

mgr Marta Siedlarek
Uniwersytet Łódzki
Wydział Chemii
Katedra Chemii Organicznej
ul. Tamka 12; 91-403 Łódź
e-mail: mz.morawska@gmail.com



Synteza α -aminofosfonianów pochodnych pirolo-2-karboksyaldehydu i 5-nitrofurfuralu oraz ich właściwości fito- i ekotoksykologiczne

Promotor: Prof. dr hab. Jarosław Lewkowski

Promotor pomocniczy: Dr Rafał Karpowicz

Praca doktorska wykonana w Katedrze Chemii Organicznej

Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

Łódź, luty 2019

Składam serdeczne podziękowania **Panu Profesorowi Jarosławowi Lewkowskiemu**, mojemu promotorowi, za fachową opiekę naukową, poświęcony mi czas oraz niezwykle cenne wskazówki merytoryczne w czasie wykonywania całej rozprawy doktorskiej.

Panu Doktorowi Rafałowi Karpowiczowi, mojemu promotorowi pomocniczemu, dziękuję za życzliwą pomoc oraz poświęcony mi czas podczas wykonywania prac laboratoryjnych.

Dziękuję również **dr. Piotrowi Rychterowi, dr. Pawłowi Tokarzowi, dr Aleksandrze Kowalczyk** a w szczególności **mgr inż. Dianie Rogacz** za pomoc w realizacji badań biologicznych oraz merytoryczne wsparcie, na które zawsze mogłam liczyć.

1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	4
2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (Abstract in English)	5
3. SPIS PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	6
4. WSTĘP	7
5. HERBICYDY.....	8
6. ZWIĄZKI ZAWIERAJĄCE UKŁAD PIROLOWY.....	13
7. ZWIĄZKI ZAWIERAJĄCE UKŁAD NITRO	14
8. AMINOFOSFONIANY	17
9. METODOLOGIA BADAŃ EKO- I FITOTOKSYKOLOGICZNYCH	19
10. METODOLOGIA BADAŃ CYTOTOKSYKOLOGICZNYCH	24
11. BADANIA WŁASNE	26
11.1. Synteza aminofosfonianów dimetylowych pochodnych pirolu	26
11.2. Synteza aminofosfonianów difenylowych pochodnych pirolu	27
11.3. Synteza aminofosfonianów z ugrupowaniem nitrofurylowym	28
11.4. Właściwości eko i fitotoksykologiczne aminofosfonianów z ugrupowaniem pirolowym....	28
11.5. Właściwości eko i fitotoksykologiczne aminofosfonianów z ugrupowaniem nitrofurylowym	30
11.6. Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe aminofosfonianów z ugrupowaniem nitrofurylowym.....	31
12. PODSUMOWANIE.....	32
13. SPIS LITERATURY	33
14. ŻYCIORYS ORAZ PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ	36
15. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWA	37
OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW PUBLIKACJI.....	44

1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Rozprawa doktorska obejmowała syntezę α - aminofosfonianów pochodnych pirolo-2-karboksyaldehydu i 5-nitrofurfuralu, a także badanie właściwości fito- i ekotoksykologiczne tych substancji.

W przypadku nowo syntezowanych na drodze zmodyfikowanej reakcji *aza*-Pudovika *N*-arylo podstawionych dimetyloamino(2-pirolilo)metylofosfonianów, badania ekotoksykologiczne wskazały na toksyczność tych substancji. W przypadku testów fitotoksycznych pochodne aminofosfonowe wykazywały wpływ zarówno na rośliny jednoliste i dwuliścienne, jednak w przypadku roślin dwuliściennych toksyczne działanie było silniejsze. Badane związki wykazały również istotną toksyczność wobec skorupiaków *Heterocypris incongruens* i bakterii *Aliivibrio fischeri* (wskaźników w teście Ostracodtoxkit FTM i Microtox[®]). Stwierdzono, że podstawniki pierścienia fenylowego odgrywają kluczową rolę w stopniu toksyczności tego rodzaju związków, a ich potencjalne zastosowanie wymaga ostrożności.

Również difenyl-*N*-aryloamino(pirolo-2-yl)metylofosfoniany, syntezowane w ramach pracy doktorskiej, zostały poddane ocenie ekotoksykologicznej. Na jej podstawie stwierdzono, że pochodna *N*-(4-nitrofenylu) była najbardziej toksyczna dla bakterii w porównaniu do innych badanych związków. Natomiast skorupiak *Heterocypris incongruens*, wrażliwy był zarówno na *N*-fenyl, jak i na *N*-naftyłowe pochodne. Substancje te, były jednak nieszkodliwe dla bakterii.

Kolejną grupę związków stanowiły *N*-aryloamino(5-nitrofurfurylo)metylofosfoniany, które w testach fitotoksyczności wykazywały szkodliwy wpływ na rośliny. Toksyczne działanie niektórych pochodnych z ugrupowaniem nitrofurylowym było jednak silniejsze w przypadku roślin dwuliściennych, co świadczy o właściwościach selektywnych tych substancji. Nowo syntezowane pochodne cechowała także toksyczność w stosunku do bakterii *A. fischeri* i małżoraczków *H. incogruens*, przy czym toksyczność ta była wyższa dla bakterii.

Uzyskane wyniki dostarczają istotnych informacji o ekotoksykologii pochodnych aminofosfonowych, nie wskazując jednak w sposób jednoznaczny substancji, która miałaby interesujące właściwości herbicydowe, będąc jednocześnie nieszkodliwa wobec badanych organizmów testowych. Skłania to do dalszych poszukiwań substancji, cechującej się pożądanymi właściwościami w tym obszarze.

2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (Abstract in English)

The research described in the herein presented doctoral dissertation included the synthesis of α -aminophosphonates of pyrrole-2-carboxaldehyde and 5-nitrofurfural derivatives and the study of the phyto- and ecotoxicological properties of these substances.

In the case of newly synthesized N-aryl-substituted dimethylamino(2-pyrrolyl)methylphosphonates, the ecotoxicological studies indicated toxicity of these substances. In phytotoxic tests, the aminophosphonic derivatives showed impact on both monocotyledonous and dicotyledonous plants, however, in the latter case, the toxic effect was stronger. The test compounds also showed significant toxicity against *Heterocypris incongruens* and *Aliivibrio fischeri* (indicators in the Ostracodtoxkit FTM and Microtox[®] tests). It has been found that substituents at a phenyl ring played a key role in the degree of toxicity of such compounds. Thus it can be concluded that potential applications of these compounds require careful analysis.

Also diphenyl-N-arylamino(pyrrol-2-yl)methylphosphonates, which synthesis was a part of this study, were subjected to ecotoxicological assessment. On its basis, it was found that the N-(4-nitrophenyl) derivative was the most toxic for bacteria as compared to other compounds tested. Crustaceans *Heterocypris incongruens* were sensitive to both N-phenyl and N-naphthyl derivatives. These substances, however, were harmless to bacteria.

Another group of compounds were N-arylamino(5-nitrofurfuryl)methylphosphonates, for which the phytotoxicity tests showed harmful effects on plants. However, the toxic effect of some derivatives with the nitrofuryl moiety was stronger in the case of dicotyledonous plants, which indicates the selective toxicity of these substances. The newly synthesized derivatives were also characterized by measurements of toxicity against bacteria *A. fischeri* and freshwater crustaceans *H. incogruens*. The toxicity was found to be higher for the bacteria.

The obtained results provide important information on the ecotoxicology of aminophosphonic derivatives, but any substance having interesting herbicidal properties with simultaneous harmless character to the tested organisms could not be found. This prompts to further exploration in a search for the substance having the desired properties in the field.

3. SPIS PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. J. Lewkowski, M. Morawska, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, "Evaluation of Ecotoxicological Impact of New Pyrrole-derived Aminophosphonates Using Selected Bioassay Battery", *Ecotoxicology*, **2017**, 26(7), 914-929. DOI: 10.1007/s10646-017-1821-4. (IF = 2.492)
2. J. Lewkowski, M. Morawska, A. Kaczmarek, D. Rogacz, K. Lewicka, P. Rychter, „Novel, N-arylamino phosphonates Bearing Pyrrole Moiety and Their Ecotoxicological Properties”, *Molecules*, **2017**, 22, 1132; DOI: 10.3390/molecules22071132. (5-y. IF = 3.268)
3. J. Lewkowski, M. Morawska, R. Karpowicz, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, "Novel (5-nitrofurfuryl)-substituted esters of phosphonoglycine - Their synthesis and phyto- and ecotoxicological properties", *Chemosphere*, **2017**, 188, 618-632. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.031 (5-y. IF = 4.506)
4. J. Lewkowski, M. Morawska, A. Kowalczyk, „Antibacterial Action of (5-Nitrofurfuryl)-derived Aminophosphonates and their Parent Imines”, *Chem. Pap.*, **2018**. DOI: 10.1007/s11696-018-0597-1 (5-y. IF = 1.198)

4. WSTĘP

Przez ostatnie dziesięciolecia obserwuje się wzrost społecznej świadomości, płynącej ze stosowania herbicydów, a także ich negatywnego wpływu na poszczególne ekosystemy. Szybko rozwijający się przemysł oraz rolnictwo, a także postępujący wzrost populacji ludzkiej przyczynia się do degradacji środowiska naturalnego. Bardzo duża część zanieczyszczeń antropogennych, to związki o działaniu toksycznym, jak i mutagennym. Zanieczyszczenia nimi spowodowane stały się jednym z największych zagrożeń ekologicznych, dlatego ich wczesne wykrywanie ma tak wielkie znaczenie.

Herbicydy odgrywają istotną rolę w rolnictwie, zarówno na powierzchniach miejskich, jak i przydomowych. Mogą powodować zanieczyszczenie w sąsiednich ekosystemach wodnych poprzez ługowanie gleby, prowadząc do zaburzeń biologicznych i funkcjonalnych. Działanie herbicydów może również wpływać niekorzystnie na zdrowie ludzi. Stąd ocena ryzyka poprzez monitoring biologiczny jest szczególnie istotna, ponieważ związki te mogą wpływać toksycznie na komórki ludzkie, przy czym jednak niemożliwe jest zbadanie ich wpływu na każdy organizm.

Wysoki koszt oraz czasochłonność współczesnych, klasycznych metod wykrywania substancji szkodliwych skłania do poszukiwań nowych technik detekcji. W związku z czym, udało się opracować liczne biotesty, oparte na ocenie wpływu substancji zanieczyszczających na organizmy żywe w celu oszacowania potencjalnej toksyczności różnych ksenobiotyków, biorąc pod uwagę różne kryteria, takie jak śmierć, możliwość ruchu, wzrost, zachowanie czy funkcje fizjologiczne. Pośród wskaźników, będących głównym ogniwem biotestów na uwagę zasługują np.: luminescencyjna bakteria *Aliivibrio fischeri*, skorupiak *Heterocypris incongruens*, czy pierwotniak *Tetrahymena pyriformis*, będące często stosowanymi w ekotoksykologii organizmami wodnymi.

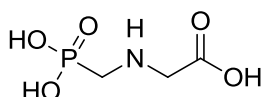
Dużym problemem jest fakt, że pomimo nawet niewielkiej ilości ksenobiotyków w środowisku, skutek może być poważny, a wykrycie ich przy minimalnych stężeniach jest skomplikowane. W związku z czym, powyższe metody mogą być pomocne w charakterystyce biodostępności i toksyczności herbicydów takich jak np. glifosat, pendimetalina, sulkotrion i mezotrion czy eter metylo-tert-butylowy.

5. HERBICYDY

Glifosat

Herbicydy mogą dostawać się do zbiorników wodnych m.in. na skutek procesów splywu. Po przejściu do ekosystemów wodnych, herbicydy wpływają na pogorszenie jakości środowiska oraz prawidłowe funkcjonowanie ekosystemu poprzez redukcję gatunków, modyfikowanie łańcuchów pokarmowych, przepływ i obieg składników odżywczych, a także zmianę stabilności i odporności ekosystemów [Pérez G. L. i inni, 2011].

Najbardziej popularnym i często stosowanym herbicydem, którego wpływ na ekosystemy wodne został udowodniony, jest glifosat oraz jego handlowe odpowiedniki.



Rys.1. Glifosat

Głównym mechanizmem działania tego herbicydu jest hamowanie aktywności syntazy EPSP (syntazy 5-enolopirogroniano-szikimowo-3-fosforanowej), przeciwdziałające przekształceniu kwasu szikimowego do tyrozyny, fenyloalaniny i tryptofanu, co klasyfikuje glifosat, jako inhibitor biosyntezy aminokwasów. Skutkiem działania glifosatu jest desykacja, prowadząca do wysuszenia rośliny, na skutek zaburzeń cyklu fotosyntezy [Martini i inni, 2012][Woźnica i inni, 2012].

Produkty oparte na glifosacie są najpopularniejszymi preparatami używanymi do zwalczania rocznych i wieloletnich chwastów na całym świecie. Gonzalo Luis Pérez i inni [Pérez i inni, 2011] dokonali wstępnej oceny toksyczności na wybranych gatunkach glonów, roślin wodnych, pierwotniaków, skorupiaków, mięczaków, ryb oraz płazów. Powyższe przesłanki, powinny zwrócić uwagę na coraz to większą potrzebę troski o ekosystem [Pérez i inni, 2011]

Sam glifosat (jako kwas lub sól) jest powszechnie uważany za nieznacznie lub umiarkowanie toksyczny w stosunku do organizmów wodnych (tj. LC_{50} lub EC_{50} między > 1 do < 100 mg/L) . Jednak niektóre glony jak np. algi, a także rośliny wodne wykazywały wyższą wrażliwość na glifosat (EC_{50} od $> 0,1$ do < 1 mg/L), wydając się mniej odporne niż mikroalgi. Wysoka toksyczność glifosatu wobec alg i roślin wodnych jest związana

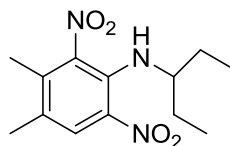
z zakłóceniem metabolizmu roślin przez ten właśnie herbicyd. Z drugiej strony zaobserwowano znacznie niższą toksyczność dla organizmów wodnych (tj. bakterie, pierwotniaki, bezkręgowce, ryby i płazy). Jednak ślimaki i niektóre inne bezkręgowce wydają się być wrażliwe na glifosat, który wykazuje znaczący wpływ na ich wzrost, reprodukcję i metabolizm przy stężeniach poniżej 1 mg/L [Pérez i inni, 2011]

Przeprowadzono badania z uwzględnieniem komercyjnych preparatów, a zwłaszcza zawierających środek powierzchniowo czynny *POEA* (*polioksyetylenoamina*). Wyniki wskazywały na wyższą toksyczność tych preparatów niż sama, czysta *N-(fosfonometylo)glicyna*, w stosunku do wszystkich badanych organizmów wodnych. Roundup® okazał się 7-krotnie bardziej szkodliwy niż glifosat w stosunku do glonów i roślin wodnych. W przypadku pierwotniaków była to toksyczność 13-krotnie większa, w przypadku ryb do 42-krotnie natomiast w przypadku skorupiaków aż 70-krotnie [Pérez i inni, 2011].

Herbicydy na bazie glifosatu (na przykład Roundup®) są szeroko stosowane w środowisku wodnym, mimo pewnych przesłanek świadczących o wysokiej toksyczności tych substancji, jednakże nie są to dane wystarczające. Brak jest informacji dotyczących toksyczności produktów tych preparatów herbicydowych i ich wpływu na środowisko. Przeprowadzono badania toksyczność czystego glifosatu, w postaci soli izopropylaminowej (IPA), a także Roundup® i jego środka powierzchniowo czynnego jakim jest polioksyetylenoamina (POEA), względem bakterii (*Allivibrio fischeri*), mikroalg (*Selenastrum capricornutum* i *Skeletonema costatum*), pierwotniaków (*Tetrahymena pyriformis* i *Euplotes vannus*) oraz skorupiaków (*Ceriodaphnia dubia* i *Acartia tonsa*). Badania obejmowały także wpływ czterech czynników środowiskowych takich jak temperatura, pH czy zawieszone osady. Ogólnie rzecz biorąc, kolejność toksyczności substancji chemicznych była następująca: POEA > Roundup® > glifosat kwas > sól IPA glifosatu, podczas gdy toksyczność glifosatu jako kwasu wynikała głównie z jego wysokiej kwasowości. Mikroalgi i skorupiaci były 4-5-krotnie bardziej wrażliwe na Roundup niż bakterie i pierwotniaki. Wzrost pH (6-9) i wzrost stężenia zawieszonego osadu znacząco zwiększył toksyczność preparatu Roundup® [Pérez i inni, 2011].

Pendimetalina

Kolejnym herbicydem, powszechnie stosowanym w rolnictwie jest *pendimetalina*, będąca inhibitorem polimeryzacji tubuliny do mikrotubul, a co za tym idzie - podziału komórkowego.

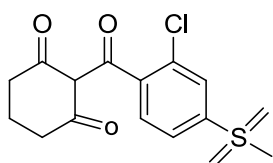


Rys.2. Pedimetalina

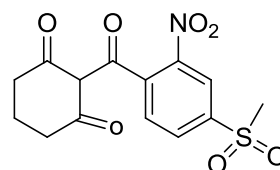
Mikrotubule stanowiące zasadniczy element cytoszkieletu komórek roślinnych, odpowiedzialne są m.in. za determinację kształtu komórek poprzez orientację mikrofibryli celulozowych, czy udział w podziałach komórkowych. Działanie *pendimetaliny* zaburza te procesy, powodując destabilizację procesów życiowych komórki roślinnej, zatrzymując podziały oraz elongację komórek, co w efekcie prowadzi do śmierci [Woźnica i inni, 2012]. W przeciwieństwie do nieselektywnie działającego *glifosatu*, *pendimetalina*, będąca pochodną dinitroaniliny stosowana jest do selektywnej kontroli większości rocznych traw i wielu rocznych chwastów szerokolistnych. Herbicyd Stomp 330, w którym substancją czynną jest właśnie *pendimetalina*, stosuje się do zbóż takich jak: żyto ozime, jęczmień, pszenica ozima, a także do niektórych upraw warzywnych. Przeprowadzono badania dotyczące oceny biodostępności i toksyczności *pendimetaliny* względem trzech gatunków mikroorganizmów wodnych, były to: mikroalgi *Selenastrum capricornutum*, pierwotniak *Tetrahymena thermophila* i bakterie luminescencyjne *Aliivibrio fischeri*. W celu porównania toksyczności wykorzystano standardową pendimetalinę (czysty związek) i techniczny preparat herbicydu Stomp 330. Najbardziej wrażliwe na pendimetalinę były glony *S. capricornutum*. Zarówno w przypadku badanych glonów, jak i bakterii *A. fischeri* wartości EC₅₀ były powyżej poziomu rozpuszczalności badanej substancji w wodzie. Wpływ Stomp 330 na bioluminescencję bakterii *A. fischeri* pojawił się w krótszym czasie w porównaniu z efektem czystej pendimetaliny [Braženaitė i inni, 2006].

Sulkotrion i meotrion

Przeprowadzono badania toksyczności sulkotrionu (2- [2-chloro-4- (metylosulfonylo) benzoilo] -1,3-cykloheksanodion) i meotrionu (2-[4-(metylosulfonylo)-2-nitrobenzoilo]-1,3-cykloheksanodion) przy użyciu reprezentatywnych mikroorganizmów środowiskowych: pierwotniaka *Tetrahymena pyriformis* i bakterii *Allivibrio fischeri*.



Rys.3. Sulkotrion



Rys.4. Meotrion

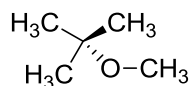
Celem było również dokonanie oceny toksyczności różnych substancji, będących produktami degradacji tych herbicydów. Testy toksyczności obejmowały test Microtox, test na wzrostu populacji *T. pyriformis*, oraz test niespecyficznego esterazy zarówno na *A. fischeri*, jak i na *T. pyriformis*. Dla każdego związku, zostały określone wartości IC_{50} [Bonnet J. i inni, 2008].

Dostępne handlowo, czyste substancje aktywne: sulkotrion i meotrion, nie wykazały toksycznego wpływu na populacje *T. pyriformis*, w przeciwieństwie do niespecyficznego aktywności esterazy w przypadku *A. fischeri*. Większość badanych produktów degradacji i dwóch handlowych preparatów wykazały dużą toksyczność w porównaniu z działaniem atrazyny. Toksyczność tych triketonowych herbicydów było mniejsza niż w *T. pyriformis* i większa lub taka sama jak w *A. fischeri* [Bonnet J. L. i inni, 2008].

Potencjalna toksyczność sulkotrionu i meotrionu, opiera się na inhibicji biosyntezy pigmentów. Chlorofil i karotenoidy, stanowiące integralną część aparatu fotosyntetycznego, narażone na jakiegokolwiek zaburzenia działania na skutek działania tych dwóch triketonowych herbicydów, przestają spełniać swe funkcje, co w efekcie prowadzi do śmierci rośliny [Praczyk i inni, 2004].

Eter metylowo-tert-butyłow

Eter metylowo-tert-butyłow (*MTBE*), oksygenat paliwa dodawany do benzyny, to również substancja mająca wpływ na ekosystemy wodne.

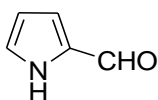


Rys.5. Eter metylowo-tert-butyłow

Przeprowadzono badania dotyczące toksyczności kilku czystych pestycydów (Diuron, Linuron, Dichlofluanid, Sea nine, Irgarol and tributyltin (TBT) oraz tych pestycydów zmieszanych z *MTBE*. W tym celu zastosowano testy ostrej toksyczności *Allivibrio fischeri* i *Daphnia magna*, mierząc i porównując ze sobą poszczególne z wartości EC_{50} (stężenie mg/l związku lub mieszaniny, która jest wymagana do uzyskania 50% zmiany parametru reakcji toksycznej i czasu wymaganego do wygenerowania reakcji toksycznej). Obecność *MTBE* zwiększyła wartość EC_{50} kilku pestycydów (Diuron, Dichlofluanid, TBT i Linuron), a także zwiększyła szybkość reakcji toksycznych niż w przypadku czystych pestycydów. Obecność *MTBE* zwiększyła toksyczność Diuronu o więcej niż 50%, w przypadku bakterii *A. fischer*. Również sama reakcja toksyczna nastąpiła znacznie szybciej - w ciągu 5 min, podczas gdy bez *MTBE*, ta sama reakcja pojawiła się po 30 minutach. Toksyczność *Sea nine* i *Irgarolu*, pozostała natomiast niezmienną przez domieszkę *MTBE*. Sam *MTBE* był toksyczny dla badanych gatunków w stężeniach, które są znacząco wyższe niż poziomy zanieczyszczenia tą substancją, powszechnie wykrywane w środowisku. Jednak obecność *MTBE* może znacznie zwiększyć toksyczność innych pestycydów, które są często obecne w tym samym środowisku co *MTBE*. Kombinacje *MTBE* przy 0,1 mg/l z EC_{50} lub niższe stężenia czystego Diuronu, Dichlofluanid, TBT i Linuronu są bardziej toksyczne niż czyste pestycydy, a reakcja toksyczna jest znacznie szybsza. Dla kilku mieszanin, jak np. *MTBE* i TBT, stwierdzono toksyczność przy stężeniach niższych niż wartości powszechnie wykrywane w środowisku [Hernando M. D. i inni, 2003].

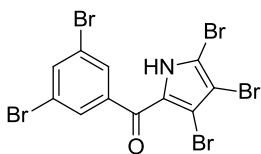
6. ZWIĄZKI ZAWIERAJĄCE UKŁAD PIROLOWY

Pirole są powszechnie znanymi związkami, które mają zróżnicowany charakter działań. Synteza związków chemicznych zawierających pirolowy układ pierścieni doprowadziła do powstania bardziej aktywnych struktur. Związki zawierające układ pirolowy są uważane za potencjalne źródło aktywności biologicznej. Dostępne na rynku leki zawierające pirolowy układ pierścieniowy mają wiele właściwości biologicznych takich jak: przeciwpsychotyczne, przeciwłkowe, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwmalaryczne i wiele innych [Bhardwaj V. i inni, 2015].

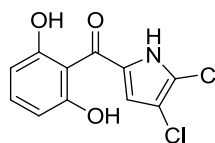


Rys.6. Pirolo-2-karboksyaldehyd

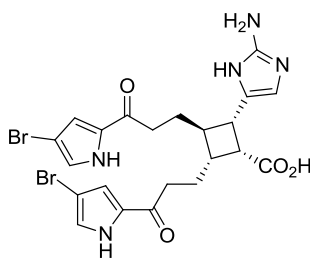
Pirole są jednym z najważniejszych prostych heterocykli, które znajduje się w szerokiej gamie produktów naturalnych, a także mają coraz większe znaczenie w nauce. Pierwszy raz został wyizolowany w 1857 roku z produktów kości podczas pirolizy. Jest fragmentem hemu i chlorofilu. Układ pirolowy został wyizolowany ze źródeł bakteryjnych jako antybakteryjne struktury, takie jak 2-(3,5-dibromobenoilo)-3,4,5-tribromopirrol i pioluteoryna. Pirole są szczególnie widoczne w naturalnym środowisku morskim, występują w kwasie nakamura, który wykazał dobrą aktywność przeciwko opornym na metacylinę szczepom *Staphylococcus aureus* [Estevez V. i inni, 2010].



Rys.7. 2-(3,5-dibromobenoilo)-3,4,5-tribromopirrol



Rys.8. Pioluteoryna

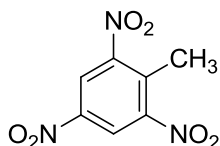


Rys.9. Kwas nakamura

7. ZWIĄZKI ZAWIERAJĄCE UKŁAD NITRO

2,4,6-trinitrotoluen

W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia o trwałych pozostałościach materiałów wybuchowych w glebie i wodach gruntowych, takich jak *2,4,6-trinitrotoluen (TNT)*.



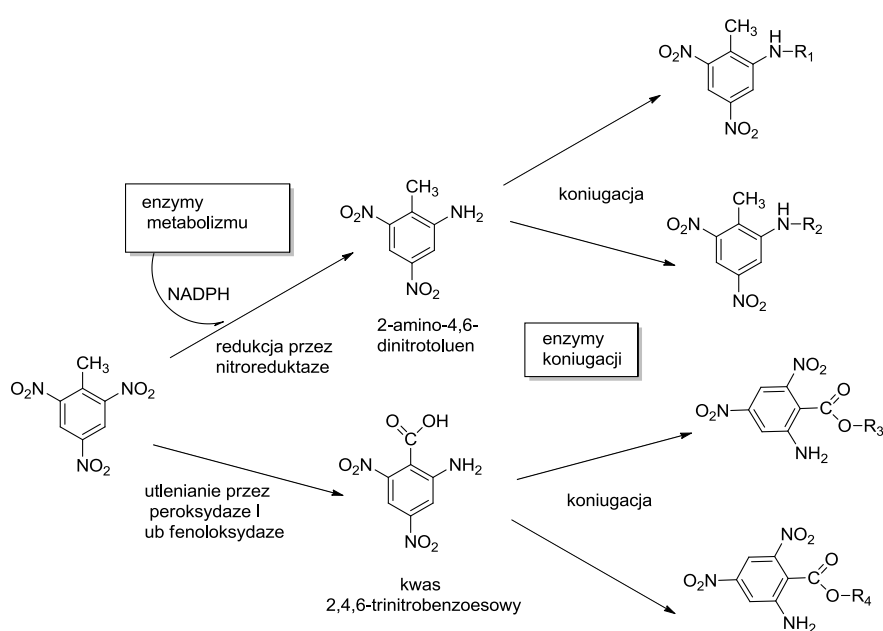
Rys.10. 2,4,6-trinitrotoluen

TNT jest jednym z najbardziej opornych i toksycznych wojskowych materiałów wybuchowych. W związku z tym, że brak jest niedrogich i skutecznych technologii oczyszczania zanieczyszczeń tego typu związkami, skierowano działania na wykorzystanie roślin transgenicznych do detoksykacji gleby skażonej TNT i użyciu nitroreduktaz bakteryjnych. Nitroreduktaza katalizuje redukcję TNT do hydroksyaminodinitrotolenu (HADNT), który jest następnie redukowany do pochodnych aminodinitrotolenu (ADNTs). Rośliny transgeniczne wykazujące ekspresję nitroreduktazy przejawiają się wzrostem zdolności do tolerowania, przyjmowania, i detoksykacji TNT. Badania przeprowadzone na transgenicznych siewkach tytoniu ekspresyjnym bakteryjną nitroreduktazę, dowiodły, że rośliny były w stanie tolerować TNT w stężeniach do granic rozpuszczalności w wodzie. Natomiast poziomy TNT tolerowane przez sadzonki były znacznie wyższe niż poziomy tolerowane przez kiełkujące rośliny. Oznacza to, że hamujący efekt TNT na sadzonkach tytoniu typu dzikiego ma duże znaczenie w kiełkowaniu. Również badania masy roślin transgenicznych wykazały zmniejszoną szybkość wzrostu w obecności TNT [Hannink N. i inni, 2001].

Również niewielkie ilości pochodnych aminodinitrotolenu (ADNTs), uważanych za toksyczne i potencjalnie rakotwórcze ograniczały pobór TNT z pożywki wzrostowej przez rośliny typu dzikiego. Efekt fitotoksyczny był w tym przypadku bardziej widoczny: siewki przejawiały objawy skrajnego bielenia, a transformacja TNT została zatrzymana. Natomiast sadzonki tytoniu posiadające NR okazały się bardziej skuteczne- podczas przebiegu

eksperymentu usunęły cały TNT. Absorpcja i koniugacja TNT, oraz jego metabolitów przez transgeniczne siewki posiada ogromny potencjał jako bardzo skuteczny proces fitoremediacji, w którym TNT jest usuwany ze środowiska poprzez związanie z materiałem roślinnym. Praca Nerissa Hannink sugeruje, że ekspresja nitroreduktazy (NR) w roślinach nadająca się do fitoremediacji może ułatwić skuteczne oczyszczanie obszarów wysoce skażonych trotylem [Hannink N. i inni, 2001].

Na podstawie aktualnych wyników i danych literaturowych hipotetyczny schemat metabolizmu TNT u roślin można przedstawić w następujący sposób (R_1 i R_3 na schemacie są to niskomolekularne związki; R_2 i R_4 – nierozpuszczalne w wysokim stopniu związki):



Rys.11. Schemat metabolizmu TNT w roślinach.

Metabolizm TNT w roślinach przebiega w następujący sposób: początkowo grupy nitrowe TNT są zredukowane do grup aminowych, katalizowanych przez nitroreduktazę, grupa metylowa cząsteczki jest transformowana do grupy karboksylowej, katalizowanej przez enzymy utleniające (fenol oksydaza). Jednak związek między koniugatami utworzony w obydwóch tych przypadkach wskazują, że znaczna większość TNT (80-85%) transformowana jest na drodze [Khatisashvili i inni, 2009].

Klaus Schneider i inni prowadzili badania gleby wykorzystywanej pod uprawy, udowadniając jej duży stopień zanieczyszczeniem z, a szczególnie TNT. Dodatkowo stwierdzono także występowanie ADNTs. Eksperymenty pokazały, że rośliny pobierały

nitrozwiazki z gleby. Stezenie substancji w roslinach bylo podobne do stezenia tych samych substancji w glebie, natomiast najwyzsze stezenia stwierdzono w korzeniach roslin. Koncentracja w liściach i łodygach wyniosła około 20% stezenia, które obecne było w korzeniach [Schneider K. i inni, 1996].

Nitrofurany

Nitrofurany to środki przeciwdrobnoustrojowe wycofane z użycia weterynaryjnego w Unii Europejskiej, ze względu na występowanie ich metabolitów w tkankach zwierzęcych. W raporcie Panelu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności, EFSA, dotyczącego zanieczyszczeń w łańcuchu pokarmowym (CONTAM), zagrożeń dla zdrowia ludzkiego związanych z obecnością nitrofuranów w żywności, podano dane dotyczące zawartości nitrofuranu w diecie człowieka. Podano, iż, według najgorszego scenariusza średnia, chroniczna dawka będzie wynosić od 3,3 do 8,0 i od 1,9 do 4,3 ng/kg dziennie dla małych dzieci i dorosłych. Mimo, że substancje te mają charakter genotoksyczny i rakotwórczy, to jednak stwierdzono, że występuje małe prawdopodobieństwo, że narażenie na żywność skażoną metabolitami nitrofuranów poniżej 1,0 µg/kg stanowi problem zdrowotny [Scientific opinion, 2015].

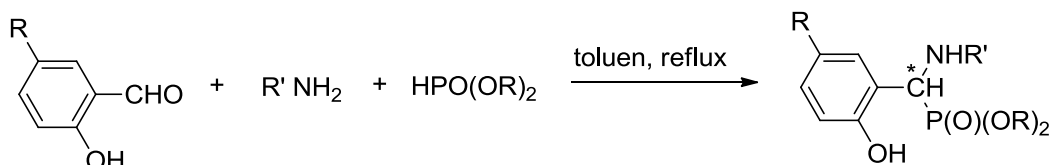
Zanieczyszczenie środowiska spowodowane uwalnianiem mutagennych i rakotwórczych nitrofuranów do wód i gleb jest rodzącym się problemem zdrowia publicznego. Przeprowadzono badania dotyczące pochłaniania i akumulacji nitrofuranu ze skażonego środowiska przez cebulę dymkę. Badanie ujawniło wysoki poziom wychwytu i akumulacji nitrofuranu w jadalnych częściach rośliny. Ponadto, wyniki wskazywały na wysoce efektywny metabolizm roślin wchłoniętego nitrofuranu, prowadząc do tworzenia genotoksycznych metabolitów zawierających pochodnych hydrazyny. Wyniki tych badań wskazują na możliwość zatrucia poprzez zanieczyszczone uprawy spożywcze. [Wang i inni, 2017]

8. AMINOFOSFONIANY

α -Aminofosfoniany są analogami kwasów α -aminokarboksylowych oraz są stosowane jako budulec peptydów. Metoda syntezy pochodnych fosforoorganicznych polega na przyłączeniu związków zawierających wiązania P-H. α -Aminofosfoniany wykazują właściwości biologiczne m.in. jako inhibitory proteaz czy jako katalityczne przeciwciała. Ponadto są stosowane jako środki przeciwbakteryjne oraz środki przeciw wirusom HIV [Srinivasulu i inni, 2007].

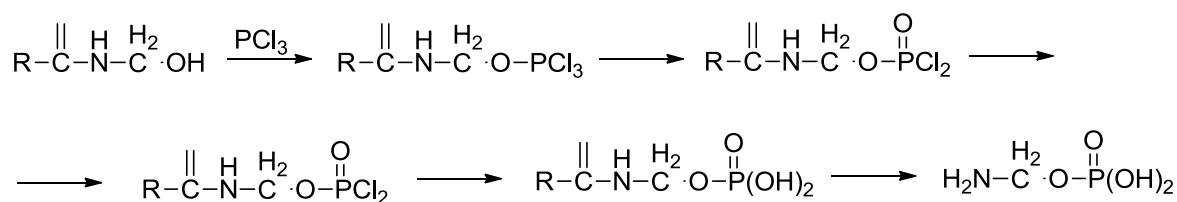
Synteza aminofosfonianów

Reakcja Kabachnik-Fieldsa (schemat 1) jest jedną z najbardziej skutecznych metody syntezy ważnych biologicznie α -aminofosfonianów. Metoda Kabachnika-Fieldsa była pierwszą metodą syntezy kwasów 1-aminoalkanofosfonowych z I-rzędową grupą aminową [Kudzin, 1994]. Reakcja ta jest reakcją jednoetapową, trójskładnikową, w skład której wchodzi związek karbonylowy, amina i fosforyn dialkylowy [Srinivasulu K. i inni, 2007].



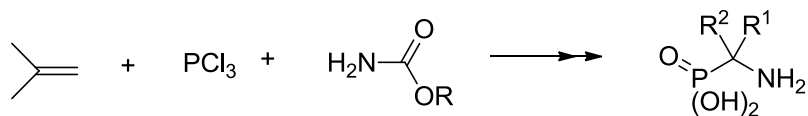
Schemat 1

Chronologicznie pierwszą metodę syntezy kwasów aminoalkanofosfonowych jest reakcja amidoalkilowania trójchlorku fosforu, która została opracowana przez Engelmana i Pikla w 1942 roku [Kudzin, 1994].



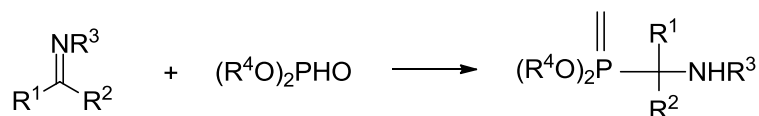
Schemat 2

W późniejszych latach reakcja ta została zmodyfikowana poprzez zastąpienie N-(hydroksymetylo)amidów mieszaniną składającą się z karbaminianów i związków karbonylowych [Kudzin, 1994].



Schemat 3

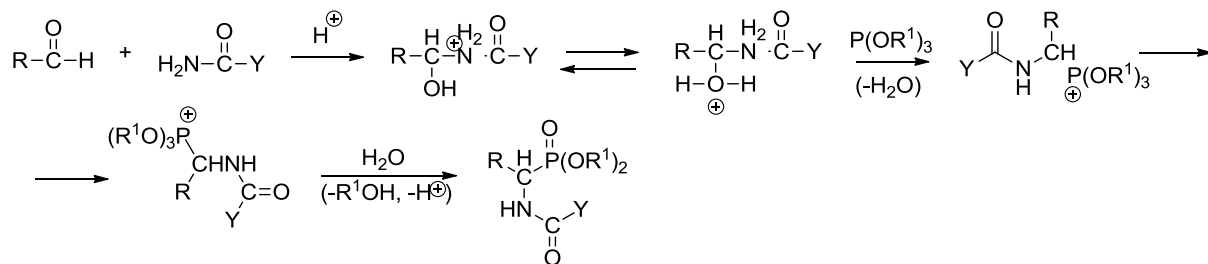
Inną z metod syntezy aminofosfonianów jest dodanie fosforynów dialkylowych do odpowiednich imin [Harry R. i inni, 2014].



Schemat 4

Imina (jeśli jest stabilna) może być najpierw wyizolowana, a następnie poddana reakcji z fosforynem dialkylowym.

W reakcji Biruma reagenty elektrofilowe wytwarzane są in situ z aldehydu i substratu amidowego.



Schemat 5

Reakcja Biruma była wielokrotnie modyfikowana poprzez wykorzystanie jako substraty amidowe N-fenylmocznik, karbaminiany benzyłowy oraz tiomocznik będące substratami metody tioureidoalkanofosfonianowej [Kudzin, 1994].

9. METODOLOGIA BADAŃ EKO- I FITOTOKSYKOLOGICZNYCH

Test wzrostu roślin względem aminofosfonianów przeprowadzono w laboratorium w warunkach zgodnych z wytyczną OECD 208 Guideline Terrestrial. Metoda polegała na ocenie wpływu różnych stężeń nowosyntezyowanych pochodnych aminofosfonowych, które dodawane były do gleby na wschody oraz wczesne stadia wzrostu roślin. Badania przeprowadzono na dwóch rodzajach roślin: owies (*Avena sativa*) jako roślina jednoliścienna i rzodkiewka (*Raphanus sativus L. subvar. radricula Pers.*) - roślina dwuliścienna (OECD 2006).

Wybór do badań dwóch gatunków roślin, związany jest z klasyfikacją herbicydów, biorącej pod uwagę selektywność. Na tym etapie dochodzi do sprzęgania dwóch właściwości herbicydów, takich jak: aktywność i selektywność. Aktywność wiąże się z możliwością danego herbicydu do niszczenia samego chwastu, selektywność natomiast ze zwalczaniem chwastu, nie niszcząc przy tym innych gatunków. W związku z tym poddane działaniu substancji chemicznej roślinnej: jednoliścienny owies i dwuliścienna rzodkiewka, miały na celu określenie czy nowosyntezyowane aminofosfoniany posiadały właściwości selektywne - wpływ na wybrane gatunki chwastów, czy nieselektywne, zwalczanie wszystkich gatunków roślin. [Praczyk i inni, 2004]

Zgodnie z wymienionym standardem OECD 208, test wzrostu roślin związków przeprowadzono w glebie piaszczystej mającej następujące parametry: granulometryczny skład gleby - 77% piasku, 16% pyłu i łu, zawartość węgla organicznego ok. 1,6%, pH (KCl) równe 6.6. Testy przeprowadzono w doniczkach polipropylenowych (średnica 90 mm i pojemność 300 cm³), które zostały wypełnione glebą kontrolną lub glebą zmieszaną z badanymi związkami w odpowiednich stężeniach (1, 10, 100, 200, 400, 800 i 1000 mg/kg suchej masy gleby), które były dobierane w zależności od rodzaju badanych związków. Badane substancje, nierozpuszczalne w wodzie, rozpuszczano w odpowiednim rozpuszczalniku (np. aceton, dichlorometan), a następnie, w odpowiednich stężeniach łączono z piaskiem (50g), stanowiącym nośnik. Rozpuszczalnik odparowywano, a piasek z osadzoną na nim substancją mieszano z glebą (200g). Każde stężenie wykonano w trzech powtórzeniach (3 doniczki na owies, 3 doniczki dla rzodkiewki). Dwadzieścia wyselekcjonowanych nasion każdego z wybranych gatunków roślin umieszczono w ziemi. Nasiona pochodzą z tego samego źródła - nasiona owsa i rzodkiewki zostały zakupione

w Hodowli i Spółki nasienne: Nieznanice i Legutko Ltd. Rośliny hodowano przez 14 dni w kontrolowanych warunkach: stała zawartość wilgoci na wymaganym poziomie rośliny (70% pojemności wodnej), temperatura (20 ± 2 °C), utrzymywano stałe natężenie światła (7000 lux) system 16 godz./dzień i 8 godz./noc. Siewki, podlewano są regularnie (raz na 24h).

Wizualna ocena fitotoksyczności badanych aminofosfonianów, została udokumentowana poprzez wykonanie fotografii cyfrowych w ostatnim dniu testu fitotoksyczności. Uzyskane zdjęcia zostały przeanalizowane pod kątem uszkodzeń badanych roślin, taki jak ich np. zahamowanie wzrostu, chloroza i martwica.

Ocena fitotoksyczności badanych aminofosfonianów przy zastosowanych stężeniach została wykonana poprzez określenie wschodów, co określa się jako procent siewek, które wzeszły, w porównaniu do wschodów roślin kontrolnych. Określano również zawartości świeżej i suchej masy w porównaniu do roślin kontrolnych.

Skuteczność substancji, mających potencjalne działanie herbicydowe związana jest ze sposobem ich absorpcji oraz przemieszczania się po organach roślinnych. Wyróżnia się dwie główne drogi pobierania środków chwastobójczych, pierwszą z nich jest pobór przez części podziemne rośliny, co wiąże się z działaniem herbicydów doglebowych, natomiast drugim poprzez części nadziemne, co jest typowe dla herbicydów dolistnych. W związku z tym, w trakcie badań fitotoksycznych określono także inhibicję wzrostu korzeni i pędów wybranych roślin, w celu określenia czy dana substancja posiadała właściwości herbicydu doglebowego [Woźnica Z., 2012][Burke I., 2014].

Dokonano również określenia wartości EC_{50} czyli stężenia powodującego wystąpienie 50% reakcji testowej.

Dla nowosyntezyowanych substancji, określono również wartości LOEC i NOEC. LOEC, (z ang. *lowest observed effect concentration*), będące najniższym stężeniem związku użytego w badaniu, przy którym zaobserwowano istotny wpływ na wschody i wzrost roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Wszystkie uwzględnione w badaniach stężenia, których wartość jest wyższa od wartości LOEC, sugerują wpływ równy lub wyższy niż ten, który obserwowany jest przy LOEC. Natomiast NOEC, (z ang. *no observed effect*

concentration (dose)), jest to stężenie niewywołujące zauważalnych skutków, znajdujące się bezpośrednio poniżej wartości LOEC.

Wizualna ocena fitotoksyczności badanych aminofosfonianów, została udokumentowana poprzez wykonanie fotografii cyfrowych w ostatnim dniu testu fitotoksyczności. Uzyskane zdjęcia zostały przeanalizowane pod kątem uszkodzeń badanych roślin, taki jak ich np. zahamowanie wzrostu, chloroza i martwica.

Test pigmentowy

Zawartość pigmentów fotosyntetycznych określono według metody opisanej przez Oren i wsp. (1995). 200 mg świeżych liści homogenizowano w 20 ml 80% acetonu, a następnie odwirowano. Zawartość chlorofilu a, chlorofilu b i karotenoidów obliczono na podstawie absorbancji przy długości fali 470, 647 i 664 nm. Zawartość pigmentów wyrażono w mg/g suchej masy.

Test toksyczności Microtox®

Test Microtox oparty jest na wykorzystaniu bakterii luminescencyjnych *Aliivibrio fischeri*, których świecenie jest naturalnym efektem przebiegu ich procesów metabolicznych. Jest to test wyróżniający się szybkością oznaczenia; wynik po 15 - 45 min. Miarą toksyczności jest redukcja emisji światła przez bakterie świecące *A. fischeri*. Porównuje się poziom emisji światła próbek hodowli poddanych działaniu związku badanego, z poziomem emisji hodowli kontrolnej. Zjawisko luminescencji bakterii świecących spowodowane jest obecnością w ich komórkach i aktywnością enzymu lucyferazy. W obecności związku toksycznego dla komórek bakteryjnych następuje zahamowanie aktywności tego enzymu.

Bioluminescencja bakterii *A. fischeri* jest ściśle związana z wielkością ich populacji, a także aktualnym stanem metabolicznym. Bakterie luminescencyjne mają zdolność do emisji światła, dopiero w momencie gdy znajdą się w optymalnym dla ich funkcjonowania środowisku. W standardowych warunkach bakterie wykorzystują około 10% pochodzącej z ich metabolizmu energii na świecenie, natomiast obecność związków wysoce szkodliwych dla mikroorganizmów, związanej z zaburzeniami procesów fizjologicznych w komórkach, prowadzi do zaniku luminescencji. Im wyższy jest toksyczność substancji chemicznej, na którą bakterie są wystawione, tym mniejsza jest ilość światła, którą emitują.

Obecnie, uważa się, że system Microtox to najczęściej stosowany, a jednocześnie najlepiej poznany dostępny na rynku biotest, wykorzystujący bakterie bioluminescencyjne *Allivibrio fischeri* jako element aktywny.

Za pomocą testu dokonano pomiaru toksyczności ostrej, co definiuje się jako efekt niekorzystny, występujący w krótkim czasie po podaniu substancji badanej, w pojedynczej dawce bądź też w kilku dawkach w okresie 24 godzin. Testy przeprowadzono w analizatorze Microtox® M500 zgodnie z Podręcznikiem Microtox® z 1992 r., z użyciem metody Solid-Phase Test, Doe et al. (2005), co wykorzystywane jest w momencie, gdy badana substancja nie jest rozpuszczalna w wodzie. W przypadku bakterii *Aliivibrio fischeri* pod uwagę brano 50% spadek intensywności bioluminescencji, co oznaczane jest za pomocą symbolu EC₅₀.

Test Ostrakodtoxit F

Test Ostrakodtoxit F należy do testów bezpośredniego kontaktu oceny toksyczności chronicznej z wykorzystaniem młodych dennych skorupiaków *Heterocypris incongruens* (małżoraczków) wylęgłych z cyst przetrwalnikowych w ciągu 52 godzin (zgodnie z procedurą producenta). Po 6 dniach przechowywania w badanym osadzie określana jest ich śmiertelność i zahamowanie wzrostu wyrażone procentowo w odniesieniu do rezultatów uzyskanych w kontakcie z nietoksycznym osadem kontrolnym. Test przeprowadzany jest na płytkach z 6 dołkami (3 × 2), czas inkubacji: 6 dni w temperaturze 25°C.

Mikrobiotest Ostracodtoxit F służy do badania toksyczności osadów na podstawie reakcji drobnych skorupiaków, małżoraczków bentosowych *Heterocypris incongruens*. W przeciwieństwie do opisanego wyżej testu Microtox, gdzie badana była toksyczność ostra, w przypadku testu Ostracodtoxit, dokonywana jest ocena toksyczności chronicznej, którą definiuje się jako szkodliwe zmiany w organizmach testowych, wywołane na skutek dłuższego lub stałego oddziaływania substancji w czasie bądź też po wielokrotnym narażeniu na związek chemiczny. Test przeprowadza się z wykorzystaniem młodych dennych skorupiaków *H. incongruens*, wylęgłych z cyst, mających charakter przetrwalnikowy w ciągu 52 godzin. Zwierzęta inkubuje się w obecności ekstraktu z materiału środowiskowego (osadu). W ciągu 6 dni obserwacji, w standardowych warunkach ocenia się ich śmiertelność oraz zahamowanie wzrostu, które wyraża się procentowo w odniesieniu do wyników

uzyskanych w kontakcie z organizmami kontrolnymi, nie poddanych działaniu badanych substancji.

Pomiar długości przeprowadzono za pomocą paska mikrometrycznego umieszczonego na spodzie szklanej płytki mikroskopu. Hamowanie wzrostu (GI) *H. incongruens* w populacji obliczono następująco:

$$\% \text{ inhibicja wzrostu} = 100 - \frac{\text{wzrost w osadzie testowym}}{\text{wzrost w osadzie referencyjnym}} \times 100$$

Analiza statystyczna

Istotność uzyskanych wyników oceniono za pomocą analizy wariancji (ANOVA). Najmniej istotne wartości różnicy (LSD) na poziomie ufności 95% były obliczono przy użyciu testu Tukeya. Ponadto średnie standardowe odchylenie określono i naniesiono na wykresy.

Aspekt ekotoksykologiczny omawianych nowosyntezyowanych pochodnych aminofosfonowych, ma charakter wieloetapowy, gdyż uwzględnia każdy, ze szczebli drabiny sieci troficznej, gdzie producenci to rośliny użyte podczas badań fitotoksyczności, konsumenci- skorupiaki *Heterocypris incongruens*, w bioteście Ostracodtoxkit, a destruentami- bakterie morskie *Aliivibrio fischeri* w systemie Microtox.

10. METODOLOGIA BADAŃ CYTOTOKSYKOLOGICZNYCH

Określenie aktywności antybakteryjnej – wyznaczenie wartości MIC

Wrażliwość wybranych szczepów na badane związki oceniano poprzez wyznaczenie wartości współczynnika MIC (ang. Minimal Inhibitory Concentration) metodą mikrorozcieńczeń na 96-dółkowych płytkach titracyjnych zgodnie z zaleceniami EUCAST (ang. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, ISO 20776-1 (2006)). Właściwości przeciwbakteryjne związków wobec panelu referencyjnych szczepów gramujemnych (*Escherichia coli* NCTC 8196, *Proteus vulgaris* ATCC 49990, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749) i gramodatnich (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228) badano w zakresie stężeń: 2-128 µg/ml, wykonując podwójne rozcieńczenia w płynnym podłożu Mueller-Hinton II (MH) (zawartość DMSO w najwyższym badanym stężeniu związku wynosiła 1% i nie miała istotnego wpływu na wzrost drobnoustrojów). Następnie dodawano 50 µL zawiesiny bakteryjnej danego szczepu o gęstości około 5×10^5 CFU/mL. Płytki inkubowano przez 18 h w temperaturze 37°C, w warunkach wytrząsania (180 rpm). Po inkubacji, gęstość hodowli mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 600$ nm, przy użyciu aparatu SpectraMax i3. Kontrolę pozytywną stanowiło czyste podłoże z dodanym inoculum, ale bez badanego związku. Każdorazowo doświadczenie powtarzano trzykrotnie. Za wartość MIC przyjmowano stężenie związku, w którym nie obserwowano wzrostu hodowli. Dla porównania otrzymanych wyników, określano również aktywność przeciwbakteryjną ampicyliny, oksacyliny i nitrofurantyny. Dodatkowo, ze względu na wysoką aktywność antybakteryjną badanych związków wobec referencyjnego szczepu *S. aureus*, określono ich aktywność również wobec 12 klinicznych izolatów *S. aureus* (w tym dwóch MRSA).

Oznaczanie żywotności komórek badanych linii komórkowych

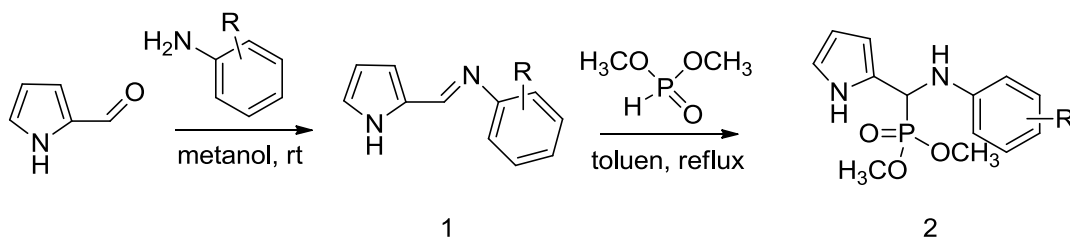
Ocenę żywotności komórek linii fibroblastów mysich L929 (ATTC ®—CCL-1) oraz linii komórek raka szyjki macicy człowieka HeLa (ATTC ®—CCL-2™) przeprowadzano za pomocą testu MTT. Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy (MTT) jest żółtą solą rozpuszczalną w wodzie, która w żywych komórkach zostaje przekształcana przez dehydrogenazę mitochondrialną do nierozpuszczalnego formazanu o zabarwieniu

fioletowym. Kryształy formazanu są rozpuszczalne w organicznych rozpuszczalnikach, jak np. DMSO i mogą być oznaczane kolorymetrycznie przy długości fali 550 nm. Ich liczba jest więc proporcjonalna do liczby żywych komórek, ponieważ redukcja soli tetrazoliowej do barwnego produktu jest możliwa tylko w komórkach o nienaruszonym metabolizmie. Zawiesinę komórek w podłożu IMDM doprowadzano do gęstości równej $1 \times 10^5/\text{ml}$ i nanoszono po 100 μl na 96-dołkową płytkę titracyjną, uzyskując w ten sposób 1×10^4 komórek na dołek (zgodnie z normą ISO 10993-5:2009 dla linii L929). Następnie płytki inkubowano przez 24 h w 37°C i 10% CO_2 . Po inkubacji usuwano stare podłoże i dodawano 100 μl podłoża zawierającego badane związki w zakresie stężeń 2 – 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (zawartość DMSO w najwyższym stężeniu związku nie przekraczała 1% i nie miała istotnego wpływu na wzrost komórek). Płytki inkubowano kolejne 24 h w 37°C i 10% CO_2 . Kontrolę pozytywną stanowiły komórki hodowane w czystym podłożu, bez dodatku związku. Dodatkowo, w analogiczny sposób określano aktywność cytotoksyczną związku przeciwnowotworowego o udowodnionej aktywności cytotoksycznej – cisplatyny. Po 24 godzinnej inkubacji komórek ze związkami, usuwano podłoże z komórek i dodawano na każdy dołek po 50 μl MTT o stężeniu 1 mg/ml i płytki inkubowano przez 2 h w 37°C i 10% CO_2 . Następnie płytki wirowano przy 1800 rpm przez 5 min w temperaturze pokojowej, usuwano supernatant, nakładano na każdy dołek po 150 μl DMSO w celu rozpuszczenia kryształów formazanu i 25 μl 0,1 M buforu glicynowego o pH 10,5 w celu utrwalenia barwy. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 550 \text{ nm}$, wykorzystując wielofunkcyjny czytnik płytek SpectraMax i3. Każdorazowo doświadczenie powtarzano trzykrotnie. Wartość IC_{50} , a więc takiego stężenia związku, które hamuje aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej o 50% w stosunku do kontroli pozytywnej wyznaczano przy użyciu programu GraphPad Prism 7 wykorzystując nieliniowy model regresji.

11. BADANIA WŁASNE

11.1. Synteza aminofosfonianów dimetylowych pochodnych pirolu (Publikacja 1)

Synteżowałam 6 aminofosfonianów dimetylowych z ugrupowaniem pirolowym. Zmiennymi podstawnikami były aminy pochodne toluidyny i anizydyny. Iminy 1a-f zsyntezowałam znaną metodą [Boduszek, 1996]. Aldehyd pirolowy rozpuściłam w toluenie i do roztworu dodałam odpowiednią aminę. Mieszaninę mieszałam w temperaturze pokojowej przez 15 minut w obecność bezwodnego siarczanu magnezu ($MgSO_4$) w celu pozbycia się cząsteczek wody. Iminy poddane były kolejnemu etapowi syntezy bez żadnego oczyszczania. W celu określenia obecności imin wykonałam widma 1H NMR (singlet $-CH=N-$ między 8 a 8,5 ppm). Następnie przeprowadziłam reakcję addycji (zmodyfikowana reakcja *aza-Pudovika*) poprzez dodanie fosforynu dimetylowego. Wstępne próby prowadzenia reakcji bez ogrzewania nie wykazywały odpowiednio wysokiej wydajności, dlatego mieszaninę mieszałam na mieszadle magnetycznym w temperaturze $100^\circ C$ przez 2 godziny. Roztwór przesączałam, a rozpuszczalnik usunęłam pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie dodałam CH_2Cl_2 i ekstrahowałam $NaHCO_3$ w celu usunięcia nadmiaru fosforynu dimetylowego. Fazy organiczne wysuszyłam $MgSO_4$ i CH_2Cl_2 usunęłam poprzez odparowanie. Produkty reakcji oczyściłam za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z octanem etylu-heksanem (4:1). Próby krystalizacji zsyntezowanych aminofosfonianów z $CH_2Cl_2:C_6H_{14}$ w różnych stosunkach wagowych okazały się niepomyślne. Otrzymanie czystej formy związków powiodło się poprzez rozpuszczenie w octanie etylu i ostrożne wytrącanie z heksanem.



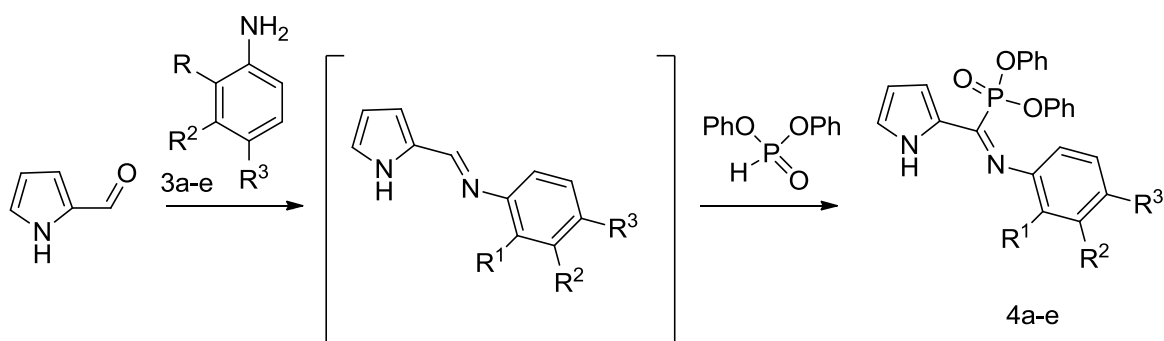
a: $R^1 = 2-CH_3$; b: $R^1 = 3-CH_3$; c: $R^1 = 4-CH_3$; d: $R^1 = 2-OCH_3$; e: $R^1 = 3-OCH_3$; f: $R^1 = 4-OCH_3$

Schemat 6. Synteza aminofosfonianów z ugrupowaniem pirolowym

Czystość została zweryfikowana za pomocą analizy elementarnej - związek uznano za czysty, kiedy różnica między obliczonym a znalezionym elementem % nie był większa niż $\pm 0,2\%$. Otrzymałam związki z zadawalającymi wydajnościami.

11.2. Synteza aminofosfonianów difenylowych pochodnych pirolu (Publikacja 2)

Syntezę aminofosfonianów 4a-e przeprowadziłam za pomocą reakcji *aza*-Pudovika, stosując metodologię określoną jakiś czas temu w naszym laboratorium. Klasyczna metoda używana do reakcja *aza*-Pudovika, tj. otrzymywanie zasady Schiffa z mieszaniny aldehydu z aminą w metanolu, w temperaturze pokojowej, jego wyodrębnienie i na koniec reakcja zasady Schiffa z fosforem difenylowym we wrzącym acetonitrylu lub toluenie nie dostarczył pożądanego efektu. Pochodzące aminofosfoniany otrzymałam w dwuetapowej reakcji, ale zasady Schiffa nie były izolowane. (Schemat 7). Tworzenie zasad Schiffa w acetonitrylu było monitorowane przez Spektroskopie ^1H NMR (pojawienie się sygnału protonu azometinowego w pobliżu 8.5 ppm, przy równoczesnym zniknięciu sygnału protonu aldehydowego przy 9,5 ppm) i tak szybko gdy stwierdzono, że jego tworzenie się zakończyło, do mieszaniny dodano fosfor difenyłowy. Reakcje prowadziłam przez około 4 godziny w temperaturze pokojowej, aż powstały osady, które były rutynowo wyizolowane i określone w celu uzyskania aminofosfonianów 4a-e przy wysokich wydajnościach .



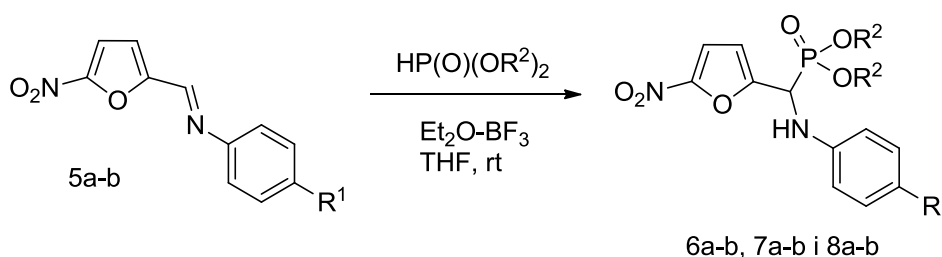
a: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$; b: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^3 = \text{NO}_2$; c: $\text{R}^1 = \text{CH}_3$, $\text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^3 = \text{Cl}$;

d: $\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{Br}$; e: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{CH}_2=\text{CH}$, $\text{R}^3 = \text{H}$

Schemat 7. Synteza aminofosfonianów z ugrupowaniem pirolowym

11.3. Synteza aminofosfonianów z ugrupowaniem nitrofurylowym (Publikacja 3)

Zsyntezowałam nowe, dotąd nieznanne związki z ugrupowaniem nitrofurylowym. Zasady Schiffa 1a-b zsyntezowałam na podstawie opublikowanej procedury [Matusiak i inni, 2013]. Produkty zidentyfikowałam poprzez Spektroskopie ^1H NMR. Aminofosfoniany 6-8 zostały zsyntetyzowane poprzez zmodyfikowaną reakcję *aza*-Pudovik, tj. przez dodanie odpowiedniego *H*-fosfonianu do wiązania azometinowego zasady Schiffa 5a-b. Klasyczne warunki dla reakcji (kwasowa kataliza w acetonitrylu lub wrzenie w toluenie) zawiodły, sięgnęłam więc po bardziej wyrafinowaną metodologię. Dodanie *H*-fosfoniany przeprowadziłam w temperaturze pokojowej, w suchym THF, a reakcje były katalizowane przez eteryczny kompleks $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, co dało pożądane aminofosfoniany z wysokimi wydajnościami. To metodologia została opisana przez [Odinets i inni, 2009]. Rozpuszczalnik usunęłam na wyparce obrotowej, dodałam CH_2Cl_2 (10 ml) i mieszaninę przemyłam 1M wodnym roztworem HCl. Organiczne fazy wysuszyłam Na_2SO_4 , następnie CH_2Cl_2 usunęłam poprzez odparowanie.



5a: R¹ = CH₃; **5b:** R¹ = OCH₃; **6:** R² = CH₃; **7:** R² = CH₂CH₃; **8:** R² = Ph

Schemat 8. Synteza aminofosfonianów z ugrupowaniem nitrofurylowym

11.4. Właściwości eko i fitotoksykologiczne aminofosfonianów z ugrupowaniem pirolowym (Publikacja 1, Publikacja 2)

Badania były wykonywane we współpracy z zespołem z Instytutu Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

Odpowiedzi roślin na testowane związki są zależne od dawki. Wartości EC₅₀, które odpowiadają zahamowaniu wzrostu pędów, zarówno w przypadku owsa, jak i rzodkiewki, charakteryzuje następująca toksyczność: **2c** > **2b** > **2a**. Podobna tendencja zmian wartości EC₅₀

występowała również w przypadku korzeni owsa. Pod tym względem można stwierdzić, że inhibicja pędu i korzeni, zależy od pozycji podstawnika i wygląda następująco: orto <meta <para. Biorąc pod uwagę zmiany w zawartości świeżej i suchej masy roślin podczas traktowania ich badanymi związkami, jak również ich kiełkowanie, można stwierdzić, że dwuliścienna rzodkiewka jest bardziej wrażliwa na działanie badanych substancji niż jednoliścienny owies. Wyniki uzyskane w teście fitotoksycznym pokrywają się z tymi uzyskanymi podczas pozostałych testów, Microtox® i Test Ostracodtokxit F™. Za najbardziej toksyczne związki przeciwko bakteriom *Aliivibrio fischeri* i skorupiakom *Heterocypris incongruens* zostały uznane dwie pochodne: dimetylo *N*-(4-metylofenylo) amino (2-pirolilo) –metylofosfonian **2c** i dimetylo *N*-(4-metoksyfenylo) amino (2- pirolilo) -metylofosfonian **2f**. W przeciwieństwie do tego warto zauważyć, że pochodne **2b** i **2e** z podstawieniem meta są bardziej przyjazne dla środowiska niż związki z podstawieniem orto i para. Co więcej, wyniki uzyskane podczas badań biologicznych w przypadku *A. fischeri* i *H. incongruens* wykazały silniejszy negatywny wpływ substancji **2d-f** z pierścieniem fenylowym podstawionym grupą metoksy w porównaniu do układów podstawionych grupą metylową (**2a-c**). Wszystkie powyższe wyniki wskazują, że *N*-arylo podstawione dimetyloamino (2-pirolilo) metylofosfoniany **2a-f** są związkami toksycznymi. Ich fitotoksyczność jest znacząca i chociaż nie jest wystarczająco wysoka i selektywna, aby uznać związki **2a-f** za potencjalne herbicydy, jednakże na tyle wysokie, aby potraktować je jako substancje szkodliwe. Ich ekotoksyczność przeciwko *Aliivibrio fischeri* i *Heterocypris incongruens* w pełni to potwierdza. Heteroarylo-podstawione pochodne fosfonoglicyny były (i są) rejestrowane jako substancje o istotnym potencjale biologicznym. Biorąc pod uwagę ich charakterystykę ekotoksykologiczną, jakiegokolwiek zastosowanie systemów aminofosfonowych musi być poprzedzone badaniami pod kątem ekotoksyczności, zwłaszcza że istnieją już dane dotyczące szkodliwego wpływ aminofosfonowych pochodnych furanu [Matusiak i inni., 2013] i tiofenu [Lewkowski i inni, 2016]. Co więcej, należy pamiętać, że potencjalne odpady zawierające badane związki **2a-f** mogą stanowić niebezpieczeństwo dla środowiska.

Natomiast aminofosfoniany difenylove pochodne pirolu, których ekotoksykologię badano na bakteriach *A. fischeri* i skorupiakach *H. incongruens*, były również toksyczne, ale w różnym stopniu. Zaobserwowano pewną tendencję: związki, które okazały się silnie toksyczne dla *H. incongruens* są raczej lekko toksyczne wobec *A. fischeri*, i odwrotnie: substancje silnie toksyczne dla bakterii, nie są silnie toksyczne dla skorupiaków. Strukturą,

która prawdopodobnie przyczyniła się do toksycznego wpływu na *H. incongruens* i jego braku w przypadku *A. fischeri* gdy *N*-podstawnik był niepodstawioną grupą arylową (1-naftyl, fenyl), dla związków 4a i 4e. Z drugiej strony, pochodna *N*-(4-nitrofenylo) 4b była względnie bezpieczna dla skorupiaków, ale była wysoce toksyczna dla bakterii. Jest to zgodne z oczekiwaniami, ponieważ wpływ grupy nitrowej na bakterie jest dobrze znany w przypadku grupy nitrowej związanej z ugrupowaniami imidazolilowymi lub furylowymi. Związki **4c-d**, które nie należą do żadnej z wymienionych grup, były równie toksyczne dla obu badanych organizmów, przy czym ich toksyczność można uznać za umiarkowaną. Badania nad tymi związkami zostaną pogłębione w najbliższej przyszłości i rozszerzone na np. badanie ich wiązania do niektórych białek roślinnych lub pod kątem ich potencjalnej skuteczności w farmakologii. Również i te wyniki wyraźnie pokazują, że każda możliwa aplikacja badanych związków **4a-b** i **4e** (lub jakiegokolwiek innego związku podobnego do nich) wymagają szczególnej ostrożności.

11.5. Właściwości eko i fitotoksykologiczne aminofosfonianów z ugrupowaniem nitrofurylowym (Publikacja 3)

Nowosyntezywane *N*-aryloamino (5-nitrofurfurylo) metylofosfoniany wykazują szkodliwy wpływ ekotoksykologiczny na wyższe rośliny lądowe (*A. sativa* i *R. sativus*), skorupiaki *H. incongruens* i gram ujemne bakterie *A. fischeri*. *N*-(4-metoksyfenylo) - podstawione aminofosfoniany **6b**, **7b** i **8b** są bardziej toksyczne dla roślin wyższych, w porównaniu do ich analogów *N*(4-metylofenylo) **6a**, **7a** i **8a**. Stwierdzono, że rzodkiewka jest bardziej wrażliwa na działanie związków **6-8**, w porównaniu do jednoliściennego owsa. Zahamowanie wzrostu korzeni obydwóch badanych roślin było wyższe w porównaniu z inhibicją pędów, co wskazuje na to, że podziemne części obydwóch roślin są bardziej wrażliwe na działanie badanych związków. Aktywność *N*-(4-metylofenylo) amino (5-nitrofurfurylo) metylofosfonianów **6a**, **7a** i **8a** na *Aliivibrio fischeri* i *Heterocypris incongruens* było znacznie silniejsze w porównaniu do ich *N*-(4-metoksyfenylo)amino(5-nitrofurfurylo) metylofosfonianowych analogów **6b**, **7b** i **8b**. Niemniej jednak, wszystkie sześć badanych związków, charakteryzuje ogólna toksyczność zarówno w przypadku bakterii *A. fischeri* i małżoraczków *H. incongruens*, przy czym są one daleko bardziej toksyczne dla bakterii i należy pamiętać, aby stosując te substancje, zapobiec przedostaniu się ich do środowiska.

11.6. Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe aminofosfonianów z ugrupowaniem nitrofurylowym (Publikacja 4)

Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe były badane przez Aleksandrę Kowalczyk (Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Genetyki Drobnoustrojów).

Stwierdzono, że badane amino(5-nitrofurfurylo)metylofosfoniany dimetylowe **6b**, **6c** i **6f** wykazują interesującą aktywność wobec szczepów gronkowca złocistego odpornych na metycylinę.

12. PODSUMOWANIE

1. Zsyntezowałam α -aminofosfoniany pochodne pirolo-2-karboksyaldehydu i 5-nitrofurfuralu.
2. Przeprowadziłam badania fito- i ekotoksykologiczne zsyntezowanych związków.
3. Związki dimetyloamino(2-pirolilo)metylofosfoniany wykazały toksyczne działanie na rośliny jedno i dwuliścienne, a także wobec skorupiaków *Heterocypris incongruens* i bakterii *Aliivibrio fischeri*.
4. Z grupy zsyntezowanych związków difenylo-*N*-aryloamino(pirolo-2-ylo)metylofosfoniany, pochodna *N*-(4-nitrofenylu) była najbardziej toksyczna dla bakterii w porównaniu do innych badanych związków. Natomiast skorupiaci *Heterocypris incongruens*, wrażliwe były zarówno na *N*-fenyl, jak i na *N*-naftylowe pochodne. Substancje te, były jednak nieszkodliwe dla bakterii.
5. *N*-aryloamino(5-nitrofurfurylo)metylofosfoniany wykazały pewną selektywność - toksyczne działanie niektórych pochodnych z ugrupowaniem nitrofurylowym było silniejsze w przypadku roślin dwuliściennych.

13. SPIS LITERATURY

Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V., Dhiman S. and Sharma P. (2015) Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics, *RSC Adv.*, 5, 15233

Boduszek Bogdan (1996) 1-aminophosphonic acid and esters bearing heterocyclic moiety. Part 2. ¹Pyridine, pyrrole and imidazole derivatives, *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, Vol. 113, pp. 209-218

Bonnet J. L., Bonnemoy F., Dusser M., J. Bohatier (2008) Toxicity Assessment of the Herbicides Sulcotrione and Mesotrione Toward Two Reference Environmental Microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*, *Arch Environ Contam Toxicol* 55:576–583

Bražėnaitė J., Šakalienė O. (2006) Availability and toxicity of pendimethalin to aquatic microorganisms *BIOLOGIJA*. 2006. Nr. 3. P. 59–62

Burke I., Bell J., (2014) Plant Health Management: Herbicides. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*

Estevez V., Villacampa M. and Menendez J. (2010) Multicomponent reactions for the synthesis of pyrroles, *Chem. Soc. Rev.*, 39, 4402-4421

Hannink N., Rosser S., French C., Basran A., Murray J., Nicklin S., and Bruce N. (2001) Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase, *Nature Biotechnology*, 19, 1168-1172

Hernando M. D., Ejerhoon M., Fernandez-Alba A.R., Chisti Y. (2003) Combined toxicity effects of MTBE and pesticides measured with *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* bioassays, *Water Research* 37; 4091–4098

Hudson H. R. and Lee R. J. (2014) *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 189:1149–1155

Khatisashvili G., Gordeziani M., Adamia G., Kvesitadze E., Sadunishvili T., and Kvesitadze G. (2009) Higher Plants Ability to Assimilate Explosives, *World Academy of Science, World Acad Sci Eng Technol*, 57, 266-270

Kudzin Z.H., (1996) Badanie w dziedzinie kwasów 1-aminoalkanofosfonowych, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego

Martini C., Gabrielli M., del Vila M. (2012) A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblastst, Toxicology in vitro, 26(6), 1007-1013

Matusiak A., Lewkowski J., Rychter P. and Biczak R. (2013) Phytotoxicity of New Furan-derived Aminophosphonic Acids, *N*-Aryl Furaldimines and 5-Nitrofuraldimine J. Agric. Food Chem., 61, 7673-7678

Odinets I.L., Artyshin O.I., Shevchenko N., Petrovskii P., Nenajdenko V.G., Roschenthaler G.-V. (2009) Efficient Synthesis of Substituted Cyclic α -Aminophosphonates, Synthesis, No. 4, pp 0577-0582

Otto M. (2013) Community-associated MRSA: What makes them special?, International Journal of Medical Microbiology 303, 324-330

Pérez G. L., María Solange Vera and Leandro Andrés Miranda (2011) Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems

Praczyk T., Skrzypczak G. (2004) Herbicydy. Państwowe wydawnictwo rolnicze i leśne, Poznań

Schneider K., Oltmanns J., Radenberg T., Schneider T., Pauly-Mundegar D. (1996) Uptake of Nitroaromatic Compounds in Plants. Implications for Risk Assessment of Ammunition Sites, ESPR - Environ. Sci. & Pollut. Res. 3 (3) 135-138

Scientific opinion (2015) Scientific Opinion on nitrofurans and their metabolites in food EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), EFSA Journal; 13(6):4140

Srinivasulu K., C. Naga Raju, Y. Hari Babu and A. Lava Kumar Reddy (2007) Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New α -Aminophosphonates, S. Afr. J. Chem., 60, 47–51

Yanniccari M., Istilart C., Gimenez D.O., Castro A.M. (2012) Effects of glyphosate on the movement of assimilates of two *Lolium perenne* L. populations with differential herbicide sensitivity, *Environmental and experimental botany*, 82, 14-19

Wang Y., K. K. Jason Chan, and Wan Chan (2017) Plant Uptake and Metabolism of Nitrofurantoin Antibiotics in Spring Onion Grown in Nitrofurantoin-Contaminated Soil, *J. Agric. Food Chem.*, 65, 4255-4261

Woźnica Z. (2012) *Herbologia: podstawy biologii, ekologii i zwalczania chwastów*, Państwowe wydawnictwo rolnicze i leśne, Poznań

14. ŻYCIORYS ORAZ PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ

Magister Marta Siedlerek urodziła się 10 lutego 1988 roku w Łodzi. W roku 2007 ukończyła II Liceum Ogólnokształcące im. Jana Kochanowskiego w Bełchatowie i tego samego roku rozpoczęła studia na kierunku 'Chemia', na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. W 2010 roku obroniła pracę licencjacką pt. „Cyklodekstryny” wykonaną w Zakładzie Fizykochemii Roztworów, Wydziału Chemii UŁ pod kierunkiem prof. dr. hab Adama Balda. Dwa lata później obroniła pracę magisterską wykonaną w Katedrze Technologii i Chemii Materiałów na Wydziale Chemii UŁ, pt. „Badania przeciwdrożdżycowe i antykorozyjne powłok tlenku tytanu na stali” pod kierunkiem dr. hab. Ireneusza Piwońskiego, prof. UŁ. W 2013 roku mgr Marta Siedlerek otrzymała stopień licencjata na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o specjalności nauczycielskiej z zakresu chemii i biologii. Promotorem pracy licencjackiej pt. „Wewnątrzcząsteczkowe tworzenie wiązania *O*-glikozydowego” był dr Robert Kołodziuk. W tym samym roku magister Marta Siedlerek została słuchaczem Studium Doktoranckiego Wydziału Chemii i rozpoczęła badania w ramach rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Synteza α -aminofosfonianów pochodnych pirolo-2-karboksyaldehydu i 5-nitrofurfuralu oraz ich właściwości fito- i ekotoksykologiczne” w Katedrze Chemii Organicznej pod kierunkiem prof. dr. hab. Jarosława Lewkowskiego oraz dr. Rafała Karpowicza jako promotora pomocniczego.

W trakcie studiów doktoranckich mgr Marta Siedlerek była wykonawcą w granicy Narodowego Centrum Nauki (nr umowy: UMO-2014/13/B/NZ9/02418, kierownik projektu dr hab. Jarosław Lewkowski) oraz odbyła staże w Instytucie Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

Magister Marta Siedlerek jest współautorem 8 artykułów oraz 37 doniesień naukowych przedstawionych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

15. DZIAŁANOŚĆ NAUKOWA

Udział w projektach naukowo-badawczych

Wykonawca w projekcie NCN pt: „Badanie ekotoksyczności oraz wstępna ocena skuteczności działania nowych, różnie podstawionych układów aminofosfonowych oraz azometinowych pochodnych 5-nitrofurfuralu jako potencjalnych herbicydów w systemach kontrolowanego uwalniania w agrochemii”, nr umowy: UMO-2014/13/B/NZ9/02418, kierownik projektu dr hab. Jarosław Lewkowski.

Staż

Staż w Instytucie Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie (08-30.09.2016 r., 16-29.01.2017 r., 26.06-09.07.2017 r.)

Wykaz publikacji nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. J. Lewkowski, Z. Malinowski, A. Matusiak, M. Morawska, D. Rogacz, P. Rychter, “The Effect of New Thiophene-Derived Aminophosphonic Derivatives on Growth of Terrestrial Plants: A Seedling Emergence and Growth Test”, *Molecules*, **2016**, 21, 694; doi:10.3390/molecules21060694 (5-y. IF = 2.988)
2. R. Karpowicz, J. Lewkowski, M. Morawska, E. Miękoś, M. Zieliński, „The aza-Pudovik Reaction Is Also Accelerated in External Constant Magnetic Field”, *Chem. Pap.*, **2016**, 70(11), 1529–1532. DOI: 10.1515/chempap-2016-0087. (5-y. IF = 1.326)
3. J. Lewkowski, R. Karpowicz, M. Morawska, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, P. Dobrzyński, “Ecotoxicological Impact of Ferrocene-derived Aminophosphonates Using Bioassays Battery”, *RSC Adv.*, **2017**, 7, 38399-38409. DOI: 10.1039/c7ra06079c (5-y. IF = 3.096)
4. J. Lewkowski, E. Rzeszotarska, A. Matusiak, M. Morawska, G. Gajek, K. Nowak, R. Kontek „Cytotoxic Action of N-aryl, Furan-derived Aminophosphonates against HT29 and HCT116 Cancer Cell Lines”, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2018**, DOI: 10.2174/1871520619666181122115649

Spis komunikatów konferencyjnych

1. R. Karpowicz, J. Lewkowski, P. Kafarski, M. Morawska, „Synthesis of N-(methoxycarbonylmethyl)amino(ferrocenyl)methylphosphonic acid derivatives and their action on leucine aminopeptidase”, poster na XVI International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 15 listopada 2013.
2. M. Morawska, J. Lewkowski, „Synteza i przemiany imin α -cyklodekstryny”, poster na III Ogólnopolskiej Konferencji dla Studentów i Doktorantów, Pomędzy Naukami Zjazd Fizyków i Chemików, Chorzów, 26 września 2014.
3. A. Matusiak, J. Lewkowski, M. Morawska, Z. Malinowski, R. Kontek, „N-Arylamino(2-furyl)methylphosphonates Seem to Be Moderately Cytotoxic against HT-29 Cell Line”, poster na XVII International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 21 listopada 2014.
4. M. Morawska, J. Lewkowski, T. Girek, „Attempts of Preparation of First Aminophosphonates Bearing the Cyclodextrine Moiety”, poster na XVII International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 21 listopada 2014
5. M. Morawska, J. Lewkowski, A. Matusiak, P. Rychter, D. Rogacz, „Azometinowe pochodne 5-nitrofurfuralu o nadspodziewanej aktywności fitotoksycznej”, poster na X Ogólnopolskim Sympozjum Chemii Organicznej, Łódź, 16-18 kwietnia 2015.
6. M. Morawska, J. Lewkowski, A. Matusiak, P. Rychter, D. Rogacz, „Azometinowe pochodne 5-nitrofurfuralu o nadspodziewanej aktywności fitotoksycznej”, poster na III Łódzkim Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 27-28 kwietnia 2015.
7. M. Morawska, J. Lewkowski, P. Tokarz, P. Rychter, D. Rogacz, „Pochodne 5-nitrofurfuralu - synteza i właściwości fitotoksyczne”, poster na IV Ogólnopolskiej Konferencji dla Studentów i Doktorantów, Zjazd Fizyków i Chemików, Pomędzy Naukami, Chorzów, 18 września 2015.

8. M. Morawska, J. Lewkowski, P. Tokarz, P. Rychter, D. Rogacz, „Synteza i właściwości fitotoksyczne aminofosfonianów pochodnych 5-nitrofurfuralu”, poster na 58 Zjeździe PTChem, Gdańsk, 21-25 września 2015.
9. M. Morawska, J. Lewkowski, Z. Malinowski, A. Matusiak, P. Rychter, D. Rogacz, „Phytotoxicological Properties of New Phosphonoglycine Derivatives Substituted with 2-Thienyl Moiety”, poster na XVIII International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 20 listopada 2015.
10. E. Rzeszotarska, J. Lewkowski, A. Matusiak, M. Morawska, R. Kontek, G. Gajek, Synthesis and Cytotoxic Properties of New Furan-Derived Aminophosphonates, poster na 59th Scientific Conference for Students of Physics and Natural Sciences, „Open Readings 2016”, Wilno, 15-18 marca 2016.
11. M. Morawska, J. Lewkowski, E. Rzeszotarska, P. Rychter, D. Rogacz, Phytotoxicological Properties of Novel Aminophosphonates Bearing 2-Pyrrole Moiety, poster na 59th Scientific Conference for Students of Physics and Natural Sciences, „Open Readings 2016”, Wilno, 15-18 marca 2016.
12. M. Morawska, J. Lewkowski, E. Rzeszotarska, P. Rychter, D. Rogacz, Synteza oraz właściwości fitotoksyczne aminofosfonianów pochodnych pirolu, poster na IV Łódzkim Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź 12-13 maja 2016.
13. Marta Morawska, Jarosław Lewkowski, Edyta Rzeszotarska, Agnieszka Matusiak, Beata Marciniak, Renata Kontek, „Właściwości cytotoksyczne aminofosfonowych pochodnych furfuralu”, poster na V Ogólnopolskiej Konferencji „Pomiędzy Naukami - Zjazd Fizyków i Chemików”, Chorzów, 16 września 2016.
14. J. Lewkowski, M. Morawska, P. Rychter, D. Rogacz, „Fitotoksyczność, pochodne nitrofurfuralu, nitroreduktazy..., nowe herbicydy?”, komunikat na 59 Zjeździe PTChem, Poznań, 19-23 września 2016.
15. M. Morawska, J. Lewkowski, E. Rzeszotarska, P. Rychter, D. Rogacz, „Właściwości fitotoksyczne aminofosfonianów z ugrupowaniem 2-pirolilowym”, poster na 59 Zjeździe PTChem, Poznań, 19-23 września 2016.

16. D. Rogacz, K. Lewicka, P. Rychter, M. Morawska, R. Karpowicz, M. Rodriguez Moya, J. Lewkowski, „Wstępna ocena ekotoksykologiczna nowosyntezyowanych pochodnych aminofosfonowych”, poster na 59 Zjeździe PTChem, Poznań, 19-23 września 2016.
17. B. Marciniak, R. Kontek, M. Morawska, E. Rzeszotarska, J. Lewkowski, „Cytotoksyczność nowo zsyntezyowanych furylowych pochodnych amino-metylofosfonianów w komórkach nowotworowych przewodu pokarmowego człowieka”, komunikat na Konferencji Młodych Naukowców „Nauki Biologiczne i Chemiczne – Spojrzenie Młodych Naukowców”, Kraków, 22 października 2016.
18. J. Lewkowski, R. Karpowicz, M. Morawska, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, “Phyto- and Ecotoxicological Properties of C-Aryl and Heteroaryl Derivatives of Phosphonoglycine”, poster na XIX International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds” Łódź, 25 listopada 2016.
19. M. Morawska, J. Lewkowski, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, „Synteza i właściwości ekotoksyczne aminofosfonianów z ugrupowaniem 2-pirolowym”, poster Ogólnopolskie Studenckie Mikrosympozjum Chemików 2017, Białystok, 30 marca – 2 kwietnia 2017.
20. D. Rogacz, K. Lewicka, P. Rychter, J. Lewkowski, M. Morawska, R. Karpowicz, Z. Malinowski, „Synteza nowych aminofosfonianów pochodnych tiofenu jako potencjalnych herbicydów”, poster V Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 11-12 maja 2017.
21. M. Morawska, J. Lewkowski, R. Karpowicz, A. Kaczmarek, D. Rogacz, P. Rychter, K. Lewicka, „Synteza, właściwości eko- i fitotoksyczne aminofosfonianów pochodnych pirolu”, poster V Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 11-12 maja 2017.
22. M. Morawska, J. Lewkowski, R. Karpowicz, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, „Synteza oraz właściwości ekotoksyczne wybranych aminofosfonianów pochodnych 5-nitrofurfuralu”, poster III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen. Łódź, 11-12 maja 2017.

23. M. Morawska, J. Lewkowski, R. Karpowicz, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, „Phyto- and Ecotoxicological Properties of New Aminophosphonates Bearing Pyrrol-2-yl and 5-Nitrofurfuryl Moiety”, komunikat Xth International Mini-Symposium - Current Problems in Organic Chemistry 'Selenium containing compounds on the borderline of chemistry, biology, and medicine'. Łódź, 25 maja 2017.
24. J. Lewkowski, M. Morawska, R. Karpowicz, Z. Malinowski, D. Cal, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, P. Dobrzyński, „Timeo Danaos et dona ferentes or pesticides as a Trojan horse... but to whom?”, wykład Xth International Mini-Symposium - Current Problems in Organic Chemistry 'Selenium containing compounds on the borderline of chemistry, biology, and medicine'. Łódź, 25 maja 2017.
25. D. Rogacz, K. Lewicka, M. Morawska, R. Karpowicz „Właściwości ekotoksyczne niektórych nowosyntezyowanych pochodnych N-fosfonometyloglicyny” IV Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców Nauk Przyrodniczych, Wrocław 7-8.09.2017 - komunikat
26. D. Rogacz, K. Lewicka, M. Morawska, „Zastosowanie nowo syntezowanych aminofosfonianów pochodnych tiofenu jako potencjalnych herbicydów”, IV Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców Nauk Przyrodniczych, Wrocław 7-8.09.2017 – poster
27. M. Morawska, J. Lewkowski, R. Karpowicz, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka „Synteza aminofosfonianów z ugrupowaniem 2-pirolowym i 5-nitrofurylowym jako potencjalnych herbicydów” VI Ogólnopolska Konferencja dla Młodych Naukowców „Pomiedzy naukami”, Chorzów 15.09.2017 – komunikat
28. D. Rogacz, K. Lewicka, P. Rychter, M. Morawska, R. Karpowicz, D. Cal, J. Lewkowski „Synteza pochodnych glifosatu i ich wstępna ocena ekotoksykologiczna” VI Ogólnopolska Konferencja dla Młodych Naukowców „Pomiedzy naukami”, Chorzów 15.09.2017 – poster
29. J. Lewkowski, M. Morawska, R. Karpowicz, Z. Malinowski, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka, D. Cal „Equo ne credite, Teucri! Czyli Laokoon, herbicydy i my” 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wrocław 17-21.09.2017 – komunikat

30. M. Morawska, J. Lewkowski, R. Karpowicz, P. Rychter, D. Rogacz, K. Lewicka „Synteza, właściwości Eko- i fitotoksyczne aminofosfonianów z ugrupowaniem 2-pirolowym i 5-nitrofurylowym” 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wrocław 17-21.09.2017 – poster

31. D. Rogacz, K. Lewicka, P. Rychter, M. Morawska, R. Karpowicz, D. Cal, J. Lewkowski „Synteza i wstępna ocena ekotoksykologiczna pochodnych N-fosfonometyloglicyny” 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wrocław 17-21.09.2017 – poster.

32. D. Rogacz, K. Lewicka, P. Rychter, J. Lewkowski, M. Morawska, R. Karpowicz, D. Cal „Synthesis and preliminary ecotoxicological assessment of new derivatives of glyphosate”, XX International Symposium „Advances in The Chemistry Of Heteroorganic Compounds” and XVII International Symposium on Selected Problems of Chemistry of Acyclic and Cyclic Heteroorganic Compounds, Łódź, 23-24.11.2017 – poster.

33. M. Morawska, J. Lewkowski, R. Karpowicz, D. Rogacz, P. Rychter, K. Lewicka, P. Dobrzyński, „Phyto- and ecotoxicological properties of new aminophosphonates bearing pyrrol-2-yl and 5-nitrofurfuryl moiety”, XX International Symposium „Advances in The Chemistry Of Heteroorganic Compounds” and XVII International Symposium on Selected Problems of Chemistry of Acyclic and Cyclic Heteroorganic Compounds, Łódź, 23-24.11.2017 – poster.

34. D. Rogacz, K. Lewicka, P. Rychter, M. Morawska, R. Karpowicz, Z. Malinowski, J. Lewkowski, „Właściwości ekotoksykologiczne nowo syntezowanych aminofosfonowych pochodnych tiofenu i ich potencjalne działanie herbicydowe”, poster, IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu – Bioopen, Łódź, 24–25 maja 2018.

35. J. Lewkowski, E. Rzeszotarska, M. Morawska, A. Matusiak, R. Kontek, G. Gajek, K. Nowak, „Silne cytotoksyczne działanie aminofosfonianów pochodnych furanu na linie komórkowe raka jelita grubego HT29 i HCT116”, poster, 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków, 17-21 września 2018.

36. D. Rogacz, P. Rychter, K. Lewicka, J. Lewkowski, M. Morawska, R. Karpowicz, Z. Malinowski, „Synteza i ekotoksykologia nowych difenyłowych

aminofosfonianów pochodnych tiofenu”, poster, 61 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Kraków, 17-21 września 2018.

37. J. Lewkowski, P. Rychter, P. Dobrzyński, R. Karpowicz, Z. Malinowski, M. Morawska, D. Rogacz, K. Lewicka, „The final comptes-rendus on the NCN grant implementation. In a search for a New Herbicide, have we reached Nowhere?”, poster, XXI International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 23 listopada 2018.

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI