



lek. dent. Beata Marta Kurczoba

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych  
i nauk o zdrowiu

**Wpływ pochodnej zielonej herbaty -  
galusanu epigallokatechiny na przenikanie przez  
barierę imitującą błonę śluzową**

Promotor: prof. dr hab. Marzena Wyganowska-Świątkowska  
Promotor: prof. dr hab. Izabela Nowak

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
Collegium Nauk Medycznych

**Poznań 2022**

*Serdecznie dziękuję*

*Pani prof. dr hab. Marzenie Wyganowskiej-Świątkowskiej,*

*Za wiarę we mnie i obdarzenie ogromnym zaufaniem, poświęcenie każdej chwili, stworzenie miłej i rodzinnej atmosfery podczas konsultacji pracy, wsparcia w chwili zwątpienia, a przede wszystkim za pomysł i umożliwienie mi realizacji doktoratu.*

*Pani prof. dr hab. Izabeli Nowak*

*Za obdarzenie mnie ogromnym zaufaniem, ponowne wprowadzenie w świat chemii doświadczalnej, stworzenie przyjaznej atmosfery podczas pracy w Zakładzie Chemii Stosowanej UAM, a przede wszystkim za pomysł i zachęcenie mnie do realizacji doktoratu.*

*Obu Paniom Promotor,*

*Za cenne merytoryczne wskazówki, wsparcie i poświęcony czas.  
Gdyby nie Panie Profesor, nie byłabym w tym miejscu naukowym, w którym znajduję się dzisiaj. Słowa nie są w stanie oddać mojej wdzięczności za Pań Profesor wkład w mój rozwój naukowy. Bez życzliwości i motywacji ze strony Pań Profesor, nie udałooby mi się tego osiągnąć.*

*Serdecznie dziękuję*

*Prof. UAM dr hab. Agnieszce Feliczak – Guzik,*

*Za każdą poświęconą chwilę w trakcie realizacji pracy,*

*Bez cierpliwości oraz motywacji ze strony Pani Profesor, nie udałoby mi się tego osiągnąć.*

*Serdecznie dziękuję  
Moim Rodzicom oraz Najbliższym,  
Za cierpliwość i wsparcie*

**SŁOWA KLUCZOWE:** zielona herbata, galusan epigallokatechiny (EGCG), błona śluzowa jamy ustnej

## Spis treści

|            |                                                                      |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1.         | Wstęp.....                                                           | 12 |
| 2.         | Przegląd piśmiennictwa.....                                          | 13 |
| 2.1.       | Nanocząstki lipidowe jako nowoczesne nośniki substancji aktywnych... | 13 |
| 2.1.1.     | Charakterystyka nanocząstek lipidowych.....                          | 13 |
| 2.1.1.1.   | SLN (Stałe Nanocząstki Lipidowe).....                                | 13 |
| 2.1.1.2    | NLC (Nanostrukturalne Nośniki Lipidowe).....                         | 14 |
| 2.1.2.     | Metody otrzymywania nanocząstek lipidowych .....                     | 15 |
| 2.1.3.     | Stabilność dyspersji nanocząstek lipidowych .....                    | 16 |
| 2.2.       | Zielona herbata.....                                                 | 17 |
| 2.2.1.     | Skład chemiczny suszu z zielonej herbaty .....                       | 18 |
| 2.2.2.     | Katechiny .....                                                      | 19 |
| 2.2.2.1.   | Struktura chemiczna i właściwości katechin.....                      | 19 |
| 2.2.3.     | EGCG – właściwości i działanie .....                                 | 21 |
| 2.2.3.1.   | Właściwości galusanu epigallokatechiny (EGCG).....                   | 21 |
| 2.2.3.2.   | Działanie EGCG.....                                                  | 22 |
| 2.2.4.2.1. | Działanie przeciwnowotworowe.....                                    | 23 |
| 2.2.4.2.2. | Działanie w chorobie wieńcowej.....                                  | 23 |
| 2.2.4.2.3. | Działanie przeciw otyłości.....                                      | 24 |
| 2.2.2.2.4. | Wpływ na starzenie skóry.....                                        | 24 |
| 2.3.       | Metody badania właściwości przeciwutleniających związków .....       | 24 |
| 2.4.       | Uwalnianie substancji aktywnych <i>in vitro</i> .....                | 26 |
| 2.5.       | Błona śluzowa jamy ustnej .....                                      | 28 |

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.1. Budowa błony śluzowej jamy ustnej .....                                                                                                                                                                         | 28 |
| 2.5.2. Funkcje błony śluzowej jamy ustnej .....                                                                                                                                                                        | 29 |
| 2.5.3. Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej.....                                                                                                                                                                       | 30 |
| 3. Cel pracy.....                                                                                                                                                                                                      | 31 |
| 4. Materiał i metody .....                                                                                                                                                                                             | 32 |
| 4.1. Spektrometria mas ESI-MS standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty.....                                                                                                                                       | 32 |
| 4.2. Optymalizacja parametrów syntezy stałych nanocząstek lipidowych typu SLN inkorporowanych EGCG.....                                                                                                                | 32 |
| 4.2.1. Materiały .....                                                                                                                                                                                                 | 32 |
| 4.2.2. Oznaczenie materiałów zsyntezowanych w pracy .....                                                                                                                                                              | 33 |
| 4.2.3. Synteza stałych nanocząstek lipidowych typu SLN z wykorzystaniem homogenizatora wysokociśnieniowego .....                                                                                                       | 34 |
| 4.2.3.1. Synteza „pustych” stałych nanocząstek lipidowych typu SLN...34                                                                                                                                                |    |
| 4.2.3.2. Synteza „pustych” stałych nanocząstek lipidowych typu SLN z zastosowaniem homogenizacji wstępnej (homogenizator wysokoobrotowy UltraTurax) oraz homogenizatora wysokociśnieniowego (ciśnienie 300 barów)..... | 34 |
| 4.2.3.3. Synteza „pustych” stałych nanocząstek lipidowych typu SLN z zastosowaniem homogenizacji wstępnej (homogenizator wysokoobrotowy UltraTurax) oraz homogenizatora wysokociśnieniowego (ciśnienie 400 barów)..... | 35 |
| 4.2.3.4. Synteza stałych nanocząstek lipidowych typu SLN inkorporowanych EGCG.....                                                                                                                                     | 36 |
| 4.2.4. Synteza „pustych” stałych nanocząstek lipidowych typu SLN oraz inkorporowanych EGCG lub kwasem galusowym z zastosowaniem homogenizacji wysokoobrotowej .....                                                    | 36 |
| 4.3. Charakterystyka fizykochemiczna stałych nanocząstek lipidowych .....                                                                                                                                              | 37 |

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.1. Pomiary potencjału zeta i wielkości cząstek.....                                                            | 37 |
| 4.3.2. Badanie zdolności antyoksydacyjnej EGCG przy użyciu TPTZ – metoda FRAP .....                                | 38 |
| 4.3.3. Badanie zdolności antyoksydacyjnej EGCG przy użyciu DPPH.....                                               | 39 |
| 4.4. Badanie kinetyki uwalniania EGCG z hydrożelu .....                                                            | 41 |
| 4.4.1. Membrana dializacyjna.....                                                                                  | 41 |
| 4.4.2. Preparatyka płynu akceptorowego .....                                                                       | 42 |
| 4.4.3. Preparatyka hydrożelu zawierającego stałe nanocząstki lipidowe inkorporowane EGCG.....                      | 42 |
| 4.4.4. Przygotowanie próbek .....                                                                                  | 43 |
| 4.4.5. Budowa i przygotowanie aparatury do badania kinetyki uwalniania EGCG ze stałych nanocząstek lipidowych..... | 45 |
| 5. Prezentacja wyników.....                                                                                        | 47 |
| 5.1. Spektrometria mas ESI-MS standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty...                                     | 47 |
| 5.2. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych SLN inkorporowanych EGCG.....                                     | 48 |
| 5.2.1. Pomiar potencjału ZETA dla otrzymanych nanocząstek lipidowych                                               | 48 |
| 5.2.2. Wyniki pomiaru współczynnika polidispersyjności (Pdl) .....                                                 | 51 |
| 5.2.3. Średnia wielkość cząstek Z-Ave .....                                                                        | 52 |
| 5.2.4. Analiza średniego rozmiaru i wielkości cząstek metodą DLS.....                                              | 53 |
| 5.3. Badanie zdolności antyoksydacyjnej SLN inkorporowanych EGCG z użyciem syntetycznego rodnika DPPH• .....       | 58 |
| 5.4. Ocena efektywności uwalniania EGCG z otrzymanej formulacji farmaceutycznej.....                               | 61 |
| 6. Dyskusja .....                                                                                                  | 63 |
| 7. Podsumowanie .....                                                                                              | 66 |
| 8. Wnioski.....                                                                                                    | 67 |
| 9. Streszczenie w języku polskim .....                                                                             | 68 |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 10. Abstract.....                              | 71 |
| 11. Piśmiennictwo.....                         | 74 |
| 12. Spis rycin.....                            | 86 |
| 13. Spis tabel.....                            | 88 |
| 14. Spis równań.....                           | 89 |
| 15. Załącznik - zgoda komisji bioetycznej..... | 90 |

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| SKRÓT        | ROZWINIECIE SKRÓTU                                                                                            |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ABTS</b>  | Sól diamonowa 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)                                                 |
| <b>CBA</b>   | Metoda odbarwienia krocyny (ang. crocin bleaching assay)                                                      |
| <b>CUPRA</b> | Metoda oznaczania zdolności do redukowania jonów Cu(II)<br>(ang. cupric reducing antioxidant capacity)        |
| <b>DLS</b>   | Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. Dynamic Light Scattering)                                               |
| <b>DPMD</b>  | Dichlorowodorek dimetylo-p-fenylendiaminy                                                                     |
| <b>DNA</b>   | Kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)                                                        |
| <b>DPPH</b>  | 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (ang. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)                                           |
| <b>EGCG</b>  | Galusan epigallokatechiny (ang. epigallocatechin gallate)                                                     |
| <b>FRAP</b>  | Metoda oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza Fe(III) (ang. ferric reducing antioxidant parameter)     |
| <b>HAT</b>   | Mechanizm przeniesienia atomu wodoru (ang. hydrogen atom transfer)                                            |
| <b>HPH</b>   | Homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. high pressure homogenization, HPH)                                      |
| <b>IUPAC</b> | Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry)      |
| <b>LDL</b>   | Lipoproteiny niskiej gęstości (ang. Low density lipoprotein)                                                  |
| <b>LPIC</b>  | Metoda oznaczania inhibicji utlenienia frakcji LDL cholesterolu (ang. Lipid peroxidation inhibition capacity) |
| <b>MMP-1</b> | Metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 1(ang.matrix metalloproteinase 1)                                    |

|                                |                                                                                                                                     |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NLC</b>                     | Nanostrukturalne nośniki lipidowe (ang. nanostructured lipid carriers)                                                              |
| <b>ORAC</b>                    | Metoda zdolności absorpcji rodników tlenowych (ang. oxygen radical absorbance capacity)                                             |
| <b>O/W; W/O; W/O/W</b>         | Typ emulsji, odpowiednio olej w wodzie, woda w oleju, woda w oleju w wodzie (emulsja wielokrotna)                                   |
| <b>PDI</b>                     | Wskaźnik polidispersyjności (ang. polydispersity index)                                                                             |
| <b>RFT</b>                     | Reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)                                                                                |
| <b>SLN</b>                     | Stałe nanocząstki lipidowe (ang. Solid Lipid Nanoparticles)                                                                         |
| <b>SET</b>                     | Mechanizm przeniesienia pojedynczego elektronu (ang. single electron transfer)                                                      |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Czynnik martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor $\alpha$ )                                                                  |
| <b>TPTZ</b>                    | 2,4,6-tripirydylo-S-tiazyna                                                                                                         |
| <b>TRAP</b>                    | Metoda całkowitej zdolności wychwytywania wolnych rodników (ang. total redox antioxidant parameter)                                 |
| <b>UV</b>                      | Promieniowanie ultrafioletowe (ang. ultraviolet)                                                                                    |
| <b>UV-VIS</b>                  | Promieniowanie w zakresie światła widzialnego oraz w nadfiolecie o długości fali 200-800 nm (ang. ultraviolet-visible spectroscopy) |
| <b>Z-AVE</b>                   | Średnia wielkość cząstek (ang. Average Particle Size)                                                                               |
| <b>ZP</b>                      | Potencjał zeta (ang. Zeta Potential)                                                                                                |

# 1. Wstęp

Wiek XXI to okres przywiązywania wielkiej wagi do zdrowego stylu odżywiania oraz urody. Wśród obecnie dostępnych na rynku produktów, którym przypisuje się właściwości odmładzające oraz prozdrowotne wymienia się zieloną herbatę. Swoje właściwości lecznicze zawdzięcza zawartym w niej katechinom, a w szczególności galusanowi epigallokatechiny (EGCG), którego zawartość w zielonej herbacie wynosi od 48 do 59% wag. Jest to związek chemiczny posiadający silne właściwości antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne oraz przeciwstarzeniowe.

Efekt działania środków leczniczych determinowany jest przez stopień uwalniania substancji aktywnych z podłoża farmaceutycznego oraz ich zdolności do pokonywania bariery naskórkowej. Jest to jedna z ważniejszych trudności, z jaką borykają się firmy farmaceutyczne. Nowe osiągnięcia technologiczne, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania lipidowych systemów nośnikowych w produkcji leków, stanowi rozwiązanie w zakresie stopnia penetracji związków czynnych w głąb błony śluzowej prowadząc do wzrostu skuteczności działania danego preparatu oraz długości jego uwalniania w organizmie.

W przedłożonej rozprawie doktorskiej, w części teoretycznej opisano charakterystykę oraz metody otrzymywania nanocząstek lipidowych, skład chemiczny oraz działanie zielonej herbaty, charakterystykę galusanu epigallokatechiny (EGCG), właściwości przeciwutleniające (metody badania), uwalnianie substancji aktywnej oraz budowę błony śluzowej jamy ustnej. W ramach części doświadczalnej przeprowadzono optymalizację oraz badania stabilności otrzymanych nanocząstek lipidowych typu SLN inkorporowanych galusanem epigallokatechiny, właściwości antyoksydacyjne nanocząstek lipidowych inkorporowanych galusanem epigallokatechiny oraz uwalnianie EGCG z przygotowanego podłoża farmaceutycznego. Kluczowym etapem badania będącego podstawą rozprawy doktorskiej jest określenie wpływu nanocząstki z EGCG na błonę śluzową jamy ustnej, poprzez efektywność jej uwalniania z podłoża farmaceutycznego.

## **2. Przegląd piśmiennictwa**

### **2.1. Nanocząstki lipidowe jako nowoczesne nośniki substancji aktywnych**

Nanocząstki lipidowe będące jednymi z najnowszych i najbardziej skutecznych nośników substancji aktywnych budzą duże zainteresowanie na rynku medycznym, farmakologicznym oraz kosmetologicznym. Zadanie ich polega przede wszystkim na zwiększeniu biodostępności inkorporowanego leku [1]. Ze względu na budowę, opartą na biodegradowalnych lipidach, są bardzo dobrze tolerowane przez organizm ludzki i nietoksyczne. Wyróżnia się dwa typy nanocząstek lipidowych:

- I generacji, którą stanowią stałe nanocząstki lipidowe (ang. Solid Lipid Nanoparticles, SLN);
- II generacji, do której należą nanostrukturalne nośniki lipidowe (ang. Nanostructured Lipid Carriers, NLC) [2].

#### **2.1.1. Charakterystyka nanocząstek lipidowych**

##### **2.1.1.1. SLN (Stale Nanocząstki Lipidowe)**

Pierwsze doniesienia o stałych nanocząstkach lipidowych (SLN, nanocząstki I generacji) otrzymywanych głównie z lipidów i związków powierzchniowo czynnych pochodzą z 1991 roku [3, 4]. Wielkość stałych nanocząstek lipidowych mieści się w przedziale 50 – 1000 nm [5]. W budowie pojedynczej struktury SLN wyróżniamy: stały lipid, substancję aktywną, związek powierzchniowo czynny oraz wodę [6]. Dobór odpowiedniego lipidu oraz związku powierzchniowo czynnego w celu otrzymania stabilnej nanocząstki o odpowiednich rozmiarach jest kluczowym w procesie syntezy tychże nośników [7]. Zawartość lipidów powinna wynosić między 0,1% a 30,0% wagowych, natomiast związku powierzchniowo czynnego między 0,5% a 5,0% wagowych. W zależności od wykorzystanej metody otrzymywania oraz struktury chemicznej wprowadzonego składnika aktywnego można wyróżnić trzy typy SLN:

- typ I, posiada substancję czynną, która jest równomiernie rozłożona w całej objętości matrycy lipidowej, bez udziału emulgatorów i solubilizatorów; można go otrzymać metodą homogenizacji na zimno;
- typ II, w którym substancja aktywna umieszczona jest na zewnętrznej powłoce nanocząstki, co skutkuje jej szybkim uwalnianiem z matrycy (ang. burst release);
- typ III, charakteryzuje się obecnością dużej ilości substancji inkorporowanej w rdzeniu nanocząstki.

Wadą SLN jest jej uporządkowana struktura krystaliczna, która może powodować niską enkapsulację leku [7, 8].

### **2.1.1.2. NLC (Nanostrukturalne Nośniki Lipidowe)**

Nanostrukturalne nośniki lipidowe stanowią drugą generację nośników lipidowych, posiadających zwiększoną zdolność przenikania w głąb skóry. W porównaniu do SLN, w swej budowie, oprócz lipidów stałych zawierają także lipidy ciekłe (oleje). Ponadto charakteryzują się mniej uporządkowaną strukturą wewnętrzną cząstki. Taka struktura zapewnia zwiększenie ilości inkorporowanej substancji aktywnej oraz wpływa na trwałość nanocząsteczki. Nanostrukturalne nośniki lipidowe, analogicznie jak nanocząstki pierwszej generacji, mogą występować w trzech typach:

- typ I (niedoskonały), posiada nieuporządkowaną strukturę, która powstała w wyniku zmieszania się lipidów stałych oraz niewielkiej ilości lipidów ciekłych; powstaje wówczas model nieuporządkowanego kryształu, który posiada najwyższą pojemność ładunkową;
- typ II, inaczej amorficzny, zapewnia minimalny ubytek substancji aktywnej podczas przechowywania;
- typ III, inaczej złożony (wielokrotny), powstaje w wyniku połączenia stałego lipidu z maksymalną ilością ciekłych lipidów na wzór emulsji wielokrotnej W/O/W, co umożliwia zwiększenie pojemności ładunkowej NLC dla substancji aktywnych [9, 10].

## **2.1.2. Metody otrzymywania nanocząstek lipidowych**

Synteza SLN oraz NLC przebiega w obu przypadkach w taki sam sposób [11]. Wybrana substancja aktywna musi być rozproszona lub rozpuszczalna w fazie lipidowej, umożliwia to w dalszym procesie otrzymanie nanocząstek lipidowych jedną z poniżej opisanych metod:

- metodą homogenizacji wysokociśnieniowej (HPH, ang. High Pressure Homogenization), jedną z najpopularniejszych i najskuteczniejszych metod otrzymywania nanocząstek lipidowych. Homogenizatory pod ciśnieniem od 100 do 2000 barów przepuszczają ciecz przez wąskie rurki o średnicy kilku mikronów. Ciecz ta osiąga prędkość ponad 1000 km/h na bardzo krótkich odcinkach. Typy HPH umożliwiają homogenizację na ciepło oraz na zimno. W obu typach homogenizacji wysokociśnieniowej, etap przygotowania jest taki sam i przebiega z dodawaniem substancji aktywnej do stopionej mieszaniny lipidów. W przypadku homogenizacji na gorąco mieszanina lipidów dodawana jest do gorącego związku powierzchniowo czynnego, w przypadku homogenizacji na zimno mieszaninę lipidów ochładza się i dodaje do zimnego związku powierzchniowo czynnego. W obu przypadkach bardzo ważne jest kontrolowanie temperatury. Otrzymane nanocząstki lipidowe w wyniku homogenizacji wysokociśnieniowej mają wielkość w przedziale od 50 do 650 nm [12, 13];
- metodą mikroemulsji polegającej na rozcieńczaniu mikroemulsji, która zawiera stałe lipidy w temperaturze pokojowej. W tym celu należy ogrzać i utrzymać temperaturę procesu na poziomie wyższym niż temperatura topnienia danego lipidu. Związki powierzchniowo czynne, przed zmieszaniem z lipidami, należy ogrzać do temperatury lipidów. Następnie otrzymaną mieszaninę miesza się z zimną wodą, w stosunku 1:25 lub 1:50. Podczas ciągłego mieszania mechanicznego, ciepło mikroemulsji dyspergowanej w wodzie rozprasza się. Proces ten zapewnia otrzymanie nanocząstek lipidowych o niewielkich rozmiarach wahających się w przedziale od 450 do 1000 nm [14];

- metoda emulgowania i odparowania rozpuszczalnika jest jedną z pierwszych metod otrzymywania nanocząstek lipidowych [15]. Polega ona na emulgowaniu fazy wodnej związku powierzchniowo czynnego z fazą lipidową, rozpuszczoną w rozpuszczalniku organicznym. Następnie odparowuje się rozpuszczalnik (pod ciśnieniem obniżonym do około 0,04 – 0,06 barów) i otrzymuje, w zależności od stężenia lipidów w fazie organicznej, zawiesinę nanocząstek lipidowych o rozmiarze w przedziale od 300 do 550 nm. Zaletą tej metody jest niwelacja zastosowania wysokich temperatur. Z kolei do jej wad zalicza się pozostałości rozpuszczalnika organicznego [16, 17];
- metodą z użyciem kontaktora membranowego polegającą na „przepchnięciu” fazy lipidowej przez pory membrany. Temperatura tego procesu musi być wyższa od temperatury topnienia danego lipidu, co umożliwia powstanie kropli lipidowych. Faza wodna, która płynie w stosunku do powierzchni membrany styknie, oddziela krople lipidowe od porów membrany, w procesie stopniowego ochładzania mieszaniny aż do temperatury pokojowej. Niewątpliwie dużą zaletą tej metody jest możliwość kontrolowania wielkości otrzymanych nanocząstek lipidowych poprzez odpowiedni dobór parametrów przyrządu [17, 18].

### **2.1.3. Stabilność dyspersji nanocząstek lipidowych**

Przeprowadzenie oceny stabilności sporządzonych preparatów farmaceutycznych ma za zadanie zapewnić prawidłowe zachowanie się produktu w określonym czasie przydatności, w odpowiednich warunkach przechowywania oraz podczas jego użytkowania w końcowym opakowaniu. Stabilność preparatów farmaceutycznych, uzależniona jest od następujących czynników [18]:

- Potencjał elektrokinetyczny zeta (ang. Zeta Potential, ZP) – określa wielkość odpychania elektrostatycznego naładowanych, poruszających się cząstek w dyspersji. Im wyższa jego wartość tym stabilniejsze nanocząstki (od  $|\pm 30|$  mV). Małe wartości potencjału zeta mogą świadczyć o agregacji lub flokulacji cząstek. Najczęściej jest wyrażany w jednostce miliwolt (mV) [19].

- Wskaźnik polidispersyjności (ang. Polidispersity Index, PDI) – pokazuje stopień rozproszenia nanocząstek lipidowych w dyspersji. Uznaje się za stabilne nanocząstki, jeśli wartość PDI mieści się w przedziale 0,0 - 0,3. Jest parametrem bezwymiarowym [20].
- Średnia wielkość cząstek (Z-AVE) - bardzo ważny parametr, klasyfikujący otrzymaną strukturę do grupy nanocząstek lipidowych, wyrażany w nm, mieszczący się w przedziale 5 - 100 nm. Wartość średniej wielkości cząstek dyspersji jest wprost proporcjonalna do ich skłonności do aglomeracji [21].

Wymagany minimalny czas badania stabilności dyspersji nanocząstek lipidowych z substancją leczniczą wynosi co najmniej 30 dni [22], podczas którego mierzymy wartości wyżej wymienionych parametrów fizykochemicznych.

## 2.2. Zielona herbata

Zielona herbata, znana w krajach azjatyckich już od ponad 4000 lat, jest jednym z najczęściej spożywanych napojów na świecie [23]. Doceniono ją w pełni za panowania dynastii Tang w Chinach (618 – 910 r.), odkąd zaczęto ją pić dla przyjemności i orzeźwienia na co dzień [24].

Zielona herbata należy do rodziny *Camellia* wraz z herbatą czarną (fermentowaną), białą (niefermentowaną) oraz oolong (częściowo fermentowaną) [25]. Uzyskiwana jest z młodych, nierozwiniętych pączków listków i delikatnych łodyżek, a uprawiana w krajach o ciepłym i wilgotnym klimacie choć może znieść ostrzejszy klimat i spadek temperatury do -10°C pod warunkiem, że chroni ją gruba warstwa śniegu [26].

W medycynie ludowej krajów azjatyckich, herbata uważana była za lek na wiele dolegliwości, a picie herbaty przybrało charakter ceremonii i filozofii życia, zwanej Drogą Herbaty lub Herbatyzmem zakładającej zamiłowanie do estetyki i piękna [27]. Walory smakowe oraz prozdrowotne zielonej herbaty zależą w dużej mierze od sposobu jej przygotowania. Zieloną herbatę należy parzyć ok. 1,5 minuty (maksymalnie 2 minuty) wodą o temperaturze 60 – 70°C. Subtelny i delikatny smak herbaty zależy również od rodzaju użytej wody, która powinna być miękka o odczynie lekko kwasowym, zawierająca małą ilość żelaza i magnezu [28, 29]. Badania prowadzone w Japonii dowodzą, że wypicie przynajmniej trzech filiżanek naparu z liści herbaty w ciągu doby

może być istotnym czynnikiem ograniczającym rozwój nowotworu we wczesnym stadium [30].

### **2.2.1. Skład chemiczny suszu z zielonej herbaty**

Do głównych związków, które występują w zielonej herbacie zalicza się: polifenole, białka, aminokwasy, węglowodany oraz lipidy. Ponadto w suszu z zielonej herbaty możemy również znaleźć: witaminy (głównie B, C, E, K), ksantyny (kofeina i teofilina), barwniki, składniki lotne i mineralne.

Flawonoidy należą do najliczniejszej grupy polifenoli, pośród których największą ilość stanowią katechiny (flawan-3-ole). Do najliczniejszych katechin w suszu z zielonej herbaty zalicza się odpowiednio od największej do najmniejszej ilości: galusan epigallokatechiny, galusan epikatechiny, epigallokatechina, galokatechina, epikatechina. Zawartość procentowa poszczególnych składników świeżych liści herbaty nie jest stała i zależy od wielu czynników, takich jak np. gleba czy warunki klimatyczne. Ponadto rodzaj liści herbacianych, wiek rośliny oraz czas zbioru również wpływają na zawartość, przede wszystkim olejków eterycznych, ale i związków polifenolowych (głównie katechin) [31].

Zielona herbata posiada największą zawartość polifenoli, w tym katechin, w porównaniu z innymi popularnymi napojami [32, 33]. Napar z zielonej herbaty zawiera także mikroelementy, takie jak: glin, mangan czy miedź, a także inne pierwiastki takie jak potas, wapń i fluor [34]. Obecność fluoru w zielonej herbacie prawdopodobnie przyczynia się do właściwości przeciwróżniczych herbaty [35].

W zielonej herbacie ponadto występują proantocyjanidyny (taniny skondensowane) nadające jej charakterystyczny gorzkawy i ściągający smak, co wynika z ich zdolności do wiązania białek śliny bogatych w prolinę. Dodatkowo, taniny wiążą kofeinę, w wyniku czego, długo parzona herbata zielona nabiera właściwości kojących oraz uspokajających. Dzięki specyficznym właściwościom tanin herbata zielona stosowana była dawniej jako lek przeciwbiegunkowy i przeciwzapalny. Niestety obecność proantocyjanidyn w herbacie może również powodować niekorzystny efekt, jakim jest ograniczenie wchłaniania niektórych metali, takich jak: żelazo, wapń czy

magnez [36]. Bardzo ważnym składnikiem zielonej herbaty, poza katechinami, są również alkaloidy purynowe, takie jak: kofeina (najbardziej aktywny alkaloid), teofilina i teobromina. Kofeina (teina) korzystnie wpływa na wydolność umysłową i fizyczną, koncentrację, a ponadto zmniejsza zmęczenie i senność, poza tym może stymulować proces termogenezy w organizmie, a więc wspomagać odchudzanie [37].

## 2.2.2. Katechiny

Katechiny (flawan-3-ole) należą do dużej grupy związków polifenolowych zwanych flawonoidami. Zielona herbata jest najbogatszym źródłem katechin. Jeden litr jej naparu może zawierać 870 – 2200 mg katechin (59 – 103 mg/g liści). Szerokie spektrum właściwości biologicznych katechin (między innymi przeciwnowotworowe, przeciwmutagenne, przeciwzapalne) tłumaczy się często ich aktywnością przeciwutleniającą. EGCG, czyli galusan epigallokatechiny, jest główną katechiną występującą w zielonej herbacie, jego zawartość wynosi aż 50% [38].

### 2.2.2.1. Struktura chemiczna i właściwości katechin

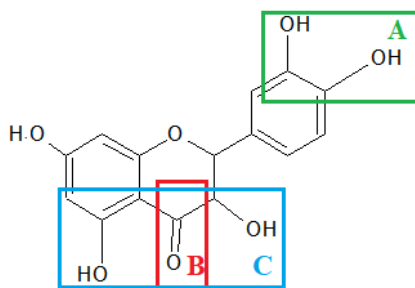
Charakterystyczną cechą struktury katechin jest szkielet difenylopropanoidowy ( $C_6-C_3-C_6$ ), w którym dwa pierścienie aromatyczne A i B połączone są heterocyklicznym pierścieniem  $\gamma$ -piranowym C (Ryc. 1). Wyniki badań nad aktywnością przeciwutleniającą katechin, wyznaczoną za pomocą różnych testów *in vitro* wykazały, że katechiny są najbardziej skutecznymi przeciwutleniaczami spośród związków polifenolowych i witamin przeciwutleniających dzięki występowaniu licznych grup hydroksylowych odpowiednio położonych w pierścieniu. Miejsce podstawienia grup OH w katechinach to  $C_3$ ,  $C_5$ ,  $C_7$ ,  $C_3'$ ,  $C_4'$ ,  $C_5'$  [39].

Występujące w cząsteczkach katechin specyficzne ugrupowania w strukturze związku mają istotny wpływ na ich aktywność. Do najważniejszych elementów występujących w strukturze i decydujących o właściwościach przeciwutleniających flawonoidów należą:

- grupa katecholowa w pierścieniu B,

- podwójne wiązanie pomiędzy atomami węgla w pozycji C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> sprzężone z ugrupowaniem 4-ketonowym,
- dwie grupy hydroksylowe w pozycjach C<sub>5</sub> i C<sub>7</sub> (pierścienie A i C) tworzące wiązania wodorowe z ugrupowaniem 4-ketonowym.

Taka budowa związku umożliwia delokalizację elektronów pomiędzy pierścieniami A i B [40].



**Ryc.1. Elementy strukturalne katechin zapewniające efektywne zmiatanie wolnych rodników [40].**

Właściwości przeciwutleniające katechin zależą wprost proporcjonalnie od liczby grup hydroksylowych w cząsteczce, im większa liczba podstawników hydroksylowych tym wyższa aktywność przeciwutleniająca. Galusan epigallokatechiny posiada aż osiem grup hydroksylowych w cząsteczce, dlatego jest tak silnym przeciwutleniaczem [41]. Flawonoidy zawierające w cząsteczce ugrupowanie pirogalołowe (np. epigallokatechina) charakteryzuje wyższa aktywność przeciwutleniająca w warunkach niskiego pH. Obecność reszty kwasu galusowego w cząsteczce katechiny (np. w cząsteczce EGCG) wpływa na podwyższenie aktywności przeciwutleniającej flawonoidu [42].

Działanie antyoksydacyjne flawonoidów, w tym również katechin polega na:

- wychwytywaniu/wymiataniu wolnych rodników tlenowych i ich reaktywnych form (RFT),
- przerwaniu kaskady reakcji wolnorodnikowych m.in. peroksydacji lipidów,
- hamowaniu aktywności enzymów biorących udział w powstawaniu RFT (oksydazy ksantynowej, błonowej oksydazy NAD(P)H, mieloperoksydazy), co prowadzi do ich ograniczonego wytwarzania w komórkach,
- chelatowaniu jonów metali przejściowych, przede wszystkim miedzi i żelaza, co uniemożliwia powstanie reaktywnego rodnika hydroksylowego; wśród katechin

najsilniejsze właściwości chelatujące posiada EGCG. Zarówno eksperymenty *in vitro*, jak i *in vivo* potwierdzają zdolność tych związków do hamowania peroksydacji lipidów indukowanej jonami miedzi [43],

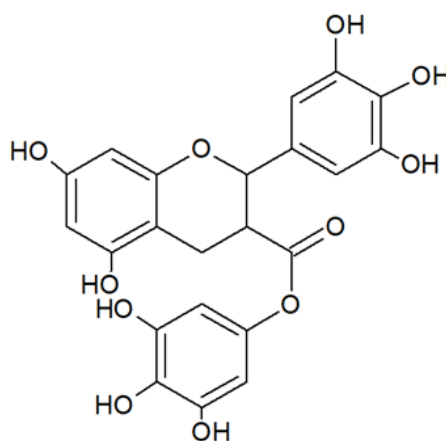
➤ ochronie przed utlenianiem antyoksydantów niskocząsteczkowych askorbinianu,  $\alpha$ - tokoferolu [44].

Zdolność katechin do wychwytywania RFT oraz chelatowania metali przejściowych może mieć istotne znaczenie w stanach patologicznych (np. w stanach zapalnych, miażdżycy, cukrzycy, chorobach neurodegeneracyjnych czy w nowotworach), którym towarzyszy stres oksydacyjny [45].

## 2.2.3. EGCG – właściwości i działanie

### 2.2.3.1. Właściwości galusanu epigallokatechiny (EGCG)

Galusan epigallokatechiny (Ryc. 2) występuje w dużej ilości w zielonej herbacie i jest bardzo silnym przeciwutleniaczem. Badania *in vivo* dowodzą, że najwyższa aktywność antyoksydacyjna we krwi jest obserwowana po 30 – 50 minutach od wypicia herbaty [46].



Ryc. 2. Wzór strukturalny EGCG [10].

Właściwości EGCG w mechanizmie przeciwnowotworowym są spowodowane, tym, że jest on silnym inhibitorem układu plazminogenu [47]. Jony metali przejściowych - miedzi oraz żelaza uczestniczą w procesie generowania RFT (wolnych rodników tlenkowych)

zarówno w fazie hydrofilowej, jak i lipofilowej. Katechiny oraz teaflawiny posiadają zdolność do chelatowania tych jonów. Eksperymenty *in vitro*, jak i *in vivo* potwierdzają, że najsilniejszą zdolność pośród katechin do peroksydacji lipidów indukowanej jonami miedzi posiada EGCG [39]. Najważniejsze właściwości EGCG przedstawiono w tabeli 1(Tab.1.).

**Tab. 1. Właściwości EGCG [48].**

| <b>Właściwości EGCG (galusanu epigallokatechiny)</b> |                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nazwa systematyczna (IUPAC)</b>                   | 3,4,5-trihydroksybenzoesan [(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-5,7-dihydroksy-2-(3,4,5-trihydroksyfenylo)-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -chromen-3-ylu] |
| <b>Wzór sumaryczny</b>                               | C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>                                                                                         |
| <b>Masa cząsteczkowa</b>                             | 458,37 g/mol                                                                                                                            |
| <b>Stan skupienia</b>                                | Ciało stałe                                                                                                                             |
| <b>Barwa</b>                                         | Słabo różowa                                                                                                                            |
| <b>Rozpuszczalność w wodzie</b>                      | Trudno rozpuszczalna                                                                                                                    |
| <b>Rozpuszczalność w etanolu</b>                     | Dobrze rozpuszczalna                                                                                                                    |
| <b>Warunki przechowywania</b>                        | Chronić przed światłem, przechowywać w temperaturze od -2 do -8 ° C                                                                     |
| <b>Toksyczność</b>                                   | Nie jest substancją ani mieszaniną niebezpieczną w rozumieniu rozporządzenia (WE) 1272/2008                                             |
| <b>Zapach</b>                                        | Brak                                                                                                                                    |
| <b>Temperatura topnienia</b>                         | 140 – 142°C                                                                                                                             |
| <b>Kwasowość (pK<sub>a</sub>)</b>                    | 7,75                                                                                                                                    |

|                |                               |
|----------------|-------------------------------|
| <b>Gęstość</b> | 1,90 g/cm <sup>3</sup> (20°C) |
|----------------|-------------------------------|

### 2.2.3.2. Działanie EGCG

#### 2.2.3.2.1. Działanie przeciwnowotworowe

Kancerogeneza to złożony proces, w którym czynnik rakotwórczy w momencie dotarcia do komórki poprzez genotoksyczne oddziaływanie prowadzi do uszkodzenia jej DNA. Pierwszą linią obronną komórki przed nowotworzeniem jest zablokowanie możliwości uszkodzenia genomu, polegające na ograniczeniu tworzenia reaktywnych rodników karcinogennych lub stymulowaniu ich detoksyfikacji drogą indukcji enzymów II-fazy. Enzymy antyoksydacyjne oraz detoksyfikujące enzymy drugiej fazy prowadzą do usunięcia związków cytotoksycznych z komórki zanim doprowadzą one do uszkodzenia komórkowego DNA [49]. Wykazano, że galusan epigalokatechiny (EGCG) hamuje oksydacyjne uszkodzenie DNA oraz cytotoksyczność, która jest spowodowana przez nitrozaminę zawartą w tytoniu, powodującą raka płuc [50]. Obserwowano również prewencyjne działanie EGCG w stosunku do fotokancerogennego działania promieniowania UV na skórę [51]. Antynowotworowe działanie EGCG koreluje z ograniczeniem produkcji wolnych rodników, zmniejszoną peroksydacją lipidów i utrzymaniem wewnątrzkomórkowej aktywności glutationu. EGCG również wpływa na odtworzenie enzymów detoksyfikacyjnych, do których należą: S-transferaza glutationowa, peroksydaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza [52]. Badania wskazują na prewencyjne działanie zielonej herbaty w rozwoju raka prostaty, przełyku, płuc, żołądka, trzustki i okrężnicy [53, 54].

#### 2.2.3.2.2. Działanie w chorobie wieńcowej

Polifenole zielonej herbaty, w tym przede wszystkim galusan epigalokatechiny, hamują utlenianie lipoproteiny niskiej gęstości (LDL) redukując produkcję ponadtlenku azotu przez makrofagi. W ten sposób najprawdopodobniej zapobiegają powstawaniu z makrofagów, wypełnionych lipidami, komórek piankowatych w ogniskach miażdżycowych [55]. Ponadto, EGCG zawarte w zielonej herbacie może zapobiegać pośredniczeniu przez komórki śródbłonna peroksydacji LDL prowadząc do inhibicji

oksygenazy hemowej, która uczestniczy w transformacji monocytów w rezydujące makrofagi i hamując tym samym rozwój zmian miażdżycowych [56, 57].

#### **2.2.3.2.3. Działanie przeciw otyłości**

Jedną z najbardziej rozpowszechnionych obecnie chorób cywilizacyjnych jest otyłość. Szacuje się, że dotyczy ona niemal 20% populacji światowej, a liczba osób otyłych stale wzrasta [58]. Zawarte w zielonej herbacie katechiny, w tym EGCG, są wspomagającym środkiem w walce z otyłością poprzez wpływ na zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej, a tym samym na masę ciała. Badania na ochotnikach, którzy przez 12 tygodni pili bogaty w katechiny napar zielonej herbaty wykazały u nich, w stosunku do grupy kontrolnej, dużo niższą masę ciała i ilość tkanki tłuszczowej [57]. Składniki zielonej herbaty hamują częściowo różnicowanie i proliferację adipocytów oraz zmniejszają wchłanianie tłuszczu i glukozy poprzez modulację działania enzymów trawiennych. EGCG tłumi poposiłkowe stężenie trójacylogliceroli *in vivo* w sposób zależny od dawki [59], wpływa na ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę i utlenianie tłuszczu. Ponadto zapobiega otyłości, pobudzając termogenezę poprzez stymulację współczulnego układu nerwowego [60].

#### **2.2.3.2.4. Wpływ na starzenie skóry**

Głębsze zmarszczki oraz utrata elastyczności to jeden z objawów procesu starzenia się skóry. Za ten proces jest odpowiedzialny rozkład kolagenu przez metaloproteinazę-1 macierzy (MMP-1), która jest indukowana przez reaktywne formy tlenu (RFT) i cytokiny prozapalne [61]. Badania wykazały korzystny wpływ EGCG poprzez hamowanie ekspresji i wydzielania MMP-1 w fibroblastach stymulowanych przez TNF- $\alpha$ , a tym samym spowolnienie procesu starzenia się skóry [62].

## **2.3. Metody badania właściwości przeciwutleniających związków**

Antyoksydanty (przeciwutleniacze) ze względu na ich właściwości zwalczania wolnych rodników tlenowych (reaktywnych form tlenu, RFT) w organizmie są szeroko

badane w medycynie klinicznej. Wolne rodniki tlenowe są cząsteczkami bardzo reaktywnymi, co powoduje, że chętnie wchodzi w reakcje chemiczne, a tym samym mogą uszkadzać ważne struktury komórkowe organizmu w wyniku utlenienia. Powoduje to szereg niekorzystnych zmian w organizmie, między innymi: uszkodzenia i mutacje DNA, starzenie się skóry, choroby nowotworowe [63].

W badaniach potwierdzających właściwości antyoksydacyjne wybranych związków prowadzonych poza organizmami żywymi wykorzystywana jest zdolność antyoksydantów do dezaktywacji wolnych rodników. Reakcje te przebiegają według dwóch mechanizmów [64]: mechanizmu przeniesienia atomu wodoru, tzw. HAT (ang. hydrogen atom transfer) oraz mechanizmu przeniesienia pojedynczego elektronu, tzw. SET (ang. single electron transfer).

Do metod HAT należą między innymi:

- metoda zdolności absorpcji rodników tlenowych (ang. oxygen radical absorbance capacity, ORAC), polega na pomiarze spadku intensywności fluorescencji sondy (związek wykazujący silną fluorescencję, np. fluoresceina) w obecności przeciwutleniacza [65].
- metoda całkowitej zdolności wychwytywania wolnych rodników (ang. total redox antioxidant parameter, TRAP) obserwuje się spadek fluorescencji sondy, np. białka R-fikoerytryny (R-Pe), który powodują rodniki nadtlenkowe syntezowane na drodze termicznego rozkładu związku azotowego. Spowolnienie zanikania fluorescencji roztworu jest spowodowane dodaniem przeciwutleniaczy do mieszaniny reakcyjnej [66].

Do metod opartych na mechanizmie przeniesienia atomu wodoru należą również: metoda odbarwienia krocyny (ang. crocin bleaching assay, CBA) oraz metoda oznaczania inhibicji utlenienia frakcji LDL cholesterolu (ang. lipid peroxidation inhibition capacity, LPIC) [64]. Metody te są jednak mniej popularne.

Wśród metod charakteryzujących się przebiegiem według mechanizmu przeniesienia pojedynczego elektronu, tzw. SET (ang. single electron transfer) wymienić można:

- metodę DPPH – (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) - jest jedną z najczęściej stosowanych metod do oznaczania właściwości antyutleniających, przy pomocy wolnego rodnika azowego DPPH. Do badań wykorzystuje się alkoholowe roztwory DPPH, których barwa przy długości fali 515 nm z maksymalną absorbancją jest purpurowa. W wyniku

reakcji z utleniaczem barwa roztworu ulega zmianie na żółtą. Przed przystąpieniem do pomiarów należy pamiętać, aby przygotowana próbka miała: ograniczony dostęp do światła i tlenu, odpowiednio dobrane pH oraz rozpuszczalnik, ponieważ może to doprowadzić do spadku absorbancji roztworu DPPH [67].

➤ metodę oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza Fe(III) (ang. ferric reducing antioxidant parameter, FRAP), polega na spektrofotometrycznym pomiarze redukcji związku TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6- tripirydylo-S-tiazyny), zawierającego jony żelaza(III). W wyniku działania utleniacza następuje zmiana zabarwienia odczynnika z bezbarwnej na niebieski (związek Fe(II))[68].

➤ metodę z wykorzystaniem odczynnika ABTS (2,2'-azobis (3- etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) polega na spektrofotometrycznym oznaczaniu zdolności przeciwutleniaczy. W wyniku dodania do ABTS nadsiarczanu sodu powstaje kationorodnik barwy niebieskiej, która z kolei zanika po dodaniu przeciwutleniacza [69].

Z pozostałych metod wymienić należy: metodę oznaczania zdolności do redukowania jonów Cu(II) (ang. cupric ion reducing antioxidant capacity, CUPRAC), metodę Folina-Ciocaltau (F-C) oraz metodę spektrofotometryczną z wykorzystaniem odczynnika DMPD (dichlorowodorek dimetylo-pfenylenodiaminy) [64].

## 2.4. Uwalnianie substancji aktywnych *in vitro*

Stopień uwalniania substancji aktywnych z substancji leczniczych przez błonę śluzową jamy ustnej zachodzi głównie na zasadzie dyfuzji biernej. Proces ten może odbywać się przez niezrogowaciałe nabłonki błony podjęzykowej oraz przez błonę śluzową policzka. Intensywność tego procesu w jamie ustnej jest większa aniżeli po podaniu leku na skórę do ok. 4000 razy [70, 71]. Uwolnienie leku zachodzi najłatwiej po podaniu drogą podjęzykową (dzięki dobremu ukrwieniu), następnie przez błonę policzka, natomiast najtrudniej przez tkankę podniebienia [71].

Badanie przenikania substancji czynnych przeprowadza się z użyciem membrany imitującej błonę śluzową oraz odpowiednio dobranej aparatury w zależności od postaci fizykochemicznej analizowanego leku:

➤ komora dyfuzyjna Franza – jest obecnie najczęściej wykorzystywana do badań uwalniania substancji aktywnych, składa się z: części akceptorowej, wypełnionej płynem

akceptorowym, mieszanym przez mieszało magnetyczne oraz części donorowej, w której znajduje się badany związek. Obie części oddzielone są za pomocą membrany, które mogą zostać zastąpione przez odpowiednio pobrane wycinki skóry, błony śluzowej. Pomiar polega na pobieraniu płynu akceptorowego, w którym znajduje się uwalniana substancja aktywna w określonych odstępach czasowych [72,73];

- dyfuzyjna komora przepływowa – zalecana do analizy związków czynnych trudno rozpuszczalnych w wodzie. Badanie polega na umieszczaniu próbki w komorze przepływowej, przez którą przepływa płyn akceptorowy. Substancja aktywna, która została uwolniona z badanej formacji do płynu akceptorowego jest pobierana do osobnego zbiornika w celu analizy ilościowej w określonych odstępach czasowych [74];
- aparat łopatkowy z komorą ekstrakcyjną (typu VanKel) – zbudowany jest z ośmiu szklanych naczyń, głowicy zawierającej mieszała łopatkowe. Naczynia należy wypełnić odpowiednio przygotowanym płynem akceptorowym. Próbkę badanego związku nanosi się do komór teflonowych, na które umieszcza się membranę dializacyjną i zabezpiecza pierścieniem typu O-ring oraz nakrętką. Tak przygotowaną próbkę umieszcza się na dnie naczynia szklanego. Kolejnym krokiem jest dobranie odpowiednich parametrów analizy oraz uruchomienie mieszadeł łopatkowych, które zapewniają homogenność medium. Aparat łopatkowy jest połączony ze spektrofotometrem UV-Vis (ang. ultraviolet-visible). W określonych odstępach czasowych dokonywany jest pomiar ilościowy uwolnionej substancji aktywnej z płynu akceptorowego [75].

Na efektywność dyfuzji substancji aktywnych przez membrany imitujące naskórek, błonę śluzową jamy ustnej, dziąsło mają wpływ następujące czynniki:

- rodzaj membrany – prawidłowo dobrana membrana do analizy powinna być porowata, mieć najmniejszą grubość oraz obojętność w stosunku do badanej formacji farmaceutycznej i płynu akceptorowego, jej zadaniem jest odizolowanie badanej formacji od płynu akceptorowego, w badaniach efektywności uwalniania substancji aktywnych najczęściej stosuje się membrany oparte na polimerach naturalnych (pochodnych celulozy) oraz syntetycznych (poliamidzie, poliwęglanie, polipropylenie, silikonach) [76, 77].
- płyn akceptorowy (inaczej medium) - to ciecz, w której zachodzi dyfuzja aktywnego związku z badanej formacji, prawidłowo dobrany powinien odzwierciedlać warunki badanego środowiska, a w szczególności:

- ✓ pH, którego wartość w zdrowej jamie ustnej wynosi między 6 a 7 oraz powinien być dobrym rozpuszczalnikiem dla badanej substancji aktywnej [76, 78].
- temperatura przeprowadzania analizy – w tego typu badaniach powinna mieścić się w przedziale 32°C – 37°C, dokładna wartość temperatury medium powinna wynosić tyle ile w warunkach fizjologicznych [79].

## 2.5. Błona śluzowa jamy ustnej

Błona śluzowa wyściela jamę ustną, która jest początkowym odcinkiem układu pokarmowego i oddechowego. Jest odpowiedzialna za odporność nieswoistą w obrębie jamy ustnej. Zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej są bardzo często pierwszym symptomem wielu chorób ostrych i przewlekłych [80].

### 2.5.1. Budowa błony śluzowej jamy ustnej

Błona śluzowa jamy ustnej zbudowana jest z czterech elementów:

#### 1. nabłonka jamy ustnej – który tworzą warstwy:

- podstawna – znajduje się bezpośrednio przy blaszce właściwej błony śluzowej, zbudowana z pojedynczej warstwy komórek z wydłużonym jądrem o kształcie walca, odpowiada za powstanie komórek nabłonka, znajdują się w niej również melanocyty, wytwarzające melaninę;
- kolczysta - zbudowana z komórek we wczesnym stadium dojrzewania, wielobocznych;
- rogowa – komórki w tej warstwie są najbardziej zróżnicowane, zazwyczaj zawierają jądro, ulegają złuszczeniu na powierzchni zewnętrznej warstwy nabłonka;
- ziarnista – dodatkowa warstwa występująca pomiędzy warstwą kolczystą a rogową, zawiera ziarna keratohialiny, które są odpowiedzialne za proces rogowacenia oraz powodują nieprzezroczystość nabłonka [80, 81]

#### 2. błony podstawnej;

#### 3. blaszki właściwej – zbudowana jest komórek tkanki łącznej (fibroblasty, fibrocyty, limfocyty, komórki plazmatyczne) oraz z elementów włóknistych (włókna klejodajne, nieliczne włókna elastyczne). Brodawki blaszki właściwej wpuklają się w obręb nabłonka, który tworzy sople

różnej długości, najdłuższe w okolicy dziąsła, najkrótsze w obrębie dna jamy ustnej;

4. **blony podśluzowej** – znajduje się ona na pograniczu blaszki właściwej błony śluzowej i warstwą mięśni i okostnej, zbudowana przede wszystkim z tkanki łącznej wiotkiej zawiera również gruczoły surowiczo-śluzowe, spłoty naczyń krwionośnych i chłonnych oraz tkankę tłuszczową. Niektóre części jamy ustnej są pozbawione błony podśluzowej, są to między innymi: dziąsła, podniebienie twarde (poza częścią tłuszczową i gruczołową) oraz język na powierzchni grzbietowej [80 - 83].

## 2.5.2. Funkcje błony śluzowej jamy ustnej

Błona śluzowa bez zmian patologicznych jest gładka oraz lśniąca. W zależności od rasy może przybierać zabarwienie od bladoróżowego do brunatnego.

Do podstawowych funkcji błony śluzowej jamy ustnej należy:

- funkcja osłaniająca, którą zapewnia ciągła odnowa nabłonka poprzez złuszczenie się wraz ze znajdującymi się bakteriami na jego powierzchni; przed urazami mechanicznymi chronią obecne w błonie śluzowej włókna sprężyste i klejodajne;
- funkcja obronna jest zapewniona przez ślinę, która usuwa z powierzchni błony śluzowej bakterie, ponadto zawarte w ślinie składniki zapewniają właściwości bakteriobójcze oraz bakteriostatyczne; przed szkodliwymi substancjami oraz urazami chronią błonę: narząd smaku, dotyku oraz bólu;
- funkcja smakowa związana jest z rozmieszczonymi w całej jamie ustnej kubkami smakowymi, największa ilość kubków smakowych znajduje się na języku w brodawkach: okolonych, liściastych, grzybowatych;
- funkcja wchłaniania jest możliwa dzięki obecności dużej ilości naczyń krwionośnych oraz cienkiego nabłonka; najlepsze wchłanianie obserwuje się na dnie jamy ustnej oraz na dolnej powierzchni języka;
- funkcja czuciowa, związana z receptorami: dotyku, bólu, ciepła zlokalizowanymi w całej jamie ustnej;
- funkcja wydzielnicza możliwa dzięki rozmieszczonym w całej jamie ustnej gruczołom ślinowym, które wydzielając ślinę chronią błonę śluzową przed wysuszeniem [80 - 83].

### **2.5.3. Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej**

Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej to proces zapalny, który zajmuje większość lub całą powierzchnię błony śluzowej jamy ustnej oraz warg. Ból, który towarzyszy zapaleniu bardzo często uniemożliwia przyjmowanie pokarmów, a nawet płynów, przez co jest bardzo uciążliwy dla pacjenta. Zmiany pojawiające się na błonie śluzowej jamy ustnej mogą przybierać różny wygląd, a ich występowanie może sugerować pojawienie się podobnych zmian w obrębie błony śluzowej całego układu pokarmowego [80, 81, 84].

Istnieje wiele czynników zarówno miejscowych jak i ogólnoustrojowych, mających wpływ na stan błony śluzowej jamy ustnej.

Wśród czynników miejscowych wymienić można: bakterie występujące w ubytkach próchnicowych lub w kieszonkach przyzębnych, zwiększone bądź zmniejszone wydzielanie śliny, zmianę składu śliny, obniżenie pH jamy ustnej, czynniki termiczne, rodzaj spożywanych pokarmów oraz płynów, używki (papierosy, alkohol, narkotyki, dopalacze), czynniki mechaniczne (przygryzanie błony śluzowej policzków w wyniku wad zgryzu, źle wypolerowanego wypełnienia, nieodpowiednio dopasowanej protezy) oraz prądy elektrogalwaniczne, które mogą powstać w wyniku występowania różnego rodzaju metali w uzupełnieniach protetycznych czy też w wypełnieniach amalgamatowych [80, 81, 85, 86].

Z kolei do czynników ogólnoustrojowych mających wpływ na stan błony śluzowej jamy ustnej zaliczamy: niedobory witamin oraz mikro- i makroelementów, skutki działania niektórych leków, obniżoną odporność nabytą lub wrodzoną, zaburzenia hormonalne, cukrzycę, choroby z autoagresji (twardzina, toczeń rumieniowaty układowy i skórny, zespół Sjogrena, pęcherzyca, pemfigoid) oraz choroby nowotworowe [87, 88].

### 3. Cel pracy

Wzrastająca liczba przypadków nowotworów jamy ustnej, konsumpcja alkoholu oraz używek, palenie tytoniu oraz cytotoksyczność niektórych syntetycznych produktów do codziennej higieny jamy ustnej skłaniają do poszukiwania naturalnych sposobów ochrony błony śluzowej jamy ustnej. Trend ten jest również wpisany w rosnącą świadomość konieczności ochrony środowiska naturalnego. Dynamiczny rozwój przemysłu farmakologicznego stwarza możliwość opracowywania innowacyjnych receptur pozwalających wykorzystywać naturalne substancje aktywne.

Głównym celem badania było opracowanie metody podania i analiza skuteczności preparatu zawierającego galusan epigallokatechiny oraz badanie przenikania nowo otrzymanego preparatu przez błonę śluzową jamy ustnej.

#### **Cele główne:**

1. Czy EGCG przenika przez barierę imitującą błonę śluzową jamy ustnej?
2. Ocena uwalniania EGCG z nanocząstek w zależności od stężenia.

#### **Cele pośrednie:**

1. Otrzymanie nanocząstek lipidowych inkorporowanych EGCG.
2. Analiza parametrów fizykochemicznych EGCG.
3. Analiza stabilności przygotowanego preparatu zawierających EGCG.
4. Analiza właściwości antyoksydacyjnych EGCG.
5. Opracowanie metodyki badań *in vitro* uwalniania EGCG z przygotowanej formuacji wraz z oceną kinetyki ich przenikania przez bariery imitujące błonę śluzową jamy ustnej.

## **4. Materiał i metody**

### **4.1. Spektrometria mas ESI-MS standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty**

Pomiar z zastosowaniem spektrometrii mas ESI-MS, zarówno w trybie jonów ujemnych jak i dodatnich (w zakresie od 100-500 m/z) przeprowadzono celem potwierdzenia obecności EGCG w standaryzowanym ekstrakcie z zielonej herbaty (ekstrakt z liści zielonej herbaty 240 mg, w tym zawartość EGCG 216 mg, Sunphenon, Taiyo Kagaku Co., Ltd. Japan). Pomiaru dokonano z zastosowaniem spektrometru mas Waters/Micromass (Manchester, Wielka Brytania).

### **4.2. Optymalizacja parametrów syntezy stałych nanocząstek lipidowych typu SLN inkorporowanych EGCG**

#### **4.2.1. Materiały**

W badaniach użyto następujące składniki:

- Lipid stały - Precirol ATO 5, distearynian glicerolu, typ I EP, producent Gattefossé, Hiszpania
- Związek powierzchniowo czynny - Polisorbant 60, Tween 60, monostearynian polioksyetylenosorbitolu, Sigma Aldrich, Polska
- Standaryzowany ekstrakt z liści zielonej herbaty 240 mg, w tym zawartość EGCG 216 mg, Sunphenon, Taiyo Kagaku Co., Ltd. Japan
- Kwas galusowy który powstał w wyniku rozkładu EGCG
- Woda wysoce demineralizowana, temperatura pokojowa

Wszystkie odczynniki były analitycznie czyste i zostały użyte bez dalszej obróbki.

## 4.2.2. Oznaczenie materiałów zsyntezowanych w pracy

### N\_SLN\_UT\_HPH\_P\_T\_SA

gdzie,

N - numer próbki

SLN – typ nanocząstek lipidowych

UT\_ homogenizacja wysokoobrotowa

HPH – homogenizacja wysokociśnieniowa

P - ciśnienie homogenizacji wysokociśnieniowej [bar]

T – czas homogenizacji [s]

SA – substancja aktywna

*Tab. 2. Oznaczenie materiałów zsyntezowanych w pracy.*

|                                |                                                                                  |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1_SLN_UT_HPH_300 bar</b>    | „puste” SLN – homogenizacja wstępna oraz homogenizacja wysokociśnieniowa 300 bar |
| <b>2_UT_30s_ kwas galusowy</b> | Homogenizacja wysokoobrotowa (Ultraturax), 30 sek., z kwasem galusowym           |
| <b>3_UT_30s_ EGCG</b>          | Homogenizacja wysokoobrotowa (Ultraturax), 30 sek., z EGCG                       |
| <b>4_UT_30s</b>                | Homogenizacja wysokoobrotowa (Ultraturax), 30 sek.                               |
| <b>5_UT_60s_ EGCG</b>          | Homogenizacja wysokoobrotowa (Ultraturax), 60 sek., Z EGCG                       |

### **4.2.3. Synteza stałych nanocząstek lipidowych typu SLN z wykorzystaniem homogenizatora wysokociśnieniowego**

#### **4.2.3.1. Synteza „pustych” stałych nanocząstek lipidowych typu SLN**

„Puste” stałe nanocząstki lipidowe (SLN) otrzymano poprzez przygotowanie dwóch faz: fazy lipidowej stanowiącej Precirol ATO 5 w ilości 1,00g (2,00% wag.) oraz wodnej, którą stanowił roztwór związku powierzchniowo czynnego, zawierający 0,62g (1,25% wag.) Tween 60 oraz 48,37 ml (96,75% wag.) wody destylowanej. Oby dwie fazy podgrzano do tej samej temperatury, około 80°C, zmieszano ze sobą i następnie poddano homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco pod ciśnieniem 300 barów (homogenizator Panda Plus 2000 GEA, Polska, Ryc. 3).

Ponadto, w trakcie syntezy „pustych” stałych nanocząstek lipidowych modyfikowano następujące parametry procesu: ciśnienie homogenizacji wysokociśnieniowej (300, 400 barów) oraz zastosowanie homogenizacji wstępnej z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego UltraTurax, co opisano poniżej.

#### **4.2.3.2. Synteza „pustych” stałych nanocząstek lipidowych typu SLN z zastosowaniem homogenizacji wstępnej (homogenizator wysokoobrotowy UltraTurax) oraz homogenizatora wysokociśnieniowego (ciśnienie 300 barów)**

Przygotowaną w punkcie 4.2.3.1 preemulsję poddano homogenizacji wstępnej za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego UltraTurax® T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801, Dottingen, Niemcy) (Ryc.4) przy prędkości 10 000 rpm, w czasie 20 sekund. Dzięki temu wszystkie składniki zostały poddane silnemu działaniu sił tnących, co w rezultacie doprowadziło do dokładnego wymieszania emulsji. Następnie zastosowano metodę wysokociśnieniowej homogenizacji na gorąco prowadzonej w 3

cyklach przy pomocy homogenizatora Panda Plus 2000 GEA (Ryc. 3), każdy pod ciśnieniem 300 barów oraz w temperaturze utrzymanej w granicach 80°C.



*Ryc 3. Homogenizator Panda Plus 2000 GEA.*



*Ryc.4. Homogenizator wysokooobrotowy UltraTurax® T25 Digital.*

#### **4.2.3.3. Synteza „pustych” stałych nanocząstek lipidowych typu SLN z zastosowaniem homogenizacji wstępnej (homogenizator wysokooobrotowy UltraTurax) oraz homogenizatora wysokociśnieniowego (ciśnienie 400 barów)**

Postępowano analogicznie, jak w punkcie 4.1.3.2 z pominięciem etapu homogenizacji wstępnej. Następnie zastosowano metodę wysokociśnieniowej homogenizacji na gorąco prowadzonej w 3 cyklach, każdy pod ciśnieniem 400 barów oraz w temperaturze utrzymanej w granicach 80°C.

#### **4.2.3.4. Synteza stałych nanocząstek lipidowych typu SLN inkorporowanych EGCG**

Stałe nanocząstki lipidowe (SLN) inkorporowane EGCG otrzymano poprzez przygotowanie dwóch faz: fazy lipidowej stanowiącej Precirol ATO 5 w ilości 1,00 g (2,00% wag.) i EGCG (0,50 g, 1,00% wag.) oraz wodnej, którą stanowił roztwór związku powierzchniowo czynnego, zawierający 0,62 g (1,25% wag.) Tween 60 oraz 47,87 ml (95,75% wag.) wody destylowanej. Oby dwie fazy podgrzano do tej samej temperatury, tj. około 80 °C, zmieszano ze sobą i następnie poddano homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco pod ciśnieniem 300 barów (homogenizator Panda Plus 2000 GEA, Polska, Ryc. 3).

W trakcie prowadzenia procesu syntezy stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych EGCG z zastosowaniem homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco okazało się, że nie będzie on możliwy do zrealizowania w/w metodą z powodu ograniczeń aparaturowych.

#### **4.2.4. Synteza „pustych” stałych nanocząstek lipidowych typu SLN oraz inkorporowanych EGCG lub kwasem galusowym z zastosowaniem homogenizacji wysokoobrotowej**

Ostateczną procedurę syntezy stałych nanocząstek lipidowych typu SLN opracowano na podstawie publikacji [89]. Procedura ta przebiegała następująco: przygotowano dwie fazy: lipidową, którą stanowił Precirol ATO 5 2,16 g (9,00% wag.) oraz związek powierzchniowo czynny Tween 60 w ilości 0,50 g (2,10% wag.). Fazę wodną stanowiła substancja aktywna (EGCG lub kwas galusowy) 0,24 g (1,00% wag.) oraz woda wysoce demineralizowana 21,12 g (87,90% wag.). Oby dwie fazy ogrzewano do temperatury 75 °C, cały czas mieszając.

Po osiągnięciu żądanej temperatury fazę lipidową zdyspergowano w fazie wodnej. Otrzymaną preemulsję poddano po chwili homogenizacji z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego UltraTurax® T25 Digital Homogenizer (Jahnke & Kunkel, Niemcy) (Ryc. 4) przy prędkości 10 000 rpm w czasie 30 oraz 60 sekund, w celu zmniejszenia średnicy otrzymanych nanocząstek lipidowych.

W tabeli 3 przedstawiono ilości związków zastosowanych do syntezy stałych nanocząstek lipidowych.

*Tab.3. Ilość użytych związków do otrzymania stałych nanocząstek lipidowych.*

| Oznaczenie próbki         | Preciro I ATO 5 (mg) | Tween 60 (mg) | Woda wysoce demineralizowana(ml) | EGC G (mg) | Kwas galusowy (mg) |
|---------------------------|----------------------|---------------|----------------------------------|------------|--------------------|
| UT_60s_EGCG               | 2350,00              | 500,00        | 22,00                            | 150,00     | -                  |
| 3_UT_30s_EGC<br>G         | 2160,00              | 500,00        | 21,12                            | 240,00     | -                  |
| 4_UT_30s                  | 2160,00              | 500,00        | 21,12                            | -          | -                  |
| 2_UT_30s_kwas<br>galusowy | 2160,00              | 500,00        | 21,12                            | -          | 240,00             |
| 5_UT_60s_EGC<br>G         | 2160,00              | 500,00        | 21,12                            | 240,00     | -                  |

### 4.3. Charakterystyka fizykochemiczna stałych nanocząstek lipidowych

#### 4.3.1. Pomiary potencjału zeta i wielkości cząstek

Pomiaru potencjału zeta (ang. Zeta Potential, ZP) dokonano za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) (Ryc.5). Przed wykonaniem każdego pomiaru, rozcieńczono 100-krotnie w wodzie wysoce

demineralizowanej otrzymane próbki stałych nanocząstek lipidowych (SLN). Następnie za pomocą strzykawki przenoszono odpowiednio przygotowaną próbkę do U-kształtnej celki kapilarnej (DTS1070), tak aby nie powstały pęcherzyki powietrza, gdyż to mogłoby zakłócić wyniki pomiarowe. Po szczelnym zamknięciu umieszczano celkę w komorze pomiarowej urządzenia. Wartość ZP dla każdej próbki była mierzona trzy razy.



*Ryc.5. Zetasizer Nano ZS.*

Rozkład średniej wielkości cząstek określono metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS), stosując Zetasizer Nano ZS, (Malvern). Pomiary DLS przeprowadzono w świetle rozproszonym pod kątem  $173^\circ$ , a temperatura pomiaru wynosiła  $25^\circ\text{C}$ . Wszystkie próbki rozcieńczono w wodzie dejonizowanej do odpowiedniej intensywności rozproszenia przed pomiarem. Otrzymane próbki do analizy badano po 1, 2, 9, 14, 30 dniu licząc od pierwszego dnia syntezy.

### **4.3.2. Badanie zdolności antyoksydacyjnej EGCG przy użyciu TPTZ – metoda FRAP**

W celu oznaczenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej EGCG w oparciu o redukcję jonów żelaza (III) przygotowano następujące roztwory:

- Roztwór TPTZ – odważono 31,24 mg 2,4,6- tripirydylo-S-triazymy, następnie wsypano do kolby miarowej o pojemności 100 ml, owiniętej folią aluminiową i uzupełniono 0,005 M HCl do współmierności.
- 3Mm roztwór  $\text{FeCl}_3$  w 5Mm kwasie chlorowodorowym odważono 20,30 mg  $\text{FeCl}_3$ , a następnie wsypano do kolby miarowej o pojemności 25 ml, owiniętej w folię aluminiową i uzupełniono 5mM HCl do współmierności. Należy pamiętać, aby ten roztwór przygotować ten roztwór na ok. 2 godziny przed wykonywaniem pomiaru.
- Odczynnik FRAP – otrzymano przez zmieszanie 0,90 ml TPTZ oraz 0,05 ml  $\text{FeCl}_3$ . Otrzymany roztwór ogrzewano w łaźni wodnej do temperatury  $37^\circ\text{C}$  i wykorzystano do oznaczania właściwości antyoksydacyjnych EGCG.
- acetonowe roztwory EGCG – 0,01 ml nanocząstek o stężeniach 1,00%, 2,00% oraz 5,00% wag. dodawano do 0,04 ml acetonu.

Następnie do przygotowanych roztworów acetonowych EGCG dodawano 0,95 ml odczynnika FRAP i inkubowano przez 30 minut w  $37^\circ\text{C}$  w łaźni wodnej. Po tym czasie powinna nastąpić wyraźna zmiana barwy roztworu na niebieski. Niestety nie zaobserwowano charakterystycznej zmiany barwy.

### **4.3.3. Badanie zdolności antyoksydacyjnej EGCG przy użyciu DPPH**

W celu zbadania aktywności antyoksydacyjnej EGCG przygotowano:

- roztwór DPPH• - odważono 3,94 mg rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu, i rozpuszczono go w 130,00 ml etanolu (Stanlab). W chwili, gdy rodnik uległ całkowitemu rozpuszczeniu w etanolu wykonano pomiar widma UV-Vis, a następnie odczytano długość fali, przy której absorbancja roztworu była największa ( $\lambda_{\text{max}}$ ), tj.  $\sim 517\text{nm}$
- etanolowe roztwory: 1,00 mg czystego EGCG rozpuszczono w 10,00 ml etanolu; 1,00 mg nanocząstek o stężeniach 1,00%, 2,00% oraz 5,00% wag. dodawano do 10 ml etanolu. Podobnie, jak w przypadku roztworu rodnika zmierzono wartość  $\lambda_{\text{max}}$  etanolowych roztworów EGCG.

Następnie w kwarcowej kuwecie umieszczono 1,50 ml roztworu DPPH• oraz 1,50 ml roztworu badanego EGCG. Tak przygotowaną próbkę poddano pomiarom absorbancji przy pomocy spektrofotometru UV-Vis Cary 50 Bio (Varian, Stany Zjednoczone) (Ryc.6). Badania prowadzono co minutę przez 5 minut, a następnie po 10, 15, 20, 25, 45 oraz 60 minutach od momentu zmieszania roztworów badanej substancji oraz rodnika DPPH•. Wyniki badań potencjału antyoksydacyjnego EGCG przedstawiono za pomocą procentu wygaszania wolnego rodnika DPPH• obliczonego według równania 1 :

$$I = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \%$$

***Równanie 1. Wzór umożliwiający obliczenie procentu wygaszania wolnego rodnika DPPH•.***

gdzie:

I - % Inhibicji, zdolność do „zamiatania wolnych rodników”

A<sub>0</sub> - absorbancja roztworu rodnika DPPH• (j.u.),

A<sub>1</sub> - absorbancja roztworu rodnika DPPH• po dodaniu badanej substancji (j.u.).



***Ryc. 6. Spektrofotometr UV-Vis Cary 50 Bio.***

## 4.4. Badanie kinetyki uwalniania EGCG z hydrożelu

Badanie kinetyki uwalniania EGCG z otrzymanych formułacji dokonano za pomocą aparatu łożatkowego 708-DS (Agilent Technologies Inc) (Ryc.7) w połączeniu z spektrofotometrem UV-Vis.



*Ryc.7. Aparat dyfuzyjny 708-DS wraz z spektrofotometrem UV-Vis.*

### 4.4.1. Membrana dializacyjna

Do badań zastosowano ultracienką membranę o nazwie Cuprophan, której grubość wynosi 7-17  $\mu\text{m}$ , natomiast wartości obciążenia 7-17 kDa. Wykonana jest z naturalnego polimeru, który jest specjalnym typem celulozy. Jej zaletą jest niskie ryzyko perforacji, ponieważ materiał z którego została wykonana cechuje się wysoką sprężystością. Na kilka godzin przed każdorazowym rozpoczęciem analizy kondycjonowano membrany w roztworze akceptorowym.

### **4.4.2. Preparatyka płynu akceptorowego**

W celu przygotowania płynu akceptorowego, którym jest bufor fosforanowy, należy najpierw przyrządzić roztwory:

- W pierwszej kolbie miarowej należy odważyć 17,63 g diwodorofosforanu(V) potasu ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a następnie dodać 1000,00 ml wody demineralizowanej i rozpuścić dodaną wodorosól.
- W drugiej kolbie rozpuścić 4,07 g wodorotlenku sodu ( $\text{NaOH}$ ) w 1000,00 ml wody demineralizowanej.

Następnie należy pobrać 732,00 ml roztworu  $\text{NaOH}$  i dodać do przygotowanego wcześniej roztworu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Po dokładnym zmieszaniu składników buforu zmierzono jego wartość pH, która wyniosła 5,8.

### **4.4.3. Preparatyka hydrożelu zawierającego stałe nanocząstki lipidowe inkorporowane EGCG**

Do szklanej zlewki odważono glicerol (10,00% wag., Chempur) oraz wodę demineralizowaną (86,80% wag.), następnie umieszczono ją w łaźni wodnej i ogrzewano do temperatury 80°C. Następnie stopniowo dodawano hydroksycelulozę (2,50% wag, Sigma Aldrich), cały czas intensywnie mieszając za pomocą szklanej bagietki, aż do uzyskania konsystencji żelu. Gdy temperatura układu spadła do 40 °C dodano Microcare® SB (0,20% wag., Thor GmbH) i mieszano przez 5 minut. Przygotowano 4 zlewki, w których odważono równe ilości otrzymanego hydrożelu oraz stałe nanocząstki lipidowe zawierające substancję aktywną (EGCG) w ilościach przedstawionych w tabeli 4, w temperaturze poniżej 30 °C, cały czas mieszając przez kolejne 10 minut w celu ustabilizowania uzyskanej konsystencji.

**Tab. 4. Przygotowanie formulacji hydrożelu z różną zawartością EGCG.**

| Nazwa próbki                   | Ilość substancji aktywnej [g] | Ilość hydrożelu [g] |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| <b>5_UT_60s_EGCG_1,00%wag.</b> | 0,02                          | 1,50                |
| <b>5_UT_60s_EGCG_2,00%wag.</b> | 0,05                          | 1,50                |
| <b>5_UT_60s_EGCG_5,00%wag.</b> | 0,08                          | 1,50                |
| <b>Czysty EGCG</b>             | 0,02                          | 1,50                |

#### 4.4.4. Przygotowanie próbek

Odważono odpowiednie ilości hydrożelu oraz SLN z EGCG co zostało przedstawione dokładnie w powyższej tabeli (tab.4). Następnie dokładnie wymieszano hydrożel z dodanymi stałymi nanocząstkami lipidowymi inkorporowanymi EGCG i umieszczono w 5 niezależnych komorach ekstrakcyjnych. Odważono 1,00g badanej formulacji z SLN inkorporowanymi EGCG, a następnie umieszczono ją w teflonowej komorze ekstrakcyjnej (Ryc.8.). Nałożony preparat wygładzono na powierzchni, a następnie nałożono membranę dializacyjną o kształcie koła, która została dopasowana do komory ekstrakcyjnej. Na całość założono pierścień typu O-ring oraz zakrętkę, którą zakręcono w celu unieruchomienia preparatu i membrany. W podobny sposób przygotowano także próbę odniesienia formulacji, która nie zawierała substancji aktywnej. Sporządzony hydrożel, będący bazą do aplikacji leku nie powinien uwalniać żadnych substancji absorbujących promieniowanie w tym samym zakresie fal, co badany EGCG. Wpływ na uwalnianie substancji aktywnej będą miały nawet niewielkie sygnały pochodzące od bazy, dlatego tak ważne jest dobranie odpowiedniej bazy i wykonanie ślepej próby. Teflon, z którego wykonane są wszystkie elementy komory ekstrakcyjnej jest chemicznie bierny względem badanych formulacji, jak również roztworu akceptorowego, w którym prowadzone są badania [90].



*Ryc. 8. Teflonowe komory ekstrakcyjne przed nałożeniem hydrożelu z SLN inkorporowanego EGCG.*

#### **4.4.5. Budowa i przygotowanie aparatury do badania kinetyki uwalniania EGCG ze stałych nanocząstek lipidowych**

Wykorzystany do badań aparat dyfuzyjny 708-DS (Agilent Technologies, CA, Stany Zjednoczone) (Ryc.7.) jest zbudowany z: łaźni wodnej, termostatu w celu utrzymywania stałej temperatury wody znajdującej się w łaźni, ruchomej głowicy, której elementem są mieszadła wykonane ze stali nierdzewnej, 8 szklanych naczyń o pojemności 200,00 mL. Mieszadła w trakcie pomiaru wykonują ruch obrotowy, co powoduje jednorodność medium na całej wysokości naczynia. Aparat dyfuzyjny jest połączony z spektrofotometrem UV-Vis.

Ilość uwolnionej substancji obliczano w oparciu o pomiar zmian absorbancji w czasie zgodnie z prawem Lamberta-Beera, równanie 2 :

$$A = \varepsilon \times C \times l,$$

*Równanie 2. II prawo Lamberta –Beera.*

gdzie: A - absorbancja (j.u.),

$\epsilon$  - molowy współczynnik absorpcji (L /mol  $\times$  cm),

C - stężenie (mol/L),

l - grubość warstwy absorbującej (cm).

Płyn akceptorowy wprowadzono do pięciu szklanych naczyń, a następnie umieszczono wcześniej przygotowane komory ekstrakcyjne z badanym preparatem. Pozostałe naczynia wypełniono płynem akceptorowym. Badanie przeprowadzano w warunkach pomiarowych określonych w tabeli 5. Dla każdej z badanych próbek procedurę powtórzono trzykrotnie.

W tabeli 5 przedstawiono wartości parametrów badania kinetyki uwalniania EGCG z SLN.

*Tab. 5. Wartości parametrów pomiaru badania uwalniania EGCG.*

| Parametry pomiaru                                            | Wartość parametru |
|--------------------------------------------------------------|-------------------|
| Temperatura łaźni wodnej                                     | 36,6°C            |
| Prędkość obrotowa łopatek                                    | 100 obr/min.      |
| Czas trwania badania                                         | 48 h              |
| Interwał czasowy do pobierania próbek do analizy spektralnej | 30 min            |

Procent uwolnienia substancji z przygotowanych formułacji obliczono w oparciu o następujące równanie 3:

$$\% \text{ uwolnienia} = \left( \frac{A_p}{A_w} \right) \left( \frac{m_w * P_w}{V_w} \right) \left( \frac{1}{D_w} \right) \left( \frac{V_p}{m_p} \right) * 100\%$$

*Równanie 3. Wzór umożliwiający obliczenie procentu uwalniania substancji aktywnej.*

gdzie:

$A_p$  - absorbancja próbki (j.u.),

$A_w$  - absorbancja wzorca (j.u.),

$m_w$  - masa wzorca (mg),

$V_w$  - objętość roztworu wzorcowego (mL),

$P_w$  - czystość wzorca,

$D_w$  - rozcieńczenie wzorca,

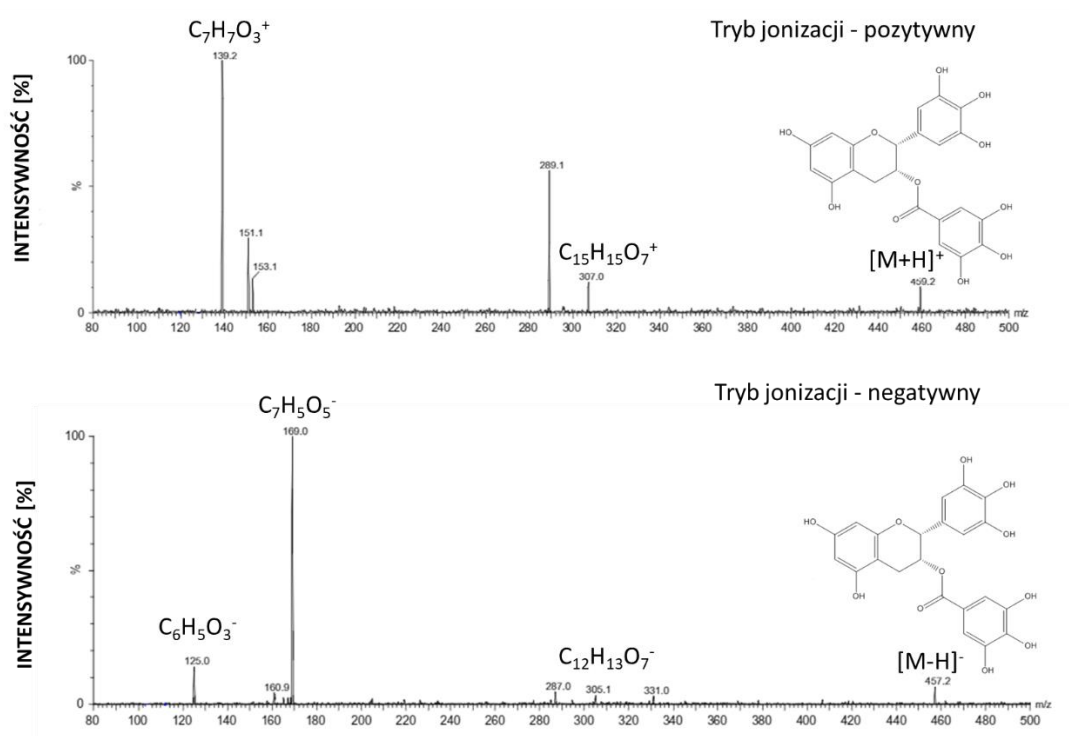
$m_p$  - masa substancji oznaczanej zawartej w próbce (mg),

$V_p$  - objętość medium (mL)

## 5. Prezentacja wyników

### 5.1. Spektrometria mas ESI-MS standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty

Na Ryc. 9 przedstawiono widmo ESI-MS standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty.



**Ryc. 9. Widmo ESI-MS standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty, tryb jonizacji: pozytywny oraz negatywny.**

Na widmie ESI-MS, w trybie jonów ujemnych, zaobserwowano jon  $m/z$  125, który przypisano dla 1,2,3-trihydroksybenzenu ( $C_6H_5O_3^-$ ), następnie jon  $m/z$  169 odpowiadający zdeprotonowanemu jonowi kwasu galusowego ( $C_7H_5O_5^-$ ) oraz jon  $m/z$  331 odpowiadający  $C_{12}H_{13}O_7^-$  (EGC, galusan epikatechiny). Z kolei Jon  $m/z$  457 przypisano dla cząsteczki EGCG  $[M-H]^-$ . Na podstawie analizy ESI-MS przeprowadzonej w trybie jonów dodatnich, dokonano analogicznego dopasowania

jonów, jak w przypadku jonizacji w trybie jonów ujemnych. Potwierdzono tym samym obecność EGCG w standaryzowanym ekstrakcie z zielonej herbaty.

## **5.2. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych SLN inkorporowanych EGCG**

W przypadku stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych EGCG przeanalizowano ocenę stabilności, która obejmowała: ocenę zmian potencjału zeta (ZP), wartości wskaźnika polidispersyjności (Pdl) oraz średniej wielkości cząstek (Z-Ave), oznaczanych dla badanych dyspersji, przechowywanych przez wymagany okres 30 dni, w jednakowej temperaturze.

### **5.2.1. Pomiar potencjału ZETA dla otrzymanych nanocząstek lipidowych**

Potencjał zeta, mierzono za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS, gdzie stosowana jest technika elektroforetycznego rozpraszania światła (ang. Electrophoretic Light Scattering, ELS), zwana również spektroskopią przesunięcia Dopplera (ang. Doppler Shift Spectroscopy) [91].

Badaną próbkę uznaje się za stabilną, gdy wartość bezwzględna potencjału zeta jest większa od  $|\pm 30 \text{ mV}|$ . Cząstki zbliżając się do siebie wzajemnie są poddawane siłom: odpychania (elektrostatyczna) oraz przyciągania (Van der Waalsa), zaś stabilność zawiesiny cząstek jest wypadkową sumy tych sił [92]. Aby zapobiec agregacji oraz wystąpieniu procesu flokulacji, musi dojść do odpychania pomiędzy cząstkami zawiesiny. Gdy dane zjawisko nie zachodzi, wówczas siły przyciągania wywołają agregację, a następnie koagulację cząstek [93, 94]. W tabeli 6 przedstawiono wyniki pomiaru potencjału Zeta dla badanych próbek.

Tab. 6. Wyniki pomiaru potencjału Zeta dla badanych próbek [jednostki dla wszystkich danych – mV].

| SLN_HPH_300bar         |                |
|------------------------|----------------|
| Dzień syntezy          | Potencjał [mV] |
| 1                      | 31,1±1,2       |
| 2                      | 28,0±1,2       |
| 5                      | 28,3±1,2       |
| 14                     | 27,8±1,2       |
| 21                     | 29,0±1,2       |
| 28                     | 29,0±1,2       |
| 1_SLN_UT_HPH_300bar    |                |
| 1                      | 30,7±5,3       |
| 2                      | 27,2±5,3       |
| 5                      | 28,0±5,3       |
| 14                     | 28,7±5,3       |
| 21                     | 28,9±5,3       |
| 28                     | 34,2±5,3       |
| SLN_HPH_400bar         |                |
| 1                      | 31,4±1,1       |
| 2                      | 29,2±1,1       |
| 5                      | 28,6±1,1       |
| 14                     | 29,2±1,1       |
| 21                     | 29,7±1,1       |
| 28                     | 31,4±1,1       |
| 3_UT_30s_EGCG          |                |
| 1                      | 43,7±9,4       |
| 2                      | 45,2±9,4       |
| 5                      | 25,4±9,4       |
| 14                     | 22,0±9,4       |
| 28                     | 35,3±9,4       |
| 5_UT_60s_EGCG          |                |
| 1                      | 44,8±5,4       |
| 2                      | 32,5±5,4       |
| 5                      | 42,4±5,4       |
| 14                     | 32,7±5,4       |
| 28                     | 32,5±5,4       |
| 2_UT_30s_kwas galusowy |                |
| 1                      | 47,6±7,3       |
| 2                      | 45,6±7,3       |
| 5                      | 32,7±7,3       |
| 14                     | 31,5±7,3       |
| 4_UT_30s               |                |
| 1                      | 28,6±2,1       |
| 2                      | 25,3±2,1       |
| 7                      | 26,0±2,1       |
| 14                     | 30,3±2,1       |

|                      |                       |
|----------------------|-----------------------|
| 28                   | 30,2±2,1              |
| <b>UT_60s_EGCG</b>   |                       |
| <b>Dzień syntezy</b> | <b>Potencjał [mV]</b> |
| 1                    | 44,1±5,9              |
| 2                    | 54,0±5,9              |
| 5                    | 44,3±5,9              |
| 7                    | 37,7±5,9              |
| 14                   | 38,1±5,9              |

Analizując powyższą tabelę (Tab.6.) stwierdzono, że pozytywny wpływ na wartość ZP, oznaczający spadek wartości ZP z 44,8 do 32,5 mV powoduje zarówno ilość zastosowanego do syntezy SLN EGCG, jak również czas prowadzenia homogenizacji. Uzyskane wyniki dla stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych EGCG porównano z próbką odniesienia tzn. „puste” SLN. W każdym typie homogenizacji pustych SLN, zarówno wysokociśnieniowej jak i wysokoobrotowej obserwujemy mały spadek, a następnie nieznaczny wzrost potencjału Zeta. Wyniki w próbkach: 1\_SLN\_UT\_HPH\_300bar, SLN\_HPH\_300bar, SLN\_HPH\_400bar oraz 4\_UT\_30 są porównywalne. Z kolei, gdy porównamy wyniki ZP dla próbek SLN inkorporowanych EGCG, najlepszy wynik uzyskano w próbce 5\_UT\_60s\_EGCG. Wyniki ZP w 5\_UT\_60s\_EGCG są zadowalające i wynoszą 32,5 mV zarówno w 2, 14 oraz 28 dniu badań co oznacza, że cząstki nie aglomerują i są stabilne. Syntezę tak otrzymanej SLN inkorporowanej EGCG (próbka 5\_UT\_60s\_EGCG) powtórzono, ponieważ wcześniejsze wyniki wahały się w okolicach 40,9 a 49,2 mV, co wskazywało na brak stabilności nanocząstki. Wpływ na tak rozbieżne wyniki mogła mieć temperatura otoczenia podczas której prowadzono syntezę SLN z EGCG.

Podsumowując, istotny wpływ na wartość ZP otrzymanej nanocząstki lipidowej inkorporowanej EGCG ma ilość użytej substancji aktywnej oraz czas trwania homogenizacji. Po 14 dniach badań widać wyraźną stabilizację, brak agregacji w wybranej próbce 5\_UT\_60s\_EGCG.

## 5.2.2. Wyniki pomiaru współczynnika polidispersyjności (PDI)

Współczynnik polidispersyjności (ang. Polydispersity Index, PDI), jest to statystyczny rozrzut masy cząstek, nazywany inaczej stopniem dyspersyjności [95]. Większa wartość stopnia dyspersyjności oznacza większy rozrzut mas, dlatego istotne jest, aby osiągnąć jak najmniejsze wartości PDI, co potwierdzi stabilność otrzymanej nanocząstki lipidowej [96] Wartość PDI powinna mieścić się w granicach 0,00 – 0,30 j.u. W tabeli 7 przedstawiono wartości PDI dla uzyskanych materiałów.

*Tab. 7. Wyniki pomiaru PDI dla badanych próbek.*

| Numer i nazwa próbki   | Dzień badań | Wartość PDI [j.u.] |
|------------------------|-------------|--------------------|
| 1_SLN_UT_HPH_300bar    | 1           | 0,606±0,056        |
|                        | 2           | 0,583±0,056        |
|                        | 9           | 0,474±0,056        |
|                        | 14          | 0,498±0,056        |
|                        | 30          | 0,474±0,056        |
| 2_UT_30s_kwas galusowy | 1           | 1,000±0,194        |
|                        | 2           | 0,797±0,194        |
|                        | 9           | 0,502±0,194        |
|                        | 14          | 0,527±0,194        |
|                        | 30          | 0,545±0,194        |
| 3_UT_30s_EGCG          | 1           | 0,906±0,145        |
|                        | 2           | 0,777±0,145        |
|                        | 9           | 0,650±0,145        |
|                        | 14          | 0,631±0,145        |
|                        | 30          | 0,475±0,145        |
| 4_UT_30s               | 1           | 1,000±0,085        |
|                        | 2           | 0,836±0,085        |
|                        | 9           | 1,000±0,085        |
|                        | 14          | 0,956±0,085        |
|                        | 30          | 0,796±0,085        |
| 5_UT_60s_EGCG          | 1           | 0,613±0,153        |

|  |    |             |
|--|----|-------------|
|  | 2  | 0,600±0,153 |
|  | 9  | 0,295±0,153 |
|  | 14 | 0,308±0,153 |
|  | 30 | 0,279±0,153 |

Analizując wyniki dla otrzymanych nanocząstek lipidowych typu SLN na podstawie powyższej tabeli można stwierdzić, że w badanych próbkach 1\_SLN\_UT\_HPH\_300bar, 2\_UT\_30s\_kwas galusowy, 3\_UT\_30s\_EGCG oraz 5\_UT\_60s\_EGCG obserwuje się spadek wartości PdI w kolejnych dniach badania. Porównując rodzaj prowadzonej homogenizacji dla SLN bez substancji aktywnej lepszą wartość PdI uzyskano w przypadku zastosowania homogenizacji wysokociśnieniowej, poprzedzonej homogenizacją wstępną niż dla homogenizacji wysokoobrotowej. Czas prowadzenia homogenizacji wysokoobrotowej przez 60 sekund obniżał wartości PdI < 0,20 j.u, z kolei, gdy czas ten został obniżony do 30 sekund wartość PdI wzrosła, osiągając wartość > 0,30 j.u. Porównując inkorporowaną substancję aktywną, obserwuje się, że kwas galusowy znacząco zwiększał wartość PdI do nawet 0,70 j.u., natomiast EGCG nieznacznie przekroczył wartość PdI do 0,50 j.u. w przypadku, gdy czas prowadzenia homogenizacji wynosił 30 sekund. 60-sekundowa homogenizacja powodowała, że inkorporowany EGCG miał niższą wartość, która wynosiła 0,30 j.u.

Podsumowując, na wartość PdI w prowadzonych badaniach miały wpływ następujące czynniki: użyta substancja aktywna, rodzaj homogenizacji oraz czas prowadzonej homogenizacji wysokoobrotowej.

### 5.2.3. Średnia wielkość cząstek Z-Ave

W tabeli 8 przedstawiono wartości uzyskane na podstawie pomiaru średniej wielkości cząstek (Z-Ave) dla zsyntetyzowanych materiałów.

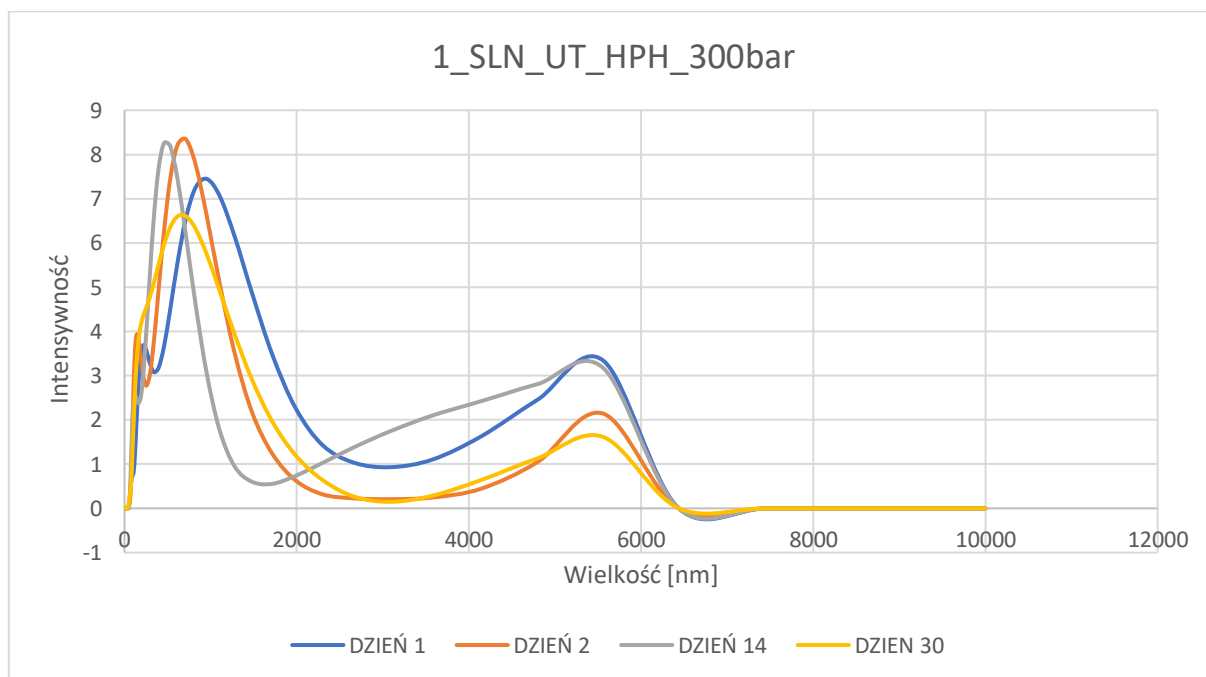
Tab .8. Wyniki pomiaru Z-Ave dla badanych próbek.

| Nazwa próbki           | Dzień badań | Wartość Z-Ave [nm] |
|------------------------|-------------|--------------------|
| 1_SLN_UT_HPH_300bar    | 1           | 542,1±61,7         |
|                        | 2           | 404,2±61,7         |
|                        | 9           | 368,8±61,7         |
|                        | 14          | 411,0±61,7         |
|                        | 30          | 385,0±61,7         |
| 2_UT_30s_kwas galusowy | 1           | 2676,0±836,8       |
|                        | 2           | 1398,0±836,8       |
|                        | 9           | 499,6±836,8        |
|                        | 14          | 309,0±836,8        |
|                        | 30          | 1254,0±836,8       |
| 3_UT_30s_EGCG          | 1           | 2153,0±497,8       |
|                        | 2           | 1371,0±497,8       |
|                        | 9           | 836,8±497,8        |
|                        | 14          | 885,7±497,8        |
|                        | 30          | 923,5±497,8        |
| 4_UT_30s               | 1           | 2350,0±2183,0      |
|                        | 2           | 4181,0±2183,0      |
|                        | 9           | 2318,0±2183,0      |
|                        | 14          | 3961,0±2183,0      |
|                        | 30          | 8301,0±2183,0      |
| 5_UT_60s_EGCG          | 1           | 806,3±241,6        |
|                        | 2           | 351,5±241,6        |
|                        | 9           | 202,2±241,6        |
|                        | 14          | 183,9±241,6        |
|                        | 30          | 164,2±241,6        |

Na podstawie wyników zestawionych w powyższej tabeli zaobserwowano, że wzrost czasu prowadzenia homogenizacji wysokoobrotowej przy użyciu Ultraturaxu,

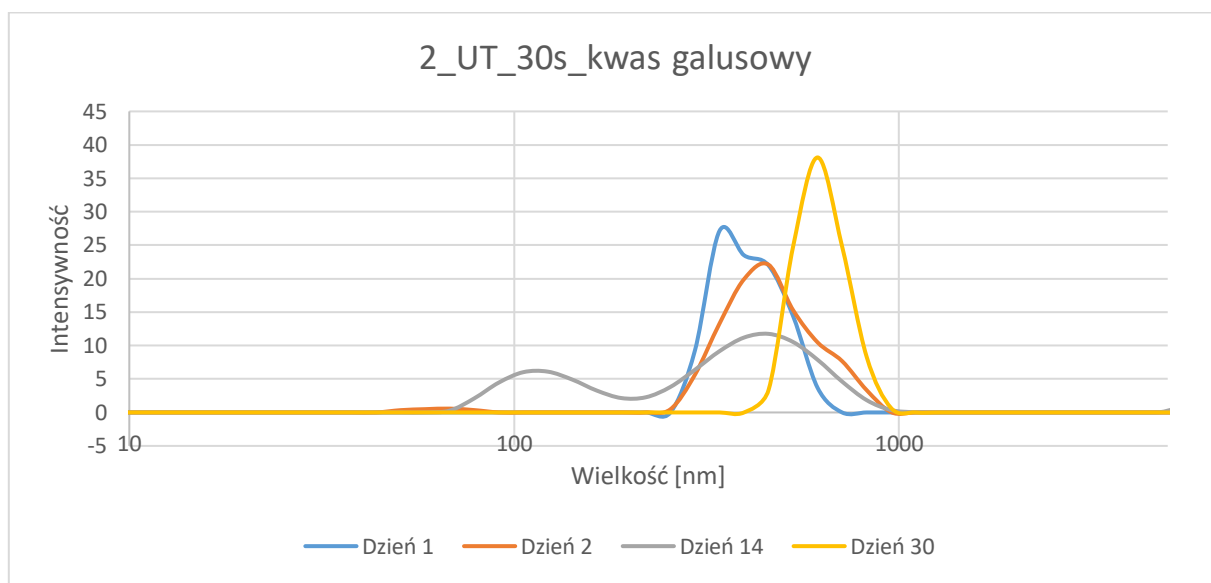
w korzystny sposób wpływa na zmniejszenie rozmiaru otrzymanych nanocząstek lipidowych do wartości poniżej 200 nm (5\_UT\_60s\_EGCG) w porównaniu do nanocząstek lipidowych otrzymanych w krótszym czasie homogenizacji (3\_UT\_30s\_EGCG), gdzie najniższa wartość rozmiaru wynosiła 923,5 nm. W przypadku homogenizacji wysokociśnieniowej, poprzedzonej homogenizacją wstępną wartości Z-Ave (1\_SLN\_UT\_HPH\_300bar) wynosiły ok. 400 nm, natomiast w przypadku homogenizacji przy użyciu Ultraturaxu (4\_UT\_30s) nanocząstki były bardzo dużych rozmiarów, a ponadto zaobserwowano wzrost średniej wielkości cząstek w kolejnych dniach pomiaru, co może świadczyć o aglomeracji cząstek. W 30 dniu pomiaru nanocząstki te miały wielkość równą 8301 nm, zależność ta spowodowana jest najprawdopodobniej zwiększeniem lepkości otrzymanej nanodyspersji, w rezultacie nastąpił wzrost napięcia powierzchniowego, który z kolei mógł przyczynić się do aglomeracji cząstek, wpływając ostatecznie na wartość Z-Ave [97]. Podobną sytuację zaobserwowano w próbce 2\_UT\_30s\_kwas galusowy, gdzie do 14 dnia włącznie rozmiar cząstek malał, a następnie po dwóch tygodniach wzrósł z wartości 309,0 nm do 1254,0 nm.

#### 5.2.4. Analiza średniego rozmiaru i wielkości cząstek metodą DLS



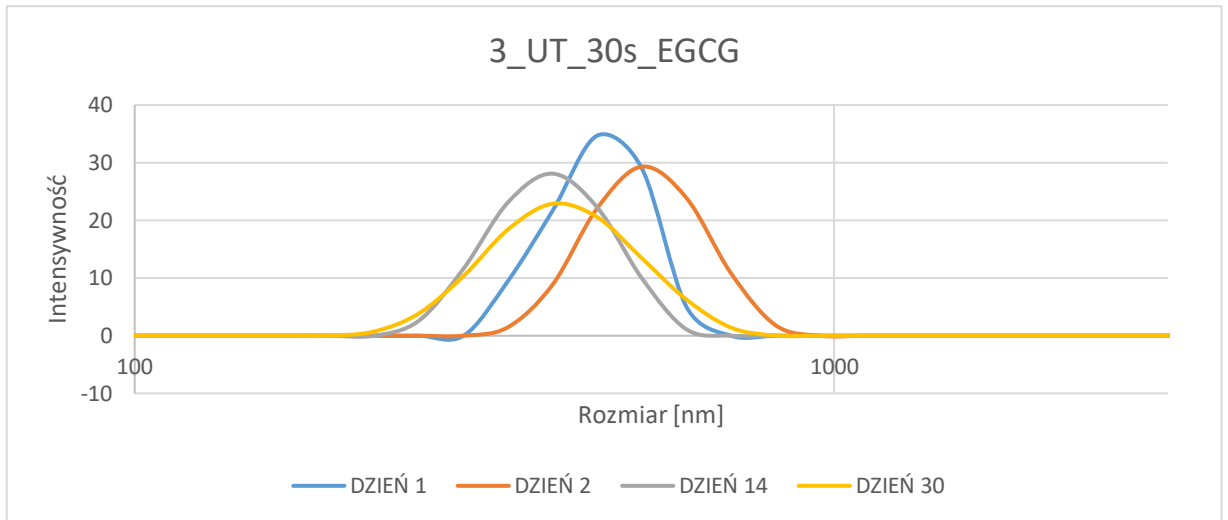
Ryc. 10. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 1\_SLN\_UT\_HPH\_300bar.

Na Ryc.10 przedstawiono wyniki pomiarów DLS dla 1\_SLN\_UT\_HPH\_300 bar, prowadzone przez 30 dni w temperaturze pokojowej 25°C. Widoczne na wykresie są dwa piki, z czego najintensywniejszy odpowiada mniejszej wielkości nanocząstek ok.610 nm w 30. dniu pomiaru. Z kolei mniejszy pik odpowiada wielkości ok. 4853nm, również w 30. dniu pomiaru. Obserwujemy, że krzywe korelacji nie są powtarzalne, rozkład wielkości nanocząstek jest zbyt duży.



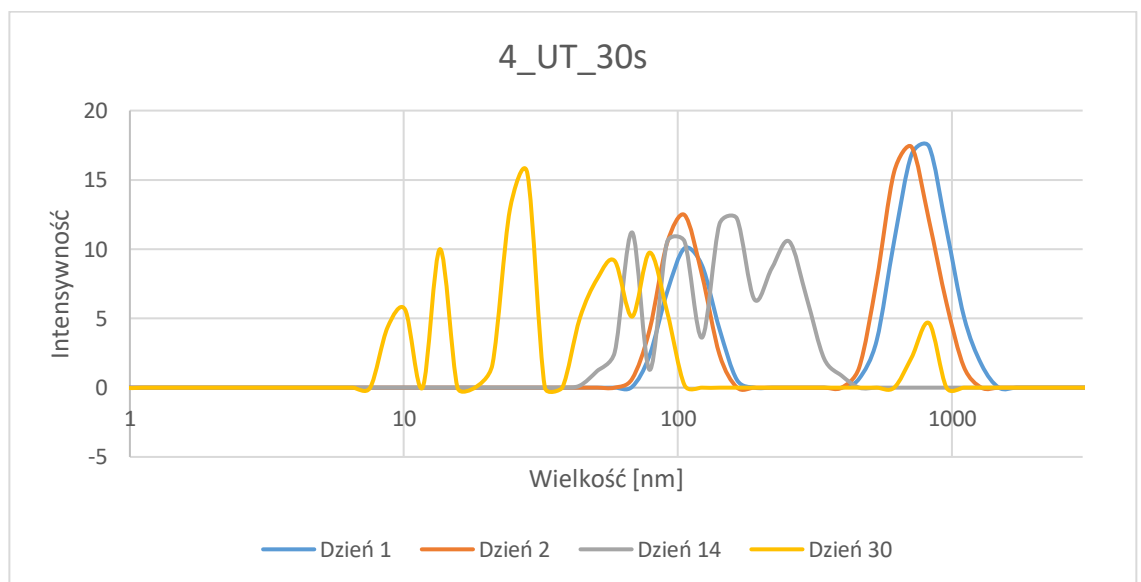
**Ryc. 11. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 2\_UT\_30s\_kwas galusowy.**

Na wykresie (Ryc.11) z kolejną próbką 2\_UT\_30s\_kwas galusowy obserwujemy, że w każdym badanym dniu wszystkie piki przyjmują różne wartości wielkości i w żaden sposób się nie pokrywają. Ponadto w 9 dniu badania widzimy 2 piki, pierwszy przy wartości ok. 122 nm, drugi przy wartości ok. 531 nm. W ostatnim dniu badania nanocząstka przyjmuje największą wartość wynoszącą ok. 615 nm i jest najbardziej intensywna. Poza tym w pierwszym dniu pomiaru dyspersja rozmiarów (PDI) wynosi 1 j.u. (tab.6), co wskazuje na duże zróżnicowanie rozmiarów nanocząstek. Krzywe korelacji nie są powtarzalne, a uzyskane wyniki pomiaru średniej wielkości nanocząstek przyjmują rozbieżne wartości.



**Ryc. 12. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 3\_UT\_30s\_EGCG.**

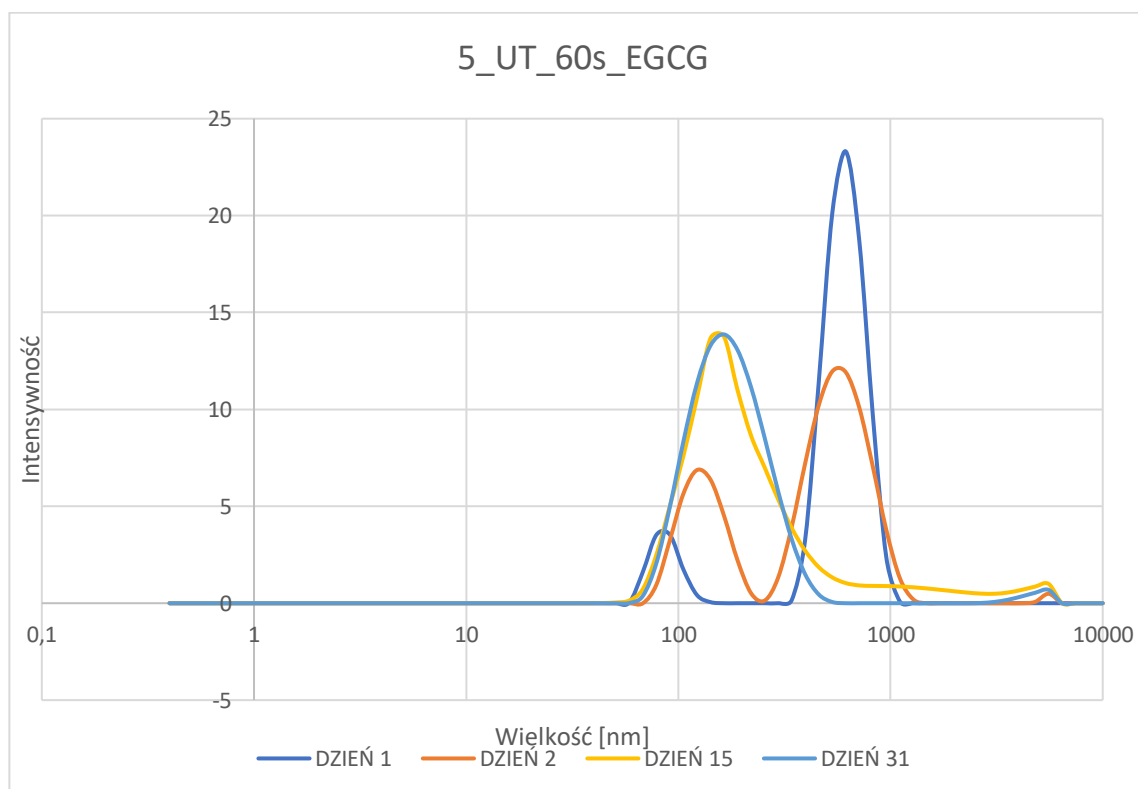
Na wykresie (Ryc.12) z próbką 3\_UT\_30s\_EGCG, zauważamy, że wraz z upływem czasu badana nanocząstka osiągała coraz to mniejszy rozmiar. Występuje tylko jeden pik, z czego najintensywniejszy jest w pierwszym dniu badania. Rozmiar nanocząstki inkorporowanej EGCG pomiędzy 1 a 30 dniem badania waha się od ok. 458 nm, a 396 nm. Krzywe korelacji mimo nienakładania się na siebie, są monotoniczne.



**Ryc. 13. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 4\_UT\_30s.**

Wyniki badania kolejnej próbki 4\_UT\_30s przedstawione na wykresie (Ryc.13) obrazują nam niemonotoniczne krzywe korelacji. Krzywe z 1 oraz 2 dnia badania posiadają

dwa piki i są nałożone na siebie, natomiast krzywe z 14 oraz 30 dnia badania posiadają więcej niż dwa piki i nie nakładają się na siebie. W związku z powyższym otrzymano duży rozstaw wielkości nanocząstki wahający się od wartości ok. 28 nm do ok. 825 nm w 30 dniu badania. Ponadto w pierwszym oraz 14 dniu badania dyspersja rozmiarów wynosi około 1 j.u. (PDI) (Tab.6), co wskazuje na duże zróżnicowanie rozmiarów nanocząstek.



**Ryc. 14. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 5\_UT\_60s\_EGCG.**

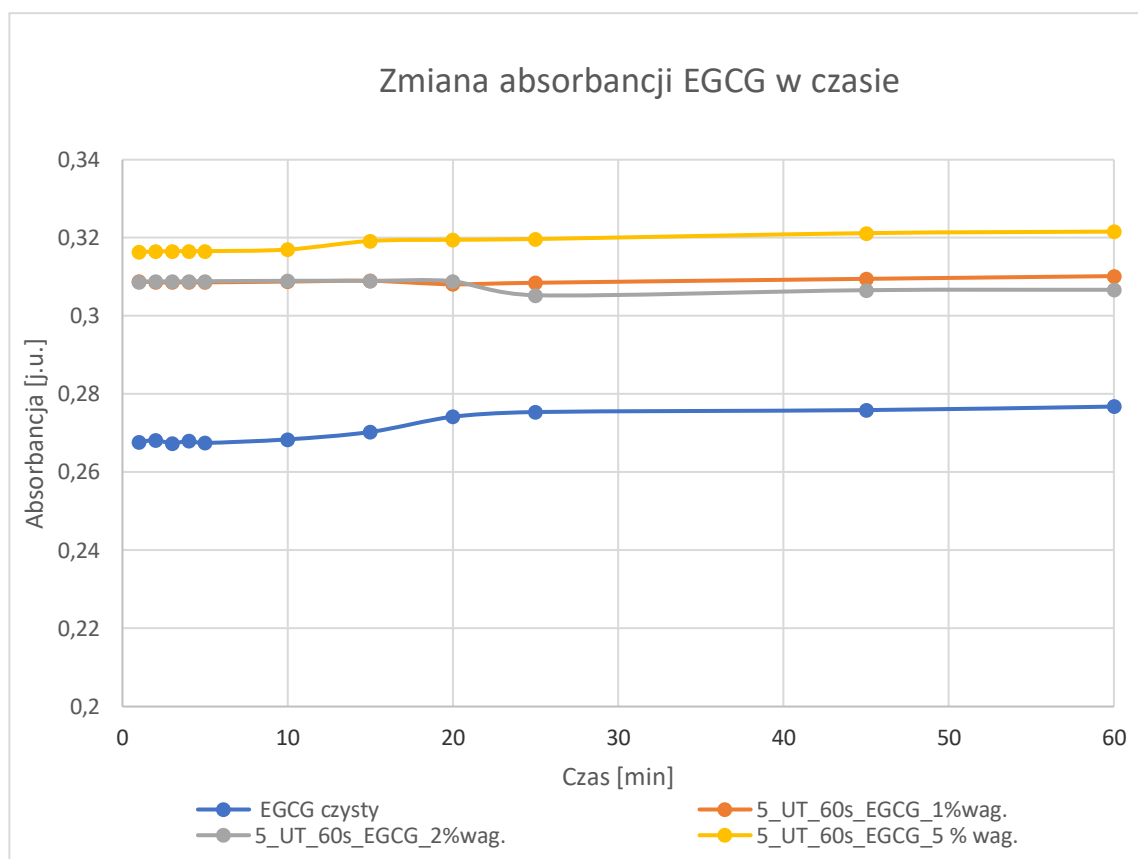
W próbce 5\_UT\_60s\_EGCG widzimy, że wraz z upływem czasu krzywe w 15 oraz 30 dniu badania stają się monotoniczne i nakładają się na siebie. Wielkość nanocząstki w 15 i 30 dniu wynosi ok. 164 nm. W pierwszym oraz drugim dniu badania widoczne są dwa piki nienakładające się na siebie, z czego najbardziej intensywny pik widzimy w pierwszym dniu badania, a wielkość nanocząstki wynosi ok. 615 nm (Ryc.14).

Podsumowując, na podstawie przeanalizowanych wykresów porównujących średnią wielkości cząstek, wybrano dwie próbki. Obie jako substancje aktywną zawierały EGCG, przygotowaną przez odpowiednio 30 oraz 60 sekund. Próbką (3\_UT\_30s\_EGCG) wykazała monotoniczne piki przez 30 dni badań, najmniejsza wartość nanocząstki wynosiła 396 nm.

Z kolei próbka (5\_UT\_60s\_EGCG) zawierająca nanocząstki EGCG, przygotowane przy pomocy UltraTuraxu przez 60 sek. wykazuje w 15. i 30. dniu monotoniczne, nakładające się na siebie krzywe, przy których odczytana średnia wielkość nanocząstki wynosi 164 nm, wykazując tym samym najmniejszy rozmiar badanych nanocząstek lipidowych, co jest bardzo korzystne, w przypadku, gdy sporządzone formułacje mają być zastosowane w medycynie. W próbce 2\_UT\_30s\_kwas galusowy oraz 4\_UT\_30s jest możliwa aglomeracja cząstek, ze względu na: brak powtarzalności krzywych korelacji, niemonotoniczność krzywej korelacji w okolicy linii bazowej, obecność na rozkładzie średniej wielkości cząstek niepowtarzalnych pików o niskiej intensywności, wysoka wartość współczynnika polidispersyjności ok. 1 j.u. [98],

### **5.3. Badanie zdolności antyoksydacyjnej SLN inkorporowanych EGCG z użyciem syntetycznego rodnika DPPH•**

W pracy zbadano potencjał antyoksydacyjny galusanu epigallokatechiny przy użyciu dwóch metod: FRAP (z zastosowaniem odczynnika TPTZ) oraz DPPH•. Jednak ze względu na niezadowalające wyniki podczas prowadzenia badań z zastosowaniem odczynnika TPTZ, podjęto decyzję o wykonaniu badania tylko z użyciem DPPH•. Na początku dokonano pomiaru absorbancji przygotowanego roztworu wzorcowego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH•). Pomiar wykonano trzykrotnie i otrzymano następujące wartości absorbancji: 0,6442, 0,6441 oraz 0,6440 j.u. Średnia wartość absorbancji ( $A_0$ ) obliczona z trzech pomiarów wynosiła  $0,6441 \pm 0,0001$  j.u. Po zmieszaniu roztworu DPPH• z odpowiednio przygotowanymi roztworami EGCG prowadzono pomiary zmian jego absorbancji w czasie. Wolny rodnik reagując z badanym związkiem powoduje spadek absorbancji roztworu co stanowi miarę aktywności przeciwrodnikowej substancji aktywnej. Spadek absorbancji roztworu DPPH• będzie wzrastał wraz ze wzrostem potencjału antyoksydacyjnego danego związku. Na poniższym wykresie (Ryc.15.) przedstawiono zmiany absorbancji roztworu rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu wskutek jego reakcji z badanymi roztworami SLN inkorporowanymi EGCG.



**Ryc. 15. Zmiana absorbancji EGCG w czasie.**

Zaobserwowano, że największy spadek absorbancji roztworu DPPH• nastąpił wskutek reakcji wolnego rodnika w próbce 5\_UT\_60s\_EGCG\_2%wag. natomiast najmniejszy – w wyniku jego reakcji z czystym EGCG (Ryc.15). Pozostałe roztwory zawierające nanocząstki z inkorporowanym EGCG o stężeniu 1% (5\_UT\_60s\_EGCG\_1%wag.) oraz 5% (5\_UT\_60s\_EGCG\_5%wag.) nie wykazały znacznego spadku absorbancji. DPPH• jest wolnym, stabilnym rodnikiem, który posiada na powłoce walencyjnej jednego z atomów azotu niesparowany elektron, tworząc mostek azotowy. Charakterystyczne fioletowe zabarwienie roztworu rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu znika w wyniku jego reakcji z cząsteczką, która może być donorem atomu wodoru. Powstaje wówczas forma rodnika zredukowana (DPPH) [99].

W celu lepszego zobrazowania otrzymanych wyników, obliczono procent wygaszania wolnego rodnika DPPH przez badane roztwory EGCG ze wzoru (równanie 4):

$$I = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \%$$

**Równanie 4. Wzór na procent wygaszania rodnika DPPH**

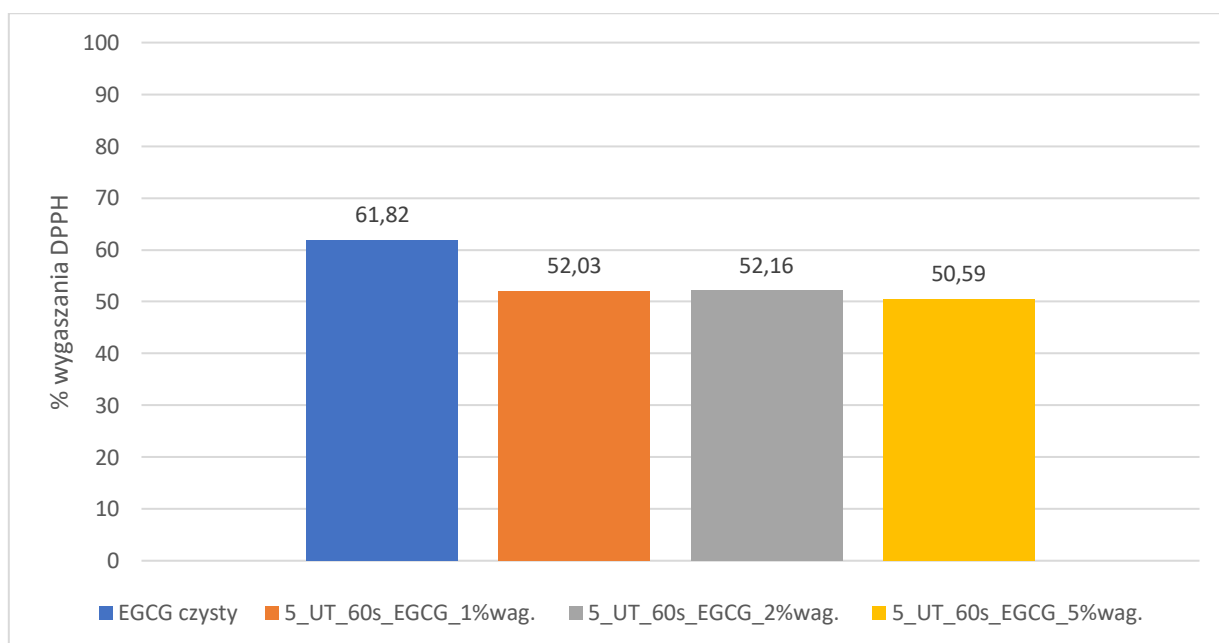
gdzie:

I - % Inhibicji, zdolność do „zamiatania wolnych rodników”

A<sub>0</sub> - absorbancja roztworu rodnika DPPH• (j.u.),

A<sub>1</sub> - absorbancja roztworu rodnika DPPH• po dodaniu badanej substancji (j.u.).

Wyniki zostały przedstawione poniżej na ryc.16



**Ryc. 16. Zdolność wygaszania rodnika DPPH• przez. badane roztwory EGCG.**

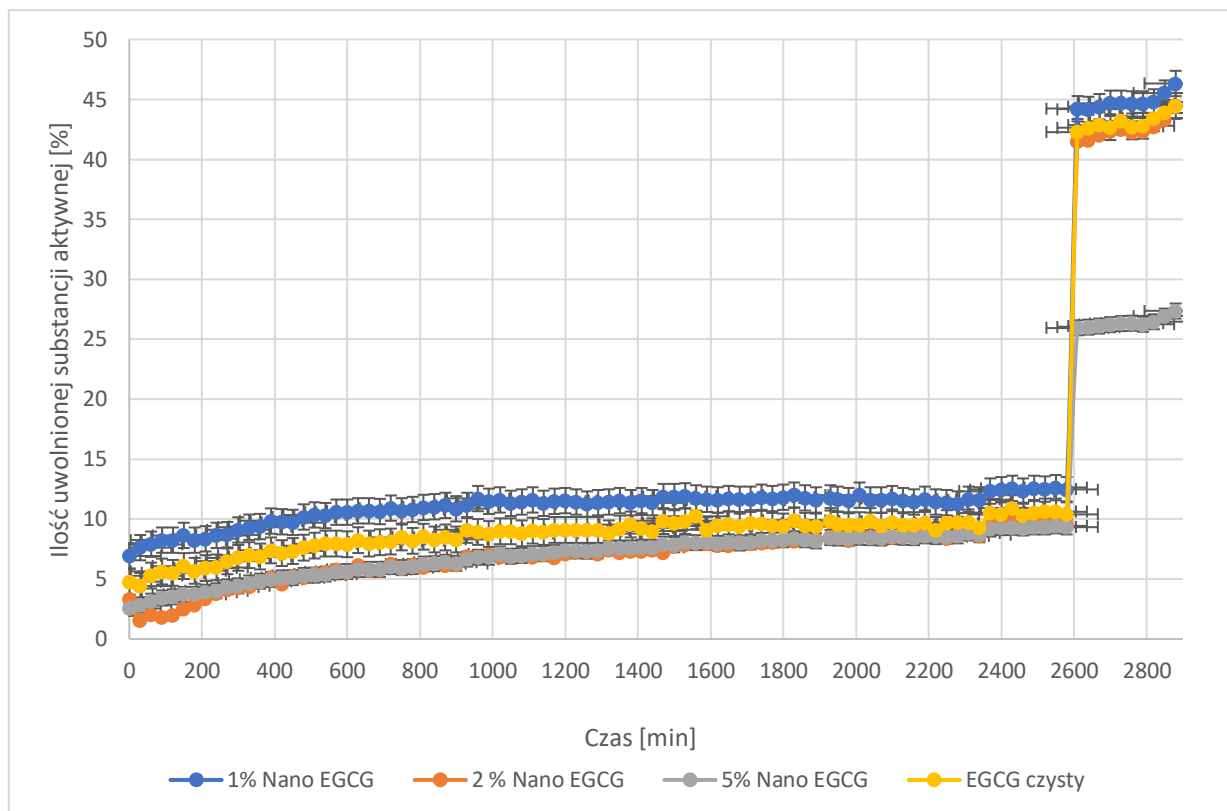
Na podstawie Ryc.16 możemy stwierdzić, że najlepszą zdolność wygaszania rodnika DPPH• posiada czysty EGCG, natomiast spośród nanocząstek inkorporowanych EGCG największą zdolność wygaszania posiada roztwór 5\_UT\_60s\_EGCG\_2%wag. Otrzymane wyniki badanych próbek z nanocząstkami są bardzo zbliżone do siebie i oscylują około wartości 52 %.

Podsumowując, w oparciu o przeprowadzoną analizę potencjału antyoksydacyjnego roztworów EGCG z wykorzystaniem wolnego rodnika DPPH• zaobserwowano, że spośród wszystkich badanych roztworów, nanocząstki o oznaczeniu 5\_UT\_60s\_EGCG\_2%wag. wykazały największą, natomiast nanocząstki oznaczone

5\_UT\_60s\_EGCG\_5%wag. wykazały najmniejszą aktywność antyoksydacyjną. Stwierdzono, że zdolność wygaszania rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu jest związana z budową cząsteczki substancji aktywnej, galusan epigallokatechiny zawiera w swojej strukturze osiem grup hydroksylowych, które stanowią donor atomu wodoru w reakcji redukcji rodnika DPPH•

#### **5.4. Ocena efektywności uwalniania EGCG z otrzymanej formulacji farmaceutycznej**

Ilość uwalnianej substancji aktywnej z podłoża, w dużym stopniu wpływa na skuteczność jej działania. Wyniki badania *in vitro* zaprezentowano w przedłożonej pracy, na podstawie doświadczenia przeprowadzonego w celu teoretycznej oceny uwalnianych ilości EGCG z przygotowanych preparatów farmaceutycznych przez semiprzepuszczalne membrany imitujące bariery błony śluzowej jamy ustnej na zasadzie dyfuzji. Podczas uwalniania cząsteczek substancji aktywnej z podłoża, w roztworze akceptorowym następuje zmiana jej stężenia. Ilość uwolnionej substancji obliczana jest w oparciu o pomiar zmian absorbancji w czasie zgodnie z prawem Lamberta-Beera. Pomiar badanego związku prowadzi się przy analitycznej długości fali badanego związku. Wyniki badania szybkości uwalniania substancji czynnych w warunkach *in vitro* zobrazowane są za pomocą krzywej zależności % uwalniania substancji czynnej od czasu. W warunkach laboratoryjnych mierzona jest dostępność oraz ilość substancji czynnej, która uwalnia się z preparatu a następnie przechodzi przez membranę do płynu akceptorowego. Każdy pomiar wykonano trzykrotnie, a następnie obliczono wartość średnią i na tej podstawie sporządzono wykresy.



**Ryc. 17. Ilość uwolnionego EGCG z podłoża farmaceutycznego w czasie.**

Analiza uzyskanych wyników nie wykazała znaczących różnic w stopniu uwalniania EGCG o różnej zawartości ze wszystkich badanych formułacji farmaceutycznych. Otrzymane profile uwalniania określono jako klasyczne, wskazujące na stopniowe uwalnianie substancji czynnej z podłoża w czasie. Nawet w przypadku formułacji 5\_UT\_60s\_EGCG\_1%wag, 5\_UT\_60s\_EGCG\_2%wag., 5\_UT\_60s\_EGCG\_5%wag. zawierających galusan epigallokatechiny zamkniętych w nośnik lipidowy, nie zaobserwowano dwufazowego profilu uwalniania ze względu na zastosowaną metodą otrzymywania nanocząstek lipidowych, w której składnik aktywny inkorporowano do fazy wodnej. Przygotowane formułacje EGCG w ciągu 2600 minut uwolniły średnio ok. 10% substancji aktywnej z żelu. Następnie po tym czasie obserwujemy znaczny skok uwalniania związku czynnego, największy do 47,5% w przypadku 5\_UT\_60s\_EGCG\_1%wag, z kolei najmniejszy ok. 25%, w przypadku 5\_UT\_60s\_EGCG\_5%wag (Ryc.17). Na tej podstawie można stwierdzić, że ilość uwalnianej substancji czynnej w nośniku żelowym oraz postać czysta lub nanocząstka SLN ma wpływ na ilość jej uwalniania.

## 6. Dyskusja

Galusan epigallokatechiny, zawarty w zielonej herbacie, obecnie cieszy się dużym zainteresowaniem wśród wielu badających ze względu na przypisane mu właściwości prozdrowotne, a w szczególności: przeciwnowotworowe, przeciwstarzeniowe, przeciwzapalne, w chorobach układu krążenia [29]. Sam związek to substancja stała, barwy jasno różowej. Badania pokazują, że wysoka temperatura, narażenie na promienie słoneczne oraz wysokie wartości pH powodują, iż EGCG ulega degradacji i traci swoje właściwości antyoksydacyjne. Ulega wówczas utlenieniu, co można zaobserwować poprzez zmianę jego koloru. W wyższej temperaturze i nasłonecznionym miejscu ulega przemianie do kwasu galusowego lub galusanu galokatechiny – dochodzi do procesu epimeryzacji [100, 101].

Kwas galusowy podobnie jak EGCG jest substancją stałą, występującą w postaci białego proszku, bardzo dobrze rozpuszczalnego w wodzie, eterze dietylowym oraz w alkoholu. Występuje przede wszystkim w galasach, czyli naroślach pojawiających się na krzewach i drzewach. Ponadto możemy znaleźć go w truskawkach, jeżynach, malinach, winogronach oraz zielonej herbacie [102,103]. Kwas galusowy wykazuje szerokie spektrum działania terapeutycznego, między innymi: właściwości przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwbólowe, przeciwutleniające oraz antybakteryjne. Jest stosowany z powodzeniem w leczeniu cukrzycy, gruźlicy oraz w albuminurii [104, 105]. Badania wskazują również na jego działanie przeciwnowotworowe [105]. Uzyskany wyciąg z pestek winogron, zawierający duże ilości kwasu galusowego zmniejsza o 62 % narażenie na powstanie i rozwój raka prostaty [103].

W budowie strukturalnej kwasu galusowego, należącego do kwasów fenolowych, zauważamy obecność trzech grup hydroksylowych, dzięki którym wykazuje on właściwości antyoksydacyjne, a tym samym posiada pozytywny wpływ na zdrowie organizmu ludzkiego [106].

Zarówno kwas galusowy jak i galusan epigallokatechiny wykazują szereg właściwości antyutleniających i prozdrowotnych. Jednak przeprowadzone badania wskazują, że to EGCG jest silniejszym przeciwutleniaczem [46]. Dzieje się tak, ponieważ, aktywność przeciwutleniająca związków polifenolowych zależy przede wszystkim od ich struktury chemicznej. Przedstawione wyniki badań wskazują głównie

na liczbę obecnych grup hydroksylowych oraz ich zdolność do oddawania atomu wodoru w związkach polifenolowych [107]. W strukturze EGCG występuje aż osiem grup hydroksylowych, podczas gdy w kwasie galusowym występują tylko trzy grupy. Ponadto EGCG jest estrem omawianego kwasu galusowego oraz epigallokatechiny, zatem silniejszym antyoksydantem [108].

Istotny wpływ na aktywność przeciwutleniającą omawianych związków ma również pH środowiska oraz jego właściwości kwasowo-zasadowe. Powszechnie aktywność przeciwutleniającą związków oznacza się przy wartości  $\text{pH}=7,4$ . Wiadomo, że odczyn ten przyjmuje różne wartości w tkankach i narządach, w szerokim zakresie od  $\text{pH}=1$  w żołądku, przez  $\text{pH}= 5,3$  w jelicie cienkim,  $\text{pH}=8$  w jelicie grubym, do  $\text{pH}= 7,0 -8,7$  w trzustce i ma istotny wpływ na wchłanianie, rozmieszczenie oraz biotransformację bioaktywnych związków w organizmie. Zależność działania antyoksydacyjnego związków polifenolowych od pH środowiska może mieć zatem wpływ na ich działanie w przewodzie pokarmowym [106]. Galusan epigallokatechiny w porównaniu z innymi katechinami w zakresie pH powyżej 3,5 wykazuje najwyższą aktywność spośród badanych, co wyjaśnia się efektem addytywnym dwóch niezależnych, aktywnych przeciwrodnikowo ugrupowań: pirogalowego oraz reszty kwasu galusowego. Efekt ten zaobserwowano w wyniku przeprowadzonego doświadczenia, gdzie wyznaczono profile zależności wartości TEAC dla EGCG i ECG od pH środowiska z profilami zależności wartości TEAC wyznaczonymi teoretycznie [108]. Oznacza to, że w przypadku różnych narządów, tkanek w naszym organizmie, gdzie pH środowiska będzie silnie kwasowe galusan epigallokatechiny będzie wykazywał największe działanie antyoksydacyjne.

Badania donoszą, że EGCG w postaci nanocząstek ma 20-krotnie silniejszy efekt terapeutyczny niż wolna cząsteczka EGCG [100, 109]. W niniejszej pracy opracowano nowatorską metodę syntezy nanocząstek lipidowych inkorporowanych galusanem epigallokatechiny, przy pomocy homogenizatora UltraTurrax® T25 Digital. Następnie zbadano stabilność otrzymanych nanocząstek, a pomiary te wynosiły:  $Z\text{-Ave}=164,2\text{ nm}$ ,  $\text{PdI}= 0,30\text{ j.u.}$  oraz  $\text{ZP } |\pm 30|\text{ mV}$ . Badanie dotyczące pomiarów stabilności otrzymanych nanocząstek inkorporowanych EGCG jest zgodne z otrzymanymi wynikami [110].

Aktywność przeciwutleniająca związków ma istotne znaczenie dla celów leczniczych, ze względu na wymiatanie z organizmu wolnych rodników, które uszkadzają komórki i mogą być przyczyną wielu schorzeń, w tym nowotworowych. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa [111] postanowiono potwierdzić właściwości antyoksydacyjne galusanu epigallokatechiny. Wyniki badań dotyczące aktywności przeciwutleniających

EGCG, zawartego w zielonej herbacie oznaczonego metodą DPPH są zgodne z wynikami pozostałych badań [112- 114].

W nowoczesnej farmakologii, dąży się do opracowania leku w taki sposób, aby substancja czynna była jak najdłużej uwalniania w organizmie i nie ulegała szybkiej degradacji. Oznacza to zmniejszenie ilości przyjmowanych lekarstw przez pacjentów.

W prezentowanej pracy sporządzono preparatykę żelu z nanocząsteczkami EGCG o różnym stężeniu (1%, 2%, 5% wag.) oraz z czystym EGCG, a następnie poddano uwalnianiu substancji aktywnej z wykorzystaniem aparatu łopatkowego 708-DS (Agilent Technologies Inc)(Ryc.7) w połączeniu z spektrofotometrem UV-Vis. Parametry aparatury dobrano w taki sposób, aby przedstawiały stan błony śluzowej jamy ustnej podczas procesu zapalnego. Przede wszystkim ustawiono wartość pH na 5,8, co imitowało nieco obniżone pH śliny. Badania dowodzą, że im niższe pH roztworu, tym większa stabilność EGCG [110], a zatem jeśli proces zapalny w jamie ustnej byłby bardzo zaawansowany (znaczne obniżenie pH śliny w jamie ustnej), powodowałoby to większą stabilność otrzymanego preparatu. Wartości otrzymanych wyników,—wskazały, że w ciągu 48 h najwięcej uwolniło się substancji czynnej z 5\_UT\_60s\_EGCG\_1%wag. (47,5%), a najmniej z 5\_UT\_60s\_EGCG\_5%wag. Pozostałe próbki: 5\_UT\_60s\_EGCG\_2%wag oraz czysty EGCG miały zbliżone wyniki do 5\_UT\_60s\_EGCG\_1%wag. Badania pokazują, że po 24 h preparat inkorporowany EGCG w środowisku silnie kwasowym może uwolnić aż 50 %, a tym samym wykazuje cechy przedłużonego uwalniania [115].

Opisane powyżej obserwacje wskazują, jak ważna jest forma wprowadzanego leku, warunki przechowywania oraz panujące warunki w miejscu podania leku. EGCG, odpowiednio przechowywany, w postaci żelu z nanocząstkami lipidowymi w łatwy sposób może być aplikowany na błonę śluzową jamy ustnej i uwalniany. Otrzymany żel z EGCG, jest bezbarwny, klarowny, bez zapachu. Lek podany w środowisku silnie kwasowym, a więc w środowisku toczącego się procesu zapalnego w błonie śluzowej jamy ustnej będzie się lepiej wchłaniał do organizmu, gdyż niskie pH sprzyja lepszej stabilności EGCG. Powolne uwalnianie leku będzie łagodziło toczący się proces zapalny, aż do uzyskania całkowitego wyzdrowienia.

## 7. Podsumowanie

Podsumowując:

- Optymalizacja oraz charakterystyka fizykochemiczna dyspersji nanocząstek lipidowych
  - Zoptymalizowano skład jakościowy oraz ilościowy dyspersji nanocząstek lipidowych galusanu epigallokatechiny 2160 mg Precirol ATO 5, Tween 60 500 mg, EGCG 240 mg, woda wysoce demineralizowana;
- Określono zadowalającą stabilność otrzymanych dyspersji nanocząstek lipidowych inkorporowanych galusanem epigallokatechiny, wskazując na temperaturę pokojową jako rekomendowaną w celu utrzymania oczekiwanych wartości parametrów fizykochemicznych (średnia wielkość cząstek – Z-Ave < 200 nm; wskaźnik polidispersyjności – PdI < 0,3 j.u.; potencjał zeta – ZP > |±30| mV);
- Dokonano oceny średniej wielkości cząstek na podstawie przygotowanych preparatów zawierających EGCG, z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS), najlepszy wynik uzyskano dla próbki 3\_UT\_30s\_EGCG oraz 5\_UT\_60s\_EGCG, gdzie homogenizacja była prowadzona przy użyciu UltraTuraxu, 240 mg galusanu epigallokatechiny przez 30 s oraz 60 s;
- Spośród przygotowanych próbek galusanu epigallokatechiny najlepszą zdolność antyoksydacyjną wykazał roztwór o zawartości 2% związku aktywnego, pozostałe były bardzo podobne i nie zauważono znacznego spadku absorbancji;
- Opracowano metodę badań in vitro uwalniania galusanu epigallokatechiny z przygotowanej formułacji oraz oceniono kinetykę ich przenikania przez bariery imitujące błonę śluzową jamy ustnej, największa wartość stopnia uwalniania wynosiła 47,5% w ciągu 48 h.

## 8. Wnioski

Przeprowadzone badania umożliwiły realizację założonego celu. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. EGCG jest substancją wrażliwą na warunki fizykochemiczne, wymagającą specjalnej preparacji celem zachowania stabilności cząstki.
2. EGCG łatwo ulega rozpadowi do epigalusanu o obniżonej skuteczności.
3. Formulacja z użyciem nanocząstek pozwala na zachowanie właściwości EGCG
4. Stopień uwalniania EGCG z nanocząstek przez barierę imitującą błonę śluzową wynosi 47,5% w czasie 48 h trwania doświadczenia.
5. Optymalną zdolność antyoksydacyjną EGCG określono dla stężenia 2% wag.

## 9. Streszczenie w języku polskim

### Wstęp

Zielona herbata jest jednym z najzdrowszych napojów na świecie. Swoje właściwości zawdzięcza zawartości takich substancji jak polifenole czy katechiny, do których zaliczamy flawonoidy. Związki te zapobiegają powstawaniu wolnych rodników w organizmie, tym samym chronią komórki oraz cząsteczki przed uszkodzeniem. Jednym z najliczniejszych związków występujących w zielonej herbacie jest przeciwutleniacz galusan epigallokatechiny.

### Cel pracy

Celem przedłożonej rozprawy doktorskiej było opracowanie metodyki badań *in vitro* uwalniania EGCG z przygotowanej formułacji wraz z oceną kinetyki jej przenikania przez bariery imitujące błonę śluzową jamy ustnej.

### Material i metody

Badaniu poddano standaryzowany ekstrakt z liści zielonej herbaty 240 mg o zawartości EGCG 216mg oraz kwas galusowy. Ekstrakt poddano analizie na obecność EGCG z zastosowaniem spektrometrię mas ESI-MS.

Pierwszym etapem było przygotowanie nowatorskiej metody syntezy formułacji farmaceutycznej zawierającej badany galusan epigallokatechiny w ilości 0,5% wag przy użyciu homogenizatora wysokoobrotowego UltraTurax. Następnie celem określenia stabilności nanocząstek dokonano pomiaru potencjału ZETA, współczynnika polidispersyjności (PDI), średniej wielkości cząstek Z-Ave. Przeprowadzono badania rozkładu średniej wielkości cząstek.

W toku badań przeprowadzono również badanie aktywności przeciwutleniającej badanych związków z wykorzystaniem metody FRAP z rodnikiem 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH).

Ostatni etap przeprowadzonych badań stanowiło opracowanie metodyki badania uwalniania galusanu epigallokatechiny z przygotowanych preparatów przez semiprzepuszczalne membrany syntetyczne *in vitro* do roztworu akceptorowego o określonej wartości pH = 5,8 (obniżona wartość imitująca proces zapalny w jamie ustnej) oraz temperatury (prawidłowa wartość dla zdrowego organizmu ludzkiego). W tym celu wykorzystano aparat dyfuzyjny 708-DS połączony z spektrofotometrem

UV-Vis. Ocenę ilości uwolnionej substancji prowadzono z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-Vis.

### **Wyniki**

Na podstawie uzyskanych wyników z spektrometrii mas ESI-MS standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty, zarówno w trybie jonów ujemnych jak i dodatnich Jon  $m/z$  457 przypisano dla cząsteczki EGCG.

Przeprowadzona ocena stabilności otrzymanych dyspersji (średnia wielkość cząstek – Z-Ave < 200 nm; wskaźnik polidispersyjności – PdI < 0,30; potencjał zeta – ZP >  $|\pm 30|$  mV) pozwoliła na określenie przygotowanych nanocząstek lipidowych jako wystarczająco stabilnych pod kątem wykorzystania ich jako składników formulacji farmaceutycznych.

Na podstawie przygotowanych preparatów zawierających EGCG, z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS), najlepszy wynik uzyskano dla dwóch próbek: 3\_UT\_30s\_EGCG oraz 5\_UT\_60s\_EGCG. Wartość średniej wielkości nanocząstki, w przypadku prowadzenia homogenizacji przez 30 sekund wynosiła 396 nm, gdy zwiększono czas homogenizacji do 60 sekund wartość ta była równa 164 nm.

Wyniki badania właściwości przeciwutleniających przy użyciu rodnika DPPH wykazały, że 2% zawartość galusanu epigallokatechiny miała największą zdolność antyoksydacyjną.

Analiza uzyskanych wyników w przypadku oceny efektywności uwalniania EGCG z otrzymanej formulacji farmaceutycznej pozwoliła na określenie profili uwalniania jako klasycznych, wskazujących na stopniowe uwalnianie substancji czynnej w czasie. Wartości otrzymanych wyników wykazały, że w ciągu 48 h najwięcej uwolniło się substancji czynnej z próbki oznaczonej 5\_UT\_60 s\_EGCG\_1%wag. (47,5%), a najmniej z 5\_UT\_60s\_egcg\_5%wag.

### **Wnioski**

Przeprowadzone badania umożliwiły realizację założonego celu. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski: EGCG jest substancją wrażliwą na warunki fizykochemiczne, wymagającą specjalnej preparacji celem zachowania stabilności cząstki; EGCG łatwo ulega rozpadowi do epigalusanu o obniżonej skuteczności; formuacja z użyciem nanocząstek pozwala na zachowanie właściwości EGCG; stopień uwalniania EGCG z nanocząstek przez barierę imitującą błonę śluzową

wynosi 47,5% w czasie 48 h; optymalną zdolność antyoksydacyjną EGCG określono dla stężenia 2% wag.

## 10. Abstract

### **Introduction**

Green tea is one of the healthiest drinks in the world. It owes its properties to the content of substances such as polyphenols or catechins, which include flavonoids. These compounds prevent the formation of free radicals in the body, thus protecting cells and molecules from damage. One of the most abundant compounds in green tea is the antioxidant epigallocatechin gallate.

### **The aim of study**

The aim of the presented doctoral dissertation was to develop an in vitro methodology for EGCG release from the prepared formulation, along with the assessment of the kinetics of its penetration through barriers imitating the oral mucosa.

### **Material and Methods**

The standardized extract of green tea leaves 240 mg with EGCG 216 mg and gallic acid were tested. The extract was analyzed for the presence of EGCG using ESI-MS mass spectrometry.

The first step was to prepare an innovative method of synthesizing a pharmaceutical formulation containing the tested epigallocatechin gallate in the amount of 0.5 wt.%. Using the UltraTurax high-speed homogenizer. Then, in order to determine the stability of the nanoparticles, the ZETA potential, polydispersity index (PDI) and mean particle size Z-Ave were measured. Mean particle size distribution studies were carried out.

In the course of the research, the antioxidant activity of the tested compounds was also tested using the FRAP method with the radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

The last stage of the research was the development of a methodology for testing the release of epigallocatechin gallate from the prepared preparations through semipermeable synthetic membranes in vitro into the acceptor solution

with a certain value of pH = 5.8 (reduced value imitating the inflammatory process in the oral cavity) and temperature (correct value for a healthy human body).

For this purpose, a 708-DS diffusion apparatus connected to a spectrophotometer was used UV-Vis. The amount of the released substance was assessed with the use of UV-Vis spectrophotometry.

### **Results**

Based on the results obtained from the ESI-MS mass spectrometry of a standardized green tea extract, both in the negative ion mode and and Ion  $m/z$  457 positives are assigned to the EGCG molecule. The evaluation of the stability of the dispersions obtained (mean particle size - Z-Ave <200 nm; polydispersity index - Pdl <0.30; zeta potential - ZP> |  $\pm 30$  | mV) allowed to determine the prepared lipid nanoparticles as sufficiently stable in terms of their use as ingredients in pharmaceutical formulations.

Based on prepared preparations containing EGCG, using the dynamic light scattering (DLS) technique, the best result was obtained for two samples: 3\_UT\_30s\_EGCG and 5\_UT\_60s\_EGCG. The value of the mean nanoparticle size when homogenization was carried out for 30 seconds was 396 nm, when the homogenization time was increased to 60 seconds, this value was 164 nm.

The results of testing the antioxidant properties using the DPPH radical showed that the 2% content of epigallocatechin gallate had the greatest antioxidant capacity.

The analysis of the obtained results in the case of the evaluation of the efficiency of EGCG release from the obtained pharmaceutical formulation allowed for the determination of the release profiles as classic, indicating a gradual release of the active substance over time. The values of the obtained results showed that within 48 h the most

active substance was released from the sample designated 5\_UT\_60 s\_EGCG\_1 wt.%. (47.5%) with the least of 5\_UT\_60s\_egcg\_5 wt.%.

### **Conclusions**

The conducted research made it possible to achieve the assumed goal. On the basis of the obtained results, the following conclusions were drawn: EGCG is a substance sensitive to physicochemical conditions, requiring special preparation in order to maintain the stability of the particle; EGCG is readily broken down into epigallate with reduced efficacy; formulation with the use of nanoparticles preserves the properties of EGCG; the rate of release of EGCG from the nanoparticles across the mucous membrane barrier is 47.5% within 48 h; the optimal antioxidant capacity of EGCG was determined for a concentration of 2 wt.

## 11. Piśmiennictwo

[1] Żwawiak J, Sowa-Kasprzak K, Nanocząstki w roli nośników substancji aktywnych, *Farmacja Współczesna*, 2014; 7: 1-8

[2] Ghasemiyeh P., Mohammadi-Samani S., Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages, *Research in Pharmaceutical Sciences*, August 2018; 13(4): 288-303

[3] Lason E, Ogonowski J., Solid Lipid Nanoparticles-characteristics, application and obtaining, *Chemik*, 2011; 65: 960-967

[4] Muller R. H., Ma Èder K., Gohla S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery a review of the state of the art., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000; 50: 161-177

[5] Hanumanaik M, Patel S.K. ,Sree K.R., Solid Lipid Nanoparticles; A Review., *Int J Pharm Sci Res.*, 2013; 4(3): 928-940

[6] Odrobińska J., Neugebauer D., Nowe rozwiązania i modyfikacje najpopularniejszych polimerowych nośników substancji aktywnych, *Wiadomości chemiczne*, 2019; 73: 9-10

[7] Bhatt S., Sharma J.,Singh M., Saini V., Solid lipid nanoparticles: A promising technology for delivery of poorly water-soluble drugs, *Acta Pharmaceutica Scientia*. 2018; 56(3): 27-49

[8] Souto E. B., Almeida A. J., Müller R. H., Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2007; 3: 317–331

[9] Naseri N., Valizadeh H., Zakeri-Milan P., Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application, *Adv Pharm Bull*. 2015; 5(3): 305–313

[10] Yadav N., Khatak S., Singh Sara U.V., Solid lipid nanoparticles – A review, *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2013; 5: 8–18

- [11] Souto E.B., Severino P., Santana M.H.A., Pinho S.C., Solid lipid nanoparticles: classical methods of lab production, *Quim. Nova*, 2011; 34: 1762-1769
- [12] Garud A., Singh D., Garud N., Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications, Garud, *International Current Pharmaceutical Journal* 2012; 1(11): 384-393
- [13] Mukherjee S., Ray S., Thakur R.S., Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System, *Indian J Pharm Sci.*, 2009; 71(4): 349–358
- [14] Mehnert W., Mäder K., Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001; 47: 165-196
- [15] Sjöström B., Bergenståhl B., Preparation of submicron drug particles in lecithin stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate, *Int. J. Pharm.*, 1992; 88: 53-62
- [16] Guimarães K.L., Ré M.I., Lipid nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC), 2011; 101–122
- [17] Yadav N., Khatak S., Singh Sara U.V., Solid lipid nanoparticles – A review, *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2013; 5: 8–18
- [18] Ahmed A.A Alsaad, Ahmed A. Hussien, Mowafaq M. Gareeb, Solid Lipid Nanoparticles (SLN) as a Novel Drug Delivery System: A Theoretical Review, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2020; 11(5): 259-273
- [19] Joshi S.A., Ramteke K.H., Solid Lipid Nanoparticle: A Review, *IOSR Journal of Pharmacy*, 2012; 2: 34–44
- [20] Jores K., Mehnert W., Drechsler M., Bunjes H., Johann C., Mäder K., Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, *J Control Release.*, 2004; 95: 217–227
- [21] Souto E.B., Müller R.H., Lipid Nanoparticles (Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers) for Cosmetic, Dermal, and Transdermal Applications, w:

D. Thassu (red.), Nanoparticulate Drug Delivery Systems, CRC Press, New York, 2007; 213–233

[22] Wissing S.A., Müller R.H., Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration, J Control Release., 2002; 81: 225–233

[23] Maciążek-Jurczyk M., Maliszewska M., Szkudlarek-Haśnik A., Sułkowska A., Działanie profilaktyczne zielonej herbaty w chorobie wieńcowej, Borgis - Postępy Fitoterapii 2011; 1: 58-64

[24] Pettigrew J., Królestwo herbaty. Wyd. Twój Styl, Warszawa, 1998

[25] Turek I.A., Kozińska J., Drygas W., Zielona herbata jako czynnik protekcyjny w profilaktyce i leczeniu wybranych chorób serca i naczyń, Kardiologia Polska, 2012;70(8): 848-852

[26] Stańczyk A. Właściwości zdrowotne wybranych gatunków herbat. Bromat Chem Toksykol. 2010; XLIII(4): 498-504

[27] Kakuzō O., Księga herbaty, Państwowy Instytut Wydawniczy, Warszawa, 1986

[28] Kaczmarczyk M., Herbata długiej przyjaźni, „Żyjmy dłużej”, 1999; 10

[29] Cichoń Z., Miśniakiewicz M, Szkudlarek E., Właściwości zielonej herbaty, Zeszyty Naukowe , Akademia Ekonomiczna w Krakowie, 2007; 743: 59-90

[30] Wierzejska R., Wpływ picia herbaty na zdrowie-aktualny stan wiedzy, Przegląd epidemiologiczny, 2014; 68: 595-599

[31] Belitz H.-D., Grosch W. & Schieberle P., Food Chemistry, Springer, Berlin, 2004

[32] Drygas W., Kozińska J., Turek I., Zielona herbata jako czynnik protekcyjny w profilaktyce i leczeniu wybranych chorób serca i naczyń”, w :Kardiologia Polska, 2017

[33] Bońkowski M., Kłódka D., Telesiński A. ,, Zawartość wybranych metyloksantyn i związków fenolowych w naparach różnych rodzajów herbat

rozdrobnionych(DUST I FANNINGS) w zależności od czasu parzenia”, w:ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2008; 1 (56): 103 – 113

[34] Ostrowska J., Herbaty - naturalne źródło antyoksydantów, Gazeta Farmaceutyczna, 2008; 1: 46- 49

[35] Cichoń Z. & Wierciak E., Towaroznawcza charakterystyka herbaty. Wyd. Akademii Ekonomicznej, Kraków, 2000

[36] Wierzejska R., Kofeina- Powszechny składnik diety i jej wpływ na zdrowie, Rocz Panstw Zakl Hig 2012; 63(2): 141 – 147

[37] Ostrowska J., Skrzydlewska E., Aktywność biologiczna flawonoidów, Borgis - Postępy Fitoterapii 2005; 3-4: 71-79

[38] Muzolf-Panek M. ,Tyrakowska B., Znaczenie pro-utleniających właściwości flawonoidów w indukcji ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne, Postępy Biochemii 2010; 56 (3): 284-289

[39] Ostrowska J., Skrzydlewska E., Aktywność biologiczna flawonoidów, Borgis - Postępy Fitoterapii 2005; 3-4: 71-79

[40] Madej-Krych J., Flawonoidy- przyjaciele czy wrogowie?, Eliksir, 2015; 1: 12-14

[41] Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 1996; 20: 933-956

[42] Muzolf M, Szymusiak H, Gliszczyńska-Świgło A, Rietjens IMCM, Tyrakowska B., pH-dependent radical scavenging capacity of Green Tea catechins, J Agric Food Chem, 2008; 56: 816-823

[43] Czaplińska M., Czepas J.,Gwoździński K., Budowa, właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe flawonoidów, Postępy Biochemii, 2012; 58 (3): 235-244

[44] Pietta P.G.: Flavonoids as antioxidants, J. Nat. Prod, 2000; 63: 1035-1042

[45] Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S.: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids., *Free Radic. Biol. Med.*, 1994; 16: 845-850

[46] Cierniak A, Skubal M. , Kalembe-Drożdż M., Czy galusan epigallokatechiny może być skutecznym polifenolem w terapii skojarzonej z etopozydem w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej, *Państwo i Społeczeństwo*, 2018; (XVIII) nr 3

[47] Donejko M., Galicka E., Niczyporuk M., Przyłipiak A. , „Właściwości antynowotworowe galusanu epigallokatechiny zawartego w zielonej herbacie”, *Postępy Hig Med Dosw (online)*, 2013; 67: 26-34

[48] [sigmaaldrich.com](http://sigmaaldrich.com)- karta charakterystyki

[49] Ferannnzo G.F., Amato I., Ingenito A., De Natale A., Pollio A., 2009. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia* 2009; 80: 255-262

[50] Chung F.L., The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black tea., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999; 220: 244-248

[51] Jimenez-Lopez J.M., Cederbaum A.I.: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects HepG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity., *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 359-370

[52] Saha P., Das S.: Elimination of deleterious effects of free radicals in murine skin carcinogenesis by black tea infusion, theaflavins and epigallocatechin gallate., *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2002; 3: 225-230

[53] Siddiqui I.A., Adhami V.M., Saleem M., Mukhtar H.: Beneficial effects of tea and its polyphenols against prostate cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006; 50: 130-143

[54] Brown M.D., Green tea (*Camellia Sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Altern. Med. Rev.* 1999; 4: 360-370

- [55] Yang T.T., Koo M.W.: Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis* 2000; 148: 67-73
- [56] Całka J., Zasadowski A., Juranek J., Niektóre aspekty leczniczego działania zielonej herbaty, *BROMAT. CHEM. TOKSYKOL.*, 2008; 1(XLI): 5-14
- [57] Maciążek-Jurczyk M., Maliszewska M., Szkudlarek-Haśnik A., Sułkowska A., Działanie profilaktyczne zielonej herbaty w chorobie wieńcowej, *Borgis - Postępy Fitoterapii*, 2011; 1: 58-64
- [58] Brończyk-Puzoń A., Koszowska A., Nowak J., Dittfeld A., Bienie J., Epidemiologia otyłości na świecie i w Polsce, *Forum Zaburzeń Metabolicznych*, 2014; 5(1): 1-5
- [59] Ikeda I., Tsuda K., Suzuki Y. i wsp., Tea catechins with galloy moiety suppress postprandial hypertriglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats, *J.Nutr.*, 2005; 135: 155- 159
- [60] Stępień M., Szulińska M., Bogdański P., Pupek-Musialik D., Rola ekstraktu zielonej herbaty w leczeniu otyłości, *Forum Zaburzeń Metabolicznych*, 2011; 2( 4): 256-262
- [61] Tyszczyk B., Rola metaloproteinaz w procesie starzenia się skóry, *Świat Przemysłu Kosmetycznego*, 2013; 1: 38-41
- [62] Feng B., Fang Y., Wei S.M., Effect and mechanism of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). against the hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human dermal fibroblasts, *J Cosmet Sci.*, 2013; 64(1):35-44
- [63] Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M., Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu, *BROMAT. CHEM. TOKSYKOL.* , 2010; 1(XLIII): 9-14
- [64] Koss-Mikołajczyk I., Baranowska M., Namieśnik J., Bartoszek A., Metody oznaczania właściwości przeciwutleniających fitozwiązków w systemach komórkowych z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji/luminescencji, *Postępy Hig Med Dosw (online)*, 2017; 71: 1-16

- [65] Trojan N., Satora P., Probiotyki i ich potencjalne właściwości antyoksydacyjne, *Postępy Mikrobiologii.*, 2017; 56(1): 18–27
- [66] Cybul M., Nowak R., Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych, *Herba Polonica*, 2008; 54(1): 68- 78
- [67] Śnieżek E., Szumska M., Janoszka B., Ocena właściwości przeciwutleniających wybranych produktów roślinnych w aspekcie możliwości ich wykorzystania jako dodatków do żywności wysokobiałkowej poddawanej obróbce termicznej, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2016; 5 (108): 116 – 126
- [68] Iris F., Benzie F., Strain J. J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 1996; 239: 70-76
- [69] Kozłowska M., Ścibisz I., Badanie zawartości polifenoli i aktywności przeciwutleniającej ekstraktów z roślin przyprawowych podczas ich przechowywania, *BROMAT. CHEM. TOKSYKOL.*, 2012; 3(XLV): 358–363
- [70] Shojaei A.H., Buccal Mucosa As A Route For Systemic Drug Delivery: A Review, *J Pharm Pharm Sci.*, Jan-Apr 1998;1(1):15-30
- [71] Bruschi M. L., Freitas O.: Oral bioadhesive drug delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2005; 31: 293 – 310
- [72] Ng, S. F., Rouse, J. J., Sanderson, F. D., Meidan, V., & Eccleston, G. M., Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies., *Aaps Pharmscitech*, 2010; 11(3): 1432-1441
- [73] Liebenberg W., Engelbrecht E., Wessels A., Devarakonda B., Yang W., De Villiers M.M., A Comparative Study of the Release of Active Ingredients from Semisolid Cosmeceuticals Measured with Franz, Enhancer or Flow-Through Cell Diffusion Apparatus, *Journal of Food and Drug Analysis*, 2004; 12: 19–28
- [74] Zatz, J. L., Segers, J. D. Techniques for measuring in vitro release from semisolids. *Dissolution technologies*, 1998; 5(1): 3-17

[75] Azarmi, S., Roa, W., & Löbenberg, R., Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of pharmaceutics*, 2007; 328(1): 12-21

[76] Olejnik, A., Gościańska, J., Nowak, I., Active compounds release from semisolid dosage forms. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2012; 101(11): 4032-4045

[77] Christensen, J. M., Chuong, M. C., Le, H., Pham, L., Bendas, E., Hydrocortisone diffusion through synthetic membrane, mouse skin, and epiderm<sup>TM</sup> cultured skin., *Archives of drug information*, 2011; 4(1): 10-21

[78] Igielska-Kalwat J., Nowak I., Uwalnianie substancji aktywnych z preparatów dermatologicznych, *Chemik*, 2015; 69: 498–504

[79] Janicka S., Sznitowska M., Zieliński W., Dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna leków, wydanie I, Ośrodek Informacji Naukowej Polfa, Warszawa, 2001

[80] Górka R., Diagnostyka i leczenie chorób błony śluzowej jamy ustnej, wydanie I, Med. Tour Press International, Warszawa, 2011

[81] Scully C., Choroby jamy ustnej. Diagnostyka i leczenie, wydanie I polskie pod red. R. Górskiej, Urban & Partner, Wrocław, 2006

[82] Kmiec Z., Histologia i Cytofizjologia zęba i jamy ustnej, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2007

[83] Jańczuk Z., Banach J., Choroby błony śluzowej jamy ustnej i przyzębia, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2004

[84] Dutkowska A., Brukwicka I., Kopański Z., Rowiński J., Furmanik F., Zmiany w błonie śluzowej jamy ustnej i języka u ludzi w starszym wieku, *Journal of Clinical Healthcare*, 2017; 2: 16-19

[85] Paszyńska E., Słopeń A., Ślebioda Z., Dyszkiewicz-Konwińska M., Węglarz M., Rajewski A., Ocena makroskopowa błony śluzowej jamy ustnej i analiza pH śliny u pacjentów z jadłowstrętem psychicznym, *Psychiatr. Pol.* 2014; 48(3): 453–464

[86] Knychalska- Karwan Z., Fizjologia i patologia błony śluzowej jamy ustnej, Czelej, Lublin, 2009

[87] Petkowicz B., Jastrzębska I., Jamrogiewicz R., Zapalenie błony śluzowej jamy ustnej jako powikłanie w chemioterapii nowotworów, Dent. Med. Probl. 2012; 49(1): 69–77

[88] Leśniak W., Doboszyńska A., Objawy stomatologiczne chorób ogólnych, Forum Medycyny Rodzinnej 2014; 8( 1): 9–13

[89] I. Frias; A. R. Neves; M. Pinheiro; S. Reis, Design, development, and characterization of lipid nanocarriers-based epigallocatechin gallate delivery system for preventive and therapeutic supplementation, Drug Design, Development and Therapy, 2016; 10: 3519–3528

[90] <http://zatorski.pl/wp-content/uploads/2018/02/PTFE.pdf> karta charakterystyki

[91] Freitas C., Müller R.H., Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions, Int. J. Pharm., 1998; 168: 221-229

[92] Kalaycioglu G.D., Aydogan N., Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery, Colloids Surf. A, 2016; 510: 77-86

[93] Wissing S., Müller R., Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration, J. Controlled Release, 2002; 81: 225-233

[94] Doktorovova S., Souto E.B., Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review, Expert Opin. Drug. Deliv., 2009; 6: 165-176

[95] Jores K., Mehnert W., Drechsler M., Bunjes H., Johann C., Mäder K., Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, J. Controlled Release, 2004; 95: 217-227

[96] Bhattacharjee S., DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *J. Controlled Release*, 2016; 235: 337-351

[97] Fangueiro J.F., Andreani T., Egea M.A., Garcia M.L., Souto S.B., Souto E.B., Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process, *Colloids Surf., B*, 2012; 100: 84-89

[98] Woch, J. , Iłowska, J. , Dejnega, B. , Korasiak, K. , Gniady, J., Metody rozpraszania światła w ocenie jakości środków smarowych, *Nafta-Gaz*, 2017; 73 (10): 784-792

[99] Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 2004; 26(2): 211-219

[100] Frasheri L, Schielein MC, Tizek L, et al. Great green tea ingredient? A narrative literature review on epigallocatechin gallate and its biophysical properties for topical use in dermatology, *Phytother Res.*, 2020; 34(9): 2170-2179

[101] Wang, R., Zhou, W., & Jiang, X., Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008; 56(8): 2694–2701

[102] Parus A., Przeciwutleniające i farmakologiczne właściwości kwasów fenolowych, *Postępy Fitoterapii*, 2013; 1: 48-53

[103] Günter A., Wesołowska P., Kwas galusowy- związek o ciekawych właściwościach, *Chemia w szkole*, 2017; 2: 13-15

[104] Guzik U., Wojcieszńska D., Jaroszek P., Biosynteza kwasu galusowego i jego zastosowanie, *Biotechnologia*, 2010; 1 (88): 119–131

[105] Choubey S., Goyal S., Varughese L.R. ,Kumar V., Sharma A.K., Beniwa V., Probing Gallic Acid for Its Broad Spectrum Applications, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2018; 18: 1283-1293

- [106] Tyrakowska B., Aktywność przeciwutleniająca związków polifenolowych. Metody badania i czynniki decydujące o aktywności przeciwutleniającej, Zeszyty Naukowe, 2012; 234: 36- 58
- [107] Cao G., Sofic E., Prior R.L., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships, Free Radical Biology and Medicine, 1997; 22 (5):749- 760
- [108] Muzolf M., Szymusiak H., Gliszczyńska- Świgała A., Rietjens I.M.C.M., Tyrakowska B., pH- Dependent Radical Scavenging Capacity of Green Tea Catechins, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008; 58: 816-823
- [109] Chamcheu, J. C., Siddiqui, I. A., Adhami, V. M. et al., Chitosan-based nanoformulated (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates human keratinocyte-induced responses and alleviates imiquimod-induced murine psoriasiform dermatitis. International Journal of Nanomedicine, 2018; 13: 4189–4206
- [110] Radhakrishnan R. , Kulhari H. , Pooja D., Encapsulation of biophenolic phytochemical EGCG within lipid nanoparticles enhances its stability and cytotoxicity against cancer, Chemistry and Physics of Lipids, 2016; 198: 51-60
- [111] Kulczyński B., Gramza- Michałowska A., Jankowiak J., Aktywność biologiczna zielonej herbaty, Współczesne trendy w kształtowaniu jakości żywienia, Poznań, 2016; 55- 56
- [112] Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P. & Rice-Evans C., Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and chain-breaking antioxidants. Arch. Biochem. Biophys. 1995; 322-339
- [113] Ohmori R., Iwamoto T., Tago M., Takeo T., Unno T., Itakura H. & Kondo K., Antioxidant activity of various teas against free radical and LDL oxidation. Lipids 2005; 40: 849-853
- [114] Yokozawa T., Dong E., Nakagawa T., Kashiwagi H., Nakagawa H., Takeuchi S. & Chung H.Y., In vitro and in vivo studies on the radical-scavenging activity of tea. J. Agric. Food Chem. 1998; 46: 2143-2150

[115] Cano A., Ettcheto M. Chang J.H. i in., Dual-drug loaded nanoparticles of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)/Ascorbic acid enhance therapeutic efficacy of EGCG in a APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> Alzheimer's disease mice model, J Control Release. 2019;10(301): 62–75

## 12. Spis rycin

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Ryc.1. Elementy strukturalne katechin zapewniające efektywne zmiatanie wolnych rodników.....                     | 20 |
| Ryc.2. Wzór strukturalny EGCG.....                                                                               | 21 |
| Ryc.3. Homogenizator Panda Plus 2000 GEA.....                                                                    | 35 |
| Ryc.4. Homogenizator wysokoobrotowy UltraTurax® T25 Digital.....                                                 | 35 |
| Ryc.5. Zetasizer Nano ZS.....                                                                                    | 38 |
| Ryc.6. Spektrofotometr UV-Vis Cary 50 Bio.....                                                                   | 40 |
| Ryc.7. Teflonowe komory ekstrakcyjne przed nałożeniem hydrożelu z SLN inkorporowanego EGCG.....                  | 41 |
| Ryc.8. Aparat dyfuzyjny 708-DS. wraz z spektrofotometrem UV Vis.....                                             | 44 |
| Ryc.9. Widmo ESI-MS standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty, tryb jonizacji: pozytywny oraz negatywny..... | 47 |
| Ryc.10. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 1_SLN_UT_HPH_300bar.....                                       | 54 |
| Ryc.11. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 2_UT_30s_kwas galusowy.....                                    | 55 |
| Ryc.12. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 3_UT_30s_EGCG.....                                             | 56 |
| Ryc.13. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 4_UT_30s. ....                                                 | 56 |
| Ryc.14. Porównanie średniej wielkości cząstek dla 5_UT_60s_EGCG.....                                             | 57 |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Ryc.15. Zmiana absorbancji EGCG w czasie.....                             | 59 |
| Ryc.16. Zdolność wygaszania rodnika DPPH• przez badane roztwory EGCG..... | 60 |
| Ryc.17. Ilość uwolnionego EGCG z podłoża farmaceutycznego w czasie.....   | 62 |

## 13. Spis tabel

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tab.1. Właściwości EGCG.....                                                                         | 22 |
| Tab.2. Oznaczenie materiałów zsyntetyzowanych w pracy.....                                           | 33 |
| Tab.3. Ilości użytych związków do otrzymania stałych nanocząstek lipidowych.....                     | 37 |
| Tab.4. Przygotowanie formulacji hydrożelu z różną zawartością EGCG.....                              | 43 |
| Tab.5. Wartości parametrów pomiaru badania uwalniania EGCG.....                                      | 45 |
| Tab.6. Wyniki pomiaru potencjału Zeta dla badanych próbek [jednostki dla wszystkich danych –mV]..... | 49 |
| Tab.7. Wyniki pomiaru Pdl dla badanych próbek.....                                                   | 51 |
| Tab.8. Wyniki pomiaru Z-Ave dla badanych próbek.....                                                 | 53 |

## 14. Spis równań

|                 |    |
|-----------------|----|
| Równanie 1..... | 40 |
| Równanie 2..... | 44 |
| Równanie 3..... | 45 |
| Równanie 4..... | 60 |

## 15. Załącznik-zgoda komisji bioetycznej

Poznań, 02.11.2021 r.

Beata, Marta Kurczoba  
Imię i nazwisko

Wydział Chemii UAM  
miejsce realizowania pracy naukowej

781 108 924  
genesis16@wp.pl  
dane do kontaktu (telefon/e-mail)

Sz. Pan  
Prof. dr hab. Maciej Krawczyński  
Przewodniczący Komisji Bioetycznej  
przy Uniwersytecie Medycznym  
w Poznaniu

Szanowny Panie Profesorze,

Przygotowuję się do realizacji pracy doktorskiej pt.: „Wpływ pochodnej zielonej herbaty-galusanu epigallokatechiny na przenikanie przez barierę imitującą błonę śluzową”, która nie posiada cech eksperymentu medycznego. Badania laboratoryjne wykonywane będą na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu.

Proszę o potwierdzenie, że prowadzone przeze mnie badanie nie jest eksperymentem medycznym i nie wymaga opinii Komisji Bioetycznej.

**BADANIE NIE NOSI CECH  
EKSPERYMENTU  
MEDYCZNEGO**

03 LIS. 2021

**PRZEWODNICZĄCY  
KOMISJI BIOETYCZNEJ**  
*Maciej Krawczyński*  
prof. dr hab. Maciej Krawczyński

*Beata Kurczoba*  
podpis studenta

*Maciej Krawczyński*  
podpis promotora

*[Signature]*