

Olsztyn, 09.11.2023

Prof. dr hab. Ryszard Amarowicz
Zakład Chemicznych i Fizycznych Właściwości Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

***Recenzja rozprawy doktorskiej magister Eweliny van Wenum pt.
„Study of antioxidant and synergistic action of selected phenols and polyphenols in
model lipid-water systems”
Praca wykonana została na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego –
promotorem pracy był prof. dr hab. Grzegorz Litwinienko***

Związki fenolowe i ich zdolność do hamowania procesów oksydacyjnych jest przedmiotem zainteresowań badawczych przedstawicieli kilku dyscyplin naukowych. Wpisując w bazę SCOPUS hasło „phenolic antioxidants” znajdujemy ponad siedemdziesiąt trzy tysiące dokumentów. Zainteresowania powyższą tematyką wynika z faktu, że stres oksydacyjny jest przyczyną większości chorób człowieka. Przeciwutleniacze mogą zapobiegać zmianom oksydacyjnym w komórkach, tkankach i organach lub łagodzić ich skutki, a tym samym zapobiegać lub opóźniać postęp wielu chorób. Ponieważ związki fenolowe chronią lipidy przed autooksydacją, ich zastosowanie w przemyśle spożywczym i w kosmetykach jest powszechne.

Badanie mechanizmów działania przeciwutleniaczy jest oczywiście domeną chemików. Uzyskane przez nich teoretyczne wyniki mogą być podstawą do prowadzenia badań przez innych naukowców oraz do praktycznego zastosowania w różnych obszarach technologicznych. Z dużą satysfakcją mogę stwierdzić, że oceniana praca doktorska wnosi istotne nowe treści odnoszące się do chemii naturalnych związków fenolowych i ich aktywności przeciwutleniającej. Uważam również, że wyniki praca doktorskiej Pani Eweliny van Wenum poza wartością poznawczą są również cenna z praktycznego punktu widzenia. Uzyskane przez Nią wyniki mogą być wykorzystane przez przemysł spożywczy i farmaceutyczny.

Przedstawiona do oceny praca napisana jest w języku angielskim, obejmuje 135 stron druku i składa się z siedmiu części. Są to:

- *Motywacje, które skłoniły Doktorantkę do podjęcia badań oraz cel tychże.*
- *Wstęp.*
- *Materiały i metody.*
- *Rezultaty.*
- *Dyskusja.*
- *Streszczenie.*
- *Piśmiennictwo.*

Właściwa część pracy poprzedzona jest abstraktem (streszczeniem) w dwóch językach, słowami kluczowymi i polskim tytułem pracy, listą użytych symboli i skrótów oraz podziękowaniami.

Doktorantka informuje, że jej praca finansowana była z trzech projektów:

- Projektu *Preludium* Narodowego Centrum Nauki „*Badanie mechanizmu synergistycznego działania fenoli i polifenoli w procesie peroksydacji modelowych układów lipidowych*” o numerze 2012/05/N/NZ9/02762.

- Projektu MNiSW „*Badanie efektu synergistycznego między silybiną, 2,3-dehydrosilybiną i analogiem α - tokoferolu podczas perosydacji modelowych układów lipidowych*” o numerze 501/86-DSM-102400.
- Stypendiów Wojewody Mazowieckiego:
 - *Mazowieckie Stypendium Doktoranckie* (2009).
 - *Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowsza – stypendium dla doktorów* (2011/2012).
 - *Rozwój nauki – rozwojem regionu – stypendia i wsparcie towarzyszące dla mazowieckich doktorantów* (2013/2014).

Dokumentację w pracy stanowi sześćdziesiąt osiem rysunków oraz pięćdziesięciu siedmiu tabel. Rysunki zawarte w pracy przygotowane są w profesjonalny sposób. Ich szata graficzna jest bardzo dobra.

Cel pracy przedstawiony jest w sposób jasny, nie budzący zastrzeżeń recenzenta. Doktorantka stawia przed sobą główne zadanie, jakim jest określenie wpływu pH na hamowanie autooksydacji lipidów przez związki fenolowe w układzie dwufazowym. Cel ten wynika z postawionej hipotezy o tym, że jonizacja poszczególnych grup fenolowych/enolowych ułatwia reakcję przeciwutleniaczy z lipidowymi rodnikami nadtlenkowymi jak również korzystnie wpływa na interakcję pomiędzy samymi przeciwutleniaczami. Ogólny celu badawczy Doktorantka realizuje w kilku „etapach”. Są nimi:

- Oznaczenie współczynnika podziału ($\log D$) dla związków objętych badaniami, a gdy to konieczne, również kwasowości (pK_a) z odniesieniem do poszczególnych grup hydroksylowych. Elektrochemiczne oznaczanie właściwości redukujących wybranych polifenoli jest uwzględnione w tym etapie.
- Zbadanie wpływu deprotonacji związku fenolowego na jego aktywność przeciwutleniającą. Realizacja tego zadania zaplanowana została w układzie

homogennym z użyciem dpph[•]. Integralną częścią tego etapu było zbadanie roli mechanizmu SPLET w odniesieniu do wybranych polifenoli.

- Opisanie kinetyki reakcji fenoli i polifenoli z lipidowym rodnikiem nadtlenkowym w micelarnym układzie lipid-woda. W tym etapie uwzględniono szeroki zakres pH – od 4.0 do 10.0, co umożliwiło uchwycić wpływ deprotonacji poszczególnych grup hydroksylowych w związkach fenolowych/polifenolowych na ich aktywność przeciwutleniająca w środowisku dwufazowym.
- Opisanie mechanizmu synergistycznej interakcji związków fenolowych z analogiem α -tokoferolu przy udziale mechanizmu SPLET i z uwzględnieniem lokalizacji związku fenolowego pomiędzy fazy układu heterogennego.

Jako cel Swoich badań Doktorantka wymienia również wyznaczenie kluczowych grup fenolowych/enolowych w strukturze flawonoidów odpowiedzialnych za aktywność tych związków w układach dwufazowych i za efekty synergistyczne.

Do realizacji Swoich celów badawczych Doktorantka użyła szerokiej grupy związków fenolowych różniących się strukturą chemiczną, a tym samym właściwościami przeciwutleniającymi. Na liście tych związków znalazły się katechol, sylybina/silybinina, 2,3-dehydrosilibina, guajakol, kwas kawowy, kwercetyna, galangina, luteolina, 3-hydroksyflawon, 7,8-dihydroksyflawon, 7-hydroksyflawon, Trolox oraz 2,2,5,7,8-pentametyl-6-chromanol (PMHC).

Część doświadczalna niniejszej dysertacji jest opisana prawidłowo. Realizacja poszczególnych szczegółowych celów pracy Doktorantki dokonuje się poprzez przeprowadzenie odpowiednich eksperymentów. Dobór metod analitycznych jest poprawny. Wyniki analiz uzyskano posługując się nowoczesnym sprzętem analitycznym.

W tym miejscu pragnę z uznaniem odnieść się do umiejętności analitycznych Doktorantki. Użyła Ona do badań bardzo wielu metod analitycznych. Wymienić tu należy:

- Woltamperometryczne oznaczenie potencjału elektrootleniania.
- Pomiar współczynnika podziału pomiędzy 1-oktanol i wodę metodą wytrząsania z użycie HPLC do oznaczania badanych związków.
- Oznaczenie aktywności przeciwrodnikowej względem rodnika dp[•]h - metoda kolorymetryczna.
- Pomiar autooksydacji lipidów i aktywności przeciwutleniającej przy użyciu systemu Biological Oxygen Monitor. Metoda ta pozwala na szybkie wyznaczenie okresu indukcyjnego.

Na stronach 39-49 zawarty jest dokładny opis procedur analitycznych oraz podstaw teoretycznych zastosowanych metod.

Na stronach 125/126 Doktorantka podsumowuje Swoje badania wymieniając w sześciu punktach główne uzyskane wyniki. W wielu miejscach tej części dysertacji pojawiają się ogólne stwierdzenia, które w czystej formie są konkluzjami. Moim zdaniem przedstawione wnioski są adekwatne do postawionych przez Doktorantkę celów badawczych, co świadczy o odniesieniu przez nią sukcesu naukowego. Sformułowane wnioski wskazują jednocześnie na ich znaczenie w badaniach podstawowych odnoszących się do aktywności przeciwutleniającej związków fenolowych.

Zdaniem recenzenta za szczególnie ważne wyniki, których w tak szerokim spektrum badanych związków fenolowych brak w literaturze przedmiotu, uznać należy:

- Ustalenie dla dwunastu związków wartości log D w układzie 1-oktanol/woda przy trzech wartości pH. Dane literaturowe odnoszą się głównie do pH 7.4.
- Zmierzenie wpływu rozpuszczalnika na stałą reakcji k^S sylibiny i 2,3-dehydrosylibiny z dp[•]h. Wyniki te są ważne z praktycznego punktu widzenia, ponieważ związki te są głównymi polifenolami ostropestu plamistego (*Silybum marianum* (L.) Gaertner), który jest w centrum zainteresowania przemysłu farmaceutycznego

- Porównanie stabilności oksydacyjnej estrów etylowych kwasu oleinowego i kwasu linolowego w układzie micelarnym w zależności od pH.
- Wykazane wpływu pH na aktywność przeciwutleniającą dwunastu związków w układzie micelarnym.
- Zbadanie SAR odnośnie aktywności przeciwutleniającej związków o bardzo zbliżonej budowie chemicznej, np. Trolox i PMHC, sylibina i 2,3-dehydrosilybina.
- Zbadanie, jak synergizm aktywności przeciwutleniającej Troloxu i PMHC ze związkami fenolowym zależy od pH.

Spis *Literatury* jest obszerny i obejmuje 290 pozycji zaktualizowanych do 2023 r. Dobór publikacji jest odpowiedni. Zdaniem recenzenta obejmuje on wprawdzie podstawowe publikacje odnoszące się do zakresu pracy, celowe byłoby dodanie dwóch pozycji podstawowych dla metody ddph:

- M.S. Blois, *Nature*, **1958**, 1199.
- W. Brand-Williams W, M.E Cuvelier, and C. Berset, *Lebensm-Wiss. Technol.*, **1995**, 28, 25.

Zdaniem recenzenta dysertacja w kilku miejscach wymaga korekt/modyfikacji:

- W spisie symboli i skrótów powinno się znaleźć „pK”, „ME” (str. 33), RE (str. 33).
- Str. 3 – Ponieważ flawonoidy są polifenolami, zwrot „flavonoids and polyphenolic antioxidants” jest raczej niefortunny.
- Str. 7 – Powinno być „•OH”.
- Str. 8 – Substratem dla lipooksygenazy są różne wielonienasycone kwasy tłuszczowe, nie tylko kwas arachidonowy.
- W rozdziale „2.3. Antioxidants” warto było nadmienić o inhibitorach prooksydacyjnych enzymów i chelatorach prooksydacyjnych metali. Informacja o chelatorach znajduje się jedynie w podrozdziale „2.4.1. Mechanism of antioxidant synergy” efektu synergistycznego.

- Str. 20 – Powinno być „ α -tocopheryl radical (α -Toc $\bullet$)”.
- Str. 31 – Poprawniej by było używać terminu „ascorbic acid” w miejsce „vitamin C”.
- W rozdziale „2.4.2 Quantification of the synergistic effect” warto było wzmiankować o zastosowaniu izobologramów do badania efektu synergistycznego.
- Str. 38 – Zwrot „... chromatography ... equipped with ... column ...” uznać należy za błędny. Powinny być podane również warunki rozdziału chromatograficznego i kalibracja metody.
- Na rysunkach przedstawiających liniową regresję wartości współczynników w równaniach i wartości współczynnika determinacji podano chyba ze zbyt wielką „dokładnością po przecinku”.
- Str. 68, 99 – Powinno być raczej „ α -tocopherol analogue” zamiast „vitamin E analogue”.
- Wyniki porównujące okres indukcyjny Troloxu i PMHC bez i razem ze związkami fenolowym powinien być uzupełniony o wyniki testów statystycznych weryfikujących istotność statystyczną obserwowanych różnic.

Wnioski końcowy

Reasumując swoją ocenę chciałbym zauważyć, że pomimo zgłoszonych kilku uwag oceniana praca wyróżnia się wysokim poziomem naukowym, wykonana została przy wykorzystaniu nowoczesnych i różnorodnych metod badawczych, a uzyskane wyniki zostały przedstawione, przeanalizowane i zinterpretowane w sposób wnikliwy. Na szczególne podkreślenie zasługują wyniki badań dotyczących działania przeciwutleniaczy fenolowych w układach emulsyjnych, które mogą być wykorzystane w praktyce przez producentów żywności i kosmetyków. To samo można powiedzieć również o wynikach dotyczących synergizmu pomiędzy przeciwutleniaczami. Wyniki Doktorantki w tym obszarze badawczym mogą być bardzo cenne np. dla technologów żywności przy wytwarzaniu żywności funkcjonalnej i nutraceutyków.

W podsumowaniu swojej oceny pragnę stwierdzić, że praca doktorska Pani mgr Eweliny van Wenum pt ***„Study of antioxidant and synergistic action of selected phenols and polyphenols in model lipid-water systems”*** spełnia kryterium oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, w oczywisty sposób wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki w danej dyscyplinie naukowej oraz potwierdza Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej – o tych kryteriach mówi Art. 187 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późniejszymi zmianami). Z pełnym przekonaniem przekładam zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Eweliny van Wenum do publicznej obrony niniejszej pracy.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, flowing letters that appear to be 'A. S.' or similar, with a long horizontal stroke extending to the right.