



Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach  
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy  
Instytut Chemii

Dr hab. inż. Barbara Gawdzik, prof. UJK  
Instytut Chemii  
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy  
Uniwersytet Jana Kochanowskiego  
ul. Świętokrzyska 15G  
25-406 Kielce  
tel. 41 3497016  
email: b.gawdzik@ujk.edu.pl

Kielce 4.02.2018

### **Ocena pracy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Koziół**

pt. „Synteza nowych tlenowych i azotowych pochodnych terpenoidowych”

Podstawę opracowania stanowi uchwała Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej z dnia 22 listopada 2017 r.

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Koziół była synteza nowych tlenowych i azotowych pochodnych terpenoidowych, zbadanie ich aktywności przeciwbakteryjnej, deterentnej oraz właściwości zapachowych.

Rozpowszechnione w przyrodzie pochodne terpenoidowe to dobrze znana grupa związków organicznych o zróżnicowanych właściwościach biologicznych. Terpeny wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, antyutleniające, cytotoksyczne i hamujące podziały komórek nowotworowych. Wśród tej grupy połączeń znajdują się również takie, które znalazły zastosowanie jako komponenty zapachowe i smakowe.

Podjęcie przez mgr inż. Agatę Koziół badań nad syntezą nowych pochodnych terpenoidowych, określeniem ich właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej



jest w pełni uzasadnione, szczególnie wobec potrzeb opracowania nowych efektywnych metod otrzymywania analogów strukturalnych związków biologicznie czynnych, jak również w celu poznania korelacji między strukturą a właściwościami biologicznymi.

Recenzowana praca doktorska zredagowana zgodnie z przyjętymi standardami, liczy 113 stron i zasadniczo podzielona jest na dwie części: literaturową i doświadczalną. Praca zawiera wykaz cytowanej literatury, na który składają się 134 prace związane z tematyką dysertacji. Ponadto Autorka zamieściła wykaz dorobku naukowego jak również podsumowanie, w którym przedstawione zostały wnioski.

Przystępując do oceny merytorycznej pracy stwierdzam, że mgr inż. Agata Koziół zrealizowała postawione cele pracy, które zostały zaprezentowane dopiero na stronie 42, choć w mojej opinii powinny zostać sprecyzowane we wstępie. Ponadto ważną i integralną część dysertacji stanowią badania aktywności biologicznej zsyntezowanych połączeń jednak ten aspekt nie znalazł odzwierciedlenia w tytule.

Część literaturową poprzedza wykaz stosowanych w pracy skrótów oraz nazw systematycznych mikroorganizmów, roślin i owadów, a także wstęp. W tej części pracy Doktorantka scharakteryzowała połączenia terpenoidowe, w kolejnych rozdziałach, opisując monotereny, terpenoidy z ugrupowaniem laktonowym, oksymy. Na podstawie przeglądu literatury przedstawiła ich naturalne źródła pozyskiwania oraz aktywność biologiczną: przeciwnowotworową, przeciwdrobnoustrojową w tym antybakteryjną i antygrzybiczą, przeciwzapalną, antyfidantną, a dla wybranych połączeń monoterpenoidowych przedstawiła właściwości zapachowe. Ostatni rozdział tej części pracy został poświęcony naturalnym pochodnym o działaniu inhibitującym ureazy.

Przechodząc do uwag dotyczących tej części pracy, pragnę podkreślić, że w objaśnieniu zawartych w pracy skrótów nie zostały wymienione wszystkie, które były stosowane w dysertacji doktorskiej (np. brak jest m-CBA, HPU), zatem właściwszym wydaje się zatytułowanie tego zestawienia: objaśnieniem najważniejszych lub wybranych w pracy skrótów. Autorka nie stosuje chronologicznej numeracji opisywanych związków i tak na stronie 17 po tapsygarginie z kolejnym numerem 13 wymienia artemisyninę i partenolid, którym przypisuje odpowiednio numery 34 i 35. Ponadto choć struktura tapsygarginy 13 zamieszczona jest na Rysunku 4 tuż pod tekstem odnoszącym się do jej właściwościach antynowotworowych to strukturę artemisyniny 34 czytelnik znajduje dopiero na Rysunku 13 na stronie 29, natomiast



partenolidu **35** na Rysunku 14 na stronie 30. W tym miejscu proszę o wyjaśnienie czy prawidłowa nazwa pochodnej **34** brzmi: artemisyninia (jak znajdujemy na stronie 17) czy artemizynina (jak czytamy na stronie 29). Historia z brakiem chronologicznej numeracji opisywanych związków powtarza się również na stronach 37 i 38, na których monoterpeneoidowe związki zapachowe cytowane są w następującej kolejności:  $\beta$ -ocymen **57**, następnie wymienione są:  $\gamma$ -terpinen **63**,  $\alpha$ -pinen ( $\pm$ )-**64** i  $\beta$ -pinen, ( $\pm$ )-**65**, a następnie geraniol **61**, a potem z niższymi numerami opisywane są cytronellol ( $-$ )-**59**, linalol ( $-$ )-**58**, a w następnej kolejności cytronellal i cytral, które mają przypisane numery odpowiednio ( $+$ )-**60** i **62**. W mojej opinii dużym ułatwieniem w przypisywaniu nazwom zwyczajowym, właściwej struktury byłoby odniesienie w tekście pracy do rysunków, na których znajdują się wzory strukturalne opisywanych połączeń. Z przykrością muszę stwierdzić, że w rozdziale poświęconym właściwościom olfaktorycznym wybranych monoterpeneoidowych połączeń, który przeczytałam z dużym zainteresowaniem, zabrakło przedstawienia charakterystyki zapachowej dla:  $\beta$ -mircenu **56** i  $\beta$ -ocymenu **57**, cytronellalu ( $+$ )-**60** i cytralu **62**, cytronellołu ( $-$ )-**59**, linalolu ( $-$ )-**58**, geraniolu **61**,  $\alpha$ -pinenu ( $\pm$ )-**64** i  $\beta$ -pinenu ( $\pm$ )-**65**, choć podane są nazwy olejków, w składzie których są one dominującymi składnikami. Ponadto na stronie 17 Autorka dysertacji cytuje z numerem [45] pracę naukową Rivero i współpracowników, jednak pod wskazanym [45] numerem czytelnik znajdzie publikację, której autorami są: S. M. Kupchan, D. C. Fessler, M. A. Eakin, T. J. Giacobbe. Natomiast publikacja Rivero i współpracowników figuruje w Bibliografii pod numerem [47]. Doktorantka jeszcze kilkakrotnie w ten sam sposób wprowadza czytelnika w błąd odsyłając go do innej niż zacytowana w tekście pracy pozycji literaturowej.

Podsumowując uważam, że publikacje, na podstawie których Doktorantka zredagowała część literaturową dobrane są prawidłowo i dobrze wprowadzają czytelnika w problematykę badawczą pracy doktorskiej.

Część poświęconą omówieniu wyników badań własnych i część doświadczalną mgr inż. Agata Kozieł rozpoczyna do przedstawienia celu pracy, którym jest synteza tlenowych pochodnych terpenoidowych i niejako uprzedzając fakty podaje tu liczbę otrzymanych związków (20 pochodnych tlenowych terpenoidowych, w tym siedem nowych związków **85**, **86**, **88**, **92**, **93**, **95** i **96**) choć dobrze byłoby te dane zaprezentować wyłącznie w podsumowaniu.



„Równoległym” celem pracy Doktorantka nazywa badania biologiczne, które mogły być przecież zrealizowane dopiero po otrzymaniu odpowiednich połączeń terpenoidowych.

W pierwszym rozdziale poświęconym omówieniu badań własnych Doktorantka opisuje syntezę  $\alpha,\beta$ -nienasyconych estrów na drodze reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa, którą na stronie 43 błędnie nazywa „estryfikacją Hornera-Wadswortha-Emmonsa”. Reakcja Wittiga jak i jej modyfikacja - reakcja Hornera-Wadswortha-Emmonsa to z całą pewnością jedne z najlepszych metod syntezy alkenów. Wyjaśnienie mechanizmu jest chaotyczne i wymaga doprecyzowania. Mechanizm reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa polega na tym, że deprotonowane mocną zasadą fosfoniany dietylowe (a nie trietylowe) tworzą ylidy fosforowe, które jako czynniki nukleofilowe atakują grupę karbonylową aldehydu lub ketonu. Natomiast Doktorantka pisze, „że grupa karbonylowa ketonu reaguje z  $\alpha$ -metalicznym fosfonianem, (...) dając alken w postaci olefin oraz łatwo rozpuszczalne estry w rozpuszczalnikach organicznych lub kwasy fosforowe”. W tym miejscu proszę o zdefiniowanie „ $\alpha$ -metalicznego fosfonianu” a także jak należy rozumieć zdanie: „Jeśli  $R^2 = H$ , wówczas związki pośrednie mogą się przekształcać”. Ponadto stereoselektywność reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa jest poddyktowana rodzajem podstawnika obecnym przy atonie węgla ylidu fosforowego, a nie „początkowym dodawaniem karboanionu i zdolnością półproduktów do osiągnięcia równowagi w reakcji”. Kolejna uwaga dotyczy przeprowadzenia ketonu **70** w ester **75** zgodnie ze schematem 5 nie jest to możliwe, ponieważ Doktorantka zapomniała zamieścić na nim właściwy fosfonian. Reakcja redukcji dwóch spośród ośmiu zsyntezowanych  $\alpha,\beta$ -nienasyconych estrów etylowych **75** i **80** została opisana w sposób lakoniczny. Aby dowiedzieć się jaki reduktor został zastosowany w celu otrzymania alkoholi allilowych **87** i **88**, zainteresowany tym faktem jest zmuszony odszukać (czterdzieści trzy strony dalej) ogólną procedurę redukcji glinowodorkiem litu. Interesujący jest dla mnie powód dla, którego Doktorantka nie podjęła próby redukcji pozostałych sześciu  $\alpha,\beta$ -nienasyconych estrów **77**, **79**, **82**, **84**, **85** i **86**.

W wyniku znanego z literatury przegrupowania [3,3]-sigmatropowego alkoholi allilowych **87** i **88**, które były produktami redukcji oraz alkoholu **91** (niewiadomego pochodzenia) Doktorantka otrzymała  $\gamma,\delta$ -nienasycone estry **90**, **92** i **93**. Taki wybór substratów do przegrupowania Claisena prowadzonego metodą ortooctanową wymaga, jeśli nie uzasadnienia to przynajmniej krótkiego komentarza.



Kolejnym etapem badań eksperymentalnych była standardowa reakcja hydrolizy  $\gamma,\delta$ -nienasyconych estrów. Konsekwentnie i w tym przypadku Autorka nie wyjaśnia z jakich powodów zasadowej hydrolizie poddała tylko dwa estry **92** i **94** spośród trzech przez siebie zsyntezowanych. Polemizowałabym też, czy zastąpienie mieszaniny etanolowego roztworu KOH metanolowym roztworem KOH wystarcza by tego typu zmianę nazwać modyfikacją reakcji hydrolizy. Autorka wspomina jeszcze o zmianie stosunków reagentów ale nie podaje żadnych szczegółów.

W efekcie reakcji bromolaktonizacji  $\gamma,\delta$ -nienasyconych estrów **90**, **92** i **93** prowadzonej z udziałem N-bromoimidu kwasu bursztynowego zostały zsyntezowane odpowiednie  $\delta$ -bromo- $\gamma$ -laktony **96** i (-)-**97**. Natomiast  $\gamma,\delta$ -nienasycone kwasy karboksylowe **94** i **95** Doktorantka poddała jodolaktonizacji, otrzymując odpowiedni  $\delta$ -jodo- $\gamma$ -lakton tylko w przypadku kwasu **95**.

Ostatni rozdział tej części pracy doktorskiej zawiera omówienie syntezy azotowych pochodnych monotrpenoidowych: oksymów i  $\epsilon$ -laktamów. Monoterpenoidowe oksymy Doktorantka otrzymywała z dostępnych komercyjnie ketonów w reakcji z chlorowodorkiem hydroksyloaminy. W kolejnym etapie oksymy zastosowała jako substraty przegrupowania Beckmanna celem uzyskania odpowiednich  $\epsilon$ -laktamów.

Do określenia struktury zsyntezowanych pochodnych terpenoidowych, mgr inż. Agata Koziół zastosowała spektroskopię w podczerwieni oraz protonowy i węglowy magnetyczny rezonans jądrowy, a także wysokorozdzielczą spektrometrię mas. Pragnę w tym miejscu nadmienić, że zasadnym byłoby zamieszczenie przynajmniej fragmentów widm  $^1\text{H}$  NMR, które pozwoliłyby potwierdzić budowę nowych nieopisanych w literaturze naukowej związków. Przedstawiając charakterystykę spektroskopową estru **93** Doktorantka dwuprotonowy kwartet przy  $\delta=4.16$  ppm przypisuje „protonom grupy CH znajdujących się w sąsiedztwie atomu tlenu”, podczas gdy w sąsiedztwie atomu tlenu obecne są protony metylenowe ugrupowania karboetoksylogo i to właśnie one generują ten sygnał. Pragnę zwrócić uwagę, że przedstawiając interpretację widm  $^1\text{H}$  NMR nie stwierdza się, że „grupa COOH daje sygnał rezonansowy” (strona 51) lecz, że proton tej grupy.

W ostatnim rozdziale części poświęconej omówieniu badań własnych mgr inż. Agata Koziół przedstawia wyniki badań nad aktywnością biologiczną zsyntezowanych pochodnych terpenoidowych. Testy na aktywność deterentną dla  $\delta$ -bromo- $\gamma$ -laktonów **96** i (-)-**97**



przeprowadzone były na mszycy brzoskwiniowej (*Myzus persicae* Sulzer) przez zespół naukowy dr hab. Maryli Szczepanik w Zakładzie Zoologii Bezkręgowców Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, a na pleśniakowcu Isniącym (*Alphitobius diaperinus* Panzer) zostały wykonane we współpracy z prof. dr hab. Beatą Gabryś na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego. Umiarkowane i stosunkowo trwałe właściwości deterentne w stosunku do mszycy brzoskwiniowej (*Myzus persicae* Sulzer) wykazuje bromolakton **(-)-97** o czym świadczą dane zamieszczone w tabeli 16, jednak Doktorantka w tekście cytuję tabelę 15, w której czytelnik znajdzie wyniki testów na aktywność deterentną w stosunku do pleśniakowca Isniącego (*Alphitobius diaperinus* Panzer). W mojej opinii, testy na aktywność deterentną można było przeprowadzić także dla pozostałych  $\gamma$ -laktonów **98** i **(-)-99**.

Na kolejnych stronach rozdziału poświęconemu badaniom biologicznym opisane zostały wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzonych we współpracy z Panią dr inż. Katarzyną Macegoniuk oraz mgr inż. Ewą Grelą w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej. Tlenowe pochodne monoterpenoidowe przetestowane zostały pod kątem działania inhibitującego aktywności ureazy pochodzącej ze *Sporosarcina pasteurii* CCM 2056TM. W tekście pracy jednak nie znalazłam wyjaśnienia na jakiej podstawie Doktorantka przypisała im niekompetycyjny mechanizm działania. Ponadto Autorka na stronie 64 wymieniając związki, dla których wyznaczono aktywność ureolityczną odsyła czytelnika do Rysunku 29, którego w pracy nie znalazłam. Natomiast struktury wszystkich wymienionych połączeń znajdują się na Rysunku 22. Mojej uwadze nie uszło błędne zakwalifikowanie pochodnej **84** do ketonów, podczas gdy obecność w jego strukturę ugrupowania karboetoksylogowego (Rysunek 22) jednoznacznie dowodzi, że mamy do czynienia z estrem, który wykazał najwyższą aktywność antyureolityczną.

Badaniom na aktywność w stosunku do szczepów bakterii *Proteus mirabilis* PCM1360 i *Helicobacter pylori* J99 zostały poddane tlenowe pochodne terpenoidowe, które wykazały inhibitujące działanie w stosunku do *Sporosarcina pasteurii* CCM 2056TM. Spośród przetestowanych połączeń terpenoidowych najwyższą aktywnością w stosunku do wszystkich szczepów bakterii wykazał bromolakton **98**.

W przypadku zsyntezowanych azotowych pochodnych monoterpenoidowych przeprowadzono testy mające na celu określenie aktywności przeciwbakteryjnej wobec trzech szczepów bakterii: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Bacillus subtilis*. Jak wynika



z tabeli 18 aktywność mikrobiologiczną zbadano dla dziewięciu ((+)-100, (+)-101, 102, (+)-104, (-)-104, (-)-105, (-)-106, (+)-106, 107) spośród dziesięciu zsyntezowanych oksymów oraz dla trzech laktamów (108, (-)-109, (+)-110). Najwyższą aktywnością przeciwbakteryjną charakteryzowały się oksymy karwonu (-)-106 oraz (+)-106 i wykazywały aktywność przeciwko wszystkim badanym szczepom bakterii. Po przeczytaniu tego rozdziału uważam, że wszystkie oksymy powinny być przeprowadzone w pochodne laktamowe, a następnie przebadanie pod kątem bakteriostatyczności, wówczas wnioski dotyczące ich słabej aktywności mikrobiologicznej byłyby kompletne.

W ostatnim rozdziale omówienia badań własnych Doktorantka przedstawia charakterystykę zapachową nienasyconych estrów, którą zawiera Tabela 19. Właściwości olfaktoryczne zostały określone dla siedmiu (75, (+)-77, (-)-79, (+)-80, (+)-82, (+)-85, (-)-86) spośród ośmiu  $\alpha,\beta$ -nienasyconych estrów etylowych, będących produktami redukcji oraz dla jednego (92) spośród trzech  $\gamma,\delta$ -nienasyconych estrów etylowych zsyntezowanych w wyniku przegrupowania Claisena. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę, że w Tabeli 19 ester, którego zapach przypomina suche igliwie sosny został oznaczony numerem 91 tak jak alkohol allilowy, z którego był otrzymany. Ponieważ nie znalazłam ani w tekście pracy ani w Tabeli 19 charakterystyki zapachowej nowego estru 93, proszę o wyjaśnienie czy był to wyjątek, który okazał się związkiem bezzapachowym? Jednak to przypuszczenie pozostaje w sprzeczności ze stwierdzeniem, że: „Wszystkie z otrzymanych (...) związków mają interesujący profil zapachowy”.

W mojej opinii zaprezentowane w tej części dysertacji badania charakteryzują się słabo przemyślaną strategią postępowania oraz brakiem dbałości o szczegóły, które są istotne nie tylko przy interpretacji danych spektroskopowych, ale także przy analizie wyników badań nad aktywnością biologiczną. Dobór związków do badań biologicznych sprawia wrażenie przypadkowości, dlatego też trudno dokonać analizy zależności pomiędzy strukturą testowanych związków a ich aktywnością biologiczną.

W części eksperymentalnej, mgr inż. Agata Koziół wymieniła metody analityczne zastosowane w celu określenia struktury zsyntezowanych pochodnych terpenoidowych. Ponadto opisuje testy, zastosowane w celu zbadania ich właściwości detergentnych, metodę badań nad aktywnością przeciwbakteryjną i antyureolityczną, jak również preparatykę przeprowadzonych syntez. W tej części pracy doktorskiej bardziej niż w poprzednich



zauważalny jest brak chronologii w numerowaniu zsyntezowanych związków, co nie ułatwia lektury pracy. Przykładowo na stronie 78 znajdziemy opis syntezy (-)-*cis*-karan-4-onu, który oznaczony jest numerem **50**, a na następnej 79 stronie metodę otrzymywania (-)-[(1*R*,4*R*,6*S*)-2-[4,7,7-trimetylobicyklo[4.1.0]-hept-3-ylideno]octanu etylu **80**, natomiast na kolejnej 80 stronie opisana jest synteza (+)-2-(4-*tert*-butylocykloheksylideno)octanu etylu **74**.

Oceniając tę część pracy, uważam, że sposób w jaki Autorka wprowadza czytelnika we właściwie dobraną do prowadzonych badań metodykę oceny aktywności biologicznej dobrze koresponduje z częścią literaturową recenzowanej dysertacji doktorskiej.

Pragnę również w tym miejscu nadmienić, że praca zawiera błędy natury językowej w tym stylistyczne i gramatyczne oraz błędy interpunkcyjne.

Wszystkie uwagi i spostrzeżenia przedstawione w recenzji pracy doktorskiej mgr inż. Agaty Koziół wymieniłam z obowiązku recenzenta.

Przystępując do podsumowania stwierdzam, że mgr inż. Agata Koziół zsyntezowała, nie tylko trzydzieści cztery tytułowe tlenowe i azotowe pochodne terpenoidowe, ale również większość z nich została przebadana pod względem aktywności biologicznej. Niewątpliwym osiągnięciem Doktorantki jest otrzymanie siedmiu nowych pochodnych terpenoidowych, z których bromolakton **98** wykazuje najsilniejsze i najbardziej pożądane właściwości biologiczne. Tym samym stwierdzam, że zadania i cele pracy zostały zrealizowane. Dodatkowo, warto nadmienić, że Doktorantka jest współautorką siedmiu artykułów i autorką trzech prac naukowych oraz dziesięciu zgłoszeń patentowych. Ponadto wyniki przedstawione w dysertacji doktorskiej były prezentowane na dziewięciu konferencjach naukowych.

Reasumując, stwierdzam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016 r. poz. 882, 1311). W związku z powyższym przedstawiam Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Koziół do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej.

