



**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE**

**Wydział Chemii
Instytut Nauk Chemicznych**

mgr Iwona Budziak-Wieczorek

**BIODOSTĘPNOŚĆ NATURALNYCH
ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH - BADANIA
FIZYKOCHEMICZNE I MODELOWE**

Rozprawa doktorska
wykonana w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem dr hab. Daniela M. Kamińskiego prof. UMCS

Lublin 2021

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi pracy doktorskiej
dr hab. Danielowi M. Kamińskiemu prof. UMCS
za poświęcony czas, wsparcie, cierpliwość oraz cenne rady i pomoc
w przygotowaniu rozprawy doktorskiej.*

*Chciałabym wyrazić wdzięczność Pani
dr hab. Marcie Arczewskiej prof. uczelni UP w Lublinie
za przekazaną wiedzę w zakresie technik eksperymentalnych
i pomoc w badaniach naukowych.*

*Składam podziękowania Kierownikowi Katedry Chemii Uniwersytetu
Przyrodniczego w Lublinie prof. dr hab. Izabelli Jackowskiej
za pomoc w realizowaniu mojej pracy doktorskiej.*

*Chciałabym serdecznie podziękować wszystkim
Pracownikom Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie za życzliwość i miłą atmosferę, która przyczyniła
się do powstania mojej pracy doktorskiej.*

*Dziękuję wszystkim osobom zaangażowanym w powstawanie
mojej pracy doktorskiej na każdym etapie badań naukowych.*

*Szczególne podziękowania składam Rodzicom oraz mojemu Mężowi
za wyrozumienie oraz motywację. W szczególności dziękuję mojej
Mamie za wiarę w moje możliwości i nieustające wsparcie.*

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej

- Publikacja 1** **Budziak-Wieczorek I.,** Maciołek U., **2021,** *Synthesis and Characterization of a (–)-Epicatechin and Barbituric Acid Cocrystal: Single-Crystal X-ray Diffraction and Vibrational Spectroscopic Studies*, **ACS Omega**
IF₍₂₀₂₀₎: **3,512**
Punkty MNiSW: **70 pkt**
Liczba cytowań wg Web of Science: (0)
- Publikacja 2** **Budziak I.,** Arczewska M., Kamiński D. M., **2020,** *Structure and Physical Properties of Cardamonin: A Spectroscopic and Computational Approach*, **Molecules**
IF₍₂₀₂₀₎: **4,411**
Punkty MNiSW: **100 pkt**
Liczba cytowań wg Web of Science: (1)
- Publikacja 3** **Budziak I.,** Arczewska M., Kamiński D. M., **2019,** *Formation of Prenylated Chalcone Xanthohumol Cocrystals: Single Crystal X-Ray Diffraction, Vibrational Spectroscopic Study Coupled with Multivariate Analysis*, **Molecules**
IF₍₂₀₁₉₎: **3,267**
Punkty MNiSW: **100 pkt**
Liczba cytowań wg Web of Science: (5)
- Publikacja 4** **Budziak I.,** Arczewska M., Sachadyn-Król M., Matwiczuk A., Waśko A., Gagoś M., Terpiłowski K., Kamiński D. M., **2018,** *Effect of polyols on the DMPC lipid monolayers and bilayers*, **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.**
IF₍₂₀₁₈₎: **3,790**
Punkty MNiSW: **35 pkt**
Liczba cytowań wg Web of Science: (7)

Sumaryczny *Impact Factor* (IF) czasopism, w których zostały opublikowane prace wchodzące w skład cyklu rozprawy doktorskiej zgodnie z rokiem opublikowania: **14,980**.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW obowiązujących w roku wydania pracy wynosi: **305**.

Liczba cytowań wg Web of Science: **13**.

Wykaz skrótów stosowanych w autoreferacie

FDA (ang. *Food and Drug Administration*) - Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków

API (ang. *active pharmaceutical ingredient*) - aktywny składnik farmaceutyczny

BCS (ang. *Biopharmaceutics Classification System*) - system klasyfikacji biofarmaceutycznej

LBF (ang. *lipid based formulations*) - kompozycje farmaceutyczne oparte na lipidach

ASD (ang. *amorphous solid dispersions*) - amorficzne stałe dyspersje

IBS (ang. *irritable bowel syndrome*) - zespół jelita drażliwego

PXRD (ang. *powder X-ray diffraction*) - proszkowa dyfrakcja rentgenowska

FTIR (ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*) - spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

UV-Vis (ang. *Ultraviolet-visible spectroscopy*) - spektroskopia w ultrafiolecie i świetle widzialnym

DSC (ang. *differential scanning calorimetry*) - różnicowa kalorymetria skaningowa

DFT (ang. *density functional theory*) - teoria funkcjonału gęstości

PBS (ang. *phosphate buffered saline*) - bufor fosforanowy

AIEE (ang. *aggregation-induced emission enhancement*) - mechanizm zwiększonej emisji indukowanej agregacją

PCA (ang. *principal component analysis*) - analiza składowych głównych

HCA (ang. *hierarchical cluster analysis*) - hierarchiczna analiza skupień

DMPC (ang. *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) - 1,2-dimirystoilo-sn-glicero-3-fosfocholina

CCDC (ang. *The Cambridge Crystallographic Data Centre*) - centrum danych krystalograficznych Cambridge

CSD (ang. *Cambridge Structural Database*) - krystalograficzna baza danych Cambridge

EC - (-)-epikatechina

BTA - kwas barbiturowy

EC-BTA - kokryształ (-)-epikatechiny i kwasu barbiturowego

CA - kardamonina

XN - ksantohumol

NIC - nikotynamid

AC - acetamid

GA - glutarimid

CF - kofeina

XN-NIC - kokryształ ksantohumolu i nikotynamidu

XN-AC - kokryształ ksantohumolu i acetamidu

XN-GA - kokryształ ksantohumolu i glutarimidu

XN-CF - kokryształ ksantohumolu i kofeiny

Spis treści

1. Uzasadnienie wyboru tematu	1
2. Część literaturowa	3
2.1. Biodostępność	3
2.2. Metody zwiększające biodostępność	5
2.2.1. Kompozycje oparte na lipidach.....	5
2.2.2. Amorficzne formy stałe.....	6
2.2.3. Krystaliczne formy stałe.....	6
2.2.4. Metoda kokryształizacji	7
2.3. Mechanizm zwiększenia rozpuszczalności i biodostępności przez kokryształy	9
2.4. Badane związki bioaktywne	10
2.4.1. Chalkony	10
2.4.2. Flawan-3-ole.....	12
2.4.3. Poliole.....	13
3. Cel pracy i tezy badawcze	15
4. Materiały i metody badawcze	17
4.1. Metody dyfrakcyjne	17
4.1.1. Dyfrakcja rentgenowska monokryształów	17
4.1.2. Proszkowa dyfrakcja rentgenowska	18
4.2. Metody spektroskopowe	18
4.2.1. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).....	18
4.2.2. Spektroskopia Ramana	19
4.2.3. Spektroskopia Elektronowa UV-Vis.....	19
4.2.4. Spektroskopia Fluorescencyjna.....	20
4.3. Analiza termiczna	20
4.3.1. Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC).....	20
4.4. Analiza powierzchni Hirszfelda.....	21
4.5. Optymalizacja geometrii metodą DFT.....	21
4.6. Analiza chemometryczna.....	21
4.7. Charakterystyka monowarstw Langmuira	22
5. Wyniki badań i omówienie najważniejszych wyników	23
5.1. Opis wyników publikacji 1	24
5.2. Opis wyników publikacji 2	28
5.3. Opis wyników publikacji 3	31
5.4. Opis wyników publikacji 4	35

6. Podsumowanie i wnioski	39
7. Spis rysunków	41
8. Bibliografia.....	42
9. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	46

SUPLEMENT

[S1] Streszczenie rozprawy w języku polskim

[S2] Streszczenie rozprawy w języku angielskim

[S3] Wykaz dorobku naukowego oraz informacja o działalności popularyzującej naukę

1. Uzasadnienie wyboru tematu

W dzisiejszych czasach szczególnym zainteresowaniem w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym cieszą się szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym związki polifenolowe. Najnowsze badania potwierdzają, że substancje bioaktywne zawarte w produktach pochodzenia naturalnego mogą być zastosowane do prewencji i leczenia wielu chorób cywilizacyjnych. Jednak ich słaba rozpuszczalność w roztworach wodnych oraz związana z tym ograniczona biodostępność są przeszkodą w opracowaniu skutecznych i stabilnych preparatów farmaceutycznych oraz suplementów diety. Rozpuszczalność i przepuszczalność mają fundamentalne znaczenie podczas tworzenia nowych połączeń, dlatego poszukuje się innych strategii, które mogłyby poprawić biodostępność substancji bioaktywnych. Znanych jest wiele metod zmieniających właściwości fizykochemiczne związków m.in. tworzenie soli krystalicznych, amorficzna dyspersja, synteza nanocząstek i kokryształów. Interesującym podejściem jest zastosowanie kokryształizacji, techniki która polega na modyfikacji właściwości fizykochemicznych związków bioaktywnych bez wpływu na ich właściwości farmakologiczne.

Badania strukturalne i fizykochemiczne związków bioaktywnych pozwalają na wyznaczenie właściwości biologicznych m.in. biodostępności, aktywności antyoksydacyjnej oraz specyficznych interakcji z receptorami komórkowymi i enzymami. W literaturze naukowej dostępnych jest już wiele prac dotyczących syntezy i badania rozpuszczalności flawonów m.in.: kwercytyny, izoliquiritigeniny oraz naringeniny. Wielokierunkowe działanie naturalnych flawonoidów pozwala prognozować, że w najbliższych latach związki te i ich zmodyfikowane formy molekularne na drodze kokryształizacji mogą stanowić uzupełnienie, a nawet alternatywę dla leczenia chemioterapeutykami. Niemniej jednak w dalszym ciągu wiele związków polifenolowych o unikalnych właściwościach biologicznych, charakteryzujących się niską biodostępnością nie jest przebadanych pod kątem poprawy właściwości fizykochemicznych.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej zastosowano metodę kokryształizacji związków biologicznie czynnych, różniących się budową chemiczną oraz zbadano wpływ wybranej formy krystalicznej na rozpuszczalność. Poprawa rozpuszczalności związków bioaktywnych w roztworach wodnych jest pierwszym i kluczowym krokiem w ulepszeniu biodostępności. Drugim aspektem badań było stworzenie układu modelowego z zastosowaniem związków silnie hydrofilowych i zbadanie wpływu wybranej grupy

związków na organizację molekularną, oddziaływanie i przepuszczalność przez błony lipidowe. Badanie wpływu hydrofilowości związku na przenikalność przez błony lipidowe ma ogromne znaczenie w projektowaniu biodostępności, zwłaszcza tam gdzie docelowym przeznaczeniem jest błona komórkowa.

2. Część literaturowa

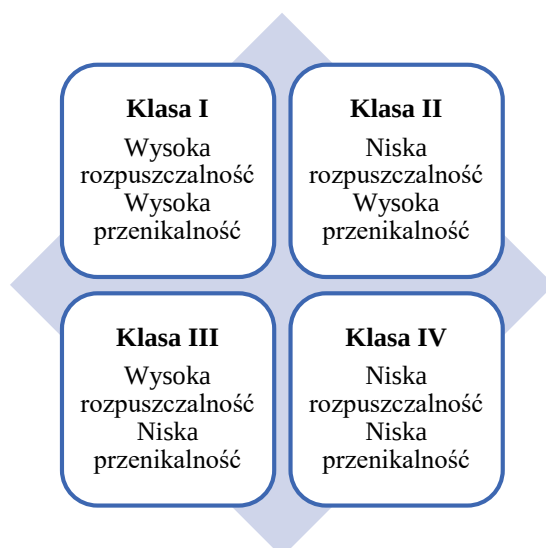
2.1. Biodostępność

Na przestrzeni ostatnich lat badania nad biodostępnością leków i substancji aktywnych oraz ich udoskonaleniem z punktu widzenia poprawy określonych właściwości fizykochemicznych stały się przedmiotem zainteresowania przemysłu farmaceutycznego. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) definiuje biodostępność jako *„szybkość i stopień z jaką aktywny składnik leku lub substancja aktywna biologicznie jest absorbowana z przewodu pokarmowego i trafia w określone miejsce, w którym może wywierać swoje działanie biologiczne”* (Veber i in., 2002, Varshosaz i in., 2018). W rzeczywistości rzadko zdarza się, aby stężenie leku można było określić w miejscu jego działania, dlatego biodostępność jest częściej definiowana jako *„szybkość i stopień z jaką aktywny składnik leku lub substancja aktywna biologicznie jest absorbowana z podanej dawki i staje się dostępna w krążeniu ogólnoustrojowym”*. Z pojęciem biodostępności wiąże się ściśle sposób i rodzaj dawkowania leku m.in. zastrzyki domięśniowe i dożylnie, plastry przezskórne, implanty oraz podanie doustne. W przypadku leku podanego dożylnie jego biodostępność wynosi 100%, co oznacza, że ilość leku docierająca do krążenia ogólnoustrojowego jest równa całkowitej podanej dawce (Olivares-Morales i in., 2014). Podanie doustne jest często preferowanym sposobem dawkowania leków ponieważ jest proste, tanie, nieinwazyjne i przyjazne dla pacjenta.

W naukach o żywieniu, które dotyczą spożywania składników odżywczych i suplementów diety, brakuje dobrze zdefiniowanego pojęcia biodostępności. Definicja farmakologiczna nie może mieć zastosowania do substancji odżywczych, ponieważ absorpcja i wykorzystanie substancji odżywczych jest funkcją stanu fizjologicznego podmiotu, co skutkuje dużymi różnicami między poszczególnymi osobami. Biodostępność można szeroko zdefiniować jako parametr, który obejmuje wchłanianie i wykorzystanie składnika odżywczego (Fairweather-Tait, 1997). Na biodostępność wpływa wiele czynników, takich jak struktura chemiczna składnika odżywczego, matryca pożywienia lub suplementu, płeć i stan fizjologiczny osoby spożywającej dany produkt oraz współistniejące stany patologiczne (Krebs, 2001).

Leki oraz aktywne składniki farmaceutyczne (API), które mają niską biodostępność po podaniu doustnym często nie osiągają minimalnego skutecznego stężenia wymaganego

do osiągnięcia założonego działania farmakologicznego (Spizzirri i in., 2019, Smith i in., 2011). W przemyśle farmaceutycznym badania dotyczące poprawy właściwości fizykochemicznych m.in. rozpuszczalności i przenikalności leków i aktywnych składników farmaceutycznych o niskiej biodostępności są jednym z najważniejszych aspektów. Zgodnie z systemem klasyfikacji biofarmaceutycznej BCS (ang. *Biopharmaceutics Classification System*) rozpuszczalność w roztworach wodnych i przenikalność przez bariery biologiczne są czynnikami odpowiedzialnymi za wchłanianie API doustne. BCS klasyfikuje leki na 4 klasy na podstawie ich rozpuszczalności i przenikalności (rysunek 1) (Emami i in., 2018). Szacuje się, że około 40% doustnych produktów leczniczych znajdujących się obecnie na rynku wykazuje niską rozpuszczalność w wodzie, z czego 30% należy do klasy II, a 10% do klasy IV.



Rysunek 1. Schemat systemu klasyfikacji biofarmaceutycznej BCS.

Ponadto, w przemyśle farmaceutycznym cały czas wzrasta liczba potencjalnych syntetycznych kandydatów na leki o słabej rozpuszczalności w wodzie, a klasa II (70%) i klasa IV (20%) stanowią największą grupę potencjalnych preparatów (Dahan, Miller, 2012). Wzrost liczby nierozpuszczalnych w wodzie związków przypisuje się postępom w dziedzinie badań przesiewowych, które umożliwiają syntezę licznych związków chemicznych o wysokim powinowactwie do celów biologicznych, ale charakteryzujących się niską biodostępnością.

Różne właściwości fizykochemiczne, które przyczyniają się do słabej rozpuszczalności leków, obejmują ich złożoną strukturę chemiczną, rozmiar, dużą masę cząsteczkową, wysoką lipofilność, możliwość tworzenia wewnątrzcząsteczkowych i międzycząsteczkowych wiązań

wodorowych (np. z rozpuszczalnikiem), krystaliczność-amorficzność, upakowanie cząsteczek w sieci krystalicznej (polimorfizm, solwatomorfizm, pH i postać soli (Lipinski, 2000). Obecnie znanych jest wiele metod uzyskiwania przesycenia słabo rozpuszczalnych postaci leku m.in. stosowanie środków powierzchniowo czynnych, formułacji z zastosowaniem lipidów, samoemulgujących systemów dostarczania leków, stosownie cyklodekstryn, kaliksarenów, amorficznych dyspersji oraz tworzenie soli krystalicznych i kokryształów (Tran i in., 2019, Alqahtani i in., 2021, Espanol, Villamil, 2019).

2.2. Metody zwiększające biodostępność

Odpowiedni wybór formy stałej jest jednym z najważniejszych etapów w trakcie badań nad nowym lekiem lub substancją aktywną i dlatego stanowi priorytet prac badawczych w przemyśle farmaceutycznym. W celu udoskonalenia określonych właściwości istotnych z punktu widzenia biodostępności możemy zastosować trzy główne podejścia: kompozycje oparte na lipidach oraz amorficzne i krystaliczne formy stałe (Pouton, 2006).

2.2.1. Kompozycje oparte na lipidach

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie kompozycjami farmaceutycznymi opartymi na lipidach LBF (ang. *lipid based formulations*), które mogą być stosowane w celu zwiększenia biodostępności słabo rozpuszczalnych w wodzie lipofilowych substancji czynnych (Patel i in., 2018, Mu i in., 2013).

Metoda ta opiera się na empirycznych ustaleniach korzystnego wpływu na profil wchłaniania substancji lipofilowych po jednoczesnym podaniu z lipidami i zmianach stanu fizykochemicznego i fizjologicznego w przewodzie pokarmowym. Podejście to zostało również rozszerzone o leki hydrofilowe w celu poprawy efektu solubilizacji w przewodzie pokarmowym i osiągnięcia spodziewanych korzyści farmaceutycznych (New, Kirby, 1997). Lipidy wywierają swoje działanie poprzez kilka złożonych mechanizmów, które prowadzą do zmiany właściwości biofarmaceutycznych leku, takich jak: zwiększona szybkość rozpuszczania leku i rozpuszczalność w płynie jelitowym, ochrona leku przed degradacją chemiczną i enzymatyczną oraz tworzenie lipoprotein wspomagających transport limfatyczny silnie lipofilnych substancji (Hauss i in., 1998).

2.2.2. Amorficzne formy stałe

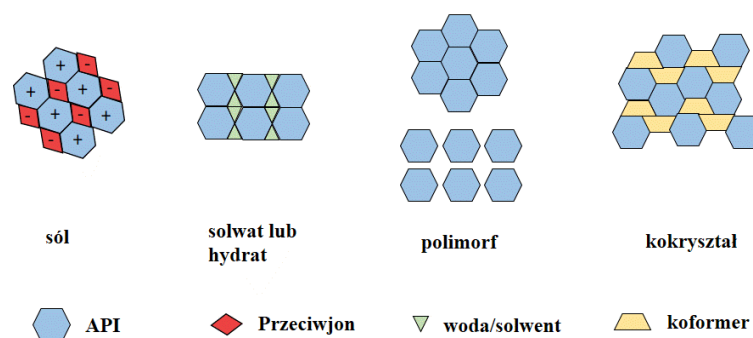
Metoda amorfizacji może efektywnie poprawiać biodostępność leków lub substancji aktywnych. Forma amorficzna z definicji jest materiałem niekrystalicznym, która nie posiada uporządkowania dalekiego zasięgu. Substancja amorficzna w porównaniu do formy krystalicznej należy do formy wysokoenergetycznej o wyższej energii wewnętrznej. Dzięki temu jest lepiej rozpuszczalna, szybciej się wchłania i jest lepiej przyswajalna w porównaniu do form krystalicznych (Mesallati i in., 2017). Jednakże, metoda amorfizacji posiada pewne ograniczenia i wady m.in. preparaty amorficzne są z natury niestabilne i podatne na krystalizację (Yu, 2001). Dlatego postać amorficznego leku osadza się na stałym nośniku, który może być małą cząsteczką lub polimerem (metoda ASD amorficznych stałych dyspersji). Nośnik używany do tworzenia ASD musi być starannie dobrany, aby zmaksymalizować stabilność i rozpuszczalność produktu. Główną wadą tej metody jest niestabilność termodynamiczna (Mishra i in., 2015).

2.2.3. Krystaliczne formy stałe

W przemyśle farmaceutycznym wiele leków występuje w formie krystalicznej, ze względu na stabilność i łatwość opracowania na różnych etapach syntezy. W początkowym etapie opracowania leku poszukuje się wielorakich form krystalicznych badanej substancji aktywnej i następnie wybiera spośród nich tę o najbardziej odpowiedniej i stabilnej postaci. Najczęściej stosowaną metodą tworzenia leków i substancji aktywnych o pożądanych właściwościach fizykochemicznych i farmakologicznych jest synteza odmian polimorficznych, solwatów, soli oraz kokryształów (Vippagunta i in., 2001). Na rysunku 2 przedstawiono różne formy krystaliczne, które są wykorzystywane do produkcji substancji leczniczych.

Na szybkość rozpuszczania oraz transport leku w postaci krystalicznej mogą mieć wpływ różne przemiany fazowe takie jak: interkonwersja polimorficzna, desolvatacja, tworzenie hydratu i konwersja do formy amorficznej. Zdolność do tworzenia soli i solwatów jest uwarunkowana obecnością określonych grup funkcyjnych w cząsteczce, które powodują powstanie form jonowych. Alternatywnym rozwiązaniem dla substancji niejonowych i jonowych może być synteza kokryształów - homogenicznych faz wieloskładnikowych, których molekularne lub jonowe komponenty, obecne w ilościach stechiometrycznych, są stabilizowane za pomocą oddziaływań niekowalencyjnych, głównie wiązań wodorowych

(Aitipamula i in., 2012, Budziak i in., 2019). W temperaturze pokojowej izolowane składniki kokryształów są ciałami stałymi.

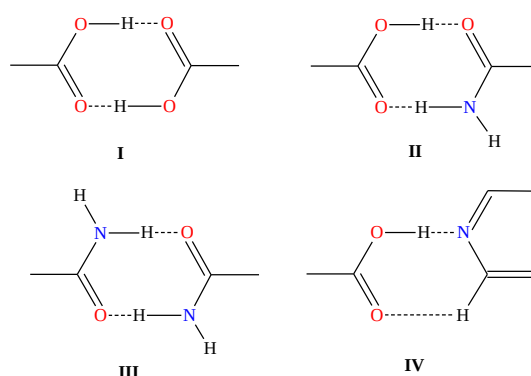


Rysunek 2. Typy form krystalicznych występujących w substancjach leczniczych (Cerrea Vioglio i in., 2017).

2.2.4. Metoda kokrysztalizacji

Obecnie obiecującym sposobem modyfikowania rozpuszczalności, szybkości rozpuszczania i innych właściwości fizykochemicznych substancji leczniczych jest metoda kokrysztalizacji, często stosowana w inżynierii krystalicznej. Kokryształy stanowią alternatywne podejście w celu poprawy określonych właściwości fizykochemicznych i biofarmaceutycznych aktywnych składników farmaceutycznych, gdy tworzenie soli, solwatów, polimorfów lub form bezpostaciowych nie spełniają oczekiwanych założeń. Ponadto kokryształy są termodynamicznie dużo trwalsze od form amorficznych ponieważ są w formie krystalicznej. W 2004 roku kokryształy farmaceutyczne zostały opisane jako odrębna klasa nowych, krystalicznych materiałów, które mogą zmieniać właściwości fizykochemiczne API co było początkiem nowej ery w inżynierii kryształów (Kumar, Nanda, 2017). Farmaceutyczne kokryształy zostały zdefiniowane jako kokryształy, które zbudowane są z substancji aktywnej API oraz koformera (ligandu krystalicznego) w stosunku stechiometrycznym (Korotkova, Kratochvil, 2014). W porównaniu z czystym, aktywnym składnikiem farmaceutycznym kokryształy często wykazują wyjątkowe właściwości, które można modyfikować poprzez zmiany koformera lub upakowanie cząsteczek w sieci krystalicznej (polimorfizm kokryształu) (Duggirala i in., 2020). Otrzymywanie kokryształów polega głównie na wykorzystaniu możliwych wiązań niekowalencyjnych m.in. wiązań wodorowych, oddziaływań van der Waalsa, słabych oddziaływań hydrofobowych (oddziaływania typu π - π). Dodatkowo na etapie projektowania kokryształów należy wziąć pod

uwagę możliwość utworzenia syntonów supramolekularnych, które stanowią jednostkę strukturalną w obrębie kryształu i mogą zostać utworzone poprzez możliwe oddziaływania międzycząsteczkowe. Termin „synton” został po raz pierwszy wprowadzony przez Coreya w 1967 roku, który zdefiniował synton jako „jednostkę strukturalną w cząsteczce, która może być utworzona i/lub złożona za pomocą znanej lub możliwej do wyobrażenia syntezy, która obejmuje interakcje międzycząsteczkowe” (Sathisaran, Dalvi, 2018). Powstawanie syntonów jest związane z określonymi grupami funkcyjnymi w molekuale m.in. grupą karboksylową, grupą hydroksylową, aromatycznym azotem. W kokryształizacji pomiędzy flawonoidami i związkami organicznym zawierającymi azot, heterosynton O–H···N został uznany za najbardziej prawdopodobny synton molekularny. Charakterystyczne i najczęściej używane syntony supramolekularne zostały zaprezentowane na rysunku 3.



Rysunek 3. Typowe syntony supramolekularne wiązań wodorowych występujących w kokryształach: I - dimer kwas-kwas, II - dimer amid-kwas, III - dimer amid-amid, IV - dimer kwas-pirydyna (Vishweshwar i in., 2006).

Kokryształy mogą być rozwiązaniem dla przemysłu farmaceutycznego, który ma do czynienia z lekami słabo rozpuszczalnymi i/lub o niskiej przepuszczalności. Główną zaletą kokryształów jest to, że poprawiają rozpuszczalność/przenikalność leku bez zmiany jego struktury molekularnej. W literaturze jest wiele przykładów leków, których kokryształy zostały pomyślnie otrzymane (Childs i in., 2013, Drozd i in., 2017, Patil i in., 2014).

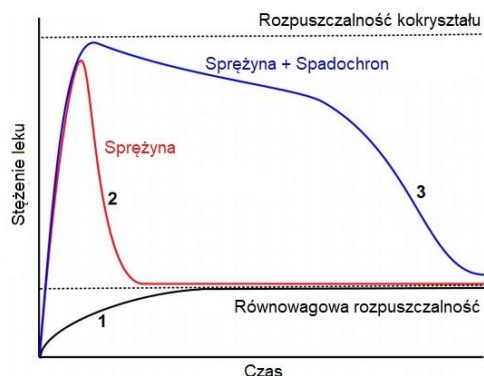
2.3. Mechanizm zwiększenia rozpuszczalności i biodostępności przez kokryształy

Zwiększenie rozpuszczalności kokryształów w porównaniu do czystej formy może być wynikiem zmiany energii solwatacji oraz zmian w sieci krystalicznej z powodu obecności koformera. W publikacjach (Childs i in., 2013, Li i in., 2020) stwierdzono, że zwiększona rozpuszczalność kokryształów korzystnie wpływała na absorpcję tych form w przewodzie pokarmowym badanych zwierząt. Podobnie Shan i współpracownicy (Shan i in., 2014) wykazali dodatnie korelacje między rozpuszczalnością *in vitro* kokryształów zawierających API z klasy II a stężeniem leku w osoczu. Dodatkowo badania wykazały, że kokryształy nie tylko mogą poprawiać właściwości rozpuszczania leków, ale także mogą modyfikować właściwości dyfuzji/przepuszczalności leków przez membrany biologiczne (Sanphui i in., 2015). Wyniki te mogą rozszerzyć zastosowania kokryształów dla leków z klasy II i III, oraz dla klasy IV w systemie BCS (Emami i in., 2018).

Zwiększona rozpuszczalność jest efektem pożądanym, ponieważ poprawia biodostępność leku. Jednakże nadmierne wzmocnienie rozpuszczalności może być problematyczne, ze względu na możliwość niepożądanego wytrącenia materiału wyjściowego z powodu tworzenia przesyconego roztworu. Przesycenie występuje, gdy cząsteczki leku obecne w roztworze posiadają stężenie wyższe niż równowagowa rozpuszczalność termodynamicznie stabilnej postaci leku. Przesycony roztwór jest niestabilny termodynamicznie, dlatego ulega krystalizacji, która jest formą termodynamicznie bardziej stabilną. Przejście do najstabilniejszej formy ciała stałego może przebiegać przez różne fazy polimorficzne. Przemiana prowadzi do szybkiego spadku stężenia substancji aktywnej do poziomu rozpuszczalności w postaci stabilnej (efekt „sprężyny”). Aby skorzystać z przesycenia jako strategii poprawy rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania słabo rozpuszczalnych leków, należy dodatkowo kontrolować dwa krytyczne etapy: (i) generowanie metastabilnego stanu przesyconego, (ii) utrzymanie powyższego stanu przez dłuższy czas. Guzmán i współpracownicy (Guzmán i in., 2007) przedstawili koncepcję „sprężyny i spadochronu” poprzez utworzenie metastabilnego stanu przesycenia z wykorzystaniem kokryształów (rysunek 4).

Istnieją metody kontrolowania szybkości przemiany fazowej poprzez użycie inhibitorów krystalizacji, takich jak polimery i środki powierzchniowo czynne, które mogą stabilizować przesycony roztwór i zmniejszyć szybkość konwersji. Poprawne uchwycenie

zalet rozpuszczalności kokryształów poprzez dodanie inhibitorów krystalizacji nazywa się efektem spadochronowym (Childs i in., 2013, Kuminek i in., 2016).



Rysunek 4. Schematyczny wykres przedstawiający koncepcję „sprężyny i spadochronu” w profilu stężenia leku w czasie. Typowy profil rozpuszczania najbardziej stabilnej fazy stałej leku (1), kokryształ z procesem przesylenia/wytrącenia (tj. faza bezpostaciowa) (2), wysoce rozpuszczalna postać leku utrzymywana przez długi czas w strefie metastabilnej(3) (Emami i in., 2018).

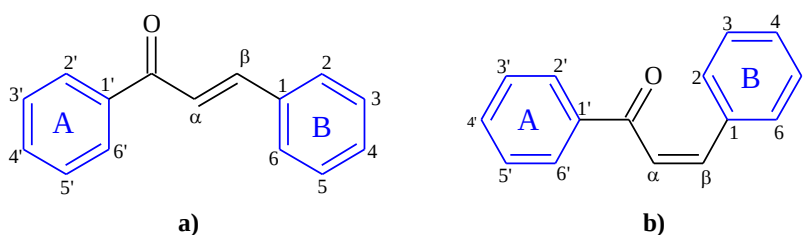
2.4. Badane związki bioaktywne

2.4.1. Chalkony

Chalkony (1,3-difenylo-2-propen-1-on) są naturalnymi, polifenolowymi związkami należącymi do dużej grupy flawonoidów, które występują w roślinach jako metabolity wtórne (Kamiński D., 2016). Podobnie jak flawonoidy, cząsteczki chalkonów mogą mieć kilka grup hydroksylowych w różnych pozycjach, które działają zarówno jako akceptory i donory wiązań wodorowych. Z tego powodu taka struktura jest bardzo podatna na tworzenie się wiązań wodorowych z hydroksylowymi, ketonowymi i aromatycznymi grupami azotowymi, co jest wysoce wskazane w procesie kokrystalizacji. Chalkony są aromatycznymi ketonami, których szkielet składa się z dwóch pierścieni aromatycznych połączonych α , β -nienasyconym ketonem. Ugrupowanie to powinno sprzyjać kokrystalizacji (rysunek 5) (Gomes i in., 2017). Istnieje niewiele doniesień naukowych na temat kokrystalizacji naturalnie występujących chalkonów (Xu i in., 2016, Budziak i in., 2019).

Chalkony są prekursorami flawonów podczas biosyntezy flawonoidów i izoflawonoidów. Związki te także stanowią główny biologicznie aktywny składnik w produktach pochodzenia naturalnego tj.: w owocach (cytrusy, jabłka), warzywa (pomidory, szalotki, kiełki fasoli, ziemniaki, soja) oraz roślinach i ziołach (lukrecja, kardamon, szyszki chmielu zwyczajnego)

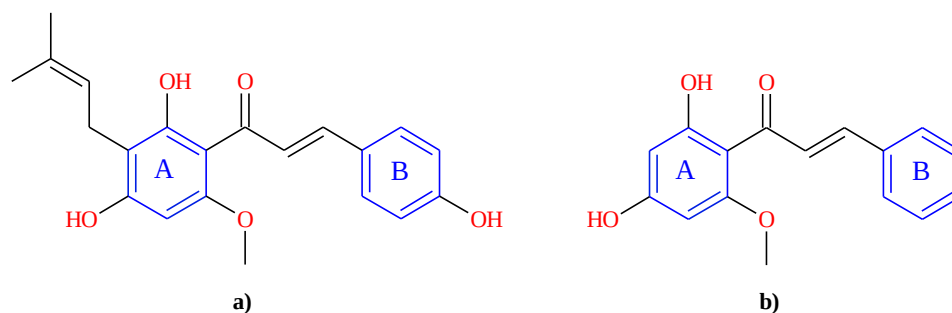
(Kumar i in., 2013). Wiele chalkonów zostało wyizolowanych z gatunków roślin należących do rodziny bobowatych, astrowatych oraz morwowatych (Rozmer, Perjesi, 2016). Badania wykazały, że związki, które posiadają strukturę chalkonu posiadają różne właściwości biologiczne oraz farmakologiczne m.in. działanie przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, cytotoksyczne, immunosupresyjne oraz chemoprewencyjne (Orlikova i in., 2011, Zhuang i in., 2017, Arczewska i in., 2013, Guo i in., 2014).



Rysunek 5. Struktura szkieletowa chalkonu wraz z numeracją. Izomer *trans* (a), izomer *cis* (b).

Przykładem takiego związku jest ksantohumol (2',4',4'-trihydroksy-6'-metoksy-3'-prenylochalkon), występujący głównie w szyszkach chmielu (*Humulus lupulus L.*), posiadający potwierdzone działanie przeciwnowotworowe, zapobiega chorobom niedokrwiennym serca, działa przeciwgrzybiczo, przeciwbakteryjnie i przeciwwirusowo, jest również silnym, naturalnym antyoksydantem (rysunek 6a) (Jiang i in., 2018, Magalhaes i in., 2009, Wei i in., 2018). Jednak słaba rozpuszczalność w roztworach wodnych i związana z nią ograniczona biodostępność wyklucza opracowanie skutecznych i stabilnych preparatów farmaceutycznych lub suplementów diety opartych na tym związku.

Kolejnym przykładem naturalnie występującego chalkonu, który cieszy się coraz większym zainteresowaniem w środowisku naukowym jest kardamonina (2',4'-dihydroksy-6'-metoksychalkon) (rysunek 6b) (Budziak i in., 2020, Goncalves i in., 2014). Kardamonina, występująca głównie w przyprawie kardamon oraz w wielu innych roślinach (rodzina imbirowatych np. *Alpinia katsumadai*, *Alpinia conchigera*, *Alpinia rafflesiana*, *Amomum subulatum* oraz *Boesenbergia pandurata*), jest znana od dawna z prozdrowotnych właściwości. Chalkon kardamonina oraz jego pochodne odgrywają istotną rolę w leczeniu raka, modulacji układu odpornościowego, stanach zapalnych i zwalczaniu patogenów (Nawaz i in., 2020). Niekorzystną cechą kardamoniny jest jej niska biodostępność związana ze słabą rozpuszczalnością w wodzie (Jaiswal i in., 2015).

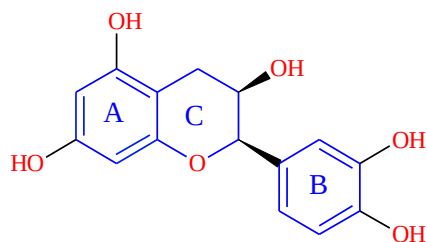


Rysunek 6. Struktura szkieletowa ksantohumolu (a) i kardamoniny (b).

2.4.2. Flawan-3-ole

Obecnie można zaobserwować rosnące zainteresowanie naturalnymi katechinami, które występują w dużych ilościach w napojach takich, jak herbata, czerwone wino czy produkty na bazie kakao. Głównymi źródłami katechin są krzewy herbaty chińskiej i indyjskiej *Camellia sinensis* oraz *C. assamica*. Zielona herbata zawiera 75–80% wody oraz związków polifenolowych (flawanole, flawonoidy i kwas fenolowy). W liściach tej herbaty katechiny stanowią ponad 75% związków polifenolowych (Zillich i in., 2015). Katechiny należące do grupy flawan-3-oli wykazują wiele właściwości prozdrowotnych: przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe, przeciwnadciśnieniowe, neuroprotektoryjne, obniżające poziom cholesterolu i termogeniczne (Spizzirri i in., 2019, Budziak-Wieczorek, Maciołek, 2021). Dominującymi związkami należącymi do katechin są: (-)-galusan-3-O-epigallokatechiny i (-)-galusan-3-O-epikatechiny, (-)-epigallokatechina, (+)-galokatechina, (+)-katechina i (-)-epikatechina, występująca również w postaci galusanów. Cząsteczki katechin zbudowane są z trzech pierścieni (dwa aromatyczne A i B połączone z dihydropiranowym pierścieniem heterocyclicznym C) i charakteryzują się obecnością kilku grup hydroksylowych. Liczba i położenie grup hydroksylowych oraz obecność/brak ugrupowania galloilu w strukturze katechin wpływa na zdolność tworzenia wiązań wodorowych i oddziaływania z biologicznym środowiskiem (Botten i in., 2015). Wadą katechin jest ich niska biodostępność (III klasa w systemie BCS) (Cai i in., 2018).

Jednym z przedstawicieli katechin o potwierdzonych właściwościach prozdrowotnych jest (-)-epikatechina ((2R,3R)-2-(3,4-dihydroksyfenylo)-3,5,7-chromanetriol) przedstawiona na rysunku 7.

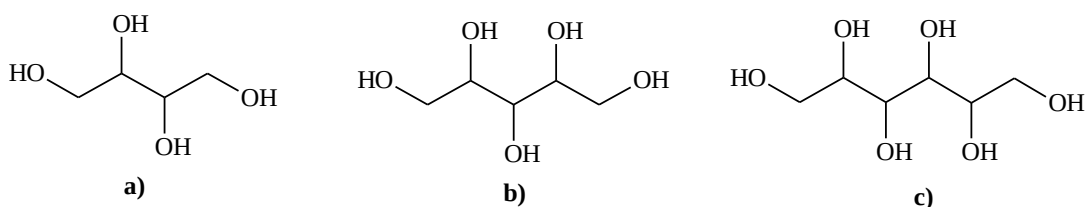


Rysunek 7. Schemat (-)-epikatechiny.

Pomimo silnych właściwości antyoksydacyjnych, wykorzystanie (-)-epikatechiny jako suplementu diety lub leku jest znacznie ograniczone ze względu na słabą stabilność w przewodzie pokarmowym i płynach ustrojowo-jelitowych oraz niską przepuszczalność (Budziak-Wieczorek, Maciołek, 2021, Cai i in., 2002). Obecnie poszukuje się nowych metod zwiększających biodostępność związków bioaktywnych, metoda kokryształizacji może więc wpłynąć na poprawę efektywności badanych substancji.

2.4.3. Poliole

Poliole (alkohole cukrowe) występujące w niektórych owocach, warzywach oraz bezcukrowych słodzikach. Charakteryzują się bardzo wysoką rozpuszczalnością w środowisku wodnym oraz posiadają słodki smak (Budziak i in., 2018). Stanowią składnik diety ubogiej w fermentowalne oligosacharydy, disacharydy, monosacharydy i zyskują coraz większą popularność w leczeniu pacjentów z zespołem jelita drażliwego IBS (Lenhart, Chey, 2017, Budziak i in., 2018). Do alkoholi cukrowych zalicza się takie poliole jak erytrytol, ksylitol i mannitol (rysunek 8), które są szeroko stosowane jako substancje słodzące i stabilizujące w różnych produktach spożywczych i farmaceutycznych oraz są składnikiem past do zębów oraz gum do żucia.



Rysunek 8. Schematyczna struktura erytrytolu (a), ksylitolu (b) oraz mannitolu (c).

Erytrytol to 4-węglowy poliol, znany pod nazwą chemiczną 1,2,3,4-butaneterolu. Występuje naturalnie w owocach, warzywach, grzybach i sfermentowanej żywności, takiej jak wino i sos sojowy. Ten naturalny słodzik zyskuje coraz to większe zainteresowanie w przemyśle spożywczym do produkcji żywności o obniżonej kaloryczności.

Ksylitol to 5-węglowy alkohol cukrowy produkowany z D-ksylozy, występujący naturalnie w różnych owocach, warzywach, owsie i grzybach oraz w niewielkim stopniu syntezowany jest przez organizm ludzki. Może być wytwarzany w procesie hydrolizy z różnych produktów roślinnych zawierających polisacharydy. Ksylitol znalazł zastosowanie w produktach farmaceutycznych oraz spożywczych. W porównaniu do innych substytutów cukru zapobiega tworzeniu się próchnicy ze względu na hamowanie wzrostu próchnicotwórczych bakterii *Streptococcus mutans*. W pracy (Arafa i in., 2018) przedstawiono zastosowanie ksylitolu jako potencjalnego łagodnego koformera do zwiększania szybkości rozpuszczania wolno rozpuszczającego się leku felodypiny.

Mannitol to 6-węglowy poliol, który jest izomerem sorbitolu. W naturze występuje w wydzielinach niektórych drzew, a także w algach morskich i grzybach. Jest stabilny w podwyższonych temperaturach i ma niską higroskopijność, dzięki czemu może być używany jako powłoka do twardych cukierków i czekoladek.

3. Cel pracy i tezy badawcze

W ostatnim czasie można zauważyć znaczne zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego i spożywczego nowymi funkcjonalnymi materiałami molekularnymi o unikalnych właściwościach i zastosowaniach. Badania biodostępności są jednym z kluczowych elementów podczas projektowania i poszukiwania nowych modyfikacji substancji leczniczych. Zmiana właściwości fizykochemicznych ma istotne znaczenie w przypadku trudno rozpuszczalnych substancji bioaktywnych m.in. polifenoli, które stanowią ważną grupę związków bioaktywnych stosowanych jako składniki żywności funkcjonalnej i suplementów diety. Zastosowanie kokryształizacji w tym przypadku może wpłynąć na poprawę ich rozpuszczalności i biodostępności, co może mieć przełożenie na efekty terapeutyczne.

Celem pracy była synteza nowych kokryształów wybranych naturalnych flawonoidów m.in. dwóch chalkonów ksantohumolu, kardamoniny oraz flawan-3-olu (-)-epikatechiny i przedstawienie ich charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i fizykochemicznej. Założono, że uzyskane w procesie kokryształizacji nowe formy molekularne wybranych chalkonów/flawan-3-oli będą cechowały się zwiększoną rozpuszczalnością, a w konsekwencji dostępnością biologiczną względem pojedynczych aktywnych składników tworzących kokryształy.

Drugim celem badawczym pracy były badania organizacji molekularnej związków o silnych właściwościach hydrofilowych na przykładzie wybranych poliolei i ich wpływ na przepuszczalność przez błony lipidowe. Poliole mogą wpływać na poprawę szybkości rozpuszczania się substancji aktywnej oraz mogą modyfikować zmianę smaku przyjmowanych tabletek oraz leków. Niemniej jednak ze względu na dużą liczbę grup hydroksylowych zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych, wybrane związki mogą nie przenikać przez dwuwarstwę lipidową.

Podczas pracy badawczej postawiono cztery częściowe tezy badawcze:

- ✓ Kokryształizacja zwiększa rozpuszczalność wybranych chalkonów oraz flawan-3-oli i jest skuteczną metodą w opracowywaniu nowych formułacji o zwiększonej biodostępności.
- ✓ Istnieje zależność pomiędzy budową chemiczną chalkonu kardamoniny a niską rozpuszczalnością w roztworach wodnych.

- ✓ Poliole (ksylitol, erytrytol i mannitol) o właściwościach silnie hydrofilowych nie oddziałują z częścią hydrofobową lipidów oraz nie przenikają przez błony biologiczne.
- ✓ Stosowanie związków o właściwościach silnie hydrofilowych nie jest skuteczną metodą w opracowaniu modeli o zwiększonej biodostępności ze względu na niską przenikalność przez błony komórkowe.

4. Materiały i metody badawcze

Opisy stosowanych materiałów, odczynników i użytych sprzętów laboratoryjnych są szczegółowo przedstawione w publikacjach **1-4**. Poniżej przedstawiono skrócony opis metod badawczych zastosowanych w prezentowanym autoreferacie.

4.1. Metody dyfrakcyjne

Dyfrakcja rentgenowska (ang. *X-ray diffraction*) należy do niedestruktywnych technik, które można zastosować do badań strukturalnych materiałów krystalicznych. Szerokie zastosowanie dyfrakcji rentgenowskiej umożliwia uzyskanie informacji m.in. na temat: budowy cząsteczek i ich konformacji, parametrów sieci krystalicznej, orientacji płaszczyzn krystalograficznych, rozmiarów kryształitów, gęstości dyslokacji i przemian fazowych (Ameh, 2019). Krystalografia rentgenowska odegrała kluczową rolę w projektowaniu farmaceutycznych kokryształów, badając upakowanie w sieci krystalicznej oraz możliwe oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe (Aitipamula, Vangala, 2017). W publikacjach **1-3** przedstawiono wyniki badań dyfrakcji rentgenowskiej monokryształów oraz proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (PXRD - ang. *powder X-ray diffraction*).

4.1.1. Dyfrakcja rentgenowska monokryształów

Rentgenografia monokryształów jest jedną z najważniejszych technik, która umożliwia wyznaczenie struktury materiałów krystalicznych oraz badanie zależności między budową chemiczną a właściwościami kryształów (Zhang i in., 2014). Rentgenowska analiza strukturalna odgrywa istotną rolę w badaniach podstawowych projektowania i syntezy aktywnych składników farmaceutycznych (API). Rozwiązanie struktury kryształu pozwala na pełną charakterystykę otrzymanej fazy krystalicznej m.in. wyznaczenie parametrów sieci przestrzennej, długości wiązań, kątów walencyjnych, kątów torsyjnych, odległości międzypłaszczyznowych, a także geometrii oddziaływań międzycząsteczkowych. Rentgenowska analiza strukturalna dostarcza informacji na temat sposobu upakowania cząsteczek w kryształ, wewnątrz- i międzycząsteczkowych oddziaływaniach oraz umożliwia opis charakterystycznych motywów wiązań wodorowych i syntonów supramolekularnych obecnych w strukturze kryształu.

4.1.2. Proszkowa dyfrakcja rentgenowska

Wyznaczanie struktury na podstawie danych z proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (PXRD) ma potencjalne zastosowania w wielu ważnych dziedzinach, w których otrzymanie monokryształów jest trudnym zadaniem (Aitipamula, Vangala, 2017). Produkty pośrednie i produkty reakcji w stanie stałym można analizować metodą dyfrakcji proszkowej w celu wykonania analizy jakościowej bez potrzeby krystalizacji. Kokryształy farmaceutyczne często wytwarza się technikami mechanochemicznymi, a otrzymane w ten sposób proszki mikrokryształiczne na ogół nie nadają się do charakterystyki strukturalnej metodą dyfrakcji rentgenowskiej pojedynczego kryształu. Z tego względu technika PXRD jest alternatywą metodą w badaniach właściwości strukturalnych kokryształów.

4.2. Metody spektroskopowe

Metody spektroskopowe są powszechnie stosowane podczas badania krystalicznych i amorficznych substancji organicznych. Uzyskane widma spektroskopowe służą do identyfikacji substancji organicznych oraz charakterystyki strukturalnej (rozkład przestrzenny cząsteczek, konformacje molekularne, oddziaływania wewnątrz- i międzycząsteczkowe). Są stosowane do badania dynamiki molekularnej i przejść fazowych w stanie stałym (np. przemiany polimorficzne), do monitorowania reakcji i procesów chemicznych (krystalizacja, desolvatacja) oraz do wykonywania analiz ilościowych (Pindelska i in., 2017). Poniżej przedstawiono wybrane metody spektroskopowe zastosowane w publikacjach 1-4.

4.2.1. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) należy do metod szybkich, nieniszczących i bardzo czułych, która znajduje swoje zastosowanie w identyfikacji substancji organicznych na podstawie analizy specyficznych ugrupowań molekularnych. Dostarcza informacji na temat charakterystycznych grup funkcyjnych oraz możliwych oddziaływań międzycząsteczkowych. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) została zastosowana w celu:

- ✓ potwierdzenia nowej fazy krystalicznej kokryształów oraz opisu oddziaływań międzycząsteczkowych (głównie wiązań wodorowych) pomiędzy substancją

aktywną (API) a koformerem oraz identyfikacji syntonów supramolekularnych występujących w sieci krystalicznej.

- ✓ badania struktury i organizacji molekularnej wybranych związków organicznych m.in. polioli w membranach lipidowych. Wybrana technika spektroskopowa dostarcza informacji o możliwych oddziaływaniach międzycząsteczkowych pomiędzy badanymi związkami a wybranymi częściami lipidu (części hydrofobowe i hydrofilowe).

4.2.2. Spektroskopia Ramana

Spektroskopia Ramana w ostatnim czasie znajduje szerokie zastosowania w badaniach strukturalnych ciał krystalicznych. Jest techniką komplementarną do techniki spektroskopii absorpcji w podczerwieni. Rozpraszanie Ramana zależy od polaryzacji i kierunku padającego światła, symetrii kryształu, orientacji próbki stałej oraz kierunku i polaryzacji światła rozproszonego (Krylov, 2020). Intensywności i położenie charakterystycznych pasm w widmach Ramana są związane ze zmianą polaryzowalności określonych wiązań chemicznych występujących w badanych cząsteczkach (Pindelska i in., 2017). Metoda spektroskopii Ramana i proszkowa dyfrakcja rentgenowska są technikami wzajemnie uzupełniającymi się na poziomie molekularnym i w połączeniu mogą zapewnić lepsze zrozumienie zjawisk w ciele stałym.

4.2.3. Spektroskopia Elektronowa UV-Vis

Spektroskopia elektronowa UV-Vis jest metodą analityczną, wykorzystującą promieniowanie w zakresie 200 - 750 nm (Kiguchiya i in., 2019). Jest szeroko stosowana w badaniach produkcji i kontroli jakości oraz w badaniach ilościowych. Technika ta opiera się na absorpcji energii świetlnej i w zależności od ilości światła i długości fali zaabsorbowanej przez badaną próbkę można badać różnice w budowie chemicznej związków. Dodatkowo można uzyskać informacje takie jak czystość i zawartość próbki. W prezentowanym autoreferacie zastosowano spektroskopię elektronową UV-Vis w celu przeprowadzenia analizy ilościowej podczas badań rozpuszczalności kokryształów w wodnych roztworach.

4.2.4. Spektroskopia Fluorescencyjna

Spektroskopia fluorescencyjna należy do metod bardzo czułych, szybkich i nieinwazyjnych. Polega na badaniu zmian strukturalnych w cząsteczkach spowodowanych zmianami rozpuszczalnika, temperatury, pH, ligandów i siły jonowej (Jagadeesh i in., 2015). Chalkony stanowią doskonały model do badań fluorescencyjnych ze względu na występowanie ugrupowań elektronowo-akceptorowych i elektronowo-donorowych połączonych za pomocą π -sprzężonego łańcucha. Cząsteczki te w odpowiednich warunkach mogą wykazywać właściwości solwatochromowe wynikające z różnych wewnątrzcząsteczkowych transferów ładunków. W pracy doktorskiej spektroskopia fluorescencja została zastosowana w celu zbadania właściwości spektroskopowych wybranych chalkonów w różnych środowiskach wodnych.

4.3. Analiza termiczna

W analizie termicznej wyróżnia się wiele metod badawczych, które polegają na opisie właściwości fizykochemicznych badanej próbki w funkcji zmiany temperatury. Analiza termiczna umożliwia wyznaczenie takich parametrów jak: temperatura topnienia, krzepnięcia, krystalizacji, zeszklenia, przejść fazowych oraz pozwala na badanie stabilności, składu i struktury badanej próbki (Ozawa, 2000). W prezentowanej pracy doktorskiej zastosowano analizę termiczną w publikacjach 1 i 4.

4.3.1. Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Różnicowa kalorymetria skaningowa DSC (ang. *differential scanning calorimetry*) należy do technik termograwimetrycznych polegających na pomiarze zmiany szybkości przepływu ciepła, która powstaje między próbką badaną i referencyjną w funkcji temperatury. Metoda DSC jest szczególnie stosowana podczas analizy przejść fazowych, w tym temperatury topnienia, zeszklenia, wyznaczenia krystaliczności, czystości i stabilności badanych próbek. Różnicowa kalorymetria skaningowa może być stosowana jako narzędzie do szybkiego wykrywania kokryształów i badania ich stabilności na podstawie różnic w zarejestrowanych skanach DSC wykonanych dla badanej próbki i materiałów wyjściowych. Umożliwia także wyznaczenie przejść fazowych pomiędzy polimorfami lub ich różnych temperatur topnienia (Garbacz, Wesołowski, 2018).

4.4. Analiza powierzchni Hirszfelda

Analiza powierzchni Hirszfelda jest stosowana w celu przeprowadzenia ilościowego i jakościowego opisu oddziaływań międzycząsteczkowych występujących w badanej cząsteczce (Sharfalddin i in., 2020). Graficzna wizualizacja na trójwymiarowych mapach gęstości elektronowej oraz na dwuwymiarowych wykresach mapy oddziaływań, umożliwia identyfikację oddziaływań niekowalencyjnych, a także porównanie rodzajów interakcji w kryształach molekularnych. Znormalizowana odległość kontaktu d_{norm} , zdefiniowana przez długości zewnętrzne i wewnętrzne (d_e i d_i) oraz promień van der Waalsa atomu (r^{vdW}) umożliwia identyfikację obszarów o szczególnym znaczeniu dla oddziaływań międzycząsteczkowych z zaznaczonymi czerwono-biało-niebieskimi obszarami. Analiza powierzchni Hirszfelda została wykonana w publikacjach 1 i 3.

4.5. Optymalizacja geometrii metodą DFT

Badania teoretyczne z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości DFT (ang. *density functional theory*) są wykorzystywane w badaniach strukturalnych różnych faz krystalicznych oraz w badaniach zależności struktura-własności. W szczególności metoda DFT jest stosowana podczas przeprowadzenia optymalizacji geometrii w celu poszukiwania takiego rozmieszczenia atomów w cząsteczce ciała stałego, dla której układ będzie posiadał najniższą energię (Brandenburg, Grimme, 2014). Porównanie uzyskanych rezultatów teoretycznych z wynikami eksperymentalnymi m.in. z pomiarami spektroskopowymi i dyfrakcyjnymi umożliwia dokładne opisanie właściwości strukturalnych badanych cząsteczek. W publikacji 2 przedstawiono zastosowanie metody DFT w celu optymalizacji geometrii badanej cząsteczki.

4.6. Analiza chemometryczna

Chemometria należy do metod zajmujących się wykorzystaniem metod statystycznych i matematycznych do analizy wielowymiarowych zbiorów danych uzyskanych podczas różnych pomiarów analitycznych (Saganowska, Wesołowski, 2017). Analiza chemometryczna jest często łączona z technikami spektroskopowymi takimi jak spektroskopia w podczerwieni, spektroskopia Ramana oraz z technikami analizy termicznej. W pracy doktorskiej (publikacja 3) zastosowano metody klasyfikacji danych

z wykorzystaniem technik analizy składowych głównych PCA (ang. *principal component analysis*) oraz hierarchiczną analizę skupień HCA (ang. *hierarchical cluster analysis*) w połączeniu z metodami spektroskopowymi w celu identyfikacji i wyznaczenia różnic występujących w kokryształach.

4.7. Charakterystyka monowarstw Langmuira

Charakterystyka monowarstw Langmuira jest jedną z podstawowych metod stosowanych w badaniach organizacji molekularnej monowarstw utworzonych na powierzchni subfazy wodnej. Metoda tworzenia monomolekularnych warstw na granicy faz powietrze/woda umożliwia wyznaczenie takich parametrów jak: upakowanie molekularne, stan fizyczny, ciśnienie powierzchniowe i gęstość utworzonej monowarstwy (Elderdfi, Sikorski, 2018). W szczególności monowarstwy Langmuira złożone ze składników błon biologicznych takich jak: fosfolipidy, sterole, sfingo- i glikolipidy stanowią bardzo dobry model do badania interakcji między elementami błon i cząsteczkami organicznymi. W pracy doktorskiej (publikacja 4) opisano charakterystykę monowarstw utworzonych z lipidu 1,2-dimirystoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (DMPC).

5. Wyniki badań i omówienie najważniejszych wyników

W cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opisano wyniki badań strukturalnych, spektroskopowych i termograwimetrycznych związków o znaczeniu biologicznym w kokryształach i kryształach oraz w mono- dwu- i wielowarstwach lipidowych. Do badań naukowych wybrano związki pochodzenia naturalnego m.in. chalkony, flawan-3-ole oraz poliole, różniące się budową chemiczną i właściwościami fizykochemicznymi (hydrofobowość, hydrofilowość), które wpływają na różną rozpuszczalność, a tym samym na biodostępność.

W publikacjach przeanalizowano kilka aspektów badawczych związanych z poprawą rozpuszczalności związków o niskiej rozpuszczalności i/lub przepuszczalności przez błony biologiczne oraz zbadano wpływ związków silnie hydrofilowych na przepuszczalność przez membrany lipidowe. W pracy skupiono się głównie na metodzie kokrystalizacji, która może być stosowana w badaniach poprawy biodostępności substancji czynnych nie wpływając na zmianę ich aktywności biologicznej.

W pracach 1-3 skoncentrowano się głównie na opisie struktur krystalicznych kokryształów oraz kryształu kardamoniny z zastosowaniem metod dyfrakcyjnych m.in. dyfrakcji rentgenowskiej monokryształu oraz proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (PXRD). Do opisu różnic w strukturach kokryształów w porównaniu do materiałów początkowych oraz oddziaływań międzycząsteczkowych zastosowano tradycyjne techniki m.in. różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), spektroskopię wibracyjną w podczerwieni (FTIR) i spektroskopię Ramana oraz metody obliczeniowe.

W publikacji 4 przedstawiono wyniki badań organizacji molekularnej wybranych alkoholi cukrowych (ksylitol, erytrytol i mannitol) w mono- dwu- i wielowarstwach lipidowych DMPC. Badania w wielowarstwach lipidowych opierały się głównie na analizie wyników różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC oraz spektroskopii w podczerwieni (FTIR) w funkcji stężenia oraz ilości grup hydroksylowych w łańcuchu węglowym poliooli.

Poniżej zaprezentowano najważniejsze wnioski i sformułowania pochodzące z publikacji 1-4.

5.1. Opis wyników publikacji 1

W publikacji 1 (Budziak-Wieczorek, Maciołek, 2021) przedstawiono wyniki badań strukturalnych, spektroskopowych oraz termograwimetrycznych nowego kokryształu (-)-epikatechiny z kwasem barbiturowym w stechiometrii 1:1 (EC-BTA). Dodatkowo wykonano badania rozpuszczalności w roztworach wodnych kokryształu oraz czystej (-)-epikatechiny.

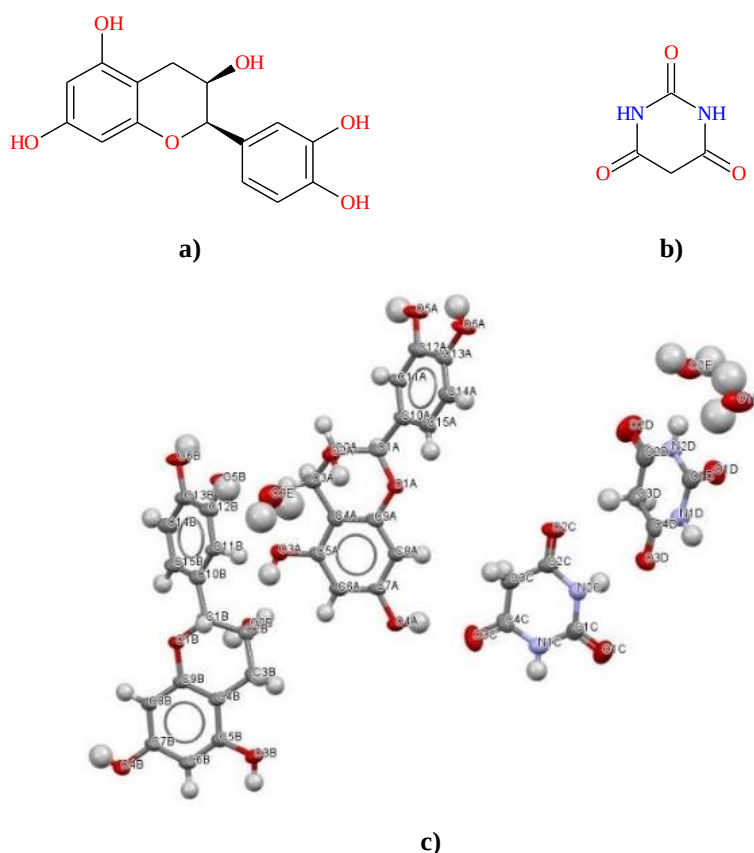
Głównym celem badań było otrzymanie kokryształów dwóch naturalnie występujących diastereoizomerów (+)-katechiny i (-)-epikatechiny z powszechnie stosowanymi koformarami takimi jak: kwas barbiturowy, 5-metylo-1H-benzotriazol, 4-(metyloamino)-pirydyna, 5-metylobenzimidazol, acetamid, salicylamid, niacynamid, izonikotynoamid, kofeina i glutarimid oraz wykonanie badań strukturalnych. Drugim celem badań było określenie wpływu kokryształizacji na poprawę rozpuszczalności wybranych katechin w roztworach wodnych.

Związki (+)-katechina oraz (-)-epikatechina zostały wybrane do badań ze względu na odmienną konformację, która może wpływać na różne zachowanie podczas kokryształizacji. Katechiny charakteryzują się stosunkowo wysoką rozpuszczalnością w roztworach wodnych, związaną z obecnością kilku grup hydroksylowych. Jednak ich biodostępność po podaniu doustnym jest bardzo mała ze względu na szybki metabolizm i biokonwersję. W prowadzonych badaniach zastosowano metodę powolnego odparowywania rozpuszczalnika z roztworu i w efekcie udało się uzyskać tylko jeden, dobrej jakości kokryształ (-)-epikatechiny z kwasem barbiturowym (EC-BTA). Na rysunku 9 przedstawiono schematyczną strukturę (-)-epikatechiny, kwasu barbiturowego oraz strukturę kokryształu EC-BTA przedstawiającą asymetryczną część komórki z numeracją atomów.

Wnioski i podsumowanie publikacji 1:

Dane uzyskane z badań dyfrakcji rentgenowskiej monokryształu wykazały, że kokryształ EC-BTA krystalizuje w trójskośnej grupie przestrzennej P1 z dwiema cząsteczkami EC oraz dwiema cząsteczkami BTA oraz trzema cząsteczkami wody w asymetrycznej części komórki. Badania strukturalne monokryształu EC-BTA potwierdziły, że w sieci krystalicznej kokryształu EC-BTA występują dwie niezależne od symetrii cząsteczki EC: A (na czerwono) i B (na zielono), które oddziałują ze sobą poprzez wiązania wodorowe O–H...O wzdłuż i pomiędzy warstwami tworząc strukturę taśmy. Grupa hydroksylowa –OH występująca w pierścieniu benzenowym A cząsteczki (-)-epikatechiny

oddziałuje z grupą karbonylową C=O koformera. W sieci krystalicznej obecne są także słabe wiązania typu $\pi \cdots \pi$ pomiędzy cząsteczkami EC i BTA, które dodatkowo stabilizują strukturę kokryształu. Analiza upakowania kokryształu EC-BTA potwierdziła, że cząsteczki (-)-epikatechiny i kwasu barbiturowego oddziałują ze sobą głównie poprzez wiązania wodorowe O–H $\cdots$ O wzdłuż i pomiędzy warstwami. Atom wodoru H8 z grupy -OH z pierścienia benzenowego A w cząsteczce EC tworzy wiązanie wodorowe z grupą karboksylową C=O z kwasu barbiturowego. Cząsteczki BTA oddziałują ze sobą poprzez wiązania wodorowe O $\cdots$ H–N i N–H $\cdots$ O. Dodatkowo cząsteczki BTA oddziałują pośrednio poprzez cząsteczki wody związane ze strukturą kokryształu.



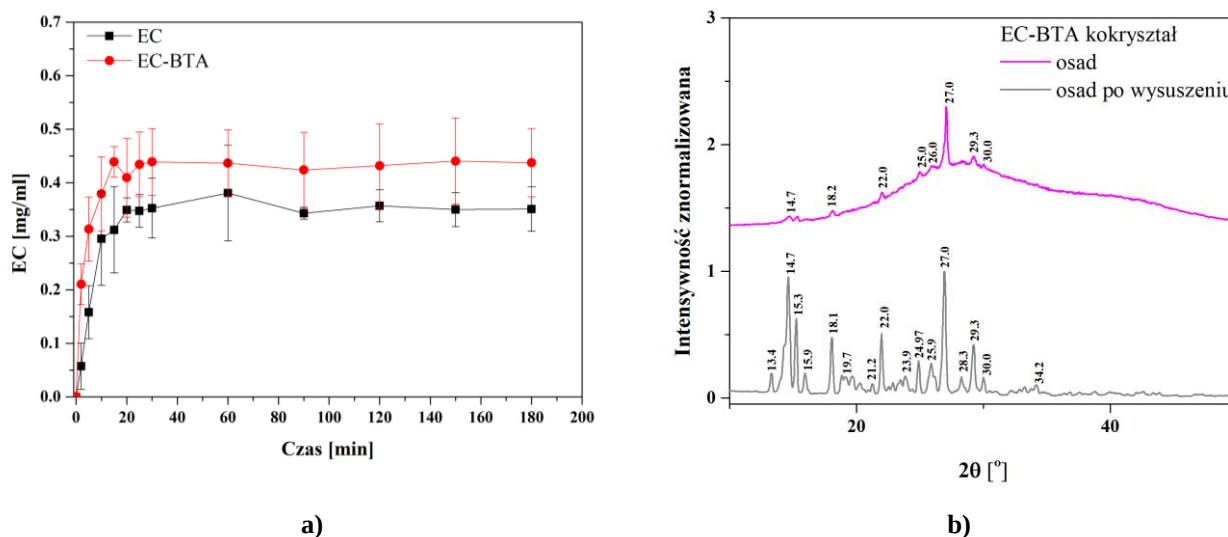
Rysunek 9. Schematyczna struktura (-)-epikatechiny (a), kwasu barbiturowego (b). Asymetryczna część komórki kokryształu EC-BTA, z numeracją atomów. Elipsoidy są narysowane z prawdopodobieństwem 50% (c) (Budziak-Wieczorek, Maciołek, 2021).

W kolejnym etapie badań wykonano analizę TGA-DSC i wykazano, że kokryształ EC-BTA posiada odmienne właściwości termiczne w porównaniu do czystych komponentów. Różne temperatury topnienia pomiędzy badanymi strukturami potwierdzają występowanie nowej formy stałej. Temperatura topnienia kokryształu EC-BTA (214,95°C) była niższa w porównaniu do (-)-epikatechiny (245,04°C) i kwasu barbiturowego

(252,64°C). Świadczy to o różnicach w strukturze molekularnej kokryształu, krystaliczności oraz innym upakowaniu sieci krystalicznej w odniesieniu do czystych komponentów.

Powstawanie nowej formy krystalicznej oraz występowanie wiązań wodorowych w strukturze kokryształu EC-BTA zostały także potwierdzone badaniami spektroskopii Ramana. Obecność wiązań wodorowych można stwierdzić analizując zmiany w przesunięciach i intensywnościach pasm w widmach spektroskopowych kokryształu w porównaniu do czystych substratów. Głównym dowodem na zajście procesu kokryształizacji były zmiany w przedziale 1800-1700 cm^{-1} w widmie Ramana, związane z drganiami rozciągającymi grupy karbonylowej C=O. Analiza przesunięć pasm w widmach Ramana uwidoczniła, że grupa aminowa N-H bierze udział w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczką BTA a grupą hydroksylową występującą w wodzie. Brak znaczących zmian w widmach w zakresie 1500-500 cm^{-1} potwierdził fakt, że nowa struktura krystaliczna nie była odmiennym związkiem chemicznym lecz kokryształem (brak dodatkowych wiązań chemicznych).

Ostatnim etapem badań były badania rozpuszczalności w roztworach wodnych połączone z analizą dyfrakcji proszkowej, analizą statystyczną i analizą powierzchni Hirszfelda. Krzywa rozpuszczalności EC-BTA oraz EC w roztworze buforowym PBS osiągnęła stały poziom po około 15-20 minutach trwania eksperymentu (rysunek 10a).



Rysunek 10. Profil rozpuszczalności (-)-epikatechiny i kokryształu EC-BTA (a). Dyfraktogramy PXRD dla osadu kokryształu EC-BTA otrzymanego po badaniach rozpuszczalności w roztworach wodnych (b) (Budziak-Wieczorek, Maciołek, 2021).

Zastosowana dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała brak istotnych różnic w rozpuszczalnościach pomiędzy związkami (widoczny niewielki wzrost poziomu

rozpuszczalności dla kokryształu w porównaniu do czystej (-)-epikatechiny). Oznacza to, że nie można potwierdzić wpływu zastosowania kokryształizacji na poprawę rozpuszczalności (-)-epikatechiny w roztworze wodnym. Dodatkowo zastosowano metodę dyfrakcji proszkowej (PXRD) w celu stwierdzenia zmian w przejściach fazowych dla mokrego i suchego osadu EC-BTA. Analiza dyfraktogramów osadu EC-BTA nie potwierdziła występowania dodatkowych refleksów świadczących o obecności innej fazy krystalicznej (rysunek 10b). Badania rozpuszczalności w różnym odczynie (pH) środowiska (w zakresie 1-7) oraz dwuczynnikowa analiza wariancji potwierdziły brak istotnych różnic pomiędzy rozpuszczalnością dla czystej (-)-epikatechiny oraz kokryształu EC-BTA.

W celu dokładniejszego zrozumienia wpływu wiązań wodorowych na rozpuszczalność (-)-epikatechiny i skorelowania z danymi eksperymentalnymi, wykonano także analizę powierzchni Hirszfelda dla całego kokryształu EC-BTA oraz osobno dla czystych komponentów EC i BTA (pochodzących z kokryształu) oraz kryształu (-)-epikatechiny posługując się danymi z bazy CCDC (numer cif 1130393). Zredukowana ilość wiązań wodorowych w strukturze kokryształu w porównaniu do czystego składnika aktywnego może znacząco wpłynąć na osłabienie upakowania cząsteczki oraz na wzrost rozpuszczalności. Analiza powierzchni Hirszfelda wykazała, że całościowy wkład wiązań wodorowych $O\cdots H/H\cdots O$ w strukturze kokryształu EC-BTA oraz (-)-epikatechiny (kryształ i kokryształ) był na podobnym poziomie (33 - 39%) co mogło znacząco wpłynąć na podobną rozpuszczalność. Dodatkowo słabe wiązania $H\cdots H$, których wkład wynosił 39%, stanowiły kluczową rolę w stabilizacji kokryształu.

Podsumowując, w publikacji 1 przedstawiono wyniki badań strukturalnych, spektroskopowych i termograwimetrycznych nowego kokryształu (-)-epikatechiny z kwasem barbiturowym w stosunku stechiometrycznym 1:1. Wykonane badania rozpuszczalności wykazały, że zastosowanie kwasu barbiturowego, który charakteryzuje się wyższą rozpuszczalnością w porównaniu do (-)-epikatechiny, nie wpłynęło na znaczącą poprawę poziomu rozpuszczalności wybranej katechiny. Jednak przypuszcza się, że użycie koformera posiadającego lipofilowy charakter może przyczynić się do zwiększenia przepuszczalności przez błony biologiczne. Badania te będą kontynuowane w następnej publikacji.

5.2. Opis wyników publikacji 2

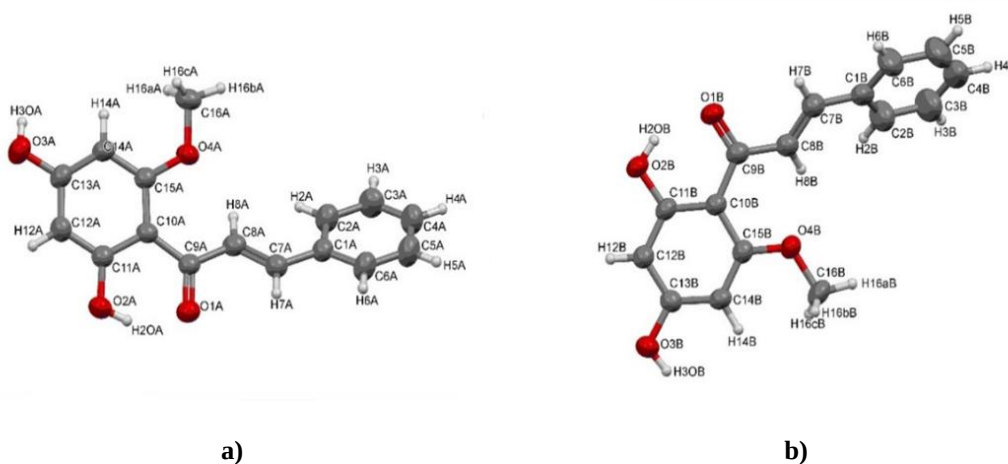
W publikacji 2 (Budziak i in., 2020) opisano wyniki badań strukturalnych, spektroskopowych oraz teoretycznych kryształu kardamoniny. Początkowo badania skupiły się na uzyskaniu kokryształu kardamoniny z powszechnie stosowanymi koformerami, jednakże w trakcie trwania eksperymentu udało się uzyskać czysty kryształ kardamoniny CA. Należy podkreślić, że w bazie CCDC znajduje się jedynie struktura krystaliczna kardamoniny dimetylowej. Pomimo wielu właściwości prozdrowotnych kardamoniny, która powszechnie występuje np. w przyprawie kardamon, niewiele jest informacji dotyczących opisu właściwości fizykochemicznych badanej cząsteczki. Celem prezentowanej publikacji było połączenie badań eksperymentalnych i teoretycznych różnych dimerów kardamoniny i opisanie właściwości fizykochemicznych, które mogą wpływać na niską rozpuszczalność w roztworach wodnych.

Wnioski i podsumowanie publikacji 2:

Rentgenowska analiza strukturalna otrzymanego kryształu kardamoniny potwierdziła, że kardamonina krystalizuje w układzie jednoskośnym należącym do centrosymetrycznej grupy przestrzennej $P2_1/c$. W sieci krystalicznej kryształu CA znajdują się dwie niezależne od symetrii molekuly różniące się konformacją (molekula A i B) przedstawione na rysunku 11. Występowanie dwóch typów konformacji w strukturze kryształu może być związane z niewielką rotacją w łańcuchu węglowym łączącym pierścienie benzenowe chalkonu (propenon). Molekuly A i B są ułożone w stosy wzdłuż osi c i oddziałują ze sobą poprzez słabe wiązania typu $\pi \cdots \pi$ lub/i wiązania van der Waalsa tworząc trójwymiarową strukturę kardamoniny. Dodatkowo sąsiadujące cząsteczki tego samego typu tworzą międzycząsteczkowe wiązania wodorowe $O-H \cdots O$.

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie obliczeń teoretycznych optymalizacji geometrii siedmiu różnych dimerów kardamoniny i monomeru oraz porównanie uzyskanych wyników z danymi strukturalnymi oraz spektroskopowymi. Obliczenia teoretyczne wykazały, że najniższą energię posiadały dimery I, II i III, które odpowiadały konformacją obecnym w sieci krystalicznej kardamoniny. Dimer I, który tworzył układ głowa-do-ogona (ang. „*head-to-tail*”) był podobny do ułożenia cząsteczek typu B, natomiast dimer II i III był podobny do ułożenia cząsteczek typu A w strukturze kryształu kardamoniny. Uzyskane

teoretyczne widma absorpcji monomeru i wybranych dimerów (I, II i III) były prawie identyczne z widmami spektroskopowymi w wodnych roztworach etanolowych.

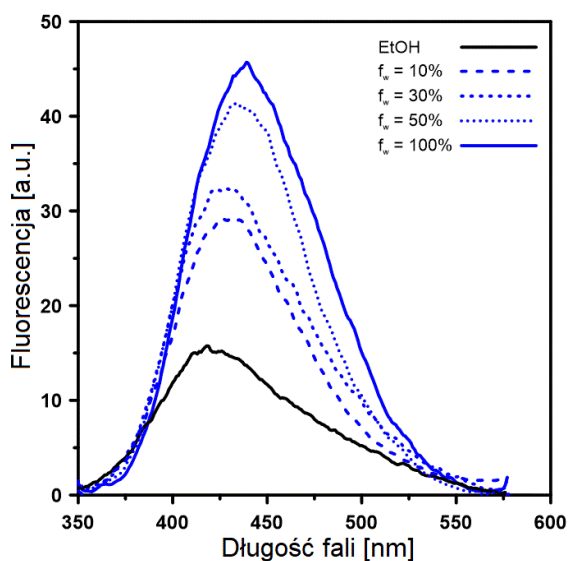


Rysunek 11. Dwie molekuły występujące w strukturze kryształu kardamoniny (CA). Parametry przemieszczenia anizotropowego są na poziomie prawdopodobieństwa 50%. Cząsteczka po lewej stronie odpowiada cząsteczce-A (a), a cząsteczka po prawej stronie odpowiada cząsteczce-B (b) (Budziak i in., 2020).

Elektronowa spektroskopia absorpcyjna oraz spektroskopia fluorescencyjna zostały wykonane w celu zbadania właściwości spektroskopowych kardamoniny w wodzie oraz w wodnych, etanolowych roztworach. Maksimum absorpcji dla kardamoniny w etanolowym roztworze w widmie eksperymentalnym UV-Vis oraz teoretycznym było praktycznie takie samo i wynosiło 344 nm (widmo dla formy monomerycznej). Maksimum absorpcji dla widm UV-Vis wykonanych w wodzie oraz w roztworze wodno-etanolowym przesunęło się w stronę większych długości fali (374 i 357 nm). Analiza podobieństw widm absorpcji kardamoniny wykonanych w wodzie oraz dla formy stałej kryształu CA potwierdziła hipotezę o obecności formy dimerycznej zarówno w wodzie jak i kryształach CA. W pracy wykazano, że różnice w widmach absorpcyjnych są związane z efektem rozpuszczalnika i agregacji cząsteczek CA. Analiza widm emisyjnych przedstawionych na rysunku 12 dla kardamoniny w etanolu i w różnych proporcjach woda/etanol uwidoczniała ciekawy efekt związany z stopniowym wzrostem maksimum fluorescencji wraz z wzrostem proporcji wody do etanolu.

Najwyższą intensywność w widmach emisyjnych zaobserwowano dla roztworu kardamoniny w wodzie (taki sam efekt dla buforu PBS). Takie zjawisko może być związane z mechanizmem zwiększonej emisji indukowanej agregacją (AIEE ang. *aggregation-induced emission enhancement*), które było już opisywane w literaturze w przypadku

małych, organicznych, sprzężonych cząsteczek, ale sam efekt nie jest jeszcze do końca opisany.

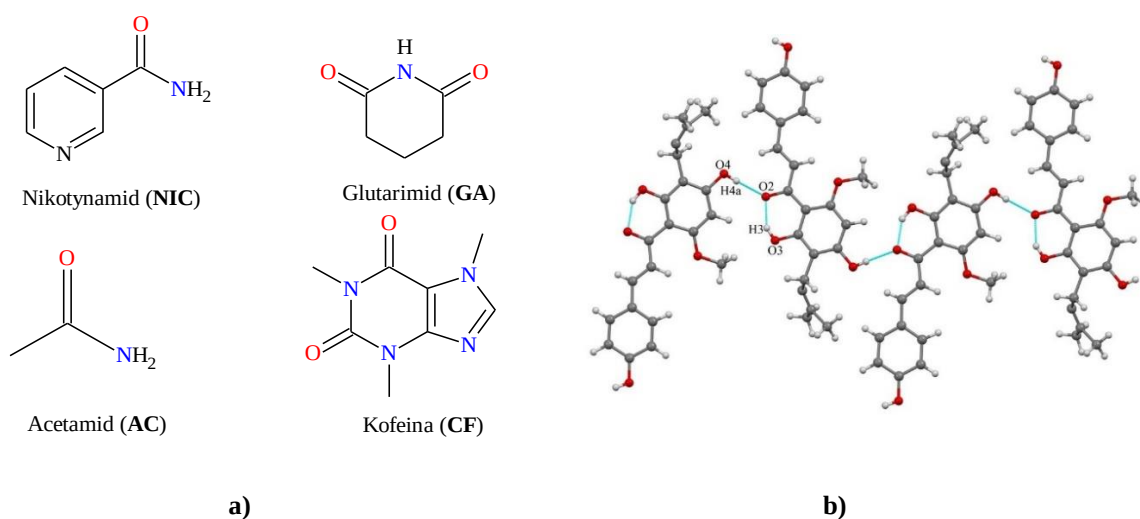


Rysunek 12. Widma emisyjne CA w etanolu i mieszaninach etanol/woda dla wzbudzenia przy 300 nm (Budziak i in., 2020).

Wnioskując, publikacja 2 przedstawia opis właściwości strukturalnych oraz spektroskopowych nowego kryształu kardamoniny. Obliczenia teoretyczne optymalizacji geometrii różnych możliwych dimerów i monomeru kardamoniny posłużyły do porównania wyników z danymi eksperymentalnymi. Wykazano, że w roztworze wodnym oraz w strukturze kryształu, kardamonina występuje w formie dimerycznej co może przyczyniać się do zmniejszonej rozpuszczalności i w konsekwencji biodostępności.

5.3. Opis wyników publikacji 3

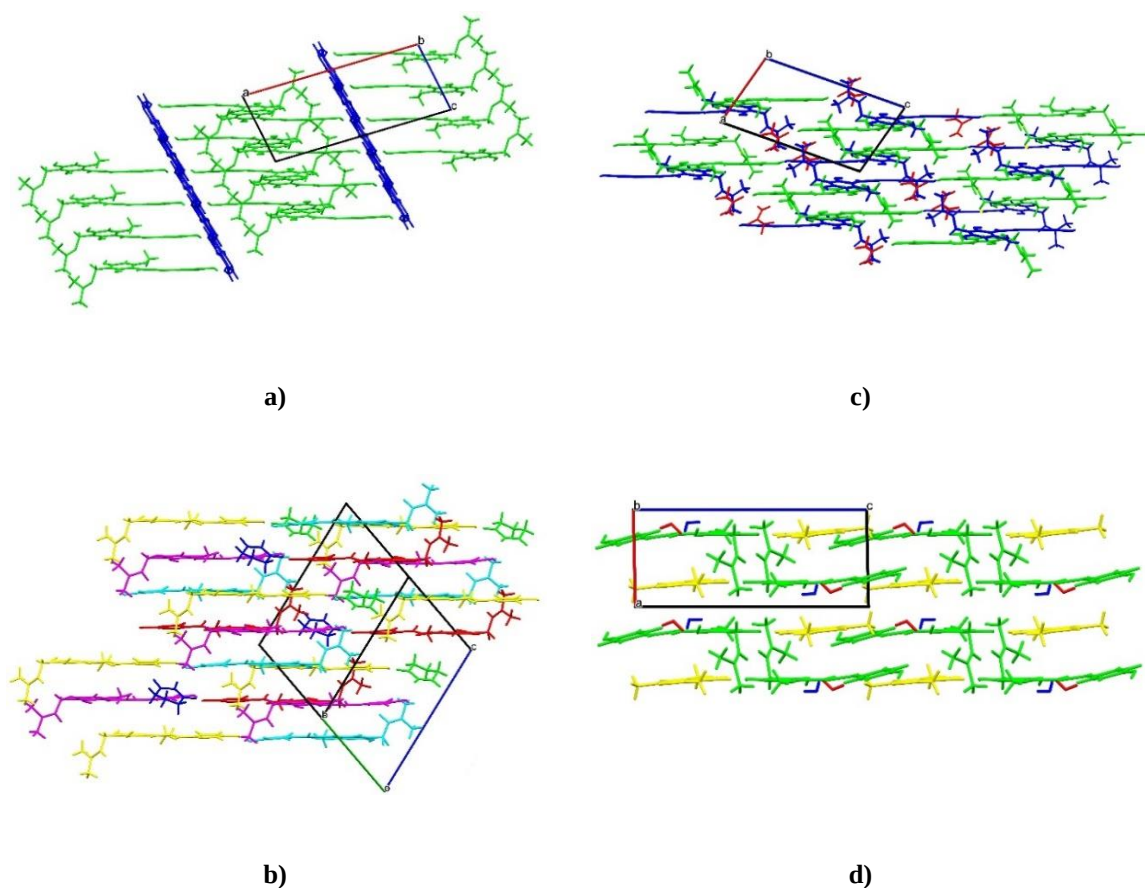
W kolejnej publikacji 3 (Budziak i in., 2019) zaprezentowano badania strukturalne oraz spektroskopowe połączone z chemometryczną analizą wielowymiarową dla czterech nowych kokryształów ksantohumolu (XN). Głównym celem badań była synteza nowych form krystalicznych XN charakteryzujących się zwiększoną rozpuszczalnością w roztworach wodnych. Ksantohumol jest silnym, naturalnym antyoksydantem występującym głównie w szyszkach chmielu. Jednakże niska rozpuszczalność wpływa na jego słabą biodostępność i znacząco ogranicza przygotowanie odpowiednich preparatów medycznych o właściwościach prozdrowotnych. Z tego powodu zastosowano metodę kokrystalizacji w celu poprawy wybranych właściwości fizykochemicznych badanego związku. Do badań użyto powszechnie, farmaceutycznie akceptowanych koformerów takich jak: nikotynamid (NIC), glutarimid (GA), acetamid (AC) oraz kofeinę (CF), które są przedstawione na rysunku 13a. W procesie kokrystalizacji, który był przeprowadzony metodą powolnego odparowania rozpuszczalnika, uzyskano cztery dobrej jakości kokryształy w stechiometrii 1:1 (XN-NIC, XN-GA, XN-AC i XN-CF). Poniżej przedstawiono główne wnioski wynikające z publikacji 3.



Rysunek 13. Struktura chemiczna koformerów opisanych w publikacji 3 (a), warstwowa struktura XN pokazująca homomolekularny motyw nieskończonych łańcuchów C(8) obserwowany w warstwach cząsteczek XN dla kryształów XN-NIC, XN-GA i XN-AC (b) (Budziak i in., 2019).

Wnioski i podsumowanie publikacji 3:

Na podstawie rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów wykazano, że cząsteczki ksantohumolu posiadają prawie płaską konformację we wszystkich kokryształach, co jest związane z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi występującymi pomiędzy grupą hydroksylową w pierścieniu A i grupą karbonylową $O3A-H3A\cdots O2A$ (rysunek 13b). W strukturze XN-NIC, XN-GA i XN-AC występują międzycząsteczkowe wiązania wodorowe $O4A-H4A\cdots O2$, których nie obserwuje się w przypadku kokryształu XN-CF. Analizując oddziaływania i upakowanie kokryształów stwierdzono, że w sieci krystalicznej cząsteczki ksantohumolu były ułożone w prawie płaskie warstwy, tworząc międzycząsteczkowe wiązania wodorowe $O-H\cdots O$, $O-H\cdots N$, i $N-H\cdots O$ między koformerami (rysunek 14).



Rysunek 14. Warstwowe upakowanie kokryształów ksantohumolu. Kokryształ XN–NIC ukazujący warstwową strukturę XN i przecinające je kolumny nikotynamidowe (a), kokryształ XN-GA przedstawiający naprzemienne warstwy typu AD, BC cząsteczek XN (b), kokryształ XN-AC przedstawiający warstwy złożone z cząsteczek XN związanych z acetamidem (c), kokryształ XN-CF ukazujący słabo związane warstwy ksantohumolu i kofeiny (d) (Budziak i in., 2019).

Synton supramolekularny odpowiedzialny za proces kokryształizacji między cząsteczkami XN a koformerami, został utworzony z udziałem grupy hydroksylowej O1-H1, która występuje w pierścieniu benzenowym B ksantohumolu. Badając analizę oddziaływań XN z koformerami potwierdzono obecność powtarzających się motywów wiązań wodorowych m.in. w strukturze XN-NIC - nieskończony łańcuch wiązań wodorowych C(6), w strukturze XN-GA oraz XN-AC - pierścień $R_6^6(16)$ oznaczający szesnastoczłonowy pierścień z sześcioma atomami pełniącymi rolę donora i akceptora wiązań wodorowych. Natomiast w strukturze XN-CF cząsteczki kofeiny i ksantohumolu znajdowały się w tej samej płaszczyźnie tworząc strukturę warstwową, w odróżnieniu od pozostałych kokryształów. Niska jakość kokryształu XN-CF ($R_1 = 29\%$), może wynikać z obecności słabych oddziaływań typu $\pi \cdots \pi$ między sąsiadującymi warstwami.

Badania rozpuszczalności w etanolowo-wodnym roztworze o stężeniu 50:50 (v/v) w temperaturze 27°C wykazały poprawę rozpuszczalności wszystkich kokryształów w porównaniu do czystego ksantohumolu (7,6 mg/l). Najwyższą rozpuszczalność posiadał kokryształ XN-AC (20,07 mg/l), który wykazał 2,6-krotny wzrost rozpuszczalności w porównaniu do czystego XN.

Wykonano także analizę widm spektroskopowych FTIR i Ramana w celu dokładniejszego opisu tworzenia się możliwych wiązań wodorowych oraz przeprowadzenia wielowymiarowej analizy składowych głównych (PCA) i hierarchicznej analizy skupień (HCA). Widma absorpcyjne w podczerwieni wykonane dla fizycznych mieszanin złożonych z ksantohumolu i koformerów przedstawiały liniową kombinację pasm pochodzących od indywidualnych komponentów. Natomiast widma spektroskopowe FTIR kokryształów różniły się zdecydowanie od fizycznych mieszanin i czystych składników. Zmiany w położeniach, intensywnościach oraz szerokościach charakterystycznych pasm w widmach absorpcyjnych w podczerwieni mogą świadczyć o tworzeniu się wiązań wodorowych podczas procesu kokryształizacji. W publikacji 3 analiza widm FTIR opierała się głównie na zakresach: drgań rozciągających pochodzących od grupy hydroksylowej $-\text{OH}$ ($3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$), drgań sprzężonych między wiązaniem podwójnym $\text{C}=\text{C}$ od pierścienia benzenowego z grupą karbonylową XN ($1710\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$) oraz drgań rozciągających od grupy karbonylowej $\text{C}=\text{O}$ ($1680\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$). W przypadku widm Ramana, które zostały wykonane dla kokryształów i czystych składników zauważono różnice w zakresie drgań rozciągających pochodzących od grup $\text{C}=\text{C}$ oraz $\text{C}=\text{O}$ (zakres $1700\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$). W szczególności istotne różnice w przesunięciach i intensywnościach pasm były widoczne w zakresie $1628\text{--}1610$

cm⁻¹. Największe przesunięcie w stronę niższych częstości (8 cm⁻¹) w porównaniu do czystego ksantohumolu były widoczne w przypadku kokryształu XN-CF.

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie wielowymiarowej analizy składowych głównych oraz hierarchicznej analizy skupień na podstawie widm spektroskopowych FTIR oraz Ramana. Analiza chemometryczna w połączeniu z innymi technikami m.in. spektroskopią oscylacyjną może być stosowana jako wstępna metoda pozwalająca na wykrycie różnic i podobieństw w strukturze danych, i tym samym na potwierdzenie obecności nowej formy krystalicznej. Analiza składowych głównych wykonana na podstawie widm FTIR wykazała znaczące różnice między kokryształami, mieszaninami fizycznymi utworzonymi z czystych komponentów oraz ksantohumolem. W oparciu o wykresy ładunków czynnikowych stwierdzono, że największy wpływ na ocenę różnic i podobieństw między próbkami miał zakres 1705-1553 cm⁻¹, który odpowiadał drganiom rozciągającym C=C, C=O, C=N.

Podsumowując publikacja 3 prezentuje opis badań strukturalnych i spektroskopowych czterech nowych kokryształów ksantohumolu: XN-NIC, XN-AC, XN-GA oraz XN-CF. Analiza upakowania i oddziaływania kokryształów wykazała obecność charakterystycznych i podobnych motywów odpowiedzialnych za tworzenie wiązań wodorowych w strukturze kokryształów XN-NIC, XN-AC, XN-GA. Największe różnice zaobserwowano w strukturze XN-CF, gdzie sąsiednie warstwy oddziaływały ze sobą głównie przez słabe wiązania wodorowe oraz oddziaływania typu $\pi \cdots \pi$. Dodatkowo przeprowadzone badania rozpuszczalności w wodnych, etanolowych roztworach wykazały wzrost rozpuszczalności wszystkich kokryształów w porównaniu do czystego ksantohumolu. Przedstawione badania mogą w przyszłości posłużyć w celu opracowania nowych preparatów farmaceutycznych złożonych z ksantohumolu o zwiększonej przyswajalności przez organizm człowieka.

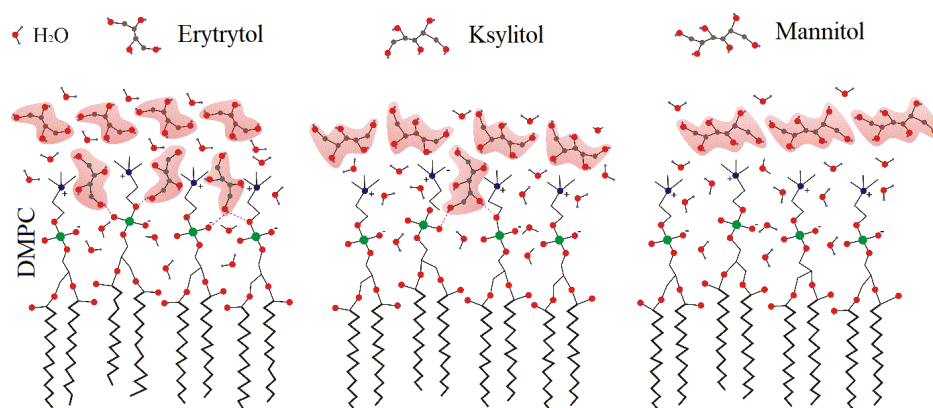
5.4. Opis wyników publikacji 4

W publikacji 4 (Budziak i in., 2018) zaprezentowano badania wpływu organizacji molekularnej wybranych poliooli: erytrytolu, ksylitolu i mannitolu na modelowy układ membranowy złożony z lipidu 1,2-dimirystoilu-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (DMPC). W pracy skoncentrowano się głównie na analizie badań różnicowej kalorymetrii skaningowej i spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera. Ogólnie uważa się, że poliole mają silne właściwości hydrofilowe. W związku z tym albo w ogóle nie oddziałują ze środowiskiem hydrofobowym, lub te oddziaływania są bardzo słabe. W celu lepszego zrozumienia wzajemnego oddziaływania między poliolami a układem lipidowym, wykorzystano technikę Langmuira do badania organizacji molekularnej monowarstw i obliczenia ich grubości w obecności poliooli w subfazie. Szczegółowy opis oddziaływań między poliolami a cząsteczkami DMPC został uzupełniony o analizę morfologii monowarstw z zastosowaniem mikroskopii kąta Brewstera. Poniżej przedstawiono główne wnioski i podsumowanie wynikające z publikacji 4.

Wnioski i podsumowanie publikacji 4:

Na podstawie termogramów DSC wykonanych dla przygotowanych liposomów złożonych z lipidu DMPC oraz wybranych poliooli: ksylitolu, erytrytolu i mannitolu w różnych stężeniach molowych zaobserwowano brak lub niewielkie różnice w przesunięciach dla temperatury głównego przejścia fazowego lipidu T_m ($\sim 24^\circ\text{C}$). Największe różnice widoczne były w przypadku mannitolu, poliolu o największej liczbie grup hydroksylowych w badanej grupie związków. Interpretując właściwości termotropowe liposomów DMPC można zasugerować, że analizowane poliole nie wnikają do obszaru hydrofobowego membrany, czyli nie wpływają na zmianę organizacji dwuwarstwy lipidowej. Dodatkowo po przeprowadzeniu eksperymentu w wyższym stężeniu lipidu przy niskiej zawartości wody wszystkie zmierzone układy były mniej stabilne i bardziej wrażliwe na wszelkie zmiany. Pokazuje to wyraźnie, że poliole nie oddziałują z hydrofobową częścią lipidów, a jedynie stabilizują strukturę pęcherzyków lipidowych, co jest zgodne z wynikami innych badań. Efekt ten związany jest z tworzeniem się wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi w poliolach i wodzie, co prowadzi do nieefektywnego uwodnienia dwuwarstw lipidowych. Wielkość tego efektu jest następująca: mannitol z 6 grupami hydroksylowymi, ksylitol z 5 grupami hydroksylowymi i erytrytol z 4 grupami hydroksylowymi.

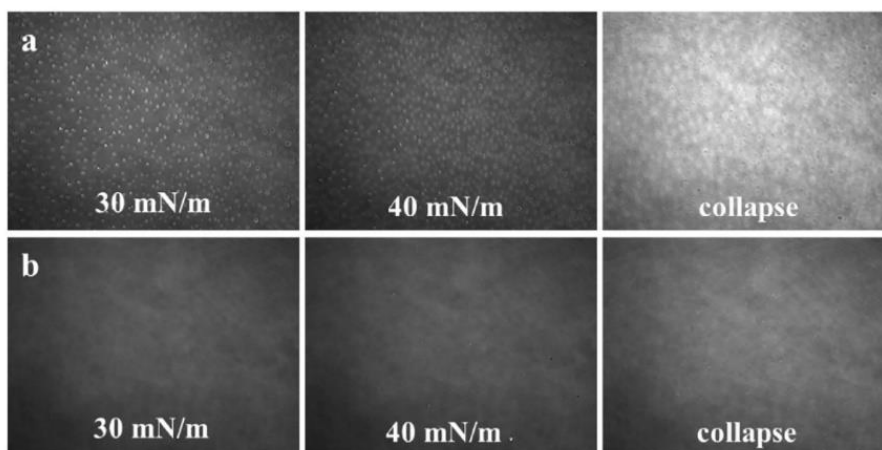
W trakcie trwania eksperymentu przeprowadzono porównywalne badania dla uzyskanych liposomów w funkcji stężenia lipidów z uwzględnieniem temperatury przy użyciu spektroskopii w podczerwieni (FTIR). Analizie poddano głównie zakresy drgań łańcuchów acylowych ($3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$), grupy fosforanowej ($1228\text{--}1240\text{ cm}^{-1}$) oraz cholinowej (970 cm^{-1}). Analogicznie jak w przypadku wyników uzyskanych z badań DSC poliole nie powodowały zmian spektralnych w części drgań rozciągających pochodzących od grupy metylenowej i metylowej (CH_2 i CH_3). Brak zmian spektralnych w zakresie drgań reszty cholinowej $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ wytłumaczono obecnością zdecydowanie silniejszych oddziaływań grupy cholinowej z dipolami cząsteczek wody w porównaniu do oddziaływania z alkoholami cukrowymi. Znaczne przesunięcia spektralne zaobserwowano w przypadku pasm drgań rozciągających asymetrycznych dla grupy $-\text{PO}_2^-$ ($1228\text{--}1240\text{ cm}^{-1}$), które były widoczne wraz ze wzrostem temperatury i stężenia polioli. W porównaniu do czystego lipidu DMPC, największe różnice w przesunięciu pasm w kierunku większych liczb falowych były w przypadku erytrytoli, podczas gdy dla mannitolu prawie nie zaobserwowano żadnych zmian. Wynika z tego, że oddziaływanie między grupami fosforanowymi obecnymi w lipidzie DMPC i polioli jest silnie zależne od długości łańcucha polioliowego. Efekt ten związany jest z tworzeniem się wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi polioli, a grupą fosforanową lipidu, ograniczając tym samym ruchliwość główek polarnych lipidów poprzez redukcję cząsteczek wody w regionie polarnym lipidu. Porównując uzyskane dane z dostępnymi informacjami pochodzącymi z badań nad innymi polioliami został utworzony model, który przedstawia w jaki sposób alkohole cukrowe o różnej długości łańcucha oddziałują z dwuwarstwą lipidową (rysunek 15).



Rysunek 15. Schematyczne przedstawienie interakcji między polioli a grupami fosforanowymi lipidu DMPC. Liczba oddziałujących polioli jest silnie zależna od długości łańcucha polioli. Oddziaływania, uporządkowane od najsilniejszego do najslabszego były następujące: erytrytol, ksylitol i mannitol (Budziak i in., 2018).

Obserwowany efekt jest związany z ilością grup hydroksylowych obecnych w łańcuchu węglowym polioli i jest silniejszy dla krótkołańcuchowych alkoholi cukrowych.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono charakterystykę monowarstw Langmuira (z użyciem lipidu DMPC), która została utworzona na powierzchni wody i roztworach polioli. Analiza wykresów zmiany ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę (A) zarejestrowanej dla monowarstwy DMPC wykazała słaby wpływ obecności roztworów polioli w subfazie na monowarstwę DMPC. Zauważono, że wszystkie poliole powodowały rozszerzenie średniej powierzchni cząsteczkowej, przy której ciśnienie powierzchniowe zaczynało wzrastać. Przesunięcie tych izoterm w prawo wskazuje, że interakcje między cząsteczkami lipidów zaczynają się w obszarze o niższych gęstościach powierzchniowych, co było widoczne w zakresie niższego ciśnienia powierzchniowego, tj. do 40 mN/m. Im krótszy łańcuch cząsteczki poliolu, tym bardziej wyraźny staje się obserwowany efekt, co jest zgodne z opisanymi powyżej badaniami kalorymetrycznymi i spektroskopowymi. Zmiany w organizacji monowarstw DMPC zarejestrowane na powierzchni subfazy, zostały uwidocznione także za pomocą mikroskopii kąta Brewstera. Analiza grubości i cech morfologicznych filmów została zwizualizowana podczas procesu kompresji izotermicznej. Grubość monowarstw DMPC w obecności erytrytolu i ksylitolu nie zmieniała się w obszarze zapadania, a wartość była zgodna z przedstawionymi danymi literaturowymi (~2.3 nm). Natomiast w przypadku monowarstw DMPC utworzonych na powierzchni czystej wody i roztworze mannitolu zaobserwowano wzrost grubości, zbliżony do wartości odpowiadającej dwuwarstwie. Wyniki uzyskane z pomiarów grubości pokazują, że krótkołańcuchowe poliole (ksylitol, erytrytol) mogą zapobiegać tworzeniu dwuwarstw przez cząsteczki DMPC pod wysokim ciśnieniem powierzchniowym. Badania zostały również poparte zarejestrowanym zdjęciami BAM, które wykazały jednorodność w monowarstwach DMPC otrzymanych na powierzchni subfazy utworzonej z erytrytolu w szerokim zakresie ciśnień powierzchniowych (rysunek 16).



Rysunek 16. Zdjęcia BAM wykonane dla monowarstwy DMPC podczas kompresji przy ciśnieniu powierzchniowym 30 mN/m, 40 mN/m oraz rejonie kolapsu <45 mN/m kiedy subfazę stanowiła woda (a) i wodny roztwór erytrytolu (b) (Budziak i in., 2018).

Podsumowując, wybrane poliole (ksylitol, erytrytol i mannitol) o silnie hydrofilowych właściwościach wykazują niską przenikalność przez błony komórkowe. Ich oddziaływania są zależne od długości wiązań i ilości grup –OH. Z tego powodu większość biologicznie aktywnych cząsteczek ma charakter amfifilowy lub hydrofobowy, gdyż tylko w takiej formie mają najwyższą przenikalność przez błony lipidowe. W związku z tym, zasadne jest szukanie nowych metod zwiększających rozpuszczalność w roztworach wodnych i przenikalność związków biologicznie czynnych przez membrany lipidowe.

6. Podsumowanie i wnioski

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono problematykę dotyczącą poprawy biodostępności wybranych naturalnych związków bioaktywnych m.in.: ksantohumolu (XN), kardamoniny (CA), (-)-epikatechiny (EC) oraz polioli: ksylitolu, erytrytolu i mannitolu. Wybrane związki różnią się budową chemiczną, a w szczególności ilością grup hydroksylowych –OH, które mogą wpływać na powstawanie międzycząsteczkowych oraz wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych i w konsekwencji mieć wpływ na zmianę ich rozpuszczalności.

Wykonano syntezę nowych kokryształów wybranych chalkonów i flawan-3-oli z powszechnie stosowanymi koformerami oraz przeprowadzono ich charakterystykę strukturalną i fizykochemiczną. W wyniku zastosowania metody powolnego odparowania rozpuszczalnika z roztworu zsyntezowano pięć nowych kokryształów (XN i EC) oraz jeden kryształ (CA), których struktury są zdeponowane w bazie krystalograficznej Cambridge CSD. Dodatkowo opisano oddziaływanie związków hydrofilowych (polioli) z modelową błoną lipidową na przykładzie lipidu DMPC. Mechanizm oddziaływania substancji hydrofilowych z membranami jest bardzo ważnym czynnikiem podczas badania przepuszczalności przez błony biologiczne.

Wyniki przedstawione w pracy mają charakter aplikacyjny i mogą być dalej rozwinięte przez przemysł farmaceutyczny i spożywczy jako nowe formy związków o działaniu farmakologicznym lub suplementów diety o zwiększonej przyswajalności.

Na podstawie uzyskanych wyników można sformułować następujące wnioski:

- ✓ Spośród otrzymanych kokryształów ksantohumolu największą rozpuszczalnością charakteryzował się kokryształ ksantohumolu z acetamidem XN-AC (2,6-krotny wzrost w porównaniu do XN).
- ✓ Kokryształ EC-BTA odznaczał się niewielkim wzrostem rozpuszczalności (1,2-krotny wzrost) w porównaniu do EC. Badania rozpuszczalności połączone z analizą statystyczną i analizą powierzchni Hirszfelda kokryształu EC-BTA oraz czystej (-)-epikatechiny nie potwierdziły istotnych różnic w rozpuszczalnościach pomiędzy związkami. Oznacza to, że nie można stwierdzić wpływu zastosowania metody kokrysztalizacji na poprawę rozpuszczalności EC.

- ✓ Przeprowadzone badania strukturalne, obliczeniowe oraz spektroskopowe wykazały, że kryształ kardamoniny, zarówno w roztworze wodnym, jak i w strukturze kryształu występuje w formie dimerycznej. Proces dimeryzacji może prowadzić do dalszej agregacji cząsteczek kardamoniny i przyczyniać się do niskiej rozpuszczalności w wodzie.
- ✓ Zastosowana metoda spektroskopii fluorescencyjnej potwierdziła, że kardamonina posiada zdolność do wykazywania efektu wzmocnienia emisji indukowanej agregacją (AIEE) i może w przyszłości mieć zastosowanie jako sonda w technice bioobrazowania na poziomie komórkowym.
- ✓ Przeprowadzona analiza strukturalna i fizykochemiczna otrzymanych kokryształów oraz kryształu CA umożliwiła dokładniejsze zrozumienie wpływu budowy chemicznej związku na rozpuszczalność w roztworach wodnych.
- ✓ Badania modelowe przeprowadzone w mono-, dwu- i wielowarstwach lipidowych wykazały, że poliole (ksylitol, erytrytol, mannitol) nie przenikają przez błonę lipidową. Wskazano, że badane cząsteczki tworzą wiązania wodorowe z grupami fosforanowymi obecnymi w polarnej części lipidów. Oddziaływania te są zależne od ilości grup –OH obecnych w łańcuchu węglowym alkoholi cukrowych i są silniejsze dla krótkołańcuchowych polioli (erytrytol, ksylitol).
- ✓ Opisane powyżej badania fizykochemiczne i modelowe będą pomocne w dalszej pracy naukowej dotyczącej poszukiwania nowych modyfikacji związków pochodzenia naturalnego w kierunku poprawy ich biodostępności.

7. Spis rysunków

Rysunek 1. Schemat systemu klasyfikacji biofarmaceutycznej BCS.....	4
Rysunek 2. Typy form krystalicznych występujących w substancjach leczniczych (Cerrei Vioglio i in., 2017).	7
Rysunek 3. Typowe syntony supramolekularne wiązań wodorowych występujących w kokryształach: I - dimer kwas-kwas, II - dimer amid-kwas, III - dimer amid-amid, IV - dimer kwas-pirydyna (Vishweshwar i in., 2006).	8
Rysunek 4. Schematyczny wykres przedstawiający koncepcję „sprężyny i spadochronu” w profilu stężenia leku w czasie. Typowy profil rozpuszczania najbardziej stabilnej fazy stałej leku (1), kokryształ z procesem przesycenia/wytrącenia (tj. faza bezpostaciowa) (2), wysoce rozpuszczalna postać leku utrzymywana przez długi czas w strefie metastabilnej(3) (Emami i in., 2018).	10
Rysunek 5. Struktura szkieletowa chalkonu wraz z numeracją. Izomer trans (a), izomer cis (b)...	11
Rysunek 6. Struktura szkieletowa ksantohumolu (a) i kardamoniny (b).	12
Rysunek 7. Schemat (-)-epikatechiny.	13
Rysunek 8. Schematyczna struktura erytrytolu (a), ksylitolu (b) oraz mannitolu (c).....	13
Rysunek 9. Schematyczna struktura (-)-epikatechiny (a), kwasu barbiturowego (b). Asymetryczna część komórki kokryształu EC-BTA, z numeracją atomów. Elipsoidy są narysowane z prawdopodobieństwem 50% (c) (Budziak-Wieczorek, Maciołek, 2021).....	25
Rysunek 10. Profil rozpuszczalności (-)-epikatechiny i kokryształu EC-BTA (a). Dyfraktogramy PXRD dla osadu kokryształu EC-BTA otrzymanego po badaniach rozpuszczalności w roztworach wodnych (b) (Budziak-Wieczorek, Maciołek, 2021).	26
Rysunek 11. Dwie molekuly występujące w strukturze kryształu kardamoniny (CA). Parametry przemieszczenia anizotropowego są na poziomie prawdopodobieństwa 50%. Częsteczka po lewej stronie odpowiada cząsteczce-A (a), a cząsteczka po prawej stronie odpowiada cząsteczce-B (b) (Budziak i in., 2020).....	29
Rysunek 12. Widma emisyjne CA w etanolu i mieszaninach etanol/woda dla wzbudzenia przy 300 nm (Budziak i in., 2020).....	30
Rysunek 13. Struktura chemiczna koformatorów opisanych w publikacji 3 (a), warstwowa struktura XN pokazująca homomolekularny motyw nieskończonych łańcuchów C(8) obserwowany w warstwach cząsteczek XN dla kryształów XN–NIC, XN–GA i XN–AC (b) (Budziak i in., 2019).....	31
Rysunek 14. Warstwowe upakowanie kokryształów ksantohumolu. Kokryształ XN–NIC ukazujący warstwową strukturę XN i przecinające je kolumny nikotynamidowe (a), kokryształ XN-GA przedstawiający naprzemienne warstwy typu AD, BC cząsteczek XN (b), kokryształ XN-AC przedstawiający warstwy złożone z cząsteczek XN związanych z acetamidem (c), kokryształ XN-CF ukazujący słabo związane warstwy ksantohumolu i kofeiny (d) (Budziak i in., 2019).	32
Rysunek 15. Schematyczne przedstawienie interakcji między polioli i grupami fosforanowymi lipidu DMPC. Liczba oddziałujących polioli jest silnie zależna od długości łańcucha polioli. Oddziaływania, uporządkowane od najsilniejszego do najsłabszego były następujące: erytrytol, ksylitol i mannitol (Budziak i in., 2018).	36
Rysunek 16. Zdjęcia BAM wykonane dla monowarstwy DMPC podczas kompresji przy ciśnieniu powierzchniowym 30 mN/m, 40 mN/m oraz rejonie kolapsu <45 mN/m kiedy subfazę stanowiła woda (a) i wodny roztwór erytrytolu (b) (Budziak i in., 2018).....	38

8. Bibliografia

- Aitipamula S., Banerjee R., Bansal A. K., Biradha K., Cheney M. L., Choudhury A. R., Desiraju G. R., Dikundwar A. G., Dubey R., Duggirala N., Ghogale P. P., Ghosh S., Goswami P. K., Goud N. R., Jetty R. R. K. R., Karpinski P., Kaushik P., Kumar D., Kumar V., Moulton B., Mukherjee A., Mukherjee G., Myerson A. S., Puri V., Ramanan A., Rajamannar T., Reddy C. M., Rodriguez-Hornedo N., Rogers R. D., Row T. N. G., Sanphui P., Shan N., Shete G., Singh A., Sun C. Q. C., Swift J. A., Thaimattam R., Thakur T. S., Thaper R. K., Thomas S. P., Tothadi S., Vangala V. R., Variankaval N., Vishweshwar P., Weyna D. R., Zaworotko M. J. (2012). *Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name?* Crystal Growth & Design, 12, 2147-2152.
- Aitipamula S., Vangala V. R. (2017). *X-Ray Crystallography and its Role in Understanding the Physicochemical Properties of Pharmaceutical Cocrystals*. Journal of the Indian Institute of Science, 97, 227-243.
- Alqahtani M. S., Kazi M., Alsenaidy M. A., Ahmad M. Z. (2021). *Advances in Oral Drug Delivery*. Frontiers in Pharmacology, 12.
- Ameh E. S. (2019). *A review of basic crystallography and x-ray diffraction applications*. International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 105, 3289-3302.
- Arafa M. F., El-Gizawy S. A., Osman M. A., El Maghraby G. M. (2018). *Xylitol as a potential co-crystal co-former for enhancing dissolution rate of felodipine: preparation and evaluation of sublingual tablets*. Pharmaceutical Development and Technology, 23, 454-463.
- Arczewska M., Kamiński D. M., Górecka E., Pociecha D., Rój E., Sławinska-Brych A., Gagoś M. (2013). *The molecular organization of prenylated flavonoid xanthohumol in DPPC multibilayers: X-ray diffraction and FTIR spectroscopic studies*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1828, 213-222.
- Botten D., Fugallo G., Fraternali F., Molteni C. (2015). *Structural Properties of Green Tea Catechins*. Journal of Physical Chemistry B, 119, 12860-12867.
- Brandenburg J. G., Grimme S. (2014). *Dispersion Corrected Hartree-Fock and Density Functional Theory for Organic Crystal Structure Prediction*. Prediction and Calculation of Crystal Structures: Methods and Applications, 345, 1-23.
- Budziak-Wieczorek I., Maciołek U. (2021). *Synthesis and Characterization of a (-)-Epicatechin and Barbituric Acid Cocrystal: Single-Crystal X-ray Diffraction and Vibrational Spectroscopic Studies*. ACS Omega, 6, 8199-8209.
- Budziak I., Arczewska M., Kamiński D. M. (2019). *Formation of Prenylated Chalcone Xanthohumol Cocrystals: Single Crystal X-ray Diffraction, Vibrational Spectroscopic Study Coupled with Multivariate Analysis*. Molecules, 24.
- Budziak I., Arczewska M., Kamiński D. M. (2020). *Structure and Physical Properties of Cardamonin: A Spectroscopic and Computational Approach*. Molecules, 25.
- Budziak I., Arczewska M., Sachadyn-Król M., Matwijczuk A., Waśko A., Gagoś M., Terpilowski K., Kamiński D. M. (2018). *Effect of polyols on the DMPC lipid monolayers and bilayers*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 1860, 2166-2174.
- Cai Y., Anavy N. D., Chow H. H. S. (2002). *Contribution of presystemic hepatic extraction to the low oral bioavailability of green tea catechins in rats*. Drug Metabolism and Disposition, 30, 1246-1249.
- Cai Z. Y., Li X. M., Liang J. P., Xiang L. P., Wang K. R., Shi Y. L., Yang R., Shi M., Ye J. H., Lu J. L., Zheng X. Q., Liang Y. R. (2018). *Bioavailability of Tea Catechins and Its Improvement*. Molecules, 23.
- Cerreia Vioglio P., Chierotti M. R., Gobetto R. (2017). *Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges*. Advanced Drug Delivery Reviews, 117, 86-110.
- Childs S. L., Kandi P., Lingireddy S. R. (2013). *Formulation of a Danazol Cocrystal with Controlled Supersaturation Plays an Essential Role in Improving Bioavailability*. Molecular Pharmaceutics, 10, 3112-3127.

- Dahan A., Miller J. M. (2012). *The Solubility-Permeability Interplay and Its Implications in Formulation Design and Development for Poorly Soluble Drugs*. Aaps Journal, 14, 244-251.
- Drozdz K. V., Manin A. N., Churakov A. V., Perlovich G. L. (2017). *Novel drug-drug cocrystals of carbamazepine with para-aminosalicylic acid: screening, crystal structures and comparative study of carbamazepine cocrystal formation thermodynamics*. Crystengcomm, 19, 4273-4286.
- Duggirala N. K., LaCasse S. M., Zaworotko M. J., Krzyzaniak J. F., Arora K. K. (2020). *Pharmaceutical Cocrystals: Formulation Approaches to Develop Robust Drug Products*. Crystal Growth & Design, 20, 617-626.
- Elderdfi M., Sikorski A. F. (2018). *Langmuir-monolayer methodologies for characterizing protein-lipid interactions*. Chemistry and Physics of Lipids, 212, 61-72.
- Emami S., Siahi-Shadbad M., Adibkia K., Barzegar-Jalali M. (2018). *Recent advances in improving oral drug bioavailability by cocrystals*. Bioimpacts, 8, 305-320.
- Espanol E. S., Villamil M. M. (2019). *Calixarenes: Generalities and Their Role in Improving the Solubility, Biocompatibility, Stability, Bioavailability, Detection, and Transport of Biomolecules*. Biomolecules, 9.
- Fairweather-Tait S. J. (1997). *From absorption and excretion of minerals ... to the importance of bioavailability and adaptation*. British Journal of Nutrition, 78, S95-S100.
- Garbacz P., Wesołowski M. (2018). *DSC, FTIR and Raman Spectroscopy Coupled with Multivariate Analysis in a Study of Co-Crystals of Pharmaceutical Interest*. Molecules, 23.
- Gomes M. N., Muratov E. N., Pereira M., Peixoto J. C., Rosseto L. P., Cravo P. V. L., Andrade C. H., Neves B. J. (2017). *Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design*. Molecules, 22.
- Goncalves L. M., Valente I. M., Rodrigues J. A. (2014). *An Overview on Cardamonin*. Journal of Medicinal Food, 17, 633-640.
- Guo Y. C., Chen Y. Z., Ma H. J. (2014). *Inclusion Mechanism and Heat Stability of the Complex of 4'-Hydroxychalcone and Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13, 1971-1977.
- Guzmán H. R., Tawa M., Zhang Z., Ratanabanangkoon P., Shaw P., Gardner C. R., Chen H., Moreau J. P., Almarsson O., Remenar J. F. (2007). *Combined use of crystalline salt forms and precipitation inhibitors to improve oral absorption of celecoxib from solid oral formulations*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 96, 2686-2702.
- Hauss D. J., Fogal S. E., Ficorilli J. V., Price C. A., Roy T., Jayara A. A., Keirns J. J. (1998). *Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB4 inhibitor*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 87, 164-169.
- Jagadeesh M., Lavanya M., Babu B. H., Hong K., Ma R., Kim J., Kim T. K. (2015). *Synthesis and detailed spectroscopic characterization of various hydroxy-functionalized fluorescent chalcones: A combined experimental and theoretical study*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 150, 557-564.
- Jaiswal S., Sharma A., Shukla M., Lal J. (2015). *Gender-related pharmacokinetics and bioavailability of a novel anticancer chalcone, cardamonin, in rats determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 986, 23-30.
- Jiang C. H., Sun T. L., Xiang D. X., Wei S. S., Li W. Q. (2018). *Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid From Hops (Humulus lupulus L.)*. Frontiers in Pharmacology, 9.
- Kamiński D. B. I., Ciolek A., Czczko R., Muszyński P., Staszowska-Karkut M. 2016. *Chalkony*, Lublin, Towarzystwo Wydawnictw Naukowych Libropolis.
- Kiguchiya A., Teraoka R., Sakane T., Yonemochi E. (2019). *A New Method for Classification of Salts and Cocrystals Using Solid-State UV Spectrophotometry*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 67, 945-952.
- Korotkova E. I., Kratochvil B. (2014). *Pharmaceutical Cocrystals*. Xv International Scientific Conference Chemistry and Chemical Engineering in Xxi Century Dedicated to Professor L.P. Kulyov, 10, 473-476.

- Krebs N. F. (2001). *Bioavailability of dietary supplements and impact of physiologic state: Infants, children and adolescents*. Journal of Nutrition, 131, 1351s-1354s.
- Krylov A. (2020). *Raman Spectroscopy of Crystals*. Crystals, 10.
- Kumar C. S. C., Loh W. S., Ooi C. W., Quah C. K., Fun H. K. (2013). *Structural Correlation of Some Heterocyclic Chalcone Analogues and Evaluation of Their Antioxidant Potential*. Molecules, 18, 11996-12011.
- Kumar S., Nanda A. (2017). *Pharmaceutical Cocrystals: An Overview*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 79, 858-871.
- Kuminek G., Cao F., da Rocha A. B. D., Cardoso S. G., Rodriguez-Hornedo N. (2016). *Cocrystals to facilitate delivery of poorly soluble compounds beyond-rule-of-5*. Advanced Drug Delivery Reviews, 101, 143-166.
- Lenhart A., Chey W. D. (2017). *A Systematic Review of the Effects of Polyols on Gastrointestinal Health and Irritable Bowel Syndrome*. Advances in Nutrition, 8, 587-596.
- Li L., Yin X. H., Diao K. S. (2020). *Improving the solubility and bioavailability of anti-hepatitis B drug PEC via PEC-fumaric acid cocrystal*. Rsc Advances, 10, 36125-36134.
- Lipinski C. A. (2000). *Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 44, 235-249.
- Magalhaes P. J., Carvalho D. O., Cruz J. M., Guido L. F., Barros A. A. (2009). *Fundamentals and Health Benefits of Xanthohumol, a Natural Product Derived from Hops and Beer*. Natural Product Communications, 4, 591-610.
- Mesallati H., Umerska A., Paluch K. J., Tajber L. (2017). *Amorphous Polymeric Drug Salts as Ionic Solid Dispersion Forms of Ciprofloxacin*. Molecular Pharmaceutics, 14, 2209-2223.
- Mishra D. K., Dhote V., Bhargava A., Jain D. K., Mishra P. K. (2015). *Amorphous solid dispersion technique for improved drug delivery: basics to clinical applications*. Drug Delivery and Translational Research, 5, 552-565.
- Mu H. L., Holm R., Mullertz A. (2013). *Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 453, 215-224.
- Nawaz J., Rasul A., Shah M. A., Hussain G., Riaz A., Sarfraz I., Zafar S., Adnan M., Khan A. H., Selamoglu Z. (2020). *Cardamonin: A new player to fight cancer via multiple cancer signaling pathways*. Life Sciences, 250.
- New R. R. C., Kirby C. J. (1997). *Solubilisation of hydrophilic drugs in oily formulations*. Advanced Drug Delivery Reviews, 25, 59-69.
- Olivares-Morales A., Hatley O. J. D., Turner D., Galetin A., Aarons L., Rostami-Hodjegan A. (2014). *The Use of ROC Analysis for the Qualitative Prediction of Human Oral Bioavailability from Animal Data*. Pharmaceutical Research, 31, 720-730.
- Orlikova B., Tasdemir D., Golais F., Dicato M., Diederich M. (2011). *Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential*. Genes and Nutrition, 6, 125-147.
- Ozawa T. (2000). *Thermal analysis - review and prospect*. Thermochimica Acta, 355, 35-42.
- Patel V., Lalani R., Bardoliwala D., Ghosh S., Misra A. (2018). *Lipid-Based Oral Formulation Strategies for Lipophilic Drugs*. Aaps Pharmscitech, 19, 3609-3630.
- Patil S. P., Modi S. R., Bansal A. K. (2014). *Generation of 1:1 Carbamazepine:Nicotinamide cocrystals by spray drying*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 62, 251-257.
- Pindelska E., Sokal A., Kolodziejewski W. (2017). *Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques*. Advanced Drug Delivery Reviews, 117, 111-146.
- Pouton C. W. (2006). *Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 29, 278-287.
- Rozmer Z., Perjesi P. (2016). *Naturally occurring chalcones and their biological activities*. Phytochemistry Reviews, 15, 87-120.
- Saganowska P., Wesołowski M. (2017). *Principal component and cluster analyses as supporting tools for co-crystals detection*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 130, 45-55.
- Sanphui P., Devi V. K., Clara D., Malviya N., Ganguly S., Desiraju G. R. (2015). *Cocrystals of Hydrochlorothiazide: Solubility and Diffusion/Permeability Enhancements through Drug-Cofomer Interactions*. Molecular Pharmaceutics, 12, 1615-1622.

- Sathisaran I., Dalvi S. V. (2018). *Engineering Cocrystals of Poorly Water-Soluble Drugs to Enhance Dissolution in Aqueous Medium*. *Pharmaceutics*, 10.
- Shan N., Perry M. L., Weyna D. R., Zaworotko M. J. (2014). *Impact of pharmaceutical cocrystals: the effects on drug pharmacokinetics*. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10, 1255-1271.
- Sharfalddin A., Davaasuren B., Emwas A. H., Jaremko M., Jaremko L., Hussien M. (2020). *Single crystal, Hirshfeld surface and theoretical analysis of methyl 4-hydroxybenzoate, a common cosmetic, drug and food preservative-Experiment versus theory*. *Plos One*, 15.
- Smith A. J., Kavuru P., Wojtas L., Zaworotko M. J., Shytle R. D. (2011). *Cocrystals of Quercetin with Improved Solubility and Oral Bioavailability*. *Molecular Pharmaceutics*, 8, 1867-1876.
- Spizzirri U. G., Carullo G., De Cicco L., Crispini A., Scarpelli F., Restuccia D., Aiello F. (2019). *Synthesis and characterization of a (+)-catechin and L-(+)-ascorbic acid cocrystal as a new functional ingredient for tea drinks (vol 5, e02291, 2019)*. *Heliyon*, 5.
- Tran P., Pyo Y. C., Kim D. H., Lee S. E., Kim J. K., Park J. S. (2019). *Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs*. *Pharmaceutics*, 11.
- Varshosaz J., Ghassami E., Ahmadipour S. (2018). *Crystal Engineering for Enhanced Solubility and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs*. *Current Pharmaceutical Design*, 24, 2473-2496.
- Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H. Y., Smith B. R., Ward K. W., Kopple K. D. (2002). *Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 2615-2623.
- Vippagunta S. R., Brittain H. G., Grant D. J. W. (2001). *Crystalline solids*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48, 3-26.
- Vishweshwar P., McMahon J. A., Bis J. A., Zaworotko M. J. (2006). *Pharmaceutical co-crystal*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95, 499-516.
- Wei S. S., Sun T. L., Du J., Zhang B. K., Xiang D. X., Li W. Q. (2018). *Xanthohumol, a prenylated flavonoid from Hops, exerts anticancer effects against gastric cancer in vitro*. *Oncology Reports*, 40, 3213-3222.
- Xu J., Huang Y. T., Ruan S. D., Chi Z. L., Qin K. M., Cai B. C., Cai T. (2016). *Cocrystals of isoliquiritigenin with enhanced pharmacokinetic performance*. *Crystengcomm*, 18, 8776-8786.
- Yu L. (2001). *Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48, 27-42.
- Zhang J. P., Liao P. Q., Zhou H. L., Lin R. B., Chen X. M. (2014). *Single-crystal X-ray diffraction studies on structural transformations of porous coordination polymers*. *Chemical Society Reviews*, 43, 5789-5814.
- Zhuang C. L., Zhang W., Sheng C. Q., Zhang W. N., Xing C. G., Miao Z. Y. (2017). *Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry*. *Chemical Reviews*, 117, 7762-7810.
- Zillich O. V., Schweiggert-Weisz U., Eisner P., Kersch M. (2015). *Polyphenols as active ingredients for cosmetic products*. *International Journal of Cosmetic Science*, 37, 455-464.

9. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej