

Prof. dr hab. inż. Dorota Neugebauer
Politechnika Śląska
Wydział Chemiczny
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów
ul. Strzody 9, 44-100 Gliwice
e-mail: dorota.neugebauer@polsl.edu.pl

Gliwice, 24.11.2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Kamili Lewickiej
pt.: *Otrzymywanie biodegradowalnych polimerów i mieszanin polimerowych oraz ocena ich przydatności dla zastosowań w systemach kontrolowanego uwalniania w agrochemii*
Praca wykonana na Wydziale Nauk Ścisłych, Przyrodniczych i Technicznych Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. J. Długosza w Częstochowie.
Promotor: dr hab. Piotr Dobrzyński, prof. UJD; promotor pomocniczy: dr Piotr Rychter

Dostarczanie substancji biologicznie aktywnych zyskało zainteresowanie głównie ze względu na konwencjonalne leki, których przyjmowanie powodowało przekroczenie poziomu toksyczności i niepożądane efekty uboczne. Dogodnym rozwiązaniem okazały się nośniki polimerowe, których zadaniem jest zwiększenie rozpuszczalności związku bioaktywnego oraz poprawa farmakokinetyki i farmakodynamiki. Wymagania te stały się podstawą rozwoju badań układów polimerowych ukierunkowanych na kontrolowane i/lub docelowe dostarczanie leków. Jednak wykorzystanie takich układów transportujących substancje biologicznie aktywne okazało się być strategiczne nie tylko w zakresie medycyny czy farmakologii, ale także zastosowań agrochemicznych. Wśród podstawowych cech jakimi powinny charakteryzować się polimery – nośniki wskazuje się biogodność i nietoksyczność wobec zdrowych komórek, zaś jako opcjonalne degradowalność, dzięki której po dostarczeniu substancji polimerowy nośnik rozpada się na małe cząsteczki bez szkody dla otoczenia, co jest niezwykle istotne również w przypadku stosowania takich układów do ochrony upraw rolnych przed szkodnikami. W tym przypadku dobór nośnika obejmuje aspekt nie tylko jego wpływu na roślinę, ale także na glebę, a kontrolowany proces uwalniania transportowanych przez niego agrochemikaliów może być zakłócony czynnikami klimatycznymi. W związku z tym układy takie powinny bazować przede wszystkim na dobrze zdefiniowanych polimerach, których otrzymanie jest możliwe przy użyciu technik inżynierii makromolekularnej, aby stanowiły tzw. materiały „szyte na miarę”.

Zagadnienia podjęte w rozprawie doktorskiej przez mgr inż. Kamilę Lewicką bardzo dobrze wpisują się w tematykę projektowania wielkocząsteczkowych nośników. W syntezie Doktorantka zastosowała polimeryzację koordynacyjno-insercyjną z otwarciem pierścienia (ROP)

wobec monomerów cyklicznych. Obok podstawowej charakterystyki fizykochemicznej wykazała właściwości degradowalne otrzymanych układów polimerowych, zaś mając na uwadze przyszłe zastosowania agrochemiczne przetestowała je pod kątem uwalniania pestycydów wykazując ich kontrolowaną aktywność chwastobójczą.

Rozprawa ma układ standardowy, obejmuje 225 stron, na które składają się: *Streszczenie* w j. polskim i j. angielskim (4 strony), *Wykaz stosowanych skrótów i symboli* (4 strony), *Wprowadzenie* (4 strony), *Część literaturowa* (63 strony), *Cel i zakres pracy* (3 strony), *Część doświadczalna* (11 stron), *Omówienie wyników badań* (81 stron), *Podsumowanie i wnioski* (5 stron) oraz *Literatura cytowana* (24 strony, 281 pozycji). Następnie podano *Spis rysunków, schematów i tabel* (6 stron). W końcowej części pracy znajduje się *Dorobek naukowy* Doktorantki (5 stron) i *Oświadczenie ws przygotowanej pracy* (1 strona).

Część literaturową Autorka rozpoczęła od przedstawienia problemów, które są następstwem stosowania pestycydów, podając przy okazji ich klasyfikacje ze względu na drogę przenikania lub grupę docelowego szkodnika, skupiając się w dalszej części na herbicydach, do których należą wybrane do pracy badawczej metazachlor i pendimetalina o działaniu chwastobójczym. Istnieje wiele czynników środowiskowych, w tym klimatyczne i glebowe, które obok tych fizycznych i chemicznych, sprzyjają nasileniu się niekorzystnych efektów działania substancji, od których oczekuje się skutecznej pomocy w zwalczaniu szkodników upraw rolniczych w związku z potrzebą zaspokojenia deficytów żywieniowych.

Kolejne rozdziały są poświęcone polimerom biodegradowalnym, w szczególności poli(L-laktydowi) (PLA), który w zależności od mikrostruktury może posiadać różne właściwości fizykochemiczne. Wśród metod syntezy powszechnie stosowana jest ROP, która może przebiegać według różnych mechanizmów. W celu otrzymania PLA o dużych ciężarach cząsteczkowych najdogodniejszym jest mechanizm insercyjno-koordynacyjny z otwarciem pierścienia przy udziale kompleksów metaloorganicznych pełniących także funkcję inicjatora. Mniej toksyczną alternatywą dla standardowych inicjatorów-katalizatorów, tj. izopropanolan glinu (III) czy oktanian cyny (II) jest acetyloacetonian cyrkonu (IV). Warto zaznaczyć, że ten ostatni związek w reakcjach ROP jest już stosowany od 20 lat, na co znaczący wpływ mają badania prowadzone przez Promotora prof. Dobrzyńskiego. Właściwości PLA można także modyfikować poprzez otrzymanie jego kopolimerów, w związku z tym w oparciu o literaturę Doktorantka przedstawiła przykłady te najbardziej związane z jej pracą doktorską, tj. kopolimer statystyczny z glikolidem lub ϵ -kapolaktonem, blokowy z glikolem polietylenowym oraz szczepione na polisacharydach. Jednocześnie zwróciła też uwagę na opcję mieszania polimerów o różnych właściwościach, w tym z udziałem biopolimerów, głównie skrobi. Wśród najważniejszych właściwości polimerów wyróżnia się ich zdolność do degradacji, która jest możliwa w przypadku, kiedy w łańcuchu

występują odpowiednie ugrupowania tracące stabilność chemiczną w odpowiednich warunkach, np. kompostowania. W wyniku degradacji hydrolitycznej łańcuch jest pocięty na krótsze segmenty, zaś degradacja enzymatyczna umożliwia ich rozpad na produkty małocząsteczkowe. Właściwości te są charakterystyczne dla poliestrów alifatycznych. W związku z tym podstawowe informacje związane z zagadnieniem degradacji i jej klasyfikacji, a następnie bardziej szczegółowo ze wskazaniem mechanizmu procesu i czynników aktywujących Doktorantka przedstawiła na przykładach literaturowych dla PLA i jego kopolimerów oraz mieszanin polimerowych.

Wśród podstawowych kierunków zastosowań polimerów biodegradowalnych w rolnictwie, które są omówione w ostatnim rozdziale, wymienione są folie i włókniny ściółkowe, w tym wykonane z PLA, alifatycznego poliestru ze skrobi kukurydzianej lub poli(bursztynianu butylenu), np. handlowo dostępny Bionolle. Inną grupę materiałów polimerowych stanowią hydrożele o właściwościach superchłonnych, dzięki którym możliwe jest długotrwałe utrzymanie wilgotności gleby. W literaturze są także opisane systemy kontrolowanego uwalniania pestycydów jako dogodne rozwiązanie pozwalające na optymalne dawkowanie substancji bioaktywnej w walce ze szkodnikami upraw rolnych.

Doktorantka opracowała przegląd literaturowy na podstawie 281 pozycji, co wskazuje na jej bardzo dobre przygotowanie do prowadzenia prac eksperymentalnych, zaś niewielka liczba cytowanych artykułów opublikowanych przed 2000 rokiem (9%) świadczy o aktualnym charakterze podjętego zagadnienia, które stanowi popularny trend badawczy w zakresie chemii polimerów.

Część badawcza poświęcona omówieniu wyników pracy doświadczalnej obejmuje przygotowanie kopolimeru L-laktydu i glikolidu P(LA-co-GL) (85/15 % mol) z udziałem acetyloacetonianu cyrkonu (IV). W przypadku dodatku glikolu polietylenowego o dwóch różnych ciężarach cząsteczkowych (4,6 i 10 tys. g/mol) lub eteru monometylowego glikolu polietylenowego (5 tys. g/mol) jako makroinicjatora di- lub monofunkcyjnego powstały odpowiednio terpolimery tri- i diblokowe, które zawierały segment(y) kopoliestrowe. Ponadto została przeprowadzona polimeryzacja ϵ -kaprolaktanu z użyciem wielofunkcyjnego makroinicjatora, którym była dekstryna lub maltodekstryna. Podstawową charakterystykę fizykochemiczną przeprowadzono za pomocą spektrometrii NMR i FTIR, chromatografii żelowej GPC, analizy termicznej DSC, pomiarów kąta zwilżania wodą. W następnym etapie otrzymano mieszanki różnych kombinacji liniowego kopolimeru blokowego z kopolimerem szczepionym, po czym uformowano z nich folie i mikrosfery z dodatkiem wybranych herbicydów, tj. metazachloru i pendimetaliny, dodanych w ilości 10% lub 20%. Nietypowe jest umieszczenie procedury syntezy i mieszania polimerów oraz formowania folii czy mikrosfer wraz z technicznym opisem w części omówienia wyników zamiast w części eksperymentalnej.

Etap II to badania degradacji, które polegały na monitorowaniu zmiany ciężaru cząsteczkowego, chłonności wody, ubytku wagi, zmiany składu i fazy krystalicznej oraz morfologii powierzchni przez okres 12 tygodni w środowisku wody, gleby i osadu czynnego. Badaniom tym poddano próbki folii 6 polimerów blokowych, 7 mieszanin z polisacharydem szczepionym i 4 mieszanin z polisacharydem niezmodyfikowanym. Następnie próbki układów polimerowych zawierających poszczególne herbicydy w określonej ilości poddano badaniom uwalniania również w 3 różnych warunkach środowiskowych. Obecność segmentu hydrofilowego znacznie poprawiła zdolności degradowalne badanych polimerów, a ich mieszanina z oligosacharydami, w szczególności tymi modyfikowanymi zwiększała kontrolowanie szybkości procesu degradacji.

Jednocześnie dla trzech wybranych układów z dodatkiem 15-17 % herbicydów zostały uformowane mikrosfery, których wielkości dla przeważającej frakcji osiągnęły 250 μm dla terpolimeru triblokowego i 150 μm dla mieszaniny polimerów. Podobnie jak w przypadku folii polimerowych, testowano rozpad mikrosfer w wodzie, osadzie czynnym i glebie poprzez zmiany w utracie masy czy pogorszenie jakości powierzchni próbek w ciągu 12 tygodni, zaś proces uwalniania herbicydów przeprowadzono w wodzie. Dla układów mikrosferycznych została także wyznaczona aktywność chwastobójcza po 1 m-cu przebywania w glebie w warunkach szklarniowych. Do badań wybrano 3 gatunki chwastów, tj. komosa biała, żółtlica drobnokwiatowa i szczaw polny, a efekty ich wrażliwości na działanie herbicydów oceniono w skali EWRC. Po 1 m-cu nie zaobserwowano kiełkujących roślin, w związku z tym obserwacje przedłużono do 2 i 3 m-cy oraz zastosowano mikrosfery z podwójną dawką zalecaną dla odpowiedniego herbicydu. Ponadto dokonano oceny toksyczności produktów degradacji nośników w glebie poprzez wyznaczenie wskaźnika EC50 czyli skutecznego stężenia indukującego efekt toksykacji u 50% bakterii prowadząc testy na luminescencyjnych bakteriach morskich *A. fischeri*.

Zakres wykonanej pracy badawczej przez Doktorantkę, tj. synteza polimerów i przygotowanie ich mieszanin, po czym przygotowanie folii i mikrosfer, a następnie kompleksowa charakterystyka, w tym ocena stopnia toksykacji i działania chwastobójczego, wymagał interdyscyplinarnej wiedzy teoretycznej i umiejętności preparatywnych. Doktorantka wykazała się znajomością różnorodnych technik analitycznych na podstawie, których potrafiła opracować wyniki zarówno w zakresie chemii polimerów, jak i agrochemii.

Na dorobek naukowy Doktorantki składa się 14 publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o zasięgu międzynarodowym (IF: 1,195-4,723), w tym w trzech Pani Kamila jest pierwszym autorem. Szkoda, że w zestawieniu nie zostały podane oddzielnie te publikacje, które stanowią podstawę pracy doktorskiej. Nie mniej współautorstwo w tych artykułach opublikowanych w latach 2015-2020, który obejmował czas studiów doktoranckich, jest

potwierdzeniem Jej dużego zaangażowania w pracach badawczych zespołu Promotora. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka swoją pracę doktorską realizowała w ramach grantu badawczego Preludium 13 (2017-2020). Jej aktywność konferencyjną potwierdzają zaprezentowane postery (16) oraz wygłoszone w jęz. polskim komunikaty (6) i referat w ramach Wirtualnej Konferencji Młodych Przyrodników.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki wskazują na duży potencjał materiałów polimerowych, których właściwości degradowalne oraz zdolności do transportowania i uwalniania związków biologicznie aktywnych z ukierunkowaniem na herbicydy mogą być regulowane poprzez skład polimeru lub jego mieszaniny, jak również odpowiednią postać nośnika, w tym przypadku uformowanego w mikrosfery. Sposób przedstawienia badań i interpretacja wyników nie budzą zastrzeżeń merytorycznych, chociaż niektóre zagadnienia wymagają uporządkowania lub wyjaśnienia:

1) W nawiązaniu do tekstu na str. 53-54 informacje są nieściśle, zatem należałoby odpowiedzieć na następujące pytania. Jaka jest różnica pomiędzy polimerem gwiazdzistym a szczepionym? Kiedy struktury gwiazdziste mogą być zaliczone do polimerów szczepionych? W jaki sposób można otrzymać polimery zawierające 2 rodzaje łańcuchów bocznych czyli polimery szczepione typu Janus? Jakie są podstawowe techniki szczepienia?

2) Czy rzeczywiście sformułowanie „Poprzez kopolimeryzację poli(L-laktydu) z politlenkiem etylenu” str. 64 jest właściwe w odniesieniu do kopolimeru liniowego? Jak należy rozumieć zapis „poli(L-laktyd-ko-politlenek etylenu)”?

3) W przypadku „PLLA o średniej liczbowo masie cząsteczkowej od 78 do 100 g/mol i dyspersji mas cząsteczkowych $D \sim 1.4$ ” (str. 48) trudno jest używać pojęcia polimer, skoro masa cząsteczkowa kwasu mlekowego wynosi 90 g/mol, a dla laktydu 144 g/mol. Dlaczego „poli(tlenek etylenu) zwyczajowo nazywany glikolem etylenowym” jest opisany wzorem ogólnym $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ z jedną grupą hydroksylową (str. 50)?

4) Czy można mówić o terpolimeryzacji, jeżeli udział biorą dwa monomery, niezależnie od tego, że efektem jest łańcuch polimeru zawierający 3 rodzaje jednostek powtarzalnych?

5) Zgodnie z podaną informacją „testowano również kopolimeryzację tych oligosacharydów z L-laktydem i cyklicznymi węglanami” str.131. Jednak ze schematu 4.3.1. wynika inaczej niż wskazuje na to powyższy fragment. Podobnie jest „W wypadku kopolimeryzacji kaprolaktonu z dużą ilością dekstryny” (str. 134-135, str. 102). Z kolei dla „dekstryny modyfikowanej poprzez reakcje grup hydroksylowych z kaprolaktonem” należy oczekiwać zmiany podstawnika, co też częściowo potwierdza zapis „maltodekstryna-g-CL” (str. 148) niż przyłączenia łańcucha. Przy tej okazji warto zastanowić się kiedy należy używać pojęcia stopień podstawienia określonej grupy funkcyjnej, a kiedy stopień szczepienia?

6) Charakterystyka użytych oligosacharydów jako wielofunkcyjnych makroinicjatorów, a dokładniej wskazanie średniej ilości jednostek powtarzalnych, ułatwiłaby zdefiniowanie topologii gwiazdzistej czy szczeniowej dla otrzymanych polimerów na bazie dekstryny lub maltodekstryny.

7) Rys. 4.3.3. przedstawia termogramy DSC dla dekstryna-g-PCL, jednak nie podano informacji, który to kopolimer lub kopolimery?

8) Mieszanki polimerowe przygotowano z udziałem kopolimerów triblokowych zawierających segment PEG (str. 138), ale nie jest doprecyzowane o jakim ciężarze cząsteczkowym (4 tys. vs 10 tys. g/mol) i zawartości (10% vs 20%).

9) Wyraźne obniżenie ilości uwolnionego pestycydu w 4-5 tygodniu na rys. 4.4.2.2 (str. 171) można tłumaczyć jako następstwo efektu „wyrzutu”, a jak wyjaśnić wzrost i kolejny spadek w 8-10 tygodniu.

Generalnie rozprawa jest napisana językiem poprawnym, chociaż Autorce nie udało się uniknąć takich błędów jak: skróty myślowe (np. lepsza kinetyka str. 51, piki H2, H4 str.132); niewyjaśnione skróty (np. PBS, NPK, mPEG); wymienne stosowanie terminów masa cząsteczkowa vs ciężar cząsteczkowy; niefortunne sformułowania (wybitnie semikrystaliczne str 35, liniowy polisacharyd przerwany przez silnie rozgałęzione regiony str.53, wyższa szybkość str.61); czy też w odniesieniu do rysunków i tabel (np. rys. 4.2.1.2. opis niezgodny z legendą, brak rys. 4.2.2.2.4., tab.4.2.1. brak M_w/M_n). Ponadto ze względu na różnorodne zapisy warto byłoby przypomnieć podstawowe zasady nazewnictwa polimerów (poli(laktyd), ale polisacharydy str.7, poli(hidroksykwas) str. 34, ale politereftalan etylenu str.39, PLGA - kwas poli-D,L-mlekowy-koglikolowy str. 48, poli(kopolimer kwasu akrylowego) str. 76, politlenek etylenu, poli(glikol etylenowy) zamiast glikol polietylenowy).

Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam wysoko, Autorka podjęła się z zadowalającym efektem zaprojektowania degradowalnych materiałów polimerowych wykorzystując kontrolowaną metodę polimeryzacji insercyjno-koordynacyjnej i wskazując ich potencjalne zastosowanie w układach kontrolowanego dostarczania substancji o działaniu chwastobójczym. Recenzowana praca spełnia kryterium nowości naukowej, co zostało udokumentowane artykułami opublikowanymi w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym znajdujących się na liście filadelfijskiej. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymagania „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym...” z dnia 18 marca 2011 r i wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Kamili Lewickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.