

dr hab. inż. Anna Gliszczyńska-Świąto, prof. nadzw. UEP  
Katedra Technologii i Analizy Instrumentalnej  
Wydział Towaroznawstwa  
Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Józwik-Dolęby „Antyutleniające właściwości mieszanin wybranych związków fenolowych”**

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (pismo z dnia 26 października 2016 r.).

Praca doktorska pt. „Antyutleniające właściwości mieszanin wybranych związków fenolowych” została przygotowana przez mgr Małgorzatę Józwik-Dolębę w Zakładzie Metod Chromatograficznych pod kierunkiem naukowym prof. dra hab. Andrzeja Dawidowicza.

Badania prowadzone przez mgr Małgorzatę Józwik-Dolębę wpisują się w nurt badań podstawowych dotyczących oddziaływań pomiędzy związkami wykazującymi właściwości przeciwutleniające i wpływem tych oddziaływań na wypadkową aktywność przeciwutleniającą mieszaniny. Interakcje zachodzące pomiędzy przeciwutleniaczami mogą obniżyć lub podwyższyć ich efektywną dawkę lub stężenie w danym produkcie spożywczym lub kosmetycznym. Efektywna dawka lub stężenie przeciwutleniaczy może zależeć nie tylko od ich rodzaju i ilości w mieszaninie, ale również od właściwości matrycy, w której działają, stężenia jonów wodorowych i temperatury. Żywność czy produkty kosmetyczne to układy wieloskładnikowe, zatem przewidzenie typu wzajemnych interakcji pomiędzy związkami biologicznie czynnymi zawartymi w produkcie bywa bardzo trudne, często niemożliwe. Badanie interakcji pomiędzy związkami, w układach modelowych, może okazać się jednak przydatne przy projektowaniu nowych produktów. Zagadnienia dotyczące interakcji pomiędzy związkami chemicznymi, w tym przeciwutleniaczami, są stale aktualne i wymagają wielu badań, tym bardziej, że wiedza w tym zakresie jest wciąż niepełna.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 251 stron. W pracy wykorzystano 293 pozycje literaturowe, przy dominującym udziale publikacji anglojęzycznych; publikacje z okresu 2006-2016 stanowią około 36%. Autorka cytuje 1 publikację, której jest współautorką. Szkoda, że w pracy nie zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim.

Praca składa się ze wstępu, trzech rozdziałów stanowiących część literaturową, celu pracy, pięciu rozdziałów tzw. części doświadczalnej, podsumowania i spisu literatury. Pracę kończy spis zastosowanych w pracy skrótów. Tytuły niektórych podrozdziałów części doświadczalnej są bardzo rozbudowane. Moim zdaniem Autorka niepotrzebnie próbowała w nich zawrzeć zbyt dużo informacji.

## Ocena merytoryczna pracy

**Część teoretyczna.** Praca doktorska mgr Małgorzaty Jóźwik-Dolęby dotyczy aktywności przeciwutleniaczy fenolowych zarówno syntetycznych, jak i pochodzenia naturalnego. W badaniach Doktorantka wykorzystwała roztwory pojedynczych związków oraz mieszaniny dwu- lub trójskładnikowe: butylohydroksyanizolu (BHA) i butylohydroksytoluenu (BHT), BHT i tymolu oraz roślinnych związków fenolowych (kwasu chlorogenowego, kwasu ferulowego, kwasu kawowego, kwasu galusowego, kwercetyny, karwakrolu i tymolu). Studia literaturowe zostały przedstawione na 59-ciu stronach maszynopisu. Autorka jasno przedstawiła zagadnienia stanowiące tło problemów poruszanych w badaniach własnych. Omówiła rodzaje, źródła i mechanizmy powstawania wolnych rodników oraz ich znaczenie w organizmie człowieka, podział i mechanizmy działania przeciwutleniaczy oraz przykłady badań na temat interakcji pomiędzy przeciwutleniaczami. Ponadto przybliżyła wybrane metody oznaczania aktywności przeciwutleniającej.

Część literaturowa nasunęła pewne uwagi i pytania.

- Podrozdział 1.2.2. *Źródła i mechanizmy powstawania wolnych rodników*, podpunkt *Rozkład żywności i leków* (str. 21) nie zawiera żadnych informacji odnośnie do leków. Tak szczegółowy opis mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz mikrosomalnego łańcucha transportu elektronów, jak opisano na str. 23-28 mógłby być ograniczony do ogólnych informacji bez szkody dla pracy.
- W wielu miejscach brakuje odnośnika literaturowego, np. na str. 16 informacje na temat rodnika monotlenku azotu, rodnika ditlenku azotu nie są opatrzone żadnym odnośnikiem literaturowym. Podobnie na str. 32, drugi i trzeci akapit, str. 34-36 oraz 44. Uwaga ta dotyczy również informacji zawartych w części doświadczalnej, które nie są powszechnie znane (np. na str. 134, 177, 182).
- Str. 37. Doktorantka napisała o podziale przeciwutleniaczy ze względu na (1) pochodzenie, (2) przynależność do określonej grupy związków chemicznych, (3) mechanizm neutralizacji rodników oraz (4) na naturalne i sztuczne. Ten ostatni podział też odnosi się do pochodzenia, zatem mógł być omówiony wraz z podziałem przeciwutleniaczy ze względu na pochodzenie, tym bardziej, że Doktorantka omawia w nim przeciwutleniacze naturalne takie, jak flawonoidy i kwasy polifenolowe, natomiast w podrozdziale 2.2.4. *Antyutleniacze naturalne i sztuczne* są tylko cztery słowa na temat przeciwutleniaczy naturalnych. Ponadto, zupełnie osobny podrozdział został poświęcony pierwiastkom o właściwościach przeciwutleniających (2.2.2).
- Wśród przeciwutleniaczy egzogennych Doktorantka wymienia kwas foliowy (str. 41), ale w ogóle nie wspomina o jakiegokolwiek aktywności przeciwutleniającej tego związku. Proszę o komentarz.
- Na str. 43 Doktorantka napisała, że „w pewnych okolicznościach flawonoidy wykazują niestety także zdolność generowania wolnych rodników, działając jak pro-oksydanty – w ten sposób mogą indukować stres oksydacyjny. Istnieją także wyniki badań sugerujące niekorzystną rolę flawonoidów w procesie karcenogenezy”. W literaturze można znaleźć wyniki badań wskazujące na

możliwą pozytywną rolę proutleniających właściwości niektórych flawonoidów w profilaktyce nowotworów. Czy Autorka mogłaby wskazać przykłady flawonoidów i ich korzystnej roli jako prooksydantów?

- W podrozdziale 3.2.1.1. *Podział ze względu na rodzaj techniki wykorzystywanej do pomiaru właściwości antyoksydantu* (str. 58-59) w punkcie 2. Doktorantka wymienia *Metody spektroskopowe i kolorymetryczne*, a wśród nich spektrofotometrię w podczerwieni, spektrometrię mas i magnetyczny rezonans jądrowy. Na czym polega wykorzystanie tych technik w badaniu właściwości przeciwutleniających?
- Str. 62, Tabela 8. „Stosując  $\beta$ -karoten lub krocynę można powyższą metodę dostosować do nowej technologii, takiej jak zastosowanie mikroplitek”. Stosowanie mikroplitek nie jest technologią.
- Str. 63, Tabela 9. „Metoda z zastosowaniem odczynnika DPPH [(2,2-difenylo-1-1-pikrylhydrazyl)]”. 2,2-Difenylo-1-1-pikrylohydrazyl to stabilny rodnik, pomiar aktywności przeciwutleniającej z wykorzystaniem rodnika DPPH\* to nie technika tylko metoda. Nie zgadzam się też z Autorką, że metodą DPPH można oznaczyć wyłącznie właściwości antyutleniające związków hydrofobowych.
- Str. 65, podrozdział 3.1.2.3. *Podział ze względu na badanie produktów reakcji utleniania określonych struktur komórkowych*. O jakie struktury komórkowe Autorce chodziło? Co oznaczanie całkowitej ilości (nie liczby, jak pisze Autorka) związków fenolowych, metoda TBARS (ang. thiobarbituric acid reactive substances), czyli oznaczanie zdolności do hamowania utleniania lipidów poprzez reakcję z kwasem tiobarbiturowym lub oznaczanie zawartości sprzężonych dienów ma wspólnego ze strukturami komórkowymi?
- Str. 67. Dlaczego metoda TEAC, która została opisana w podrozdziale 3.2.1.2. *Podział ze względu na mechanizmy reakcji zmiatania wolnych rodników* jako metoda ABTS, została ponownie opisana jako metoda TEAC w podrozdziale 3.2.1.5. *Inne metody*?
- Str. 69. Szkoda, że Doktorantka tylko wymieniła metodę chemiluminescencyjną, bez krótkiego opisu zasady tej metody.

Za cele rozprawy Autorka przyjęła:

- określenie rodzaju oddziaływań pomiędzy BHA i BHT, przeciwutleniaczami syntetycznymi stosowanymi w produkcji żywności i kosmetyków, oraz wpływu stężenia tych przeciwutleniaczy, stężenia jonów wodorowych, temperatury i rodzaju rozpuszczalnika na aktywność przeciwutleniającą ich mieszaniny,
- określenie rodzaju oddziaływań pomiędzy wybranymi związkami fenolowymi pochodzenia syntetycznego lub roślinnego (BHT i tymolem, tymolem i karwakrolem, kwasem chlorogenowym i kwercetyną, kwasem ferulowym, kawowym i galusowym) oraz wpływu stężenia tych

przeciwutleniaczy i rodzaju rozpuszczalnika (woda, etanol lub ich mieszanina) na aktywność przeciwutleniającą ich mieszaniny.

W celu realizacji zaplanowanych badań Autorka zastosowała różne metody oznaczania aktywności przeciwutleniającej: metodę  $\beta$ -karotenową, ABTS, DPPH, FRAP i CUPRAC oraz techniki chromatograficzne (wysokosprawną chromatografię cieczową i chromatografię gazową), aby określić zmiany jakościowe i ilościowe badanych przeciwutleniaczy w mieszaninie.

**Część doświadczalna** zawiera opis modelowych układów pomiarowych i metod wykorzystanych w badaniach oraz wyniki badań i ich dyskusję. Szkoda, że Autorka nie przedstawiła na wykresie/schemacie wykorzystanych technik/metod badawczych wraz z logiką ich prowadzenia w odniesieniu do poszczególnych mieszanin. Takie ujęcie ułatwiłoby ocenę prawidłowości przyjętych rozwiązań.

Część doświadczalna jest bardzo obszerna (liczy 151 stron) i stanowi prezentację wyników realizacji przyjętych w celu pracy problemów badawczych i ich szczegółową dyskusję. Otrzymane wyniki są przedstawione w 23 tabelach i na 137 wykresach. Prezentację uzyskanych wyników kończy rozdział *Podsumowanie*. W rozdziale tym Autorka jeszcze raz, w skrócie, wymienia najważniejsze obserwacje wynikające z przeprowadzonych badań.

Liczba wykonanych przez Autorkę oznaczeń oraz uzyskanych wyników doświadczalnych jest duża. Nie jest możliwe omówienie ich wszystkich, nawet w sposób syntetyczny, zatem ograniczę się do najważniejszych osiągnięć i uwag.

Do najważniejszych osiągnięć mgr Małgorzaty Jóźwik-Dolęby zaliczyłabym:

- samo podjęcie badań dotyczących interakcji pomiędzy przeciwutleniaczami. Jak wspomniano wcześniej, badania w tym zakresie są wciąż niewystarczające,
- określenie typu oddziaływań pomiędzy BHA i BHT oraz wpływu różnych czynników (stężenia przeciwutleniaczy, stężenia rodnika, rodzaju rozpuszczalnika, temperatury, pH) na wypadkową aktywność przeciwutleniającą mieszaniny tych przeciwutleniaczy i typ ich oddziaływania;
- porównanie aktywności przeciwutleniającej mieszaniny BHA/BHT mierzonej różnymi metodami,
- podjęcie badań nad oddziaływaniem roślinnych związków fenolowych w układach dwu- i trójskładnikowych.

Część doświadczalna rozprawy również nasunęła pewne uwagi i pytania, być może wyłącznie o charakterze polemicznym.

#### **Uwagi i pytania ogólne**

- Czy badane przeciwutleniacze (BHA, BHT i roślinne związki polifenolowe) były dobrze rozpuszczalne w zastosowanych rozpuszczalnikach (czy sprawdzono ich rozpuszczalność, jeśli tak, to w jaki sposób)? Czy sprawdzono wzajemny wpływ badanych przeciwutleniaczy w układach dwu-

i trójskładnikowych na ich rozpuszczalność? Te pytania są tym bardziej zasadne, iż Autorka stwierdziła na str. 147, że w przypadku  $\text{CCl}_4$  jedynie BHA był w nim całkowicie rozpuszczalny. Ponadto, w przypadku niektórych związków Autorka zauważyła, że dalsze zwiększanie ich stężenia w układzie nie zwiększało ich aktywności przeciwutleniającej. Wnioski i obserwacje przedstawione w pracy odnośnie do porównania właściwości przeciwutleniających różnych związków, ale w tym samym rozpuszczalniku mogą być zupełnie inne, jeśli uwzględnimy ich rzeczywiste stężenie w próbce wynikające z ich rozpuszczalności.

- Na str. 94 i 103 Doktorantka wspomina o zakresie stężeń badanych przeciwutleniaczy, które należało ograniczyć eliminując zbyt niskie (zbyt niska czułość urządzenia pomiarowego) oraz zbyt wysokie (zbyt szybka reakcja zmiatania rodnika/kationorodnika). Moim zdaniem nadal niektóre zastosowane stężenia były zbyt wysokie, np. mieszanina BHT/BHA o stężeniu po 0,5 mg każdego związku/ml metanolu, BHT/BHA 0,5/0,25 mg/ml metanolu, stężenia zastosowane przy określaniu wpływu pH na aktywność przeciwutleniającą (Rys. 109 i 110). Brak prostoliniowego charakteru zmian mierzonych wielkości (% inhibicji) od stężenia przeciwutleniaczy wskazuje na zbyt wysokie stężenie i raczej takie stężenia powinny zostać pominięte. W moim odczuciu wszystkie wyniki dotyczące % inhibicji na poziomie 80-90% mogą budzić wątpliwości, wynikające ze zbyt wysokiego stężenia przeciwutleniacza. W wielu układach, w których stężenie badanych przeciwutleniaczy jest zbyt wysokie, typ interakcji określony jako antagonizm może również budzić wątpliwości. Zwiększanie stężenia przeciwutleniaczy poza zakres możliwych pomiarów spektrofotometrycznych (zbyt niska lub zbyt wysoka absorbcja) uniemożliwia prawidłową interpretację uzyskanych wyników. Ponadto, prawidłowe określenie typu interakcji metodą sumowania indywidualnych efektów i porównywania ich z efektem działania mieszaniny jest możliwe w przypadku zależności liniowych.
- Doktorantka w swoich badaniach stosowała nie tylko różne stężenia BHT i BHA, ale również ich różne stosunki wagowe w mieszaninie, co utrudnia porównanie niektórych wyników. Dlaczego np. przy badaniu wpływu stężenia BHT/BHA na ich aktywność przeciwutleniającą mierzoną różnymi metodami nie zachowano niezmienności ich stosunku wagowego?
- Doktorantka generalnie stosowała 100  $\mu\text{l}$  pojedynczego związku lub ich mieszaniny, ale zdarzają się układy, w których zastosowała 60  $\mu\text{l}$  lub 90  $\mu\text{l}$ , co również utrudnia bezpośrednie porównanie niektórych wyników.
- W jaki sposób w pomiarach dotyczących wpływu temperatury na właściwości przeciwutleniające badanych przeciwutleniaczy utrzymywano temperaturę pomiaru od 15 do 35°C? Jak w pozostałych pomiarach utrzymano temperaturę 25°C?

- BHA i BHT to przeciwutleniacze stosowane głównie w układach tłuszczowych. Szkoda, że poza metodą  $\beta$ -karotenową, Autorka nie wykorzystwała chociaż jednej metody/sposobu badania skuteczności przeciwutleniaczy w tłuszczach czy w emulsji.
- W pracy brakuje opisu metod statystycznych. Wartości średnie zamieszczone w Tabelach 12, 13 i 14 powinny być podane wraz z odchyleniem standardowym. Dlaczego nie badano istotności różnic między mierzonymi a teoretycznymi średnimi (poza mieszaninami trójskładnikowymi)? W kilku przypadkach, bez analizy istotności różnic między średnimi, można mieć wątpliwości czy efekt jest antagonistyczny, jak podaje Autorka, czy raczej addytywny, np. wyniki pokazane na rys. 17, 20 (punkt odpowiadający 20  $\mu$ l BHT i 80  $\mu$ l BHA), 22, 23 (punkt odpowiadający 80  $\mu$ l BHT i 20  $\mu$ l BHA), 30 i inne. O istotności lub braku istotności różnic pomiędzy wynikami Doktorantka pisze dopiero od str. 180. Jaki test zastosowała, na jakim poziomie istotności ( $\alpha=0,05$  czy innym)? W jakim programie wykonała obliczenia?

#### **Pozostałe uwagi i pytania**

- Str. 76. Molowy współczynnik absorpcji jest wielkością mianowaną a nie bezwymiarową. Czy  $\epsilon$  dla Troloksu wynosi 689,482 L/mol·cm czy 689 482 L/mol·cm?
- Tabela 16 i str. 140. Symbol  $R^2$  odnosi się do współczynnika determinacji. Współczynnik korelacji oznacza się symbolem  $R$  (lub  $r$ ) i jest on pierwiastkiem ze współczynnika determinacji.
- Na wykresach brakuje znaczników osi, co bardzo utrudnia analizę wyników. Szkoda, że dane wykorzystane do przygotowania wykresów wraz z wartościami SD nie zostały zamieszczone w pracy w postaci elektronicznego załącznika, co z kolei umożliwiłoby wyjaśnianie wątpliwości nasuwających się przy interpretacji niektórych wyników.
- W kilku miejscach pracy Autorka napisała o procesie odbudowy jednego przeciwutleniacza przez drugi. Moim zdaniem bardziej odpowiednie byłoby używanie stwierdzenia „proces regeneracji formy rodnikowej przeciwutleniacza....”.
- Dlaczego na rysunkach 66-71, opisujących wpływ temperatury na % inhibicji rodników DPPH\* zastosowano wykres liniowy ze znacznikami, a nie punktowy z linią trendu (podobnie jak na rys. 64 i 65)?
- Metoda HPLC. Jak zidentyfikowano DPPH-H oraz rodnik BHA\* i BHT\*?
- Przy jakiej długości fali rejestrowano chromatogramy pokazane na rysunkach 34, 35 i 118?
- Dlaczego zależność % inhibicji od stężenia BHA ( $c=0,25$  mg/ml) na rysunkach 27 i 29 są znacząco różne? To samo dotyczy BHT ( $c=0,5$  mg/ml) na rysunkach 26 i 28.
- Str. 112, rysunek 37 jest nieczytelny. Szkoda, że Autorka nie przedstawiła na osobnych rysunkach mieszanin BHT/BHA o identycznym składzie objętościowym składników, aby zobrazować, że

rzeczywiście początkowe stężenie rodnika nie ma wpływu na przebieg krzywych kinetyki zmiatania rodnika DPPH\*.

- Na str. 114 Doktorantka podała, że „początkowa absorbancja rodnika (DPPH\*) wpływa na ocenę właściwości antyutleniających pojedynczych składników (zwłaszcza BHA), jak i ich mieszaniny”. „Wraz ze wzrostem początkowej absorbancji rodnika obserwuje się zmniejszenie efektu antagonistycznego”. Analizując wyniki pokazane na Rys. 38 i 39, a dotyczące wyników uzyskanych przy absorbancji roztworu rodnika 0,36 i 0,707, można mieć wątpliwości, czy stwierdzenia Autorki jest prawdziwe. W tym miejscu wykazanie istotności różnic między średnimi wynikami byłoby konieczne.
- Uważam, że w Tabeli 16 wystarczyłoby podać wyniki dotyczące % inhibicji z dokładnością do jedności.
- Str. 146. „Właściwości przeciwutleniające kwasu galusowego są silniejsze w n-propanolu niż w metanolu”. To stwierdzenie jest prawdziwe dla troloksu (Rys. 73), natomiast dla kwasu galusowego jedynie w temperaturze 15°C. Z rys. 72 wynika, że aktywność przeciwutleniająca kwasu galusowego w temperaturze 35°C jest wyższa w metanolu niż w n-propanolu.
- Str. 148. Trzecie stwierdzenie odnosi się wyłącznie do metanolu jako rozpuszczalnika badanych związków.
- Str. 167. „Należy jednak zauważyć, że literaturowe informacje na temat wpływu pH na antyutleniający potencjał antyoksydantów żywności są nieliczne. Pojedyncze wzmianki mówią o badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem związków modelowych. Zupełny brak jest natomiast prac dotyczących wpływu pH na antyutleniający potencjał mieszanin antyoksydantów”. Pozwolę sobie zwrócić uwagę Doktorantki na prace Tyrakowskiej i in., Lemańskiej i in., Borkowskiego i in., Muzolf i in., Enko i in. na temat wpływu pH na aktywność różnych fenolokwasów, flawonoidów oraz mieszanin tych związków w postaci ekstraktów, mierzonych metodą ABTS. Z tych badań wynika, że aktywność przeciwutleniająca kwasów hydroksybenzoesowych, kwasów cynamonowych, katechin, antocyjanów i innych flawonoidów lub też ekstraktów z herbat roślinie wraz ze wzrostem pH. Autorzy tych prac podjęli również próby wyjaśnienia, z czego wynika ten wzrost.
- Str. 171. Czy istnieje jakieś wyjaśnienie nietypowego przebiegu linii obrazującej wpływ stężenia BHT/BHA na aktywność przeciwutleniającą w pH 7,0 (Rys. 107).
- Pod Rys. 121 (str. 193) podano, że stężenie tymolu i karwakrolu wynosiło po 4,0 mg/ml, a w Tabeli 21 (str. 194) – po 4,5 mg/ml. Czy to pomyłka, czy zastosowano różne stężenia?
- Bez analizy statystycznej wyników podanych w Tabeli 21 (str. 194) i 22 (str. 195) można mieć wątpliwości (tekst na str. 193), czy istnieje statystycznie istotna różnica pomiędzy wartościami 13% i 11% oraz 8% i 6% (Tabela 21), jak również 64% i 65% oraz 60% i 61% (Tabela 22).

- Czy wartości „T” w Tabeli 24, to obliczone statystyki testu t-Studenta? Jeśli tak, to oznacza się je małą literą „t”. Ile wynosiła liczba stopni swobody (n-1)? Jaki przyjęto poziom istotności różnic? Szkoda, że Doktorantka nie podała chociaż wartości tabelarycznej testu t-Studenta.

W pracy znalazło się również kilka nieścisłości lub błędów, na przykład:

- W kilku miejscach pracy symbol rodniaka znajduje się po stronie atomu wodoru zamiast tlenu (str. 15, 19, Rys. 2).
- W kilku miejscach pracy brakuje symbolu rodniaka lub kationorodniaka odpowiednio przy rodniku DPPH\* i kationorodniku ABTS\*\*+. Ponadto, ABTS\*\*+ to kationorodnik a nie rodnik (np. tytuł Tabeli 12 na str. 106).
- Pikrylohydrazyl a nie pikrylhydrazyl.
- Str. 8. „Ponieważ wymienione produkty zawierają przeważnie kilka przeciwutleniających substancji, czego prostą konsekwencją jest ich jednoczesna obecność w organizmie człowieka, dlatego też rzeczą naturalną jest nurt badawczy, którego jednym z celów jest odpowiedź na pytanie jak mają się własności antyutleniające poszczególnych utleniaczy do antyutleniających własności ich mieszanin”, powinno być: „.....jak mają się własności antyutleniające poszczególnych antyutleniaczy do antyutleniających własności ich mieszanin.”
- Str. 14, Tabela 3. Rodnik alkoksyłowy ma symbol RO\*, a nie ROO\* (to rodnik peroksyalkoksyłowy/nadtlenkowy), wodoronadtlenków ROOH nie oznacza się z symbolem rodniaka.
- Str. 23. „Jednoelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do wody w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym.....”, zapewne chodzi o jednoelektronowe etapy redukcji.
- Str. 45. „Tworzenie ochronnej powierzchni pomiędzy fazą wodną zawierającą czynniki prooksydacyjne a lipolową .....”, powinno być lipofilową.
- Str. 65. Powinno być „kwas linolenowy” a nie „kwas linoleinowy”.
- Str. 90. Podpis pod Rys. 16 informuje, że wartości SD zostały pominięte, podczas gdy na tym rysunku pokazano rozrzut wyników.
- Str. 107. „Z analizy danych zebranych w Tabeli 13 wynika, że zużycie BHT, w porównaniu do systemu pomiarowego zawierającego mieszaninę BHT/BHA, jest znacznie większe ....”. Powinno być „....znacznie mniejsze”.
- Rys. 18 i 33 (str. 92) dotyczą wyników uzyskanych dla tych samych stężeń BHT (0,1 mg/ml) i BHA (0,05 mg/ml) oraz tego samego rozpuszczalnika (metanol). To samo dotyczy Rys. 17 i 30.
- Str. 120. W podpisie rysunku 49 powinno być  $c_{BHT}=4$  mg/ml.



- Na rys. 66-67 oraz 69-71 pokazano wpływ temperatury na procent inhibicji rodników DPPH\* przez BHT i BHA w różnych rozpuszczalnikach (metanolu, etanolu, n-propanolu, octanie etylu i dioksanie). Na końcu podpisu pod tymi rysunkami błędnie podano „Rozpuszczalnik – metanol”.
- Str. 145. „Należy w tym miejscu zauważyć, że zdolność do tworzenia klasterowych struktur w alkoholach maleje wraz ze wzrostem długości alifatycznego rodnika”. Alifatycznego rodnika czy alifatycznego łańcucha alkoholu?
- Str. 192. „Należy w tym miejscu podkreślić, że zaprezentowane wyniki wydają się bardziej wiarygodne, gdyż dotyczą znacznie szerszego zakresu stężeń kwasu chlorogenowego i kwercetyny niż te w cytowanej literaturze”. Powinno być: „.....tymolu i karwakrolu...”.
- Str. 197. Powinno być „resweratrol” a nie „reserwatrol”.
- Str. 203-204. Aktywność przeciwutleniająca mieszaniny trójskładnikowej kwas galusowy/ferulowy/kawowy przedstawiona została na Rys. 125, a nie na Rys. 126.
- W kilku miejscach pracy efekt addytywny określono jako addytywistyczny.

Praca zawiera nieliczne błędy interpunkcyjne, literowe i redakcyjne, np. tzw. „zlepki literowe”, kilka błędów stylistycznych oraz niezręcznych sformułowań czy stwierdzeń, których nie przytaczam.

W mojej opinii założone cele dysertacji zostały osiągnięte. Mgr Małgorzata Józwick-Dolęba wykazała się znajomością tematu i metod analitycznych umożliwiających realizację celów pracy oraz umiejętnością analizy i interpretacji wyników. Podjęła próbę wyjaśnienia obserwowanych efektów korzystając z danych literaturowych. Świadczy to o jej dobrym przygotowaniu merytorycznym. Należy podkreślić duży wkład pracy włożony przez Doktorantkę w realizację zaplanowanych badań. Przytoczone uwagi krytyczne nie umniejszają wartości naukowej pracy. Wskazanie pewnych mankamentów i nieścisłości może pomóc Doktorantce w takim opracowaniu wyników, które nie będzie budzić wątpliwości recenzentów przy ich publikacji.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki, Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Wydziału Chemii o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Józwick-Dolęby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Anna Gliszczyńska-Świątło*  
dr hab. inż. Anna Gliszczyńska-Świątło, prof. nadzw. UEP

Poznań, dnia 20 grudnia 2016 r.