

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **238660**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427085**

(22) Data zgłoszenia: **17.09.2018**

(51) Int.Cl.

A01N 37/28 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

(54) **Zastosowanie hydrazynu kwasu 4-hydroksybenzoesowego
oraz zastosowanie hydrazido-hydrazonów pochodnych kwasu
4-hydroksybenzoesowego aldehydów zawierających fragment aromatyczny**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

06.05.2019 BUP 10/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

20.09.2021 WUP 25/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

HALINA MANIAK, Wrocław, PL

DOROTA WITKOWSKA, Złaków Kościelny, PL

MIROŚLAW GIURG, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Otręba

PL 238660 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie hydrazynu kwasu 4-hydroksybenzoesowego oraz zastosowanie hydrazido-hydrazonów pochodnych kwasu 4-hydroksybenzoesowego i aldehydów zawierających fragment aromatyczny, które może być wykorzystane zwłaszcza w rolnictwie, sadownictwie, przemyśle leśnym i ogrodnictwie.

Kwas 4-hydroksybenzoesowy (4HBA) jest składnikiem ścian komórkowych roślin. Z pracy przeglądowej Vanholme et al., *Plant Physiology*, **2010**, 153, 895–905 znany jest kwas 4-hydroksybenzoesowy i jego koniugaty, kwas walininowy, syringowy i protokatechowy, które tworzą złożoną strukturę ligniny. Lignina nadaje roślinie wytrzymałość i sztywność oraz zapewnia ochronę przed mikroorganizmami patogennymi. Z publikacji Klick i Herman, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, **1988**, 187, 444–450 znanym jest występowanie 4HBA w pospolitych ziołach i przyprawach, w owocach wanilii, w anyżu, koprze, kminku i pietruszce. Z innej publikacji Hatcher i Kruger, *Cereal Chemistry*, **1997**, 74, 337–343 znanym jest występowanie tego kwasu w produktach zbożowych. Z prac naukowych Smith-Becker et al., *Plant physiology*, **1998**, 116, 231–238 oraz Chakraborty et al., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2006**, 34, 509–513 znane jest zjawisko akumulacji 4HBA w ścianach komórkowych roślin w odpowiedzi na czynniki środowiskowe i na atak patogenów roślinnych. Z artykułu naukowego Johannes i Majchrzejczyk, *Applied and Environmental Microbiology*, **2000**, 66(2), 524–528 wiadomym jest, że 4HBA jest produktem degradacji ligniny oraz naturalnym mediatorem reakcji katalizowanych przez lakazę. Z artykułu Chong et al., *Journal of Agricultural Science*, **2009**, 1, 15–20 znana jest aktywność 4HBA hamująca wzrost huby drzewnej z rodzaju *Ganoderma boninense*. Z artykułu Kamaya et al., *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **2006**, 51, 537–541 wiadomym jest, że kwas 4-hydroksybenzoesowy nie jest fitotoksyczny, gdyż nie wykazuje on toksycznego wpływu na zielone algi. Z artykułu Lodovici et al., *Food and Chemical Toxicology*, **2001**, 39, 1205–1210 wiadomym jest że 4HBA nie wykazuje szkodliwego wpływu *in vitro* na cząsteczki DNA pochodzące od śledzia.

Pochodne kwasu 4-hydroksybenzoesowego. (4HBA) powszechnie występują w naturze. Z artykułu Lever, *Analytical Biochemistry*, **1972**, 47, 273–279 znany jest hydrazid kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4HBAH) stosowany w chemii analitycznej do oznaczania cukrów redukujących. Z innej publikacji Drożdżewski et al., *Structural Chemistry*, **2010**, 21, 405–414 znana jest zdolność kompleksowania jonów miedzi przez 4HBAH. Z jeszcze innej publikacji Miyazawa et al., *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **1998**, 52, 115–126 znane jest wykorzystanie hydrazynu kwasu 4-hydroksybenzoesowego w celu indukowania w roślinach uprawnych w pomidorach oporności na grzybowego patogena roślinnego z rodziny guzełkowatych *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* przy stężeniu 10 μ M.

Iminowe pochodne związków karbonylowych (aldehydów i ketonów) z hydrazidami kwasowymi są znane, jako hydrazido-hydrazony. Obecność grupy azometinowej przyłączonej wiązaniem pojedynczym azot-azot do grupy amidowej $[-(C=O)-NH-N=C-]$ stymuluje różnorodne właściwości biologiczne. Z artykułu Wilde et al., *Molecular Diversity*, **2014**, 18, 307–322 znane są hydrazony pochodne hydrazynu kwasu octowego i 4-hydroksyacetofenonu, inhibitory selenozależnej peroksydazy glutationowej wykazującej nadaktywność podczas rozwoju choroby nowotworowej w czasie tworzenia chłoniaka i przebiegu białaczki. W innym artykule Siemann et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2002**, 46(8), 2450–2457 ujawniono hydrazony pochodne 1-formylo-2-hydroksynaftalenu i hydrazydów kwasów arenosulfonowych jako inhibitory metalo- β -laktamazy inaktywującej antybiotyki β -laktamowe. Z pracy przeglądowej Popiółek *Medicinal Chemistry Research*, **2017**, 26, 287–301 znane są hydrazido-hydrazony o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

W literaturze przedmiotu znane są właściwości biologiczne cząsteczek zawierających fragment fenolowy kwasu 4-hydroksybenzoesowego. Z amerykańskiego zgłoszenia patentowego US201615053887 (A1) znane są również hydrazony, pochodne kwasu 4-hydroksybenzoesowego i aldehydów benzoesowych, przydatne w leczeniu chorób nowotworowych. Z publikacji Backes et al., *Bioorganic and Medical Chemistry*, **2014**, 22, 4629–4636 znane są hydrazido-hydrazony pochodne kwasu 4-hydroksybenzoesowego i aldehydu salicylowego lub aldehydu 5-metylosalicylowego wykazujące aktywność przeciwko grzybowi *Candida glabrata* o aktywności MIC₈₀ na poziomie odpowiednio 4 μ g/ml i 1 μ g/ml.

Z prac przeglądowych przykładowo Morozova et al., *Applied Biochemistry and Microbiology*, **2007**, 43(5), 523–535 znanym jest, że lakazy (EC 1.10.3.2) są miedziozależnymi oksydazami polifenolowymi, które katalizują cztero-elektronową redukcję tlenu cząsteczkowego do wody utleniając równocześnie rodnikowe związek aromatyczny aktywowany ugrupowaniami aminowym i/lub hydroksylowym polifenoli. Z pracy przeglądowej Solomon et al., *Chemical Reviews*, 1996, 96(7), 2563–2606 znanym

jest, że lakazy wytwarzane są w niewielkich ilościach przez insekty, bakterie i rośliny wyższe, natomiast dominującymi producentami tych enzymów są grzyby pasożytujące na drzewach, takie jak huby drzewne powodując niszczenie podłoża, w którym degradują ligninę wywołując tzw. białą zgniliznę drewna. Na atak pasożytniczy narażone są zarówno drzewa rosnące w lasach, grodach, działkach, jak i w miastach.

Z pracy przeglądowej Suchocka, *Człowiek i środowisko*, **2011**, 35(3–4), 19–34 wiadomym jest, że roślinność miejska jest stale narażona na działanie czynników antropogenicznych. Takie niekorzystne i długotrwałe czynniki siedliskowe wywołują u roślin stres i znacznie obniżają ich odporność na choroby i infekcje, z których największe zagrożenia wywołuje infekcja grzybowa. Jej skutkiem jest biała lub brunatna zgnilizna drewna, prowadząca do obumierania roślin zainfekowanych. Z pracy przeglądowej Mayer i Staples, *Phytochemistry*, **2002**, 60(6), 551–565 wiadomym jest, że lakaza pełni funkcję ochronną wielu gatunków grzybów patogennych poprzez neutralizowanie fitoaleksyn i tanin; toksycznych substancji antybiotycznych wydzielanych przez komórki atakowanej rośliny.

Do powszechnie występujących patogenów roślin uprawnych wydzielających lakazę należą grzyby pleśniowe z rodziny twardnicowatych (*Sclerotiniaceae*). Przykładowo, z rozdziału w książce Pezet R., Pont, V., Hoang-Van, K. „*Enzymatic-detoxication of stilbenes by Botrytis cinerea and inhibition by grape berries proanthocyanidins*” edytowanej przez Verhoeff, K., Malathrakis, N.E., Williamson, B., „*Recent Advances in Botrytis Research*” Pudoc Scientific, Wageningen, 1992, str. 87–92, wiadomym jest, że jeden z nich, gronowiec szary (*Botrytis cinerea*), infekuje owoce, kwiaty i tkanki zielone co najmniej 235 gatunków roślin, wydzielając lakazę w celu detoksyfikacji związków fenolowych produkowanych przez system odpornościowy roślin.

Z artykułu Call i Mücke, *Journal of Biotechnology*, **1997**, 53(2–3), 163–202 wiadomym jest, że wrośniak różnobarwny (*Trametes versicolor*) jest jednym z najlepiej przebadanych i opisanych w literaturze grzybów białej zgnilizny. Lakaza z wrośniaka różnobarwnego (*T. versicolor*) charakteryzuje się największym potencjałem redoks i aktywnością wśród lakaz pochodzenia grzybowego. Jest ona komercyjnie dostępna przykładowo w firmie Sigma (nr kat. 3E429) i wykorzystywana, w reakcjach enzymatycznych. Znana jest pod przeszło siedemdziesięcioma synonimami naukowymi, a najpopularniejsze z nich to *Trametes versicolor*, *Coriolus versicolor* oraz *Polyporus vesicolor*.

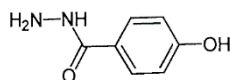
Z pracy przeglądowej Strong i Claus, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **2011**, 41, 373–434 znane są liczne przemysłowe zastosowania lakaz pochodzenia grzybowego obejmujące delignifikację drewna, detoksyfikację i bioremediację wód przemysłowych oraz gleby. Z innej pracy przeglądowej Witayakran i Ragauskas, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2009**, 357(9), 1187–1209 znane są liczne zastosowania lakaz w syntezie. Chociaż w licznych publikacjach i opracowaniach literaturowych ujawniono mediatory lakaz przydatne w reakcjach utlenienia mniej reaktywnych związków organicznych, to opracowanie obojętnych dla roślinności, ludzi i świata zwierzęcego inhibitorów lakaz doprowadzi tak do wzrostu wydajności produkcji na zainfekowanych roślinach w rolnictwie, sadownictwie i w przemyśle leśnym jak i poprawy jakości ogrodów i roślin ozdobnych.

Z prac przeglądowych Strong i Claus, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **2011**, 41, 373–434 oraz Couto i Herrera, *Current Enzyme Inhibition*, **2006**, 2(4), 343–352 znane są liczne sposoby inhibitowania lakaz. Inhibicja lakaz może nastąpić w wyniku zmiany konformacyjnej enzymu na drodze chemicznej modyfikacji jego reszt aminokwasowych, oraz w wyniku kompleksowania jonów miedzi. Aktywność lakaz może być zmniejszona poprzez zakłócenie wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia elektronów w wyniku oddziaływania z niskocząsteczkowymi anionami wiążącymi się do centrów miedziowych w miejscu aktywnym enzymu.

Aktywność lakaz hamują szkodliwe dla roślinności, zwierząt i ludzi cyjanki i halogenki metali; jony metali biogennych takie jak Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} oraz Pb^{2+} ; redukujące związki organiczne takie jak 2-merkaptetanol zawierające uciążliwe ugrupowanie tiolowe będące silnym wodoroforem; jony karboksylanowe zakłócające naturalny odczyn żywej komórki; azydki, EDTA i deferoksamina silnie wiążące mikroelementy roślinne; kwasy tłuszczowe stanowiące pożywkę dla mikroorganizmów symbiotycznych z grzybami patogennymi; trudnodostępny kwas kojowy sprzyja w zwalczaniu mikroorganizmów spowalniających rozwój grzybów patogennych; czwartorzędowe sole amoniowe, które są detergentami zakłócającymi naturalne procesy biologiczne. Inhibicja lakazy w obecności halogenków oraz czynników redukujących i chelatujących, podana jako IC_{50} , stężenie substancji, które wywołuje 50% inhibicji, mieści się w przedziale odpowiednio 0,02–1600 mM oraz 0,005–25 mM.

Celowym jest zatem wskazanie skutecznego, nieuciążliwego i bezpiecznego dla ludzi oraz świata zwierzęcego i roślinnego inhibitora lakazy.

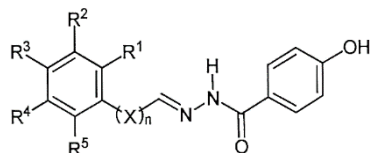
Istotą wynalazku jest zastosowanie hydrazynu kwasu 4-hydroksybenzoesowego o wzorze:



do inhibitowania lakazy.

Korzystnym jest zastosowanie hydrazynu kwasu 4-hydroksybenzoesowego do inhibitowania lakazy wrośniaka różnobarwnego.

Wynalazek dotyczy również zastosowania hydrazyno-hydrazonów pochodnych kwasu 4-hydroksybenzoesowego i aldehydów zawierających fragment aromatyczny, o wzorze ogólnym:



w którym R^1 , R^2 , R^3 , R^4 i R^5 oznaczają podstawniki pierścienia aromatycznego, przy czym R^1 oznacza H, OH albo OMe, R^2 oznacza H, OH, OMe, *t*-Bu, CH_2OH albo Ph, R^3 oznacza H, OH albo Me, R^4 oznacza H, OH, Me albo *t*-Bu, R^5 oznacza H albo OH, zaś X oznacza ugrupowanie $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ a n stanowi liczbę 0 lub 1, do inhibitowania lakazy.

Aprobatywnie jest zastosowanie hydrazyno-hydrazonów pochodnych kwasu 4-hydroksybenzoesowego i aldehydów zawierających fragment aromatyczny, określonych wzorem ogólnym, do inhibitowania lakazy wrośniaka różnobarwnego.

Równie korzystne jest zastosowanie hydrazyno-hydrazonów pochodnych określonych wzorem ogólnym, przy czym aldehyd zawierający fragment aromatyczny to aldehyd salicylowy zawierający jako podstawniki pierścienia aromatycznego grupę fenyłową Ph, metylową Me, *tert*-butylową *t*-Bu lub dodatkową grupę hydroksylową OH do inhibitowania lakazy.

Hydrazyn kwasu 4-hydroksybenzoesowego jak i stosowane aldehydy zawierające fragment aromatyczny są łatwo dostępne i zarówno one same jak i ich iminowe pochodne (hydrazyno-hydrazony) są nieuciążliwe dla środowiska naturalnego wykazując jednocześnie skuteczność w inhibitowaniu lakazy, w tym lakazy wrośniaka różnobarwnego.

Przedmioty wynalazku zostały przedstawione w przykładzie realizacji.

Analizowano efektywność hydrazynu kwasu 4-hydroksybenzoesowego i hydrazyno-hydrazonów pochodnych kwasu 4-hydroksybenzoesowego z aldehydami zawierającymi fragment aromatyczny: z dialdehydem (1,3-diformylo-2,4,6-trihydroksybenzenem) oraz z monoaldehydami (benzaldehydami i aldehydem 3-fenylpropionowym) względem lakaz, oceniając ich wpływ na aktywność lakazy z *Trametes versicolor* w reakcji z syringaldazyną wyznaczając stałą inhibicji K_i oraz mechanizmy inhibitowania. Dla porównania badano również efektywność kwasu 4-hydroksybenzoesowego oraz azydku sodu, który jest znanym, ale toksycznym inhibitorem lakaz.

Wyznaczanie K_i

Aktywność enzymatyczną wyznaczono na podstawie pomiarów absorbancji przy użyciu spektrofotometru **UV-Vis** Shimadzu UV-1800. Lakaza z *Trametes versicolor* (wrośniaka różnobarwnego) w formie zliofilizowanej (Sigma-Aldrich) została rozpuszczona w buforze Mclvaina o pH=5,2 i była użyta bezpośrednio w badaniach kinetycznych. Syringaldazyna (azyne 4-hydroksy-3,5-dimetoksybenzaldehydu, Sigma-Aldrich) oraz testowane związki wykorzystano do reakcji po uprzednim rozpuszczeniu w metanolu (POCH, CZDA). Pomiar aktywności lakazy prowadzono w jednorazowych kuwetach ze szkła akrylowego (Radiolab) przy długości fali 525 nm ($\epsilon_0=65000 \text{ cm}^{-1}$) monitorując postęp reakcji co 0,5 s do momentu maksymalnego przereagowania syringaldazyny, w temperaturze 298K. Objętość 1,5 cm^3 roztworu enzymu o stężeniu 3,0 mg/dm^3 (0,045 μM) preikubowano przez 10 min. z 0,10 cm^3 metanolu lub metanolowego roztworu inhibitora, odpowiednio dla reakcji enzymatycznej bez inhibitora lub z inhibitorem w co najmniej czterech stężeniach. Reakcję zapoczątkowano przez dodanie 0,100 cm^3 syringaldazyny o odpowiednim stężeniu. Uwalnianie barwnego, produktu monitorowano spektrofotometrycznie do czasu osiągnięcia maksymalnej absorbancji. Szybkość reakcji obliczono z przyrostu absorbancji w czasie zakładając kinetykę reakcji rzędu pierwszego. Mechanizmy inhibicji oraz wartości K_i określono na podstawie wykresów Lineweavera-Burka wykorzystując aplikację Microsoft Office Excel. Stwierdzono,

że badane iminowe pochodne hydrazynu kwasu 4-hydroksybenzoesowego są inhibitorami kompetycyjnymi lub akompetycyjnymi. Hydrazyn kwasu 4-hydroksybenzoesowego oraz azydek sodu są inhibitorami niekompetycyjnymi.

Stała K_i dla inhibitorów kompetycyjnych, akompetycyjnych i niekompetycyjnych była obliczana z równań odpowiednio 1, 2 oraz 3:

$$(1) \ 1/V_0 = K_M/V_{max} \cdot (1 + [I]/K_i) \cdot 1/[S] + 1/V_{max}$$

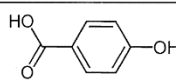
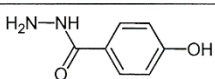
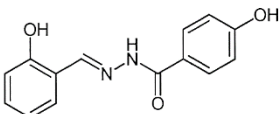
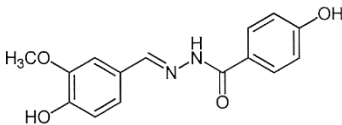
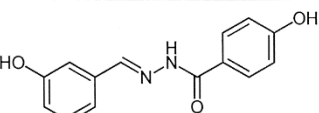
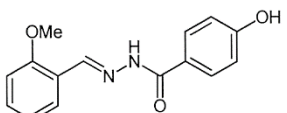
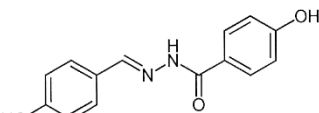
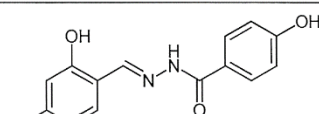
$$(2) \ 1/V_0 = K_M/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max} \cdot (1 + [I]/K_i)$$

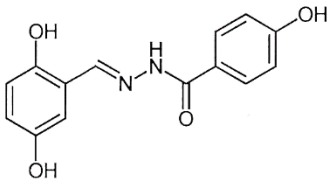
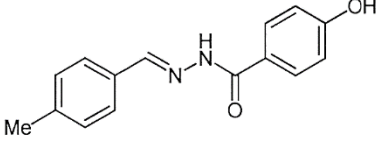
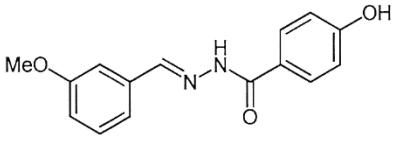
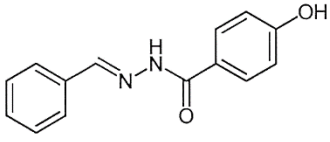
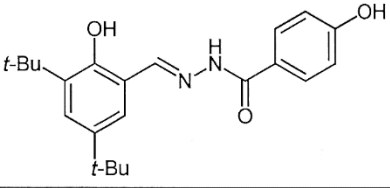
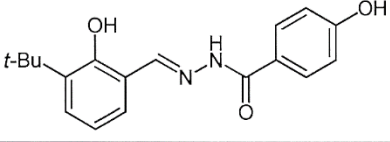
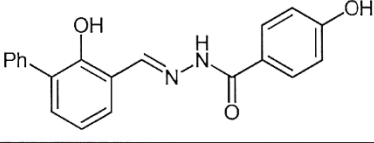
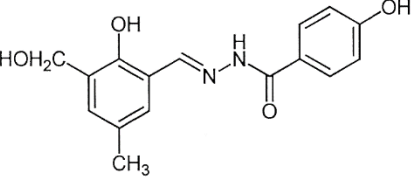
$$(3) \ 1/V_0 = K_M/V_{max} \cdot (1 + [I]/K_i) \cdot 1/[S] + 1/V_{max} \cdot (1 + [I]/K_i)$$

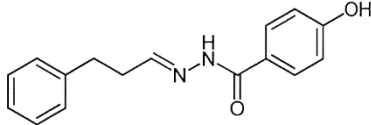
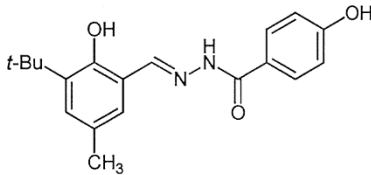
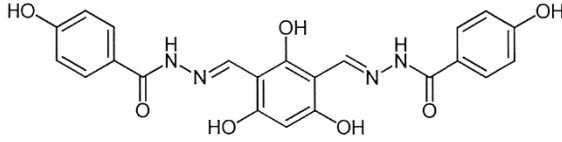
K_i – stała inhibicji, K_M – stała Michealisa-Menten, V_{max} – maksymalna szybkość reakcji, V_0 – szybkość reakcji, $[S]$ – stężenie substratu, $[I]$ – stężenie inhibitora.

Reakcje wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach, uzyskując wartość błędów S.D. $\leq 7,0\%$. W tabeli 1 przedstawiono wyniki oznaczeń stałej inhibicji K_i wobec lakazy z wrośniaka różnobarwnego dla hydrazynu kwasu 4-hydroksybenzoesowego (4HBAH) oraz jego iminowych pochodnych.

Tabela 1. Wyniki oznaczeń stałej inhibicji K_i wobec lakazy wrośniaka różnobarwnego

Struktura	K_i [μ M]	Typ inhibicji
 4HBA	–	Brak inhibicji
 4HBAH	3632 \pm 658	niekompetycyjna
	674 \pm 102	kompetycyjna
	250,5 \pm 38	kompetycyjna
	2396 \pm 334	kompetycyjna
	1064 \pm 18	kompetycyjna
	638 \pm 35	akompetycyjna
	939 \pm 30	akompetycyjna

Struktura	K_i [μ M]	Typ inhibicji
	$7,1 \pm 1,4$	kompetycyjjna
	251 ± 26	kompetycyjjna
	$416 \pm 1,5$	kompetycyjjna
	1468 ± 58	kompetycyjjna
	$19,4 \pm 1,3$	kompetycyjjna
	$22 \pm 5,9$	kompetycyjjna
	$26 \pm 6,9$	kompetycyjjna
	1287 ± 101	kompetycyjjna

Struktura	K_i [μM]	Typ inhibicji
	1919 ± 163	akompetycyjna
	$26,9 \pm 3,4$	kompetycyjna
	$194 \pm 5,75$	niekompetycyjna

K_i dla azydku sodu NaN_3 posiada wartość $8,0 \pm 1,4 \mu\text{M}$ (inhibicja niekompetycyjna).

Kwas 4-hydroksybenzoesowy nie wykazuje zdolności inhibitowania lakazy wrośniaka.

Analiza potwierdziła natomiast wysoką zdolność hamowania przez pozostałe badane substancje aktywności lakazy wrośniaka różnobarwnego wydzielanej do zainfekowanej rośliny.

Stała niekompetycyjnej inhibicji hydrazidu kwasu 4-hydroksybenzoesowego, określonego wzorem 1, wynosi $3,63 \text{ mM}$.

Stała inhibicji, wszystkich zbadanych hydrazydo-hydrazonów pochodnych 4HBA i zawierających fragment aromatyczny aldehydów, określonych wzorem ogólnym 2, mieści się w przedziale od $2,396 \text{ mM}$ do $7,1 \mu\text{M}$.

I tak hydrazydo-hydrazony pochodne 4HBA i aldehydów salicylowego (2-hydroksybenzaldehydu) i wanilinowego (4-hydroksy-3-metoksybenzaldehydu) wykazują zdolność hamowania aktywności lakazy wrośniaka różnobarwnego na poziomie odpowiednio $674 \mu\text{M}$ i $250 \mu\text{M}$.

Największą efektywność inhibitowania wykazywały hydrazydo-hydrazony pochodne kwasu 4-hydroksybenzoesowego i aldehydu salicylowego zawierającego w pierścieniu benzenowym grupy hydroksylową, fenyłową lub alkilową, które konkurują o centrum aktywne enzymu z syringaldazyną, wykazując stałą inhibicji rzędu od $26,9 \mu\text{M}$ do $7,1 \mu\text{M}$.

W tej grupie związków hydrazydo-hydrazony pochodne 4HBA i aldehydów salicylowych zawierających podstawnik, w wolnej pozycji obok grupy hydroksylowej, ze stabilizującym ugrupowaniem fenyłowym lub *tert*-butylowym, cechuje zdolność hamowania lakazy na poziomie w przedziale od $26,9 \mu\text{M}$ do $19,4 \mu\text{M}$.

Szczególnie wysoką zdolność kompetycyjnego hamowania lakazy, opisaną stałą inhibicji $7,1 \mu\text{M}$, wykazuje iminowa pochodna aldehydu 5-hydroksysalicylowego. Wartość ta jest porównywalna do znanego niekompetycyjnego inhibitora lakazy NaN_3 ($K_i = 8,0 \mu\text{M}$).

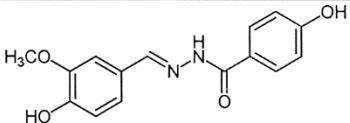
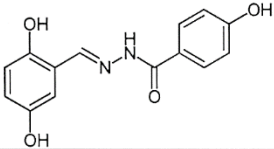
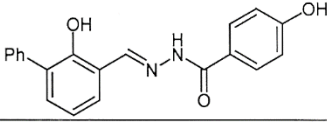
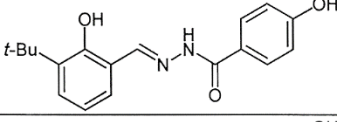
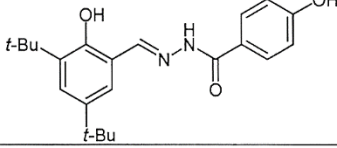
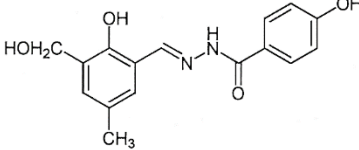
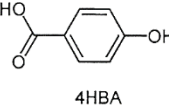
Dla wybranych hydrazydo-hydrazonów pochodnych 4HBA analizowano poziom fitotoksyczności w celu potwierdzenia ich nieuciążliwości dla środowiska naturalnego. Do oceny toksyczności hydrazonów wykorzystano mikrobiotest Phytotestki™ zgodnie z protokołem rekomendowanym przez producenta MicroBioTest Inc. z modyfikacją dotyczącą użytego rodzaju nasion. W badaniach wykorzystano nasiona lnu (*Linum usitatissimum* L.), oraz nasiona słonecznika (*Helianthus annuus* L.). Płytką kontrolną zawierała nasiona jednego gatunku rośliny, kiełkujące na podłożu zawierającym $6,25\%$ (v/v) roztwór metanolu w wodzie. Płytką testową zawierała nasiona tego samego gatunku, kiełkujące na podłożu zawierającym $50 \mu\text{M}$ odpowiedniej pochodnej 4HBA hydrazydo-hydrazonu rozpuszczonej w $6,25\%$ (v/v) wodnego roztworu metanolu. Płytki inkubowano w pozycji pionowej w temperaturze 25°C , bez dostępu światła, przez 5 dni. Każdy eksperyment przeprowadzono na 10-ciu nasionach lnu i 6-ściu nasionach słonecznika w trzech powtórzeniach. Do ilościowej oceny fitotoksyczności hydrazydo-hydrazonów pochodnych 4HBA wykorzystano indeks germinacji (kiełkowania), GI (%) obliczony na podstawie pomiarów kiełkowania i wczesnego wzrostu korzeni według wzoru:

$$GI, \% = (Gs \cdot Ls) / (Gc \cdot Lc) \cdot 100\%$$

gdzie Gs i Ls są odpowiednio zdolnością kiełkowania nasion (%) i długością korzenia rośliny dla testowanego związku oraz Gc i Lc są odpowiadającymi im wartościami dla próby kontrolnej.

Parametr GI jest kategoryzowany jako: dla wartości GI < 90% – efekt inhibicji, GI (90–110%) – brak efektu i GI > 110% – efekty stymulacji, jak przedstawiono w pracach naukowych Czerniawska-Kusza I. i Kusza G., *Environmental Monitoring Assessment*, **2011**, 179, 113–121 oraz Baran A, i Tarnawski M., *Ecotoxicol Environmental Safety* **2013**, 98, 19–27. W tabeli 2 przedstawiono wyniki oznaczeń indeksu germinacji dla kwasu 4-hydroksybenzoowego oraz niektórych hydrazydo-hydrazonów pochodnych 4HBA.

Tabela 2. Wyniki oznaczeń indeksu germinacji (GI, %) dla rośliny jednoliściennej, *Linum usitatissimum* L. (len) oraz dwuliściennej, *Helianthus annuus* L. (słonecznik) w obecności badanych związków.

Hydrazydo-hydrazony pochodne 4HBA	<i>Linum usitatissimum</i> L.	<i>Helianthus annuus</i> L.
	GI, %	
	96 ±20	101 ±8
	93 ±9	85 ±25
	106 ±6	87 ±15
	118 ±6	89 ±14
	91 ±10	88 ±19
	123 ±7	96 ±7
	109 ±9	93 ±25

Wyniki potwierdzają brak lub bardzo niską toksyczność hydrazydo-hydrazonów pochodnych 4HBA aldehydami zawierającymi fragment aromatyczny, co potwierdzono na przykładzie rośliny jednoliściennej *Linum usitatissimum* L (len) i dwuliściennej *Helianthus annuus* L. (słonecznik). Dla rośliny jednoliściennej wartość indeksu GI zawiera się w przedziale 91–123%, natomiast dla dwuliściennej 85–101%.

Kwas 4-hydroksybenzoowy powszechnie występuje w szlakach metabolicznych roślin i jest neutralny dla tej grupy organizmów co znalazło odzwierciedlenie w wynikach fitotoksyczności wartości GI 109 i 93%, odpowiednio dla lnu i słonecznika.

Hydrazydo-hydrazon pochodna 4HBA i aldehydu salicylowego zawierającego podstawnik alkilowy w pozycji 2 i 5 odpowiednio grupy CH₂OH ii CH₃ powoduje stymulację wzrostu lnu GI 123% oraz pozostaje bez wpływu na słonecznik GI 96%.

Hydrazydo-hydrazon pochodna 4HBA i aldehydu salicylowego alkilowanego w pozycji C-2 grupą *tert*-butylową powoduje stymulację wzrostu lnu GI 118% oraz bardzo słaby efekt hamowania w przypadku słonecznika GI 89%.

Hydrazydo-hydrazon pochodna 4HBA i aldehydu 2,5-dihydroksybenzoesowego pozostaje bez wpływu na roślinę jednoliścienną GI 93%, i powoduje bardzo słaby efekt zahamowania wyrażony wartością GI 85% dla rośliny dwuliściennej.

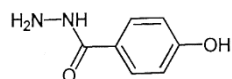
Hydrazydo-hydrazon pochodna 4HBA i aldehydu wanilinowego pozostaje bez wpływu GI rośliny jednoliściennej i dwuliściennej, dla których wartości wynoszą odpowiednio 96 i 101%.

Otrzymywanie hydrazonów

Jedną część molową aldehydu rozpuszcza się w mieszaninie alkoholu metylowego lub alkoholu etylowego (roztwór 95% w wodzie) zawierającej kwas octowy w ilości do 0,10 ml/mmol aldehydu, następnie dodaje się równomolową ilość hydrazydu kwasu 4-hydroksybenzoesowego. Uzyskaną mieszaninę ogrzewa się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika do przereagowania substratów, po czym lotne składniki usuwa się pod ciśnieniem około 20 hPa, suszy na powietrzu w wyniku uzyskuje się ilościowo wysokiej czystości produkt w postaci (*E*) hydrazonu pochodnej aldehydów benzoesowych i hydrazydu kwasu 4-hydroksybenzoesowego, który rekrystalizuje się z metanolu lub z etanolu lub z dodatkiem wody, uzyskując wysokiej czystości hydrazony.

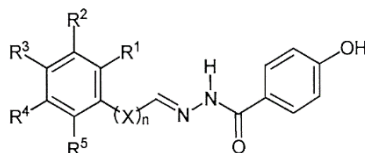
Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie hydrazydu kwasu 4-hydroksybenzoesowego o wzorze (1):



do inhibitowania lakazy.

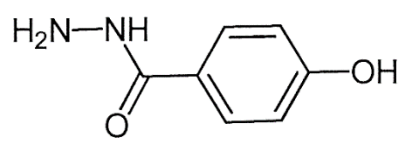
2. Zastosowanie hydrazydu według zastrz. 1 do inhibitowania lakazy wrośniaka różnobarwnego.
3. Zastosowanie hydrazydo-hydrazonów pochodnych kwasu 4-hydroksybenzoesowego i aldehydów zawierających fragment aromatyczny, o wzorze ogólnym (2):



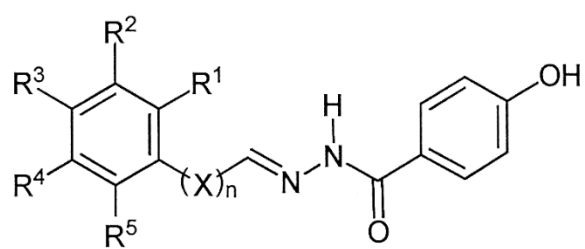
którym R^1 , R^2 , R^3 , R^4 i R^5 oznaczają podstawniki pierścienia aromatycznego, przy czym R^1 oznacza H, OH albo OMe, R^2 oznacza H, OH, OMe, *t*-Bu, CH_2OH albo Ph, $4-HOC_6H_4(C=O)NHN=CH$, R^3 oznacza H, OH albo Me, R^4 oznacza H, OH, Me albo *t*-Bu, R^5 oznacza H albo OH, zaś X oznacza ugrupowanie CH_2-CH_2 a n stanowi liczbę 0 lub 1, do inhibitowania lakazy.

4. Zastosowanie hydrazydo-hydrazonów pochodnych określonych wzorem ogólnym (2) według zastrz. 3 jako inhibitorów lakazy wrośniaka różnobarwnego.
5. Zastosowanie hydrazydo-hydrazonów pochodnych określonych wzorem ogólnym (2) według zastrz. 3, przy czym zawierający fragment aromatyczny aldehyd to aldehyd salicylowy, zawierający jako podstawniki w pierścieniu aromatycznym grupę fenyłową Ph, metylową Me, *tert*-butylową *t*-Bu lub dodatkową grupę hydroksylową OH do inhibitowania lakazy.

Rysunki



Wzór 1



Wzór ogólny 2