UNIWERSYTET w BIAŁYMSTOKU
Wydział Chemii

dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska, prof. UwB
15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (85) 738 80 37, fax: 738 80 99, e-mail: agawilcz@uwb.edu.pl

Białystok, 28.09.2022 r

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Urbańskiej pt. „Porfiryny łączone z aminokwasami wiązaniem C-N i C-C – otrzymywanie i charakterystyka syntonów do chemii superamolekularnej"

Praca doktorska Pani mg Karoliny Urbańskiej wykonana została w na Uniwersytecie Wrocławskiem pod kierunkiem dr hab. Miłosza Pawlickiego.

Dorobek badawczy Pani Urbańskiej w zakresie przedstawionej pracy stanowią cztery artykuły naukowe, opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i dobrym współczynniku oddziaływania. Dodatkowa praca jest w przygotowaniu.

Tematyka przedłożonej pracy dotyczy tworzenia nowych układów zawierających porfiryny w pozycji *mezo* modyfikowane aminokwasami, ich charakterystyki fizykochemicznej oraz wybranych zastosowań. Jest to tematyka interesująca i budząca duże zainteresowanie ze względu na właściwości i możliwości zastosowania, np. jako sensorów do rozpoznawania molekularnego, znaczników fluorescencyjnych, znakowanych nośników substancji aktywnych. Poszukiwania nowych reakcji modyfikacji porfiryn aminokwasami, prowadzących do powstania układów aromatycznych w jednym etapie lub syntonów do chemii superamolekularnej pozwalają na rozwiązanie ważnych zagadnień chemii organicznej (chemii porfiryn).

Dostarczona do recenzji praca obejmuje 160 stron jednolitego manuskryptu. Zawartość została podzielona w sposób typowy dla prac z zakresu chemii organicznej na „Część literaturową" (44 strony), „Cel pracy" (1 strona), „Część eksperymentalną" (23 strony), „Wyniki i dyskusję" (59 stron) oraz „Podsumowanie" (2 strony). W skład rozprawy wchodzą również: „Streszczenie" i „Abstrakt" (2 strony), „Wykaz skrótów" (3 strony) oraz „Suplement" zawierający uzupełnienie danych fizykochemicznych (4 strony). Pracę kończy Lista publikacji Doktorantki oraz Bibliografia (12 stron, 189 pozycji).

Część teoretyczna rozpoczyna się od krótkiego wprowadzenia, w którym Autorka przedstawiła budowę oraz rolę, jaką pełnią porfiryny w naturze. W dalszych podrozdziałach wprowadziła czytelnika w tematykę chemii porfiryn. Zwróciła uwagę na zagadnienie wiązane z delokalizacją elektronów π w strukturach pierścieni aromatycznych, wynikające z obecności nowych podstawników aromatycznych w strukturze porfiryny. Zmiany te wpływają na właściwości spektralne modyfikowanych związków. Przegląd literatury został bardzo dobrze

zaplanowany. Na początku Doktorantka omówiła modyfikacje porfiryny w pozycjach *mezo* i β prowadzące do powstania wielopierścieniowych układów karbocyklicznych i zawierających heterom w układzie wielopierścieniowym. W kolejnych rozdziałach Pani Urbańska omówiła przykłady zastosowania porfiryn w roli detektorów małocząsteczkowych związków organicznych (w tym chiralnych - aminokwasów), kationów i anionów przy użyciu metod spektroskopowych takich jak fluorymetria, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego NMR, czy UV/Vis. Szczególną uwagę poświęciła Pani Urbańska na omówienie rozpoznawania cząsteczek achiralnych i chiralnych ze zwróceniem uwagi na sposoby oddziaływania tych cząsteczek z układem porfirynowej sondy. Kolejnym zagadnieniem rozważań literaturowych były modyfikacje porfiryn peptydami. Podzielone zostały one na dwie grupy: przyłączanie do porfiryn łańcucha peptydu poprzez łącznik wprowadzony w pozycję *mezo* lub β oraz poprzez post-modyfikację łańcucha peptydowego porfiryną. Wielkocząsteczkowe związki zostały wykorzystane do tworzenia kompleksów supramolekularnych mogących znaleźć zastosowanie np. w modelu sztucznego fotosyntetycznego centrum reakcyjnego. Część literaturową oceniam bardzo wysoko. Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy w odniesieniu do chemii porfiryn i ich koniugatów z peptydami, co stanowi doskonałe wprowadzenie do ukonstytuowania celu i jego realizacji w postaci zaprezentowanych dalej badań własnych.

Cel jest bardzo ambitny, dotyczy on otrzymania przestrzennie rozbudowanych układów aromatycznych typu porfiryna-peptyd, zbadanie ich właściwości optycznych oraz zbadanie możliwości ich wykorzystania, jako detektorów związków chemicznych. Realizacja wymagała wykonania szeregu zadań syntetycznych, które przyniosły wiele informacji na temat właściwości uzyskanych pochodnych porfiryn.

Pani Urbańska w „części eksperymentalnej" oraz rozdziale zatytułowanym „wyniki i dyskusja" przedstawiła syntezy oraz badania fizykochemiczne prowadzące do realizacji przedstawionego celu. Doktorantka założyła dwa podejścia syntetyczne poprzez modyfikację *N*-końca aminokwasu oraz przekształceń chemicznych w łańcuchu bocznym aminokwasu. Pierwsze podejście skutkowało uzyskaniem 6 układów porfiryn z aminokwasami przyłączonymi w pozycji *mezo,* w wyniku reakcji Buchwalda-Hardwiga. Doktorantka zbadała reaktywność tych związków w reakcji utleniania wiązania N-C zwracając uwagę na selektywność procesu w zależności od warunków ich przeprowadzenia. Uzyskane związki charakteryzowały się ciekawymi właściwościami chiralooptycznymi wynikającymi z przeniesienia aktywności optycznej z centrum chiralnego aminokwasu do chromoforu. Kolejne prace dotyczyły uzyskania pochodnych porfirynowych poprzez reakcje w łańcuchu bocznym aminokwasów takich jak *p*-aminofenyloalanina i tryptofan. Wynikiem było utworzenie nowych wiązań C-N oraz/lub C-C. Zabezpieczone grupą Boc lub Fmoc estrowe pochodne *p*-aminofenyloalaniny poddano reakcji utleniającego aminowania z diacetoksyjodobenzenem w obecności tetrachlorozłocianu sodu. Doktorantka uzyskała 5 nowych pochodnych fenyloalaniny. Udowodniła, że wypełnienie wnęki porfirynowej wpływa na strukturę uzyskiwanych związków. W przypadku wolnej porfiryny Pani mgr Urbańska po raz pierwszy udowodniła, że w jednej reakcji można uzyskać oprócz produktów nieskondensowanych produkty skondensowane. Doktorantka zbadała reaktywność uzyskanych nieskondensowanych pochodnych w reakcjach utleniania. Produkty skondensowane, powstające w wyniku kaskadowego tworzenia wiązań C-N i C-C, mają

bardzo ciekawą strukturę z π-rozszerzonym układem elektronowym posiadającym heteroatom azotu w pozycji *mezo,* a tym samym interesujące właściwości spektralne. Doktorantka zbadała wpływ środowiska zasadowego na ścieżki delokalizacji elektronów π – 18 i 26 elektronową. Dodanie większej ilości zasady skutkowało deportacją w pozycji *mezo*. Obserwacje eksperymentalne poparto obliczeniami z zastosowaniem teorii funkcjonałów gęstości elektronowej – DFT. Kolejne uzyskane pochodne fenyloalaniny zawierały podstawnik *N*-pirydynowy w pozycji *mezo* porfiryny. Doktorantka otrzymała również polarne kationowe analogi stosując *N*-metylopirydynę.

Ważnym zadaniem syntetycznym było uzyskanie pochodnych tryptofanu połączonych z układem pirydynowym wiązaniem C(*mezo*)-C(3). Doktorantka uzyskała pięć pochodnych – dwie „otwarołańcuchowe" i trzy skondensowane, z 2,3-dihydroazocynowym (8-członowym pierścieniem zawierającym atom azotu). Produkty hydrolizy estrów metylowych pochodnych tryptofanu Doktorantka zastosowała jako sensory estrów metylowych wybranych estrów aminokwasów. Powstawanie oddziaływań badała rejestrując widma protonowego rezonansu jądrowego. Wyznaczone zostały stałe asocjacji kompleksów z wybranymi pochodnymi aminokwasów. W wyniku badań potwierdzono, że uzyskane związki mogą być wykorzystane, jako sondy do rozpoznawania molekularnego. Zaobserwowano jedynie niewielką preferencję w kwestii rozpoznawania izomerów optycznych. Doktorantka zaproponowała również sposób wiązania estrów aminokwasów ze zmodyfikowanymi tryptofanem pochodnymi porfiryny, co zostało dodatkowo potwierdzone metodami obliczeniowymi DFT.

Następnym wyzwaniem przedstawionym w recenzowanej pracy było zastosowanie fenyloalaniny do tworzenia peptydów z ugrupowaniami porfirynowymi. Sukcesem zakończyła się synteza dipeptydów pochodnych *p*-aminofenyloalaniny zakotwiczonych w strukturze porfiryny w pozycji *mezo* (wiązanie C-N). Doprowadziła ona do uzyskania dwóch ugrupowań chromoforowych w cząsteczce. Doktorantka otrzymała jeszcze dwa dipeptydy z jednym chromoforem udowadniając tym samym możliwość tworzenia struktur bardziej złożonych, co zostało wykorzystane w dalszej części pracy. Pani mgr Urbańska podjęła próby wykorzystania układów bisporfirynowych do rozpoznawania molekularnego biednych amin. Nie zakończyły się one powodzeniem, co Doktorantka tłumaczy naprężeniem w strukturze liganda, co spodobało inną niż „kanapkowa" orientację przestrzenną „gospodarza".

Bardzo interesująca jest ostatnia część badań, w której mgr Urbańska przedstawiła syntezy struktur trójwymiarowych peptydów udekorowanych ugrupowaniami porfirynowymi. Peptydy zaprojektowano w taki sposób, aby ugrupowania makrocykliczne znajdowały się w przestrzeni blisko siebie, co pozwoliłoby na stworzenie kompleksów supramolekularnych z bidentnymi ligandami. Kluczowym czynnikiem było wprowadzenie jonów cynku do układu. Zsyntezowane zostały trzy peptydy z porfirynowymi kompleksami cynku. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka potwierdziła, że jeden z peptydów tworzy z diaminami supramolekularne kompleksy typu gość-gospodarz.

Badania własne kończy krótkie podsumowanie, w którym Autorka przedstawia najważniejsze osiągnięcia pracy, które trochę szumnie nazwała „kamieniami milowymi".

Wyniki badań przedstawione przez Doktorantkę oraz wkład pracy eksperymentalnej oceniam bardzo wysoko. Praca pod względem ilości przeprowadzonych syntez, które zakończyły się powodzeniem jest imponująca, zwłaszcza przy tak skomplikowanych związkach i koniecznych żmudnych rozdziałach chromatograficznych. Wyniki uzyskane przez Panią Karolinę Urbańską są bardzo ciekawe. Cele przedstawione w pracy są rzetelnie zaplanowane i zrealizowane. Godna uznania jest systematyczność zaproponowanych procedur prowadzących do optymalizacji poszczególnych reakcji oraz zbadania stosowalności metod. Jest to bardzo solidna praca syntetyczna wymagająca przede wszystkim sprawności oraz ogromnej cierpliwości i staranności eksperymentatora. Analiza wyników badań fizykochemicznych wymagała interdyscyplinarnej wiedzy teoretycznej i umiejętności. Doktorantka wykazała się znajomością różnorodnych technik analitycznych na podstawie, których potrafiła opracować wyniki. Szeroko zakrojone badania fizykochemiczne zostały przeprowadzone z należytą starannością z użyciem metod takich jak FT-IR, NMR, fluorymetria, analiza elementarna, spektrometria mas, XRD i innych. Przedstawiona została ogromna ilość badań pozwalająca na poznanie właściwości spektralnych otrzymanych materiałów oraz wyciągnięcie bardziej szczegółowych wniosków dotyczących możliwości zastosowania tych związków, jako detektory bidentnych amin i estrowych pochodnych aminokwasów. Interpretacja wyników nie budzi zastrzeżeń merytorycznych.

Moje uwagi dotyczą edytorskiej części rozprawy. Wyniki dyskutowane na str. 92 dotyczące syntezy porfirynowych pochodnych aniliny, z punktu widzenia postawionego celu pracy powinny stanowić uzupełnienie badań i być przedstawione w innej kolejności (na początku koniugaty z *p*-aminofenyloalaną, co sugeruje tytuł podrozdziału). To samo dotyczy reakcji porfiryny z indolami, str. 105. Należy jednak zwrócić uwagę, że wspomniane badania są bardzo ciekawe i doprowadziły do poszerzenia biblioteki badanych związków. Wykonując je Doktorantka budowała warsztat nie tylko w zakresie syntezy pochodnych porfiryn, ale również ich wydzielania i oczyszczania oraz metodyki badań właściwości fizykochemicznych.

Opisy wykonanych badań są czasami bardzo skrótowe i nie ułatwiają recenzentowi śledzenia toku wywodu. Z uwagi na dużą ilość przeprowadzonych syntez i uzyskanych wyników autorka często przeskakuje od jednej syntezy do drugiej nie tłumacząc powodów swoich wyborów lub powodu zaniechania podania wyników niektórych eksperymentów. Np. str. 86 czy badania CD były wykonywane też dla pozostałych związków? Dlaczego wybrano akurat związek 11? Najbardziej ewidentny jest przykład rozdziału 4.3. Na str. 111 przestawione są badania chiralności enancjomerów (R)- i (S)-258 oraz (R)- i (S)-260. Nie wiadomo jednak czy związki te powstały w reakcji porfiryny 236-Zn, czy 236 - nie będącej kompleksem cynku? Nie potrafiłam ustalić czy reakcja porfiryny 236-Zn lub 236 była prowadzona z racemicznym tryptofanem? Jeżeli tak to, w jaki sposób rozdzielono mieszaninę czterech stereoizomerów? Str. 118 - rozpoznawanie molekularne - w jaki sposób wyznaczone zostały stałe asocjacji? Brak metodologii tych badań w części eksperymentalnej. Brak jest w części eksperymentalnej opisu syntezy peptydów (omawianych w rozdziale 4.6) metodologii ich oczyszczania i wydzielania oraz modyfikacji.

Proszę o komentarz dotyczący możliwości dalszego wykorzystania uzyskanych w wyniku realizacji pracy pochodnych porfirynowych? Czy właściwości spektralne któregoś z uzyskanych zawiązków były szczególnie interesujące – zaskakujące?

Do tekstu rozprawy zakradła się pewna, niewielka (co warto podkreślić), liczba nieścisłości i błędów językowych, co z obowiązku recenzenta wymieniam. Np. „chemia kwasowo-zasadowa"; rysunek lub tabela „przedstawia"; „na widmie"; „optowane produkty". Łącznik w „porfirynowo–aminokwasowe" powinien być krótki – porfirynowo-aminokwasowe. Schemat 108, str. 108 związki 258 i 260 zamiast Boc powinno być PG. Dane w tabeli 8 zostały pomieszane i nie odpowiadają opisowi pod tabelą na str. 109.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka prawidłowo ustaliła plan i metodykę prowadzonych badań. Doktoranta wykazała się umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i wyboru odpowiednich do przedmiotu badań technik fizykochemicznych. Autorka wykazała się znajomością literatury przedmiotu, a zdobytą wiedzę wykorzystała w odpowiedni sposób do interpretacji i syntezy wyników badań. Praca doktorska pani mgr Karoliny Urbańskiej zawiera wymagane w rozprawach doktorskich elementy nowości naukowej, co zostało dodatkowo udokumentowane artykułami opublikowanymi w czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdującymi się na liście filadelfijskiej. Przedmiot rozprawy dotyczy zagadnień aktualnych i wciąż rozwijanych zarówno w dziedzinie chemii organicznej jak i w chemii porfiryn. Wyniki uzyskane przez Panią mgr Urbańską są oryginalne i mają istotne znaczenie poznawcze. Stanowi ona ważny wkład w rozwój chemii organicznej. Zamieszczone uwagi mają charakter formalny oraz wynikają z zainteresowania wynikami pracy. Nie mają one wpływu na bardzo dobrą ocenę merytoryczną badań przedstawionych w ramach rozprawy.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca mgr Karoliny Urbańskiej pt. „Porfiryny łączone z aminokwasami wiązaniem C-N i C-C – otrzymywanie i charakterystyka syntonów do chemii superamolekularnej" spełnia wszystkie wymagania zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" i zwracam się do wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Urbańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę całkowity dorobek naukowy Doktorantki oraz bardzo wysoki poziom merytoryczny badań, wnoszę również o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska, prof. UwB