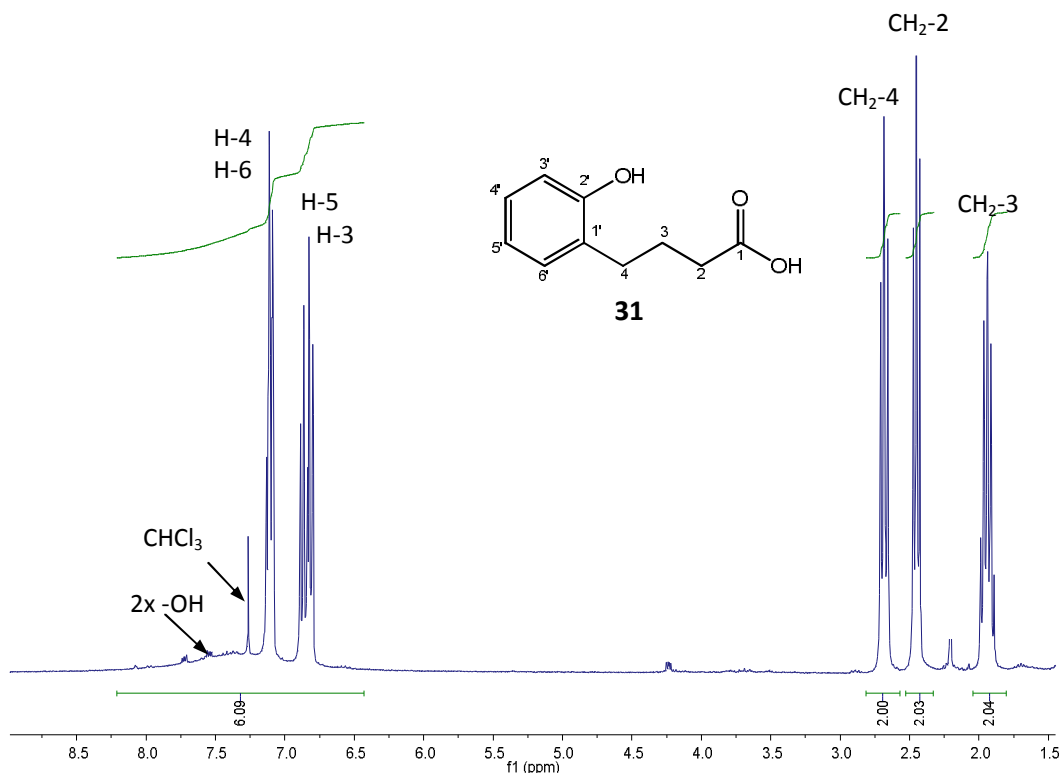
Tabela 19. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji benzoksepan-2-onu (2).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt % kwas 31
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)	2	100	0
	4	100	0
	6	84	16
	8	81	19
	10	69	31
	12	67	33
<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)	2	100	0
	4	100	0
	6	77	23
	8	54	46
	10	21	79
	12	6	94

Do przeprowadzenia biotransformacji na skalę preparatywną wybrałam szczep *Penicillium chermesinum* (AM113). Proces prowadziłam 12 dni. Otrzymałam czysty kwas 4-(2-hydroksy-fenyl)masłowy (**31**) z wydajnością 36% (Schemat 50).

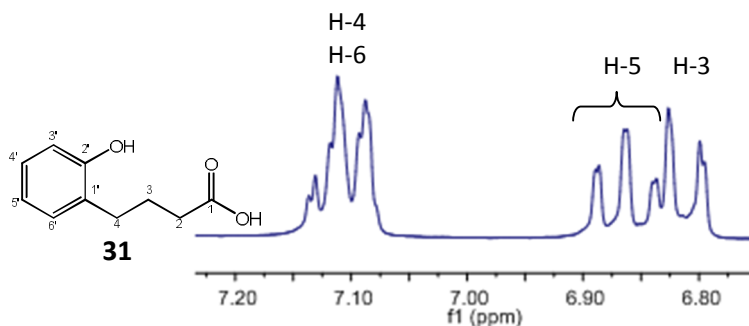
Strukturę produktu ustaliłam na podstawie jego danych spektroskopowych. Potwierdzeniem, że otrzymany produkt jest hydroksykwasem jest silne, szerokie pasmo absorpcji w zakresie 2500-3600  $\text{cm}^{-1}$  na widmie IR. Na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR widoczny jest sygnał pochodzący od karboksylowego atomu węgla C-1 ( $\delta=180.31$ ) a także sygnał od atomu węgla bezpośrednio związanego z grupą hydroksylową C-2' ( $\delta=153.96$ ).

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR (Rysunek 41) sygnały pochodzące od protonów grup hydroksylowych cząsteczki nie są widoczne „na pierwszy rzut oka”. Dopiero obraz całej linii podstawowej pozwala zaobserwować szeroki sygnał o niewielkiej intensywności w zakresie 6.5 do 8.5 ppm. Integracja tego fragmentu widma wskazuje, że w jego obrębie znajdują się sygnały od sześciu protonów. Cztery z nich są sygnałami pochodzącymi od protonów pierścienia aromatycznego. Dwa pozostałe przypisałam protonom grup -OH.



Rysunek 41. Widmo  $^1\text{H}$  NMR hydroksykwasu **31**

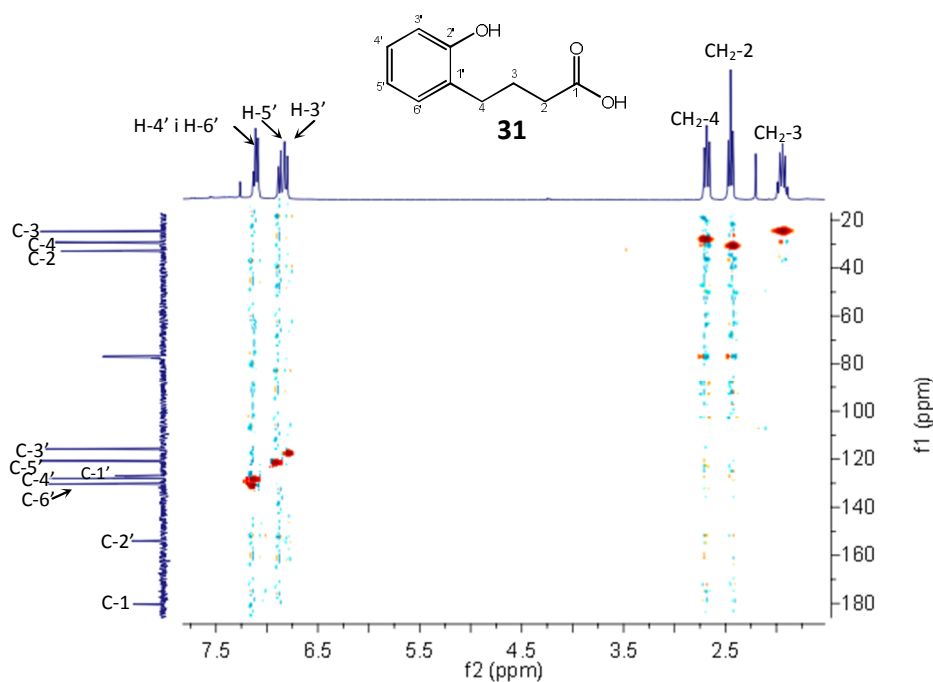
Na widmie  $^1\text{H}$  NMR widoczne są trzy dwuprotonowe sygnały o takich samych stałych sprzężenia ( $J=6.9$  Hz), pochodzące od protonów grup metylenowych. Kwintet przy 1.93 ppm przyporządkowałam protonom grupy  $\text{CH}_2$ -3, tryplet przy 2.45 ppm protonom grupy  $\text{CH}_2$ -2, a tryplet przy 2.68 ppm protonom grupy  $\text{CH}_2$ -4. W zakresie widma odpowiadającym sygnałom pochodzącym od protonów pierścienia aromatycznego widoczne są trzy sygnały (Rysunek 42).



**Rysunek 42.** Fragment widma hydroksykwasu **31** odpowiadający sygnałom pochodzącym od protonów aromatycznych

Przy 6.81 ppm położony jest dublet dubletów ( $J=8.1$  i  $1.0$  Hz) pochodzący od protonu  $\text{H}-3'$ . Sygnał ten jest przesunięty w kierunku wyższego pola, co spowodowane jest obecnością grupy  $-\text{OH}$  w pozycji *orto* względem protonu  $\text{H}-3'$ . Większa stała sprzężenia jest wynikiem sprzęgania z protonem  $\text{H}-4'$ , a mniejsza sprzęgania z protonem  $\text{H}-5'$ . Przy 6.86 ppm widoczny jest tryplet dubletów ( $J=7.7$  i  $1.0$  Hz). Sygnał ten przyporządkowałam protonowi  $\text{H}-5'$ . Krotność rozszczepienia i wartości stałych sprzężenia wskazują, na obecność dwóch protonów przy sąsiednich atomach węgla ( $J=7.7$  Hz) oraz jednego protonu znajdującego się w pozycji *meta* ( $J=1.0$  Hz). W Zakresie 7.00-7.22 ppm znajdują się sygnały pochodzące od protonów  $\text{H}-4'$  i  $\text{H}-6'$ . Sygnały na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR przypisałam dzięki danym z widma korelacyjnego HMQC (Rysunek 43).

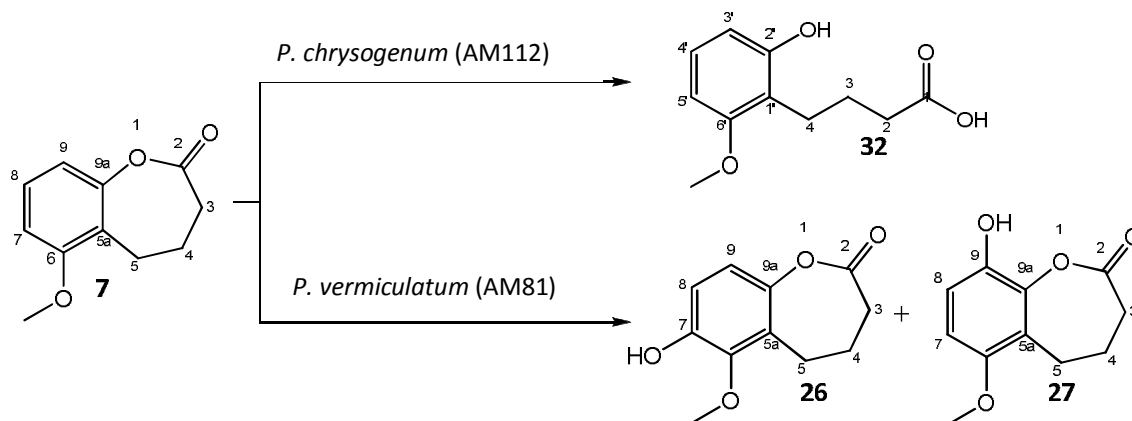
Hydrolizę pierścienia laktonowego mogło wywoływać środowisko biotransformacji. Wymagało zatem sprawdzenia, czy otrzymany hydroksykwas **31** jest rzeczywiście produktem biotransformacji, czy też hydroliza pierścienia następuje samoistnie, pod wpływem środowiska. W tym celu przeprowadziłam próby kontrolne stabilności substratu w zakresie od  $\text{pH}=7.0$  (początek biotransformacji) do  $\text{pH}=8.8$  (koniec biotransformacji). Próby te potwierdziły, że substrat jest stabilny w tym zakresie  $\text{pH}$  po wprowadzeniu do pożywki Sabourauda. Wyniki te wskazują, że hydroliza  $\epsilon$ -laktonu jest katalizowana przez układ enzymatyczny mikroorganizmu.

Rysunek 43. Widmo HMQC hydroksykwasu **31**

#### 4.4.2 Biotransformacje 6-metoksybenzoksepan-2-onu (**7**)

Spośród badanych szczepów tylko dwa posiadały zdolność transformacji 6-metoksybenzoksepan-2-onu (**7**). Szczep *Penicillium chrysogenum* (AM112) katalizował hydrolizę pierścienia laktonowego. (Tabela 20), natomiast szczep *Penicillium vermiculatum* (AM81) hydroksylował pierścień benzenowy przy atomach węgla C-7 i C-9 (Schemat 51).

Biotransformacja 6-metoksybenzoksepan-2-onu (**7**) na skalę preparatywną katalizowana *Penicillium chrysogenum* (AM112) trwała cztery dni. Po tym czasie wyizolowano kwas 4-(2-hydroksy-6-metoksyfenylo)masłowy (**32**) z wydajnością izolowaną 87%. Strukturę produktu ustaliłam na podstawie widm IR,  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR.



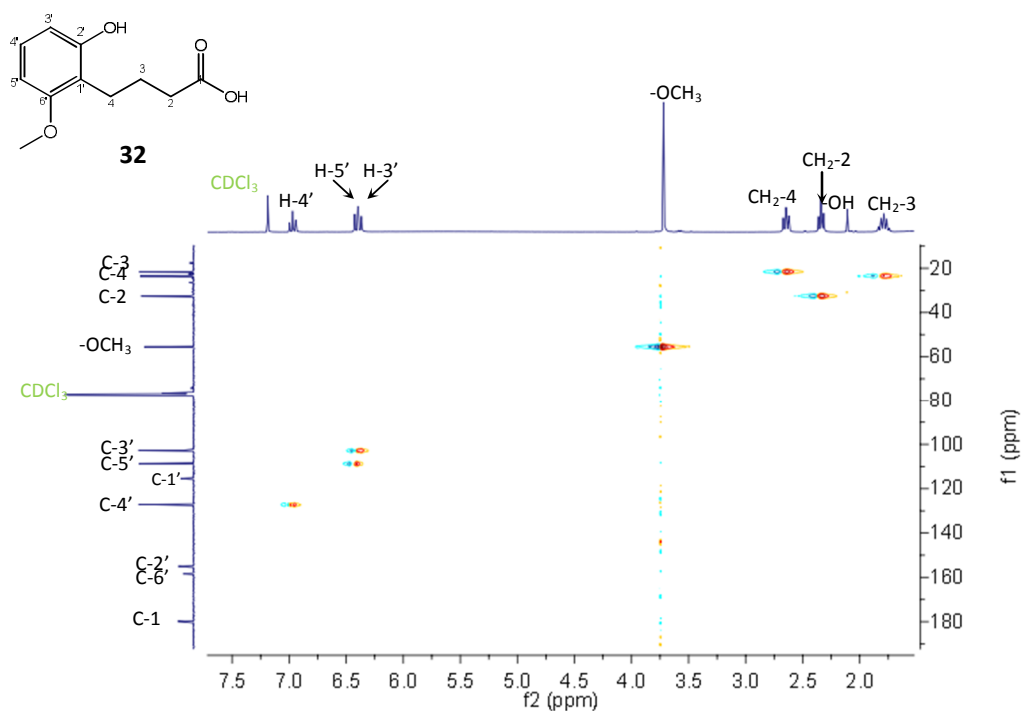
Schemat 51.

Tabela 20. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 6-metoksybenzoksepan-2-onu (7).

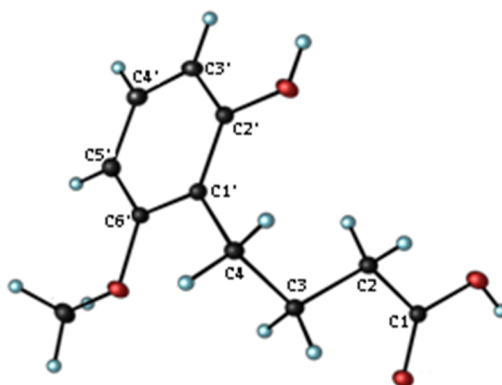
Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %		
			hydroksylakton 26	hydroksylakton 27	kwas 32
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)	2	36	-	-	64
	4	0	-	-	100
	6	0	-	-	100
	8	0	-	-	100
	10	0	-	-	100
	12	0	-	-	100
<i>Penicillium vermiculatum</i> (AM81)	2	54	32	14	-
	4	2	75	23	-
	6	0	76	24	-
	8	0	75	25	-
	10	0	75	25	-
	12	0	74	26	-

Na widmie IR widoczne jest szerokie, intensywne pasmo absorpcji w zakresie 2550-3600  $\text{cm}^{-1}$ . Na widmie  $^1\text{H}$  NMR wyróżnić można trzy dwuprotonowe multiplety pochodzące od protonów grup metylenowych. Tryplet o stałej sprzężenia  $J=6.8$  Hz, położony przy wyższym polu ( $\delta=2.41$ ) przyporządkowałam protonom grupy  $\text{CH}_2-2$ , a tryplet o stałej sprzężenia  $J=7.4$  Hz, położony przy niższym polu ( $\delta=2.72$ ) protonom grupy  $\text{CH}_2-4$ . Protony grupy  $\text{CH}_2-3$  dają sygnał w postaci multipletu, o kształcie zbliżonym do kwintetu, położony w zakresie 1.79-1.94 ppm. Tryprotonowy singlet położony przy 3.79 ppm pochodzi od protonów grupy metoksylowej.

W zakresie odpowiadającym sygnałom pochodzącym od protonów pierścienia aromatycznego położone są trzy sygnały: dwa częściowo nałożone na siebie dublety o jednakowej stałej sprzężenia  $J=8.5$  Hz przy 6.38 i 6.41 ppm pochodzące odpowiednio od protonów H-3' i H-5' oraz jednoprotonowy tryplet ( $J=8.5$  Hz) przy 7.04 ppm pochodzący od protonu H-4'. Przypisanie sygnałów odpowiednim atomom węgla na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR było możliwe dzięki widmu HMQC (Rysunek 44).

Rysunek 44. Widmo HMQC hydroksykwasu **32**

Ostatecznym potwierdzeniem budowy produktu biotransformacji 6-metoksybenzoksepan-2-onu była struktura krystaliczna produktu (Rysunek 45).

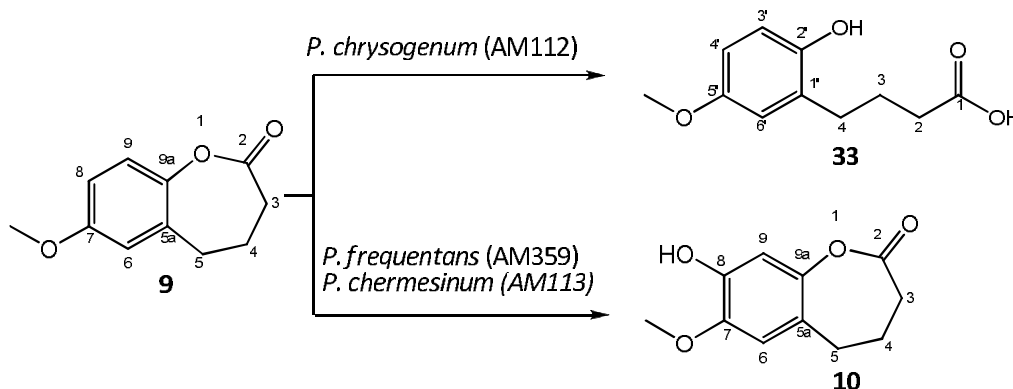
Rysunek 45. Struktura krystaliczna hydroksykwasu **32**

W wyniku czterodniowej biotransformacji 6-metoksybenzoksepan-2-onu w kulturze szczepu *Penicillium vermiculatum* (AM81) otrzymałam dwa hydroksylaktony **26** (wyd. 47%) i **27** (wyd. 28%). Są to te same produkty, które otrzymałam w wyniku biotransformacji 5-metoksytetralonu (**6**) w kulturze szczepu *Penicillium frequentans* (AM359). Strukturę produktów ustaliłam w oparciu o ich dane spektroskopowe, które były identyczne z danymi produktów otrzymanych w wyniku biotransformacji 5-metoksytetralonu (**6**).



#### 4.4.3 Biotransformacje 7-metoksybenzoksepan-2-onu (9)

Trzy szczepy grzybów z rodzaju *Penicillium* wykazywały zdolność transformacji 7-metoksybenzoksepan-2-onu (9). *P. chrysogenum* (AM112) katalizował hydrolizę pierścienia laktonowego substratu. *P. chermesinum* (AM113) i *P. frequentans* (AM359) prowadzą hydroksylację pierścienia benzenowego przy atomie węgla C-8 (Schemat 52). Biotransformację w kulturze tych szczepów opisano wcześniej, gdyż posiadają one również zdolność do utlenienia Baeyera-Villigera.



Schemat 52.

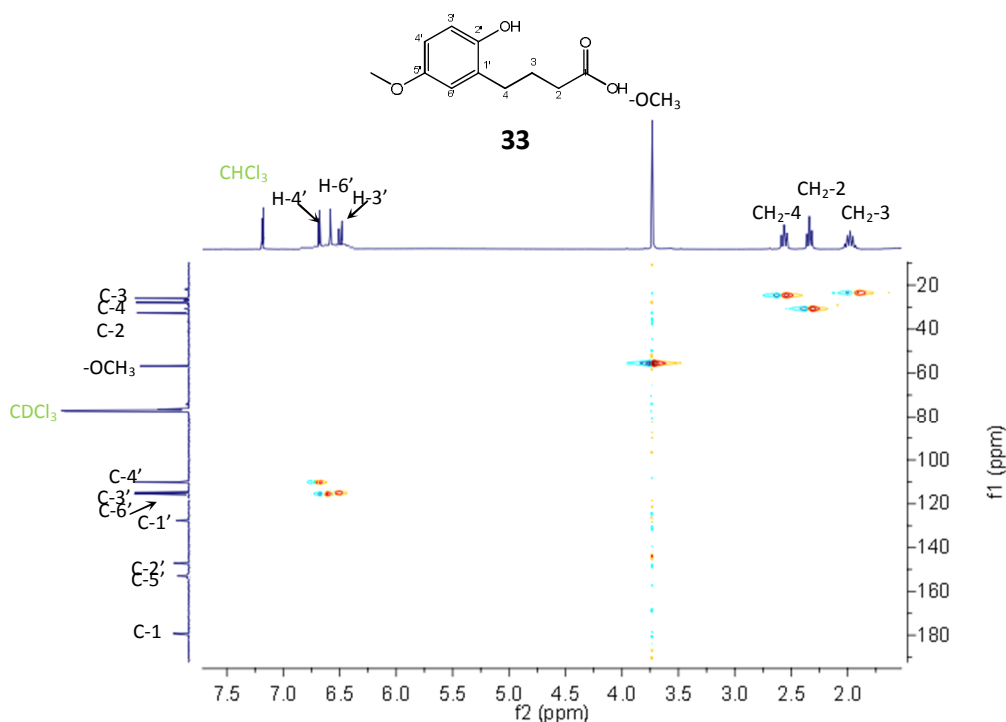
Tabela 21. Skład(% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 7-metoksybenzoksepan-2-onu (9).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %	
			hydroksylakton <b>10</b>	hydroksykwasy <b>33</b>
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)	2	24	-	76
	4	0	-	100
	6	0	-	100
	8	0	-	100
	10	0	-	100
	12	0	-	100
<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)	2	88	12	-
	4	59	41	-
	6	55	45	-
	8	56	44	-
	10	48	52	-
	12	47	53	-
<i>Penicillium. frequentans</i> (AM359)	2	100	0	-
	4	44	56	-
	6	38	62	-
	8	36	64	-
	10	35	65	-
	12	35	65	-

Biotransformacja 7-metoksybenzoksepan-2-onu na skalę preparatywną katalizowana *Penicillium chrysogenum* (AM112) trwała cztery dni. Po tym czasie wyizolowano produkt z wydajnością 80%. Jego strukturę ustaliłam na podstawie danych z widm IR,  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR.

Na widmie IR widoczne jest szerokie, intensywne pasmo absorpcji w zakresie  $2760\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ . Na widmie  $^1\text{H}$  NMR protony grup metylenowych dają sygnały w zakresie  $1.90\text{--}2.70\text{ ppm}$ . Protonom grupy metylenowej  $\text{CH}_2\text{-2}$  przyporządkowałam tryplet ( $J=5.5\text{ Hz}$ ) przy  $2.35\text{ ppm}$ , natomiast protonom grupy  $\text{CH}_2\text{-4}$  drugi tryplet ( $J=7.6\text{ Hz}$ ) przesunięty w kierunku niższego pola ( $\delta=2.60$ ). Protonom grupy  $\text{CH}_2\text{-3}$  odpowiada dwuprotonowy multiplik, położony przy  $2.00\text{ ppm}$ . Protony grupy metoksylowej dają sygnał w postaci trzyprotonowego singletu o przesunięciu chemicznym  $\delta=3.81$ . W zakresie widma  $^1\text{H}$  NMR odpowiadającym protonom pierścienia aromatycznego widoczne są trzy jednoprotone sygnały. Spośród nich najbardziej przesłaniany ( $\delta=6.60$ ) jest dublet pochodzący od protonu  $\text{H-3}'$ . Tak stosunkowo mała wartość przesunięcia chemicznego spowodowana jest obecnością grupy hydroksylowej w pozycji *orto*. Stała sprzężenia  $J=7.5\text{ Hz}$  wskazuje na obecność atomu wodoru przy sąsiednim atomie węgla. Przy  $6.67\text{ ppm}$  położony jest drugi dublet o mniejszej stałej sprzężenia ( $J=1.4\text{ Hz}$ ), pochodzący od protonu  $\text{H-6}'$ . Przy najniższym polu umiejscowiony jest dublet dubletów ( $J=7.5$  i  $1.4\text{ Hz}$ ) pochodzący od protonu  $\text{H-4}'$ . Większa stała sprzężenia wynika ze sprzężenia z jądrem atomu  $\text{H-3}'$ , a mniejsza ze sprzężenia z jądrem atomu  $\text{H-6}'$ .

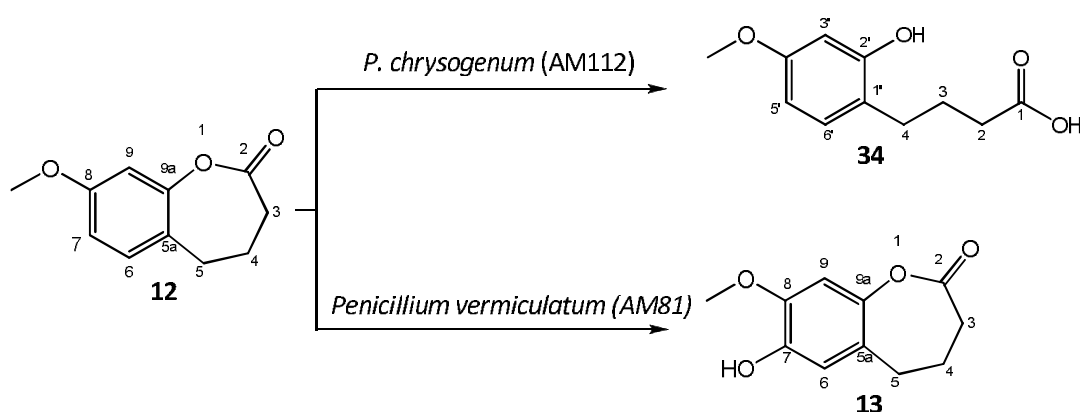
Przypisanie sygnałów odpowiednim atomom węgla na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR było możliwe dzięki widmu HMQC (Rysunek 46). W przypadku sygnałów od czwartorzędowych atomów węgla, wyraźnie widoczny jest wpływ sąsiednich grup na przesunięcie chemiczne. Najbardziej odsłaniany ( $\delta=177.03$ ) jest sygnał od karboksylowego atomu węgla. Przy niskim polu położone są również sygnały od atomu węgla  $\text{C-5}'$  ( $\delta=153.35$ ) oraz od atomu węgla  $\text{C-2}'$  ( $\delta=147.91$ ). Najmniej odsłaniany jest sygnał pochodzący od atomu węgla  $\text{C-1}'$  przy  $128.87\text{ ppm}$ .



Rysunek 46. Widmo HMQC hydroksykwasy **33**

#### 4.4.4 Biotransformacje 8-metoksy benzoksepan-2-onu (**12**)

Spośród przebadanych dwudziestu czterech szczepów, dwa wybrałam jako katalizatory do biotransformacji 8-metoksybenzoksepan-2-onu (**12**) na skalę preparatywną. Szczep *Penicillium chrysogenum* (AM112) katalizował hydrolizę pierścienia laktonowego substratu, podczas gdy *Penicillium vermiculatum* (AM81) hydroksylację pierścienia benzenowego przy atomie węgla C-7 (Schemat 53, Tabela 22). Zgodnie z przewidywaniami również szczepy *P. chermesinum* (AM113) i *P. frequentans* (AM359) posiadały zdolność do hydroksylacji pierścienia aromatycznego w tej pozycji, ale proces ten opisałam już wcześniej, jako drugi etap biotransformacji 7-metoksy-1-tetralonu (**11**).



Schemat 53.

Tabela 22. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 8-metoksybenzoksepan-2-onu (**12**).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %	
			hydroksylakton <b>13</b>	hydroksykwas <b>34</b>
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)	2	60	-	40
	4	47	-	53
	6	9	-	91
	8	7	-	93
	10	0	-	100
	12	0	-	100
<i>Penicillium vermiculatum</i> (AM81)	2	64	36	-
	4	33	67	-
	6	29	71	-
	8	28	72	-
	10	21	79	-
	12	20	80	-

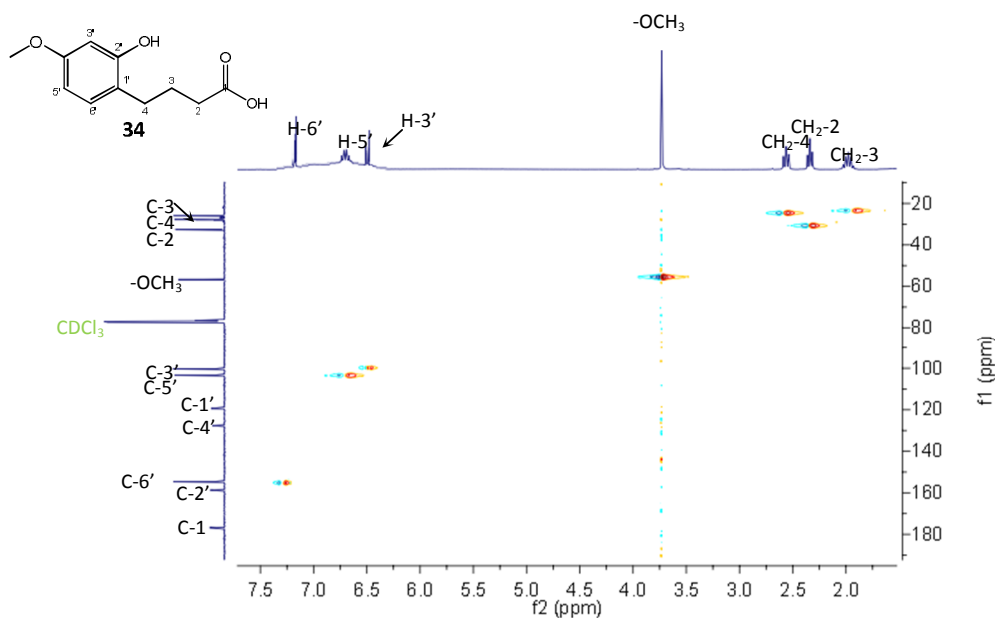
Określając optymalny czas trwania biotransformacji, brałam pod uwagę nie tylko stopień przereagowania substratu, ale również udział powstających metabolitów własnych mikroorganizmu w płynie pohodowlanym. W przypadku biotransformacji 8-metoksybenzoksepan-2-onu (**12**) katalizowanej *P. chrysogenum* (AM112) za najbardziej odpowiedni uznałam okres sześciu dni. Po tym czasie wyizolowałam kwas 4-(2-hydroksy-4-metoksyfenylo)masłowy (**34**) z wydajnością 77% jako jedyny produkt biotransformacji.

Strukturę produktu potwierdziłam analizując widma w zakresie podczerwieni oraz magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HMQC.

Na widmie IR widoczne jest szerokie pasmo absorpcji w zakresie  $2670\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  pochodzące od drgań rozciągających wiązań O-H. Obecność ugrupowania karboksylowego potwierdza również sygnał na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR pochodzący od jądra karboksylowego atomu węgla C-1 ( $\delta=177.05$ ). Widoczny jest także sygnał od jądra atomu węgla C-2' położony przy 162.33 ppm. Przesunięcie chemiczne tego sygnału jest charakterystyczne dla jąder atomów węgla z przyłączoną grupą hydroksylową. Sygnał od protonu tej grupy hydroksylowej widoczny jest na widmie  $^1\text{H}$  NMR w postaci szerokiego jednoprotowego singletu położonego przy 6.87 ppm.

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR przy 2.35 ppm położony jest tryplet ( $J=5.5\text{ Hz}$ ) pochodzący od protonów grupy metylenowej  $\text{CH}_2\text{-2}$ . Tryplet ( $J=7.6\text{ Hz}$ ) pochodzący od protonów grupy metylenowej  $\text{CH}_2\text{-4}$  przesunięty jest w stronę niższego pola ( $\delta=2.59$ ). Efekt odsłaniania tego sygnału związany jest z sąsiedztwem pierścienia aromatycznego. Protony grupy metylenowej  $\text{CH}_2\text{-3}$  dają sygnał w postaci multipletu położonego przy 2.00 ppm. Przy 3.81 ppm widoczny jest trójprotonowy singlet pochodzący od protonów grupy metoksylowej. Protonom aromatycznym przyporządkowałam trzy sygnały w postaci dwóch dubletów i jednego dubletu dubletów. Najbardziej przesłaniany ( $\delta=6.42$ ) jest dublet ( $J=1.5\text{ Hz}$ ) pochodzący od protonu H-3', gdyż jest w pozycji *orto* grupy hydroksylowej i metoksylowej. Drugi dublet ( $J=7.2\text{ Hz}$ ) pochodzący od protonu H-6' przesunięty jest w stronę niższego pola ( $\delta=6.97$ ). Dublet dubletów przyporządkowałam protonowi H-5'. Większa stała sprzężenia ( $J=7.2\text{ Hz}$ ) jest wynikiem sprzężenia z protonem H-6', natomiast mniejsza ( $J=1.5\text{ Hz}$ ) świadczy o obecności sprzężenia z protonem H-3'. Przyporządkowanie sygnałów atomom węgla na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR umożliwiła mi analiza widma korelacyjnego  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  NMR – HMQC (Rysunek 47).

W wyniku czterodniowej biotransformacji 8-metoksybenzoksepan-2-onu (**12**) w kulturze szczepu *Penicillium vermiculatum* (AM81), otrzymałam produkt- 7-hydroksy-8-metoksybenzoksepan-2-on **13** z wydajnością 37%. Po wyizolowaniu produktu ustaliłam jego strukturę na podstawie danych z widm IR,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. Dane te były identyczne z danymi produktu otrzymanego na drodze syntezy chemicznej i wskazały jednoznacznie, że w procesie biotransformacji nastąpiła hydroksylacja w pozycji *orto* w stosunku do grupy metoksylowej (Schemat 53).

Rysunek 47. Widmo HMQC hydroksykwasu **34**

#### 4.4.5 Biotransformacje 9-metoksy benzoksepan-2-onu (**24**)

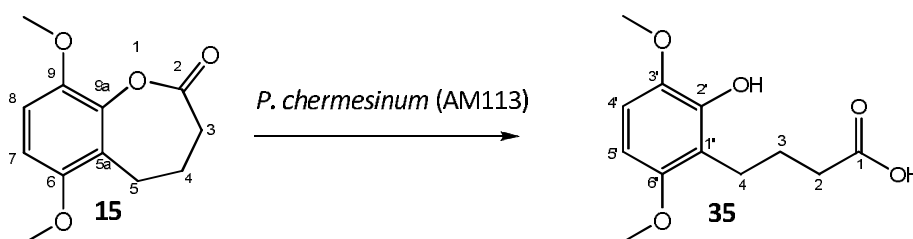
W przypadku 9-metoksybenzoksepan-2-onu (**24**) jedynie szczep *Penicillium chrysogenum* (AM112) był zdolny do jego transformacji, lecz stopień konwersji po dwunastu dniach był bardzo niski (6%) (Tabela 23), co uniemożliwiło przeprowadzenie biotransformacji na skalę preparatywną i ustalenie struktury produktu.

Tabela 23. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 8-metoksybenzoksepan-2-onu (**24**).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)	2	100	0
	4	100	0
	6	100	0
	8	96	4
	10	94	6
	12	94	6

## 4.4.6 Biotransformacje 6,9-dimetoksy benzoksepan-2-onu (15)

Zdolność do przekształcania 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-onu (15) zaobserwowałam u trzech szczepów z rodzaju *Penicillium*: *P. chrysogenum* (AM112), *P. chermesinum* (AM113) i *P. frequentans* (AM359). Na podstawie analizy GC stwierdziłam, że we wszystkich trzech przypadkach powstaje ten sam produkt- kwas 4-(2-hydroksy-3,6-dimetoksyfenilo)masłowy (35) (Schemat 54). Szczepy *P. chermesinum* (AM113) i *P. frequentans* (AM359) posiadały zdolność do utlenienia Baeyera-Villigera 5,8-dimetoksy-1-tetralonu (14) (Rozdział 4.3.5), w wyniku którego powstawał 6,9-dimetoksy benzoksepan-2-on (15). Wówczas nie zaobserwowałam hydrolizy pierścienia laktonowego. Przyczyną tego był po pierwsze zbyt krótki czas prowadzenia procesu, a po drugie zbyt niski stopień przereagowania (23%).



Schemat 54.

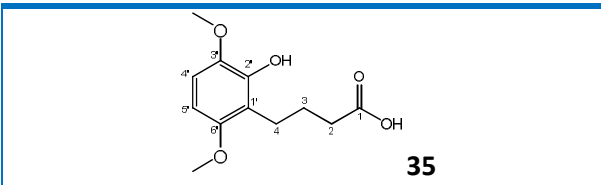
Tabela 24. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-onu (15).

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %
			hydroksykwas 35
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)	2	100	0
	4	100	0
	6	97	3
	8	94	6
	10	89	11
	12	88	12
<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)	2	100	0
	4	84	16
	6	29	71
	8	22	78
	10	23	77
	12	22	78
<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)	2	100	0
	4	100	0
	6	100	0
	8	7	93
	10	8	92
	12	13	87

Szczep *P. chermesinum* (AM113) wykazywał najwyższą aktywność do katalizowania hydrolizy pierścienia laktonowego  $\epsilon$ -laktonu **15** w najkrótszym czasie, pomimo iż jego zdolności katalityczne do katalizowania reakcji Baeyera-Viliiigera były niewielkie (Tabela 24). Właśnie ten szczep wybrałam do przeprowadzenia biotransformacji na skale preparatywnej. Za optymalny czas uznałam sześć dni. Po tym czasie przerwałam proces i wyizolowałam produkt - kwas 4-(2-hydroksy-3,6-dimetoksyfenylo)masłowy (**35**) z wydajnością 54%.

Strukturę produktu określiłam na podstawie jego danych spektroskopowych. Na widmie IR produktu widoczne jest szerokie pasmo absorpcji w zakresie od 2750 do 3550  $\text{cm}^{-1}$ , pochodzące od drgań rozciągających wiązań O-H hydroksykwasu. Obecność grupy hydroksylowej potwierdza również szeroki jednoprotonowy singlet przy 5.78 ppm na widmie  $^1\text{H}$  NMR. Przesunięcie chemiczne sygnału odczytane z widma  $^{13}\text{C}$  NMR pochodzącego od jądra atomu węgla C-2', przy którym znajduje się grupa hydroksylowa, wynosi 144.54 ppm. Protonom grup metylenowych przypisałam trzy sygnały na widmie  $^1\text{H}$  NMR o jednakowej stałej sprzężenia wynoszącej  $J=7.4$  Hz. Położony przy najwyższym polu ( $\delta=1.89$ ) kwintet przypisałam protonom grupy  $\text{CH}_2-3$ , tryplet przy 2.36 ppm protonom grupy  $\text{CH}_2-2$  a tryplet przy 2.74 ppm protonom grupy  $\text{CH}_2-4$ . Protony grup metoksylowych dają dwa sygnały w postaci singletów położonych przy 3.75 i 3.83 ppm. Dwa dublety o stałej sprzężenia  $J=8.8$  Hz przypisałam protonom położonym w pierścieniu aromatycznym: dublet położony przy wyższym polu ( $\delta=6.31$ ) protonowi H-5' a dublet przy 6.65 ppm protonowi H-4'. W przyporządkowaniu sygnałów odpowiednim atomom węgla pomocne okazały się widma korelacyjne  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  NMR: HMQC i HMBC. Na podstawie obecności sprzężenia przez dwa wiązania pomiędzy jądrem karboksylowego atomu węgla a protonami grupy  $\text{CH}_2-2$  mogłam odróżnić sygnał od tych protonów na widmie  $^1\text{H}$  NMR od sygnału od protonów grupy  $\text{CH}_2-4$ . Znając położenie sygnału od jądra atomu węgla na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR i posługując się widmem HMBC, można było odróżnić od siebie sygnały pochodzące od protonów aromatycznych na widmie  $^1\text{H}$  NMR. Tabela 25 pokazuje sprzężenia pomiędzy jądrami atomów wodoru i węgla na widmie HMBC.

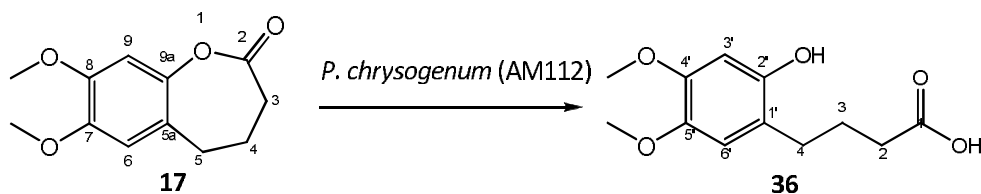
Tabela 25. Sprzężenia przez dwa i trzy wiązania pomiędzy jądrami atomów węgla i wodoru odczytane z widma HMBC produktu 35



	CH <sub>2</sub> -2	CH <sub>2</sub> -3	CH <sub>2</sub> -4	H-4'	H-5'	2xO-CH <sub>3</sub>
C-1	+	+	-	-	-	-
C-2	-	+	+	-	-	-
C-3	+	-	+	-	-	-
C-4	+	+	-	-	-	-
C-1'	-	+	+	-	+	-
C-2'	-	-	+	+	-	-
C-3'	-	-	-	+	+	-
C-4'	-	-	-	-	+	-
C-5'	-	-	-	+	-	-
C-6'	-	-	+	+	+	-
2xO-CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-

#### 4.4.7 Biotransformacje 7,8-dimetoksy benzoksepan-2-onu (17)

Biotransformacja skriningowa 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-onu (**17**) pozwoliła mi wyłonić szczep grzyba strzępkowego zdolny do jego biotransformacji. Był to szczep *Penicillium chrysogenum* (AM112) (Tabela 26). Biotransformację preparatywną laktonu **17** z zastosowaniem tego szczepu prowadziłam sześć dni. Wyizolowanym produktem okazał się hydroksykwasy **36** (wyd. izolowana 75%) (Schemat 55).



Schemat 55.

Tabela 26. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-onu (17).

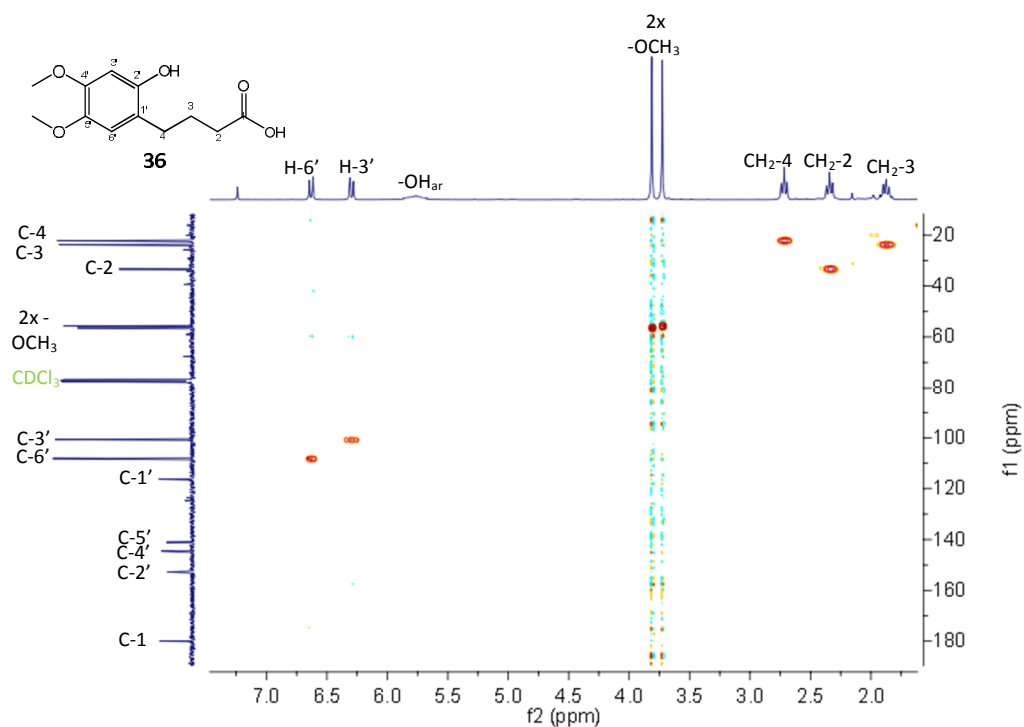
Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %
			hydroksykwasy <b>36</b>
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)	2	92	8
	4	22	78
	6	1	99
	8	0	100
	10	0	100



Dane spektroskopowe produktu pozwoliły mi określić jego strukturę. Na widmie  $^1\text{H}$  NMR można odnaleźć dwa szerokie jednoprotonowe sygnały o małej intensywności. Pierwszy położony przy polu o wyższym natężeniu ( $\delta=5.65$ ) przypisałam protonowi grupy hydroksylowej przy atomie węgla C-2', drugi, przesunięty w stronę niższego pola ( $\delta=9.74$ ) protonowi grupy karboksylowej. Na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR sygnał pochodzący od jądra atomu węgla C-2' położony jest przy 155.62 ppm, natomiast sygnał od jądra karboksylowego atomu węgla przy 197.29 ppm. Potwierdzeniem obecności grupy karboksylowej i hydroksylowej jest również szerokie pasmo absorpcji w zakresie od 2760 do 3550  $\text{cm}^{-1}$  na widmie IR produktu.

Sygnały pochodzące od protonów grup metylenowych są widoczne na widmie  $^1\text{H}$  NMR w postaci multipletu położonego w zakresie 2.15 ppm oraz dwóch trypletów przy 2.58 i 2.87 ppm. Multiplet pochodzi od protonów grupy  $\text{CH}_2$ -3. Tryplet ( $J=6.5$  Hz) położony przy wyższym polu przyporządkowałam protonom grupy  $\text{CH}_2$ -2 a tryplet ( $J=6.1$  Hz) położony przy niższym polu protonom grupy  $\text{CH}_2$ -4. Protony grup metoksyloowych dają dwa położone blisko siebie ( $\delta=3.89$  i  $\delta=3.92$ ) trójprotonowe singlety. Również dwa singlety dają jądra atomów wodoru w pierścieniu aromatycznym. Singlet przy wyższym polu ( $\delta=7.24$ ) przypisałam protonowi H-3' ze względu na położenie w pozycji *ortho* względem grupy hydroksylowej. Drugi singlet ( $\delta=7.50$ ) przypisałam protonowi H-6'.

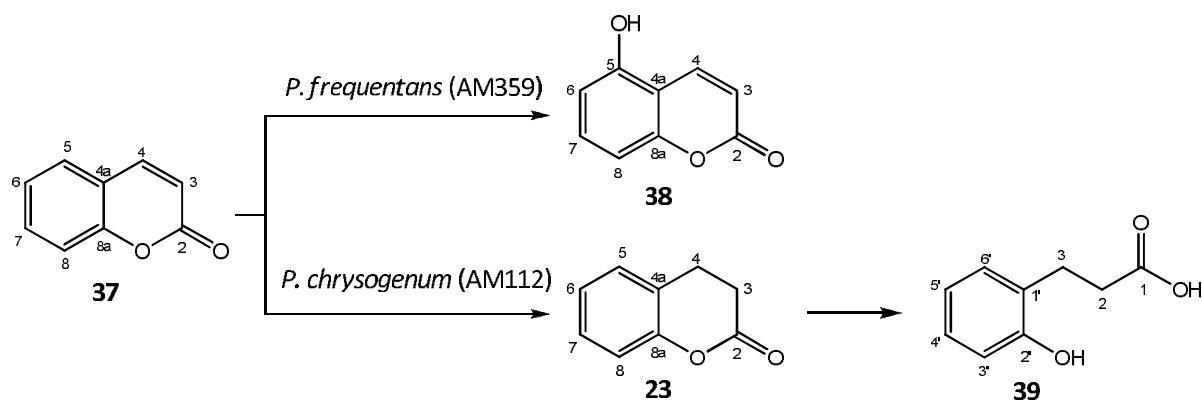
Przypisanie sygnałów atomom węgla C-2, C-3, C-4, C-3' i C-6' na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR umożliwiło mi widmo korelacyjne HMQC (Rysunek 48). Na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR widocznych jest pięć sygnałów o niskiej intensywności, pochodzących od czwartorzędowych atomów węgla. Sygnał od atomu węgla C-2', związanego z grupą hydroksylową położony jest przy 155.62 ppm. Sygnał przy najniższym polu ( $\delta=197.29$ ) przypisałam karboksylowemu atomowi węgla C-1. Najmniej odsłaniany spośród tych czterech sygnałów jest sygnał od atomu C-1' ( $\delta=110.14$ ). Na położenie sygnałów pochodzących od atomów węgla C-4' i C-5' ma wpływ położenie atomu względem grupy hydroksylowej. Dlatego atomowi C-5' położonemu w pozycji *para* względem grupy -OH przypisałam sygnał położony przy wyższym polu ( $\delta=112.03$ ), a atomowi węgla C-4' sygnał przy 139.33 ppm.

Rysunek 48. Widmo HMQC hydroksykwasu **36**

#### 4.5 Biotransformacje kumaryny (**37**)

Tylko dwa spośród dwudziestu czterech badanych przeze mnie szczepów drobnoustrojów były zdolne do biotransformacji kumaryny. Podobnie jak w poprzednio opisanych przykładach były to *Penicillium frequentans* (AM 359) i *Penicillium chrysogenum* (AM112) (Schemat 56, Tabela 27).

Po ośmiu dniach biotransformacji preparatywnej z udziałem szczepu *P. frequentans* (AM359) stopień przereagowania wynosił 100%. Po tym czasie zakończyłam biotransformację i wyizolowałam 5-hydroksykumarynę (**38**) z wydajnością 65% jako jedyny produkt biotransformacji. Widmo w zakresie podczerwieni oraz widma magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR, a także widma korelacyjne COSY, HMQC i HMBC umożliwiły mi ustalenie struktury produktu.

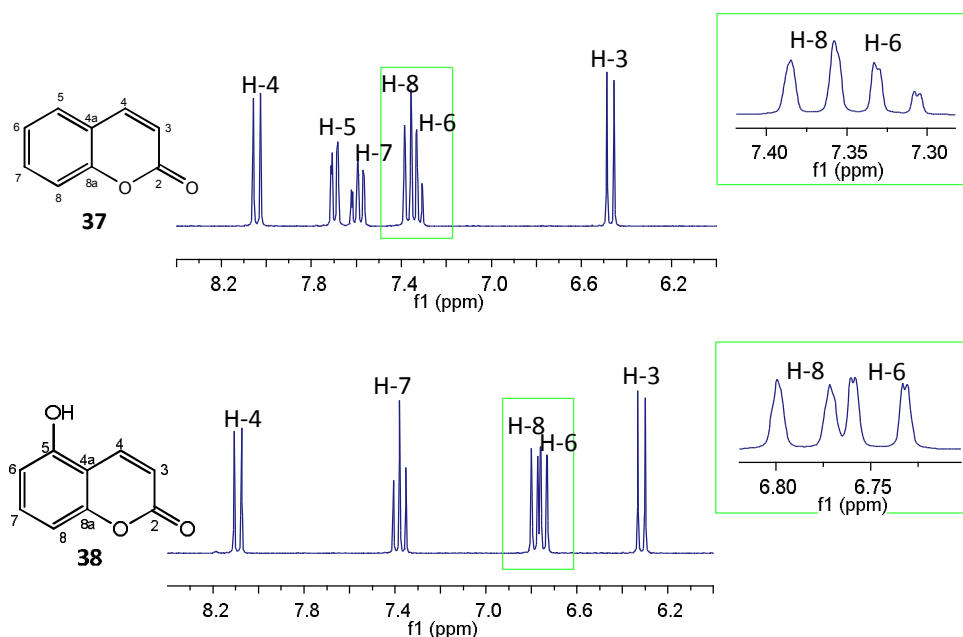


Schemat 56.

Tabela 27. Skład (% wg GC) mieszaniny produktów w trakcie biotransformacji kumaryny 37

Szczep	Czas [dni]	Substrat %	Produkt %		
			hydroksylakton <b>38</b>	dihydrokumaryna <b>23</b>	hydroksykwas <b>39</b>
<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)	2	9	-	91	0
	4	0	-	93	7
	6	0	-	75	25
	8	0	-	65	35
	10	0	-	27	73
	12	0	-	12	88
<i>Penicillium frequentans</i> (AM 359)	2	83	17	-	-
	4	51	49	-	-
	6	6	94	-	-
	8	0	100	-	-
	10	0	100	-	-
	12	0	100	-	-

Na widmie IR produktu przy  $3396\text{ cm}^{-1}$  położone jest szerokie pasmo absorpcji pochodzące od drgań rozciągających wiązania O-H. Przesunięcie chemiczne sygnału na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR pochodzącego od jądra atomu węgla C-5 wynosi  $155.36\text{ ppm}$ . Świadczy to, że właśnie w pozycję C-5 została podstawiona grupa -OH. Sygnał na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR pochodzący od jądra karbonylowego atomu węgla C-2, położony jest przy  $160.60\text{ ppm}$ . Przypisanie sygnałów pozostałym atomom węgla było możliwe dzięki widmu korelacyjnemu HMQC. Sygnały na widmie  $^{13}\text{C}$  NMR pochodzące od mostkowych atomów węgla rozróżniłam na podstawie widma HMBC. Na widmie tym widoczne jest sprzężenie pomiędzy jądrem atomu C-4a, a każdym z sygnałów pochodzących od protonów przy podwójnym wiązaniu.



**Rysunek 49.** Fragmenty widm  $^1\text{H}$  NMR kumaryny (**37**) i 5-hydroksykumaryny (**38**) odpowiadające sygnałom pochodzącym od protonów aromatycznych

Na widmie  $^1\text{H}$  NMR 5-hydroksykumaryny (**38**) (Rysunek 49) widoczne są dwa dublety ( $J=9.7$  Hz) pochodzące od protonów H-3 ( $\delta=6.33$ ) i H-4 ( $\delta=8.11$ ). Hydroksylacja przy atomie węgla C-5 nie wpłynęła na zmianę położenia tych sygnałów w porównaniu z widmem kumaryny. Jednak wpływ obecności grupy hydroksylowej na multipletowość i przesunięcie chemiczne protonów aromatycznych jest wyraźny. Sygnał od protonu H-7 był trypletem dubletów ( $J=5.9$  i  $1.6$  Hz) na widmie kumaryny. Większa stała sprzężenia wynikała ze sprzężenia z protonami H-6 i H-8, a mniejsza z położonym w pozycji *meta* względem niego protonu H-5. Na widmie 5-hydroksykumaryny (**38**) jest on trypletem ( $J=8.3$  Hz) na skutek sprzężenia jedynie z dwoma protonami H-6 i H-8. Podobna zmiana multipletowości dotyczy sygnałów pochodzących od protonów H-6. Na widmie kumaryny sygnał ten był trypletem dubletów ( $J=7.5$  i  $1.0$  Hz). Na widmie 5-hydroksykumaryny (**38**) jest on dubletem dubletów ( $J=8.2$  i  $1.0$  Hz), co świadczy o obecności tylko jednego protonu przy sąsiednim atomie węgla. Jednocześnie sygnał od protonu H-6 uległ znacznemu przesunięciu względem położenia na widmie kumaryny, w stronę wyższego pola, co również wskazuje na obecność grupy hydroksylowej w pozycji *orto*. Krotność rozszczepienia sygnału pochodzącego od protonu H-8 nie uległa zmianie. Zarówno na widmie substratu, jak i produktu jest on dubletem. Stała sprzężenia dla tego sygnału na widmie 5-hydroksykumaryny (**38**) wynosi  $8.3$  Hz. Ale również ten sygnał uległ przesunięciu w kierunku wyższego pola względem jego położenia na widmie kumaryny (**37**).

Biotransformacja kumaryny (**37**) z udziałem szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112) przebiegała w odmienny sposób (Schemt 56). W pierwszym etapie następowała redukcja wiązania podwójnego, w wyniku czego powstawała dihydrokumaryna. Następnie pierścień laktonowy dihydrokumaryny (**23**) ulegał hydrolizie, w wyniku czego powstawał kwas 3-(2-hydroksyfenylo)-propionowy (**39**).

W celu wyizolowania obu produktów zdecydowałam się przeprowadzić biotransformację preparatywną dwukrotnie. Pierwszą przerwałam po dwóch dniach i wyizolowałam dihydrokumarynę (**23**) z wydajnością 80%. Dane spektroskopowe były zgodne z danymi wzorca otrzymanego na drodze reakcji chemicznej. Dziesięciodniowa biotransformacja skutkowała otrzymaniem drugiego produktu (**39**) z wydajnością 46%. Jego strukturę określiłam na podstawie widm IR oraz  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. Dane te okazały się zgodne z danymi literaturowymi [136]. Na widmie IR w zakresie  $2700\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$  widoczne jest szerokie pasmo absorpcji pochodzące od drgań rozciągających wiązań O-H hydroksykwasu. Na widmie  $^1\text{H}$  NMR widoczny jest szeroki jednoprotonowy singlet pochodzący od protonu grupy hydroksylowej.

Protonom grup metylenowych odpowiadają dwa dwuprotonowe tryplety ( $J = 7.0\text{ Hz}$ ) przy 2.44 ppm dla protonów grupy  $\text{CH}_2\text{-2}$  oraz przy 2.84 dla protonów grupy  $\text{CH}_2\text{-3}$ . Sygnały pochodzące od protonów aromatycznych występują w postaci czterech jednoprotonowych multipletów. Spośród nich najbardziej przesłaniany jest sygnał od protonu H-3' ( $\delta = 7.14$ ). Spowodowane jest to obecnością grupy hydroksylowej przy sąsiednim atomie węgla. Efekt przesłaniania spowodowany obecnością grupy hydroksylowej widoczny jest również w przypadku protonu H-5' ( $\delta = 7.54$ ), który znajduje się w pozycji *para* w stosunku do grupy hydroksylowej.

#### 4.6 Badania biologiczne

Cykliczne ketony ze skondensowanym pierścieniem aromatycznym oraz otrzymane z nich na drodze syntezy chemicznej laktony zostały poddane testom biologicznym na aktywność deterentną. Badania przeprowadzono na szkodnikach magazynów zbożowych: larwach i chrząszczach trojszyka ulca (*Tribolium confusum* Duv.), chrząszczach wołka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.), larwach skórka zbożowego (*Trogoderma granarium* Ev.) oraz na szkodniku upraw roślin zielonych: mszycy brzoskwiniowo-ziemniaczanej (*Myzus persicae* Sulz.).

Szkodniki te wciąż powodują znaczne straty podczas uprawy roślin i przechowywania zbiorów, mimo nieustannego poszukiwania i stosowania coraz to nowych czynników ograniczających ich populację. Wynika to w głównej mierze z nabywanej odporności wobec nowo wprowadzanych insektycydów. Duże nadzieje wiązano z naturalnymi antyfidantami. Są one syntezowane w roślinach i stanowią system ochronny przed owadzimi szkodnikami, zniechęcając je do żerowania. Mechanizmy ich działania polegają w głównej mierze na oddziaływaniu na receptory smaku owada. W skrajnym przypadku działanie antyfidantne prowadzi do śmierci szkodnika. Niestety zawartość tych związków w roślinach jest niewielka a ich struktura chemiczna skomplikowana. Dlatego sądzi się, że uzyskanie na drodze syntezy chemicznej mniej lub bardziej „wiernych” analogów strukturalnych naturalnych antyfidantów, tak samo aktywnych jak naturalne, może być dobrym rozwiązaniem tego zagadnienia.

##### 4.6.1 Testy biologiczne na aktywność deterentną wobec mszycy brzoskwiniowej (*Myzus persicae* Sulz.)

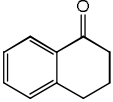
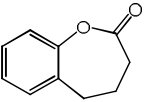
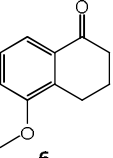
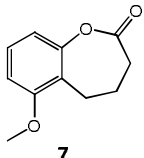
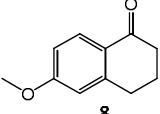
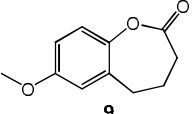
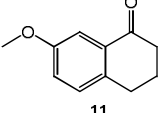
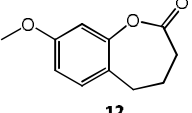
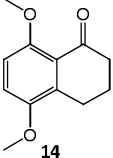
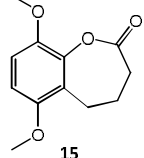
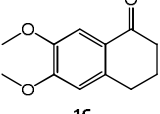
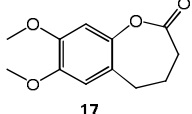
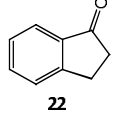
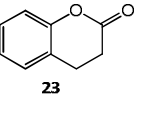
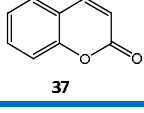
Mszycy brzoskwiniowo-ziemniaczana (*Myzodes persicae* Sulz.) należy do rodziny mszycowatych (*Aphididae*). W Polsce znana jest przede wszystkim jako szkodnik atakujący brzoskwinie, ziemniaki i pomidory. Stanowi jednak również zagrożenie dla wielu innych gatunków roślin zielonych. Wysysając soki z pędów, liści, kwiatostanów powoduje ich zwijanie i obumieranie. Ponadto wkuwając się w tkanki rośliny przenosi choroby wirusowe, a spadź wydzielana przez żerujące mszyce stanowi bardzo dobrą pożywkę do rozwoju grzybów chorobotwórczych. Powszechnie stosowane preparaty o działaniu bójącym nie są wystarczająco skuteczne w walce z tym owadem. W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia literaturowe dotyczące aktywności deterentnej siedmioczłonowych laktonów [12]. Dlatego badaniom aktywności antyfidantnej względem mszycy brzoskwiniowo-ziemniaczanej postanowiliśmy poddać  $\epsilon$ -laktony: benzoksepan-2-on (**2**), jego monometoksy- (**7**, **9**, **12**) i dimetoksy pochodne (**15**, **17**), a także  $\delta$ -lakton - dihydrokumarynę (**23**), ketony będące substratami do otrzymania tych laktonów (**1**, **6**, **8**, **11**, **14**, **16**, **22**) oraz kumarynę (**37**).

Testy wykonano w Katedrze Botaniki i Ekologii Uniwersytetu Zielonogórskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Beaty Gabryś. Zastosowano test z wyborem Polonsky'ego [137] polegający na obserwacji zasiedlania liści kapusty pekińskiej (*Brassica pekinensis*) przez mszyce. Na szalce Petriego pomiędzy dwoma liśćmi, z których jeden nasączony był 0,1% roztworem badanego związku w 70% etanolu, a drugi 70% etanolem (próba kontrolna,) umieszczano dwadzieścia dorosłych, bezskrzydłych osobników mszyc. Po upływie 1, 2 i 24 godzin liczono mszyce znajdujące się na każdym z liści. Test wykonywano w ośmiu powtórzeniach. W celu wyliczenia poziomu istotności różnic statystycznych w zasiedleniu liści zastosowano test t-Studenta.

Różnica statystycznie istotna  $P < 0.05$  pomiędzy liczbą mszyc znalezionych na liściu potraktowanym testowanym związkiem i liściem kontrolnym oznacza, iż badany związek jest **aktywny biologicznie**. Wyznaczone poziomy istotności różnicy statystycznej dla testowanych połączeń przedstawia Tabela 28.

Wszystkie otrzymane przeze mnie  $\epsilon$ -laktony wykazały aktywność antyfidantną w stosunku do mszycy brzoskwiowo-ziemniaczanej, natomiast wśród badanych ketonów, tylko cztery (**8**, **11**, **14** i **22**) są aktywnymi deterentami pokarmowymi w stosunku do tego szkodnika. Spośród badanych związków najwyższą aktywność wykazuje lakton **17**, który bardzo efektywnie ogranicza żerowanie mszycy już w pierwszej godzinie testowania. Aktywność ta utrzymuje się w trakcie trwania testu i jest widoczna po 24 godzinach. Na podstawie porównania aktywności laktonów i odpowiednich wyjściowych ketonów można wnioskować, że wprowadzenie alkoksylogowego atomu tlenu do pierścienia ketonu powoduje zwiększenie aktywności antyfidantnej.

Tabela 28. Aktywność deterentna cyklicznych ketonów i laktonów wobec mszycy brzoskwińowo-ziemniaczanej

Badany związek	Poziom istotności różnicy statystycznej (P)			Badany związek	Poziom istotności różnicy statystycznej (P)		
	czas żerowania				czas żerowania		
	1h	2h	24h		1h	2h	24h
 1	0,2087	0,1151	0,7426	 2	<b>0,0289</b>	0,1169	0,0899
 6	0,8898	0,5536	0,3088	 7	<b>0,0191</b>	<b>0,0091</b>	<b>0,0112</b>
 8	<b>0,0285</b>	0,1127	0,1808	 9	<b>0,0006</b>	0,1201	0,0506
 11	<b>0,0007</b>	0,1630	<b>0,0026</b>	 12	0,1662	<b>0,0078</b>	<b>0,0000</b>
 14	0,1755	0,4498	<b>0,0383</b>	 15	<b>0,0001</b>	<b>0,0065</b>	<b>0,0054</b>
 16	0,1856	0,9484	0,1948	 17	<b>0,0001</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0000</b>
 22	<b>0,0021</b>	<b>0,0106</b>	<b>0,0071</b>	 23	<b>0,0055</b>	<b>0,0396</b>	0,0989
				 37	0,9063	0,5386	0,0518



#### 4.6.2 Testy biologiczne na aktywność deterentną wobec szkodników magazynów zbożowych

Testy aktywności antyfidantnej wszystkich otrzymanych  $\epsilon$ -laktonów i ketonów z których te laktony zostały otrzymane wobec larw i chrząszczy trojszyka ulca (*Tribolium confusum* Duv.), chrząszczy wołka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.) i larw skórka zbożowego (*Trogoderma granarium* Ev.) zostały wykonane w zespole badawczym kierowanym przez Pana prof. **Jana Nawrota** z Państwowego Instytutu Badawczego Ochrony Roślin w Poznaniu.

Szkodniki te żerują w magazynach, w których przechowywane są ziarna zbóż, kasze, mąki a także orzechy, bakalie, tytoń a nawet wyroby czekoladowe. Wśród nich najgroźniejszy jest wołek zbożowy, powodujący nawet do 5% strat podczas przechowywaniu ziaren zbóż. Stosowane w walce z tymi szkodnikami insektycydy, m. in. metopren, pyretryny, czy bardziej przyjazne środowisku pułapki feromonowe [138] nie przynoszą oczekiwanych rezultatów, gdyż owady uodporniają się na ich działanie i zmuszają do zwiększania dawek stosowanych preparatów. Dlatego też poszukuje się nowych metod zwalczania tych szkodników. Jednym ze sposobów mogłoby być stosowanie naturalnych antyfidantów lub ich syntetycznych ich analogów.

Badania wykonano zgodnie z opublikowaną procedurą [139, 140, 141], stosując jako pokarm opłatki pszenne nasączone 1% etanolowymi roztworami badanych związków. Miarą deterentności była masa zjedzonego przez owady pokarmu. Pokarmem kontrolnym były opłatki nasączone tylko etanolem. Każde z doświadczeń wykonano w pięciu powtórzeniach, za każdym razem wykorzystując 3 chrząszcze wołka zbożowego, 20 chrząszczy trojszyka ulca oraz po 10 larw skórka zbożowego i trojszyka ulca.

Testy prowadzono w dwóch wariantach:

- **Test z wyborem** - owady miały dostęp zarówno do opłatka potraktowanego 1% etanolowym roztworem badanego związku, jak i do pokarmu kontrolnego (opłatki potraktowane tylko etanolem). Po pięciu dniach opłatki zważono i obliczono **względny współczynnik deterentności (R)**,

$$R = \frac{K - E}{K + E} \times 100$$

gdzie: K – ciężar zjedzonego opłatka kontrolnego w teście z wyborem

E – ciężar zjedzonego opłatka testowego w teście z wyborem

- **Test bez wyboru** – owady miały dostęp jedynie do opłatka potraktowanego 1% etanolem roztworem badanego związku. Po pięciu dniach opłatki zważono i obliczono **bezwzględny współczynnik deterentności (A)**.

$$A = \frac{KK - EE}{KK + EE} \times 100$$

gdzie: KK – ciężar zjedzonego opłatka kontrolnego w teście bez wyboru

EE – ciężar zjedzonego opłatka testowego w teście bez wyboru

Miarą aktywności deterentnej testowanych związków jest **sumaryczny współczynnik deterentności (T)**, będący sumą współczynników R i A:

$$T = R + A$$

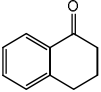
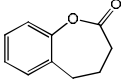
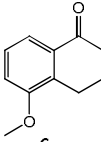
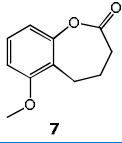
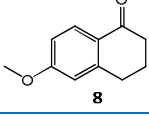
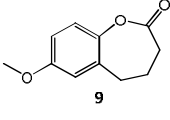
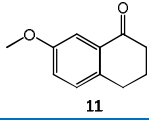
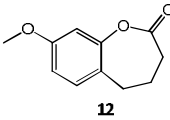
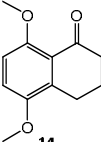
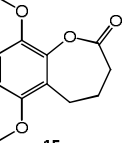
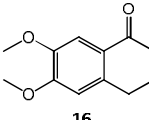
Wartości współczynnika (T) zawierają się w przedziale –200 do 200. Dodatnia wartość współczynnika T wskazuje na aktywność deterentną badanego związku, natomiast ujemna wartość świadczy, że jest on atraktantem pokarmowym dla danego owada. Tabela 29 pokazuje zależność pomiędzy wartością współczynnika T, a aktywnością deterentną.

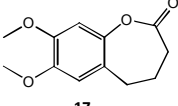
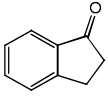
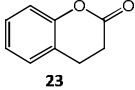
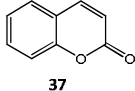
**Tabela 29.** Wartość sumarycznego współczynnika deterentności (T), a aktywność deterentna.

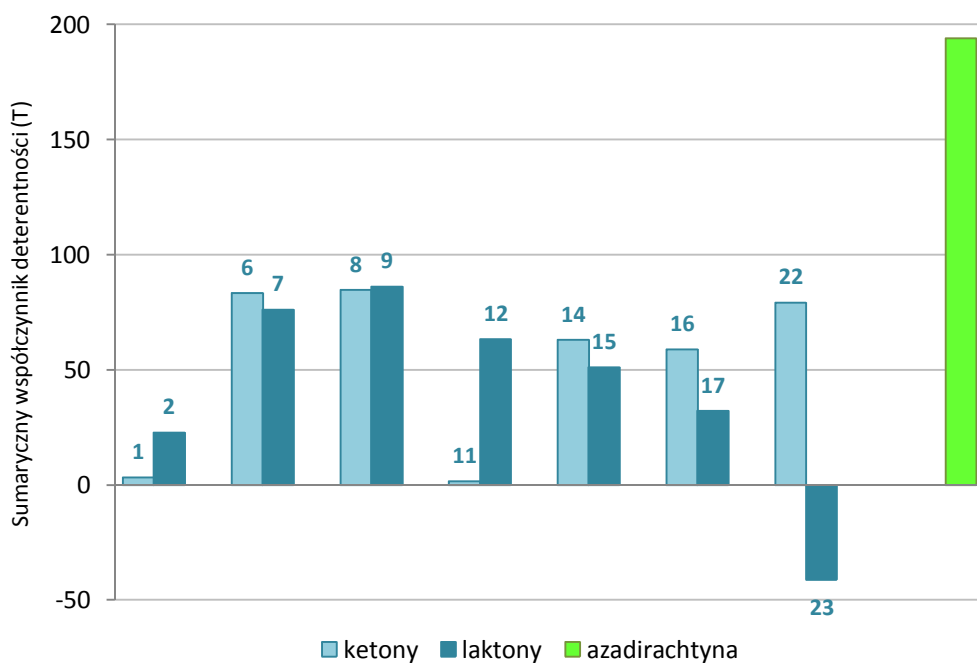
Wartość wsp. T	Aktywność deterentna
200 – 151	Bardzo silna
150 – 101	dobra
100 – 50	średnia
50 – 0	słaba

Poniżej przedstawiłam wyniki testów aktywności deterentnej otrzymanych przeze mnie siedmioczłonowych laktonów (**2, 7, 9, 12, 15, 17**), substratów w ich syntezie – tetralonów (**1, 6, 8, 11, 14, 16, 18, 20**) a także kumaryny (**37**), dihydrokumaryny (**23**), indanonu (**22**) oraz azadirachtyny, która jest obecnie najbardziej znanym i wysoce aktywnym naturalnym antyfidantem dla wielu gatunków owadów (Tabele 30).

Tabela 30. Wartości sumarycznego współczynnika deterentności (T) dla wybranych laktonów

Związek	Skórek zbożowy	Wołek zbożowy	Trojszyk ulec	
	( <i>Trogoderma granarium</i> Ev.) Larwy	( <i>Sitophilus granarius</i> L.) Chrząszcze	( <i>Tribolium confusum</i> Duv.) Larwy	( <i>Tribolium confusum</i> Duv.) Chrząszcze
 1	3,3	57,0	-26,4	40,0
 2	22,9	86,6	95,5	80,4
 6	83,5	95,5	50,1	<b>118,3</b>
 7	76,2	87,0	<b>115,5</b>	<b>132,6</b>
 8	84,8	<b>104,1</b>	<b>110,6</b>	47,7
 9	86,3	49,5	<b>137,8</b>	<b>111,5</b>
 11	1,7	64,7	25,8	78,2
 12	63,5	<b>101,1</b>	87,9	99,5
 14	63,0	<b>108,6</b>	<b>100,5</b>	<b>129,0</b>
 15	51,3	59,6	<b>145,8</b>	90,6
 16	58,9	<b>103,7</b>	96,9	65,7

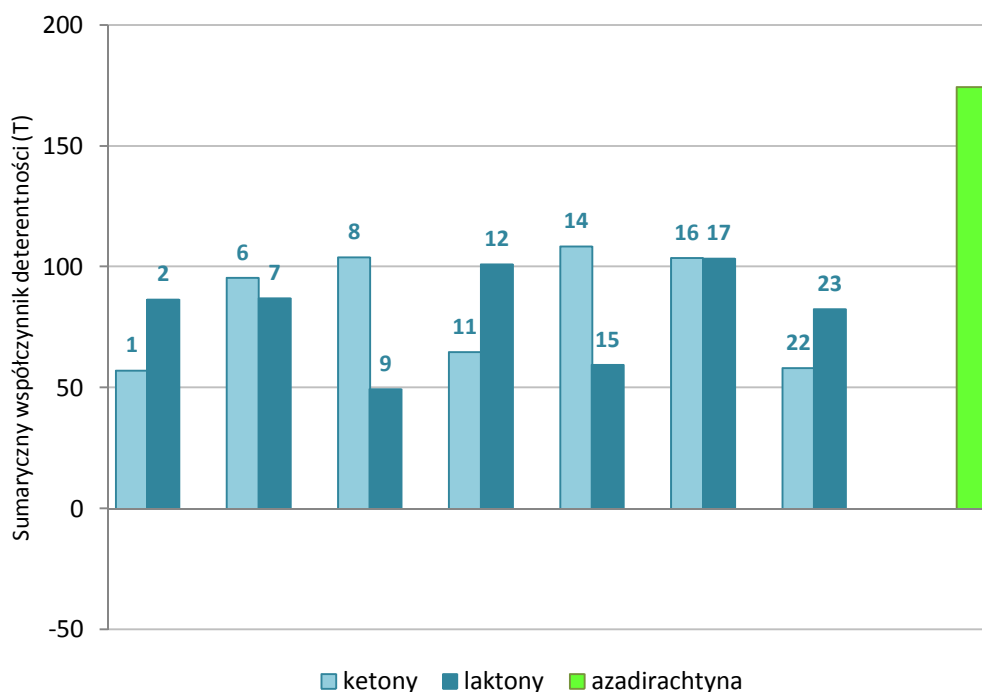
	32,3	103,5	141,5	108,9
	79,2	58,1	64,4	-27,9
	-41,0	82,6	117,3	88,1
	68,1	119,5	128,4	87,9
<b>Azadirachtyna</b>	<b>194,2</b>	<b>174,3</b>	<b>188,4</b>	<b>185,0</b>



Wykres 1. Sumaryczne współczynniki deterentności (T) poszczególnych związków wobec larw skórka zbożowego

Wykres 1 obrazuje aktywność deterentną badanych związków względem larw skórka zbożowego. Sumaryczny współczynnik deterentności (T) dla żadnego z badanych związków nie przekroczył wartości 100. Ketony **6**, **8**, **14**, **16** i **22** oraz laktony **7**, **9**, **12** i **15** wykazują średnią aktywność. Spośród nich najbardziej aktywny jest lakton **9**. Współczynnik T dihydrokumaryny (**23**) ma wartość ujemną. Jest zatem atraktantem pokarmowym dla tego owada. Aktywność pozostałych

badanych związków jest niska. Nie zaobserwowałam też zależności pomiędzy budową związku a jego aktywnością. W dwóch przypadkach związek z pierścieniem laktonowym jest aktywniejszy niż keton, z którego został otrzymany. W pozostałych przypadkach wprowadzenie atomu tlenu do pierścienia ketonowego obniża aktywność związku. Skrajnym przykładem jest tutaj para indanon (**22**) i dihydrokumaryna (**23**), gdzie keton jest antyfidantem podczas gdy lakton atraktantem.

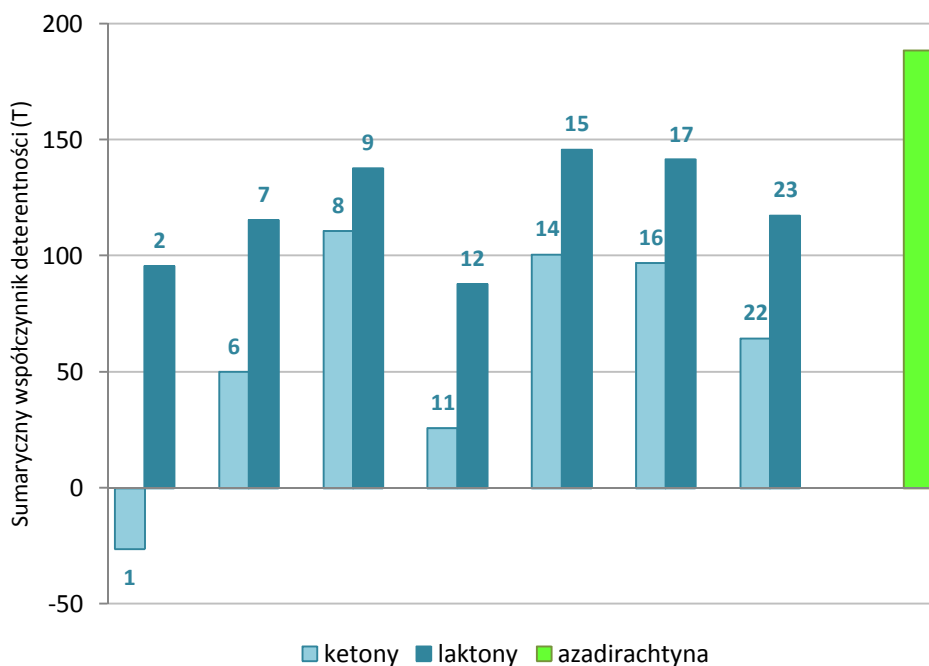


Wykres 2. Sumaryczne współczynniki deterentności (T) poszczególnych związków wobec chrząszczy wołka zbożowego

Jak wynika z danych zawartych w Tabeli 30 oraz z Wykresu 2, wszystkie badane związki w stosunku do chrząszczy wołka zbożowego wykazały średnią i dobrą aktywność deterentną. W przypadku ketonów **8**, **14** i **16** oraz laktonów **12** i **17**, aktywność ta jest wysoka. Pozostałe badane związki wykazują średnią aktywność antyfidantną. Również w tym przypadku żaden ze związków nie posiada aktywności porównywalnej ze wzorcem, jakim jest azadirachtyna, a zatem mają małe szanse na zastosowanie jako środek do ograniczania populacji wołka zbożowego.

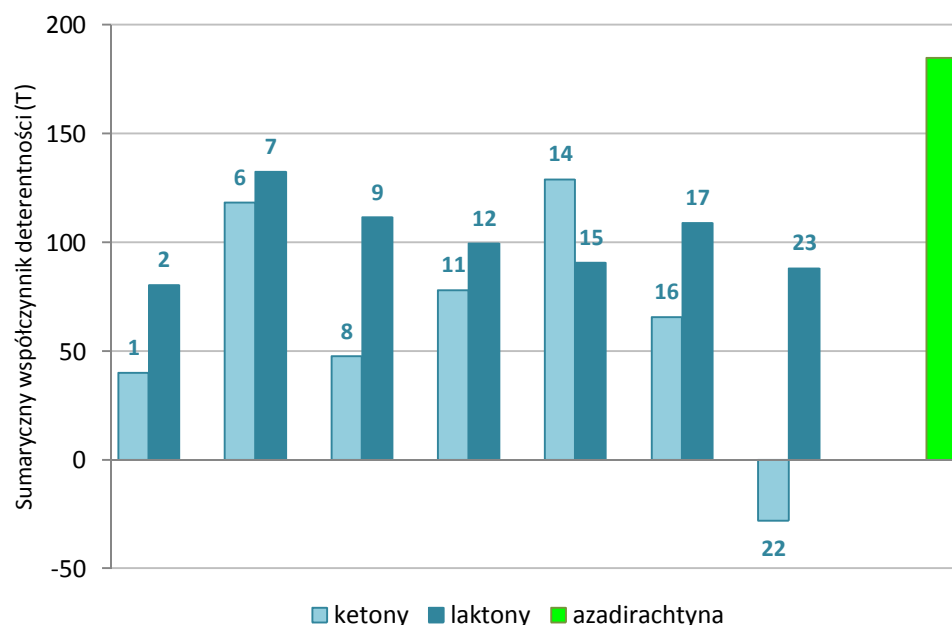
Wyniki testów na aktywność deterentną w stosunku do larw trojszyka ulca, przedstawione w Tabeli 30 oraz na Wykresie 3 wskazują, że wszystkie związki z wyjątkiem 1-tetralonu (**1**) posiadają średnią i dobrą aktywność deterentną. Wyraźnie widoczna jest zależność aktywności związku od jego budowy. We wszystkich przypadkach laktony są znacznie silniejszymi deterentami pokarmowymi niż ketony, z których je otrzymano. Aktywność pięciu laktonów (**7**, **9**, **15**, **17**, **23**) można określić jako wysoką. Pozostałe dwa laktony (**2**, **12**) są średnio-aktywne. Spośród nich najwyższą aktywnością cechują się  $\epsilon$ -laktony z dwiema grupami metoksyłowymi w pierścieniu aromatycznym (**15** i **17**).

Godny uwagi jest fakt, że po wprowadzeniu ugrupowania laktonowego do cząsteczki 1-tetralonu (**1**), związek z atraktanta staje się deterentem pokarmowym.



**Wykres 3.** Sumaryczne współczynniki deterentności (T) poszczególnych związków wobec larw trojszyka ulca

Podobnie jak w przypadku larw trojszyka ulca, również w przypadku chrząszczy tego owada możemy obserwować zależność, że aktywność  $\epsilon$ -laktonów jest wyższa niż odpowiadających im ketonów. Wyjątkiem jest tutaj para keton **14** i lakton **15**. W tym przypadku wprowadzenie tlenu laktonowego skutkowało obniżeniem aktywności związku. Godny uwagi jest fakt, że keton **1**, będący atraktantem dla larw, jest deterentem dla chrząszczy tego samego gatunku owada. Odwrotna sytuacja dotyczy indanonu (**22**). Związek ten jest antyfidantem w stosunku do larw, a atraktantem w stosunku do chrząszczy trojszyka ulca.



**Wykres 4.** Sumaryczne współczynniki deterentności (T) poszczególnych związków wobec Ichrząszczy trojszyka ulca

Większość otrzymanych przeze mnie związków wykazuje średnią lub dobrą aktywność deterentną wobec szkodników magazynów zbożowych. W większości przypadków laktony są znacznie silniejszymi deterentami pokarmowymi niż ketony, z których je otrzymano. Zależność aktywności związku od jego budowy jest szczególnie widoczna w przypadku aktywności względem larw i chrząszczy trojszyka ulca. Analizując wyniki badań deterentności względem tego owada można zaobserwować różnice w aktywności danego związku na różne stadia jego rozwoju.

## 5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. W wyniku chemicznej reakcji Baeyera-Villigera otrzymałam z dobrą wydajnością (66-81%) osiem nasyconych  $\epsilon$ -laktonów: benzoksepan-2-on (**2**) oraz jego monometoksy- (**7**, **9**, **12**), dimetoksy- (**15**, **17**) i metylo pochodne (**19**, **21**) oraz jeden  $\delta$ -lakton – 3,4-dihydrokumarynę (**23**). Laktony **7**, **12**, **15**, **17**, **19** i **21** były związkami nowymi. We wszystkich przypadkach widoczna jest bardzo wysoka regioselektywność reakcji. Inercja atomu tlenu następuje zawsze pomiędzy karbonylowym atomem węgla, a wyżej podstawionym atomem węgla w pozycji  $\alpha$  względem grupy karbonylowej, w tym przypadku atomem węgla pierścienia aromatycznego.
2. W przypadku utleniania 1-tetralonu (**1**), 6-metoksy-1-tetralonu (**8**) i 7-metoksy-1-tetralonu (**11**) z udziałem nadkwasu, po reakcji Baeyera-Villigera następowała elektrofilowa hydroksylacja pierścienia aromatycznego, w wyniku której otrzymałam trzy hydroksylaktony: 9-hydroksybenzoksepan-2-on (**3**), 8-hydroksy-7-metoksybenzoksepan-2-on (**10**) i 7-hydroksy-8-metoksybenzoksepan-2-on (**13**). Czynnikiem aktywującym stanowi alkoksylowy atom tlenu ugrupowania laktonowego lub grupa metoksylova. Dwa z otrzymanych laktonów (**10** i **13**) są związkami nieopisanymi dotąd w literaturze.
3. Spośród dwudziestu czterech szczepów drożdży wyselekcjonowałam dwa zdolne do katalizowania utlenienia typu Bayera-Villigera pochodnych tetralonu. Szczep *Penicillium chermesinum* (AM113) katalizował utlenienie 5-metoksy- (**6**), 7-metoksy- (**11**), 5,8-dimetoksy- (**14**) i 6,7-dimetoksytetralonu (**16**), natomiast *Penicillium frequentans* (AM359) katalizował utlenienie 1-tetralonu (**1**), 5-metoksy- (**6**), 6-metoksy- (**8**), 7-metoksy- (**11**), 6,7-dimetoksy (**16**), 2-metylo- (**18**) i 4-metylotetralonu (**20**) do odpowiednich  $\epsilon$ -laktonów. Wydajność izolowana wynosiła od 18 do 56%. Ze względu na zbyt niski stopień przereagowania nie udało się wyizolować produktów utlenienia ketonów **18** i **20**.
4. Dwa szczepy drożdży *Rhodotorula marina* (AM77) i *Rhodotorula rubra* (AM82) posiadały zdolność redukcji grupy karbonylowej badanych ketonów. 1-Tetralon (**1**) redukowany był w kulturach obu szczepów do alkoholu z przewagą enancjomeru *R*. W kulturze szczepu *R. rubra* (AM82) nadmiar enancjomeryczny wynosił aż 99%. Oba szczepy wykazywały także zdolność do redukcji 5-metoksy-1-tetralonu (**6**) do alkoholu z przewagą enancjomeru *S*. Także w tym przypadku wyższą enancjoselektywnością cechowała się biotransformacja w kulturze



- szczepu *R. rubra* (AM82) (99%*ee*), jednak stopień przereagowania był wyższy w biotransformacji w kulturze *R. marina* (AM77). Do redukcji grupy karbonylowej 7-metoksy-1-tetralonu (**11**) zdolny był jedynie szczep *R. rubra* (AM82). Biotransformacja w kulturze tego szczepu skutkowała otrzymaniem enancjomerycznie wzbogaconego alkoholu **30** z przewagą enancjomeru *R* (35%*ee*).
5. Transformacje ketonów **1, 6, 8, 11, 14** i **16** z udziałem monooksygenazy cykloheksanonu z *Acinetobacter sp.* rekombinowanej w *E. coli* prowadziły do otrzymania  $\epsilon$ -laktonów **2, 7, 9, 12, 15** i **17**. Stopień przereagowania ( $\leq 9\%$ ) nie był wystarczający, by można było przeprowadzić biotransformacje na skalę preparatywną. Zatem w przypadku pochodnych 1-tetralonu biotransformacje w kulturach całych komórek grzybów strzępkowych są wydajniejszym i tańszym sposobem otrzymania produktów utlenienia typu Baeyera-Villigera niż biotransformacje z wykorzystaniem powyższego enzymu.
  6. Biotransformacje mono- (**7, 9, 12**) i dimetoksypochodnych (**15, 17**) benzoksepan-2-onu w kulturze szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112) skutkowały otrzymaniem produktów hydrolizy pierścienia laktonowego – kwasu 4-(2-hydroksyfenylo)masłowego (**31**) oraz jego monometoksy- (**32, 33, 34**), dimetoksypochodnych (**35, 36**), z których związki **32, 35** i **36** nie były dotąd opisywane w literaturze. Szczep ten katalizował również biotransformację kumaryny (**37**). W wyniku tej transformacji powstawał  $\delta$ -lakton – 3,4-dihydrokumaryna (**23**) – produkt redukcji wiązania podwójnego. W kolejnym etapie następowała hydroliza pierścienia laktonowego prowadząca do powstania kwasu 3-(2-hydroksyfenylo)propionowego (**39**).
  7. Trzy spośród dwudziestu czterech badanych szczepów wykazały zdolność hydroksylacji pierścienia aromatycznego laktonów **7, 9** i **12**. Są to szczepy *Penicillium vermiculatum* (AM81), *Penicillium chermesinum* (AM113) i *Penicillium frequentans* (AM359). Spośród nich najefektywniejszym katalizatorem jest szczep *P. frequentans* (AM359). W wyniku biotransformacji w kulturze tego szczepu otrzymałam hydroksylaktony: 8-hydroksy-7-metoksybenzoksepan-2-on (**10**) i 7-hydroksy-8-metoksybenzoksepan-2-on (**13**), 7-hydroksy-6-metoksybenzoksepan-2-on (**26**) i 9-hydroksy-6-metoksybenzoksepan-2-on (**27**). Szczep ten wykazuje regioselektywność, katalizując hydroksylację w pozycjach *orto* (**10, 13, 26**) lub *para* (**27**) w stosunku do grupy metoksylowej obecnej w cząsteczce substratu. Szczep *P. frequentans* (AM359) katalizował także hydroksylację kumaryny (**37**), w wyniku czego otrzymałam 5-hydroksykumarynę (**38**).
  8. Testy biologiczne na aktywność antyfidantną przeprowadzone w stosunku do mszycy brzoskwiowej dla sześciu  $\epsilon$ -laktonów, dihydrokumaryny (**23**), siedmiu ketonów - substratów

do otrzymania tych laktonów oraz kumaryny (**37**) wykazały, że wprowadzenie alkoksylogowego atomu węgla do cząsteczki ketonu skutkuje wzrostem aktywności związku. Spośród badanych związków najwyższą aktywność wykazuje 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-on (**17**), który bardzo efektywnie ogranicza żerowanie mszycy już w pierwszej godzinie testowania. Aktywność ta utrzymuje się przez cały czas trwania testu.

9. Sumaryczne współczynniki deterentności (T) większości otrzymanych przeze mnie związków wykazują średnią lub dobrą aktywność deterentną wobec szkodników magazynowych: chrząszczy wołka zbożowego, larw skórka zbożowego oraz chrząszczy i larw trojszyka ulca. Zależność aktywności związku od jego budowy jest szczególnie widoczna w przypadku aktywności względem larw i chrząszczy trojszyka ulca. Laktony są znacznie silniejszymi deterentami pokarmowymi niż ketony, z których je otrzymano.

## 6. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 6.1. Metody analityczne

**Chromatografię kolumnową** wykonano stosując kolumny szklane oraz wypełnienie w postaci żelu krzemionkowego Kieselgel 60 (230-400 mesh, Merc), stosując jako eluenty mieszaniny rozpuszczalników organicznych (heksan, eter dietylowy, chloroform, chlorek metylenu, aceton, octan etylu) w różnych proporcjach.

**Chromatografię cienkowarstwową (TLC- Thin Layer Chromatography)** wykonano stosując płytki aluminiowe pokryte żelem krzemionkowym 60 F<sub>254</sub> Merck. Chromatogramy wywoływano używając wywoływacza anyżowego, w skład którego wchodzi: alkohol metylowy (45 cm<sup>3</sup>), stężony kwas siarkowy (VI) (5 cm<sup>3</sup>) oraz aldehyd anyżowy (0,1 cm<sup>3</sup>) lub 5% roztworu chlorku glinu w metanolu. Eluentami były mieszaniny rozpuszczalników organicznych (heksan, eter dietylowy, chloroform, chlorek metylenu, aceton, octan etylu) proporcjach dobieranych do każdej mieszaniny produktów.

**Chromatografię gazową (GC –Gas Chromatography)** wykonano na aparacie Agilent Technologies 6890 N z kolumnami kapilarnej HP-5 (Crosslinked 5 % Ph Me Siloxane) (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm) oraz DB-17 (30m x 0.25 mm x 0.25 μm). W celu określenia składu enancjomerycznego produktów chiralnych stosowano kolumnę z wypełnieniem chiralnym Supelco BETA DEXTM 325 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm).

**Widma <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT 135, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC i <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC** wykonano na spektrometrach: Bruker Avance II 600 MHz (Laboratorium Badań Strukturalnych NMR Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej) oraz Bruker Avance DRX 300 MHz (Laboratorium NMR Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej).

**Widma w zakresie podczerwieni (IR)** wykonano za pomocą spektrometru Mattson IR 300 Thermo Nicolet. Próbkę przygotowano w postaci filmu na płytkach z KBr lub w przypadku ciał stałych w postaci pastylek z KBr.

**Temperatury topnienia** (niekorygowane) oznaczono na bloku grzewczym Kofflera firmy Boetius.

**Skręcalność właściwą** oznaczono za pomocą automatycznego polarymetru AUTOPOL 4 firmy Rudolph Research. Pomiary wykonano w roztworze  $\text{CHCl}_3$ , o stężeniu podanym w  $\text{g}/100 \text{ cm}^3$

**Pomiary pH** wykonano za pomocą pH-metru HI 9321 Microprocesor z elektrodą szklaną.

**Pomiary krystalograficzne** wykonano w Zakładzie Krystalografii na Uniwersytecie Wrocławskim przy użyciu dyfraktometru KM4CCD z przystawką Oxford Cryosystem, w temperaturze 100K z zastosowaniem pominięcia  $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda=0.71073\text{\AA}$ ) monochromatyzowanego grafitem. Do korekcji danych doświadczalnych zastosowano program CrysAlis Red [142] uwzględniając poprawkę na czynnik Lorentza oraz polaryzacyjny. Struktury rozwiązano metodami bezpośrednimi i udokładniono pełnomacierzowo metoda najmniejszych kwadratów. W celu rozwiązania graficznej prezentacji struktur użyto programów pakietu SHELXTL (Brucker 1999)[143]

## 6.2 Synteza laktonów skondensowanych z pierścieniem aromatycznym

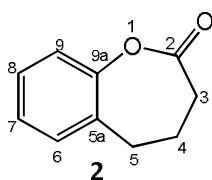
$\epsilon$ -Laktony ze skondensowanym pierścieniem aromatycznym: benzoksepan-2-on (**2**), 9-hydrokso- (**3**), 6-metokso- (**7**), 7- metokso- (**9**), 8-hydrokso-7-metokso- (**10**), 8- metokso- (**12**), 7-hydrokso-8- metokso- (**13**), 6,9-dimetokso- (**15**), 7,8-dimetokso- (**17**), 3-metylo- (**19**), 5-metylobenzoksepan-2-on (**21**) oraz 3,4-dihydrokumarynę (**23**) otrzymano w wyniku reakcji utleniania typu Baeyera-Villigera. Substratami w ich syntezie były zakupione w firmie Sigma Aldrich 1-tetralon (**1**) i jego pochodne: 5-metokso- (**6**), 6-metokso- (**8**) 7-metokso- (**11**), 5,8-dimetokso- (**14**), 6,7-dimetokso- (**16**), 2-metylo- (**18**), 4-metylo-1-tetralon (**20**) oraz 1-indanon (**22**).

9-Metoksobenzoksepan-2-on (**24**) otrzymano w wyniku reakcji Williamsona. Substratem tej reakcji był 9-hydroksobenzoksepan-2-on (**3**).

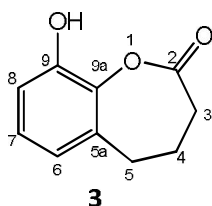
### Benzoksepan-2-on (**2**) i 9-hydroksobenzoksepan-2-on (**3**)

W kolbie kulistej umieszczono 1.46g (0.01 mola) ketonu **1** rozpuszczonego w 25 ml chlorku metylenu, wkroplono 3.45 g (0.02 mola) osuszonego *m*-CPBA w 50 ml chlorku metylenu i mieszano na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 3 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną przeniesiono do rozdzielacza i trzykrotnie przemywano nasyconym roztworem  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Frakcję organiczną przemyto nasyconymi roztworami  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  i osuszono bezwodnym  $\text{MgSO}_4$ . Odparowano rozpuszczalnik a surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan: aceton, 2:1). Otrzymano 1.31g (81%) czystego laktonu **2**. Frakcję zawierającą  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  zakwaszono 6M roztworem  $\text{HCl}$  do  $\text{pH}=1$ . Wytrącony kwas *m*-chlorobenzoesowy

oddzielono na lejku Shotta a przesącz ekstrahowano trzykrotnie chlorkiem metylenu. Frakcję organiczną osuszono bezwodnym  $MgSO_4$  a rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 2:1:1). Otrzymano 53 mg (3%) laktonu **3**. Stałe fizyczne i spektroskopowe otrzymanych laktonów podano niżej.



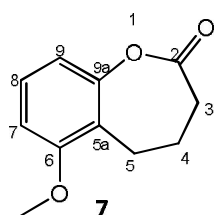
Gęsty olej,  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2.18 (kwintet,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -4), 2.47 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -3), 2.82 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -5), 7.06 (m, Hz, 1H, H-9), 7.14(m, 1H, H-7), 7.19 (m, 1H, H-6), 7.27 (m, 1H, H-8);  $^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 25.58 (C-4), 28.29 (C-5), 31.13 (C-3), 119.34 (C-9), 125.95 (C-7), 128.36 (C-8), 129.71(C-6), 130.11 (C-5a), 151.85 (C-9a), 171.69 (C-2); IR (film,  $cm^{-1}$ ): 2950 (m), 1734 (s), 1454 (s), 1222 (s), 758 (m)



Gęsty olej,  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2.17 (kwintet,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -4), 2.48 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -3), 2.76 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -5), 5.49 (s, 1H, -OH), 7.03 (dd,  $J=7.5$  i 1.6 Hz, 1H, H-8), 7.14 (t,  $J=7.5$  Hz, 1H, H-7), 7.18 (dd,  $J=7.5$  i 1.6 Hz, 1H, H-6);  $^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 24.00(C-4), 31.78 (C-5), 34.60(C-3), 116.65(C-8), 119.12(C-6), 124.76(C-7), 137.05(C-5a), 138.95 (C-9a), 151.39(C-9), 173.69(C-2); IR (film,  $cm^{-1}$ ): 3493(m), 1756(s), 1224(s), 856(m)

### 6-Metoksybenzoksepan-2-on (7)

W kolbie kulistej umieszczono 0.88 g (0.005 mola) ketonu **6** rozpuszczonego w 25 ml chlorku metylenu, wkroplono 1.73 g (0.01 mola) osuszonego kwasu *m*-chloroperoksybenzoesowego (*m*-CPBA) w 50 ml chlorku metylenu i mieszano na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 3 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną przemyto trzykrotnie nasyconymi roztworami soli  $Na_2SO_3$ ,  $NaHCO_3$ ,  $NaCl$  i osuszono bezwodnym  $MgSO_4$ . Odparowano rozpuszczalnik a surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan: aceton, 2:1). Otrzymano 0.67 g (70%) czystego laktonu **7** o następujących stałych spektroskopowych:

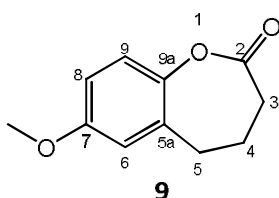


Gęsty olej,  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2.12 (kwintet,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -4), 2.46 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -3), 2.88 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $CH_2$ -5), 3.83 (s, 3H,  $-OCH_3$ ), 6.72 (d,  $J=8.3$ Hz, 1H, H-7), 6.75 (d,  $J=8.3$ Hz, 1H, H-9), 7.19 (t,  $J=8.3$  Hz, 1H, H-8);  $^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 19.87 (C-4), 25.81 (C-5), 31.37 (C-3), 55.87 (C-10), 107.98 (C-7), 111.78 (C-9), 118.64 (C-5a), 127.74 (C-8), 152.73 (C-9a),

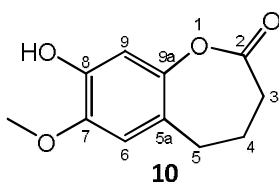
157.21 (C-6), 171.78 (C-2); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2941 (m), 1766 (s), 1467 (s), 1217 (s), 783 (m), 726 (m)

### 7-Metoksybenzoksepan-2-on (9) i 8-hydroksy-7-metoksybenzoksepan-2-on (10)

W kolbie kulistej umieszczono 1.76 g (0.01 mola) ketonu **8** rozpuszczonego w 25 ml chlorku metylenu, wkroplono 3.45 g (0.02 mola) osuszonego *m*-CPBA w 50 ml chlorku metylenu i mieszano na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 4 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną przeniesiono do rozdzielacza i trzykrotnie przemywano nasyconymi roztworami soli  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  i osuszono bezwodnym  $\text{MgSO}_4$ . Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan: aceton, 2:1). Otrzymano 1.29g (67%) czystego laktonu **9**. Roztwór wodny  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  zakwaszono roztworem  $\text{HCl}$  o stężeniu 2 mole/ $\text{dm}^3$  do  $\text{pH}=1$ . Wytrącony kwas *m*-chlorobenzoesowy oddzielono na lejku Shota a przesącz ekstrahowano trzykrotnie chlorkiem metylenu. Frakcję organiczną osuszono bezwodnym  $\text{MgSO}_4$  a rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 2:1:1). Otrzymano 13mg (7%) hydroksylaktonu **10**. Stałe fizyczne i spektroskopowe otrzymanych laktonów podano poniżej.



Gęsty olej  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.16 (kwintet,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.45 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.77 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 3.78 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 6.75 (d,  $J=3.0$  Hz, 1H, H-6), 6.78 (dd,  $J=8.7$  and 3.0 Hz, 1H, H-8) 7.02 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H, H-9);  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 26.42 (C-4), 28.63 (C-5), 31.12 (C-3), 55.74 (C-10), 112.64 (C-8), 115.22 (C-6), 120.15 (C-9), 131.30 (C-5a), 145.61 (C-9a), 157.32 (C-7), 172.27 (C-2); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2944 (m), 1762 (s), 1492 (s), 1203 (s), 872 (m), 807 (m)

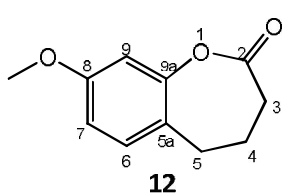


t.t. = 129 - 131 $^\circ\text{C}$   $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.16 (kwintet,  $J=7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.47 (t,  $J=7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.74 (t,  $J=7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 3.89 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 5.65 (s, 1H, -OH), 6.65 (s, 1H, H-9), 6.71 (s, 1H, H-6);  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 26.92 (C-4), 27.95 (C-5), 31.09 (C-3), 55.30 (C-10), 105.53 (C-9), 111.27 (C-6), 120.92 (C-5a), 144.02 (C-9a), 144.99 (C-8), 145.43 (C-7), 172.12 (C-2); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3337 (m), 1738 (s), 1510 (m), 1227 (s), 879 (m)

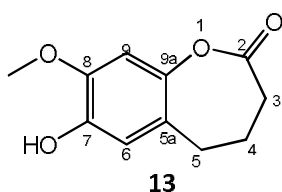
### 8-Metoksybenzoksepan-2-on (12) 7-hydroksy-8-metoksybenzoksepan-2-on (13)

Laktony **12** i **13** otrzymano poddając 7-metoksy-1-tetralon **11** (1.76 g, 0.01 mola) reakcji z *m*-CPBA (3.45 g, 0.02 mola) według procedury otrzymywania i oczyszczania laktonów **9** i **10**.

W wyniku reakcji otrzymano 1.34 g (70%) laktonu **12** i 0.17 g (8%) laktonu **13** o następujących stałych fizycznych i spektroskopowych:



Gęsty olej,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.15 (kwintet,  $J=7.2$  Hz 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.51 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.79 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 3.82 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 6.69 (d,  $J=2.5$  Hz, 1H, H-9), 6.73 (dd,  $J=8.3$  and 2.5 Hz, 1H, H-7), 7.11 (d,  $J=8.3$  Hz, 1H, H-6);  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 26.28 (C-4), 26.86 (C-5), 30.61 (C-3), 54.90 (C-10), 104.79 (C-9), 110.62 (C-7), 121.34 (C-5a), 129.35 (C-6), 151.79 (C-9a), 169.01 (C-8), 171.05 (C-2); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2949 (m), 1765 (s), 1619 (s), 1504 (s), 1217 (s), 838 (m)



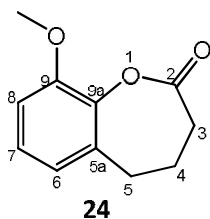
t.t. = 130 - 132°C  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.15 (kwintet,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.47 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.71 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 3.87 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 5.48 (s, 1H, -OH), 6.68 (s, 1H, H-9), 6.77 (s, 1H, H-6),  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 26.86 (C-4), 27.63 (C-5), 31.15 (C-3), 56.26 (C-10), 103.10 (C-9), 114.83 (C-6), 122.36 (C-5a), 143.00 (C-7), 144.52 (C-9a), 145.61 (C-8), 172.34 (C-2); IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3393 (s), 1754 (s), 1600 (m), 1512 (s), 856 (s), 707 (m)

Dane krystalograficzne dla 7-hydroksy-8-metoksybenzoksepan-2-onu **13**

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ,  $M = 208.21$ , bezbarwna bryła, wymiary kryształu  $0.23 \times 0.21 \times 0.06$  mm, układ jednoskośny, grupa przestrzenna  $P21/c$ ,  $a = 9.243(2)$ ,  $b = 8.355(2)$ ,  $c = 14.567(5)$  Å,  $\beta = 119.64(2)^\circ$ ,  $V = 977.7(5)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 4$ ,  $D_c = 1.414$  Mg m<sup>-3</sup>,  $T = 100(2)$  K,  $R = 0.038$ ,  $wR = 0.092$  (1461 refleksów z  $I > 2\sigma(I)$ ) dla 137 parametrów.

### 9-Metoksybenzoksepan-2-on (**24**)

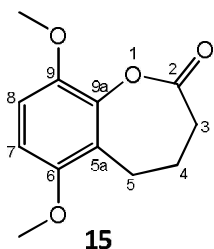
W kolbie kulistej o pojemności 20 ml umieszczono mieszaninę złożoną z 0.15 g (0.84 mmola) 9-hydroksybenzoksepan-2-onu (**3**), 0.1 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 3 ml bezwodnego acetonu. Wkroplono za pomocą strzykawki 1 ml jodku metylu. Kolbę osłonięto folią aluminiową w celu ograniczenia dostępu światła. Reakcję prowadzono na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez pięć dni. Po tym czasie odsączono  $\text{K}_2\text{CO}_3$  i odparowano aceton na wyparce próżniowej. Dodano 15 ml nasyconego roztworu NaCl i ekstrahowano eterem dietylowym (3x25 ml). Ekstrakt osuszono bezwodnym  $\text{MgSO}_4$ . Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan : aceton, 4:1). Otrzymano 97 mg (52%) laktonu **24** o następujących danych spektroskopowych:



t.t. = 127 - 130°C  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.17 (kwintet,  $J=7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.48 (t,  $J=7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.56 (t,  $J=7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 3.81 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 7.09 (dd,  $J= 7.5$  i 1.6 Hz, 1H, H-8), 7.14 (t,  $J= 7.5$  Hz, 1H, H-7), 7.17 (dd,  $J= 7.5$  i 1.6 Hz, 1H, H-6),  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 23.99 (C-4), 27.88 (C-5), 34.99 (C-3), 56.78 (C-10), 112.15 (C-8), 120.14 (C-5a), 123.88 (C7), 137.92 (C-6), 140.98 (C-9a), 155.62 (C-9), 168.32 (C-2); **IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3393 (s), 1754 (s), 1600 (m), 1512 (s), 856 (s), 707 (m)

### 6,9-Dimetoksybenzoksepan-2-on (15)

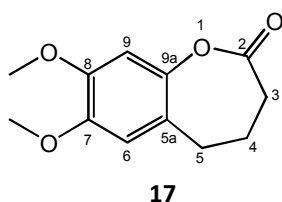
Utlenienie 5,8-dimetoksy-1-tetralonu (**14**) (2.06 g, 0.01 mola) za pomocą *m*-CPBA (3.45g, 0.02 mola) prowadzono analogicznie jak w przypadku utlenieni ketonu **1**. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan : aeton : chloroform, 2:1:1) otrzymując 1.60 g (72%) czystego laktonu **15** o następujących stałych spektroskopowych:



t.t. = 174 - 176°C  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.11 (kwintet,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.46 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 2.87 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 3.77 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.79 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.66 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H, H-7), 6.78 (d,  $J=9.0$  Hz, 1H, H-8);  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 20.40 (C-4), 25.86 (C-5), 31.44 (C-3), 55.27 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -9), 55.66 ( $\text{CH}_3\text{O}$ -6), 107.90 (C-7), 111.09(C-8), 120.44 (C-5a), 141.64 (C-9a), 144.03(C-9), 150.69 (C-6), 171.33 (C-2); **IR** (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2943 (m), 1757 (s), 1495 (s), 1263 (s), 1092 (s), 790 (m)

### 7,8-Dimetoksybenzoksepan-2-on (17)

Lakton **17** (1.67 g, 72%) otrzymano w ten sam sposób jak lakton **15**. Poddając reakcji 6,7-dimetoksytetralon **16** (2.06 g, 0.01 mola) i *m*-CPBA (3.45g, 0.02 mola). Poniżej podano stałe spektroskopowe otrzymanego laktonu:

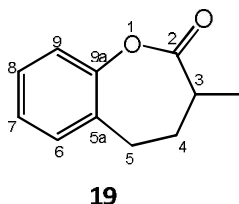


t.t. = 166 - 168°C  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.17 (p,  $J=7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.47 (t,  $J=7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.74 (t,  $J=7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 3.84 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.86 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 6.658 (s 1H, 1 z H-9), 6.664 (s, 1H, 1 z H-6);  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 26.94 (C-4), 27.83(C-5), 31.15 (C-3), 56.11 ( $-\text{OCH}_3$ ), 56.26 ( $-\text{OCH}_3$ ), 103.07 (C-9), 112.03(C-6), 121.19(C-5a), 145.03(C-9a), 146.35 (C-8), 148.32(C-7), 177.12 (C-2); **IR** (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2928 (m), 2854 (s), 1754 (s), 1598 (s), 1511 (s), 1260 (s), 1030 (s), 795 (m)



**3-Metylobenzoksepan-2-on (19)**

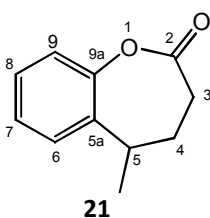
Utlenienie 2-metylo-1-tetralonu (**18**) (1.60 g, 0.01 mola) za pomocą *m*-CPBA (3.45g, 0.02 mola) prowadzono analogicznie jak w przypadku ketonu **14**. Surowy produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan : aeton : chloroform, 4:1) otrzymując 1.28 g (73%) czystego laktonu **19** o następujących stałych spektroskopowych:



Gęsty olej,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.26 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1.77 (m, 1H, 1 z  $\text{CH}_2$ -4), 1.97 (m, 1H, 1 z  $\text{CH}_2$ -4), 2.58 (m, 1H, H-3), 2.69 (t,  $J=7.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 6.82 (dd,  $J=8.3$  i 1.1 Hz, 1H, H-9), 6.86 (td,  $J=7.4$  i 1.1 Hz, 1H, H-7), 7.09-7.14 (m, 2H, H-6 i H-8);  $^{13}\text{C NMR}$  (C300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 17.23 ( $-\text{CH}_3$ ), 27.89 (C-5), 33.49 (C-4), 38.75 (C-3), 115.77 (C-9), 120.66 (C-7), 127.29 (C-5a), 127.63 (C-8), 130.23 (C-6), 153.98 (C-9a), 183.56 (C-2); **IR** (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3329 (m), 2945 (m), 1758 (s), 1486 (s), 1211 (s), 733 (s)

**5-Metylobenzoksepan-2-on (21)**

Lakton **21** (1.16 g, 66%) otrzymano w ten sam sposób jak lakton **14**. Poddając reakcji 4-metylo-1-tetralon (**20**) (1.60 g, 0.01 mola) i *m*-CPBA (3.45g, 0.02 mola). Poniżej podano stałe spektroskopowe otrzymanego laktonu:

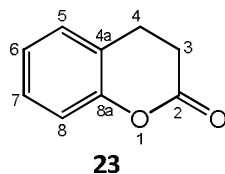


Gęsty olej,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 1.38 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.59-1.69 (m, 1H, 1 z  $\text{CH}_2$ -4), 2.31-2.46 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ -3 i 1 z  $\text{CH}_2$ -4), 3.21 (m, 1H, CH-5), 7.07-7.10 (m, 1H, H-9), 7.23-7.31 (m, 3H, H-6, H-7, H-8)ppm;  $^{13}\text{C NMR}$  (C300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 17.47 ( $-\text{CH}_3$ ), 31.28 (C-3 lub C-5), 31.32 (C-3 lub C-5), 34.99 (C-4), 119.29 (C-9), 125.73 (C-6, C-7 lub C-8), 126.06 (C-6, C-7 lub C-8), 127.96 (C-6, C-7 lub C-8), 133.74 (C-5a), 151.57 (C-9a), 171.87 (C-2)ppm; **IR** (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2954 (m), 1758 (s), 1454 (s), 1213 (s), 997 (s), 733 (m)

**3,4-Dihydrokumaryna (23)**

Utlenienie indanonu (**22**) (1.32 g, 0.01 mola) za pomocą *m*-CPBA (3.45g, 0.02 mola) prowadzono analogicznie jak w przypadku ketonu **6**. Surowy produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii

kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan : aceton, 2:1) otrzymując 1.14 g (77%) czystego laktonu **23** o następujących stałych fizycznych i spektroskopowych:



t.t. = 20-23° C, (lit.: 21-22°C [144,145])  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.76 (t,  $J=7.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.98 (t,  $J=7.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 7.02 (dd,  $J=8.1$  i 1.1 Hz, 1H, H-8), 7.07 (ddd,  $J=8.1$ , 7.5 i 1.1 Hz, 1H, H-6), 7.17 (dd,  $J=7.5$  i 1.1 Hz, 1H, H-5); 7.23 (td,  $J=8.1$  i 1.1 Hz, 1H, H-7);  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 23.69 (C-4), 29.21 (C-3), 116.90 (C-8), 122.61 (C-4a), 124.37 (C-6), 128.00 (C-7), 128.24 (C-5), 151.96 (C-8a), 168.56 (C-2); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1772 (s), 1228 (s), 1124 (s), 760 (s).

### 6.3 Hydroksylacja pierścienia aromatycznego z wykorzystaniem peroksy kwasów

#### 6.3.1 Procedura ogólna hydroksylacji z wykorzystaniem kwasu *m*-chloroperoksybenzoesowego (*m*-CPBA)

W kolbie kulistej umieszczano ok. 0.005 mola substratu rozpuszczonego w 10 ml chlorku metylenu (lub chloroformu), wkraplano od 0.005 do 0.05 mola osuszonego *m*-CPBA w 30 ml chlorku metylenu (lub chloroformu) i mieszano na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 5 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną przenoszono do rozdzielacza i trzykrotnie przemywano nasyconym roztworem soli  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Frakcje rozdzielono. Frakcję wodną zakwaszono 1M roztworem HCl do pH=1. Wytrącony kwas *m*-chlorobenzoesowy oddzielono na lejku Shotta a przesącz ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 50 ml). Ekstrakt osuszono bezwodnym  $\text{MgSO}_4$  a rozpuszczalnik odparowano na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 2:1:1).

Z oddzielonej wcześniej frakcji organicznej odzyskiwano nieprzereagowany substrat, poprzez przemycie nasyconymi roztworami  $\text{NaHCO}_3$ , NaCl, osuszenie bezwodnym  $\text{MgSO}_4$ , odparowanie rozpuszczalnika na wyparce próżniowej i oczyszczenie za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan: aceton, 2:1).

#### Pocedura ogólna hydroksylacji z wykorzystaniem kwasu trifluoronoctowego (TFPA)

Do kolby kulistej umieszczonej w łaźni lodowej na mieszadle magnetycznym wprowadzono mieszaninę zawierającą 2.5 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 13.9 ml (0.1 mola) bezwodnika kwasu trifluorooctowego i mieszano 1 godzinę. Następnie wdroplono substrat (**1**) (od 0.01 do 0.1 mola) w 5 ml chlorku metylenu. Reakcję prowadzono 24 godziny. Nadmiar nadkwasu po przereagowaniu ketonu zredukowano przez dwukrotne przemywanie mieszaniny reakcyjnej nasyconym roztworem Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Warstwę organiczną przemywano nasyconym roztworem NaHCO<sub>3</sub> i trzykrotnie solanką, a następnie osuszano nad bezwodnym MgSO<sub>4</sub>. Rozpuszczalnik odparowywano na wyparce próżniowej. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, heksan : aceton, 2:1)

## 6.4. Biotransformacje

### 6.4.1 Mikroorganizmy

Materiał biologiczny stanowiły dwadzieścia dwa szczepy grzybów strzępkowych i drożdży pochodzące z kolekcji własnej Katedry Chemii U. P. We Wrocławiu (Tabela 31). Szczepy te były przechowywane na skosach agarowych (agar Sabourauda o pH 5.7 zawierający: 1% peptonu, 4% glukozy i 8% agaru) w temperaturze +4°C.

Tabela 31.. Szczepy mikroorganizmów wykorzystane w badaniach skringowych

Nazwa szczepu	Nazwa szczepu
<i>Fusarium culmorum</i> (AM7)	<i>Syncephalastrum racemosum</i> (105)
<i>Nigrospora oryzae</i> (AM8)	<i>Penicillium lilacinum</i> (AM111)
<i>Fusarium culmorum</i> (AM10)	<i>Penicillium chrysogenum</i> (AM112)
<i>Fusarium avenaceum</i> (AM11)	<i>Penicillium chermesinum</i> (AM113)
<i>Fusarium avenaceum</i> (AM12)	<i>Absidia glauca</i> (AM177)
<i>Fusarium oxysporum</i> (AM13)	<i>Fusarium scirpi</i> (AM199)
<i>Fusarium oxysporum</i> (AM21)	<i>Botrytis cinerea</i> (AM235)
<i>Penicillium vermiculatum</i> (AM81)	<i>Absidia glauca</i> (AM254)
<i>Rhodotorula marina</i> (AM77)	<i>Absidia cylindrospora</i> (AM336)
<i>Rhodotorula rubra</i> (AM82)	<i>Penicillium frequentans</i> (AM351)
<i>Penicillium camembertii</i> (AM83)	<i>Penicillium citrinum</i> (AM354)
<i>Penicillium thomi</i> (91)	<i>Penicillium frequentans</i> (AM359)

Skład pożywki wykorzystanej do wzrostu mikroorganizmów i biotransformacji:

Glukoza	1.5 g
Pepton „Peptobac”	0.5 g
Woda destylowana	50 ml
pH=5.9	

#### 6.4.2 Ogólne procedury procesów biotransformacji

Biotransformacje wstępne miały na celu wyselekcjonowania drobnoustrojów wykazujących zdolności do przekształceń 1-tetralonów i  $\epsilon$ -laktonów ze sprzężonym pierścieniem aromatycznym.

##### Procedura skringingowa:

Sterylną pożywkę (50 ml) w kolbie Erlenmayera o pojemności 300 ml zaszczepiłam wybranym drobnoustrojem za pomocą ezy. Po 3-4 dniach pobierałam po 1 ml inokulum i zaszczepiłam sześć kolejnych pożywek. Jedna z nich stanowiła próbę kontrolną w celu określenia metabolitów własnych drobnoustroju, pozostałe pięć było próbami właściwymi. Hodowlę drobnoustrojów prowadziłam na wytrząsarkach w temperaturze pokojowej. Następnie do hodowli drobnoustrojów wprowadzałam substrat rozpuszczony w 1 ml acetonu. Po 2, 4, 6, 9 i 12 dniach biomasę odwirowywałam, mierzyłam pH płynu pohodowlanego, który następnie zakwaszałam do pH=3 i ekstrahowałam 50 ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną oddzielałam przez odwirowanie i suszyłam za pomocą bezwodnego  $MgSO_4$ . Ekstrakty przesączałam, zagęszczałam na wyparce próżniowej do objętości ok. 2 ml i poddawałam analizie za pomocą TLC i GC. Dodatkowo wykonywałam próbę kontrolną poprzez dodanie 10 mg substratu do pożywki bez mikroorganizmu w celu określenia stabilności substratu w warunkach prowadzenia Biotransformacji. Każde doświadczenie wykonywałam w dwóch powtórzeniach.

##### Transformacje enzymatyczne

W procesie enzymatycznej transformacji 1-tetralonu **1** i jego mono- i dimetoksypochoodnych zastosowano monooksygenazę cykloheksanonu z *Acinetobacter sp.* rekombinowaną w *E. coli*, o aktywności 12.6 U/ cm<sup>3</sup> zakupionej w firmie Fluka. Enzym wymagał obecności zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego. Koenzym pozyskałam z firmy Codexis.

Do fiolki szklanej o pojemności 20 ml naważano substrat (0.02 g) i koenzym NADPH (0.008 g). Następnie uzupełniano buforem glicynowym z 5 % dodatkiem toluenu do objętości 15 cm<sup>3</sup> i po ustabilizowaniu pH na poziomie 9.0, wkraplano roztwór enzymu (0.002 g) rozpuszczonego w buforze (2 ml). Biotransformacje prowadzono na termostatowanym mieszadle magnetycznym w temperaturze 30°C. W celu określenia stabilności substratu równolegle prowadzono próbę kontrolną, zawierającą bufor z toluenem i substratem, bez dodatku enzymu. Zmiany pH podczas biotransformacji kontrolowano za pomocą pH-metru. W celu monitorowania postępu reakcji pobierano próbki (1 ml) w określonych odstępach czasu (po 2, 24, 48, 96, 120 godz.) i ekstrahowano octanem etylu (2 x 1 ml). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO<sub>4</sub>. Przygotowane w ten sposób próbki poddawano analizie chromatografii gazowej.

### **Biotransformacje preparatywne ketonów i laktonów**

Biomasę w kolbach Erlenmayera przygotowywano analogicznie jak w przypadku biotransformacji wstępnych. Skalę procesu zwiększano poprzez zwielokrotnienie liczby kolb. Po określonym na podstawie skriningu czasie inkubacji biomasę odwirowywano, płyn pochodzący zakwaszono do pH=3 i ekstrahowano trzykrotnie chlorkiem metylenu (po 50 ml na każdą kolbę). Połączone ekstrakty organiczne suszono bezwodnym MgSO<sub>4</sub>, przesączano i odparowywano na wyparce próżniowej.

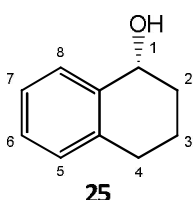
Produkty biotransformacji izolowano i oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej. Strukturę otrzymanych produktów ustalono na podstawie ich danych spektroskopowych (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, widma korelacyjne COSY, HMQC, HMBC, IR). Dla związków **13** i **32** wykonano analizę krystalograficzną.

### 6.4.3 Biotransformacje tetralonów

#### Biotransformacja 1-tetralonu (**1**) w kulturze szczepu *Rhodotorula rubra* (AM82)

Proces biotransformacji preparatywnej ketonu **1** (150 mg) za pomocą szczepu *Rhodotorula rubra* (AM82) trwał dwa dni a surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton, 3:1) otrzymując 36 mg (25%) czystego alkoholu **25** o następujących stałych fizycznych i spektroskopowych

#### (*R*)-1-tetralol (**25**)



$[\alpha]_D^{23} = -33.4^\circ$  (c 2.0, CHCl<sub>3</sub>) (98% *ee*) {lit.  $[\alpha]_D^{22} = -34.9^\circ$ , (c 1.12, CHCl<sub>3</sub>) 99% *ee* (*R*)}[127];  $[\alpha]_D^{27} = +33.9^\circ$ , 99% *ee* (*S*)}[126]; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.53 (s, 1H, -OH,), 1.66-1.81 (m, 3H, 1 z CH<sub>2</sub>-2 i CH<sub>2</sub>-3), 2.12-2.19 (m, 1H, jeden z CH<sub>2</sub>-2), 2.67 (t, *J*=5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-4), 4.92 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, H-1), 7.01-7.06 (m, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 18.90 (C-3), 29.21 (C-4), 32.17 (C-2), 67.85 (C-1), 125.97 (C-6), 127.31 (C-5), 128.68 (C-7), 128.78 (C-4a), 136.97 (C-8), 138.89 (C-8a), IR (film, cm<sup>-1</sup>): 3336 (s), 2937 (s), 1489 (s), 1466 (s), 739 (s).

Nadmiar enancjomeryczny produktu oznaczono stosując chiralną chromatografię gazową i następujący program: 120°C do 130°C (0.4°C/min.), następnie do 200°C (30°C/min.), 200°C przez 2 min. Całkowity czas analizy = 29.30 min.; temp. dozownika 200°C; temp. detektora 250°C.

Czasy retencji poszczególnych enancjomerów 1-tetralolu są następujące:  $R_t$  (S) = 15.01 min,  $R_t$  (R) = 15.52 min.

#### Biotransformacja 1-tetralonu (**1**) w kulturze szczepu *Penicillium frequentans* (AM359)

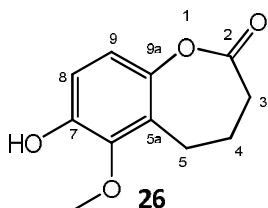
Biotransformację preparatywną 1-tetralonu (**1**) (150 mg) z wykorzystaniem szczepu *Penicillium frequentans* (AM359) jako biokatalizatora prowadzono 6 dni. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton, 4:1) Otrzymano 93 mg (56%) laktonu **2**. Stałe fizyczne i spektroskopowe produktu były identyczne laktonu **2** otrzymanego w syntezie chemicznej. Przedstawiono je na stronie 139.

#### Biotransformacja 5-metoksy-1-tetralonu (**6**) w kulturze szczepu *Penicillium frequentans* (AM359)

Biotransformację preparatywną ketonu **6** (2x150 mg) z wykorzystaniem szczepu *Penicillium frequentans* (AM359) jako biokatalizatora prowadzono dwukrotnie. Gdy trwała ona dwa dni, izolowano jeden produkt, który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton, 4:1) Otrzymano 70 mg (43%) laktonu **7** (stałe fizyczne i spektroskopowe

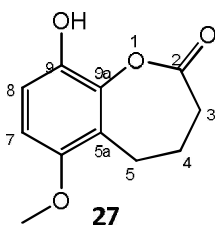
przedstawiono na str. 140). Gdy transformację prowadzono sześć dni, izolowano dwa kolejne produkty **26** (39mg, 22%) i **27** (20mg, 11%) które rozdzielono i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktów przedstawiono poniżej.

#### 7-Hydroksy-6-metoksy-benzoksepan-2-on (**26**)



Gęsty olej,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.15 (kwintet,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.51 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.88 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 3.78 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 5.67 (s, 1H, -OH), 6.67 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H, H-8), 6.85 (d,  $J=8.9$  Hz, 1H, H-9),  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20.37 (C-4), 25.73 (C-5), 31.41 (C-3), 56.46 (- $\text{OCH}_3$ ), 109.27 (C-8), 114.09 (C-9), 119.23 (C-5a), 139.35 (C-6), 140.05 (C-7), 150.07 (C-9a), 171.63 (C-2) **IR** (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3494 (s), 1733 (s), 1201 (s), 879 (m).

#### 9-Hydroksy-6-metoksy-benzoksepan-2-on (**27**)

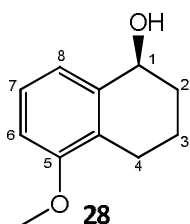


Gęsty olej,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.18 (kwintet,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 2.49 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.88 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -5), 3.81 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$ ), 5.55 (s, 1H, -OH), 6.81 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H, H-8), 6.85 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H, H-7),  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.21 (C-4), 25.90 (C-5), 30.98 (C-3), 62.34 (- $\text{OCH}_3$ ), 113.73 (C-7), 115.80 (C-8), 123.65 (C-5a), 144.55 (C-9a), 145.25 (C-9), 146.76 (C-6), 171.81 (C-2); **IR** (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3394 (s), 1733 (s), 1211 (s), 879 (m).

#### Biotransformacja 5-metoksy-1-tetralonu (**6**) w kulturze szczepu *Rhodotorula marina* (AM77)

Preparatywną transformację ketonu **6** (120 mg) za pomocą szczepu *Rhodotorula marina* (AM77) prowadzono przez sześć dni. Po rozdzieleniu i oczyszczeniu produktu surowego za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan : aceton : chloroform - chlorek metylenu 3:1:1) otrzymano 26 mg alkoholu **28** (22%) o stałych fizycznych i spektroskopowych opisanych poniżej:

#### (S)-5-metoksy-1-tetralol (**28**)



$[\alpha]_D^{23} = +11.9^\circ$  (c 1.2,  $\text{CHCl}_3$ ) (86% ee) (lit.  $[\alpha]_D^{23} = -12.3^\circ$ , c 1.2,  $\text{CHCl}_3$ , 98% ee (R))[128];  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$ : 1.68-2.00 (m, 5H, -OH, - $\text{CH}_2$ -2, - $\text{CH}_2$ -3), 2.55 (m, 1H, jeden z  $\text{CH}_2$ -4), 2.75 (m, 1H, jeden z  $\text{CH}_2$ -4), 4.77 (m, 1H, CH-1), 6.76 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H, H-6), 7.06 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H, H-8) 7.20 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H, H-7)ppm,  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$ : 18.09 (C-3), 23.03 (C-4), 31.75 (C-2), 55.40 (- $\text{OCH}_3$ ), 68.19 (C-1), 108.70 (C-6),

12.59 (C-8), 126.20 (C-4a), 126.57(C-7), 140.05 (C-8a), 157.04 (C-5) IR  
(film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3333 (s), 2937 (s), 2837 (s), 1589 (s), 1487 (s)

Nadmiar enancjomeryczny produktu oznaczono stosując chiralną chromatografię gazową i następujący program: 120°C do 140°C (0.4°C/min.), następnie do 200°C (30°C/min.), 200°C przez 2 min. Całkowity czas analizy = 54.00 min.; temp. dozownika 200°C; temp. detektora 250°C.

Czasy retencji poszczególnych enancjomerów 5-metoksy-1-tetralolu (**28**) są następujące:  
 $R_t(R) = 24.27$  min,  $R_t(S) = 24.70$  min.

#### **Biotransformacja 6-metoksy-1-tetralonu (8) w kulturze szczepu *Penicillium frequentans* (AM359)**

Biotransformację preparatywną ketonu **8** (2x150 mg) z wykorzystaniem szczepu *Penicillium frequentans* (AM359) jako biokatalizatora prowadzono dwukrotnie. Gdy trwała ona dwa dni, izolowano jeden produkt, który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton, 4:1) Otrzymano 83 mg (51%) laktonu **9**. Gdy transformację prowadzono sześć dni, oprócz laktonu **9** (27 mg, 17%) izolowano drugi produkt, lakton **10** (39mg, 21%) który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktów są identyczne z danymi produktów otrzymanych w wyniku syntezy chemicznej (str. 141).

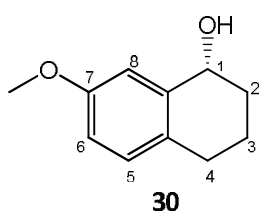
#### **Biotransformacja 7-metoksy-1-tetralonu (11) w kulturze szczepu *Penicillium frequentans* (AM359)**

Biotransformację preparatywną ketonu **11** (2x150 mg) z wykorzystaniem szczepu *Penicillium frequentans* (AM359) jako biokatalizatora prowadzono dwukrotnie. Gdy trwała ona sześć dni, izolowano jeden produkt, który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton, 4:1) Otrzymano 85 mg (52%) laktonu **12**. Gdy transformację prowadzono dwanaście dni, oprócz laktonu **12** (18 mg, 11%) izolowano drugi produkt, lakton **13** (27mg, 15%) który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktów identyczne z danymi produktów otrzymanych w wyniku syntezy chemicznej (str. 141).

#### **Biotransformacja 7-metoksy-1-tetralonu (11) w kulturze szczepu *Rhodotorula rubra* (AM82)**

Biotransformację preparatywną ketonu **11** (150 mg) za pomocą szczepu *Rhodotorula rubra* (AM82) prowadzono przez dwa dni. Po wyizolowaniu i oczyszczeniu produktu za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan : aceton : chloroform - chlorek metylenu 4:1:1) otrzymano 33 mg (22%) alkoholu **30** o stałych fizycznych i spektroskopowych podanych poniżej:



**(R)-7-metoksy-1-tetralol (30)**

$[\alpha]_D^{23} = -15.5^\circ$  (c 1.2,  $\text{CHCl}_3$ ) (36% ee) {lit.  $[\alpha]_D^{23} = -45.4^\circ$ , c 1.5,  $\text{CHCl}_3$ , 99% ee (R)} [129];  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.65 (s, 1H, OH), 1.71-2.06 (2m, 4H,  $\text{CH}_2$ -2 i  $\text{CH}_2$ -3), 2.61-2.81 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 3.80 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.75 (t,  $J=5.0$  Hz, 1H, H-1), 6.79 (dd,  $J=8.4$  i 2.7 Hz, 1H, H-6), 6.99 (d,  $J=2.7$  Hz, 1H, H-8), 7.02 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H, H-5)  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 19.21 (C-3), 28.46 (C-4), 32.46 (C-2), 55.38 ( $-\text{OCH}_3$ ), 68.55 (C-1), 112.65 (C-8), 114.41 (C-6), 129.15 (C-4a), 130.01 (C-5), 139.85 (C-8a), 158.02 (C-7); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3434 (s), 3367 (s), 2847 (s), 1611 (s), 1502 (s)

Nadmiar enancjomeryczny produktu oznaczono stosując chiralną chromatografię gazową i następujący program: 120°C do 140°C (0.4°C/min.), następnie do 200°C (30°C/min.), 200°C przez 2 min.. Całkowity czas analizy = 54.00 min.; temp. dozownika 200°C; temp. detektora 250°C. Czasy retencji poszczególnych enancjomerów 7-metoksy-1-tetralolu (**30**) są następujące:  $R_t$  (R) = 23.87 min,  $R_t$  (S) = 24.22 min.

**Biotransformacja 5,8-dimetoksy-1-tetralonu (14) w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113)**

W wyniku dwunastodniowej biotransformacji ketonu **14** (150 mg) w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113) jako biokatalizatora otrzymano lakton **15** (29 mg, 18%), który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktu były takie same jak danei produktu otrzymanego w wyniku syntezy chemicznej (str. 142).

**Biotransformacja 6,7-dimetoksy-1-tetralonu (16) w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113)**

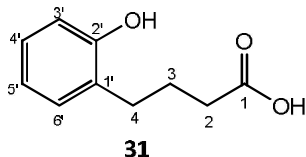
W wyniku biotransformacji ketonu **16** (150 mg) z wykorzystaniem szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113) jako biokatalizatora otrzymano lakton **17** (34 mg, 21%). Biotransformację prowadzono dziewięć dni. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:2). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktu przedstawiono wcześniej.

#### 6.4.4 Biotransformacje pochodnych benzoksepan-2-onu (2)

##### Biotransformacja benzoksepan-2-onu (2) w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113)

Biotransformację preparatywną laktonu **2** (150 mg) za pomocą szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113) prowadzono przez dwanaście dni. Po wyizolowaniu i oczyszczeniu produktu za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan : aceton : chloroform, 2:1:1) otrzymano 60 mg (36%) kwasu **31** o stałych fizycznych i spektroskopowych opisanych poniżej:

##### Kwas 4-(2-hydroksyfenylo)masłowy (**31**)

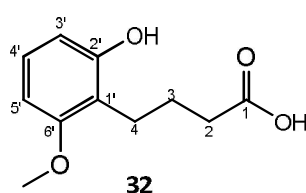


Gęsty olej,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.93 (kwintet,  $J=6.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.45 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 2.68 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 6.81 (dd,  $J=8.1, 1.0$  Hz, 1H, H-3'), 6.86 (td,  $J=7.7$  i 1.0 Hz, 1H, H-5'), 7.00-7.22 (m, 2H, H-4' i H-6');  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 24.70 (C-3), 29.23 (C-4), 32.92 (C-2), 115.71 (C-3'), 120.69 (C-5'), 127.11 (C-1'), 127.68 (C-4'), 130.33 (C-6'), 153.96 (C-2'), 180.31 (C-1); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2500-3600 (s), 1702 (s), 1511 (s), 1224 (s), 831 (m)

##### Biotransformacja 6-metoksybenzoksepan-2-onu (7) w kulturze szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112)

W wyniku czterodniowej biotransformacji laktonu **7** (100 mg) z wykorzystaniem szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112) jako biokatalizatora otrzymano kwas **32** (95 mg, 87%), który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktu przedstawiono już poniżej.

##### Kwas 4-(2-hydroksy-6-metoksyfenylo)masłowy (**32**)



$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.79-1.94 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.18 (s, 1H, -OH), 2.41 (t,  $J=6.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 2.72 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 3.79 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.38 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-3'), 6.41 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-5'), 7.04 (t,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-4');  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 21.66 (C-3), 23.58 (C-4), 32.60 (C-2), 55.53 (-OCH<sub>3</sub>), 102.74 (C-3'), 108.70 (C-5'), 115.40 (C-1'), 127.16 (C-4'), 154.99 (C-2'), 158.43 (C-6'), 179.85 (C-1); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3600-2550 (s), 1704 (s), 1469 (s), 1216 (s), 759 (m)

##### Dane krystalograficzne dla **32**

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ,  $M = 210,22$  m bezbarwna bryła, wymiary kryształu  $0,45 \times 0,30 \times 0,09$  mm, układ trójskośny, grupa przestrzenna group  $P-1$ ,  $a = 7,385(2)$ ,  $b = 7,627(3)$ ,  $c = 9,680(3)$  Å,  $\alpha = 73,64(2)$ ,  $\beta = 89,36(2)$ ,  $\gamma = 79,95(2)$  °,  $V = 514,7(3)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$ ,  $D_c = 1,356$  Mg m<sup>-3</sup>,  $T = 100(2)$  K,  $R = 0,037$ ,  $wR = 0,105$  (2243 refleksów z  $I > 2\sigma(I)$ ) dla 136 parametrów.

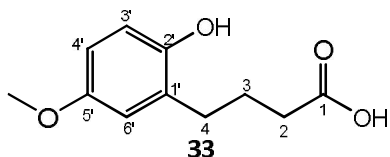
### Biotransformacja 6-metoksybenzoksepan-2-onu (**7**) w kulturze szczepu *Penicillium vermiculatum* (AM81)

Po czterech dniach prowadzenia procesu, jako produkt biotransformacji preparatywnej laktonu **7** (150 mg) otrzymano mieszaninę laktonów **26** i **27**. Produkty rozdzielono i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:1) uzyskując 51mg laktonu **26** (47%) i 30mg laktonu **27** (28%). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktów przedstawiono wcześniej (str. 150).

### Biotransformacja 7-metoksybenzoksepan-2-onu (**9**) w kulturze szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112)

W wyniku czterodniowej biotransformacji laktonu **9** (100 mg) w kulturze szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112) otrzymano kwas **33** (87 mg, 80%), który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktu przedstawiono poniżej.

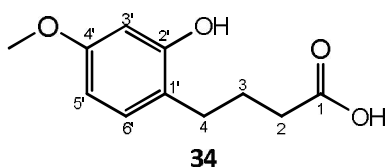
#### Kwas 4-(2-hydroksy-5-metoksyfenilo)masłowy (**33**)



t.t.=97-99°C,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 2.00 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.35 (t,  $J=5.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 2.60 (t,  $J=7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 3.81 (s, 1H, -OCH<sub>3</sub>) 6.60 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H, H-3'), 6.67 (d,  $J=1.4$  Hz, 1H, H-6'), 6.73 (dd,  $J=7.5, 1.4$  Hz, 1H, H-4')ppm;  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  =27.86 (C-3), 28.53 (C-4), 33.02 (C-2), 55.53 (-OCH<sub>3</sub>), 111.96 (C-4'), 116.75 (C-3'), 116.82 (C-6'), 128.87 (C-1'), 147.91 (C-2'), 153.35 (C-5'), 177.03 (C-1); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3600-2760 (s), 1704 (s), 1515 (s), 1234 (s), 912 (m)

### Biotransformacja 8-metoksybenzoksepan-2-onu (**12**) w kulturze szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112)

W wyniku czterodniowej biotransformacji laktonu **12** (100 mg) w kulturze szczepu *Penicillium chrysogenum* (AM112) otrzymano kwas **34** (83 mg, 77%), który oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 4:1:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktu przedstawiono poniżej.

**Kwas 4-(2-hydroksy-4-metoksyfenylo)masłowy (34)**

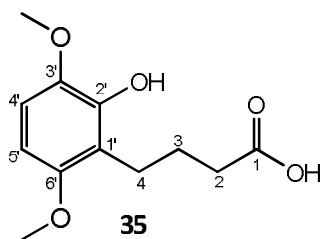
t.t.=98-101°C,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.00 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.35 (t,  $J=5.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 2.59 (t,  $J=7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 3.81 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ) 6.42 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H, H-3'), 6.43 (dd,  $J=7.2$  i 1.5 Hz, 1H, H-5'), 6.87 (s, 1H,  $-\text{OH}_{\text{ar}}$ ) 6.97 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H, H-6');  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 27.53 (C-3), 28.73 (C-4), 33.21 (C-2), 55.54 ( $-\text{OCH}_3$ ), 101.00 (C-3'), 105.75 (C-5'), 118.52 (C-1'), 132.86 (C-4'), 157.91 (C-6'), 162.33 (C-2'), 177.05 (C-1); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2670-3500 (s), 1702 (s), 1511 (s), 1242 (s), 831 (m)

**Biotransformacja 8-metoksybenzoksepan-2-onu (12) w kulturze szczepu *Penicillium vermiculatum* (AM81)**

W wyniku biotransformacji preparatywnej laktonu **12** (150 mg) otrzymano 60 mg (37%) laktonu **13**. Biotransformację prowadzono cztery dni. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform, 3:1:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe otrzymanego produktu podano już wcześniej (str. 141).

**Biotransformacja 6,9-dimetoksybenzoksepan-2-onu (15) w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113)**

Biotransformację preparatywną laktonu **15** (150 mg) w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113) prowadzono przez sześć dni. Po wyizolowaniu i oczyszczeniu produktu za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan : aceton : chloroform - chlorek metylenu 2:1:1) otrzymano 87 mg (54%) kwasu **35** o stałych fizycznych i spektroskopowych przedstawionych poniżej:

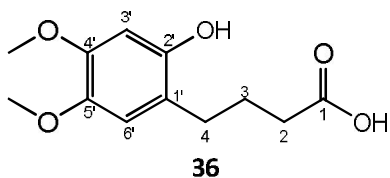
**Kwas 4-(2-hydroksy-3,6-dimetoksyfenylo)masłowy (35)**

T.t.=141-143°C,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.89 (kwintet,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.36 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 2.74 (t,  $J=7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 3.75 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.83 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 5.78 (s, 1H,  $-\text{OH}$ ), 6.31 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H, H-5'), 6.65 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H, H-4');  $^{13}\text{C NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22.29 (C-2), 23.87 (C-3), 31.42 (C-4), 55.71 ( $-\text{OCH}_3$ ), 56.44 ( $-\text{OCH}_3$ ), 100.69 (C-5'), 108.12 (C-4'), 116.28 (C-1'), 141.08 (C-3'), 144.54 (C-2'), 152.76 (C-6'), 179.97 (C-1); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2750-3550 (s), 1704 (s), 1491 (s), 1249 (s), 1100 (s), 757 (m)

### Biotransformacja 7,8-dimetoksybenzoksepan-2-onu (17) w kulturze szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113)

Biotransformację preparatywną laktonu **17** (150 mg) za pomocą szczepu *Penicillium chermesinum* (AM113) prowadzono przez sześć dni. Po wyizolowaniu i oczyszczeniu produktu za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan : aceton : chloroform - chlorek metylenu 2:1:1) otrzymano 121 mg (75%) kwasu **36** o stałych fizycznych i spektroskopowych opisanych poniżej:

#### Kwas 4-(2-hydroksy-4,5-dimetoksyfenylo)masłowy (36)



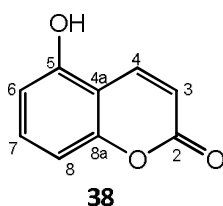
T.t.=145-146°C,  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.15 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -3), 2.58 (t,  $J=6.5$ , 2H,  $\text{CH}_2$ -2), 2.87 (t,  $J=6.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -4), 3.89 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.92 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 5.65 (s, 1H,  $-\text{OH}_{\text{ar}}$ ), 7.24 (s, 1H, H-3'), 7.50 (s, 1H, H-6'), 9.74 (s, 1H,  $-\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (C300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 29.45 (C-3), 29.65 (C-4), 48.51 (C-2), 55.98 ( $-\text{OCH}_3$ ), 56.01 ( $-\text{OCH}_3$ ), 103.73(C-3'), 108.44(C-6'), 110.14 (C-1'), 112.03 (C-5'), 139.33(C-4'), 155.62(C-2'), 197.29(C-1)ppm; IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3500-2600(s), 1707 (s), 1517 (s), 1202 (s),

#### 6.4.5 biotransformacje kumaryny (37)

##### Biotransformacja kumaryny (37) w kulturze szczepu *Penicillium frequentans* (AM 359)

W wyniku biotransformacji preparatywnej kumaryny **37** (100 mg) z wykorzystaniem szczepu *Penicillium frequentans* (AM 359) otrzymano 72 mg (65%) 5-hydroksykumaryny **38**. Biotransformację prowadzono osiem dni. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton 3:1). Stałe fizyczne i spektroskopowe otrzymanego produktu podano poniżej.

##### 5-Hydroksykumaryna (38)

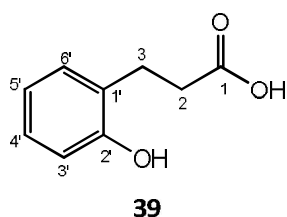


Białe kryształy, t.t. = 229-231°C (lit. 230-231°C [146, 147])  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 6.33 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H, H-3), 6.76 (dd,  $J=8.2$ , 1.0 Hz, 1H, H-6), 6.80 (d,  $J=8.3$  Hz, 1H, H-8), 7.39 (t,  $J=8.3$  Hz, 1H, H-7), 8.11 (d,  $J=9.7$  Hz, 1H, H-4), 10.76 (s, 1H,  $-\text{OH}$ )ppm;  $^{13}\text{C NMR}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C)  $\delta$  = 107.18 (C-8), 108.71 (C-4a), 110.49 (C-6), 114.11 (C-3), 133.19 (C-7), 139.66 (C-4), 155.25 (C-8a), 155.36 (C-5), 160.60 (C-2)ppm; IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3396 (s), 2923 (s), 1727 (s), 1453 (s), 753 (s).

**Biotransformacja kumaryny (37) w kulturze *Penicillium chrysogenum* (AM 112)**

W wyniku biotransformacji preparatywnej kumaryny **37** (100 mg) otrzymano dwa produkty. Gdy biotransformację prowadzono dwa dni wyizolowanym produktem była 3,4-dihydrokumaryna **23** (83 mg, 80%), dla której stałe spektroskopowe opisano na str. 154. Gdy proces prowadzono 10 dni, wyizolowano 52 mg (46%) kwasu 3-(2-hydroksyfenylo)propionowego (**39**). Stałe fizyczne i spektroskopowe produktu opisano poniżej.

Produkty rozdzielono i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy, heksan : aceton : chloroform 3:1:1).

**Kwas 3-(2-hydroksyfenylo)propionowy (39)**

Białe kryształy, *t.t* = 174-176°C(lit. 174-176°C [136]);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.44 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  2), 2.84 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  3), 5.60 (s, 1H,  $\text{C}2'$ -OH), 7.14 (m, 1H, H-3'); 7.54 (m, 1H, H-5'), 7.86 (m, 1H, H-6'), 8.69 (m, 1H, H-4')ppm; **IR** (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2700-3550 (m), 1463 (s), 1292 (s),

## 7. LITERATURA

- [1] Pickman A. K., Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.*, **14**, 255-281 (1986).
- [2] Barerro F., Oltra J. E., Alvarez M., Raglan D. S., Saute D. A., Akssira M., New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Phytoterapy*, **71**, 60-64 (2000).
- [3] Neerman M., Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essentials oils possessing antibacterial and antifungal properties. *Int. J. Aromatherapy*, **13**, 114-120 (2003).
- [4] Skaltsa H., Lazari D., Panagouleas C., Georgiadou E., Garcia B., Sokovic M., Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry*, **55**, 8, 903-908 (2000).
- [5] Dirsch V., Stuppner H., Vollmar A. M., Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells triggering apoptosis. *Planta Med.* **67**, 557-559 (2001).
- [6] Obara R., Szumny A., Wzorek A., Szmigiel-Pieczewska M., Białońska A., Ciunik Z., Wawrzeńczyk C., Lactones 31. Synthetic odoriferous unsaturated  $\gamma$ -lactones. *Flavour. Fragr. J.*, **23**, 416-425 (2008).
- [7] Devon T. K., Scott A. I., Naturally occurring compounds. New York and London, Vol. 2 (1972).
- [8] Paruch E., Nawrot J., Wawrzeńczyk C., Lactones: Part 11. Feeding-deterrent activity of some bi- and tricyclic terpenoid lactones. *Pest Manag. Sci.* **57**, 9, 776-780 (2001).
- [9] Szczepanik M., Dams I., Wawrzeńczyk C., Feeding deterrent activity of terpenoid lactones with the p-menthane system against the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* **34**, 6, 1433-1440 (2005).
- [10] Dams I., Białońska A., Ciunik Z., Wawrzeńczyk C., Lactones. 21. Synthesis and odoriferous properties of lactones with the p-menthane system. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 6, 1630-1634 (2004).
- [11] Dancewicz K., Gabryś B., Masłowiec D., Gliszczyńska A., Wawrzeńczyk C., Wpływ pochodnych benzoksepanonu na zasiedlanie roślin przez mszycę brzoskwińską *Myzus persicae* (sulz.), *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin*, **49**, 3, 1175-1178 (2009).
- [12] Dancewicz K., Ratuś B., Boratyński F., Kordan B., Gabryś B., Wawrzeńczyk C., Effect of oxygen incorporation into cyclohexanone ring on antifeedant activity, *J. Plant Prot. Res.*, **51**, 1, 23-28 (2011).
- [13] Nicolaou K. C., Xu H., Total synthesis of floresolide B and D6,7-Z-floresolide B, *Chem. Commun.*, 600-602 (2006).
- [14] Lian K-C., Chuang J-J., Hsieh C-W., Wung B-S., Huang G-D., Jian T-Y., Sun Y-W., Dual mechanisms of NF- $\kappa$ B inhibition in carnosol-treated endothelial Wells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **245**, 21-35 (2010).
- [15] Szajdek A., Borowska B., Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **4**, 41, 5-28 (2004).
- [16] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends. Plant Sci.*, **2**, 4, 152-159 (1997).

- [17] Wiktorowska-Owczarek A., Nowak J. Z., Patogeneza i profilaktyka AMD: rola stresu oksydacyjnego i antyoksydantów (Pathogenesis and prophylaxis of AMD: focus on oxidative stress and antioxidants), *Postępy Hig. Med. Dosw.*, **64**, 333-343 (2010).
- [18] Jeszka M., Flaczyk E., Kobus-Cisowska J., Dziedzic K., Związki fenolowe – charakterystyka i znaczenie w technologii żywności. *Nauka Przym. Technol.* **4**, 2 (2010).
- [19] King A., Young G., Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* **2**, 213-218 (1999).
- [20] Pietta P. G., Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod. (Lloydia)* **63**, 1035-1042 (2000).
- [21] Gawlik-Dziki U. Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **4**, 41, 29-40 (2004).
- [22] Breinholt V., Desirable versus harmful levels of intake of flavonoids and phenolic acids. Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease. J.T. Kumpulainen and J.T. Salonen, *The Royal Society of Chemistry*, 93-99 (1999).
- [23] Woodring P.J., Edwards P.A., Chisholm M.G.: A HPLC determination of nonflavonoid phenols in Vidal blank wine using electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 729-732 (1990).
- [24] Kobus J., Flaczyk E., Siger A., Nogala-Kałużka M., Korczak J., Pegg R.B., Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of Ginkgo leaves. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111**, 1140-1150 (2009).
- [25] Slavin J., Marquart L., Jakobs D. Jr., Consumption of whole-grain food and decreased risk of cancer: proposed mechanisms. *Cereal Foods World*, **45**, 2, 54-58 (2000).
- [26] Kohlmünzer S., *Farmakognozja - podręcznik dla studentów farmacji*, wyd. 5, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa (2003).
- [27] Glinka Ł., Ochocki J.: Flawonoidy i ich syntetyczne pochodne we współczesnej medycynie schorzeń układu sercowo-naczyniowego i moczowego. *Pol. J. Cosmet.*, **2**, 70-80 (2004).
- [28] Ross J.A., Kasum C.M., Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.*, **22**, 19-34 (2002).
- [29] Huxley R. R., Neil H. A., The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 904-908 (2003).
- [30] Balcerek M., Matławska I.: Wpływ związków fenolowych na receptory GABA i interakcje z pochodnymi benzodiazepiny. *Postępy Fitoterapii*, **52**, 3 (2006).
- [31] Olas B., Wachowicz B., Stochmal A. i wsp., Relationship between vasodilatation capacity and phenolics content of Spanish wines. *Eur. J. Pharmacol.*, **517**, 84-91 (2005).
- [32] Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F. i wsp., Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.*, **134**, 613-617 (2004).
- [33] Olas B., Wachowicz B., Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. *Thromb. Res.*, **106**, 143-148 (2002).
- [34] Baur J. A., Sinclair D. A., Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 493-506 (2006).
- [35] Szumiło J., Resveratrol – ocena działania przeciwnowotworowego. *Pol. Mer. Lek.*, **117**, 362-364 (2006).



- [36] Fukada S., Kaga S., Zhan L. i wsp., Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosine kinase receptor Flk-1. *Cell Biochem. Biophys.*, **44**, 43-49 (2006).
- [37] Olas B., Wachowicz B., Majsterek I. i wsp.: Resveratrol may reduce oxidative stress induced by platinum compounds in human plasma, blood platelets and lymphocytes. *Anti-Cancer Lett.* **16**, 659-665 (2005).
- [38] Kędzierska M, Olas B, Wachowicz B, Jeziorski A, Piekarski J., The lipid peroxidation in breast cancer patients, *Gen Physiol Biophys*, **29**, 2, 208–210 (2010).
- [39] Zeng H. H., Tu P. F., Zhou K., Wang H., Wang B. H., Lu J. F.,. Antioxidant properties of phenolic diterpenes from *Rosmarinus officinalis*. *Acta Pharmacol. Sin.* **22**, , 1094–1098 (2001).
- [40] Peng C. H., Su J. D., Chyau C. C., Sung T. Y., Ho S. S., Peng C. C., Peng R. Y.,. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2223–2232 (2007).
- [41] Lo A. H., Liang Y. C., Lin-Shiau S. Y., Ho C. T., Lin, J. K., Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis* **23**, 983–991 (2002).
- [42] Sotelo-Felix J. I., Martinez-Fong D., Muriel De la Torre P., Protective effect of carnosol on CCl(4)-induced acute liver damage in rats., *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 1001–1006 (2002).
- [43] Huang S. C., Ho C. T., Lin-Shiau S. Y., Lin J. K., Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through downregulating nuclear factor-kappaB and c, *Jun. Biochem. Pharm.* **69**, 221–232 (2005).
- [44] Yao J. H., Zhang X. S., Zheng S. S., Li Y. H., Wang L. M., Wang Z. Z., Chu L., Hu X. W., Liu K. X., Tian X. F., Prophylaxis with carnosol attenuates liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. *World J. Gastroenterol.* **15**, 3240–3245 (2009).
- [45] Kunze B., Sasse F., Wieczorek H., Huss M., Cruentaren A, a highly cytotoxic benzolactone from *Myxobacteria* is a novel selective inhibitor of mitochondrial F1-ATPases, *FEBS Letters*, **581**, 3523–3527 (2007).
- [46] Feutrill J. T., Holloway G. A., Hilli F., Hügel H. M. Rizzacasa M. A., Synthetic studies on the salicylhalamides: macrolactone formation via ring closing metathesis versus macrolactonization, *Tetrahedron Lett.* **41**, 8569–8572 (2000).
- [47] Lebreton S., Jaunbergs J., Roth M. G., Ferguson D. A., De Brabander J. K., Evaluating the potential of Vacuolar ATPase inhibitors as anticancer agents and multigram synthesis of the potent salicylhalamide analog saliphenylhalamide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, , 5879–5883 (2008).
- [48] Lake B.G., Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment, *Food Chem. Toxicol.* **37**, 423-453 (1999).
- [49] Li V., Koike K., Asada Y., Yoshikawa T., Nikaido T., Biotransformation of umbelliferone by *Panax ginseng* root cultures, *Tetrahedron Lett.*, **43**, 5633-5635 (2002).
- [50] Urbach F., The historical aspects of sunscreens. *J. Photochem. Photobiol.* **64**, 99-104 (2001).
- [51] Bruneton J., Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants. Intercept Ud, London, Paris, New York (1999).

- [52] Imaida K., Hirose M., Yamaguchi S., Tanahashi S., Ito N.: Effects of naturally antioxidants on combined 1,2-dimethylhydrazine- and 1-methyl-1-nitrosourea-initiated carcinogenesis in F344 male rats. *Cancer Lett.* **5**, 53-59 (1990).
- [53] Kaneco T., Baba N., Matsuo M.: Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact.* **142**, 239-254 (2003).
- [54] Cisowski W., Biologiczne właściwości kumarynu. Działanie na rośliny oraz właściwości farmakologiczne i przeciwbakteryjne. *Herba Polonica*, **3-4**, 301-318 (1993).
- [55] Yang Y-Z., Ranz A., Pan H-Z., Zhang Z-N., Lin X-B., Meshnick S. R., Daphnetin: a Novel Antimalarial Agent with in Vitro and in Vivo Activity, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **46**, 1, 15-20 (1992).
- [56] Sproll C., Ruge W., Andlauer C., Godelmann R., Lachenmeier D.W., HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods, *Food Chem.*, **109**, 462-469 (2008).
- [57] Marshall S., Christmas pudding: A spicy tale, *Pharmaceutical Journal*, **277**, 786-788 (2006).
- [58] Caterina M. J., Chemical biology: Sticky spices, *Nature*, **445**, 491-492 (2007).
- [59] Felter S.P., Vassallo J.D., Carlton B.D., Daston G.P., A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics, *Food Chem. Toxicol.* **44**, 462-475 (2006).
- [60] Rietjens I. M. C. M., Boersma M. G., Zaleska M., Punt A., Differences in simulated liver concentrations of toxic coumarin metabolites in rats and different human populations evaluated through physiologically based biokinetic (PBBK) modeling, *Toxicol. in Vitro* **22**, 1890-1901 (2008).
- [61] Souček P., Novel sensitive high-performance liquid chromatographic method for assay of coumarin 7-hydroxylation, *J. Chromatogr. B*, **734**, 23-29 (1999).
- [62] Pelkonen O., Rautio A., Raunio H., Pasanen M., CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase, *Toxicology*, **144**, 139-144 (2000).
- [63] Lewis D. F. V., Ito Y., Lake B. G., Metabolism of coumarin by human P450s: A molecular modeling study, *Toxicol. in Vitro*, **20**, 256-264 (2006).
- [64] Barbusiński K.: Oczyszczanie ścieków przemysłowych metodami katalicznymi z wykorzystaniem nadtlenu wodoru. *Chemicz*, **2**, 31-33 (2001).
- [65] Kitajima N., Ito M., Fukui H., Moro-Oka Y., Hydroxylation of alkanes and arenes using molecular oxygen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **2**, 102-104 (1991).
- [66] Sakai K., Matsumoto K., Oxidation of benzene to phenol with hydrogen peroxide catalyzed by  $\alpha$ -pyrrolidonate-bridged mixed-valent tetranuclear platinum complexes, *J. Mol. Catal.* **67**, 7-18 (1991).
- [67] Mimoun H., Saussine L., Daire E., Postel M., Fischer J., Weiss R., Vanadium(V) peroxo complexes. New versatile biomimetic reagents for epoxidation of olefins and hydroxylation of alkanes and aromatic hydrocarbons, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 3101-3110 (1983).
- [68] Tatsumi T., Yuasa K., Tominaga H., Hydroxylation of benzene and hexane by oxygen and hydrogen over palladium-containing titanium silicates, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **19**, 1446-1447 (1992).

- [69] Olah G. A., Keumi T., Lecoq J. C., Fung A. P., Olah J. A., Oxyfunctionalization of hydrocarbons. 17. Acid-dependent high regioselectivity hydroxylation of naphthalene with hydrogen peroxide giving 1- or 2-naphthol, *J. Org. Chem.*, **56**, 6148-6151 (1991).
- [70] Lücke B., Narayana K. V., Martin, A. Jähnsch, K., Oxidation and ammoxidation of aromatics. *Adv. Synth. Catal.* **346**, 1407–1424 (2004).
- [71] Tani M., Sakamoto T., Mita S., Sakaguchi S., Ishii Y., Hydroxylation of benzene to phenol under air and carbon monoxide catalyzed by molybdovanadophosphoric acid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 2586–588 (2005).
- [72] Campestrini S., Tonellato U., Selective catalytic oxidations in supercritical carbon dioxide. *Curr. Organ. Chem.* **9**, 31–7 (2005).
- [73] Peterson D. H., Murray H. C., Eppstein S. H., Reineke L. M., Weintraub A., Meister P. D., Leigh H. M., Microbiological transformations of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone, *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 23, 5933-5936 (1952).
- [74] Mason H. S., Fowlks W. L. Peterson, E., Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2914–2915 (1955).
- [75] Hayaishi O., Katagiri M., Rothberg S., Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5450–5451 (1955).
- [76] Williams P. A., Cosme J., Ward A., Angove H.C., Matak Vinkovic D., Jhoti H., Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin., *Nature*, **424**, 6947, 464-468 (2003).
- [77] Ullrich R., Hofrichter M., Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 3, 271-293 (2007).
- [78] Matsunaga I., Sumimoto T., Ayata M., Ogura H., Functional modulation of a peroxygenase cytochrome P450: Novel insight into the mechanisms of peroxygenase and peroxidase enzymes., *FEBS Lett.* **528**, 90–94 (2002).
- [79] Ullrich R., Hofrichter M., The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene, *FEBS Letters*, **579**, 6247–6250 (2005).
- [80] Jadan A. P., van Berkel W. J., Golovleva, L. A., Golovlev, E. L. Purification and properties of p-hydroxybenzoate hydroxylases from *Rhodococcus* strains. *Biochemistry (Mosc)* **66**, , 898–903 (2001).
- [81] Entsch B., Cole L. J. Ballou D. P., Protein dynamics and electrostatics in the function of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 297–311 (2005).
- [82] Fitzpatrick P. F., Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* **42**, 14083–14091 (2003).
- [83] Briante R., Patumi M., Febbraio F., Nucci R., Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic beta-glycosidase. *J. Biotechnol.*, **111**, 1, 67–77 (2004).
- [84] Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M.. The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.*, **18**, 98–112 (2005).

- [85] Manna C., Migliardi V., Sannino F., De Martino A., Capasso, R., Protective effects of synthetic hydroxytyrosol acetyl derivatives against oxidative stress in human cells. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 24, 9602–9607 (2005).
- [86] Gill C. I. R., Boyd A., McDermott E., McCann M., Servili M., Selvaggini R., Potential anti-cancer effects of virgin olive oil phenol on colorectal carcinogenesis models in vitro. *Int. J. Cancer*, **117**, 1, 1–7 (2005).
- [87] Brouk M., Fishman A., Protein engineering of toluene monooxygenases for synthesis of hydroxytyrosol, *Food Chem.* **116**, 114–121 (2009).
- [88] Liebgott P-P., Amouric A., Comte A., Tholozan J-L., Lorquin J., Hydroxytyrosol from tyrosol using hydroxyphenylacetic acid-induced bacterial cultures and evidence of the role of 4-HPA 3-hydroxylase, *Res. Microbiol.* **160**, 757-766 (2009).
- [89] Brooks S. J., Doyle E. M., O'Connor K. E., Tyrosol to hydroxytyrosol biotransformation by immobilized cell extracts of *Pseudomonas putida* F6, *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 191-196 (2006).
- [90] Tao Y., Bentley W. E., Wood T. K., Regiospecific oxidation of naphthalene and fluorene by toluene monooxygenases and engineered toluene 4-monooxygenases of *Pseudomonas mendocina* KR1. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 85–94 (2005).
- [91] Siani L., Papa R., Di Donato A., Sannia G., Recombinant expression of toluene o-xylene monooxygenase (ToMO) from *Pseudomonas stutzeri* OX1 in the marine antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *J. Biotechnol.* **126**, 3, 334-341 (2006).
- [92] Shindo K., Nakamura R., Chinda I., Ohnishi Y., Horinouchi S., Takahashi H., Iguchi K, Harayama S., Furukawa K., Misawa N., Hydroxylation of ionized aromatics including carboxylic acid or amine using recombinant *Streptomyces lividans* cells expressing modified biphenyl dioxygenase genes, *Tetrahedron* **59**, 1895–1900 (2003).
- [93] Bromberg N., Durán N., Violacein transformation by peroxidases and oxidases: Implications on its biological properties, *J. Mol. Catal. - B Enzym* **11**, 4-6, 463-467 (2001)
- [94] Cerniglia, C. E., Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 324–333 (1997).
- [95] Taupp M., Heckel F., Harmsen D., Schreier P., Biohydroxylation of *N,N*-dialkylarylamines by the isolated topsoil bacterium *Bacillus megaterium*, *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 1013–1016 (2006).
- [96] Berg A., Rafter J. J., Studies on the substrate specificity and inducibility of cytochrome P-450meg. *Biochem J*, **196**, 781–786 (1981).
- [97] Sietmann R., Hammer E., Schauer F., Biotransformation of Biaryllic Compounds by Yeasts of the Genus *Trichosporon*, *System. Appl. Microbiol.* **25**, 332–339 (2002).
- [98] Sariaslani F. S., Rosazza J. P., Novel biotransformations of 7-ethoxycoumarin by *Streptomyces griseus*, *App. Environ. Microbiol.* **46**, 2, 468-474 (1983).
- [99] Mueller J.G., Middaugh D.P., Lantz S.E., Chapman P.J., Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: chemical and biological assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1277–1285 (1991).
- [100] Seto H., New 3-hydroxy-4-aminocarbazole compounds. JP,Patent 03227971 (1991).

- [101] Grosser R.J., Warshawsky D., Vestel J.R., Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzoapyrene, and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3462–3469 (1991).
- [102] Kirimura K., Nakagawa H., Tsuji K., Matsuda K., Kurane S., Usami S. Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas* sp. CDH-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1563–1568 (1999).
- [103] Schneider J., Grosser R.J., Jayasimhulu K., Xue W., Kinkle B., Warshawsky D., Biodegradation of carbazole by *Ralstonia* sp. RJGII.123 isolated from a hydrocarbon contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* **46**, 269–277 (2000).
- [104] Lobastova T.G. i wsp., Hydroxylation of carbazoles by *Aspergillus flavus* VKM F-1024 FEMS. *Microbiology Lett.* **235**, 51–56 (2004).
- [105] Pedras M. S. C., Khan A. Q., Unprecedented detoxification of the cruciferous phytoalexin camalexin by a root phytopathogen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7** 2255–2260 (1997).
- [106] Pedras, M. S. C., Ahiahonu P. W. K., Probing the phytopathogenic stem rot fungus with phytoalexin analogs: unprecedented glucosylation of camalexin and 6-methoxycamalexin. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 3307–3312 (2002).
- [107] Gotor V., Quiros M., Liz R., Figola J., Fernandez R., Fungal and bacterial regioselective hydroxylation of pyrimidine heterocycles, *Tetrahedron* **53**, 6421 (1997).
- [108] Grogan G. J., Holland H. L., The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. Review. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **9**, 1–32 (2000).
- [109] Pietz S., Wolker D. Haufe G., Selectivity of the Biooxygenation of N-Phenylcarbamates by the Fungus *Beauveria bassiana*, *Tetrahedron.* **53**, 17067-17078 (1997).
- [110] Kinne M., Poraj-Kobielska M., Aranda E., Ullrich R., Hammel K. E., Scheibner K., Hofrichter M., Regioselective preparation of 5-hydroxypropranolol and 4'-hydroxydiclofenac with a fungal peroxygenase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 11, 3085-3087 (2009).
- [111] Kinne M., Ullrich R., Hammel K. E., Scheibner K., Hofrichter M., Regioselective preparation of (R)-2-(4-hydroxyphenoxy)propionic acid with a fungal peroxygenase, *Tetrahedron Lett.* **49**, 5950–5953 (2008).
- [112] Carballeira J.D., Quezada M.A., Hoyos P., Simeó Y., Hernaiz M.J., Alcantara A.R., Sinisterra J.V., Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions, *Biotechnol. Adv.* **27**, 686–714 (2009).
- [113] Floyd N., Munyemana F., Roberts S. M., Willetts A. J., Biooxidations of some N-arylperidines and related compounds using *Beauveria sulfurescens*, *J.Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 8, 881-882 (1993).
- [114] Holland H. L., Morris T. A., Nava P. J., Zabic M., A New Paradigm for Biohydroxylation by *Beauveria bassiana* ATCC 7159, *Tetrahedron* **55**, 7441-7460 (1999).
- [115] Patrick G., chemia leków. Krótkie wykłady. WN PWN, Warszawa (2004).
- [116] Weidner, S., Goeke, K., Trinks, U., Traxler, P., Ucci-Stoll, K., Ghisalba, O., Preparation of 4-(4'-hydroxyanilino)-5-anilinophthalimide and 4,5-bis-(4'-hydroxyanilino)-phthalimide by microbial hydroxylation, *Biosci. Biotech. Biochem.* **63**, 8, 1497-1500 (1999).
- [117] Roh C., Seo S-H., Choi K-Y, Cha M., Pandey B-P., Kim J-H., Park J-S, Kim D-H, Chang I. S., Kim B-G., Regioselective hydroxylation of isoflavones by *Streptomyces avermitilis* MA-4680, *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 1, 41–46 (2009).

- [118] Esaki, H., Onozaki, H., Morimitsu, Y., Kawakishi, S., Osawa, T.,. Potent antioxidative isoflavones isolated from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**, 740–746 (1998).
- [119] Klus K., Barz W., Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from tempe., *Phytochemistry*, **47**, 6, 1045-1048 (1998).
- [120] Kostrzewa-Susłow E., Dmochowska-Gładysz J., Białońska A., Ciunik Z., Microbial transformations of flavanone and 6-hydroxyflavanone by *Aspergillus niger* strains *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **39**, , 18–23 (2006).
- [121] Kostrzewa-Susłow E., Dmochowska-Gładysz J., Białońska A., Ciunik Z., Microbial transformations of flavanone by *Aspergillus niger* and *Penicillium chermesinum* cultures *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **52–53**, 34–39 (2008).
- [122] Turnbull J. J., Nakajima J., Welford R. W., Yamazaki M., Saito K. Schofield C. J., Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: Anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **279**, 1206–1216 (2004).
- [123] Schlangen K., Miosic S., Topuz F., Muster G., Marosits T., Seitz C., Halbwirth H., Chalcone 3-hydroxylation is not a general property of flavonoid 3O-hydroxylase, *Plant Science* **177**, 97–102 (2009).
- [124] Günter H., Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego., PWN (1983).
- [125] Bjørsvik H-R., Occhipinti G., Gambarotti C., Cerasino L., Jensen V. R., Synthesis of Methoxy-Substituted Phenols by Peracid Oxidation of the Aromatic Ring., *J. Org. Chem.* **70**, 7290-7296 (2005).
- [126] Ferraz H. M. C., Bianco G. G., Teixeira C. C., Andrade L. H., Portob A. L. M., Enzymatic resolution of  $\alpha$ -tetralols by CALB-catalyzed acetylation; *Tetrahedron- Asymmetr.* **18**, 1070–1076 (2007).
- [127] Lie F., Chen Y., Wang Z., Li Z., Enantioselective benzylic hydroxylation of indan and tetralin with *Pseudomonas monteilii* TA-5. *Tetrahedron- Asymmetr.* **20**, 1206–1211 (2009).
- [128] Ohkuma T., Hattori T., Ooka H., Inoue T., Noyori R., BINAP/1,4-Diamine—Ruthenium(II) Complexes for Efficient Asymmetric Hydrogenation of 1-Tetralones and Analogues. *Org Lett.* **5**, 6, 16, 2681-2683 (2004).
- [129] Bichlmaier I., Siiskonen A., Finel M., Yli-Kauhaluoma J., Stereochemical Sensitivity of the Human UDP-glucuronosyltransferases 2B7 and 2B17. *J. Med. Chem.* **49**, 1818-1827 (2006).
- [130] Cheesman M. J., Kneller M. B., Kelly E. J., Thompson S. J., Yeung C. K., Eaton D. L., Rettie A. E., Purification and characterisation of hexahistidine-tagged cyclohexanones monooxygenase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Prot. Express. Purific.*, **21**, 81-86 (2001).
- [131] Torres Pazmino D. E., Dudek H. M., Fraaije M. W., Baeyer–Villiger monooxygenases: recent advances and future Challenges, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **14**, 138–144 (2010).
- [132] Stewart J. D., Cyclohexanones monooxygenase: a useful reagent for asymmetric Baeyer–Villiger reactions. *Curr. Org. Chem.*, **2**, 211-232 (1998).
- [133] Mihovilovic M. D., Mülle B., Stanetty P., Monooxygenase-mediated Baeyer–Villiger oxidation. *Eur. J. Org. Chem.*, **22**, 3711-3730 (2002).
- [134] <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3gwf> (11.02.2011)

- [135] Rioz-Martínez A., de Gonzalo G., Torres Pazmiño D. E., Fraaije M. W., Gotor V., Enzymatic Baeyer–Villiger Oxidation of Benzo-Fused Ketones: Formation of Regiocomplementary Lactones, *Eur. J. Org. Chem.*, 2526–2532 (2009).
- [136] Konno M., Nakae T., Sakuyama S., Imaki K., Nakai H., Hamanaka N., ChemInform Abstract: An Efficient Method for the Synthesis of a Novel Leukotriene B<sub>4</sub> Receptor Antagonist, ONO-4057, via Michael Reaction of Dihydroresorcinol. *Synlett*, **12**, 1472-1474 (1997).
- [137] Polonsky J., Bhatnager S. C., Gyrriffiths D. C., Pikett J. A., Woodcock C. M., Activity of quassinoids as antifeedants against aphids. *J. Chem. Ecol.*, **15**, 933-998 (1989).
- [138] Wakefield M. E., Bryning G., Chambers P. J., Progress towards a lure to attract three stored product weevils, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *S. oryzae* (L.) and *S. granaries* (L.) (Cleopectera: Curculioniadae). *J. Stored. Prod. Res.*, **41**, 145-161 (2005).
- [139] Nawrot J., Błuszczek E., Hormatka J., Nowotny L., Drożdż B., Action of antifeedants of plant origin on beetles infesting stored products. *Acta Entomol. Bohemoslov.*, **83**, 327-335 (1986).
- [140] Ratuś B., Boratyński F., Nawrot J., Wawrzeńczyk C., Lactones Part XXXIII Synthesis and antifeedant activity of alkyl substituted  $\epsilon$ -lactones, *Przemysł Chemiczny* **88**, 5, 557-562 (2009).
- [141] Nawrot J., Dams I., Wawrzeńczyk C., Feeding deterrent activity of terpenoid lactones with a p-menthane system against stored-product pests, *J. Stored Products Res.* **45**, 4, 221-225 (2009).
- [142] Oxford Diffraction, Polnd Sp. Zo.o., Crys Alis CCD and CrysAlis Red, V166 (2001).
- [143] Bruker AXS, SHELXTL V5. 1 (1999).
- [144] Li V., Vasella A., ChemInform Abstract: Synthesis of Enantiomerically Pure Carbohydrate-Derived Annulated Cyclopentadienes and Ferrocenes. *Helvetica Chimica Acta*, **76**,1, 197-210 (1997).
- [145] Wang H., Lian H., Chen J., Pan Y., Shi Y., Ultrasonic Accelerated Hydrogenation of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Unsaturated Ketones with Raney Nickel. *Catalyst Synthetic Communications* **29**, 1, 129-134 (1999).
- [146] Gerqueira N. M. F. S. A. Oliveira-Campos A. M. F., Coelho P. J., Carvalho L. H., Samat A., Guglielmetti R., Synthesis of Photochromic Dyes Based on Annulated Coumarin Systems *Helvetica Chimica Acta*, **85**, 2, 442-450 (2002).
- [147] Takaishi K., Izumi M., Baba N., Kawazu K., Nakajima S., Synthesis and biological evaluation of alkoxy coumarins as novel nematocidal constituents *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 20, 5614-5617 (2008).