



Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Dr hab. Anna Bujacz, prof. PŁ

Instytut Biochemii Technicznej
Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź
Tel. 042-6314337, 042-6314394
e-mail: anna.bujacz@p.lodz.pl

Łódź, 16.07.2019 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Urszuli Izabeli Maciołek
pt. „Rola cząsteczek kwercetyny w chemii supramolekularnej”**

Praca doktorska Pani Urszuli Izabeli Maciołek obejmuje badania z zakresu chemii supramolekularnej. Promotorem pracy jest Prof. dr hab. Anna Kozioł z Zakładu Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, a promotorem pomocniczym jest dr. Ewaryst Mendyk z Laboratorium Analitycznego tego samego Wydziału. Obiektem badań prowadzonych przez doktorantkę są ko-kryształy kwercetyny i kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego. Ten szeroko rozpowszechniony polifenol z grupy hydroksyflawonów występuje w wielu owocach, warzywach i ziołach. Związek ten, jako lek, jest uważany za bezpieczny, gdyż praktycznie nie wykazuje niepożądanych efektów toksycznych i można go dawkować w wysokich stężeniach, ale z uwagi na słabą rozpuszczalność w wodzie ma ograniczone stosowanie. Wykazuje on szerokie spektrum aktywności biologicznej, m.in. właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. Kwercetyna posiada dwa układy aromatyczne: podwójny pierścień kromonu (ang. *Chromone* lub *1,4-benzopyrone*) i pierścień fenyłowy. Obecność dwóch układów aromatycznych i aż pięciu grup hydroksylowych, jednej ketonowej oraz zdolność do zmiany konformacji pierścienia dihydroksyfenylowego względem płaskiego ugrupowania kromonu, powoduje że związek ten jest idealny (choć trudny) do badań nad tworzeniem ko-kryształów różnego typu.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska jest bardzo obszerna, liczy prawie 300 stron, co wynika z bardzo dużego zakresu przeprowadzonych badań, ale i ogromnej liczby zamieszczonych ilustracji, wykresów i tabel. Spis literatury wraz z suplementem zajmuje 55 stron. Praca ma klasyczny układ, składa się z dziewięciu rozdziałów obejmujących: wstęp, cel pracy, część literaturową, część doświadczalną, wyniki badań, podsumowanie i wnioski, literaturę oraz suplement.

Do pracy załączony został wykaz dorobku naukowego Doktorantki oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim.

Część literaturowa jest napisana bardzo profesjonalnie i świetnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w pracy. Jest podzielona na dwa podrozdziały zatytułowane: Chemia supramolekularna oraz Kwercetyna – struktury krystaliczne. W części poświęconej chemii supramolekularnej Doktorantka przedstawia nomenklaturę związków supramolekularnych, typy oddziaływań i inżynierię krystaliczną. Opisuje wyczerpująco syntony supramolekularne i ich hierarchie. Wszystkie te informacje chronologicznie obrazują rozwój chemii supramolekularnej od jej zdefiniowania do chwili obecnej. Opis wieloskładnikowych kryształów molekularnych zawiera definicje oraz ich podział. Pokazane są przejrzyste schematy graficzne obrazujące ko-kryształy molekularne, jonowe, ich solваты oraz kompleksy inkluzyjne. Omówione są sposoby syntezy ko-kryształów oraz metody ich badania. Autorka przytacza zastosowania ko-kryształów w produkcji potencjalnych leków, środków agrochemicznych, materiałów nieliniowych optycznie oraz do tworzenia nowych materiałów wybuchowych, pokazując, że chemia supramolekularna to nie tylko dziedzina czysto teoretyczna.

Do tej części mam trzy drobne uwagi, wyrażające moje indywidualne poglądy i nieumniejszające bardzo wysokiej oceny tego rozdziału pracy. W zdaniu na str. 19 „Zrozumienie tych oddziaływań umożliwiło rozwiązanie struktury białek i kwasów nukleinowych, zakończone w roku 1953 przełomowym odkryciem struktury helisy DNA przez Jamesa Watsona i Francisca Cricka (Watson i Crick, 1953).” - użyłabym raczej sformułowania – „zaproponowanie struktur...” ponieważ w tym czasie były to tylko propozycje strukturalne oparte pośrednio na wcześniejszych przesłankach eksperymentalnych (strukturach aminokwasów i dipeptydów w pracy Paulinga i zdjęć dyfrakcyjnych włókien DNA w przypadku Watsona i Cricka - wykorzystanych zresztą bez zgody autorki Rosalind Franklin). Ponadto przydałby się odnośnik do pracy Paulinga (Linus Pauling, Robert B. Corey, and H. R. Branson. The Structure of Proteins, Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain *Proc Natl Acad Sci USA*. 1951 Apr; 37(4): 205–211). Druga uwaga dotyczy nie wymienienia ko-kryształu CL-20 z oktożenem HMX w stosunku molowym 2:1, który ma jeszcze większe znaczenie od ko-kryształu TNT-CL-20 (1:1). Trzecia uwaga dotyczy Tabeli 3.2.1.2. i kolejnych, które pokazują jak uniwersalnym ko-formerem jest kwercetyna, ale mimo, że Doktorantka utworzyła te tabele korzystając z bazy CSD, to nie podała do niej odnośnika literaturowego (C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot and S. C. Ward, The Cambridge Structural Database, *Acta Cryst.* (2016). B72, 171-179). Dodatkowo, w tabelach przy kodach struktur brakuje odnośników do publikacji, które znajdują się na końcu pracy w spisie literatury przy odpowiednich publikacjach - o czym jednak czytający dowiaduje się dopiero przeglądając literaturę. Można było dodać te odnośniki pod tabelkami.

Część doświadczalna zawiera spis materiałów i odczynników oraz opisy poszczególnych procedur eksperymentalnych. Główną techniką badawczą, użytą do scharakteryzowania otrzymanych ko-kryształów, była rentgenowska analiza strukturalna. Doceniam bardzo pracowitość

Doktorantki, która oprócz badań strukturalnych, które same są bardzo czasochłonne, rozszerzyła analizy o spektroskopie w podczerwieni FTIR-ATR i spektroskopie Ramana. Widma te zostały wykonane nie tylko dla uzyskanych ko-kryształów ale również dla związków wyjściowych. Dla większości związków i ko-kryształów wykonała analogiczne porównanie dyfraktogramów uzyskanych za pomocą proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej. Te podstawowe badania zostały uzupełnione o cały szereg innych analiz takich, jak: oznaczenia zawartości metali i niemetalu oraz wody, a jeśli było to uzasadnione innych rozpuszczalników, a także mikroskopię optyczną, skaningową mikroskopię elektronową oraz analizę termogravimetryczną. Część doświadczalna obejmuje również opis otrzymywania kryształów bezwodnej kwercetyny, syntezy ko-kryształów kwercetyny i kompleksów kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego, w tym solwotermalną syntezę kompleksów kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego. Obliczenia teoretyczne umożliwiły pani Urszuli Maciołek oszacowanie energii oddziaływań pomiędzy jonami w kompleksach sodu z kwasem kwercetyno-5'-sulfonowym. Ta część pracy opisana jest bardzo zwięźle, w stylu publikacyjnym, ale przy takiej ilości przeprowadzonych badań była to jedyna metoda zapobiegająca nadmiernemu rozszerzeniu pracy.

Rozdział zatytułowany „Wyniki Badań” rozpoczyna się od scharakteryzowania formy krystalicznej kwercetyny i ko-formerów ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań międzycząsteczkowych w sieci krystalicznej, w celu identyfikacji potencjalnych syntonów supramolekularnych. Do analizy oddziaływań użyto w większości danych dostępnych w CSD, ale dla niektórych z nich, do których dane literaturowe nie były dostępne albo były słabej jakości, Doktorantka wyznaczyła strukturę krystaliczną samodzielnie. Charakterystyka ta obejmuje: bezwodną kwercetynę (QUE), 4-(1-benzofuran-2-yl)pirydynę (BZFP), 4-(5-etylo-1-benzofuran-2-yl) pirydynę (EBZFP) i 3,3'-dimetoksy-4,4'-diaminobifenyl (O-DIA).

W pracy opisanych jest dziewięć ko-kryształów kwercetyny, które można podzielić na 4 grupy.

1) typowe ko-kryształy:

- bis(4-(1-benzofuran-2-yl)pirydyna) kwercetyna (2:1) QUE:BZFP
- bis(4-(5-etylo-1-benzofuran-2-yl)pirydyna) kwercetyna (2:1) QUE:EBZFP
- bis(fenantrolina) kwercetyna (2:1) QUE:FEN
- o-dianizydyna kwercetyna (1:1) QUE:O-DIA

2) solwatowane ko-kryształy kwercetyny z ko-formerami:

- solwat ko-kryształu tris-acetonitryl kofeina kwercetyna (3:1:1) QUE:KOF
- solwat ko-kryształu etanol kwas pirydyno-3-sulfonowy kwercetyna (1:1:1) QUE:PYRSUL

3) solwatowane ko-kryształy soli:

- monohydrat chlorku ketaminy kwercetyna (1:1:1:1) QUE:KethCl

ko-kryształem akwasoli jest natomiast:

- kwercetyna : bis(diklofenako)heptaakwadisód (1:2:7:2) QUE:NaDik

4) solwatowany kompleks:

- monoetanol monohydrat etanol[bis(kwercetyna)]naproksenosód (1:1:1:2:1:1) QUE:NaNap

Wszystkie określone struktury krystaliczne są udokładnione do bardzo dobrych parametrów, co jest pochodną bardzo dobrej jakości otrzymanych kryształów, jak i do perfekcji opanowanego przez Doktorantkę warsztatu badawczego zarówno pomiarowego, jak i obliczeniowego. Ponadto dla wszystkich otrzymanych ko-kryształów kwercetyny wykonano szereg analiz, które pozwoliły na określenie ich właściwości i skorelowanie z budową wewnętrzną. Morfologię kryształów zarówno kwercetyny, jak i ko-formerów zbadano za pomocą mikroskopu optycznego, wykonując fotografie w świetle spolaryzowanym przechodzącym i/ lub odbitym, techniką pogłębionej ostrości EDF, a dodatkowo wykonano również obrazowanie za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej próbek napylonych cienką warstwą przewodzącą stopu Au/Pd przy niskim napięciu przyspieszającym 5 kV.

Zestawienie dyfraktogramów proszkowych poszczególnych ko-formerów tworzących ko-kryształ z dyfraktogramami otrzymanych ko-kryształów pokazuje jak zmieniają się ogólne parametry sieci przestrzennej. Ponadto dyfraktogramy te zostały porównane z dyfraktogramami wygenerowanymi na podstawie rozwiązanych struktur monokrystalicznych. Analogiczną procedurę zastosowano, analizując widma w podczerwieni techniką FTIR-ATR i widma Ramana. Pozwoliło to na powiązanie oddziaływań występujących w fazie stałej, odpowiedzialnych za tworzenie kryształów dla ko-formerów i ko-kryształów. Szczególnie pozycje pasm drgań związanych z tworzeniem wiązań wodorowych mają wysoką wartość analityczną, a wyznaczone struktury krystaliczne umożliwiły ich jednoznaczne przypisanie.

Analiza termiczna z zastosowaniem techniki TG-DSC, przeprowadzona w atmosferze helu, umożliwiła wyznaczenie stabilności termicznej i przebieg rozkładu termicznego dla ko-kryształu i związków je tworzących. Zestawienie temperatur topnienia kwercetyny, ko-formerów z nią ko-krystalizujących i otrzymanych ko-kryształów pokazuje, że ko-kryształy mają nieco wyższą temperaturę topnienia od ko-formera, co świadczy o wzroście liczby korzystnych energetycznie oddziaływań w tej formie krystalicznej. Przeprowadzenie tak kompleksowych badań wymagało od Doktorantki „tytanicznej” pracy. Wszystkie opracowania są przejrzyste i dowodzą, że kwercetyna dzięki swym właściwościom jest bardzo dobrym materiałem do tworzenia ko-kryształów różnego typu.

Kolejną grupą związków badaną przez Doktorantkę były kompleksy kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego z jonami Na^+ i K^+ , z dodatkowymi ligandami obojętnymi oraz hydratu soli z jonem NH_4^+ . Jako pierwszy otrzymano dihydrat diakwakwercetyno-5'-sulfonianu sodu – I, dla którego przeprowadzono pełne badania analogiczne do opisanych powyżej. Rozbudowana została metodyka analizy termicznej kompleksu I, dla którego wykonano pomiary zarówno w atmosferze powietrza, jak i w atmosferze helu oraz przeprowadzono analizę produktów gazowych uwalnianych w obu wariantach pomiarowych. W związku I – $[\text{NaQSA}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – cząsteczki wody ze sfery koordynacyjnej jonów sodu i sieci krystalicznej zostały wymienione na drodze syntezy

solwotermalnej na cząsteczki odpowiednio acetonu (II) i DMSO (III). Otrzymane kompleksy mają różną stechiometrię, w kompleksie II związały się dwie cząsteczki acetonu – $[\text{NaQSA Ace}] \cdot \text{Ace}$, a w kompleksie III - trzy cząsteczki DMSO – $[\text{NaQSA DMSO}] \cdot 2\text{DMSO}$. W wyniku reakcji HQSA z niedomiarem wodorotlenku sodu i po krystalizacji produktu z mieszaniny etanol-woda, uzyskano kryształ kwaśnego organokompleksu z sodem, IV – $[\text{Na}(\text{QSA})_2(\text{H}_2\text{O})_2][(\text{EtOH})_2\text{H}]$. Dla kompleksów I – IV wykonano analizy, które zestawiono i opisano razem, co ułatwia porównanie tej grupy związków. Analizy te obejmują widma w podczerwieni i Ramana, analizę termiczną oraz desolwatację kryształów w próżni. Dodatkowo metodami chemii obliczeniowej przeanalizowano rozkład ładunków na atomach w kryształach I.

Analogiczną metodykę badawczą, jak dla dihydratu diakwakwercetyno-5'-sulfonianu sodu, zastosowano dla diakwakwercetyno-5'-sulfonianu potasu – V. Dla tego związku wykonano rentgenowską analizę strukturalną i kompleksową analizę termiczną kompleksu zarówno w atmosferze powietrza, jak i helu, połączoną z analizą uwalnianych produktów gazowych. Kompleks V został wybrany jako substrat do wymiany molekuł rozpuszczalnika. Obojętne ligandy, tzn. cząsteczki wody ze sfery koordynacyjnej jonów potasu, wymieniono na drodze syntezy solwotermalnej na cząsteczki odpowiednio acetonu (VI) i DMSO (VII). Kompleks VII otrzymano w postaci monokrystalicznej, odpowiedniej do badań dyfrakcyjnych, natomiast VI tworzy tylko fazę mikrokryystaliczną. Dla kompleksów V – VII, zawierających kation potasowy, wykonano analizy analogiczne jak dla kompleksów I - IV, zawierających kationy sodu. Niezmiernie cennym i nowatorskim elementem tej części badań jest określenie sfer koordynacyjnych metali w badanych kompleksach i wykazanie, jak mogą się one różnić w zależności od rodzaju sieci i użytego rozpuszczalnika.

Dihydrat kwercetyno-5'-sulfonianu amonu oznaczony jako kompleks VIII jest kolejnym kryształem o charakterze hydratowanej soli, ze stechiometrią kation:anion 1:1. Dla tego kryształu wykonano analizy podobne, jak dla pozostałych siedmiu, jednak odmienny charakter kationu amoniowego sprawił, że struktura ta różni się w pewnym stopniu od kompleksów zawierających kationy sodu i potasu. Jednocześnie zostało wykazane, że stałym elementem strukturalnym wszystkich struktur krystalicznych jest orientacja cząsteczek kwercetyny sprzyjająca kontaktom układów aromatycznych w motywie $\pi \cdots \pi$ *stacking*.

Badania w pracy doktorskiej pani Urszuli Maciołek mają w większości charakter chemiczno-strukturalny, jednakże zostały one wzbogacone również o aspekt biologiczny. Doktorantka przeanalizowała potencjalne właściwości przeciwnowotworowe kwercetyny i kompleksów kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego, badając stopień zahamowania proliferacji komórek nowotworowych nabłonka jelita grubego HT-29. Na podstawie uzyskanych danych obliczono wartość IC_{50} , a uzyskane wyniki wykazały zdolność kompleksów I i V do hamowania podziałów komórek nowotworowych, a kompleks V wykazał 3-krotnie wyższą aktywność przeciw proliferacyjną w porównaniu do kwercetyny.

Z jednej strony doceniam bardzo wartość naukową pracy oraz ogrom wykonanych eksperymentów i analiz, jednakże nadmierna drobiazgowość Doktorantki nie pozwoliła Jej spojrzeć na przeprowadzone badania z dystansem, który umożliwiłby lepsze pogrupowanie niektórych zagadnień, co poskutkowałoby zmniejszeniem objętości pracy. Natomiast przeniesienie tabel zawierających dane krystalograficzne, parametry z pomiaru i udokładniania struktur do suplementu stanowi utrudnienie dla czytelnika. Znacznie łatwiej analizowałoby się struktury poszczególnych ko-kryształów gdyby dane te były umieszczone w pobliżu części opisowej. Ale jest to uwaga edycyjna nie merytoryczna.

W podsumowaniu stwierdzam, że pani mgr Urszula Maciołek przedstawiła rozprawę doktorską posiadającą wysokie walory poznawcze. Uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią niewątpliwie nowość naukową. Doktorantka wykazała wiedzę z zakresu badań strukturalnych i umiejętności wykorzystania uzyskanych informacji strukturalnych w celu wyjaśnienia właściwości fizycznych kryształów supramolekularnych. Dysponuje pogłębioną wiedzą w dziedzinie krystalografii, jak również innych zastosowanych metod analitycznych. Dysponuje solidnym i różnorodnym warsztatem eksperymentalnym, a stosując różnorodne metody wykazała się dużą konsekwencją w dążeniu do postawionego naukowego celu.

Dorobek naukowy Doktorantki jest imponujący, szczególnie konferencyjny. W dużej części dotyczy również innych zagadnień naukowych niż badania opisane w pracy doktorskiej. Mam nadzieję, że Doktorantka wykorzysta zaprezentowany w pracy materiał badawczy i razem z Promotorami pracy opublikuje w najbliższym czasie serie prac w czołowych czasopismach z zakresu chemii supramolekularnej.

Stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Urszuli Maciołek spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003r. Nr 65 poz 595 z późniejszymi zmianami), oraz rozporządzeniem Ministra Edukacji Narodowej z 5 grudnia 2005 roku w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, w związku z czym z całym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie Pani magister Urszuli Maciołek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na nowatorstwo i jakość przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy chciałabym przedstawić Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej wniosek o wyróżnienie pracy.

