

Wrocław 29.07.2019 r.

Prof. dr hab. Mirosław Czarnecki

Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

Recenzja pracy doktorskiej:

Ocena stanu fizykochemicznego powierzchni metali metodą badania adsorpcji na granicy faz metal/ciecz z zastosowaniem techniki SERS

wykonanej przez **mgr Agnieszkę Tąę** pod kierunkiem **Prof. dr hab. Edyty Proniewicz** na Wydziale Odlewnictwa Akademii Górniczo Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie

Przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej była charakterystyka procesu adsorpcji na granicy faz metal/ciecz za pomocą techniki powierzchniowo-wzmocnionego efektu Ramana (SERS). Do badań wybrano cztery metale: Au, Pt, Fe i Ti oraz dwa tlenki metali: Fe₂O₃ i TiO₂. Metale te często są wykorzystywane do produkcji implantów oraz endoprotez, dlatego też poznanie procesów zachodzących na granicy faz metal/ciecz jest ważne z punktu widzenia nie tylko poznawczego ale również aplikacyjnego. Obiektem badań była bombezyna (BN) i jej sześć fragmentów poczynając od BN₁₃₋₁₄ do BN₈₋₁₄. Bombezyna jest peptydem składającym się z 14 aminokwasów (pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met) i pełni ważną rolę w organizmie człowieka. Posiada również potencjalne zastosowania w diagnostyce medycznej. Bardzo ważną rolę w BN odgrywa tryptofan, który jest odpowiedzialny za rozpoznawanie receptora. Jednakże rola pozostałych aminokwasów jest również istotna, a nie była do tej pory przedmiotem systematycznych badań. Zatem podjęcie badań BN i jej krótszych fragmentów na różnych powierzchniach wydaje się być jak najbardziej uzasadnione.

Zarówno klasyczna spektroskopia ramanowska jak i technika SERS są doskonałymi narzędziami do tego typu badań, ponieważ dostarczają informacji o strukturze oraz oddziaływaniach na poziomie molekularnym. Szczególnie użyteczna, z punktu widzenia celu pracy, wydaje się technika SERS, która umożliwia otrzymanie informacji o orientacji cząsteczek względem powierzchni aktywnego substratu metalicznego. Dzięki temu, można wnioskować o sposobie oddziaływania badanej substancji z aktywną powierzchnią. Widma

SERS różni się od widm zarejestrowanych za pomocą klasycznej spektroskopii Ramana. Zatem analiza porównawcza obu typów widm może być źródłem szczegółowych informacji o mechanizmie oddziaływania badanych próbek z powierzchniami metalicznymi.

Cała praca doktorska ma 110 stron, wliczając w to wszelkiego rodzaju spisy i informacje o aktywności naukowej Doktorantki. Pracę otwiera krótkie **Wprowadzenie**, w którym Doktorantka stara się uzasadnić celowość podjętych badań. Kolejnym rozdziałem jest **Część Literaturowa**. Ten fragment pracy nie jest może zbyt porywający ale zawiera niezbędne informacje o obiektach badań i stosowanych metodach. Być może klasyczna spektroskopia ramanowska została przedstawiona zbyt pobieżnie ale za to technika SERS jest już opisana dostatecznie wyczerpująco. Pozostałe techniki eksperymentalne jak: skaningowa mikroskopia elektronowa, spektroskopia UV-Vis, dyfrakcja rentgenowska czy spektroskopia ATR-IR, jako metody pomocnicze zostały pominięte we wstępie teoretycznym, dzięki czemu nie jest on zbyt obszerny. Na pochwałę zasługuje duża liczba odnośników literaturowych (277), co świadczy o dobrej znajomości uprawianej tematyki badawczej.

Na stronie 28 zostały podane w punktach główne **cele pracy**. Kolejnym rozdziałem jest **Część eksperymentalna**, która zwiera bardzo syntetyczny opis przygotowania powierzchni metalicznych i nanocząsteczek oraz warunków pomiarowych dla wszystkich stosowanych technik badawczych. Dla recenzenta taka zwięzłość jest dużą zaletą, jednak moim zdaniem została tutaj zbyt daleko posunięta. Praca nie zawiera opisu metod, jakimi analizowano widma. Analiza porównawcza oparta jest na takich parametrach spektralnych jak położenie, intensywność oraz szerokość połówkowa pasm na widmach SERS i Ramana, jednak w pracy nie ma informacji w jaki sposób wyznaczano te wartości. Większość pasm znacznie nakłada się z innymi pasmami. Zatem bezpośrednio oszacowanie tych parametrów z widm jest niemożliwe i wymaga stosowania metod numerycznych. Chętnie też dowiedziałbym się czy widma eksperymentalne były poddawane jakiejś wstępnej obróbce typu wygładzanie lub korekcja linii podstawowej.

Po zwięzłej **Części eksperymentalnej** przechodzimy do najważniejszego rozdziału pracy jakim jest **Analiza wyników badań i dyskusja**. Na początek, Doktorantka przedstawiła wyniki kompleksowych badań powierzchni metalicznych i nanocząsteczek metali przed i po zaadsorbowaniu BN. Za pomocą metod SEM i XRD określiła kształt oraz średnią wielkość nanocząsteczek. Z kolei zdjęcia SEM oraz pomiary widm UV-Vis potwierdziły fakt adsorpcji BN na badanych powierzchniach. Doktorantka zarejestrowała widma SERS BN i jej fragmentów BN^{13-14} , BN^{12-14} , BN^{11-14} , BN^{10-14} , BN^{9-14} i BN^{8-14} na następujących

powierzchniach: AuNPs/SiO₂, PtNPs, α -Ti, α -Fe, TiO₂NPs i γ -Fe₂O₃NPs. Zebranie tak bogatego materiału doświadczalnego wymagało od Doktorantki sporej wiedzy i dużych umiejętności praktycznych, gdyż technika SERS, pomimo wielu lat intensywnych badań, wciąż jest bardzo kapryśna i nieprzewidywalna. Jednak staranne opracowanie tego materiału również nie jest zadaniem trywialnym. Nawet najlepsze widma są bezużyteczne, jeżeli nie potrafimy przypisać obserwowanych pasm absorpcyjnych do drgań określonych fragmentów strukturalnych. Aby dokonać wiarygodnego przypisania pasm, Doktorantka wykorzystwała obliczenia teoretyczne (DFT/B3LYP) oraz dostępne dane literaturowe. Widma SERS BN i jej fragmentów są na tyle złożone, że przypisania niektórych pasm wciąż pozostają dyskusyjne. Na szczęście, większość z fragmentów molekularnych posiada więcej niż jedno pasmo charakterystyczne i nawet niepoprawne przypisania pojedynczych pasm nie muszą prowadzić do błędnych konkluzji.

Podstawą do określenia stopnia oddziaływania adsorbentu z adsorbentem są dwa parametry: intensywność oraz szerokość połówkowa pasma. Porównując wartości tych parametrów na widmach SERS i Ramana dla różnych fragmentów cząsteczek, Doktorantka określiła w jaki sposób badane cząsteczki oddziałują z powierzchniami oraz jaka jest ich orientacja względem tych powierzchni. Moim zdaniem, jest to najważniejsza i zarazem najciekawsza część pracy. Otrzymane widma SERS są dobrej jakości i charakteryzują się dużą zmiennością zależnie od rodzaju cząsteczki i powierzchni. Zatem stanowią one solidną podstawę do interesujących konkluzji o badanych układach. Otrzymane wyniki wskazują, że najkrótszy z badanych peptydów (BN¹³⁻¹⁴), w zależności od powierzchni, oddziałuje poprzez reszty aminokwasowe lub metioninowe. Po przyłączeniu kolejnego aminokwasu - histydyny, ważną rolę w procesie adsorpcji zaczyna odgrywać pierścień imidazolowy. Adsorpcja tych fragmentów BN jest wspomagana za pomocą reszty metioninowej oraz wiązania peptydowego i grupy aminowej. Z kolei przyłączenie tryptofanu powoduje, że w oddziaływaniach z powierzchnią dominuje pierścień indolowy, chociaż na niektórych powierzchniach wciąż dużą rolę odgrywa reszta metioninowa. Porównując kształt widm SERS na powierzchni Ti i Fe oraz TiO₂NPs i Fe₂O₃NPs, Doktorantka stwierdziła, że w wyniku adsorpcji BN i jej fragmentów badane powierzchnie nie ulegają korozji. Otrzymane wyniki wskazują, że postać widma SERS silnie zależy zarówno od struktury adsorbowanej cząsteczki jak i rodzaju powierzchni. Stwarza to potencjalne możliwości aplikacyjne w diagnostyce medycznej. Do tej pory na powierzchni Pt, Fe lub ich tlenków udało się

zaadsorbować stosunkowo niewielkie cząsteczki. Zatem adsorpcja BN i jej fragmentów na tych powierzchniach oraz rejestracja dobrej jakości widm SERS stanowi znaczne osiągnięcie.

Pomimo starań, Doktorantka nie ustrzegła się błędów i pomyłek, głównie o charakterze edytorskim. Jednak mam również uwagi i pytania o charakterze merytorycznym.

Na początek kilka uwag ogólnych:

1. Na rysunku 16 pokazano jednocześnie widma SERS i Ramana dla BN i jej fragmentów. Na pozostałych rysunkach Doktorantka zrezygnowała z prezentacji widm Ramana, pomimo, że w dyskusji wciąż się do nich odwołuje. Zatem czytelnik porównujący widma SERS i Ramana dla powierzchni innych niż AuNPs/SiO₂ zmuszony jest do jednoczesnej analizy rysunków znajdujących się na różnych stronach, co stanowi pewną niedogodność.

2. Porównania widm oparte są na wizualnej inspekcji, zatem są one dosyć subiektywne. Moim zdaniem, należało wprowadzić jakąś prostą, ilościową miarę podobieństwa pomiędzy widmami, np. współczynnik korelacji.

3. Rysunki nie zawierają informacji o skali intensywności. Na rys. 16 przedstawione są widma SERS i Ramana ale brak tej informacji nie pozwala na oszacowanie stopnia wzmocnienia sygnałów na widmie SERS w stosunku do widma Ramana.

4. Położenia pasm na widmach często różnią się od tych, do których odniesienia znajdują się w tekście. Najlepszym przykładem jest tekst na str. 48 oraz widmo 16F. W tekście znajdują się odniesienia do pasm przy 1676, 1552, 1448 czy 1244 cm⁻¹ podczas gdy na widmie mamy pasma leżące przy 1672, 1550, 1460 i 1259/1236 cm⁻¹. Co prawda, różnice w położeniach są stosunkowo niewielkie ale często nawet tak małe przesunięcia pasm mogą być istotne, gdyż dostarczają informacji o zmianach strukturalnych i/lub oddziaływaniach.

5. W tabelach nie podano położenia wielu pasm, które są dobrze widoczne na widmach. Np. Rys. 18 zawiera pasma: 596 cm⁻¹ dla BN¹¹⁻¹⁴, 545 cm⁻¹ dla BN¹⁰⁻¹⁴, 652 cm⁻¹ dla BN⁹⁻¹⁴, i 518 cm⁻¹ dla BN, których nie ma w Tabeli 3.

6. Doktorantka porównywała widma SERS dla BN i różnych jej fragmentów na tej samej powierzchni, co pozwoliło na otrzymanie informacji o wpływie długości łańcucha peptydowego i jego struktury na oddziaływanie z daną powierzchnią. Interesujące byłyby zestawienie, na osobnych rysunkach, widm BN i jej fragmentów zaadsorbowanych na różnych powierzchniach. Tym sposobem otrzymalibyśmy czytelną informację na temat

wpływu różnych powierzchni na proces adsorpcji tej samej cząsteczki. Alternatywą jest jednocześnie porównanie widm znajdujących się na sześciu różnych rysunkach.

7. Doktorantka przedstawiła w formie graficznej sposoby adsorpcji BN i jej sześciu fragmentów na różnych powierzchniach (Rys. 17, 19, 22, 23, 26 i 27). Czy jest to wizja artystyczna wykreowana przez Doktorantkę czy też jest to obraz oparty o obliczenia teoretyczne? Jeżeli podstawą były obliczenia teoretyczne, to czy uwzględniały one oddziaływania BN i jej fragmentów z powierzchnią?

Uwagi bardziej szczegółowe:

a) Jednym z celów pracy było zbadanie wpływu adsorbentu na proces korozji wybranych powierzchni metalicznych. W tym przypadku porównywane były dwie pary powierzchni: α -Fe i γ -Fe₂O₃NPs oraz Ti i TiO₂NPs. Doktorantka stwierdziła, że w trakcie adsorpcji związków organicznych badane metale nie ulegają korozji. Konkluzja ta została oparta o wizualną ocenę różnic w kształcie widm BN i jej fragmentów na powierzchniach metalicznych (α -Fe i Ti) i ich tlenków. Przy braku ilościowej lub chociażby półilościowej miary podobieństwa widm (uwaga 2) taka ocena jest trochę arbitralna. W większości przypadków, różnice pomiędzy porównywanymi widmami są znaczne, jednak w kilku przypadkach widma SERS są podobne, np. BN⁸⁻¹⁴ na Ti i TiO₂ (rys. 21F), BN¹³⁻¹⁴ i BN⁸⁻¹⁴ na Fe i Fe₂O₃ (rys. 24A i 25F). Zatem jeżeli konkluzja o korozji ma być oparta jedynie na podobieństwie widm lub jego braku, to powinno ona być poprzedzona dyskusją wyżej wymienionych przypadków. Widma SERS były rejestrowane po dwóch (w niektórych przypadkach po trzech) godzinach od naniesienia roztworu na powierzchnię. Pełniejszy obraz dynamiki procesu korozji dałoby zarejestrowanie czasowo-rozdzielczych widm SERS w znacznie dłuższym przedziale czasowym.

b) Na str. 58 znajduje się następująca konkluzja - "*W wszystkich widmach SERS zaobserwowano interakcję grupy karboksylowej z powierzchnią PtNPs.*" Jedyne pasmo przypisane wprost do drgań związanych z grupą karboksylową leży przy 1450 cm⁻¹ (Tab. 3). Jednak główny wkład do tego pasma pochodzi od drgań deformacyjnych grupy metylowej. Poza tym dla BN⁸⁻¹⁴ i BN pasmo to występuje przy ok. 1440 cm⁻¹ i zostało przypisane do drgań tryptofanu.

c) Na str. 76 znajduje się stwierdzenie, że pierścień imidazolu dla BN¹²⁻¹⁴ na powierzchni γ -Fe₂O₃NPs przyjmuje kątowne ułożenie względem powierzchni nanocząstek i miara kąta wynosi prawie 90°. W jaki sposób oszacowano miarę kąta?

d) *"Widmo SERS dla BN¹¹⁻¹⁴ unieruchomionego na powierzchni płytki α -Fe ma kształt podobny do tego otrzymanego na tym SERS aktywnym substracie dla BN¹²⁻¹⁴ (rys. 24B, 24C)."* Jak pisze Doktorantka (str. 76), taka sytuacja jest możliwa ponieważ polipeptydy różnią się między sobą tylko jednym aminokwasem L-glicyną. Zatem L-glicyna nie powinna być zaangażowana w oddziaływanie z powierzchnią, czemu przeczą dane doświadczalne oraz konkluzja na str. 77.

e) W Tabeli 2 położenia pasm odpowiadających drganiom wiązania peptydowego dla BN¹³⁻¹⁴ i BN¹²⁻¹⁴ (534 i 543 cm⁻¹) zamieniono miejscami.

f) Nawet na pierwszy rzut oka widać, że deklarowane położenie pasma przy 495 cm⁻¹ na widmie FT-IR-ATR (Rys. 10 A) jest znacznie zawyżone!

g) Na str. 60 znajdujemy informację, że pasma SERS na α -Ti (rys. 20A) przy: 1343 cm⁻¹ i 1256 cm⁻¹ mają niską intensywność. W rzeczywistości pasmo przy 1343 cm⁻¹ jest niewidoczne a z kolei pasmo przy 1256 cm⁻¹ należy do najintensywniejszych na tym widmie!

h) Str. 60: *"Dodatkowo w obu widmach (BN¹³⁻¹⁴ na Ti i TiO₂NPs) przy częstotliwości około 1041 cm⁻¹ obserwowane jest (Rys. 20A) pasmo przypisane do drgań rozciągających grupy: Ti-O-C."* Na widmie SERS na podłożu TiO₂NPs pasmo to jest tak słabe, że jego istnienie zależy od dobrej woli osoby interpretującej widmo.

i) Dlaczego drganie przy 1436 cm⁻¹ pochodzące od histydyny na TiO₂ przypisano do cząsteczki BN¹³⁻¹⁴, która nie zawiera w swojej strukturze pierścienia imidazolowego (Tabela 4)?

k) Str. 48. *"...His¹² i Met¹⁴ asystują w adsorpcji BN⁸⁻¹⁴ na AuNPs/SiO₂."* - powinno być BN⁹⁻¹⁴
Rys. 7 *"Ti/BN (linia ciągła granatowa)"* - powinno być: Ti/BN (linia ciągła czerwona).

Str. 73: *"Kształt widma SERS dla fragmentu BN¹³⁻¹⁴ (Rys. 24, (B))"* - powinno być Rys. 24 A.

I jeszcze jedna uwaga - dotycząca języka. Na początku pracy od czasu do czasu zdarzają się błędy językowe, głównie niepoprawne końcówki. Jednak im bliżej końca pracy tym zagęszczenie tych błędów staje się coraz większe. Praca zawiera również sporo nieprecyzyjnych bądź niezrozumiałych sformułowań. Poniżej kilka wybranych przykładów:

str. 7: Ti - titan

str. 23: może wykonywać inne właściwości

str. 24: niż jego nanocząstki tego metalu

str. 24: widma SERS o wysokiej rozdzielczości wody na PtNPs

str. 25: widma SERS miały niską stosunek S/N

str. 35: Badania SEM potwierdzają wyznaczone na podstawie pomiarów XRD, iż wielkość PtNPs wynosi 12 nm.

str. 43: kationów wakacyjnych

str. 45: Przypisanie obserwowanych pasma... a także widma Raman

str. 68: Widmo SERS został zdominowany... połączone z drganiami po za płaszczyzną...

str. 77: Na kształt widma wzrasta wpływ grup pochodzących od His¹².

str. 76: L-glicynyną

str. 87: ...wzrost ilość węgla na tych powierzchniach po adsorpcji BN.

str. 87: powierzchnie podano charakterystyce

W wielu miejscach pracy występuje określenie "*ilość pasm*" zamiast liczba pasm a pracę kończy nieco zabawne określenie: "*związkami z ciała człowieka*".

Jednak te wszystkie krytyczne uwagi nie deprecjonują naukowej wartości recenzowanej pracy. Realizacja pracy doktorskiej wymagała opanowania wielu metod eksperymentalnych, włączając w to technikę SERS, oraz wykazania się stosowną wiedzą teoretyczną. Doktoranta dobrze poradziła sobie z tymi zadaniami, dzięki czemu zebrała dużą ilość wartościowego materiału. Wyniki zawarte w pracy doktorskiej zostały opublikowane w kilku czasopismach z listy filadelfijskiej a Doktorantka jest pierwszym autorem w pięciu z sześciu tych prac. Pomimo pewnych niedociągnięć, praca zawiera elementy nowości naukowej i stanowi rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Tąty spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami i wnioskuję o dopuszczenie mgr Agnieszki Tąty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mirosław Czerwik

