

dr Małgorzata Materska  
Uniwersytet Przyrodniczy  
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii  
Katedra Chemii  
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin  
Tel.: (81) 445 66 38  
e-mail: [malgorzata.materska@up.lublin.pl](mailto:malgorzata.materska@up.lublin.pl)

## **Załącznik 2**

---

### **AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM**

---

Lublin 2014

## 1. Dane osobowe:

Imię i nazwisko: **Małgorzata Materska**

Miejsce pracy: Uniwersytet Przyrodniczy  
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii  
Katedra Chemii  
ul. Akademicka 15  
20-950 Lublin

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- 2002     **doktor nauk rolniczych** w zakresie technologii żywności i żywienia – specjalizacja chemia żywności, Akademia Rolnicza w Lublinie (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie).
- 1996     **magister chemii**, w zakresie chemii podstawowej i stosowanej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Jednolite stacjonarne studia magisterskie.

## 3. Doświadczenie zawodowe

- 01.10.2002 – do chwili obecnej - **adiunkt** w Katedrze Chemii Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.
- 01.10.1996 – 30.09.2002 – **asystent** naukowo-dydaktyczny w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (wcześniej Akademii Rolniczej w Lublinie).

## 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust 2. ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

### a/ tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl publikacji naukowych pod tytułem: „*Badania wpływu struktury wybranych związków fenolowych pozyskiwanych z owoców papryki *Capsicum annuum* L. na aktywność biologiczną oznaczoną w różnych układach modelowych.*”

### b/ autor/ autorzy publikacji, rok wydania, nazwa publikacji

**O1. Materska M.** (2012). The scavenging effect and flavonoid glycosides content in fractions from fruits of hot pepper *Capsicum annuum* L. Acta Sci. Pol., Technologia Alimentaria, 11(4), 363-371, ISSN 1644-0730. **(9 pkt.)\***

**O2. Materska M.** (2014). Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). Journal of Functional Foods, 7, 269-277. **(35 pkt.\*, IF=4,480\*; 4,462\*\*)**

- O3. Materska M.** (2008). Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, Vol. 58, No4, 407-413. ISSN 1230-0322 (**6 pkt\***)
- O4. Materska M.,** Konopacka M., Rogoliński J., Ślosarek K. (**2015**). Antioxidant activity and protective effects against oxidative damage of human cells induced by X-radiation of phenolic glycosides isolated from pepper fruits *Capsicum annuum* L. Food Chemistry, 168, 546-553. (**40 pkt.\*, IF=3,259\*; 3,867\*\***)
- O5. Materska M.** (2015). Flavone C-glycosides from *Capsicum annuum* L: relationships between antioxidant activity and lipophilicity. European Food Research and Technology, DOI: 10.1007/s00217-014-2353-2. (**30 pkt.\*, IF=1,387\*; 1,818\*\***)

Łącznie:

Impact Factor: 9,126\*; 10,147\*\*

Punkty MNiSW: 120\*

\* obowiązujące w roku wydania publikacji

\*\* średni pięcioletni IF, zgodnie z aktualnymi danymi w bazie Journal Citation Reports

Wkład Wnioskodawcy w wymienione publikacje obejmuje: autorstwo hipotez i koncepcji badań, wykonanie analiz chemicznych, opracowanie i dyskusję wyników oraz przygotowanie manuskryptów. Oświadczenia współautorów pracy **O4**, określające ich indywidualny wkład w powstanie publikacji znajdują się w **Załączniku 6**.

#### **c/ omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Jako kierownik i główny wykonawca projektu nr: N312 021 32/1491 pod tytułem „Izolacja i identyfikacja pochodnych kwasów fenolowych i flawonoidów z owocni papryki *C. annuum* L. oraz badanie ich właściwości pod względem aktywności antyoksydacyjnych, antyrodnikowych, redukcyjnych i ochronnych w stosunku do promieniowania  $\gamma$ .” w latach 2007-2012 wykonywałam prace badawcze oraz przeprowadziłam wnikliwe studia literaturowe dotyczące zależności pomiędzy strukturą a właściwościami związków fenolowych. Uzyskane rezultaty opublikowałam w postaci cyklu prac (**O1-O5**), które uważam za swoje największe osiągnięcie w dotychczasowej działalności naukowej i przedkładałam jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

#### **Wprowadzenie i cel naukowy**

Związki fenolowe stanowią rozległą grupę roślinnych metabolitów wtórnych o korzystnych dla zdrowia właściwościach chemicznych i biologicznych. Udokumentowanym jest fakt, że wiele z nich to naturalne antyoksydanty wspomagające system ochrony

organizmu przed szkodliwym działaniem wolnych rodników [1]. Obecność wolnych rodników wpływa na wzrost stresu oksydacyjnego, w wyniku którego w komórkach zachodzą reakcje utleniania i redukcji. W chwili zachwiania równowagi pomiędzy stężeniem oksydantów (wolnych rodników) i antyoksydantów (systemu ochrony przed wolnymi rodnikami) reakcje te mogą prowadzić do szeregu niekorzystnych zjawisk. Należy tu wymienić przyspieszenie procesu starzenia się komórek, rozwój chorób neurodegeneracyjnych, a także rozwój chorób nowotworowych [1, 2]. Związki fenolowe działające jako antyoksydanty stanowią cenny składnik diety owocowo-warzywnej, ale także mogą być wykorzystywane jako wzbogacające żywność dodatki lub konserwanty żywności, w zastępstwie syntetycznych, co cieszy się coraz większym zainteresowaniem konsumentów [3]. Poza przemysłem spożywczym, istnieje także możliwość wykorzystania tej grupy związków w kosmologii, farmacji i medycynie. W każdej z wymienionych dziedzin gospodarki, a szczególnie w dwóch ostatnich niezbędna jest dokładna wiedza na temat spektrum działania danej substancji przed jej dalszym wykorzystaniem.

W ciągu ostatnich lat przeprowadzono szereg badań nad ustaleniem zależności pomiędzy strukturą, a aktywnością biologiczną związków fenolowych. Wyniki tych badań wskazują wyraźnie na obecność określonych grup funkcyjnych w cząsteczce flawonoidów i kwasów fenolowych, które determinują ich aktywność w wybranym układzie modelowym [4, 5]. Jednak badania te dotyczyły głównie wolnych aglikonów flawonoidów oraz kwasów fenolowych, które pozyskiwano na drodze hydrolizy ekstraktów roślinnych, bądź syntezy organicznej. Proces hydrolizy jest destrukcyjny dla bogactwa pochodnych związków fenolowych, a w efekcie otrzymuje się mniejszą ich liczbę o zmodyfikowanej aktywności. Dodatkowo silnie kwaśne lub silnie zasadowe środowisko warunków hydrolizy może przyspieszać degradację związków aktywnych chemicznie. W prezentowanych badaniach (**O1-O5**) związki fenolowe pozyskiwano w postaci naturalnej nie ingerując w skład chemiczny otrzymanych ekstraktów. Dokładano jednocześnie maksymalnych starań, aby zmniejszyć wpływ czynników zewnętrznych na zmiany jakościowo-ilościowe w otrzymanych ekstraktach. Informacje podane w literaturze światowej na temat aktywności naturalnie występujących w świecie roślinnym pochodnych glikozydowych związków fenolowych są fragmentaryczne. Wynika to z niewielkiego stężenia tych związków w roślinie oraz problemów analitycznych związanych z ich wyodrębnianiem i identyfikacją.

W przedstawionym cyklu badań stanowiącym Osiągnięcie naukowe pochodne flawonoidów i kwasów fenolowych pozyskiwano z owocni papryki (*Capsicum annuum* L.) za

pomocą metody preparatywnej chromatografii cieczowej. Zidentyfikowane związki, które otrzymano w wystarczających ilościach analizowano pod względem aktywności antyoksydacyjnej, antyrodnikowej i radioochronnej. Starano się określić, czy zależności pomiędzy strukturą, a aktywnością związku zdefiniowane dla aglikonów mogą odnosić się do aktywności ich pochodnych. Hipoteza badawcza prezentowanych badań brzmiała następująco: aktywność biologiczna pochodnych związków fenolowych jest inna niż ich aglikonów.

**Cykl badań przedstawiony jako Osiągnięcie naukowe składa się z następujących głównych wątków:**

1. Wyodrębnianie występujących naturalnie w owocniach papryki związków fenolowych za pomocą metody preparatywnej chromatografii cieczowej oraz ich identyfikacja.
2. Określenie aktywności chemicznej i radioochronnej związków fenolowych w układach *in vitro*.
3. Wykazanie, zależności pomiędzy strukturą, lipofilnością i bioaktywnością związków fenolowych.

**1. Wyodrębnianie występujących naturalnie w owocniach papryki związków fenolowych za pomocą metody preparatywnej chromatografii cieczowej oraz ich identyfikacja.**

Wśród dostępnych metod izolacji związków z tkanek roślinnych, w przypadku frakcji związków fenolowych najpopularniejsze są ekstrakcja ciecz-ciecz oraz ekstrakcja do fazy stałej. Wynika to z różnorodnego charakteru fizycznego omawianych związków, gdyż w grupie tej można znaleźć substancje typowo hydrofilowe, o pośredniej hydrofilowości i lipofilowe. W badaniach prezentowanych jako Osiągnięcie, związki fenolowe stanowiły grupę o pośredniej lipofilowości, które separowano metodą ekstrakcji do fazy stałej stosując jako fazę stacjonarną żel krzemionkowy C18, a eluentem omawianej frakcji był 40% roztwór metanolu w wodzie. Ze względu na bogactwo pochodnych związków fenolowych występujących w owocach papryki, otrzymana tą metodą frakcja związków fenolowych (nazywana w skrócie frakcją 40%) stanowiła mieszaninę ponad 25 związków, które doczyszczano metodą średniociśnieniowej chromatografii cieczowej oraz w razie potrzeby metodą preparatywnej HPLC. W publikacji **O1** przedstawiono wyniki pierwszego etapu procesu doczyszczania frakcji 40% ze wskazaniem wydajności ekstrakcji związków fenolowych wyrażonych jako % masy otrzymanej frakcji oraz sumę fenoli w przeliczeniu na mg kwasu chlorogenowego na kg świeżych owoców papryki (oznaczonych metodą Folina-Ciocalteu). W omawianej pracy stwierdzono, że masa frakcji związków fenolowych, którą

doczyszczano w dalszych etapach prowadzenia procesu stanowiła 1,4% masy ekstraktu wyjściowego (co stanowiło 0,12% masy wyjściowej owoców papryki), a jednocześnie zawierała 9% związków fenolowych oznaczonych jako suma w porównaniu do ekstraktu wyjściowego. W pracy **O1** proces izolacji prowadzono ze świeżych owoców papryki odmiany Capel Hot, a wyjściowa masa owoców wynosiła 1100 g. Powyższy kierunek badawczy przyczynił się do osiągnięcia poznawczego na temat skali, w jakiej należy przeprowadzić analizę preparatywną, aby zamierzona procedura zakończyła się sukcesem. Wiedzę tę wykorzystano też w kolejnej preparatyce, którą prezentowano w pracy **O4**, gdzie wykorzystano liofilizowane owoce tej samej odmiany papryki w ilości 360 g.

Nadrzędnym celem prowadzenia rozdziału frakcji związków fenolowych za pomocą chromatografii preparatywnej było otrzymanie czystych substancji w jak największych ilościach, aby poza ustaleniem ich struktury, można było oznaczyć eksperymentalnie ich właściwości chemiczne. Prezentowany jako Osiągnięcie cykl prac jest wynikiem przeprowadzenia w sumie trzech rozdziałów frakcji związków fenolowych w skali preparatywnej. Jako wynik tego etapu postępowania otrzymano 10 w pełni zidentyfikowanych związków. W grupie tej znajdowały się pochodne dwóch kwasów fenolowych: ester  $\beta$ -D-glukopiranozydowy kwasu *trans*-p-ferulowego oraz ester  $\beta$ -D-glukopiranozydowy kwasu *trans* synapinowego, dwie pochodne kwercetyny: 3-O-( $\alpha$ -ramnopiranozyd)-7-O-( $\beta$ -glukopiranozyd) kwercetyny oraz 3-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranozyd) kwercetyny, pięć pochodnych luteoliny: 6,8-di-C-( $\beta$ -D-glukopiranozyd) luteoliny; 6-C-( $\beta$ -D-glukopiranozyd) luteoliny; 6-C-( $\beta$ -D-glukopiranozyd)-8-C-( $\alpha$ -D-arabinofuranozyd) luteoliny; 7-O-[2-( $\beta$ -D-apiofuranozydo)- $\beta$ -D-glukopiranozyd] luteoliny; 7-O-[2-( $\beta$ -D-apiofuranozydo)-4-( $\beta$ -D-glukopiranozydo)-6-(malonylo)- $\beta$ -D-glukopiranozyd] luteoliny, a także jedna pochodna apigeniny: 6-C-( $\beta$ -D-glukopiranozyd)-8-C-( $\alpha$ -D-arabinofuranozyd) apigeniny.

Identyfikacja wspomnianych związków opierała się na wykorzystaniu ogólnie przyjętych i stosowanych w tego rodzaju analizie technik rozdzielczych, spektrometrycznych i spektroskopowych. Każdy związek scharakteryzowano pod względem czasu retencji w analizie chromatograficznej, wykonano jego widmo UV-Vis, analizę MS oraz analizy  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. W analizie chromatograficznej, warunkiem koniecznym w celu właściwej identyfikacji związku jest wykonanie chromatogramu wzorca badanej substancji w tych samych warunkach rozdziału. Wymierną korzyścią będącą wynikiem przeprowadzonych procedur było pozyskanie 10 wzorców pochodnych kwasów fenolowych i flawonoidów, które stanowią cenny zasób substancji wzorcowych Pracowni Fitochemii. Analiza

chromatograficzna z wykorzystaniem detektora fotodiodowego pozwoliła określić widma UV-Vis analizowanych związków. Jest to szczególnie użyteczne przy wstępnej kontroli czystości pików, gdyż odczyt przy jednej, lub nawet dwóch długościach fal nigdy nie daje gwarancji, że analizowana jest pojedyncza substancja. Dopiero analiza metodą spektrometrii masowej (MS) pozwalała na jednoznaczne stwierdzenie, że dany związek jest czysty. Pierwszą uzyskaną informacją będącą wynikiem tej analizy jest czystość związku, drugą jego masa cząsteczkowa, a w następnej kolejności, po analizie wtórnych widm fragmentacyjnych (analiza MS<sup>2</sup>, MS<sup>3</sup>) można uzyskać informację o budowie badanej cząsteczki. Identyfikacja związków na podstawie analizy podstawowych i wtórnych widm masowych, przy braku wzorców tych substancji jest pracochłonna i nie zawsze przynosi oczekiwany efekt, dlatego analizę MS na tym etapie wykorzystuje się do określenia czystości związku oraz jego masy cząsteczkowej. Ułatwia to dalszy etap analiz, jakim jest spektroskopia <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR. Związki prezentowane w Osiągnięciu były już zidentyfikowane we wcześniejszych badaniach, a wyniki tych analiz przedstawiono w publikacjach **II.A.2** oraz **II.B.3** oraz w sprawozdaniu końcowym z osiągniętych wyników w kierowanym przeze mnie projekcie badawczym nr: N312 021 32/1491, pt: „Izolacja i identyfikacja pochodnych kwasów fenolowych i flawonoidów z owocu papryki *C. annuum* L. oraz badanie ich właściwości pod względem aktywności antyoksydacyjnych, antyrodnikowych, redukcyjnych i ochronnych w stosunku do promieniowania  $\gamma$ ”. Zatem posiadając wzorce tych substancji, można było wykonać analizy porównawcze, ułatwiające identyfikację związków w toku kolejnych rozdziałów preparatywnych oraz wykorzystać je do przygotowania krzywych kalibracyjnych, które stosowano w dalszych oznaczeniach ilościowych.

Zbiór informacji dotyczących kwercetyny i jej pochodnych, którą przedstawiłam w pracy przeglądowej **O3** wskazuje wyraźnie, że występujące najczęściej w przyrodzie pochodne tego flawonolu to *O*-glikozydy a głównym miejscem glikozylacji są grupy hydroksylowe przy atomach węgla C3 oraz C7. Jest to zgodne z wynikami eksperymentalnymi, które przedstawiłam w pracach **O1**, **O2** oraz **O4**. W pracach tych zamieściłam rezultaty kolejnych rozdziałów preparatywnych, w wyniku których wyodrębniłam i zidentyfikowałam dwa glikozydy tego związku, a były to 3-*O*-( $\alpha$ -ramnopiranozyd)-7-*O*-( $\beta$ -glukopiranozyd) kwercetyny oraz 3-*O*-( $\alpha$ -ramnopiranozyd) kwercetyny. Ponadto analiza ilościowa pochodnych kwasów fenolowych i flawonoidów przeprowadzona dla czterech odmian papryki, przedstawiona w pracy **O2** potwierdziła znany również z danych literaturowych fakt, że 3-*O*-( $\alpha$ -ramnopiranozyd) kwercetyny jest jednym z dominujących związków we frakcji

związków fenolowych [6, 7]. Drugim flawonoidem, który jako aglikon dominuje w owocach papryki jest luteolina. Pod względem ilościowym pochodne luteoliny stanowią z reguły mniejszy udział w sumie związków fenolowych, ale występuje tu większa ich różnorodność. Luteolina poza *O*-glikozydowymi połączeniami z cząsteczkami cukrów tworzy często połączenia *C*-glikozydowe, których obecność stwierdzono w owocach papryki [6, 7]. W pracy **O2** wykazano, że związkiem dominującym wśród pochodnych luteoliny jest 7-*O*-[2-( $\beta$ -D-apiofuranozydo)- $\beta$ -D-glukopiranozyd]. Wynik ten potwierdzają też dane literaturowe [6, 7].

## **2. Określenie aktywności chemicznej i radiochronnej związków fenolowych w układach *in vitro*.**

Z uwagi na to, że proces izolacji związków w skali preparatywnej i dalsze etapy ich doczyszczania są czasochłonne, równoległe z tym etapem moich badań prowadziłam dogłębne studia literaturowe na temat zależności pomiędzy strukturą, a aktywnością zarówno wolnych kwasów fenolowych i flawonoidów, jak też ich pochodnych. Wynikiem tych działań jest praca **O3**, w której scharakteryzowałam właściwości chemiczne i biologiczne kwercetyny oraz jej pochodnych, zgodnie z ówczesnym stanem wiedzy. Kwercetyna jest flawonoidem z grupy flawonoli i można stwierdzić że jest najdokładniej zbadanym związkiem wśród flawonoidów, co wynika z faktu jej powszechnego występowania w roślinach [8]. Związek ten wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne, antibakteryjne, antywirusowe i wiele innych, co wykazano w licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* [9, 10]. Z drugiej strony, wykazano również, że kwercetyna w pewnych warunkach może wykazywać aktywność prooksydacyjną [11] oraz cytotoksyczną [12, 13].

Aktywność antyoksydacyjna kwercetyny wynika z obecności w jej cząsteczce ugrupowań chemicznych, które wykazują zdolność do neutralizacji wolnych rodników zarówno na drodze przeniesienia elektronu (właściwości redukcyjne) ale także hamowania aktywności enzymów odpowiedzialnych za wytwarzanie reaktywnych form tlenu oraz chelatowania jonów metali prooksydacyjnych, głównie żelaza i miedzi [14]. Do głównych grup funkcyjnych, które determinują właściwości antyoksydacyjne flawonoidów (w tym kwercetyny) należą: grupa C3-OH w pierścieniu C w połączeniu z podwójnym wiązaniem pomiędzy atomami C2-C3 tego pierścienia, układ katecholowy (*orto* dihydroksylowy) w pierścieniu B, a także obecność grup hydroksylowych w pierścieniu A cząsteczki flawonoidu [14, 15].

Obecność podstawników w związkach fenolowych znacząco zmienia ich właściwości chemiczne. Wynika to głównie z zablokowania grup funkcyjnych wiązaniami glikozydowymi



lub estrowymi oraz zmiany charakteru fizycznego związku (z lipofilowego w hydrofilowy lub odwrotnie). Na reaktywność tych związków mają także wpływ efekty steryczne [15]. Biorąc pod uwagę wszystkie czynniki decydujące o aktywności chemicznej związku, włączając w to również charakter chemiczny oksydantów, niezbędne i uzasadnione są badania empiryczne dotyczące tego zagadnienia. Dowodzi tego również duża liczba publikacji o zasięgu światowym opisujących badania aktywności chemicznej związków w różnych układach modelowych. W cyklu prac prezentowanym jako Osiągnięcie zastosowałam w sumie pięć układów modelowych do porównania aktywności chemicznej pochodnych związków fenolowych oraz wzorców ich aglikonów. Były to zarówno układy generujące rodniki w fazie wodnej (rodnik ponadtlenkowy otrzymywany metodą enzymatyczną w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa i nieenzymatyczną w układzie NADH/PMS), jak też układy o charakterze lipidowym (rodnik DPPH oraz układ emulsyjny  $\beta$ -karoten-kwas linolowy).

Oksydaza ksantynowa jest enzymem katalizującym utlenianie ksantyny do kwasu moczowego. Najwyższe stężenia tego enzymu notuje się w śluzówce jelit oraz wątrobie. W chorobie niedokrwiennej jelita cienkiego jest ona głównym źródłem wolnych rodników, które mogą przyczyniać się do uszkodzeń DNA i rozwoju choroby nowotworowej [16]. W metodzie enzymatycznej, w reakcji reoksydacji oksydazy ksantynowej, cząsteczki tlenu działają jako akceptory elektronu przekształcając się w rodniki ponadtlenkowe [15, 16]. Aktywność antyoksydacyjna związków może być wynikiem ich bezpośredniej reakcji z powstającymi rodnikami, ale może też być pośrednim efektem inhibicji działania oksydazy ksantynowej przez badaną substancję. Z tego względu w omawianej metodzie, równoległe z badaniem właściwości redukcyjnych związków oznacza ich wpływ na aktywność oksydazy ksantynowej. Innym układem reakcyjnym, w którym powstają rodniki ponadtlenkowe jest układ NADH/PMS. Powstają one w reakcji zredukowanego dinukloetydu  $\beta$ -nikotyno-adeninowego (NADH) z metylosiarczanem fenazyny (PMS), który z kolei reagując z tlenem atmosferycznym prowadzi do syntezy rodników ponadtlenkowych [17].

Zarówno w metodzie enzymatycznej, jak i nieenzymatycznej powstałe rodniki ponadtlenkowe redukują obecny w mieszaninie błękit bromotetrazoliowy, który z barwy żółtej przechodzi w niebieski formazan, co jest monitorowane spektrofotometrycznie. Zatem obecność wolnych rodników w omawianych układach oznaczana jest pośrednio poprzez pomiar redukcji błękitu bromotertazoliowego. Dodatek antyoksydanta redukuje rodniki ponadtlenkowe, co z kolei przekłada się na zmniejszoną syntezę formazanu i niższe wartości absorbancji.

W układzie z rodnikiem DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylowym) określa się zdolność antyoksydanta do oddawania atomu wodoru. Zachodzi tutaj bezpośrednia reakcja pomiędzy

rodnikiem, a antyoksydantem, co obserwuje się spektrofotometrycznie jako odbarwienie zredukowanego rodnika. Rodnik DPPH jest typowym związkiem lipofilowym, stąd też analizę prowadzi się w roztworze metanolu. Stosowanie metanolu jako rozpuszczalnika jest jedną z podstawowych wad tej metody oraz to, że wymieniony rodnik jest typowo syntetyczny i nie ma odpowiednika w naturze. Pomimo wspomnianych wad, oznaczenie aktywności antyrodnikowej w odniesieniu do rodnika DPPH jest jedną z najpopularniejszych metod analitycznych wykorzystywanych w laboratoriach na całym świecie. Stosuje się ją do określania potencjału antyoksydacyjnego zarówno ekstraktów roślinnych, naturalnych związków pochodzenia roślinnego, jak i otrzymanych na drodze syntezy organicznej. O popularności tej metody decyduje tani koszt odczynników oraz prostota i szybkość oznaczeń [4].

Kolejnym układem modelowym, który stosowałam w swoich badaniach (**O4** i **O5**) był układ emulsyjny  $\beta$ -karoten-kwas linolowy. Jako aktywność antyoksydacyjną w opisanej metodzie określa się zdolność antyoksydanta do spowolnienia, bądź też minimalizacji rozkładu  $\beta$ -karotenu podczas skojarzonej oksydacji kwasu linolowego i  $\beta$ -karotenu w układzie zemulsyfikowanym z nadtlaniem wodoru, a rozkład  $\beta$ -karotenu jest monitorowany spektrofotometrycznie [18]. W środowisku opisanej reakcji generowane są rodniki peroksydowe, powstające w wyniku reakcji kwasu linolowego z nadtlaniem wodoru. Jest to etap inicjacji łańcuchowej reakcji peroksydacji kwasu tłuszczowego, w etapie propagacji generowane są kolejne rodniki peroksydowe, które mogą reagować ze sobą, ale też reagują z cząsteczką  $\beta$ -karotenu, prowadząc do jej degradacji. W naturze procesom peroksydacji ulegają głównie reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzące w skład fosfolipidów a także cząsteczki cholesterolu. Produkty powstałe w wyniku tych reakcji mogą wpływać na dysfunkcje organizmu poprzez utlenianie białek (dezaktywacja enzymów), czy DNA (modyfikacje zasad azotowych), co może być przyczyną wielu następstw zdrowotnych [4]. Procesy te są też główną przyczyną starzenia się żywności, szczególnie produktów mięsnych.

Aktywność biologiczna substancji jest związana z jej aktywnością antyoksydacyjną. Jednak nie można jednoznacznie przenieść właściwości oznaczanych w modelowych układach *in vitro* do układów biologicznych, w których występuje szereg innych czynników determinujących bioaktywność określonego związku. Należą do nich wchłanianie i transport badanej substancji przez błony komórkowe, jej cytotoksyczność dla określonych linii komórkowych, reaktywność z występującymi wewnątrz komórki reaktywnymi formami tlenu

i wiele innych. Z tego względu postawioną we wstępie hipotezę badawczą starałam się potwierdzić na trzech poziomach badań, które przedstawiłam w pracy **O4**. Pierwszy etap stanowiło porównanie aktywności antyoksydacyjnej pochodnych związków fenolowych oraz ich aglikonów, drugi określenie cytotoksyczności i genotoksyczności wymienionych związków w stosunku do limfocytów ludzkich, trzecim etapem było zbadanie właściwości radioochronnych związków w stężeniach, w których nie wykazywały one cytotoksyczności i genotoksyczności. W pracy **O4** badanym układem biologicznym były limfocyty krwi ludzkiej, które poddano działaniu promieniowania X. Promieniowanie to wykorzystywane jest w radioterapii do zwalczania niektórych typów nowotworów. Jednak poza działaniem leczniczym wywiera ono niekorzystny wpływ na komórki zdrowe. Dlatego koniecznym jest poszukiwanie substancji, które pełniłyby funkcje ochronne dla zdrowych komórek w tego rodzaju terapii.

Związkami objętymi wspomnianymi badaniami były wyodrębnione w największych ilościach z owocni papryki ester glukozydowy kwasu synapinowego, 3-O-( $\alpha$ -ramnopiranozyd) kwercetyny, 3-O-( $\alpha$ -ramnopiranozyd)-7-O-( $\beta$ -glukopiranozyd) kwercetyny oraz 7-O-[2-( $\beta$ -D-apiofuranozydo)- $\beta$ -D-glukopiranozyd] luteoliny, a także aglikony tych związków. Wyniki prezentowane w pracy **O4** potwierdziły znany z danych literaturowych fakt, że aglikony charakteryzują się z reguły wyższą aktywnością antyoksydacyjną niż ich pochodne glikozydowe [5,14,15,17,18]. Jednak szczegółowa analiza zmian aktywności badanych związków wskazuje na różnice w ich aktywności, zależnie od stosowanej metody oznaczeń. Przykładowo 7-O-[2-( $\beta$ -D-apiofuranozydo)- $\beta$ -D-glukopiranozyd] luteoliny i luteolina wykazywały porównywalną aktywność antyrodnikową w odniesieniu do rodnika ponadtlenkowego generowanego metodą nieenzymatyczną (NADH/PMS), podobnie ester glukozydowy kwasu synapinowego miał zbliżoną aktywność do kwasu synapinowego w układzie z rodnikiem DPPH. Pochodna luteoliny wykazywała też korzystną aktywność w układzie emulsyjnym kwas linolowy-  $\beta$ -karoten, gdzie luteolina była praktycznie nieaktywna.

Drugi etap badań obejmował określenie zakresu stężeń, w których analizowane związki nie wykazują aktywności cytotoksycznej i genotoksycznej na limfocyty krwi ludzkiej. Działanie cytotoksyczne określano jako indukcję śmierci komórkowej na drodze apoptozy, natomiast genotoksyczne przez indukcję mikrojąder, określono też hamowanie przez badane związki aktywności podziałowej (indeks NDI) limfocytów ludzkich *in vitro*. Stwierdzono, że w grupie badanych związków luteolina i kwercetyna wykazywały działanie cytotoksyczne już przy stężeniu 10 $\mu$ g/ml. W przypadku związków wyizolowanych z owocni papryki ester

glukozydowy kwasu synapinowego tylko w najwyższych w stężeniach indukował mikrojądra, ale nie apoptozę, co wskazywało na jego słabe właściwości genotoksyczne. W limfocytach hodowanych w obecności 3-*O*-( $\alpha$ -ramnopiranozydu)-7-*O*-( $\beta$ -glukopiranozydu) kwercetyny tylko w najwyższym stężeniu odsetek komórek apoptotycznych był podwyższony w porównaniu z kontrolą hodowaną bez dodatku tego związku. Z kolei 7-*O*-[2-( $\beta$ -D-apiofuranozydo)- $\beta$ -D-glukopiranozyd] luteoliny oraz 3-*O*-( $\alpha$ -ramnopiranozyd) kwercetyny wykazywały zbliżone właściwości, gdyż w całym zakresie badanych stężeń nie indukowały apoptozy komórek ani mikrojąder, zatem nie wykazywały działania cytotoksycznego i genotoksycznego na limfocyty krwi ludzkiej. Dodatkowo 3-*O*-( $\alpha$ -ramnopiranozyd) kwercetyny nie zmieniał zdolności podziałowych limfocytów, a w obecności 7-*O*-[2-( $\beta$ -D-apiofuranozydo)- $\beta$ -D-glukopiranozydu] luteoliny indeks podziałowy jąder (NDI) obniżał się wraz ze wzrostem stężenia tego związku. Świadczy to o zahamowaniu aktywności podziałowej limfocytów w stosunku do limfocytów kontrolnych hodowanych w podłożu standardowym.

Otrzymane wyniki badań wykazały, że glikozydy kwasów fenolowych i flawonoidów są mniej cytotoksyczne i genotoksyczne dla badanych komórek w stosowanych zakresach stężeń niż wolne aglikony (**O4**). Według mojej wiedzy tego typu badania dla pochodnych związków fenolowych nie były dotychczas opublikowane w literaturze światowej.

W stężeniach, dla których testowane związki nie wykazywały działania cytotoksycznego i genotoksycznego zbadano ich właściwości radioochronne. Stwierdzono, że wszystkie badane substancje wykazywały działanie radioochronne, wyrażone jako zmniejszenie liczby indukowanych przez promienie X mikrojąder w limfocytach ludzkich. Spośród związków wyizolowanych z owocni papryki najsilniejsze działanie radioochronne zanotowano dla 3-*O*-( $\alpha$ -ramnopiranozydu) – kwercetyny oraz 7-*O*-[2-( $\beta$ -D-apiofuranozydo)- $\beta$ -D-glukopiranozydu] luteoliny. Dodatkowo pochodna kwercetyny wykazywała silniejsze właściwości radioochronne niż kwercetyna.

Na podstawie uzyskanych wyników po raz pierwszy sformułowano wniosek, że glikozydowe pochodne flawonoidów wyizolowane z owocni papryki charakteryzują się silniejszymi właściwościami radioochronnymi przeciwko promieniowaniu X niż ich aglikony (**O4**).

### 3. Wykazanie zależności pomiędzy strukturą, lipofilnością i bioaktywnością związków fenolowych.

Otrzymane rezultaty badań opisane i zinterpretowane w pracy **O4** były inspiracją do podjęcia kolejnych, których celem była odpowiedź na pytanie, czy charakter lipofilowy związku determinuje jego aktywność w układzie *in vitro*. Próbą odpowiedzi na to pytanie jest publikacja **O5**. W pracy tej koncentrowałam się na *C*-glikozydowych pochodnych luteoliny i apigeniny. *C*-Glikozydy flawonoidów są związkami interesującymi pod wieloma względami i dość słabo opisanymi w literaturze. Wynika to głównie z tego, że ich stężenie w roślinie jest kilkakrotnie niższe w porównaniu do *O*-glikozydów. Związki te posiadają z reguły tyle samo wolnych grup hydroksylowych, co ich aglikony ale na skutek obecności cząsteczki cukrowej są bardziej hydrofilowe. Z drugiej jednak strony podstawniki cukrowe mogą osłaniać grupy –OH, przez co te stają się mniej reaktywne. W rozważaniach teoretycznych koncentrujących się na bioaktywności substancji chemicznych stosuje się często parametr lipofilności związku, wyrażony jako logarytm współczynnika podziału pomiędzy wodę oraz *n*-oktanol ( $\log P$ ). W prezentowanej pracy podjęto próbę porównania wyników obliczonych teoretycznie wartości  $\log P$  oraz wyznaczonych eksperymentalnie aktywności antyoksydacyjnych. Badania aktywności antyoksydacyjnej *C*-glikozydów przeprowadzono stosując pięć opisanych wcześniej układów modelowych a lipofilowość związków obliczono posługując się trzema programami komputerowymi. Na podstawie uśrednionych wartości  $\log P$  uszeregowano badane związki zgodnie z malejącą lipofilnością: apigenina > luteolina > 6-*C*-( $\beta$ -D-glukopiranozyd) luteoliny > 6-*C*-( $\beta$ -D-glukopiranozyd)-8-*C*-( $\alpha$ -D-arabinofuranozyd) apigeniny > kwas askorbinowy  $\geq$  6,8-di-*C*-( $\beta$ -D-glukopiranozyd) luteoliny. Kolejność tych związków powinna sugerować spadek ich aktywności, gdyż według rozważań teoretycznych wyższe wartości współczynnika  $\log P$  determinują jego aktywność [19]. Jednak badania eksperymentalne dowodzą złożoności wspomnianego problemu. Yang i wsp. [20], analizując aktywność antyoksydacyjną kilkunastu aglikonów flawonoidowych mierzoną jako inhibicję utleniania lipidów stwierdzili, że związki o zbyt wysokich lub zbyt niskich wartościach  $\log P$  były słabymi antyoksydantami. Zatem pochodne *C*-glikozydowe luteoliny i apigeniny wydawały się w tym ujęciu być obiecującymi związkami o potencjale antyoksydacyjnym. Otrzymane wyniki oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej badanych związków w układzie emulsyjnym kwas linolowy- $\beta$ -karoten potwierdziły te przypuszczenia, gdyż 6-*C*-( $\beta$ -D-glukopiranozyd) luteoliny oraz 6-*C*-( $\beta$ -D-glukopiranozyd)-8-*C*-( $\alpha$ -D-arabinofuranozyd) apigeniny charakteryzowała najwyższa aktywność. Z drugiej strony, związki silnie

hydrofilowe, czyli kwas askorbinowy oraz 6,8-di-*C*-( $\beta$ -*D*-glukopiranozyd) luteoliny, powinny wykazywać wysoką aktywność w układach hydrofilowych. Jednak otrzymane wyniki badań nie potwierdziły jednoznacznie tej zależności. Co prawda kwas askorbinowy najsilniej z analizowanych związków redukował rodniki ponadtlenkowe w układzie modelowym NADH/PMS ale pochodna luteoliny była tam praktycznie nieaktywna. Z kolei w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa najwyższą aktywność antyrodnikową stwierdzono dla luteoliny, która wraz z apigeniną jest najbardziej lipofilowa.

Analiza uzyskanych wyników aktywności antyoksydacyjnej badanych związków w powiązaniu z ich budową chemiczną oraz charakterem fizycznym skłoniła do sformułowania wniosku, że w układach modelowych *in vitro* charakter fizyczny (lipofilowość) związku nie jest czynnikiem determinującym jego aktywność chemiczną (**O5**). Nadzędne znaczenie mają tutaj grupy funkcyjne oraz efekty steryczne. Interesującym zagadnieniem wyszczególnionym w publikacji **O5** były właściwości apigeniny oraz jej pochodnej 6-*C*-( $\beta$ -*D*-glukopiranozydu)-8-*C*-( $\alpha$ -*D*-arabinofuranozydu) apigeniny. Apigenina należy do grupy flawonów i w odróżnieniu od luteoliny nie posiada jednej grupy hydroksylowej w pierścieniu B. Zatem apigenina nie posiada układu katecholowego w swojej cząsteczce. Brak tego ugrupowania drastycznie zmniejsza aktywność antyrodnikową apigeniny w porównaniu do luteoliny, co potwierdziły wyniki przedstawione w pracy **O5**. Jednocześnie w jednym układzie apigenina wykazywała aktywność prooksydacyjną, był to układ emulsyjny kwas linolowy- $\beta$ -karoten. Otrzymane wyniki były zgodne z danymi literaturowymi, gdyż w układzie z emulsją  $\beta$ -karotenową zaobserwowano również prooksydacyjną aktywność apigeniny [21]. Właściwości te tłumaczono wysokim jednoelektronowym potencjałem oksydacyjnym powstającego w opisanej reakcji rodnika fenoksylogo [22]. Z kolei pochodna apigeniny wykazywała przeciwstawną aktywność w porównaniu z aglikonem. Fakt ten można tłumaczyć tym, że obecność podstawników cukrowych w cząsteczce glikozydu zmniejsza potencjał oksydacyjny jej rodników fenoksylogo lub tym, że bardziej hydrofilowe pochodne apigeniny mogą reagować w fazie wodnej układu emulsyjnego, przerywając już na samym początku łańcuch reakcji utleniania  $\beta$ -karotenu. Według mojej wiedzy tego typu rozważania dla *C*-glikozydów flawonoidów przeprowadzono po raz pierwszy.

## Podsumowanie

Cykl 5 prac stanowiących Osiągnięcie naukowe zawiera wyniki badań dotyczących aktywności biologicznej związków fenolowych wyizolowanych z owoców papryki *Capsicum annuum* L., których strukturę zdefiniowano za pomocą nowoczesnych metod spektroskopowych. Aktywność biologiczna wspomnianych związków była badana w pięciu układach modelowych, generujących rodniki zarówno w fazie wodnej (układ NADH/PMS, ksantyna/oksydaza ksantynowa, inhibicja oksydazy ksantynowej) oraz w fazie lipidowej (rodnik DPPH i układ emulsyjny  $\beta$ -karoten- kwas linolowy).

W celu określenia współzależności między strukturą, lipofilnością i bioaktywnością związków fenolowych po raz pierwszy porównywano parametr lipofilności związków obliczony teoretycznie z aktywnością wyznaczoną eksperymentalnie. Po raz pierwszy przeprowadzono też badania nad zdolnością radioochronną wyizolowanych związków i ich aglikonów w stosunku do ludzkich limfocytów narażonych na uszkodzenia indukowane promieniowaniem X w odniesieniu do ich aktywności antyoksydacyjnej. Zanotowano, że pochodne glikozydowe związków fenolowych wykazywały słabszą aktywność antyrodnikową ale ich działanie radioochronne było wyższe i mniej toksyczne na limfocyty ludzkie, w przeciwieństwie do ich aglikonów co otwiera możliwość wykorzystania tego rodzaju związków w medycynie. Najwyższy współczynnik korelacji między aktywnością radioochronną i antyoksydacyjną zanotowano dla układu generującego rodniki ponadtlenkowe metodą nieenzymatyczną (NADH/PMS), którą można zastosować do wstępnej oceny związków o możliwym potencjale radioochronnym.

Podjęcie tematu badawczego, którego efektem jest cykl prac stanowiących podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest uzasadnione potrzebą poszukiwania naturalnych substancji, które mogą być wykorzystane także w produkcji żywności funkcjonalnej. Zagadnienie to staje się istotne dla producentów żywności, gdyż obserwowany wzrost świadomości społecznej motywuje do wprowadzania nowych produktów zawierających związki o potwierdzonych właściwościach prozdrowotnych.

## Bibliografia

1. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (2007). Free radicals in biology and medicine, fourth ed. Clarendon, Oxford, UK.
2. Ferrari C. K. B., Torres E. A. F. S. (2003). Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 251-260.
3. Mannion C., Page S., Bell L. H., Verhoef M. (2011). Components of an anticancer diet: dietary recommendations, restrictions and supplements of the Bill Henderson Protocol. *Nutrients*, 3, 1-26.
4. Niki E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Rad Biol Med*, 49, 503-515.

5. Li N., Liu J. H., Zhang J., Yu B. Y. (2008). Comparative evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids. *J Agric Food Chem*, 56, 3876-3883.
6. Marin A., Ferreres F., Tomas-Barberan F.A., Gil M.I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*capsicum annum L.*). *J Agric Food Chem*, 52, 3861-3869.
7. Wahyuni Y., Ballester A.R., Sudarmonowati E., Bino R.J., Bovy A.G. (2011) Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72:1358-1370.
8. Oszmiański J., Wojdyło A., Gorzelany J., Kapusta I. (2011). Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS. *J Agric Food Chem*, 59, 12830-12835.
9. Dajas F., (2012). Life of death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J. Ethnopharmacology*, 143, 383-396.
10. Middleton J.E., Kandaswami C., Thesherides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 42 (4), 673-751.
11. Geetha T., Malhotra V., Chopra K., Kaur I.P. (2005). Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of quercetin. *Indian J. Exp. Biol.* 43, 61-67.
12. Galati G., O'Brien P.J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for chemopreventive and anticancer properties. *Free Rad Biol Med* 37 (3), 287-303.
13. Harwood M., Danielewska-Nikiel B., Borzelleca J.F., Flamm G.W., Williams G.M., Lines T.C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem. Tox.* 45, 2179-2205.
14. Rice-Evans C. A., Miller J., Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
15. Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J., Berghe D.V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 61:71-76.
16. Lin J.K., Chen P.C., Ho C.T., Lin-Shiau S.Y. (2000). Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3-3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J Agric Food Chem* 48:2736-2743.
17. Ribeiro B, Valente P, Baptista P, Seabra RM, Andrade PB (2007). Phenolic compounds, organic acids profile and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food Chem Tox* 45:1805-1813.
18. Burda S., Oleszek W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 49:2774-2779.
19. Koba M., Belka M., Ciesielski T., Bączek T. (2012). Determination of lipophilicity for antitumor acridinone derivatives supported by gradient high-performance liquid chromatography method. *Cent Eur J Chem* 10:218-223.
20. Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F. (2001). Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Analyt. Sci.*, 17, 599-604.
21. Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simoncic M., Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem* 89:191-198.
22. Rietjens I.M.C.M., Boersma M.G., Haan L., Spenklink B., Awad H.M., Cnubben N.H.P., Zanden J.J., Woude H., Alink G.M., Koeman J.H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Env Tox Pharm* 11:321-333.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### 5.1. Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Pracę w Katedrze Chemii Akademii Rolniczej w Lublinie (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego rozpoczęłam 1 października 1996 roku. Zostałam włączona do Zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Irenę Perucką, gdzie od początku mojej pracy na tym stanowisku rośliną badawczą stanowiły owoce papryki rocznej (*Capsicum annum L.*), zarówno odmian słodkich, półostrych, jak i ostrych. Papryka jest warzywem, o którym można powiedzieć, że zyskuje coraz większą popularność wśród



konsumentów. Wynika to zarówno z jej walorów smakowych, ale także ze wzrastającej świadomości społeczeństwa o walorach dietetycznych i zdrowotnych papryki.

Obok analiz podstawowych składników występujących w owocach papryki takich jak witamina C, tokoferole, mikro i makroelementy, grupą związków która szczególnie mnie zainteresowała były związki fenolowe. Główne nurty badań w tym okresie obejmowały analizę zmian stężenia tych związków pod wpływem działania czynników agrotechnicznych (oprysk jonami  $\text{Ca}^{2+}$  oraz etefonem z jonami  $\text{Ca}^{2+}$ , celem wymienionych zabiegów było przyspieszenie i ujednoczenie dojrzewania owoców papryki), a także wynikające z różnic odmianowych oraz z fazy dojrzałości owoców. Kolejny nurt analiz, które rozpoczęłam w tym okresie stanowiły oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej zarówno surowych ekstraktów otrzymanych z papryki, jak też ich frakcji. Stosowane przeze mnie w tym okresie metody badawcze to przede wszystkim układ emulsyjny  $\beta$ -karoten-kwas linolowy oraz układ z rodnikiem DPPH. Rezultatem przeprowadzonych badań były dwie oryginalne prace twórcze, jedna o zasięgu międzynarodowym (II.A.1) i jedna o zasięgu krajowym (II.B.1), jedna monografia oraz dziesięć komunikatów, dwa prezentowane na konferencjach międzynarodowych (II.D.1.1-2) oraz osiem na krajowych (II.D.2.1-8).

W ciągu pierwszych kilku lat pracy doskonaliłam swój warsztat badawczy, oraz poszerzałam swoją wiedzę na temat fitochemii. W roku 1998 wzięłam udział w tygodniowych warsztatach 2<sup>nd</sup> Central European Workshop on Carotenoids, które odbyły się w Peczu na Węgrzech, a w roku 1999 uczestniczyłam w szkoleniu: *Techniki elektroforetyczne i produkcja białek zrekombinowanych* organizowanych przez firmę DNA-Gdańsk. W tym okresie odbyłam też dwumiesięczny staż naukowy w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów IUNG w Puławach w 2002 roku. Na wspomnianym stażu pod opieką prof. dr hab. Wiesława Oleszka oraz prof. dr hab. Anny Stochmal przeprowadziłam pierwszy rozdział frakcji fenylopropanoidów metodą niskociśnieniowej chromatografii cieczowej. Identyfikację wyodrębnionych związków wykonałam we współpracy z prof. Sonią Piacente z grupy FARMABIOMED Dipartimento di Scienze Farmaceutiche e Biomediche Uniwersytetu w Salerno we Włoszech, gdzie przeprowadzone zostały analizy metodą  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. Efektem tych badań było określenie struktury 9 związków, w tym 2 zidentyfikowanych po raz pierwszy w świecie roślinnym. Na podstawie uzyskanych wyników oraz wcześniejszych badań własnych przygotowałam rozprawę doktorską pt: „Aktywność przeciwutleniająca, identyfikacja i zawartość niektórych składników frakcji fenylopropanoidów w owocach wybranych odmian papryki ostrej z uwzględnieniem fazy dojrzałości.”, której promotorem była prof. dr hab. Irena Perucka, a którą obroniłam w maju 2002 roku. Moja praca została

wyróżniona nagrodą indywidualną III stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w 2003 roku. Decyzją Rady Wydziału Rolniczego (obecnie Agrobioinżynierii), w dniu 5 czerwca 2002 roku uzyskałam stopień doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, specjalność chemia żywności.

Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w postaci sześciu oryginalnych prac twórczych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (II.A.2; II.A.6) i krajowym (II.B.2; II.B.3; II.B.5; II.B.8) oraz były prezentowane w postaci 5 komunikatów na 3 konferencjach międzynarodowych (II.D.1.3-4; II.D.1.6; II.D.1.8-9) oraz 5 krajowych (II.D.2.9; II.D.2.12-13; II.D.2.15-16). Wśród nich największe zainteresowanie zanotowałam dla prac: II.A.2; II.A.6, których liczba cytowań (według bazy Web of Science) wynosiła odpowiednio 40 i 155. Dodatkowo wyniki pracy doktorskiej prezentowałam w formie 2 referatów: w 2002 roku na XXXIII Sesji naukowej Komitetu Technologii I Chemii Żywności PAN, pt: „*Rozdział i identyfikacja głównych związków flawonoidowych i pochodnych kwasów fenolowych pochodzących z czerwonych owoców papryki ostrej odmiany Bronowicka Ostra.*” oraz w 2005 roku na XL Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, zatytułowany: „*Changes in ferulic and sinapic acids esters and quercetin rhamnoside in hot pepper fruit after  $Ca^{2+}$  and etephon with  $Ca^{2+}$  treatment.* W roku 2006 zostałam wyróżniona nagrodą zespołową II stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie za cykl publikacji wydanych w latach 2004-2005.

## **5.2. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora**

Doświadczenie zdobyte podczas realizowania rozprawy doktorskiej pozwoliło mi wypracować własny warsztat badawczy oraz zainteresowania naukowe, które obecnie koncentrują się na następujących obszarach tematycznych:

- a) badania składu chemicznego owoców papryki i czynników wpływających na jego modyfikacje,
  - b) doskonalenie warsztatu analizy preparatywnej w celu pozyskiwania nowych substancji lub odpowiednich ilości substancji opisanych wcześniej w literaturze,
  - c) badania aktywności antyoksydacyjnej czystych związków, jak też ich mieszanin w układach modelowych o zróżnicowanej lipofilności,
  - d) alkaloidy jako składniki żywności: badania ilościowe alkaloidów występujących w owocach papryki oraz studia literaturowe na temat alkaloidów pirolizydynowych.
- a) Od początku mojej pracy w Katedrze Chemii, do dnia dzisiejszego papryka roczna (*Capsicum annuum* L.) jest dla mnie podstawową rośliną badawczą, a główną grupą

związków są związki fenolowe. Jednak owoce papryki zawierają szereg innych ważnych żywieniowo substancji, których zawartość może wpływać na zmiany w składzie frakcji związków fenolowych. Z tego powodu obok badań koncentrujących się na związkach fenolowych, analizowałam też inne składniki owoców papryki, między innymi: witaminę C, tokoferole, karoteny i ksantofile oraz makro- i mikroelementy. Poza czynnikami odmianowymi (przebadałam w sumie sześć słodkich, trzy półostre oraz cztery ostre odmiany papryki), analizowałam także takie czynniki, jak: faza dojrzałości owoców, ich część anatomiczna (owocnie i łożyska), zabiegi agrotechniczne (oprysk jonami  $\text{Ca}^{2+}$  oraz etefonem z jonami  $\text{Ca}^{2+}$ ). Wyniki wymienionych badań zostały opublikowane w postaci siedmiu oryginalnych prac twórczych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (II.A.3-5; II.A.8, II.A.10) i krajowym (II.B.4; II.B.6) oraz były prezentowane w postaci 9 komunikatów na konferencjach międzynarodowych (II.D.1.5, II.D.1.10) oraz krajowych (II.D.2.10-11; II.D.2.14; II.D.2.18, II.D.2.20, II.D.2.24, II.D.2.26).

**b)** Kolejnym nurtem prowadzonych przeze mnie badań było dopracowywanie metody rozdziału frakcji fenylopropanoidów, zarówno pod względem doboru rodzaju i stężenia fazy ruchomej w analizie chromatograficznej, jak i rodzaju sorbentów na etapie przygotowania próbki. Ten etap analiz stanowił dla mnie szczególnie ważne zagadnienie w momencie rozpoczęcia realizacji projektu badawczego, którego efektem są wyniki przedstawione w Osiągnięciu. Poza owocami papryki w materiale badawczym były także ziarna zielonej kawy Robusta, z której izolowałam frakcję związków fenolowych. Wspomniane badania były rezultatem współpracy z Instytutem Chemicznej Technologii Żywności Politechniki Łódzkiej, której efektem była publikacja o zasięgu międzynarodowym (II.A.7, liczba cytowań: 20). Poza owocami papryki i ziarnami kawy, podjęłam też próbę wyodrębnienia frakcji związków fenolowych z roślin ziołowych, między innymi melisy. W badaniach tych koncentrowałam się nad ustaleniem zależności pomiędzy lipofilnością związków występujących badanych frakcjach, a jakością ich rozdziału metodami chromatograficznymi, jak również wpływie warunków ekstrakcji na skład otrzymanych frakcji. Uzyskane wyniki opublikowałam w postaci trzech oryginalnych prac twórczych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (II.A.9) i krajowym (II.B.7; II.B.10) oraz prezentowałam w postaci 6 komunikatów na konferencjach międzynarodowych (II.D.1.7, II.D.1.12) oraz krajowych (II.D.2.19; II.D.2.21-23). Z uwagi na to, że wspomniany obszar badań opierał się na wykorzystaniu technik chromatograficznych, zarówno chromatografii średniociśnieniowej, jak i wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej, starałam się poszerzyć swoją wiedzę na temat technik

chromatograficznych. Dlatego w 2009 roku odbyłam *Kurs Nowoczesnej Chromatografii Cieczowej*, w Katedrze Chemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

c) Oznaczanie aktywności antyoksydacyjnej zarówno frakcji pozyskanych z roślin, jak też czystych związków stanowiło i nadal stanowi główny nurt moich naukowych dociekań, którego wynikiem jest przedstawione Osiągnięcie. Staram się wciąż wzbogacać swój warsztat analityczny o nowe metody, które pozwolą mi na dokładniejsze określenie spektrum aktywności danego związku. W dotychczasowych badaniach koncentrowałam się na dobraniu takich metod oznaczania aktywności związku, aby uwzględniały one jego charakter hydro- lub lipofilowy. Stąd wprowadziłam oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej w odniesieniu do rodnika ponadtlenkowego, jak też rodnika DPPH oraz układu emulsyjnego z  $\beta$ -karotenem i kwasem linolowym. W ostatnim czasie moje dociekania w wymienionym obszarze koncentrowały się na określeniu mechanizmu inhibicji oksydazy ksantynowej przez pochodne flawonoidów (wyniki jeszcze nie opublikowane). Obok badań aktywności czystych związków wyizolowanych w toku rozdziału preparatywnego, wykonywałam szereg oznaczeń aktywności ekstraktów roślinnych, jak też ich frakcji. Badania te miały na celu uzyskanie informacji na temat potencjalnych możliwości wykorzystania takich preparatów jako dodatki do żywności. Uzyskane wyniki badań przedstawiłam w jednej publikacji o zasięgu krajowym (II.B.11) oraz w formie 3 komunikatów na konferencjach międzynarodowych (II.D.1.11, II.D.1.13) i krajowych (II.D.2.17), a także w 2011 roku wygłosiłam referat zatytułowany: „*O-glikozydy kwercetyny jako związki o potencjale antyoksydacyjnym.*” na II Krajowej Konferencji Pt. ”Naturalne substancje roślinne – aspekty strukturalne i aplikacyjne” w Puławach.

d) Wyodrębniając frakcję związków fenolowych, izolowałam jednocześnie kolejną frakcję o wyższej lipofilności (zwaną w skrócie frakcją 70%). Składnikami tej frakcji były bardziej lipofilowe pochodne flawonoidów, ale także alkaloidy charakterystyczne dla owoców papryki. Dwa główne alkaloidy papryki ostrej to kapsaicyna i dihydrokapsaicyna. Związki te wykazują silne działanie fizjologiczne, a pierwszym z nich jest działanie na kubki smakowe, przez co spożywając owoce papryki ostrej odczuwa się silny, piekący smak. Uznałam, że kapsaicynoidy stanowią równie ciekawą pod względem chemicznym i żywieniowym grupę związków, co frakcja związków fenolowych. Dlatego praktycznie przy każdym rozdziale preparatywnym starałam się wyodrębnić również tę frakcję oraz oznaczyć zawartość kapsaicyny i dihydrokapsaicyny w owocach papryki ostrej i półostrej. Wyniki wspomnianych badań były często przedstawiane wraz z wynikami dotyczącymi frakcji

związków fenolowych, w cytowanych już wcześniej publikacjach o zasięgu międzynarodowym (II.A.6) i krajowym (II.B.2), jednej monografii (II.C.2) oraz w formie 3 komunikatów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych (II.D.1.8) i krajowych (II.D.2.22-23).

Interesując się kapsaicynoidami, zaczęłam też poszukiwać informacji na temat innych alkaloidów, gdyż związki te charakteryzują się specyficznymi właściwościami fizjologicznymi i chemicznymi. Zainteresowania te obejmowały dotychczas studia literatury światowej dotyczące tematyki wpływu alkaloidów na środowisko, ze szczególnym naciskiem na alkaloidy pirolizydynowe. Związki te są silnymi neurotoksynami, których obecność w żywności jest niepożądana. Wspomnianą tematykę przedstawiłam w jednej publikacji o zasięgu krajowym (II.B.9) oraz w jednej monografii (II.C.3).

## 6. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Mój łączny dorobek naukowy stanowi **71 pozycji**, w tym:

- 29 oryginalnych prac twórczych
  - 27 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora
- 3 rozdziały w monografiach
  - 2 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora
- 13 komunikatów naukowych na konferencje międzynarodowe
  - 11 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora
- 26 komunikatów naukowych na konferencje krajowe
  - 18 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

### 6.1. Wskaźniki dokonań naukowych

- Suma punktów za publikacje, według komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17 grudnia 2013 roku wynosi **460**.
- Sumaryczny *impact factor* publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JRC) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **15,851**
- Liczba prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych przez Journal Citation Reports (JRC) wynosi 13 (łącznie 340 punktów, co stanowi 74% ogólnej liczby punktów)
- Indeks Hirscha opublikowanych prac według bazy Web of Science (na dzień 27.10.2014) wynosi: **3**, a według bazy Scopus wynosi: **4**.
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (na dzień 27.10.2014) wynosi: **205** (bez autocytowań 199), a według bazy Scopus wynosi: **299** (bez autocytowań 280)

## 6. 2. Zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe

Nazwa czasopisma	Liczba publikacji	IF <sup>a</sup>	IF <sup>b</sup>	Punkty wg MNiSW <sup>a</sup>	Punkty wg MNiSW <sup>c</sup>
<b>Czasopisma znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JRC)</b>					
Innovative Food Sci. & Em. Technol.	1	-	3,342	10	40
Phytochemistry	1	2,322	3,571	16	35
J. Elementol.	2	-	1,136	8	30
Żywność. Nauka. Technologia. Jakość	4	0,501	1,18	43	60
J. Agric. Food Chem	1	2,532	3,107	24	40
Eur. Food Res. Technol	2(1 <sup>*</sup> )	2,757	3,636	54	60
Journal of Functional Foods	1 <sup>*</sup>	4,48	4,462	35	35
Food Chemistry	1 <sup>*</sup>	3,259	3,867	40	40
<b>Publikacje naukowe w czasopismach wymienionych w części B wykazu czasopism naukowych MNiSW</b>					
Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.	5(1 <sup>*</sup> )	-	-	33	50
Biuletyn Magnezologiczny	1	-	-	4	4
Pol. J. Food and Nutr. Sci.	3(1 <sup>*</sup> )	-	-	18	30
Annales UMCS, Sec. E	1	-	-	4	6
Acta Agrobotanica	1	-	-	9	8
Przemysł Spożywczy	1	-	-	5	5
Episteme	1	-	-	4	4
<b>Czasopisma nieujęte w wykazie czasopism naukowych MNiSW</b>					
Rozdziały w monografiach w języku angielskim <sup>d</sup>	1	-	-	6	5
Rozdziały w monografiach w języku polskim <sup>d</sup>	2	-	-	8	8
Komunikaty naukowe na konferencje międzynarodowe	11	-	-	-	-
Komunikaty naukowe na konferencje krajowe	31	-	-	-	-
<b>RAZEM</b>	71 (5 <sup>*</sup> )	15,851 (9,126 <sup>*</sup> )	24,301 (10,147 <sup>*</sup> )	321 (120 <sup>*</sup> )	460 (125 <sup>*</sup> )

\* dotyczy publikacji wchodzących w skład Osiągnięcia

<sup>a</sup> obowiązujące w roku opublikowania

<sup>b</sup> średni pięcioletni IF obowiązujący w roku 2014

<sup>c</sup> zgodnie z aktualną listą czasopism punktowanych według komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17 grudnia 2013

<sup>d</sup> wg rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 sierpnia 2012 r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania kategorii naukowej jednostkom naukowym

Małgorzata Matynka