

# BADANIA FIZYKOCHEMICZNE I MIKROBIOLOGICZNE ORAZ OCENA BIODEGRADACJI WYBRANYCH POCHODNYCH KWASU BENZOESOWEGO I ICH SOLI. POSZUKIWANIE NOWYCH ZWIĄZKÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH MAJĄCYCH ZASTOSOWANIE W OCHRONIE I INŻYNIERII ŚRODOWISKA ORAZ TECHNOLOGII ŻYWNOSCI

Monika KALINOWSKA, Renata ŚWISŁOCKA, Włodzimierz LEWANDOWSKI\*

Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska, Politechnika Białostocka, ul. Wiejska 45 A, 15-351 Białystok

**Streszczenie:** Ciągłe rosnące zainteresowanie badaniami wpływu metali na układy elektronowe kwasów karboksylowych podyktowane jest m.in. ogromnym biologicznym znaczeniem połączeń metal-ligand. Jednym z obszarów zastosowań związków kompleksowych jest inżynieria i ochrona środowiska, gdzie kompleksy z metalami pełnią rolę nowoczesnych związków przeciwdrobnoustrojowych bezpiecznych dla człowieka i środowiska naturalnego. W prezentowanej pracy zostały przedstawione wyniki badań fizykochemicznych *o*-metoksy-*o*-nitrobenzoesanów i *o*-aminonikotynianów litowców z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni (FT-IR), spektroskopii ramanowskiej (FT-Raman), absorpcyjnej spektroskopii elektronowej (UV), spektroskopii protonowego i węglowego magnetycznego rezonansu jądowego ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR) oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych. Przedstawiono także wybrane badania mikrobiologiczne i określono możliwość biodegradacji. Ocena biodegradacji w/w związków polegała na pomiarze wskaźników zanieczyszczeń wód takich jak: BZT, ChZT, RWO.

**Słowa kluczowe:** *o*-metoksy-, *o*-nitrobenzoesany, *o*-aminonikotyniany, metody spektroskopowe, obliczenia kwantowo-mechaniczne, biodegradacja.

## 1. Wprowadzenie

Istnieje kilka powodów zmuszających do poszukiwania nowych związków przeciwdrobnoustrojowych, wśród nich należy wymienić: (1) zanieczyszczenie środowiska naturalnego wynikające ze zwiększającego się stosowania dezynfekantów nie ulegających biodegradacji lub powodujących powstawanie toksycznych produktów, a przez to negatywnie wpływających na organizmy wodne, a w dalszej konsekwencji na człowieka; (2) wzrastającą odporność drobnoustrojów na obecnie stosowane środki (leki, konserwanty, środki dezynfekujące); (3) występowanie reakcji alergicznych oraz jednostek chorobowych powodowanych częstym kontaktem z wyżej wymienionymi preparatami; przypuszcza się, że za wzrastającą zachorowalnością na raka jelita grubego odpowiedzialne jest powszechne stosowanie konserwantów żywności, takich jak benzoesan sodu; (4) wzrastającą świadomość konsumentów

i potrzebę stworzenia nowych związków przeciwdrobnoustrojowych na bazie naturalnych ekstraktów roślinnych jako alternatywę do obecnie stosowanych preparatów. Kwas benzoesowy jest od lat znanym i stosowanym środkiem o właściwościach bakteriobójczych, którego działanie jest jednak ograniczone, co do zakresu pH oraz gatunków drobnoustrojów, których rozwój hamuje. Z tych powodów wiele ośrodków naukowych na całym świecie zajmuje się poszukiwaniem nowych, bezpiecznych dla człowieka i środowiska związków o potencjalnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Duże zainteresowanie budzą pochodne kwasu benzoesowego, szczególnie te pochodzenia naturalnego. Dlatego celem naszych prac są: (a) fizykochemiczne badania wybranych ligandów (między innymi pochodnych kwasów benzoesowego, cynamonowego, pirydynokarboksylowego, pyrolowego) oraz ich kompleksów i soli z metalami, (b) badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych w stosunku

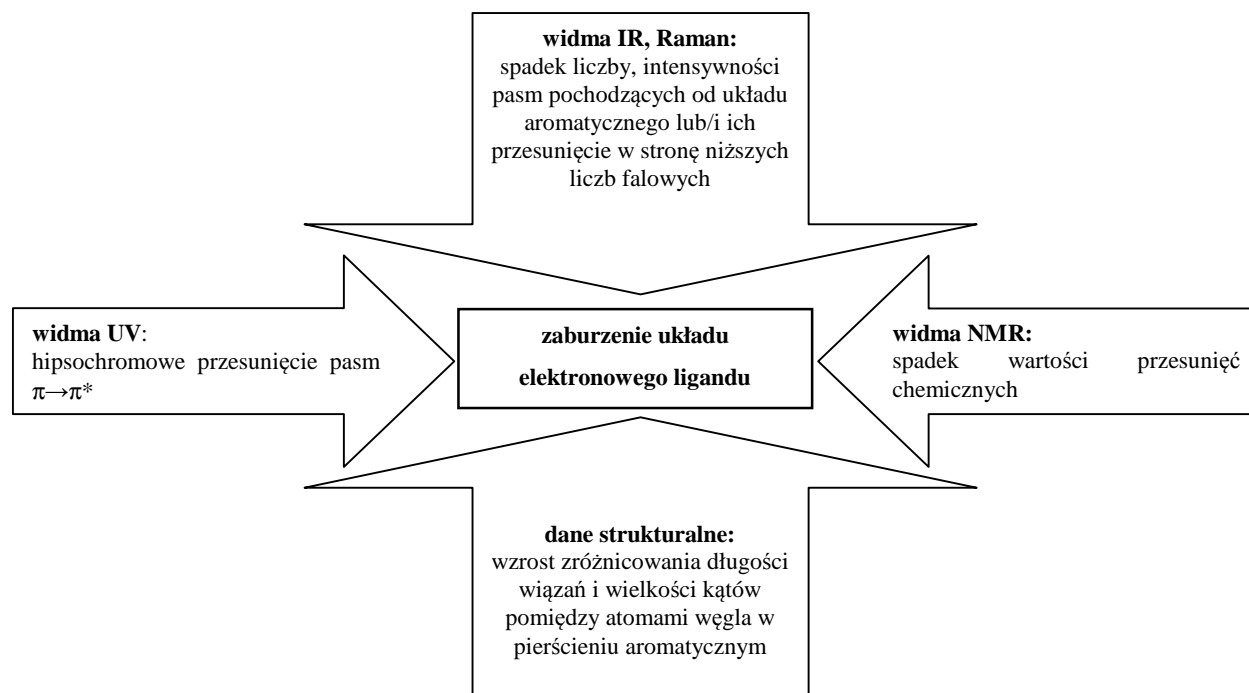
\* Autor odpowiedzialny za korespondencję. E-mail: w-lewando@wp.pl

do wybranych szczepów bakterii i grzybów, (c) poszukiwania korelacji między strukturą molekularną związków chemicznych a ich aktywnością biologiczną, (d) ocena biodegradacji w celu oszacowania ich wpływu na środowisko naturalne.

W fizykochemicznych badaniach wybranych aromatycznych kwasów karboksylowych oraz ich kompleksów wykorzystujemy następujące wzajemnie komplementarne metody: spektroskopię w podczerwieni (FT-IR; widma rejestrowane różnymi technikami: metodą prasowania próbki z KBr, przy użyciu przystawki ATR dla prób w rozwarze i w ciele stałym oraz widma w niskotemperaturowych matrycach argonowych), spektroskopię ramanowską (FT-Raman), absorpcyjną spektroskopię elektronową (UV), spektroskopię protonowego i węglowego magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR) oraz obliczenia kwantowo-mechaniczne wykonane w programie Gaussian celem uzyskania teoretycznych widm w podczerwieni, ramanowskich, magnetycznego rezonansu jądrowego, wartości cząstkowych ładunków punktowych, parametrów geometrycznych, map rozkładu gęstości elektronowej. Do oceny składu zsyntezowanych przez nas kompleksów i soli stosujemy analizę rentgenograficzną, elementarną i termogravimetryczną. Uzyskane wyniki badań służą dyskusji nad budową molekularną związków chemicznych oraz nad wpływem metali i podstawników przy pierścieniu na rozkład gęstości elektronowej ligandu. Stosujemy następujące kryteria zaburzenia układu elektronowego ligandu (rys. 1): (a) zmniejszenie liczby oraz intensywności pasm pochodzących od układu aromatycznego lub/i ich przesunięcie w stronę niższych liczb falowych w widmach IR i Raman kompleksów w porównaniu z widmem kwasu; spowodowane jest to zmniejszeniem stałych siłowych wiązań chemicznych i polaryzacją wiązań C-C i C-H w pierścieniu; (b) hipsochromowe przesunięcie pasm  $\pi \rightarrow \pi^*$  w widmach

UV kompleksów w porównaniu z widmem kwasu; jest to wynik zwiększenia różnic energetycznych między poziomem wiążącym  $\pi$  i antywiązącym  $\pi^*$  oraz zmniejszenia energii delokalizacji pierścienia; (c) przesunięcie sygnałów pochodzących od protonów aromatycznych w stronę wyższych natężeń pola w widmach  $^1\text{H}$  NMR kompleksów w porównaniu z widmem kwasu; spowodowane jest to wzrostem ekranowania protonów aromatycznych jako konsekwencja osłabienia prądów kołowych w pierścieniu; (d) wzrost zróżnicowania długości wiązań i wielkości kątów pomiędzy atomami węgla w pierścieniu aromatycznym kompleksu w porównaniu z odpowiednimi w strukturze kwasu.

Wyniki badań Lewandowskiego i współpracowników wskazują na istnienie wyraźnej zależności między położeniem metalu w układzie okresowym a jego wpływem na rozkład ładunku elektronowego ligandu (Lewandowski i in., 2005a; 2005b). Kationy litowców i niektórych metali ciężkich [Ag(I), Pb(II), Hg(I), Hg(II)] zaburzają, natomiast jony pierwiastków 3d i 4f przejściowych [Cr(III), Fe(III), Ln(III)] oraz Al(III) stabilizują układ elektronowy ligandów (kwas benzoesowy, salicylowy). Stopień zaburzenia układu elektronowego ligandu wywołany przez działanie metalu zależy od: parametrów kationów metalu, stopnia uwodnienia (Tori i in., 1998) i struktury krystalicznej kompleksu. Rodzaj podstawnika w pierścieniu ma większy wpływ na zaburzenie układu elektronowego ligandu niż metal podstawiony w grupie karboksylanowej (Lewandowski i in., 1996, Lewandowski i in., 2002; Dobrosz-Teperek i in. 1998). Spośród podstawników halogenowych to jod najbardziej zaburza układ elektronowy ligandu. Literaturowe dane krystalograficzne potwierdzają, że zaburzenie układu elektronowego cząsteczki wzrasta gdy rodzaj podstawnika w pierścieniu



Rys. 1. Kryteria stosowane przy ocenie stopnia zaburzenia układu elektronowego ligandu

zmienia się w serii F→Cl→Br→I. Wskazują na to wartości geometrycznych indeksów aromatyczności policzone na podstawie długości wiązań C-C w pierścieniu, których wartości maleją w w/w szeregu (Lewandowski i in., 2005a; Kalinowska i in., 2006a). Ilościowa analiza zależności między strukturą a aktywnością związków (ang. *Quantitative Structure – Activity Relationship*, QSAR) opiera się na ogólnym równaniu, w którym aktywność biologiczna związku ( $\Phi$ ) jest funkcją jego budowy chemicznej (c):

$$\Phi = f(c) \quad (1)$$

W badaniach QSAR niezbędne jest zdefiniowanie odpowiednich pomiarów określających aktywność biologiczną „ $\Phi$ ” oraz właściwych funkcji matematycznych „ $f$ ” i metod służących do ilościowego opisu struktury związku „ $c$ ” (Benigni, 2003). Do opisu struktury chemicznej związku używa się różnych deskryptorów (Todeschini i Consonni, 2000). Można je sklasyfikować jako: (1) wielkości eksperymentalne, takie jak  $\log P_{ow}$  (współczynnik podziału w układzie oktanol/woda),  $pK_a/pK_b$ , dane spektroskopowe, (2) stałe podstawnikowe (elektryczna, hydrofobowa, steryczna), (3) parametry pochodzące z obliczeń kwantowo-mechanicznych i modelowania molekularnego. Natomiast typowym parametrem opisującym aktywność biologiczną są: stężenie molowe związku powodujące określony efekt (np.  $LC_{50}$ ), stała wiązania, stała asocjacji, stała inhibitora. Do opisu funkcji „ $f$ ” w równaniu stosuje się różne metody statystyczne, np. analiza regresji wielokrotnej, metoda składowych głównych, metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), analiza dyskryminacyjna i inne.

Mimo, że analiza QSAR stanowi młodą dziedzinę nauki, w ostatnich latach nastąpił jej gwałtowny rozwój. Wynika to z faktu, iż metody te znalazły powszechne zastosowanie na świecie, m.in. w inżynierii i ochronie środowiska, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i innych, jako podstawowe źródło informacji umożliwiających odkrycie nowych substancji o pożądanych właściwościach biologicznych (dezynfektantów, leków, konserwantów). W trakcie analizy QSAR wyznaczane są właściwości fizykochemiczne ligandów, ich kompleksów i dokonana ocena zależności z ich aktywnością biologiczną. W dalszej kolejności następuje uszeregowanie preparatów podobnych strukturalnie z uwzględnieniem ich specyficznych aktywności. Taki sposób uporządkowania pozwala na łatwe wyznaczenie wspólnych fragmentów struktury przestrzennej, które odpowiedzialne są za aktywność biologiczną lub bezpośrednio na nią wpływają. Stosując metody statystyczne można ustalić równanie wiążące określone właściwości fizykochemiczne z aktywnością preparatu. Równania QSAR pozwalają nie tylko na ocenę biologicznych właściwości nowych związków, ale również są pomocne przy podjęciu decyzji o konieczności ich syntezy i/lub przeprowadzeniu testów biologicznych. Dzięki temu analiza QSAR zmniejsza ilość niepotrzebnych syntez i badań oraz pozwala na odkrycie nowych właściwości molekuł, które nie pasują do

wyznaczonego równaniem trendu.

W prezentowanej pracy zostaną przedstawione i podsumowane wyniki naszych ostatnich badań naukowych, które częściowo zostały już opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Kalinowska i in., 2006b; Świsłocka i in., 2007; Świsłocka i in., 2009). Prowadzone prace są wynikiem realizacji grantów ministerialnych, które uzyskały finansowanie w dyscyplinie naukowej: Kształtowanie i Ochrona Środowiska Przyrodniczego (N N305 267534, kierownik: W. Lewandowski, zakończony; N N305 105333, grant promotorski, kierownik: W. Lewandowski, zakończony; N N305 384538, kierownik: M. Kalinowska, realizowany). Badania te dotyczyły: (a) wpływu litowców na układ elektronowy kwasów: *o*-metoksybenzoesowego (*o*-anyżowego), *o*-nitrobenzoesowego i *o*-aminonikotynowego, (b) właściwości przeciwdrobnoustrojowych zsyntezowanych soli, (c) pomiaru wskaźników zanieczyszczeń wód. Wybór soli i kwasów do badań podyktowany był: (a) możliwie małą ich szkodliwością w stosunku do człowieka i środowiska, (b) możliwością praktycznego zastosowania jako np. dezynfektanty czy konserwanty żywności dzięki dobrej rozpuszczalności w wodzie i w rozpuszczalnikach polarnych, (c) dostępnością, łatwością otrzymania i trwałością tych związków, (d) dużym znaczeniem biologicznym jonów litu, sodu i potasu. Badania aktywności mikrobiologicznej wybranych związków zostały przedstawione w pracach (Kalinowska i in., 2007 i 2010; Świsłocka i in., 2010).

## 2. Metodyka

Sole metali pierwszej grupy układu okresowego pierwiastków otrzymano mieszając stechiometryczną ilość kwasu anyżowego, nitrobenzoesowego lub aminonikotynowego w odpowiedniej objętości wodorotlenków o stężeniu  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  (substancje reagują ze sobą w stosunku molowym 1:1). Otrzymane roztwory podgrzewano na łaźni wodnej mieszając, aż do całkowitego przereagowania kwasu. Następnie rozpuszczalnik odparowano, a otrzymane związki po osuszeniu w temperaturze  $140^\circ\text{C}$  były bezwodne. Skład substancji określono na podstawie wyników analizy elementarnej oraz termicznej. Widma FT-IR rejestrowano stosując spektrofotometr z transformacją Fouriera firmy Bruker Equinox 55. Zastosowano dwie techniki rejestracji: (1) metoda prasowania preparatów z bromkiem potasu w pastylkach (stosunek wagowy próbki do KBr wynosił 1:300 mg) w zakresie  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ ; (2) w cieple stałym (ATR<sub>s</sub>) i roztworze wodnym (ATR<sub>r</sub>) przy wykorzystaniu przystawki ATR w zakresach:  $1700\text{--}550 \text{ cm}^{-1}$  i  $2000\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$ , stosując rozdzielczość  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Widma FT-Raman wykonano na spektrometrze firmy Perkin Elmer FT-NIR 2000R stosując laser YAG z wiązką laserową o liczbie falowej  $9394,7 \text{ cm}^{-1}$ . Aparat współpracuje z programem Pegrans 2000. Zarejestrowano widma substancji stałych techniką pomiarów w kapilarze w zakresie liczb falowych  $4000\text{--}$

100  $\text{cm}^{-1}$  przy rozdzielczości 4  $\text{cm}^{-1}$ . Widmo jest zależnością intensywności promieniowania rozproszonego od liczby falowej. Intensywność wyrażona jest w jednostkach umownych (względnych), przy czym wzorcem jest intensywność pasma tetrachloru węgla przy 459  $\text{cm}^{-1}$ . Intensywność tego pasma w maksimum jest umownie równa 100 jednostkom. Parametry strukturalne, teoretyczne widma IR oraz rozkład ładunku elektronowego dla badanych związków obliczono wykorzystując program Gaussian 09W (Frisch i in. 2009). Obliczenia prowadzono metodą B3LYP stosując bazę obliczeniową 6-311++G\*\*. Określono wpływ *o*-anyżanów, *o*-nitrobenzoesanów i *o*-aminonikotynianów litu, sodu i potasu na wybrane wskaźniki zanieczyszczeń wód oraz możliwość ich biodegradacji. Wodę do badań pobrano ze stawu przy ul. Mickiewicza w Białymstoku. Badania prowadzono dla trzech stężeń w/w soli: 1, 5 i 10  $\text{mg}/\text{dm}^3$  oraz wody nie zawierającej badanych substancji (próba zerowa). Badania były przeprowadzane w ciągu kolejnych pięciu dni. Każdego dnia określano, zgodnie z obowiązującymi normami, takie parametry jak: chemiczne zapotrzebowanie na tlen-metoda dichromianowa (ChZT-Cr), tlen rozpuszczony, biochemiczne zapotrzebowanie na tlen (BZT), rozpuszczony węgiel organiczny (RWO). Aktywność biologiczna badanych związków oceniana była przy pomocy testów mikrobiologicznych na wybranych szczepach bakterii testowych: *Pseudomonas aeruginosa* (PCM 2270), *Staphylococcus aureus* (PCM 2267). Drobnoustroje pochodziły ze zbiorów Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów PAN przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu. Wybór bakterii podyktowany był zaleceniami PCM w odniesieniu do testów jakim podlegają preparaty do dezynfekcji według Polskich Norm. Testowane szczepy drobnoustrojów namnażano w bulionie przez 24 godziny w temperaturze 36°C. Podłoże bulionowe przeznaczone do testów mikrobiologicznych zaszczepiano namnożoną hodowlą bakteryjną. Do zaszczepionego bulionu dodawano badane substancje, w takich ilościach, aby stężenie substancji w roztworze bulionowym wynosiło 0,1%. Podłoże kontrolne stanowił bulion zaszczepiony testowanym szczepem bakteryjnym bez dodatku badanych preparatów. Wszystkie próby inkubowano w cieplarni w temperaturze 36°C. Wzrost liczby komórek drobnoustrojów w hodowli bulionowej badano po 24 i 48 godzinach inkubacji wykonując pomiar gęstości optycznej roztworów przy  $\lambda = 600 \text{ nm}$  w trzech, czterech lub więcej powtórzeniach. Ilość komórek bakterii w podłożu bulionowym, w przeliczeniu na 5 ml hodowli, określano metodą posiewu redukcyjnego na płytkach Petrie'go z podłożem agarowym. Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu z programu Statistica 8.0.

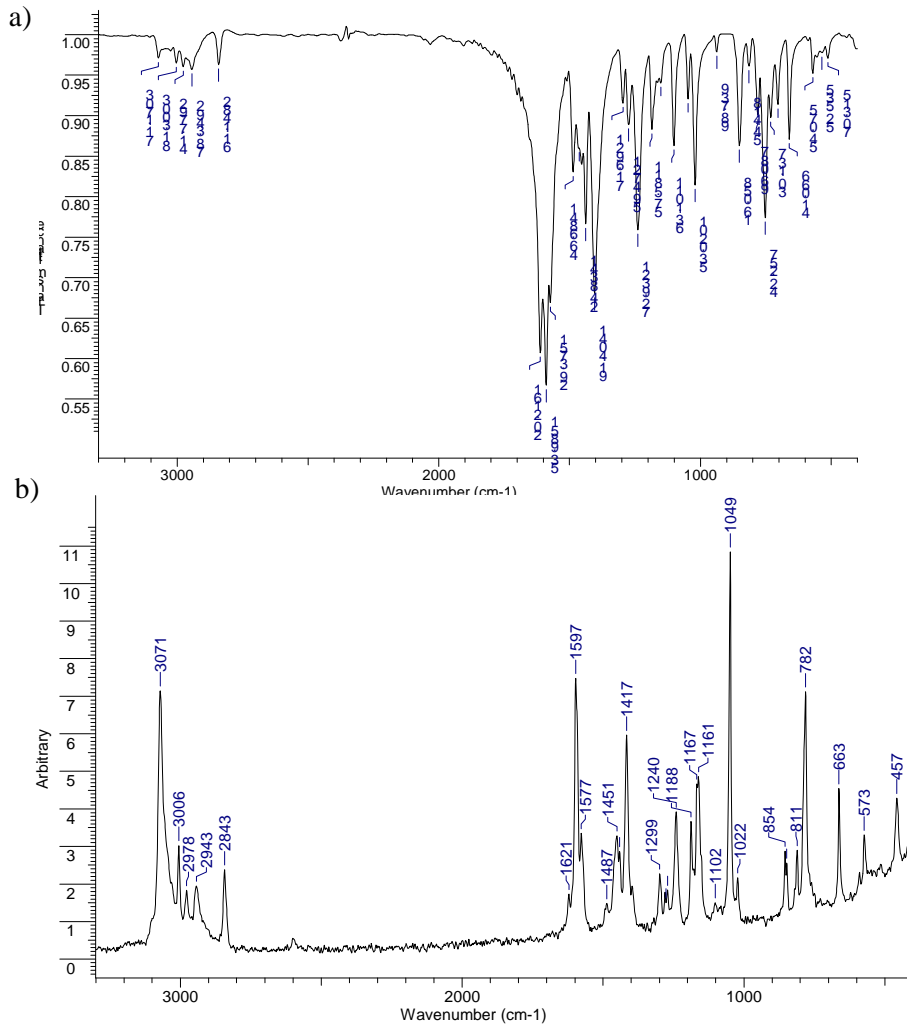
### 3. Wyniki badań i dyskusja

#### 3.1. Kwas *o*-metoksybenzoesowy (*o*-anyżowy) i *o*-metoksybenzoesany (*o*-anyżany) litowców - badania FT-IR, FT-Raman, UV, NMR, obliczenia kwantowo-mechaniczne, biodegradacja i aktywność przeciwdrobnoustrojowa

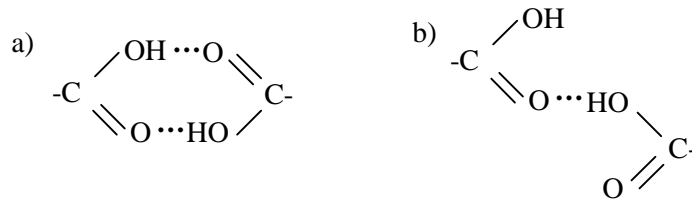
**Widmo w podczerwieni i ramanowskie** jednego z badanych związków zostało przedstawione na rysunku 2. Zmiany parametrów pasm z widm FT-IR i FT-Raman będące wynikiem wpływu metalu lub podstawnika na strukturę ligandu spowodowane są przesunięciem gęstości elektronowej w cząsteczce, której rozkład decyduje o liczbach falowych i intensywnościach pasm. Dlatego zastosowanie wzajemnie komplementarnych metod jakimi są podczerwień i Raman oraz wykorzystanie obliczeń pozwoliło badać wpływ metali i podstawników na rozkład gęstości elektronowej ligandu. W widmie kwasu metoksybenzoesowego obecne są charakterystyczne pasma pochodzące od drgań grupy karboksylowej, a których brak jest w widmach soli. Są to bardzo intensywne pasma pochodzące od drgań rozciągających grupy karbonylowej  $\nu(\text{C}=\text{O})$  obecne w zakresie liczb falowych: 1663-1669  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 1639  $\text{cm}^{-1}$  (Raman), pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{OH})$  w zakresie: 2500-3300  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 2600-3200  $\text{cm}^{-1}$  (Raman), pasma drgań rozciągających  $\nu(\text{C}-\text{OH})$  przy 1261  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 1264  $\text{cm}^{-1}$  (Raman) oraz pasma o mniejszej intensywności pochodzące od drgań deformacyjnych  $\beta(\text{OH})$ ,  $\gamma(\text{OH})$  i  $\nu(\text{C}=\text{O})$  znajdujące się odpowiednio przy: 1409  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 918  $\text{cm}^{-1}$  (IR) i 593  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 591  $\text{cm}^{-1}$  (Raman).

Analiza widma w podczerwieni kwasu *o*-anyżowego izolowanego w matrycach argonowych potwierdziła obecność wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Dodatkowo wykorzystanie obliczeń wykonanych dla struktury kwasu *o*-anyżowego z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym, jak i bez niego, ułatwiło interpretację widma. W rejonie drgań rozciągających grupy hydroksylowej  $\nu(\text{OH})$  obecne są intensywne pasma pochodzące od drgań monomerów, tj. przy 3728  $\text{cm}^{-1}$  i 3636  $\text{cm}^{-1}$ . W zakresie 3358-3551  $\text{cm}^{-1}$  znajdują się pasma pochodzące od drgań  $\nu(\text{OH})$  dimerów kwasu *o*-anyżowego połączonych międzycząsteczkowym oraz monomerów z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym. Reva i współpracownicy stosując matryce argonowe dowiedli obecności dwóch rodzajów dimerów kwasu benzoowego: połączonych dwoma wiązaniami wodorowymi (rys. 3a) oraz liniowych dimerów połączonych jednym wiązaniem wodorowym (rys. 3b) (Reva i Stepanian, 1995; Stepanian i in., 1996).

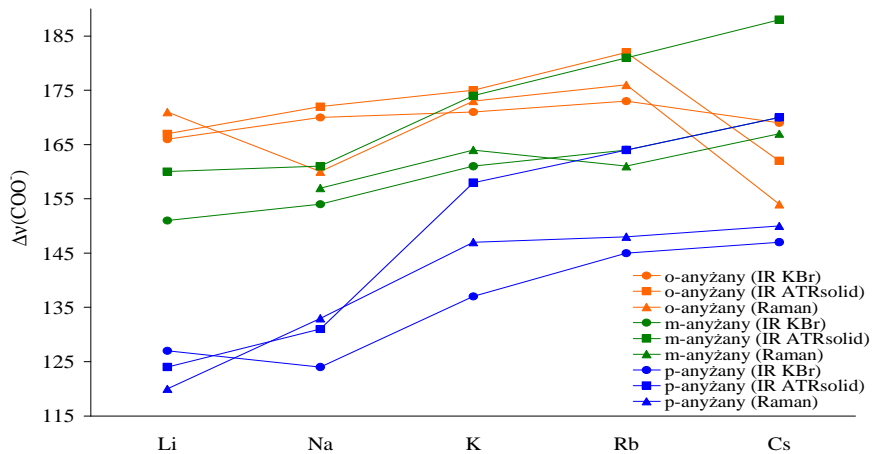
Obecność tego typu dimerów możliwa jest również w przypadku kwasu *o*-anyżowego. W widmie w podczerwieni kwasu *o*-anyżowego izolowanego w matrycach argonowych w rejonie drgań rozciągających  $\nu\text{C}=\text{O}$  obecne są pasma 1768 i 1762  $\text{cm}^{-1}$  przypisane monomerom kwasu oraz pasma w zakresie 1740-1735  $\text{cm}^{-1}$  pochodzące od drgań układów z wiązaniem wodorowym. Obecność wiązań wodorowych



Rys. 2. Widmo: a) IR KBr, b) Ramana *o*-metoksybenzoianu sodu



Rys. 3. Schemat struktury dimerów kwasu karboksylowego



Rys. 4. Zmiany wartości  $\Delta\nu(\text{COO}^-)$  [cm<sup>-1</sup>] w szeregu Li→Na→K→Rb→Cs *o*-, *m*- i *p*-anyżanów litowców (legenda objaśniająca znajduje się na wykresie, w nawiasach podany jest rodzaj widma użytego do analizy)

wpływa również na położenie innych pasm, szczególnie  $\beta(\text{OH})$ ,  $\nu(\text{C-OCH}_3)$ ,  $\nu(\text{O-CH}_3)$ ,  $\gamma(\text{C=O})$ . Pasma pochodzące od drgań pierścienia oraz podstawnika metoksylogowego znajdują się w kolejno wymienionych zakresach: drgania nożycowe grupy metylowej  $\delta(\text{CH}_3)$  asymetryczne przy około 1450-1465  $\text{cm}^{-1}$  (IR) i 1464-1453  $\text{cm}^{-1}$  (Raman) oraz symetryczne  $\delta(\text{CH}_3)$  w zakresie 1316-1430  $\text{cm}^{-1}$  (IR) i 1311-1430  $\text{cm}^{-1}$  (Raman). Ponadto obecne są drgania wahadłowe grupy metylowej w zakresach: 1130-1254  $\text{cm}^{-1}$  (IR) i 1135-1243  $\text{cm}^{-1}$  (Raman) oraz drgania rozciągające  $\nu(\text{O-CH}_3)$  obecne w rejonie liczb falowych: 1027-1048  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 1023-1050  $\text{cm}^{-1}$  (Raman).

Podstawienie metalu w miejsce wodoru grupy karboksylowej powoduje zanik pasm pochodzących od drgań grupy karboksylowej i pojawienie się nowych związanych z drganiami anionu karboksylanowego. Mianowicie, w widmach IR i Ramana anyżanów obecne są bardzo intensywne pasma przypisane drganiom rozciągającym asymetrycznym i symetrycznym anionu karboksylanowego, tj.  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ , znajdujące się odpowiednio w zakresach: 1548-1574  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 1551-1580  $\text{cm}^{-1}$  (Raman) i 1392-1428  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 1392-1412  $\text{cm}^{-1}$  (Raman). Drgania deformacyjne w płaszczyźnie anionu karboksylanowego, tj.  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  i  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ , obecne są odpowiednio w zakresach: 813-854  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 810-856  $\text{cm}^{-1}$  (Raman) i 506-587  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 516-575  $\text{cm}^{-1}$  (Raman). Natomiast drgania deformacyjne poza płaszczyznę anionu  $\gamma(\text{COO}^-)$  znajdują się w zakresach liczb falowych: 723-795  $\text{cm}^{-1}$  (IR), 786-799  $\text{cm}^{-1}$  (Raman). W przypadku niektórych z wyżej wymienionych pasm widoczny jest wyraźny wpływ metali w serii:  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$  objawiający się przesunięciem pasm w stronę niższych lub wyższych liczb falowych. W widmach *o*-anyżanów pasma  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$  (Raman) i  $\beta_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  (IR KBr, Raman) ulegają przesunięciu w stronę niższych liczb falowych w serii metali. Parametrem opisującym stopień udziału wiązania jonowego i jego asymetryczności, jest różnica między liczbami falowymi pasm drgań rozciągających asymetrycznych i symetrycznych anionu  $\text{COO}^-$  (parametr  $\Delta\nu$ ), który został policzony i zebrany w tabeli 1. Generalnie w serii  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb}$  *o*-anyżanów wzrasta stopień jonowości oraz asymetryczności wiązania metal-tlen. Przyjmuje się, że im wartość  $\Delta\nu(\text{COO}^-)$  jest większa, tym większa jest asymetria wiązania metal-ligand oraz wzrasta udział wiązania jonowego. Różnice w wartościach  $\Delta\nu$  i  $\Delta\beta$  (różnica między liczbami falowymi pasm drgań deformacyjnych asymetrycznych i symetrycznych anionu  $\text{COO}^-$ ) *o*-anyżanów (np.  $\Delta\nu(\text{COO}^-)$  dla *o*-anyżanu litu: 166  $\text{cm}^{-1}$  - IR KBr, 167  $\text{cm}^{-1}$  - IR  $\text{ATR}_{\text{solid}}$ , 154  $\text{cm}^{-1}$  - IR  $\text{ATR}_{\text{H}_2\text{O}}$ , 171  $\text{cm}^{-1}$  - Raman, 130  $\text{cm}^{-1}$  - obliczenia) spowodowane są wpływem matrycy w jakiej rejestrowane były widma (KBr, woda, obliczenia prowadzone dla izolowanej struktury). Z wyjątkiem widm wykonywanych dla prób w roztworze wodnym, wpływ matrycy nie był na tyle silny, aby maskować oddziaływanie metali na strukturę anionu karboksylanowego. W tabeli 1 przedstawiono wartości  $\Delta\nu$  i  $\Delta\beta$  dodatkowo dla *m*-

i *p*-anyżanów. Na podstawie zebranych wartości  $\Delta\nu(\text{COO}^-)$  i  $\Delta\beta(\text{COO}^-)$  widać, że również podstawnik decyduje o wpływie metali na strukturę anionu, podczas gdy następuje zmiana metalu na kolejny z serii. Mianowicie, wartości  $\Delta\nu(\text{COO}^-)$  i  $\Delta\beta(\text{COO}^-)$  zmieniają się znacznie w serii  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$  *m*-i *p*-anyżanów, natomiast najmniejsze zmiany obserwowane są w przypadku *o*-anyżanów (podobne zależności widoczne są w zmianie wartości  $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ,  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ ,  $\beta_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  i  $\beta_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ) (rys. 4). To oznacza, że podstawnik metoksylogowy w pozycji *orto* w pierścieniu osłabia wpływ metalu na rozkład gęstości elektronowej anionu karboksylanowego.

Tabela 1. Różnica między liczbami falowymi [ $\text{cm}^{-1}$ ] pasm drgań rozciągających asymetrycznych i symetrycznych anionu karboksylanowego ( $\Delta\nu$ ) obecnych w widmach *o*-, *m*- i *p*-anyżanów litowców

	Li	Na	K	Rb	Cs
$\Delta\nu(\text{COO}^-)$					
<i>o</i> -anyżany					
IR KBr	166	170	171	173	169
IR $\text{ATR}_{\text{s}}$	167	172	175	181	162
IR $\text{ATR}_{\text{r}}$	154	154	154	154	154
Raman	171	160	173	176	154
Teoret.	130	159	174		
$\Delta\beta(\text{COO}^-)$					
IR KBr	-	338	328	326	336
Teoret.	407	463	463		
$\Delta\nu(\text{COO}^-)$					
<i>m</i> -anyżany					
IR KBr	151	154	161	164	170
IR $\text{ATR}_{\text{s}}$	154	164	174	181	188
IR $\text{ATR}_{\text{r}}$	166	166	164	166	166
Raman	-	157	164	161	167
Teoret.	119	158	174		
$\Delta\beta(\text{COO}^-)$					
IR KBr	232	236	241	241	242
IR $\text{ATR}_{\text{s}}$	235	233	238	245	241
Teoret.	269	231	221		
$\Delta\nu(\text{COO}^-)$					
<i>p</i> -anyżany					
IR KBr	127	124	137	145	147
IR $\text{ATR}_{\text{s}}$	124	131	158	164	170
IR $\text{ATR}_{\text{r}}$	148	148	148	150	148
Raman	120	133	147	148	150
Teoret.	99	142	158		
$\Delta\beta(\text{COO}^-)$					
IR KBr	297	306	317	318	321
Teoret.	335	330	323		

Porównując położenie pasm pochodzących od drgań tych samych fragmentów struktury obecnych w widmie *o*-, *m*- i *p*-anyżanów wyraźnie widać, że podstawnik

metoksylowy powoduje większy niż metal wpływ na rozkład gęstości elektronowej ligandu. Liczby falowe wybranych pasm obecnych w widmach FT-IR i FT-Raman kwasu *o*-anyżowego i *o*-anyżanu sodu oraz kwasu benzoowego i benzoesu sodu zostały zebrane w tabeli 2. Porównując położenie odpowiadających sobie pasm w widmach kwasu benzoowego i kwasu anyżowego widać, że podstawienie grupy metoksylowej do pierścienia powoduje przesunięcie niektórych pasm o maksymalnie  $\sim 60\text{ cm}^{-1}$ , podczas gdy podstawienie metalu (porównanie widm kwasów i ich soli) prowadzi do przesunięcia pasm pochodzących od drgań pierścienia o maksymalnie  $\sim 40\text{ cm}^{-1}$ .

Metal silniej wpływa na rozkład gęstości elektronowej kwasu benzoowego niż kwasów anyżowych, co sugeruje, że podstawnik metoksylowy osłabia wpływ metali na strukturę ligandu. Do takiego wniosku prowadzą następujące obserwacje: (1) więcej pasm zanika w widmie benzoesu sodu w porównaniu do widma ligandu niż w widmie anyżanu w odniesieniu do widma kwasu anyżowego; (2) podstawienie metalu w miejsce wodoru grupy karboksylowej powoduje większe przesunięcie odpowiadających sobie pasm w widmie benzoesu sodu niż anyżanu sodu. Porównując trzy główne pasma pochodzące od drgań układu aromatycznego - 8a, 19a i 19b - są one obecne w widmie IR kwasu benzoowego, ale brak ich jest w widmie benzoesu sodu. Pasma 8b jest w widmie Ramana kwasu benzoowego, ale zanikło w widmie jego soli. Reszta pasm ulega przesunięciu w stronę niższych lub wyższych liczb falowych o maksymalnie  $37\text{ cm}^{-1}$  w widmie IR i  $30\text{ cm}^{-1}$  w widmie Ramana benzoesu sodu (pasmo nr 10a). Zbieżne wnioski można wyciągnąć analizując widma pozostałych benzoesanów oraz *o*-, *m*- i *p*-anyżanów litowców.

Wpływ metali w serii  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$  na układ elektronowy ligandu, mimo że zdecydowanie mniejszy niż wpływ podstawnika, widoczny jest w postaci regularnych przesunięć pasm w widmach anyżanów. W pierwszej kolejności metale wpływają na zmianę rozkładu ładunku elektronowego w anionie karboksylanowym, która następnie przenoszona jest na pierścień oraz podstawnik powodując zmiany w rozkładzie gęstości elektronowej

całej cząsteczki. Zmiany te widoczne są w przesunięciach pasm pochodzących od drgań pierścienia i podstawnika. W roztworze wodnym kationy metali są hydratowane, co ogranicza ich bezpośredni wpływ na anion karboksylowy, ale na podstawie przesunięcia pozostałych pasm w widmach anyżanów można wnioskować, że nie ogranicza to wpływu metali na pozostałą strukturę ligandu. Pasma pochodzące od drgań pierścienia aromatycznego występują w całym badanym zakresie spektralnym. W widmach soli widoczne jest charakterystyczne zmniejszenie względnej intensywności oraz ilości pasm pochodzących od drgań układu aromatycznego w porównaniu do widm kwasów. Natomiast liczby falowe niektórych pasm zmieniają się wraz ze zmianą metalu przyłączonego do anionu karboksylanowego w szeregu  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$ ; są to zarówno pasma pochodzące od drgań rozciągających i jak deformujących. Jednoczesne wyraźne, systematyczne przesunięcia pasm pochodzących od drgań układu aromatycznego w serii widm litowców zarejestrowanych różnymi technikami potwierdza, że zmiany liczb falowych nie są przypadkowe. I tak w widmach *o*-anyżanów pasma, które ulegają regularnemu przesunięciu w stronę niższych liczb falowych w serii  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$  to: 20a (IR KBr), 20b (IR KBr, Raman - bez soli Cs), 8a (IR KBr, IR ATR<sub>solid</sub>, Raman), 7a (bez soli Cs: IR KBr, IR ATR<sub>solid</sub>), 9a (bez soli Cs: IR KBr, IR ATR<sub>solid</sub>, Raman), 18a (bez soli Cs: IR KBr, IR ATR<sub>solid</sub>, Raman), 17b (IR KBr, IR ATR<sub>H2O</sub>), 11 (bez soli Cs: IR KBr, IR ATR<sub>solid</sub>), a pasma ulegające przesunięciu w stronę wyższych liczb falowych: 6b (IR KBr, IR ATR<sub>solid</sub>, Raman), 3 (IR KBr, IR ATR<sub>solid</sub>, Raman), 16b (IR KBr). Na podstawie porównania zmiany położenia odpowiadających sobie pasm w widmach kwasów *o*-, *m*- i *p*-anyżowych oraz ich soli zebranych w tabeli 2, można przypuszczać że największy wpływ metali na pierścień ligandu występuje w przypadku izomeru *orto*. Spośród pasm aż dwanaście z nich zdecydowanie zmienia położenie w widmach *o*-anyżanów, bo o ponad  $10\text{ cm}^{-1}$ , podczas gdy w widmach *m*-anyżanów dotyczy to tylko trzech pasm, a w widmach *p*-anyżanów - sześciu pasm.

Tabela 2. Liczby falowe [ $\text{cm}^{-1}$ ] i intensywności wybranych pasm obecnych w widmach FT-IR (pastylki z KBr) i FT-Raman kwasów anyżowych i anyżanów sodu oraz kwasu benzoowego i benzoesu sodu

Związek		8a	8b	19a	19b	14	18b	18a	10a	4	6b
kwas benzoowy	IR KBr	1604m*	1586m	1498w	1455s	1324vs	1073m	1027m	856vw	668s	617vw
	Raman	1603s	1586vw		1460vw	1326w		1027m	855vw		616s
benzoesan sodu	IR KBr		1597vw			1306w	1068m	1029m	819m	684sh	
	Raman	1605s		1493w	1436m			1033m	825w		617m
kwas	IR KBr	1578s	1599s	1436s	1492s		1019s	1088s	796m		
	Raman	1581m	1600vs	1437w	1493w		1021vw		797vw		
<i>o</i> -anyżan sodu	IR KBr	1589vs	1612vs	1438m	1487m		1020m	1101w	781w	704w	660m
	Raman	1597s	1621vw	1441vw	1487vw		1022vw	1102vw	782s		663m

\* oznaczenia intensywności pasm: vs - bardzo silne, s - silne, m - średnie, w - słabe, vw - bardzo słabe sh - na zboczu

Podstawienie metalu w grupie karboksylowej powoduje również zmiany w rozkładzie ładunku elektronowego grupy metoksylowej. Niektóre pasma ulegają regularnym przesunięciom w serii  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$  anyżanów. W porównaniu z widmem kwasu, położenie pasm pochodzących od drgań grupy metoksylowej zmienia się nieznacznie w widmach *o*-anyżanów, ale w widmach *m*- i *p*-anyżanów niektóre z tych pasm ulegają znacznym przesunięciom. Pozwala to przypuszczać, że wpływ jonu metalu alkalicznego na rozkład ładunku elektronowego grupy metoksylowej jest silniejszy w przypadku *m*- i *p*-anyżanów niż *o*-anyżanów.

W widmach  $^1\text{H}$  NMR *o*-anyżanów widoczne są przesunięcia sygnałów w stronę wyższych wartości natężeń pola w porównaniu z sygnałami obecnymi w widmie protonowym kwasu. Ponadto wartości sygnałów maleją w serii  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$  *o*-anyżanów. Świadczy to wzmocnienie ekranowania protonów aromatycznych będącego wynikiem osłabienia prądów kołowych w pierścieniu. Ponadto bardziej znaczące zmiany w położeniu odpowiadających sobie sygnałów w widmach *o*-anyżanów w porównaniu z widmami protonowymi *m*-anyżanów i *p*-anyżanów, świadczą o silniejszym wpływie kationów litowców na strukturę kwasu *o*-anyżowego niż *m*- i *p*-anyżowych.

W przypadku widm  $^{13}\text{C}$  NMR anyżanów część sygnałów ulega przesunięciu w stronę wyższych lub niższych wartości natężeń pola w porównaniu z odpowiednimi sygnałami w widmie kwasu. W widmach anyżanów sygnał pochodzący od atomu węgla nr 7 ulega przesunięciu w stronę mniejszych wartości natężeń pola. Spowodowane jest to wpływem metalu na strukturę anionu karboksylanowego i spadkiem gęstości elektronowej wokół atomu węgla nr 7. W widmach węglowych *o*-anyżanów sygnały pochodzące od pozostałych węgli pierścienia ulegają przesunięciu w stronę wyższych wartości natężeń pola w porównaniu z widmem kwasu *o*-anyżowego, co wskazywałoby na wzrost gęstości elektronowej wokół tych atomów w cząsteczkach *o*-anyżanów. Policzone metodą B3LYP/6-311++G\*\* (program Gaussian) teoretyczne widma NMR oraz rozkład ładunku elektronowego koreluje z danymi z widm magnetycznego rezonansu jądrowego (rys. 5).

W widmach UV wodnych roztworów kwasu *o*-anyżowego i *o*-anyżanów obecne są maksima długości fali pasm pochodzących od przejść  $\pi \rightarrow \pi^*$  (dla kwasu: 199,4 i 282,6 nm oraz dla soli ~195 i ~278 nm). Widoczne jest niewielkie przesunięcie pasm w widmach anyżanów litowców w stronę niższych wartości długości fali w porównaniu z widmem kwasu. Większe różnice między widmami kwasu i soli obecne są w przypadku *o*-anyżanów niż *m*-anyżanów i *p*-anyżanów. Natomiast nie zaobserwowano systematycznych zmian wartości długości fali pasm  $\pi \rightarrow \pi^*$  zachodzących wraz ze zmianą metalu w serii litowców. Różnice w długościach fali pasm w widmach kolejnych anyżanów są niewielkie. Zarejestrowano również widma UV w cieple stałym. Również widoczne jest hipsochromowe przesunięcie pasm  $\pi \rightarrow \pi^*$  w widmach soli w porównaniu z widmem kwasu.

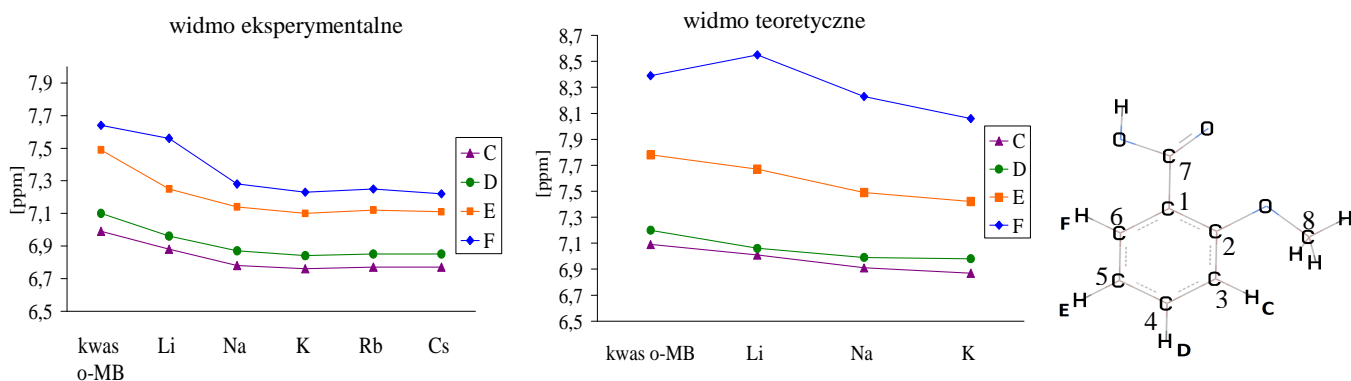
Najbardziej widoczna różnica w położeniu maksimum pasm w widmie ligandu i jego soli widoczna jest w przypadku *o*-anyżanów. Nie zaobserwowano regularnych i wyraźnych przesunięć maksimum pasm w serii litowców.

Stosując obliczenia kwantowo-mechaniczne (program Gaussian, metoda obliczeniowa: B3LYP/6-311\*\*G++) zoptymalizowano struktury kwasu *o*-anyżowego oraz soli litu, sodu i potasu w celu uzyskania parametrów strukturalnych, takich jak długości wiązań i wielkości kątów. Wykonano obliczenia dla różnych konformacji kwasu wybierając do dyskusji struktury o najniższej energii lub o identycznym ułożeniu grup funkcyjnych jak monokryształ kwasu *o*-anyżowego (na podstawie danych literaturowych). Obliczenia wykazały, że struktura z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym ma najniższą energię (rys. 6).

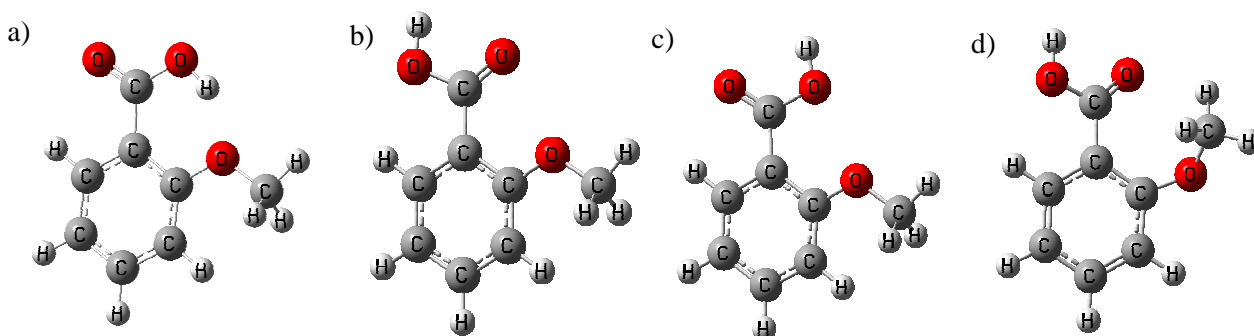
Metale pierwszej grupy układu okresowego powodują zmiany głównie w strukturze anionu karboksylanowego oraz grupy metoksylowej. Największe zmiany w geometrii ligandu zaobserwowano w przypadku *o*-anyżanów w porównaniu do *m*- i *p*-anyżanów. Rodzaj metalu z serii  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K}$  nie powoduje znaczących zmian w długościach wiązań i wielkościach kątów w cząsteczkach soli. Obecność regularnych zmian w długościach wiązań i wielkościach kątów badanych cząsteczek tłumaczy zmiany innych parametrów, takich jak rozkład ładunku w cząsteczkach czy zmiana pozycji pasm w widmach w podczerwieni i ramanowskich anyżanów. Policzone geometryczne indeksy aromatyczności dla *o*-anyżanów wskazują, że podstawienie metalu w miejsce wodoru w grupie karboksylowej nie powoduje znaczących zmian we właściwościach aromatycznych soli.

Stopień biodegradacji *o*-anyżanów litu, sodu i potasu został oceniony na podstawie procentu redukcji wskaźników zanieczyszczeń, takich jak chemiczne zapotrzebowanie na tlen i biochemiczne zapotrzebowanie na tlen. Na podstawie % redukcji CHZT należy stwierdzić, że wraz z upływem dni następuje wzrost % redukcji chemicznego zapotrzebowania na tlen w badanych próbach. Po pięciu dniach otrzymano zmniejszenie tego wskaźnika dla soli z litem o 43-48%, dla soli sodowej o 47-60% oraz dla soli z potasem o 47-61%. Położenie podstawnika metoksylowego przy pierścieniu wpływa na stopień biodegradacji anyżanów. Biorąc pod uwagę parametr jakim jest % redukcji CHZT podatność na biochemiczny rozkład rośnie w szeregu *o*-  $\rightarrow$  *m*-  $\rightarrow$  *p*- metoksybenzoesanów. Na rysunku 7 przedstawiono wartości % redukcji biochemicznego zapotrzebowania na tlen po pięciu dniach (BZT<sub>5</sub>) dla metoksybenzoesanów: litu, sodu i potasu. Analizując uzyskane wyniki zaobserwowano, że zarówno w przypadku *o*-metoksybenzoesanów, *m*-metoksybenzoesanów jak i *p*-metoksybenzoesanów litu, sodu i potasu widoczny jest wzrost % redukcji biochemicznego zapotrzebowania na tlen. Wraz ze wzrostem stężenia poszczególnych soli (z wyjątkiem *o*-anyżanu potasu przy stężeniu 1 mg/dm<sup>3</sup>) wzrasta % redukcji w miarę upływu

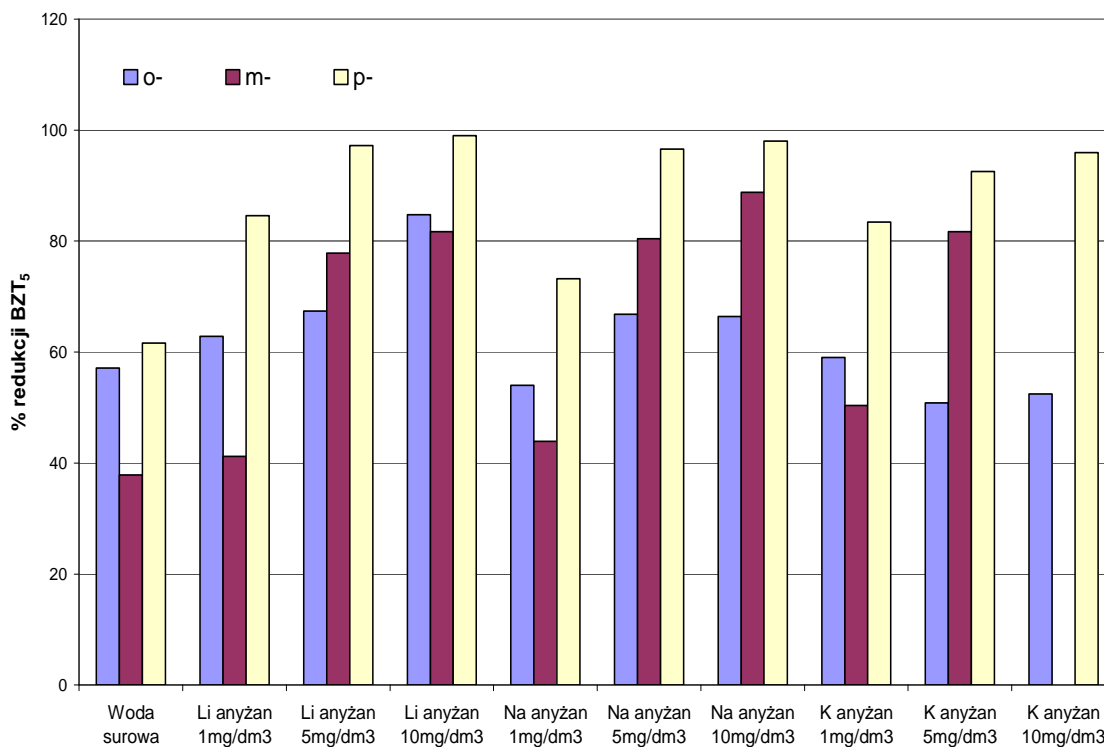




Rys. 5. Wartości przesunięć chemicznych [ppm] sygnałów w eksperymentalnym i teoretycznym widmie  $^1\text{H}$  NMR kwasu *o*-azyżowego (*o*-MB) oraz anyżanów litowców



Rys. 6. Cząsteczki kwasu *o*-azyżowego, dla których wykonane były obliczenia optymalizacji struktury. Wartości energii i momentów dipolowych poszczególnych struktur są następujące: a)  $E = -535,500$  a.u., moment dipolowy = 7,06 D; b)  $E = -535,497$  a.u., moment dipolowy = 2,72 D; c)  $E = -535,497$  a.u., moment dipolowy = 3,75 D; d)  $E = -535,493$  a.u., moment dipolowy = 1,94 D



Rys. 7. Procent redukcji wartości BZT po pięciu dniach dla *o*-, *m*-, *p*- anyżanów potasu

czasu. Redukcja BZT generalnie maleje w szeregu Li→Na→K. Podatność na biochemiczny rozkład maleje w szeregu  $p- \rightarrow m- \rightarrow o-$  anyżanów litu, sodu i potasu.

Wykonano badania aktywności mikrobiologicznej  $o$ -anyżany litowców w stosunku do: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Proteus vulgaris*. Badane związki wykazują niewielką aktywność w stosunku do wymienionych bakterii. W przypadku *Ps. aeruginosa* zauważalny jest wzrost właściwości antybakteryjnych w serii Li→Na→K→Rb→Cs anyżanów. Celem korelacji danych opisujących strukturę związku i jego właściwości biologiczne przeprowadzono analizę regresji dla liczb falowych z widm podczerwieni anyżanów litowców oraz parametrów opisujących ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Wyniki analizy regresji zebrane zostały w tabeli 3.

Tabela 3. Wyniki analizy regresji (równanie regresji, współczynnik determinacji  $R^2$ , błąd standardowy estymacji) wykonanej dla danych spektroskopowych i biologicznych  $o$ -anyżanów litu, sodu, potasu, rubidu i ceszu

<i>o</i> -anyżany	
<i>Ps. aeruginosa</i>	
24 godz.	gęstość optyczna = $40,13971 - 0,4417 \cdot 19b$ $+ 0,01824 \cdot \delta_{as}(CH_3)_{(2)}$ * $R^2=0,999$ błąd stand. estymacji=0,00306
48 godz.	gęstość optyczna = $-65,1609 + 0,0485 \cdot \delta_{as}(CH_3)_{(2)}$ $- 0,0053 \cdot \gamma_s(COO^-)$ $R^2 = 0,9999$ błąd stand. estymacji = 0,0135
<i>E. coli</i>	
24 godz.	gęstość optyczna = $-6,21102 - 0,018798 \cdot \delta_{as}(CH_3)_{(1)}$ $+ 0,02289 \cdot \delta_{as}(CH_3)_{(2)}$ $R^2 = 0,9998$ błąd stand. estymacji = 0,0008
<i>Pr. Vulgaris</i>	
24 godz.	gęstość optyczna = $-46,8195 + 0,0304 \cdot \delta_{as}(CH_3)_{(2)}$ $+ 0,0041 \cdot \beta_s(COO^-)$ $R^2 = 0,9997$ błąd stand. estymacji = 0,00183

\* oznaczenia pasm z widm FT-IR użytych w równaniach zaznaczono pogrubioną czcionką; w przypadku obecności kilku pasm o takim samym oznaczeniu kolejność pasma w tabeli z przypisaniami widm w podczerwieni oznaczono cyfrą w indeksie dolnym

Przeprowadzona analiza statystyczna wskazuje na istnienie zależności między aktywnością a strukturą związku opisanych w postaci równań regresji, które wiążą ze sobą parametry opisujące właściwości biologiczne związku (gęstość optyczna roztworu) oraz parametry

opisujące budowę cząsteczek (liczby falowe z widm w podczerwieni). O istotności parametrów strukturalnych modeli decydowała wartość poziomu prawdopodobieństwa. Wysokie współczynniki determinacji wskazują na dobrą zależność pomiędzy wskaźnikami użytymi w równaniach. Wielkość błędu standardowego estymacji określa błąd z jakim można wyznaczyć teoretyczną gęstość optyczną roztworu charakteryzującą aktywność mikrobiologiczną związków. Oznaczenia pasm użyte w równaniach opisują drgania tych fragmentów cząsteczki, od których w największym stopniu zależy aktywność biologiczna związku. Uzyskane modele regresji wskazują na duży udział pasm pochodzących od drgań grupy karboksylanowej oraz metoksylowej. Dla prawie wszystkich pasm użytych w równaniach regresji wykazano wysokie współczynniki korelacji liniowej z parametrami kationów metali (promieniem jonowym, potencjałem jonowym i odwrotnością masy atomowej). Oznacza to, że pasma te są szczególnie wrażliwe na podstawienie metalu w grupie karboksylanowej kwasu, a ich położenie na widmie jest w dużym stopniu uzależnione od rodzaju kationu litowca. Dlatego pozwala to przypuszczać, że parametry spektralne użyte w równaniach regresji w dobry sposób opisują zmianę w rozkładzie gęstości elektronowej ligandu spowodowanej podstawieniem w grupie karboksylanowej kolejnego z serii kationu litowca.

### 3.2. Kwas *o*-nitrobenzoesowy i *o*-nitrobenzoesany litowców – badania FT-IR, RT-Raman, UV/VIS, NMR, obliczenia teoretyczne, biodegradacja i aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Zbadany został kwas *o*-nitrobenzoesowy oraz seria soli kwasu *o*-nitrobenzoesowego z litowcami. Kwas był potraktowany jako związek modelowy, do którego były porównywane i odniesione otrzymane wyniki. Do scharakteryzowania związków posłużyły wyniki badań spektroskopowych. Przypisano pasma występujące w widmach w podczerwieni IR i widmach ramanowskich badanych *o*-nitrobenzoesanów (Świsłocka i in., 2007).

W widmie kwasu *o*-nitrobenzoesowego obecne są charakterystyczne pasma drgań grupy karbonylowej  $\nu(C=O)$  przy  $1702 \text{ cm}^{-1}$  (IR);  $1639 \text{ cm}^{-1}$  (Raman),  $\nu(C-OH)$  przy  $1295 \text{ cm}^{-1}$  (IR);  $1293 \text{ cm}^{-1}$  (Raman) oraz  $\gamma(C=O)$  przy liczbie falowej  $585 \text{ cm}^{-1}$  (IR);  $582 \text{ cm}^{-1}$  (Raman) oraz pasma pochodzące od drgań grupy hydroksylowej rozciągających w zakresie  $3000-2600 \text{ cm}^{-1}$  i pasm drgań deformacyjnych:  $\beta(OH)$  przy liczbie falowej  $1420 \text{ cm}^{-1}$  (IR),  $\gamma(OH)$  przy  $905 \text{ cm}^{-1}$  (IR);  $895 \text{ cm}^{-1}$  (Raman).

Charakterystyczne zmiany w widmie oscylacyjnym badanego związku w porównaniu z kwasem *o*-nitrobenzoesowym spowodowane były przez zastąpienie atomu wodoru atomem litowca w grupie karboksylanowej. W widmach w podczerwieni i Ramana *o*-nitrobenzoesanów litowców występują charakterystyczne intensywne drgania pochodzące od grupy karboksylanowej. Pasma takie były łatwe do zaobserwowania oraz interpretacji, ponieważ charakteryzowały się

dużą szerokością i były przeważnie bardzo intensywne. Pasma odpowiedzialne za drganie rozciągające symetryczne anionu karboksylanowego –  $\nu_s(\text{COO})$  występuje w zakresie liczb falowych 1420–1350  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 1403–1384  $\text{cm}^{-1}$  (Raman) a asymetryczne –  $\nu_{as}(\text{COO})$  przy 1535–1510  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 1534–1518  $\text{cm}^{-1}$  (Raman). Występują charakterystyczne intensywne drgania deformacyjne symetryczne w płaszczyźnie anionu karboksylanowego  $\beta_s(\text{COO})$  leżące w zakresie 840–830  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 842–830  $\text{cm}^{-1}$  (Raman), asymetryczne  $\beta_{as}(\text{COO})$  przy 585–570  $\text{cm}^{-1}$  (IR) i drgania deformacyjne symetryczne poza płaszczyzną  $\gamma_s(\text{COO})$  przy 730–751  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 757–734  $\text{cm}^{-1}$  (Raman).

Zarówno w widmach kwasu jak i w soli tego kwasu wystąpiły drgania grupy nitrowej  $-\text{NO}_2$ : drgania rozciągające asymetrycznie –  $\nu_{as}(\text{NO}_2)$  w zakresie 1569–1568  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 1574–1533  $\text{cm}^{-1}$  (Raman) i symetrycznie –  $\nu_s(\text{NO}_2)$  w zakresie 1355–1343  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 1385–1341  $\text{cm}^{-1}$  (Raman), drgania deformacyjne w płaszczyźnie symetryczne –  $\beta_s(\text{NO}_2)$  przy 867–863  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 861–867  $\text{cm}^{-1}$  (Raman) i asymetryczne  $\beta_{as}(\text{NO}_2)$  przy 583–573  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 531–556  $\text{cm}^{-1}$  (Raman), drganie deformacyjne symetryczne poza płaszczyzną –  $\gamma_s(\text{NO}_2)$  w zakresie 728–700  $\text{cm}^{-1}$  (IR); 706  $\text{cm}^{-1}$  i 699  $\text{cm}^{-1}$  (Raman).

Pasma związane z drganiami pierścienia aromatycznego występują w całym analizowanym zakresie spektralnym. W zakresie 4000–2900  $\text{cm}^{-1}$  występują pasma związane z drganiami rozciągającymi

$\nu(\text{CH})$ . Drgania deformacyjne wiązania CH zarówno drgania w płaszczyźnie –  $\beta(\text{CH})$ , jak i drgania poza płaszczyzną –  $\gamma(\text{CH})$  w całym analizowanym zakresie spektrum występują naprzemiennie. Nieregularność taką można również zauważyć w przypadku pasm drgań rozciągających szkieletowych –  $\nu(\text{CC})$ , które łatwo jest odróżnić od innych pasm, ponieważ są węższe od innych pasm.

Przeprowadzono analizę regresji liniowej i wyznaczono korelacje występujące pomiędzy parametrami spektralnymi a wielkościami opisującymi badane metale: elektroujemność, promień jonu, promień atomu, powinowactwo elektronowe, energia jonizacji, potencjał jonowy. Zależności te zostały wyznaczone dla pasm, których liczby falowe zmieniały się regularnie (w stronę większych lub mniejszych liczb falowych) wraz ze zmianą metalu.

W widmach kwasu i jego soli zauważono systematyczne zmiany liczb falowych niektórych pasm:  $\alpha(\text{CCC})$ ,  $\gamma_s(\text{NO}_2)$ ,  $\beta_s(\text{COO})$  i  $\beta_{as}(\text{COO})$  wykazują tendencje malejącą w szeregu  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$ . Analiza współczynników korelacji wykazała, że liczby falowe tych pasm wykazują istotne korelacje z wybranymi parametrami metali. Najlepsze korelacja w widmach IR i Ramana stwierdzono między liczbami falowymi a promieniem jonu i potencjałem jonowym. Świadczy to o czułości tych pasm na sprzężenie mechaniczne kationu z resztą cząsteczki (tab. 4 i 5).

Tabela 4. Współczynniki korelacji prostoliniowych (R) pomiędzy wartościami liczb falowych ( $\text{cm}^{-1}$ ) pasm w widmach IR o-nitrobenzoesanów litowców a wybranymi parametrami fizykochemicznymi metali wchodzących w skład analizowanych soli

Drganie	Elektroujemność	Promień jonu [pm]	Promień atomu [pm]	Powinowactwo elektronowe [m→m] [kJ/mol]	Energia jonizacji	Potencjał jonowy
$\beta_s(\text{COO})$ 840-830	0,9687	0,9372	0,9624	0,9172	0,9593	0,9506
$\gamma_s(\text{NO}_2)$ 704-700	0,9948	0,9871	0,9692	0,9700	0,9894	0,9850
$\alpha(\text{CCC})$ 649-647	0,8643	0,9253	0,8535	0,9332	0,8757	0,9244
$\beta_{as}(\text{COO})$ 583-573	0,9808	0,9592	0,9803	0,8598	0,9789	0,9623

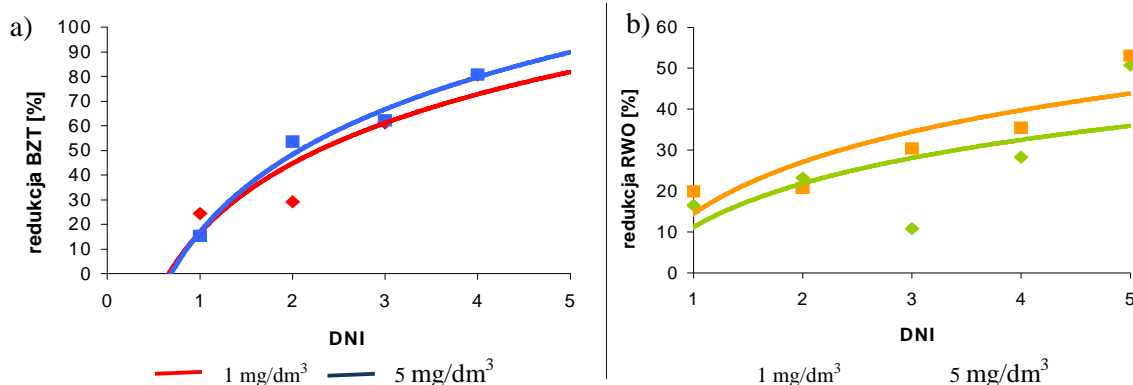
Tabela 5. Współczynniki korelacji prostoliniowych (R) pomiędzy wartościami liczb falowych ( $\text{cm}^{-1}$ ) pasm w widmach Ramana o-nitrobenzoesanów litowców a wybranymi parametrami fizykochemicznymi metali wchodzących w skład analizowanych soli

Drganie	Elektroujemność	Promień jonu [pm]	Promień atomu [pm]	Powinowactwo elektronowe [m→m] [kJ/mol]	Energia jonizacji	Potencjał jonowy
$\nu(\text{CC})$ 19a	0,9605	0,9727	0,9284	0,9582	0,9601	0,9613
$\gamma(\text{CH})$ 5	0,9607	0,9643	0,9924	0,9058	0,9815	0,9466
$\beta_s(\text{COO})$ 842-830	0,9667	0,9563	0,9880	0,9052	0,9788	0,9460
$\alpha(\text{CCC})$ 651-648	0,8421	0,9525	0,8585	0,8826	0,8819	0,8814

Zarejestrowano widma elektronowe UV/VIS roztworów wodnych kwasu i soli *o*-nitrobenzoesanu litu, sodu i potasu. Badania prowadzono dla stężenia  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>. Widma były rejestrowane w zakresie 190-350 nm. Widmo elektronowe kwasu *o*-nitrobenzoesowego posiada dwa pasma przy 212 i 266 nm. Zastąpienie atomu wodoru w kwasie atomem litowca (Li, Na, K) powoduje nieznaczne przesunięcie wyżej wymienionych pasm w stronę fal krótszych (przesunięcie hipsometryczne). Pasma te zostały zinterpretowane jako pasma odpowiadające przejściom  $\pi - \pi^*$  w układzie aromatycznym. Pierwsze pasmo wynika z przejścia z orbitali wiążących w stanie podstawowym do dipolowych stanów wzbudzonych, podczas gdy pasmo przy około 266 nm jest wynikiem wzbudzonego przejścia z orbitalu niewiążącego do homo polarnego stanu wzbudzonego.

Badania biodegradacji przeprowadzone były w celu oceny podatności badanych *o*-nitrobenzoesanów litu, sodu i potasu na biochemiczny rozkład. Wpływ *o*-nitrobenzoesanu litu, sodu i potasu na wskaźniki zanieczyszczeń określono na podstawie zmian biologicznego zapotrzebowania na tlen (BZT), tlenu rozpuszczonego, chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) oraz rozpuszczonego węgla organicznego (RWO). Badania rozkładu tych związków przeprowadzone były na podstawie procentu redukcji: biochemicznego zapotrzebowania na tlen, chemicznego zapotrzebowania na tlen i rozpuszczalnego węgla organicznego.

Na rysunku 8 przedstawiono procent redukcji biochemicznego zapotrzebowania na tlen *o*-nitrobenzoesanu sodu. Redukcja BZT<sub>5</sub> dla *o*-nitrobenzoesanu Li, Na i K malała w kolejnych dniach pomiarowych.



Rys. 8. Wykres redukcji: a) biologicznego zapotrzebowania na tlen, b) rozpuszczonego węgla organicznego w zależności od czasu dla *o*-nitrobenzoesanu sodu

Tabela 6. Ocena mikrobiologiczna *o*-nitrobenzoesanów litu, sodu i potasu na wybrane linie komórkowe bakterii i grzybów

Związek	Staphylococcus aureus		Pseudomonas aeruginosa		Candida albicans		Bacillus subtilis	
	MIC [mg/cm <sup>3</sup> ]	MBC [mg/cm <sup>3</sup> ]	MIC [mg/cm <sup>3</sup> ]	MBC [mg/cm <sup>3</sup> ]	MIC [mg/cm <sup>3</sup> ]	MBC [mg/cm <sup>3</sup> ]	MIC [mg/cm <sup>3</sup> ]	MBC [mg/cm <sup>3</sup> ]
2-nitrobenzoesan litu	25	100	12,5	100	6,25	12,5	25	25
2-nitrobenzoesan sodu	25	100	50	100	50	100	50	50
2-nitrobenzoesan potasu	25	>100	100	100	50	>100	50	100

Badane związki przy niższych stężeniach ulegają szybszej biodegradacji, przy wyższych - wolniej. Redukcja wskaźnika ChZT-Mn rośnie wraz z upływem dni w próbach zawierających *o*-nitrobenzoesany Li, Na i K. Przy stężeniu 1 mg/dm<sup>3</sup> rozkład badanych związków następuje szybciej niż przy stężeniu 5 mg/dm<sup>3</sup>. Stopień biodegradacji określony na podstawie procentu redukcji rozpuszczalnego węgla organicznego (przykładowy wykres przedstawiono na rys. 8b) jest najwyższy w ostatnim dniu pomiarowym. Zauważyć można, iż redukcja RWO maleje w szeregu Li-Na-K.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż są to związki należące do grupy związków powoli rozkładalnych. Wartości stosunku BZT<sub>5</sub>/ChZT mieszczą się w przedziale (0,2-0,4) i redukcja ChZT (10-50%). Zauważyć można, iż rozkład badanych związków zależy od rodzaju podstawionego metalu i maleje w szeregu K→Li→Na.

Badania mikrobiologiczne mają służyć poszukiwaniu nowych preparatów dezynfekujących i antyseptycznych. Badania aktywności bakteriobójczej *o*-nitrobenzoesanów litowców (soli Li, Na, K) określono w stosunku do wybranych bakterii testowych: gram-dodatnich G(+) – *Staphylococcus aureus*, gram-ujemnych G(-) – *Pseudomonas aeruginosa*, wytwarzających spory (przetrwalniki) – *Bacillus subtilis*. Natomiast działanie grzybobójcze określono w stosunku do szczepu *Candida albicans*.

Wyznaczono minimalne stężenia badanych soli wykazujące działanie hamujące wzrost mikroorganizmów (MIC) oraz działanie bójcze, powodujące śmierć drobnoustrojów (MBC) w odniesieniu do testowanych szczepów. Wartości MIC i MBC zostały przedstawione w tabeli 6. Analiza wyników badań mikrobiologicznych



Charakterystyczne zmiany w widmie oscylacyjnym badanego związku w porównaniu z widmem kwasu *o*-aminonikotynowego spowodowane były przez zastąpienie atomu wodoru atomem litu, sodu, potasu, rubidu i cezu w grupie karboksylowej. Zanikły pasma od drgań: grupy karbonylowej (C=O), grupy hydroksylowej (OH), walencyjnych (C-OH), a pojawiły się pasma związane z grupą karboksylową: (a) pasma pochodzące od drgań rozciągających -  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$  w zakresie 1612-1608  $\text{cm}^{-1}$  IR (KBr), 1613-1607  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 1614-1600  $\text{cm}^{-1}$  Raman,  $\nu_s(\text{COO}^-)$  w zakresie 1398-1380  $\text{cm}^{-1}$  IR (KBr), 1393-1972  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 1404-1375  $\text{cm}^{-1}$  Raman; (b) pasma deformacyjne w płaszczyźnie -  $\beta_{as}(\text{COO}^-)$  w zakresie 551-539  $\text{cm}^{-1}$  IR (KBr), 541-530  $\text{cm}^{-1}$  Raman,  $\beta_s(\text{COO}^-)$  w zakresie 895-891  $\text{cm}^{-1}$  IR (KBr), 894-889  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 899-891  $\text{cm}^{-1}$  Raman; (c) pasma deformacyjne poza płaszczyznę -  $\gamma_s(\text{COO}^-)$  w zakresie 772-770  $\text{cm}^{-1}$  IR (KBr), 777-768  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 777-772  $\text{cm}^{-1}$  Raman. Liczby falowe pasm odpowiedzialnych za drgania rozciągające symetryczne grupy karboksylowej  $\nu_s(\text{COO}^-)$  zmieniają się w sposób regularny w kierunku niższych liczb falowych w szeregu Li→Na→K→Rb. Różnica wartości liczb falowych drgań rozciągających grupy  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$  i  $\nu_s(\text{COO}^-)$  wykazuje tendencję rosnącą (z wyjątkiem *o*-aminonikotynianu cezu) w wyżej wymienionym kierunku. To wskazuje na wzrost jonowego charakteru wiązania pomiędzy jonem metalu i grupą  $-\text{COO}^-$ . Natomiast liczby falowe pasm odpowiedzialnych za drgania deformacyjne asymetryczne w płaszczyźnie grupy karboksylowej  $\beta_{as}(\text{COO}^-)$  zmieniają się w sposób regularny w szeregu Li<Na<K=Rb=Cs. Różnica wartości liczb falowych drgań deformacyjnych grupy  $\beta_s(\text{COO}^-)$  i  $\beta_{as}(\text{COO}^-)$  maleje w szeregu Li→Na→K=Rb=Cs.

Zarówno w widmach kwasu jak i soli tego kwasu wystąpiły drgania grupy aminowej  $-\text{NH}_2$ : (a) pasma pochodzące od drgań rozciągających -  $\nu_{as}(\text{NH}_2)$  przy 3257  $\text{cm}^{-1}$  IR<sub>KBr</sub>, 3249  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 3107  $\text{cm}^{-1}$  Raman,  $\nu_s(\text{NH}_2)$  przy 3099  $\text{cm}^{-1}$  IR<sub>KBr</sub>, 3095  $\text{cm}^{-1}$  ATR;  $\nu(\text{C-NH}_2)$  przy 1463  $\text{cm}^{-1}$  IR<sub>KBr</sub>, 1462  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 1468  $\text{cm}^{-1}$  Raman; (b) pasma deformacyjne w płaszczyźnie -  $\beta_s(\text{NH}_2)$  przy 1636  $\text{cm}^{-1}$  IR<sub>KBr</sub>, 1630  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 1632  $\text{cm}^{-1}$  Raman;  $\beta_{as}(\text{NH}_2)$  przy 1251 i 1089  $\text{cm}^{-1}$  IR<sub>KBr</sub>, 1242 i 1093  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 1250 i 1082  $\text{cm}^{-1}$  Raman; (c) pasmo deformacyjne poza płaszczyznę -  $\gamma_s(\text{NH}_2)$  przy 583  $\text{cm}^{-1}$  IR<sub>KBr</sub>, 579  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 581  $\text{cm}^{-1}$  Raman. Ponadto w widmach soli

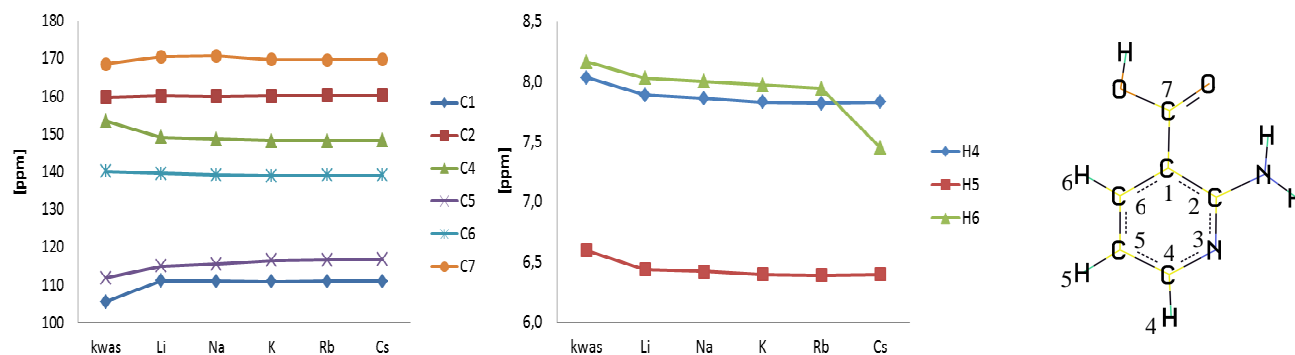
zaobserwowano pojawienie się pasma w zakresie 1330-1322  $\text{cm}^{-1}$  IR<sub>KBr</sub>, 1330-1317  $\text{cm}^{-1}$  ATR; 327-1322  $\text{cm}^{-1}$  Raman, odpowiadające za drganie rozciągające wiązania C-N (Świsłocka i in., 2009).

Na uwagę zasługują systematyczne zmiany liczb falowych niektórych pasm. W sposób regularny zmieniają się liczby falowe pasm:  $\nu(\text{C-NH}_2)$  i  $\gamma_s(\text{NH}_2)$  wykazując tendencję malejącą w szeregu Li→Na→K→Rb→Cs w widmach IR<sub>KBr</sub>;  $\phi(\text{C-C})$ ,  $\beta(\text{CH})$  i  $\nu_s(\text{NH}_2)$  w widmach ATR;  $\phi(\text{C-C})$ ,  $\nu(\text{C-N})$ ,  $\nu_s(\text{NH}_2)$  i  $\gamma_s(\text{NH}_2)$  w widmach Ramana. Liczby falowe pasma  $\beta_{as}(\text{NH}_2)$  zmieniają się w sposób regularny w kierunku wyższych wartości w szeregu Li→Na→K=Rb→Cs.

Różnica między liczbami falowymi pasm drgań rozciągających asymetrycznych i symetrycznych anionu karboksylanowego ( $\Delta\nu\text{COO}^-$ ) zmienia się w serii Li→Na→K→Rb→Cs następująco: 213, 216, 229, 231 i 226  $\text{cm}^{-1}$ . Ogólnie w wyżej wymienionej serii wzrasta stopień jonowości oraz asymetryczność wiązania metal-ten.

Zmiany wartości liczb falowych poszczególnych pasm wskazują na wpływ metalu na zachowanie się pierścienia heterocyklicznego. Wzrost wartości liczb falowych pasm oscylacyjnych należy interpretować jako zwiększenie się gęstości elektronowej wokół drgających atomów. Z kolei spadek wartości liczb falowych wiąże się ze zmniejszeniem gęstości elektronowej. Zbadano korelacje między liczbą falową danego pasma, a parametrami fizykochemicznymi metali (elektroujemność, promień atomu, promień jonu, energia jonizacji, potencjał jonowy). Zależności te zostały wyznaczone dla pasm, których liczby falowe zmieniały się regularnie w stronę niższych lub wyższych liczb falowych wraz ze zmianą metalu. Uzyskane wartości współczynników korelacji świadczą, iż istnieje istotna zależność pomiędzy parametrami opisującymi metal a wartościami liczb falowych pasm w widmach spektroskopowych. Największe współczynniki korelacji uzyskano pomiędzy liczbami falowymi pasm a promieniem jonu i potencjałem jonowym.

Przeanalizowano otrzymane doświadczalnie widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) atomu wodoru  $^1\text{H}$  i atomu węgla  $^{13}\text{C}$  kwasu *o*-aminonikotynowego i jego soli z litem, potasem, rubidem i cezem. Uzyskane wartości przesunięć chemicznych  $\delta$  protonów i atomów węgla zestawiono na rysunku 10.



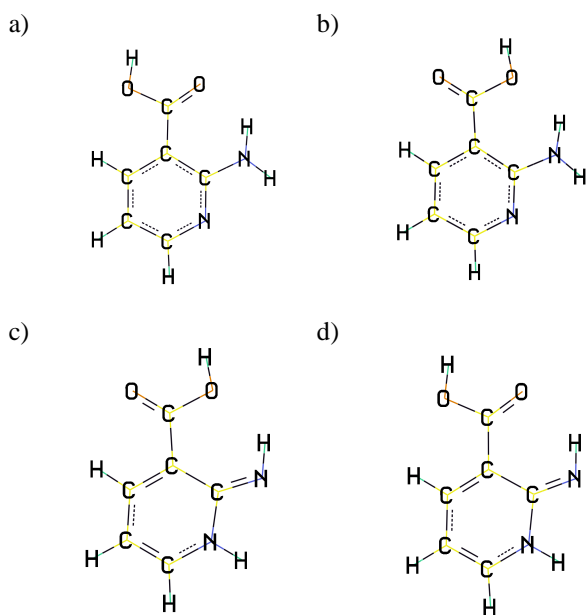
Rys. 10. Wartości przesunięć chemicznych [ppm] sygnałów w eksperymentalnych widmach  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR kwasu *o*-aminonikotynowego oraz *o*-aminonikotynianów litowców



Po podstawieniu atomu wodoru w grupie karboksylowej atomem litowca nastąpiły zmiany wartości przesunięć chemicznych  $\delta$  zarówno protonu  $^1\text{H}$  i atomu węgla  $^{13}\text{C}$  w stosunku do kwasu. W widmach protonowych aminonikotynianów widoczne są przesunięcia sygnałów w stronę wyższych wartości natężeń pola w porównaniu z sygnałami obecnymi w widmie kwasu. Wartości sygnałów maleją w serii kwas $\rightarrow$ Cs.

W widmie węglowym wartości przesunięć chemicznych atomu węgla C4 regularnie rosną w wyżej podanym szeregu. Przesunięcia chemiczne atomów węgla  $^{13}\text{C}$  w solach przyjmują większe wartości niż w kwasie *o*-aminonikotynowym dla atomów węgla C1, C2, C4, C6, a co za tym idzie następuje odślanianie atomów węgla w solach. Najbardziej odślanianym atomem węgla w pierścieniu jest C2, natomiast mniejsze przesunięcia chemiczne w stosunku do kwasu *o*-aminonikotynowego zauważono dla atomu C1.

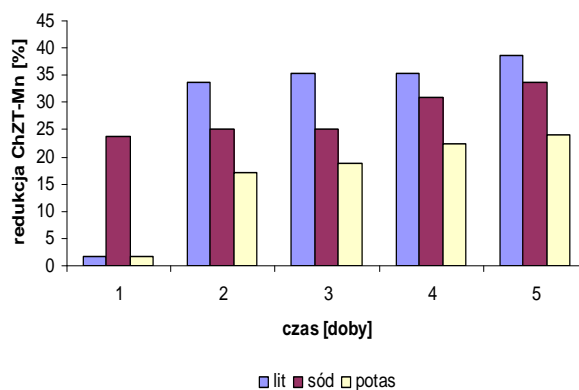
Przy użyciu programu Gaussian wykonano **obliczenia kwantowo-mechaniczne** polegające na optymalizacji struktur (policzono parametry geometryczne cząsteczek kwasu *o*-aminonikotynowego i jego soli z litem, sodem i potasem, tj. długości wiązań, wielkości kątów, momenty dipolowe i energie). Do obliczeń zastosowano metodę B3LYP z bazą 6-311\*\*. Wykonano obliczenia dla różnych konformacji kwasów (rys. 11). Wartości energii i momentów dipolowych poszczególnych struktur są następujące: (a)  $E = -492,382$  a.u., moment dipolowy = 1,199 D; (b)  $E = -492,379$  a.u., moment dipolowy = 1,491 D; (c)  $E = -492,352$  a.u., moment dipolowy = 3,130 D i (d)  $E = -492,354$  a.u., moment dipolowy = 4,750 D. Obliczono też parametry strukturalne cząsteczek soli *o*-aminonikotynianów litu, sodu o potasu. Wartość momentu dipolowego wzrasta w szeregu kwas $\rightarrow$ Li $\rightarrow$ Na $\rightarrow$ K i wynosi odpowiednio: 1,199; 5,171; 8,071; 9,812.



Rys. 11. Zoptymalizowane struktury kwasu *o*-aminonikotynowego (Świsłocka i in., 2009)

Analizując parametry geometryczne można zaobserwować regularne zmiany w szeregu: kwas  $\rightarrow$  Li  $\rightarrow$  Na  $\rightarrow$  K. Rosną długości wiązań: C3-C4, C1-N2, N2-H2, C2-C6 oraz maleją: C2-C3, C4-C5, C6-O1, C6-O2. Wraz ze wzrostem masy atomowej litowca rośnie również długość wiązania między atomem tlenu a atomem metalu. Rosną kąty między atomami: C2-C3-C4, N1-C1-C2, N1-C1-N2 i H1-N2-H2, a maleją między atomami C1-C2-C3, C2-C1-N2, C1-N2-H2 oraz H4-C3-C2.

W celu oceny **biodegradacji o-aminonikotynianów litu, sodu i potasu** przeprowadzono badania wpływu tych związków na wybrane wskaźniki zanieczyszczeń wód powierzchniowych. Na ich podstawie określono możliwość biodegradacji tych związków. Jej przebieg oceniono na podstawie procentu redukcji biochemicznego zapotrzebowania na tlen i indeksu manganianowego (ChZT-Mn). W przypadku wszystkich soli przedstawionych na wykresach zauważono wyraźny wzrost % redukcji w miarę upływu czasu (rys. 12).



Rys. 12. Wykres redukcji indeksu manganianowego dla *o*-aminonikotynianów litu, sodu i potasu (1 mg/dm<sup>3</sup>)

Zmniejszenie zawartości biochemicznego zapotrzebowania na tlen po pięciu dobach inkubacji wynosiło od około 30% do około 50%. Natomiast zmniejszenie wartości wskaźnika tlenowego jakim jest indeks manganianowy po pięciu dobach wynosiło od około 20% do około 39%. Procent redukcji ChZT-Mn zmniejszał się wraz ze wzrostem stężenia badanej soli. Spośród badanych związków największy procent redukcji tego wskaźnika uzyskano dla *o*-aminonikotynianu litu dla wszystkich analizowanych stężeń.

Na podstawie badań redukcji wybranych wskaźników zanieczyszczeń wód powierzchniowych należy stwierdzić, iż badane związki należą do związków trudno rozkładalnych. Można zauważyć, iż ich rozkład zależy od podstawionego metalu i maleje w szeregu Li $\rightarrow$ Na $\rightarrow$ K.

#### 4. Wnioski

Podstawienie metalu w miejsce wodoru grupy karboksylowej powoduje zanik pasm pochodzących od drgań grupy karboksylowej kwasów *o*-anizowego, *o*-nitrobenzoesowego i *o*-aminonikotynowego, pojawienie się nowych związanych z drganiami anionu

karboksylanowego oraz zmianę położenia pasm przypisanych drganiom pierścienia i podstawników metoksyłowego, nitrowego i aminowego. W serii soli  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$  regularnemu przesunięciu w widmach IR i Ramana ulega od kilkunastu do kilkudziesięciu pasm. Jednoczesne wyraźne przesunięcia pasm pochodzących od drgań układu aromatycznego w serii widm litowców zarejestrowanych różnymi technikami potwierdza, że przesunięcia te nie są przypadkowe.

1. Wyniki badań spektroskopowych przeprowadzonych z zastosowaniem FT-IR, FT-Raman,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, UV oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych wskazują, że zmiana pozycji podstawnika metoksyłowego w pierścieniu znacznie bardziej wpływa na rozkład ładunku elektronowego ligandów niż zmiana kationu metalu w grupie karboksylanowej anyżanów. Ponadto jony litowców silniej wpływają na układ aromatyczny kwasu *o*-anyżowego niż kwasów *m*- i *p*-anyżowych. Natomiast wpływ kationów litowców na strukturę grupy karboksylanowej i metoksyłowej jest zauważalnie większy w strukturach *m*- i *p*-anyżanów niż *o*-anyżanów. Prawdopodobnie w przypadku *o*-anyżanów grupa metoksyłowa uczestniczy w koordynacji jonu litowca, w przeciwieństwie do struktur *m*- i *p*-anyżanów. Utworzenie sześcioczołowego pierścienia stabilizuje rozkład gęstości elektronowej w grupie karboksylanowej i metoksyłowej. Regularne przesunięcia niektórych pasm w widmach FT-IR, FT-Raman,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR w serii  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$  anyżanów wskazują, że zaburzenie układu elektronowego ligandów zależy od określonych parametrów kationów metali (takich jak np. potencjał jonowy, promień jonowy czy masa atomowa).

W widmach kwasu *o*-nitrobenzoesowego i jego solach z litowcami zauważono systematyczne zmiany liczb falowych pasm:  $\alpha(\text{CCC})$ ,  $\gamma_s(\text{NO}_2)$ ,  $\beta_s(\text{COO})$  i  $\beta_{as}(\text{COO})$ , wykazują one tendencję malejącą w szeregu  $\text{Li} \rightarrow \text{Na} \rightarrow \text{K} \rightarrow \text{Rb} \rightarrow \text{Cs}$ . Analiza współczynników korelacji wykazała, że liczby falowe tych pasm wykazują istotne korelacje z wybranymi parametrami metali. Najlepsze korelacje w widmach IR i Ramana stwierdzono między liczbami falowymi a promieniem jonu i potencjałem jonowym.

2. Przeprowadzono badania wpływu *o*-metoksy-, *o*-nitrobenzoesanów oraz *o*-aminonikotynianów litu, sodu i potasu na wybrane wskaźniki zanieczyszczeń wód powierzchniowych. W przypadku *o*-anyżanów stwierdzono spadek zawartości tlenu rozpuszczonego i rosnące wartości biochemicznego zapotrzebowania na tlen, co świadczy o tym, że w badanych próbach zachodzi proces biodegradacji. Osiągnięto wysoki procent redukcji wskaźników zanieczyszczeń, co dowodzi, że badane związki są podatne na rozkład biochemiczny w analizowanych stężeniach. Badane związkami nie są toksyczne w stosunku do mikroorganizmów obecnych w środowisku wodnym. Stopień biodegradacji wykazuje tendencję malejącą w szeregu *p*-  $\rightarrow$  *m*-  $\rightarrow$  *o*- anyżanów litu,

sodu i potasu. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż *o*-nitrobenzoesany litu, sodu i potasu należąca do grupy związków powoli rozkładalnych. Wartości stosunku  $\text{BZT}_5/\text{ChZT}$  mieszczą się w przedziale 0,2-0,4 i redukcja ChZT wynosi 10–50%. Zauważyć można, iż rozkład badanych związków zależy od rodzaju podstawionego metalu i maleje w szeregu  $\text{K} \rightarrow \text{Li} \rightarrow \text{Na}$ . W przypadku *o*-aminonikotynianów zmniejszenie zawartości biochemicznego zapotrzebowania na tlen po pięciu dobach inkubacji wynosiło od około 30% do około 50%. Natomiast zmniejszenie wartości wskaźnika tlenowego jakim jest indeks manganianowy po pięciu dobach wynosiło od około 20% do około 39%. Procent redukcji ChZT-Mn zmniejszał się wraz ze wzrostem stężenia badanej soli. Spośród badanych związków największy procent redukcji tego wskaźnika uzyskano dla *o*-aminonikotynianu litu dla wszystkich analizowanych stężeń. Badane związki należą do związków trudno rozkładalnych.

3. Anyżany litowców wykazują niewielką aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *St. aureus*. Wykazano korelacje między budową molekularną anyżanów litowców a ich aktywnością biologiczną. Użycie danych spektroskopowych do opisu struktury jest wystarczające do stworzenia statystycznie istotnych modeli regresji opisujących oraz pozwalających przewidzieć właściwości przeciwdrobnoustrojowe związków o podobnej budowie do badanych.

4. Analiza wyników badań mikrobiologicznych *o*-nitrobenzoesanów litu, sodu i potasu dowodzi, że szczególną aktywność (skuteczność) analizowane związki wykazały w stosunku do grzybów *Candida albicans*. Zarówno wartości MIC i MBC badanych soli w stosunku do grzybów były niższe niż wartości tych parametrów dla odpowiednich soli w odniesieniu do pozostałych szczepów (bakterii). Wykazano, iż wartości MIC w stosunku do *Candida albicans* rosły w następującej kolejności: *o*-nitrobenzoesan litu  $\rightarrow$  *o*-nitrobenzoesan sodu  $\rightarrow$  *o*-nitrobenzoesan potasu. Wartości MBC dla tego samego szczepu zmieniały się analogicznie. Badane sole okazały mniej skuteczne w odniesieniu do bakterii. W tym przypadku stężenia soli wykazujące działanie hamujące i bójcze są porównywalne.

## Literatura

- Benigni R. (2003). Quantitative Structure – Activity Relationship (QSAR) Models Of Mutagens And Carcinogens. CRC Press LLC, USA.
- Dobrosz-Teperek K., Zwierzchowska Z., Lewandowski W., Bajdor K., Dobrowolski J.Cz., Mazurek A.P. (1998). Vibrational spectra of 5-halogenouracils part II – solids. *J. Mol. Struct.*, Vol. 471, 115-125.
- Frisch M. J., Trucks G.W., H.B. Schlegel, Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X.,



- Hratchian H.P., Izmaylov A.F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J.L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Montgomery, Jr. J.A., Peralta J.E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J.J., Brothers E., Kudin K.N., Staroverov V.N., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A., Burant J.C., Iyengar S.S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J.M., Klene M., Knox J.E., Cross J.B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R.E., Yazyev O., Austin A.J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Zakrzewski V.G., Voth G.A., Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman P., Ortiz J.V., Cioslowski J., Fox D.J. (2009). Gaussian 09, Revision A.11.2, *Gaussian Inc.*, Wallingford CT.
- Kalinowska M., Siemieniuk E., Kostro A., Lewandowski W. (2006a). The application of Aj, BAC, I6, HOMA indexes for quantitative determination of aromaticity of metal complexes with benzoic, salicylic, nicotinic acids and benzene derivatives. *J. Mol. Struct.: Theochem.*, Vol. 761, 129-141.
- Kalinowska M., Świsłocka R., Lewandowski W. (2006b). The spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV and <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR) and theoretical studies of alkali metal *o*-methoxybenzoates. *J. Mol. Struct.*, Vol. 792-793, 130-138.
- Kalinowska M., Borawska M., Świsłocka R., Piekut J., Lewandowski W. (2007). Spectroscopic (IR, Raman, UV, <sup>1</sup>H AND <sup>13</sup>C NMR) and microbiological studies of Fe(III), Ni(II), Cu(II), Zn(II) and Ag(I) picolinates. *J. Mol. Struct.*, Vol. 834-836, 419-425.
- Kalinowska M., Piekut J., Świsłocka R., Lewandowski W. (2010). Zależność między strukturą molekularną anyżonów i cynamonianów litowców a ich aktywnością biologiczną określoną w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. W: „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości”. Z. Hubicki (red.), *UMCS Lublin*, 93-99.
- Lewandowski W., Kalinowska M., Lewandowska H. (2005a). The Influence of Halogens on the Electronic System of Biologically Important Ligands: Spectroscopic Study of Halogenobenzoic Acids, Halogenobenzoates and 5-Halogenouracils. *Inorg. Chem. Acta.*, Vol. 358, 2155-2166.
- Lewandowski W., Kalinowska M., Lewandowska H. (2005b). The influence of metals on the electronic system of biologically important ligands. Spectroscopic study of benzoates, salicylates, nicotines and isoorotates. *J. Inorg. Biochem.*, Vol. 99, 1407-1423.
- Lewandowski W., Priebe W., Koczoń P., Mościbroda P., Orzechowska A. (1996). The influence of selected metals and halogens on the electronic system of benzoic acid. *Fresenius. J. Anal. Chem.*, Vol. 355, 750-752.
- Lewandowski W., Dasiewicz B., Koczoń P., Skierski J., Dobrosz-Teperek K., Świsłocka R., Fuks L., Priebe W., Mazurek A.P. (2002). Vibrational study of alkaline metal nicotines, benzoates and salicylates. *J. Mol. Struct.*, Vol. 604, 189-193.
- Reva I.D., Stepanian S.G. (1995). An infrared study on matrix-isolated benzoic acid. *J. Mol. Struct.*, Vol. 349, 337-340.
- Stepanian S.G., Reva I.D., Radchenko E.D., Sheina G.G. (1996). Infrared spectra of benzoic acid monomers and dimers in argon matrix. *Vibr. Spectr.*, Vol. 11, 123-133.
- Świsłocka R., Piekut J., Kalinowska M., Lewandowski W. (2010). Spektroskopowe i mikrobiologiczne badania soli kwasów pikolinowych oraz *m*-ftalowego. W: „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości”. Z. Hubicki (red.), *UMCS Lublin*, 70-77
- Świsłocka R., Samsonowicz M., Regulska E., Lewandowski W. (2007). Theoretical and experimental IR, Raman and NMR spectra in studying the electronic structure of 2-nitrobenzoates. *J. Mol. Struct.*, Vol. 854-836, 389-398.
- Świsłocka R., Regulska E., Samsonowicz M., Lewandowski W. (2009). Experimental (FT- IR, FT- Raman, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR) and theoretical study of alkali metal 2-aminonicotines. *Polyhedron*, Vol. 28, 3556-3564.
- Torii H., Tatsumi T., Tasumi M., (1998). Effects of hydration on the structure, vibrational wavenumbers, vibrational force field and resonance raman intensities of *N*-methylacetamide. *J. Raman Spectrosc.*, Vol. 29, 537-546.
- Todeschini R., Consonni V. (2000). Handbook Of Molecular Descriptors. *Wiley-VCH*, Weinheim.

**PHYSICOCHEMICAL, MICROBIOLOGICAL  
AND BIODEGRADATION STUDIES OF SELECTED  
DERIVATIVES OF BENZOIC ACIDS AND ITS SALTS.  
SEARCHING FOR NEW ANTIMICROBIAL  
COMPOUNDS APPLICABLE IN PROTECTION  
AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING**

**Abstract:** Still growing interest in studies of the effect of metal ions on the electronic system of carboxylic acids is caused by the huge biological importance of metal-ligand linkages. In the field of protection and environmental engineering metal complexes act as antimicrobial compounds safe for human and natural environment. In this work the results of physicochemical studies of alkali metal *o*-methoxybenzoates, *o*-nitrobenzoates and *o*-aminonicotines were presented. The following analytical methods were used: infrared spectroscopy (FT-IR), Raman spectroscopy (FT-Raman), electronic absorption spectroscopy (UV), magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) and quantum-mechanical calculations. The degrees of biodegradation of studied compounds were established on the basis of BZT, ChZT and RWO values.

Pracę wykonano w Politechnice Białostockiej w ramach pracy statutowej S/WBiIS/21/07.