

## RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Musielak zatytułowanej „Nanostrukturalne materiały oparte na krzemionce oraz materiałach typu lipidowego, jako nośniki substancji czynnej”, opracowana na zlecenie Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (L. dz. WCH/441/KZ/2022) z dnia 2 listopada 2022 r.

### Uwagi ogólne

Pani mgr inż. Ewelina Musielak wykonała pracę doktorską pod opieką promotorów Pani Profesor dr hab. Izabeli Nowak oraz Pani dr hab. Agnieszki Feliczak-Guzik prof. UAM w Zakładzie Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tematyka recenzowanej pracy mieści się w nurcie prowadzonych badań dotyczących aktualnej problematyki projektowania nowych systemów dostarczania leków bazujących na biokompatybilnych i nietoksycznych materiałach zapewniających możliwość kontrolowanego uwalniania aktywnej substancji w określonym czasie. W ramach przedstawionej pracy przeprowadzono kompleksowe badania obejmujące opracowanie metod syntezy stałych nanocząstek lipidowych i zeolitów hierarchicznych (glinokrzemianów szkieletowych), charakterystykę ich właściwości fizykochemicznych oraz opracowanie procedur inkorporacji do zsyntezowanych materiałów (jak również uwalniania) substancji bioaktywnej pochodzenia roślinnego (kurkuminy).

### Ocena formalna i merytoryczna pracy.

Praca doktorska Pani mgr inż. Eweliny Musielak została przedstawiona w formie zawierającej wszystkie niezbędne elementy rozprawy naukowej. Generalnie praca jest bardzo dobrze ustrukturyzowana i składa się ze wstępu, części literaturowej zawierającej logicznie ułożone tematyczne rozdziały (nowoczesne nośniki substancji aktywnych; nanocząstki lipidowe; materiały porowate; zeolity hierarchiczne i ich historia; synteza zeolitów hierarchicznych; zeolity hierarchiczne, jako nośniki substancji aktywnych; substancje czynne; kurkumina), opisy metod instrumentalnych stosowanych w badaniach do charakterystyki właściwości fizykochemicznych syntezowanych kompozytów, określenia celu pracy, części eksperymentalnej zawierającej omówienie wyników badań (synteza stałych nanocząstek lipidowych oraz hierarchicznych zeolitów, jako nowoczesnych nośników substancji aktywnych), podsumowania i wniosków, materiałów dodatkowych niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz spisu cytowanej literatury. Rozprawa doktorska zawiera też wykaz skrótów używanych w pracy, życiorys naukowy Doktorantki, listę publikacji i zgłoszeń patentowych, listę prezentacji na konferencjach naukowych, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, oświadczenia współautorów oraz przedruk publikacji stanowiących podstawę rozprawy naukowej Doktorantki. Niestety nie znalazłem uzasadnienia zamieszczenia w pracy materiałów dodatkowych niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Rozprawa jest napisana poprawnym językiem naukowym w sposób przejrzysty, jednoznaczny i z zachowaniem spójności wypowiedzi. Trafnie udokumentowana w postaci licznych tabel, rysunków oraz schematów, co pomaga łatwiej zorientować się w treści

prezentowanych wyników badań. Dobór wykorzystanych w pracy źródeł literaturowych świadczy o dobrym rozpoznaniu Doktorantki w podejmowanej tematyce badawczej.

We Wstępie do swojej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Musielak w bardzo przejrzysty sposób określa aktualność podejmowanej w pracy tematyki badawczej, związanej z rozwojem metod syntezy innowacyjnych materiałów, jako efektywnych nośników substancji aktywnych, które zapewnią celowe dostarczanie tych substancji w organizmie oraz kontrolowane ich uwalnianie w określonym czasie. Doktorantka akcentuje uwagę na dobrej perspektywie syntezy nowych, skutecznych nośników substancji aktywnych dla potrzeb medycznych czy też przemysłu kosmetycznego na bazie materiałów o hierarchicznej strukturze porowatej, zwłaszcza glinokrzemianów szkieletowych – zeolitów oraz na bazie stałych nanocząstek lipidowych, które są biokompatybilne i nietoksyczne. Uzasadniono też wybór inkorporowania kurkuminy, jako naturalnej aktywnej substancji leczniczej do syntezowanych materiałów - nośników. W zwięzły sposób są określone główne cele i zadania badawcze.

Część Literaturowa zarówno jak Część Eksperymentalna pracy są w istocie swojej przewodnikiem do czterech prac opublikowanych przez Doktorantkę w czasopismach naukowych. Te cztery publikacje są podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej. Dwie publikacje są przeglądowe i należą do części literaturowej. Jedna praca przeglądowa opublikowana w *Materials* (IF = 3,623) dotyczyła analizy prowadzonych badań w zakresie syntezy i perspektywy zastosowania w medycynie stałych nanocząstek lipidowych. W drugiej pracy przeglądowej, opublikowanej w czasopiśmie *Przemysł Chemiczny* (IF = 0,464), Doktorantka opisała stan wiedzy na temat możliwości zastosowania zeolitów jako nośników leków. W całości część literaturowa jest dobrym informacyjnym fundamentem, uzasadnieniem oraz motywacją do zaplanowania i przeprowadzenia badań eksperymentalnych.

Pani mgr inż. Eweliny Musielak w pierwszej swojej pracy przeglądowej (D1) bardzo szczegółowo i w kompetentny sposób przedstawia literaturowe wiadomości o budowie, właściwościach oraz zastosowaniu stałych nanocząstek lipidowych (SLN) oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych (NLC). Podaje usystematyzowaną wiedzę o wcześniej przeprowadzonych badaniach inkapsulacji różnych substancji aktywnych w układach opartych na strukturze lipidowej (SLN lub NLC), zwłaszcza zastosowania nanocząstek lipidowych, jako nośników mRNA w szczepionkach przeciwko wirusowi SARS-CoV-2. W bardzo wnikliwy sposób, na podstawie doniesień literaturowych uzasadnia, że nanocząstki lipidowe mogą być najbardziej skutecznymi nośnikami substancji czynnych ze względu na szerokie spektrum możliwości modyfikacji ich powierzchni, możliwości zwiększenia biodostępności leków, kontrolowanego uwalniania substancji czynnych, poprawy przepuszczalności wewnątrzkomórkowej i kontroli dostarczania leków do miejsc docelowych oraz ochronę substancji aktywnej przed fizjologicznym pH, wilgocią oraz aktywnością enzymów. W tym przeglądzie Autorka w klarowny sposób przedstawiła możliwości i korzyści inkapsulacji substancji aktywnych w układach nośników lipidowych. Wysoki poziom opublikowanej pracy został zauważony przez towarzystwo naukowe, o czym świadczą liczne cytowania. W ciągu niepełnego roku od opublikowania w czasopiśmie praca była zacytowana 16 razy.

W kolejnej drugiej pracy przeglądowej (D2) Doktorantka zaprezentowała dokładną charakterystykę i możliwości zastosowania zeolitów, jako skutecznych matryc-nośników substancji aktywnych, ze szczególnym uwzględnieniem przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego. Autorka stawia akcent na perspektywie syntezy i zastosowania zeolitów o strukturze hierarchicznej, które wykazują wtórną porowatość i posiadają znacznie większą pojemność sorpcyjną w stosunku do dużych molekuł oraz lepszą przepuszczalność w porównaniu z konwencjonalnymi mikroporowatymi zeolitami. Skupia znaczną uwagę na opisie stosowanych metod syntezy oraz specyficzności cech zeolitów hierarchicznych, zwłaszcza ich odpowiedniości do pożądaných właściwości, funkcji, oraz bezpieczeństwa w nowoczesnych nośnikach leków. Referując dane literaturowe dotyczące właściwości

zeolitów hierarchicznych wymienia też ich właściwości katalityczne. I w tym aspekcie nasuwa się pytanie czy te właściwości katalityczne zeolitów są pożądane w nośnikach leków. Czy nie spowodują one zagrożenia katalitycznej transformacji/degradacji leku? Niektóre użyte w pracy referowane formułowania są też zbyt dyskusyjne: „Miejsca kwasowe w zeolitach hierarchicznych ulokowane są na zewnątrz ziarna i są słabsze w porównaniu z konwencjonalnymi zeolitami...”, „Wpływa to bezpośrednio na wymiary molekuł, które mogą zostać zwiększone, co umożliwia szersze ich zastosowanie [46]”. Niejasny jest cel opisu problemu dezaktywacji zeolitów używanych w krakingu katalitycznym węglowodorów w przekroju tematu pracy. Doniesienie literaturowe, brzmiące: „Do najważniejszych zalet zeolitów hierarchicznych zalicza się niszczenie komórek zapalnych i nowotworowych [62]”, znajdujące się w części przeglądu dotyczącej zastosowania zeolitów hierarchicznych, jako nośników substancji aktywnych, wydaje się być nieco kontrowersyjnym.

Celem nadrzędnym rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Musielak było: „opracowanie powtarzalnej metody syntezy zeolitów hierarchicznych oraz stałych nanocząstek lipidowych, (SLN), jako formy nośników dla substancji aktywnej pochodzenia roślinnego, takiej jak kurkumina (CUR)”. Uzasadnieniem określonego celu oraz zadań badawczych pracy jest aktualny problem powiązany ze wzrostem zapotrzebowania w medycynie na nowe skuteczne materiały dostarczania związków bioaktywnych do organizmu człowieka. Główne zadania badawcze dotyczyły zaprojektowania i syntezy zeolitów hierarchicznych oraz stałych nanocząstek lipidowych, inkorporacji kurkuminy do struktury zsyntezowanych materiałów, charakteryzacji właściwości fizykochemicznych zsyntetyzowanych materiałów „pustych” i załadowanych substancją aktywną, oraz określenia profili czasowych uwalniania inkorporowanej kurkuminy.

Do charakteryzacji badanych materiałów wykorzystano szereg właściwie dobranych metod instrumentalnych: dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD); skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM); mikroskopii konfokalnej; niskotemperaturowych izoterm adsorpcji/desorpcji azotu; analizy elementarnej; spektroskopii w podczerwieni; transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM); dynamicznego i elektroforetycznego rozpraszania światła. Zastosowanie takiego szerokiego spektrum metod w badaniach podkreśla dobre profesjonalne kompetencje Doktorantki. Natomiast, w opisie metod instrumentalnych niektóre określenia możliwości ich stosowania być może są zbyt dowolne: „XRD...umożliwia również obserwację przejść fazowych oraz reakcji katalitycznych przebiegających na badanej powierzchni”; „dzięki spektroskopii możliwa jest analiza zarówno struktury cząsteczek, jak i ich oddziaływania z otoczeniem”.

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Musielak opiera się na dwóch pracach opublikowanych w czasopismach naukowych. Jedna praca „Optimization of the conditions of solid lipid nanoparticles (SLN) synthesis” oznaczona symbolem D3, opublikowana w czasopiśmie *Molecules* z współczynnikiem IF = 4,412. Druga praca D4 „Modification and functionalization of zeolites for curcumin uptake” opublikowana w czasopiśmie *Materials* z współczynnikiem IF = 3,748. W obydwu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co jednoznacznie podkreśla Jej istotny wkład.

W przedstawionej do rozprawy doktorskiej publikacji D3 zaprezentowane są wyniki syntezy stałych nanocząstek lipidowych (SLN) inkorporowanych substancją aktywną (kurkumina). Można zauważyć, że w podstawie uzyskanych w tej pracy wyników leży dobrze przemyślany, logiczny i konsekwentny plan zadań badawczych. Ważne znaczenie miało dokonania udanego doboru odpowiedniego lipidu do badanej substancji aktywnej (kurkuminy) na początkowym etapie badań. Dalej było opracowanie powtarzalnej metody syntezy stałych nanocząstek lipidowych na bazie lipidu Softisan®601 i surfaktantu Poloxamer 188 oraz opracowanie procedur inkorporacji kurkuminy do zsyntezowanych stałych nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem homogenizatora szybkoobrotowego oraz homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco. Konsekwentnie przeprowadzono

kompleksowe badanie właściwości fizykochemicznych zsyntezowanych materiałów oraz analiza kinetyki uwalniania kurkuminy z przygotowanych preparatów kosmetycznych (hydrożel, emulsja o/w) bazujących na nanocząstkach lipidowych inkorporowanych kurkumina. Badanie wpływu różnych parametrów (szybkość homogenizacji, czas homogenizacji, ciśnienie, wstępna homogenizacja, czas działania ultradźwiękami oraz rodzaj układu homogenizującego - otwarty/zamknięty) pozwoliło Doktorantce na optymalizację procesu syntezy lipidowej matrycy-nośnika. Końcowym wynikiem przeprowadzonych badań było uzyskanie nowego skutecznego nośnika substancji bioaktywnej pochodzenia roślinnego - kurkuminy.

Zastosowanie techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS) dało możliwość Doktorantce na uzyskanie informacji o wielkości otrzymanywanych nanocząstek lipidowych. Według tych danych średnia wielkość syntezowanych SLN inkorporowanych kurkumina mieściła się w zakresie 200 – 400 nm. Niestety, obrazy SEM (D3, tab.3) nie potwierdzają takiej dyspersyjności zsyntezowanych cząstek lipidowych.

Syntezowane nanocząstki lipidowe badano za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD), dzięki czemu zidentyfikowano ich strukturę. Według interpretacji Doktorantki, analiza XRD w zakresie niskich kątów wykazała, że inkorporacja kurkuminy do stałych nanocząstek lipidowych nie spowodowała zaburzenia struktury całej cząstki. W tym wypadku nie zostało wyjaśniono dlaczego charakterystyczny refleks w zakresie  $2\theta = 2^\circ$ - $2,5^\circ$  wykryty dla próbki referencyjnej („puste” stałe nanocząstki lipidowe, SLN1) zanika w próbkach SLN inkorporowanych kurkumina (SLN19) (D3, rys. 6A). Nie została wyjaśniona też przyczyna zaniku w próbkach SLN inkorporowanych kurkumina (SLN19) szerokiego pasma (charakterystycznego dla struktur amorficznych) wykrytego dla SLN1 w zakresie kątów  $2\theta$   $13^\circ$ - $15^\circ$  (D3, rys. 6B).

Interesującymi są wyniki Doktorantki dotyczące temperaturowych granic przejść fazowych syntezowanych nanocząstek lipidowych uzyskane na podstawie przeprowadzonych badań przy pomocy różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC).

Zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) pozwoliło Doktorantce na opisanie strukturalnych i morfologicznych osobliwości zsyntezowanych nanocząstek lipidowych niemodyfikowanych, inkorporowanych kurkumina oraz samej kurkuminy. Moim zdaniem skala zastosowanego w badaniach SEM powiększenia nie pozwoliła (była zbyt mała, pasek skali na zdjęciach 2-20 mkm) na dokonanie analizy morfologii czy struktury badanych cząstek lipidowych na poziomie nanoskali. Na przedstawionych zdjęciach SEM widoczne są aglomeraty stałych cząstek lipidowych o nieregularnych kształtach i powierzchniach oraz rozmiarach w zakresie 1-15 mikrometrów. W tekście rozprawy doktorskiej podpis do tabeli 3. „Obrazy SEM dla kurkuminy, SLN1 i SLN19 w powiększeniu 10  $\mu\text{m}$ ”, a mianowicie wskazanie powiększenia, 10  $\mu\text{m}$ , nie jest odpowiednim (możliwe, jest to niefortunne przetłumaczenie z angielskiego „ a scale bar of 10  $\mu\text{m}$ ” w pracy D3).

Zastosowanie mikroskopii konfokalnej mało na celu wyjaśnić charakter dystrybucji kurkuminy w matrycy lipidowej, biorąc pod uwagę zdolności kurkuminy do autofluorescencji. Po analizie próbki za pomocą mikroskopu konfokalnego Doktorantka wywnioskowała, że substancja aktywna jest wbudowana w stałe nanocząstki lipidowe. Niestety nie wyjaśniono (opisano), czym jest to „wbudowanie”. Analiza przedstawionych zdjęć budzi wątpliwości co do możliwości jednoznacznego określenia mechanizmu inkorporacji substancji aktywnej w stałe nanocząstki lipidowe przy zastosowaniu takiej skali powiększenia.

Ważnymi są uzyskane przez Doktorantkę wyniki badania profili uwalniania kurkuminy z przygotowanych preparatów kosmetycznych bazujących na zsyntezowanych nanocząstkach lipidowych z inkorporowaną kurkumina, które wykazały stopniowe, wydłużone w czasie uwalnianie kurkuminy i zależność szybkości uwalniania substancji czynnej od rodzaju formułacji kosmetycznej.

W kolejnej pracy eksperymentalnej [D4] przedstawiono interesujące wyniki przeprowadzonych badań dotyczących syntezy zeolitów hierarchicznych inkorporowanych substancją bioaktywną (kurkumina). Praca zawiera precyzyjnie opracowane metody syntezy zeolitów hierarchicznych oraz metody wprowadzenia do ich struktury kurkuminy. Zeolity hierarchiczne zsyntezowano na bazie komercyjnego zeolitu typu FAU z wykorzystaniem w procesie syntezy jonowego surfaktantu CTABr, niejonowych surfaktantów Lutrol F127 i Brij S10 oraz dodatku różnych ilości TEOS. Przeprowadzono kompleksową charakterystykę właściwości zsyntezowanych zeolitów hierarchicznych oraz uzyskanych kompleksów kurkumina-zeolit hierarchiczny. Zbadano kinetykę uwalniania inkorporowanej kurkuminy.

W badaniach właściwości syntezowanych materiałów Doktorantka wykorzystwała szereg różnych metod instrumentalnych: SEM, TEM, XRD, FTIR, DSC, porozymetria. Taka wszechstronna charakterystyka istotnie podnosi wartościowość otrzymanych wyników przeprowadzonych badań. Na podstawie uzyskanych wyników zostało stwierdzone, że zeolity hierarchiczne syntezowane na bazie zeolitu FAU i jonowego środka powierzchniowo czynnego CTABr są najbardziej wydajnymi nośnikami kurkuminy. Rezultaty badań Doktorantki potwierdziły perspektywy możliwości zastosowania zeolitów hierarchicznych, jako skutecznego porowatego nośnika substancji aktywnych w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych.

Formowanie się w syntezowanych zeolitach wtórnej porowatości w zakresie mezoporów (korzystnych dla dyfuzji i akumulacji kurkuminy) zostało potwierdzone przez Doktorantkę za pomocą dwóch metod: dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD) oraz niskotemperaturowych izoterm adsorpcji/desorpcji azotu. Do charakteryzacji wiązań strukturalnych zsyntezowanych materiałów zastosowano właściwą metodę - spektroskopię w podczerwieni. Zastosowanie analizy elementarnej pozwoliło na określenie organicznej składowej (C, N, H, S) w otrzymanych materiałach oraz pośrednie oszacowanie zawartości inkorporowanej kurkuminy. Jedynie rezultaty elementarnej analizy o procentowej zawartości węgla (C = 30,2%) dla wzorca kurkuminy mogą podważyć poprawność przeprowadzenia tej analizy.

Na podstawie badań z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) Doktorantka słusznie wywnioskowała, że materiały zeolitowe zachowują swoją uporządkowaną charakterystyczną strukturę niezależnie od zastosowanego surfaktantu, co też potwierdzają dyfraktogramy XRD. Takie stwierdzenie jest odpowiednim, jeśli dotyczy pierwotnej struktury krystalicznej zeolitów i szkieletowej porowatości pierwotnej. Potwierdzeniem są dyfraktogramy w zakresie szerokokątowym. Natomiast, ewidentnym jest też wpływ zastosowanych surfaktantów na formowanie się w strukturze zeolitów porowatości wtórnej (efekt łupliwości krystalitów zeolitowych). Potwierdzeniem tego jest powstanie pików na dyfraktogramach w zakresie niskokątowym (D4, Rys. 15A). Dodatkowe informacje o morfologii i strukturze badanych nośników zeolitowych oraz substancji aktywnej Doktorantka uzyskała przy pomocy skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Określenie rozmiaru cząstek kurkuminy: „...kurkumina posiada nieregularny kształt oraz średni rozmiar cząstek” przytoczone w opisie rezultatów badania SEM jest niewłaściwym.

W pracy D4 przedstawiono też wyniki badań izoterm adsorpcji kurkuminy na komercyjnym zeolicie FAU i zeolitach hierarchicznych oraz parametry aproksymacji eksperymentalnych danych izoterm adsorpcji kurkuminy do modeli izoterm adsorpcji Langmuira i Freundlicha. Wartości maksymalnej pojemności sorpcyjnej dla wszystkich zeolitów wykryte w bardzo bliskim zakresie -98-102 mg/g. Wtedy, jeśli sorpcja kurkuminy na komercyjnym zeolicie FAU i zeolitach hierarchicznych jest tak zbliżona, powstaje pytanie o celowości syntezy i wykorzystywania zeolitów hierarchicznych na bazie FAU. Doktorantka zaprezentowała również badania wydajności inkorporowania kurkuminy do komercyjnego zeolitu FAU oraz zsyntezowanych zeolitów hierarchicznych stosując metodę impregnacji. Najwyższa ilość załadowania kurkuminy dla komercyjnego zeolitu FAU/A/CUR150 wyniosła 76,6% oraz 89,6% dla zsyntezowanego zeolitu hierarchicznego

FAU/CTABr/CUR150. Taka wysoka efektywność załadowania (76,6-89,6%) istotnie się różni od efektywności sorpcji (9,8-10,2%) kalkulowanej na podstawie uzyskanych wartości maksymalnej pojemności sorpcyjnej. W opisie wyników inkorporacji stosowanych zeolitów kurkumina zabrakło proponowanych hipotez odnośnie mechanizmów wiązania kurkuminy z powierzchnią zeolitów.

Oceniając część eksperymentalną w całości podkreślam, że badania eksperymentalne Pani mgr inż. Eweliny Musielak zostały zrealizowane odpowiednio do postawionych zadań badawczych i w oparciu o właściwie dobrane metody badań. Uzyskane wyniki są wartościowe, interesujące i zawierają elementy nowości naukowej. Wyniki swoich badań Doktorantka prezentowała na licznych międzynarodowych i krajowych konferencjach (17). Ponadto Pani mgr inż. Eweliny Musielak jest współautorką czterech zgłoszeń patentowych (trzech krajowych oraz jednego europejskiego), co potwierdza aplikacyjność Jej badań.

Wszystkie wskazane w recenzji uwagi, wątpliwości i dostrzeżone uchybienia mają charakter całkowicie dyskusyjny, nie pomniejszają wartości merytorycznej i nie zmieniają pozytywnej oceny przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Eweliny Musielak zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań i spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 r. poz. 1668). W związku z tym, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Eweliny Musielak do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie Jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie chemia.

Toruń, 2023-01-02

