



Politechnika Łódzka

Wydział Chemiczny

Prof. dr hab. inż. Tomasz Janecki

Politechnika Łódzka

Instytut Chemii Organicznej

Ul. Żeromskiego 116

90-924 Łódź

Tel: (+42) 631-32-20

E-mail: tomasz.janecki@p.lodz.pl

Łódź, 03.10.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Krzysztofa Żelechowskiego
pt. „Zastosowanie reakcji cykloaddycji 1,3-dipolarnej nitronów do syntezy nowych
pochodnych izoksazolidyny jako potencjalnych środków ochrony roślin”**

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska magistra inż. Krzysztofa Żelechowskiego powstała w wyniku badań prowadzonych pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Marka Gołębińskiego w, jak się domyślam, Instytucie Przemysłu Organicznego w Warszawie. Niestety, w rozprawie nie znalazłem na ten temat żadnej informacji. Recenzję sporządziłem na prośbę Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej, prof. dr hab. inż. Janusza Zachary.

W ramach przedstawionej rozprawy Doktorant przeprowadził syntezę nowych pochodnych amidów kwasów 2-difenylo-metylo-3-aryloizoksazolidyno-5-karboksylowych zawierających różne grupy aryłowe i różne podstawniki na amidowym atomie azotu. Do utworzenia pierścienia izoksazolidynowego wykorzystał 1,3-dipolarną addycję nitronów do estrów kwasu akrylowego. Przeprowadził też analizę zależności między strukturą otrzymanych związków (rodzajem podstawnika w pierścieniu fenyłowym i rzędowością amidu) a ich aktywnością fungicydową. Inspiracją dla tych badań były prace prowadzone w zespole prof. Gołębińskiego, z których wynikało, że amidy kwasów 4,5-dihydroizoksazolo-5-karboksylowych, będące nienasyconymi analogami zsyntezowanych przez Doktoranta związków, mają interesujące właściwości biologiczne, a w szczególności są pestycydami.

Ocena formalna

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter badawczy i zawiera 173 strony. Zbudowana jest w sposób klasyczny, charakterystyczny dla rozpraw doktorskich i obejmuje Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis treści, Wstęp z zarysowanym celem pracy, Część literaturową przedstawiającą aktualny stan wiedzy związanej z tematyką

rozprawy (61 stron), Wyniki badań własnych (17 stron), Wnioski (1 strona), Część doświadczalną zawierającą procedury syntetyczne i analizę fizykochemiczną otrzymanych pochodnych (60 stron), wykaz stosowanych skrótów oraz spis tabel, rysunków i schematów reakcji. Uzupełnieniem treści rozprawy jest Bibliografia licząca 276 pozycji. Oddzielny załącznik przedstawia dorobek naukowy Doktoranta, na który składa się jedenaście publikacji, w tym dziewięć z tzw. „listy filadelfijskiej” o sumarycznym IF ~18,6 oraz cztery patenty. Doktorant był wykonawcą w trzech grantach oraz brał udział w jednej konferencji krajowej.

Podsumowując uważam, że pod względem formalnym sposób prezentacji rozprawy jest przejrzysty a zawartość merytoryczna poszczególnych części poprawnie opisana, co bardzo ułatwia ich czytanie.

Ocena merytoryczna

Część literaturowa

Podstawowym celem części syntetycznej rozprawy było opracowanie efektywnej metody syntezy biblioteki różnorodnie podstawionych amidów kwasów 2-difenylometylo-3-aryloizoksazolidyno-5-karboksylowych, w której głównym etapem była 1,3-dipolarna addycja nitronów do estrów kwasu akrylowego. Autor planował też przeprowadzenie analizy zależności między strukturą otrzymanych związków, a ich aktywnością grzybobójczą. Z tego względu Część literaturowa rozpoczyna się omówieniem rodzajów reakcji cykloaddycji [3+2], z podziałem na różne typy 1,3-dipoli oraz dipolarofili stosowanych w tych addycjach oraz przypomnieniem mechanizmu i stereochemii tej reakcji. Następnie, w interesujący sposób podane są zastosowania reakcji cykloaddycji [3+2] w syntezie pestycydów. W kolejnym rozdziale omówione są różne, opisane w literaturze modyfikacje struktury komercyjnych pestycydów, polegające między innymi na zmianie pierścienia, jego zamknięciu lub otwarciu, cyklizacji fragmentu cząsteczki czy zmianie grupy funkcyjnej, które prowadziły do bardziej aktywnych analogów. W ostatnim rozdziale mówione zostały związki naturalne, które wykorzystywane są jako środki ochrony roślin, lub które posłużyły jako związki modelowe w syntezie komercyjnych pestycydów. W mojej ocenie część teoretyczna dobrze wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy dotyczącej omawianych w rozprawie zagadnień i bardzo dobrze świadczy o przygotowaniu doktoranta do realizacji zamierzonego celu badań.

Lektura tego fragmentu rozprawy nasuwa jednak kilka uwag krytycznych. Pierwsza dotyczy tytułu pierwszego fragmentu Części literaturowej: „Zastosowanie reakcji [3+2] cykloaddycji w syntezie organicznej.” Jest on zdecydowanie zbyt ogólny, bo omówione są tylko te reakcje [3+2] cykloaddycji, które znalazły zastosowanie w syntezie pestycydów. Druga uwaga wiąże się z nazewnictwem. Niektóre nazwy kwasów karboksylowych nie są poprawne, np. kwas cykloheksylowy czy kwas pirydynowy (str. 12). Prawidłowa nazwa to kwas cykloheksanokarboksylowy czy kwas pirydynokarboksylowy. Również kwas1H-pirazol-3 karboksylowy powinien być nazwany kwasem1H-pirazolo-3-karboksylowym (str. 35), 3-N-acetylofenol - 3-acetyloaminofenolem (str. 36), a propanal-1 po prostu propanalem (str 42). Na stronie 32 opisana jest „addycja Michaela”, a powinno się raczej napisać „addycja oksa-Michaela”. Słowa dirodnik i intermediat (str. 20) zastąpiłbym

słowa: dwurodnik i związek pośredni. W rozważaniach dotyczących synchronicznego lub asynchronicznego przebiegu reakcji dipolarnej [3+2] cykloaddycji (str. 20) cytowany odnośnik nr 56 dotyczy reakcji cykloaddycji [2+2], a konkretnie dekarboksylacji 2-oksetanów. Natomiast odnośnik 29 jest dla mnie zagadką. Nie znalazłem skrótu Rev. J. Chem. w indeksie Web of Science. Autor Buzykin B. I. występuje co prawda w bazie Scopus ale brak artykułu z takim skrótem wśród jego prac. Czytanie części literaturowej ułatwiłoby wyróżnienie w jakiś sposób, np. większą czcionką czy tłustym drukiem, podtytułów rozdziałów. Ułatwieniem byłaby też numeracja związków na schematach, a nie tylko podawanie ich nazw w tekście. W rozdziale 2.2 Części literaturowej już taka numeracja jest stosowana, ale błędem jest pisanie numerów związków w nawiasie, gdy nie jest podana ich pełna nazwa chemiczna.

Badania własne

Badania własne opisane zostały na kolejnych 17 stronach. Synteza amidów kwasów 2-difenylo-metylo-3-aryloizoksazolidyno-5-karboksylowych przeprowadzona została w siedmioetapowej sekwencji reakcji. Najpierw Doktorant otrzymał N-difenylo-metylohydroksyloaminę w reakcji reduktywnej aminacji, wychodząc z benzofenonu i chlorowodoru hydroksyloaminy. Sprawdził przy tym kilka literaturowych metod syntezy tego związku i wybrał tę, która w Jego rękach okazała się najefektywniejsza. N-difenylo-metylohydroksyloamina użyta została następnie w reakcjach kondensacji z aldehydem benzoowym i jego pochodnymi zawierającymi w pozycji *para* podstawniki o zróżnicowanym charakterze elektronowym, zarówno elektronoakceptorowe (CF₃, Cl) jak i elektronodonorowe (*i*-Pr, OMe). Otrzymane w ten sposób N-tlenki-N-arylideno-N-difenylo-metyloamin wykorzystane zostały w, kluczowej dla całej syntezy, reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji z estrem etylowym i *t*-butylowym kwasu akrylowego. Reakcję prowadzono w temperaturze 100 °C z nadmiarem estru kwasu akrylowego, bez udziału katalizatora. Głównymi produktami były zawsze regioizomery 3,5-izoksazolidyny o konfiguracji *trans*, powstające z wydajnością od 63% do 73%. Powstawał również regioizomer 3,4 o konfiguracji *trans*, ale w niewielkiej ilości. Nie zaobserwowano natomiast powstawania izomerów *cis*. Surowe produkty oczyszczano przez krystalizację. Struktura otrzymanych estrów kwasów *trans*-2-difenylo-metylo-3-aryloizoksazolidyno-5-karboksylowych została jednoznacznie potwierdzona metodami spektroskopowymi (¹H i ¹³C NMR) oraz wysokorozdzielczą spektrometrią mas. Przekształcenia otrzymanych estrów etylowych kwasów *trans*-2-difenylo-metylo-3-aryloizoksazolidyno-5-karboksylowych w odpowiednie amidy dokonano przez ich zasadową hydrolizę do odpowiednich kwasów, przekształcenie kwasów w chlorki kwasowe za pomocą chlorku tionylu lub oksalilu i reakcję chlorków kwasowych z wybranymi aminami. Natomiast aby otrzymać amidy kwasów *trans*-2-difenylo-metylo-3-(4-metoksyfenylo)izoksazolidyno-5-karboksylowych wykorzystano ester *tert*-butylo- kwasu *trans*-2-difenylo-metylo-3-(4-metoksyfenylo)izoksazolidyno-5-karboksylowego, który w obecności chlorku tionylu i kwasy solnego przekształcał się w chlorek kwasowy, a ten posłużył do N-acylowania wybranych amin. W sumie Doktorant otrzymał w ten sposób 80 amidów z różnymi podstawnikami w pierścieniu fenylowym i na amidowym atomie azotu.

Druga część tego fragmentu pracy dotyczy badań otrzymanych amidów na aktywność fungicydową, które wykonała pani mgr Maria Krawczyk z Pracowni

Skuteczności Biologicznej BT-6 Instytutu Przemysłu Chemicznego. Badania przeprowadzono na czterech rodzajach grzybów: *Botrytis cinerea* (aktywność powyżej 20% wykazało 17 amidów), *Fusarium culmorum* (aktywność powyżej 20% wykazało 10 amidów), *Phytophthora cactorum* (aktywność powyżej 20% wykazało 21 amidów) i *Rhizoctonia solani* (aktywność powyżej 20% wykazało 25 amidów). Otrzymane wyniki są dość obiecujące, bo w każdej z czterech grup przynajmniej jeden z otrzymanych amidów wykazywał aktywność powyżej 70%, a w przypadku *Rhizoctonia solani* dwa z przebadanych amidów miały aktywność powyżej 80%. Autorowi udało się też ustalić pewne zależności między strukturą a aktywnością fungicydową. Okazało się na przykład, że najaktywniejsze są amidy z niepodstawioną grupą fenylową w pozycji 3 izoksazolidyny. Wyjątkiem były drugorzędowe amidy wywodzące się z 3-aminometylopirydyny i etanoloaminy, które były aktywne niezależnie od rodzaju podstawnika w pierścieniu fenylowym. Natomiast zależność aktywności fungicydowej otrzymanych amidów od ich polarności okazała się nieznacząca.

Warto podkreślić, że zarówno wykorzystana metodologia syntetyczna jak i część otrzymanych amidów zostały opisane w publikacji, która ukazała się w Monatshefte für Chemie z roku 2015 (odn. 269), gdzie Doktorant jest pierwszym autorem. Przedstawiona rozprawa jest jednak znaczącym rozszerzeniem tej publikacji, głównie jeżeli chodzi o ilość otrzymanych końcowych amidów.

Uwagi krytyczne i dyskusyjne

- 1) Doktorant pisze, że w planowanych reakcjach dipolarnej cykloaddycji istotną rolę odegrał dobór podstawnika przy atomie azotu, a „wstępne eksperymenty z użyciem N-(fenylo)benzylo-N-tlenku (czy chodzi o N-(fenylo)benzylideno-N-tlenek?) w reakcji z akrylanem etylu dały złożoną mieszaninę produktów” (str. 79). Niejasne jest dla mnie uzasadnienie zmiany podstawnika na atomie azotu z fenyłowego na difenylometylowy w celu poprawy efektywności tej reakcji. Autor powołuje się na pracę Hashimoto i in. (odn. 266) gdzie, jak twierdzi, ustalono, że rozbudowana sterycznie grupa difenylometylowa faworyzuje regio i stereoselektywność reakcji cykloaddycji. W cytowanej pracy rzeczywiście zamiana na atomie azotu nitronu grupy benzyłowej na difenylometylową zdecydowanie poprawiła wydajność reakcji z metakroleiną, tyle że rolą grupy difenylometylowej była destabilizacja kompleksu nitronu z użytym w tej reakcji kwasem Lewisa, który niekorzystnie oddziaływał z atomem tlenu nitronu. Co więcej, regioselektywność reakcji się nie zmieniła a stereoselektywność tylko nieco poprawiła. Doktorant natomiast prowadził reakcje cykloaddycji bez użycia kwasu Lewisa więc powoływanie się na tę pracę nie wydaje się zasadne.
- 2) Nie jest dla mnie jasne co autor chciał powiedzieć pisząc na stronie 80: „Położenie podstawników w pozycji 4 pierścienia benzenowego powinno pokazać wpływ efektu elektronowego podstawnika R1 na naturę pochodnych amidów kwasów izoksazolidyno-5-karboksylowych, natomiast efekt steryczny podstawników można zaniedbać.” Wydaje się, że na naturę pochodnych amidów kwasów izoksazolidyno-5-karboksylowych, a więc i na ich aktywność fungicydową, wielkość podstawnika

R1 może mieć bardzo znaczący wpływ, np. poprzez zmianę oddziaływań z receptorem.

- 3) Stwierdzenie: „Technika ta pozwala na znajdowanie korelacji między atomami protonów...” (str. 83), należałoby zastąpić zdaniem „Technika ta pozwala na znajdowanie korelacji między protonami...”
- 4) Na Rysunku 50 autor przedstawił stany przejściowe prowadzące do adduktów 3,5-endo i 3,4-endo podpisane na rysunku odpowiednio, jako Z-egzo i Z-endo. Co oznacza litera Z ? Oznaczenie górnego stanu przejściowego jako egzo jest błędne, bo grupa etoksykarbonylowa znajduje się nad nitronem, czyli w pozycji endo. Błędny jest zatem również opis na str. 83, bo izomer 3,5-trans powstaje w wyniku podejścia endo.
- 5) Stwierdzenie na stronie 84, że „Pochodne izoksazolidyny wykazują konformację kopertową z atomem tlenu umieszczonym poza płaszczyzną [270, 271]” jest mylące i nieprawdziwe. Tylko w jednej z cytowanych publikacji (odn. 271) znajduje się takie stwierdzenie i dotyczy ono konformacji konkretnej pochodnej izoksazolidyny w ciele stałym. W drugiej publikacji (odn. 270) wykonano analizę rentgenograficzną dla innej pochodnej izoksazolidyny i ustalono, że to atom azotu leży poza płaszczyzną utworzoną przez cztery pozostałe atomy pierścienia. Dodatkowo, trzeba pamiętać, że te ustalenia dotyczą konformacji w ciele stałym, a nie w roztworze. Tak więc, dokonane przez Doktoranta uogólnienie dotyczące konformacji pierścienia izoksazolidyny jest całkowicie nieuprawnione.
- 6) Autor przeprowadza analizę konformacyjną otrzymanych adduktów (str. 84) i stwierdza, że grupa aryłowa i estrowa są w położeniach pseudoekwatorialnych. Nie jest jednak podane w jaki sposób oszacowano kąty dwuścienne H5/H4a i H3/H4a. Dla potrzeb takiej analizy bardzo pomocny byłby odpowiedni rysunek konformerów z grupami aryłową i estrową zarówno w położeniu pseudodiekwarorialnym jak i pseudodiaksjalnym, z zaznaczeniem kątów dwuściennych między odpowiednimi protonami i odpowiadających im w przybliżeniu stałych sprzężenia. Trzeba też pamiętać, że labilność konformacyjna pierścienia pięciocłonowego jest duża i do takich analiz trzeba podchodzić z ostrożnością.
- 7) Amidy kwasów *trans*-2-difenylometyloizoksazolidyno-5-karboksylowych z grupą 4-metoksyfenyłową w pozycji 3 otrzymane zostały z estru *tert*-butylowego a pozostałe amidy z estrów etylowych kwasów *trans*-2-difenylometylo-3-aryloizoksazolidyno-5-karboksylowych. W pracy brak wyjaśnienia dlaczego w jednym przypadku okazało się konieczne zastosowanie estru *tert*-butylowego.

Część doświadczalna

Część doświadczalna rozprawy jest bardzo obszerna i zajmuje 60 stron. Są tam szczegółowo opisane procedury syntetyczne oraz wyniki badań fizykochemicznych wszystkich otrzymanych związków, w tym opisy widm ^1H i ^{13}C NMR oraz analiza masowa

HRMS. Opisy preparatywne są dokładne i pozwalają na precyzyjne odtworzenie procedur eksperymentalnych. Opisy widm NMR są zgodne z przyjętymi standardami i zawierają przypisanie sygnałów do konkretnych protonów. Bardzo pomocne dla czytelnika są załączone struktury opisywanych związków. Część ta napisana jest bardzo przejrzysto, a autor trzyma się ustalonego schematu.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że Doktorant wykazał się dobrą znajomością tematyki rozprawy doktorskiej i zrealizował założone cele badawcze zgodnie ze standardami naukowymi. Rozprawa stanowi istotny i oryginalny wkład w rozwój nowych związków o działaniu przeciwgrzybicznym. Doktorant zidentyfikował nowe pochodne izoksazolidyny, które mogą być strukturami wiodącymi do dalszych badań. Przedstawione uwagi krytyczne bądź dyskusyjne nie wpływają w znaczący sposób na wartość naukową rozprawy. Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Żelechowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

