



**KF NICCOLUM** Sp. z o.o.  
ul. Tadeusza Kościuszki 43  
05-270 Marki, mazowieckie  
NIP: 1251632838, REGON: 361408655

Warszawa, dn. 03.01.2018 r.

## **RAPORT PODSUMOWUJĄCY**

**/01.10.2016 - 31.12.2017/**

***Projekt pn. „Opracowanie technologii otrzymywania substancji chelatujących jony chromu i kobaltu, opartej na syntezie aktywnych biopolimerów”  
/Nr RPMA.01.02.00-14-5770/16/***



**Dr Izabela Zawisza**  
Członek zarządu



## SPIS TREŚCI

I.	ANALIZA POZNAWCZA – ZADANIE NR 1 .....	3
	1. Źródła ekspozycji na chrom oraz mechanizm indukowania i epidemiologia alergii chromowej	3
	2. Źródła ekspozycji na kobalt i epidemiologia alergii kobaltowej .....	4
	3. Zastosowanie modyfikowanych biopolimerów do wychwytywania jonów Cr(III)/Cr(VI) i Co(II)	5
II.	SYNTEZA NOWYCH SUBSTANCJI – ZADANIE NR 2 .....	8
	1. Procedura sprzęgania chitozanu z modyfikatorem .....	8
	2. Wstępna ocena wytworzonych substancji aktywnych .....	8
III.	OPTIMALIZACJA PROCESÓW SYNTEZY SUBSTANCJI AKTYWNEJ – ZADANIE NR 3.....	10
	1. Optymalizacja syntezy substancji aktywnej – etap kondycjonowania i etap sprzęgania .....	10
	2. Ocena właściwości fizykochemicznych wytworzonych substancji aktywnych .....	11
	3. Optymalizacja etapu oczyszczania substancji aktywnej .....	13
	4. Podsumowanie .....	14
IV.	BADANIA BIOINFORMATYCZNE – ZADANIE NR 4 .....	15
V.	CHEMICZNA ANALIZA STRUKTURALNA, JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA SUBSTANCJI AKTYWNYCH – ZADANIE NR 5...	16
	1. Analiza elementarna: oznaczenie zawartości C, H, N, S.....	16
	2. Analiza spektroskopii UV-Vis .....	17
	3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego – <sup>1</sup> H NMR, 2D <sup>13</sup> C NMR .....	27
	4. Oznaczanie Co(II), Cr(VI) i Ni(II) techniką ICP-MS .....	28
VI.	BADANIA NA SZTUCZNEJ SKÓRZE, NA KOMÓRKACH HODOWLANYCH – ZADANIE NR 6 .....	31
	1. Cel badań.....	31
	2. Metodologia badania .....	31
	3. Dobór testu przeżywalności .....	32
	4. Omówienie wyników .....	34
	5. Podsumowanie i wnioski .....	35
VII.	BADANIA SUBSTANCJI AKTYWNYCH - BADANIA CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ, BADANIA FIZYKOCHEMICZNE, BADANIA TOKSYKOLOGICZNE – ZADANIE NR 7.....	36
	1. Badania dermatologiczne testem kontaktowym półotwartym .....	36
	2. Badania mikrobiologiczne .....	37
	3. Oznaczenie As, Cd, Pb, Ni w surowcach użytych do syntezy substancji aktywnych .....	41
	4. Podsumowanie .....	42
VIII.	WNIOSKI KOŃCOWE .....	43

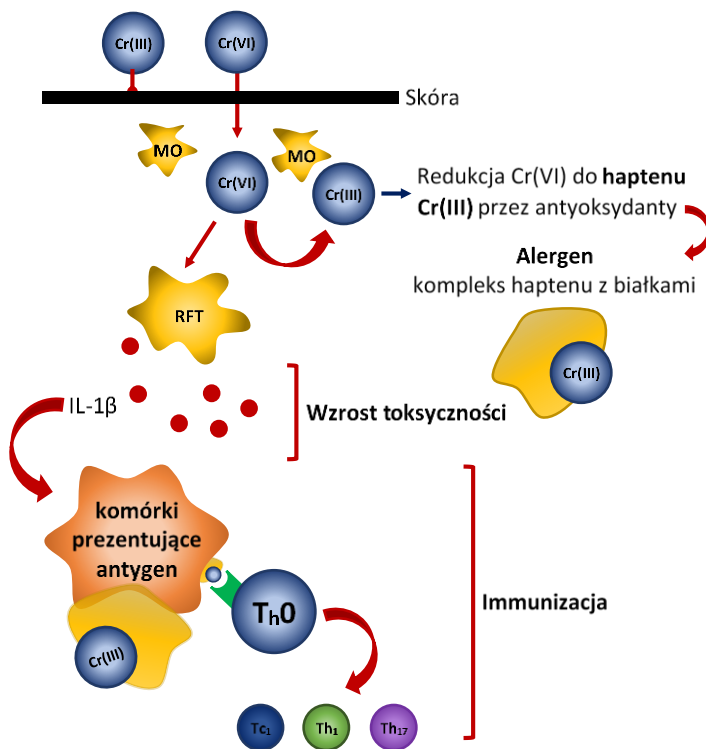
## I. ANALIZA POZNAWCZA – ZADANIE NR 1

### 1. Źródła ekspozycji na chrom oraz mechanizm indukowania i epidemiologia alergii chromowej

Chrom (Cr) należy do grupy pierwiastków powszechnie występujących w środowisku naturalnym, zajmując 20 miejsce pod względem rozpowszechnienia w skorupie ziemskiej. Najważniejszymi, poznanymi naturalnymi zasobami tego pierwiastka są rudy krokitu  $PbCrO_4$  i chromitu  $FeCr_2O_4$ , w których chrom znajduje się na III stopniu utlenienia. Jako pierwiastek zewnętrznoprzejściowy chrom odznacza się zdolnością do tworzenia różnorodnych połączeń, występując w swoich związkach na stopniach utlenienia nawet od -IV do VII. Do najbardziej trwałych form, powszechnie występujących w środowisku naturalnym należą chrom(III) i (VI), o właściwościach odpowiednio silnie kompleksotwórczych i utleniających [1].

Rozwój technologii, industrializacja i współczesne życie stale powodują zwiększenie popytu i zarazem ekspozycji na chrom. Ze względu na szczególne właściwości chrom znajduje bowiem zastosowanie w materiałach powszechnego użytku, takich jak cement, wyroby skórzanego, telefony komórkowe, kosmetyki, detergenty, implanty, chromowane stopy metali czy wysokogatunkowe stale [2].

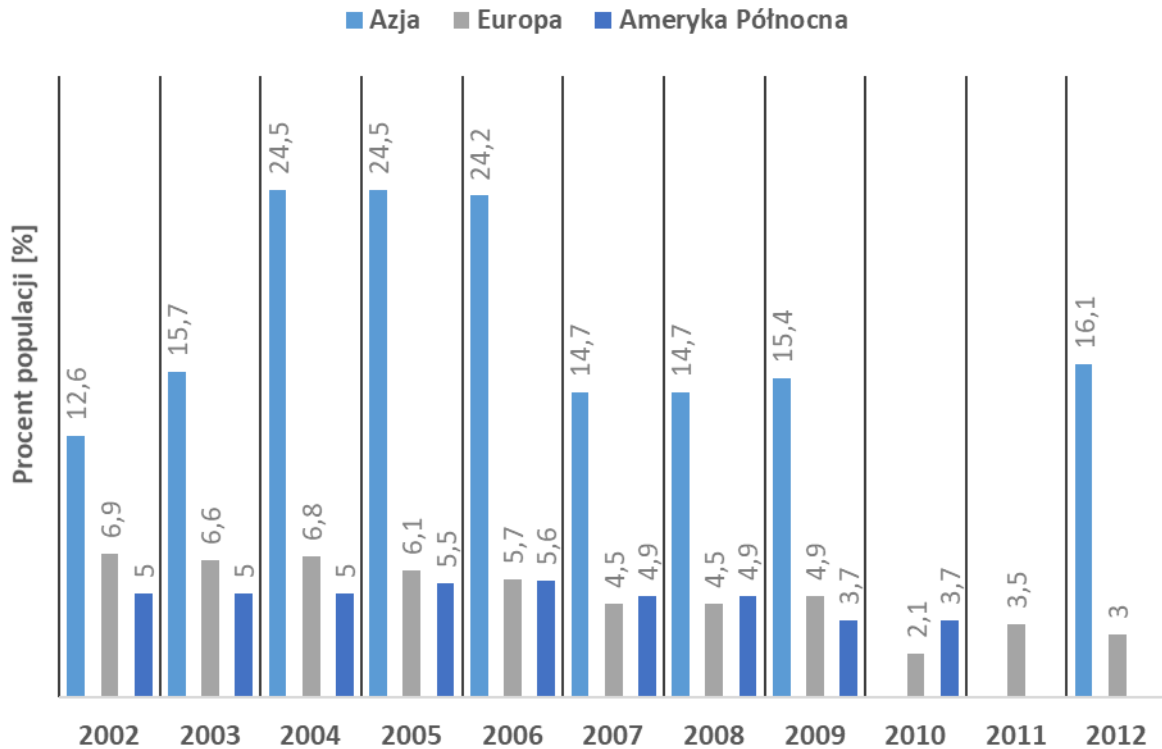
Z punktu widzenia mechanizmu powstawania alergii chromowej (rysunek 1) szczególnie niekorzystna jest ekspozycja na sole chromu(VI), które mogą swobodnie penetrować skórę wywołując rumień, obrzęk, świąd, wysypkę a nawet ciężkie stany zapalne skóry wymagające hospitalizacji [3].



Rys. 1 Mechanizm alergii chromowej (typu IV opóźnionego) indukowany przez chrom(VI) przenikający przez skórę (chrom(III) przenika przez skórę w mniejszym stopniu). W skórze chrom(VI) jest redukowany przez przeciwutleniacze (np. glutation) do chromu(III). Chrom(III) jest haptenu, który oddziałuje z białkami, tworząc pełny alergen. Jednocześnie chrom(VI) prowadzi do gromadzenia się reaktywnych form tlenowych (RFT), jak pokazano dla monocytów (MO). RFT aktywują inflamasom NRLP3, w wyniku czego następuje uwalnianie IL-1β, co potencjalnie aktywuje komórki prezentujące antygen. Komórki te procesują alergen i następnie aktywują swoje dla chromu komórki T, w wyniku czego występuje nadwrażliwość na chrom [3].

Alergia kontaktowa na chrom jest trzecią, po alergii na nikiel i kobalt, najczęściej występującą alergią na metale i dotyczy średnio 3% światowej populacji [4]. Według danych ESSCA (*The European Surveillance System on Contact Allergies*) od roku 2002 do chwili obecnej nastąpił znaczący spadek występowania alergii na chrom wśród krajów europejskich, co jest wynikiem wprowadzenia regulacji ograniczających zawartość tego metalu w różnych materiałach i przedmiotach [2].

Spadek częstości występowania alergii na chrom obserwuje się również w Ameryce Północnej, niemniej jednak tendencja spadkowa nie jest już tak znaczna. Dane pochodzące z klinik azjatyckich wykazują natomiast istotnie wyższą częstość występowania alergii na chrom niż w Europie i Ameryce Północnej (Rys. 2) [2].



Rys. 2 Epidemiologia alergii chromowej dla wybranych rejonów świata w latach 2002-2012 [2].

## 2. Źródła ekspozycji na kobalt i epidemiologia alergii kobaltowej

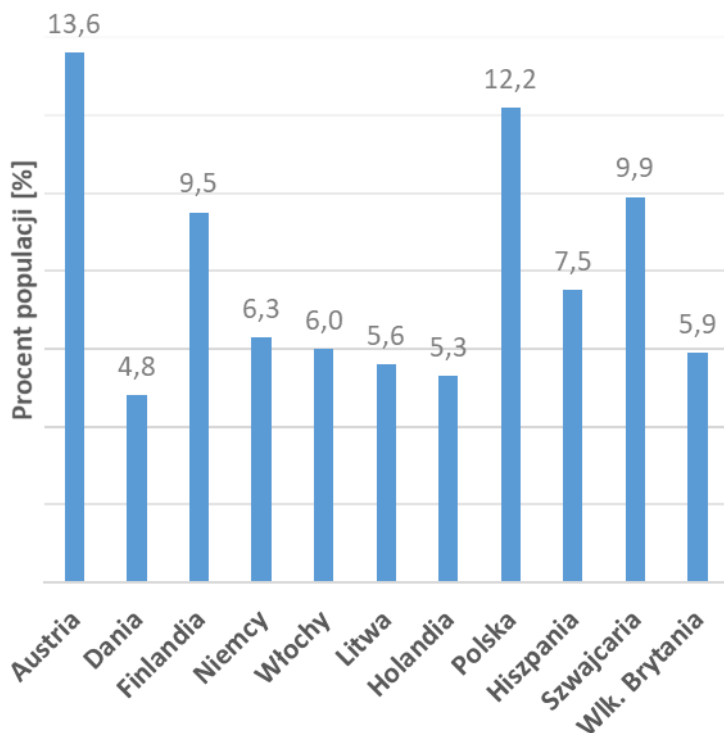
Kobalt (**Co**), stanowiący 0,0025% skorupy ziemskiej, występuje w licznych minerałach siarczkowych, arsenkowych i tlenkowych żelaza, miedzi i niklu. Do najważniejszych minerałów, których pierwiastek ten jest głównym składnikiem, należą smaltyn  $\text{CoAs}_2$ , linneit  $\text{Co}_3\text{S}_4$  oraz kobaltyn  $\text{CoAsS}$ . Przeważającą część kobaltu otrzymywanego na skalę przemysłową jest wydzielana z rud miedzi i żelaza [5].

Kobalt podobnie do chromu znajduje zastosowanie w wielu materiałach codziennego użytku, powodując zwiększoną ekspozycję na ten pierwiastek. Powszechnie stosowany jest do produkcji wyrobów skórzanym, biżuterii, zabawek dla dzieci, implantów ortopedycznych, farb, telefonów komórkowych czy plastikowych materiałów opakowaniowych [6]–[8].

Kobalt jest drugim, po niklu, alergenem kontaktowym i uczula on różne grupy osób, w tym zarówno dzieci, jak i robotników z wypryskiem zawodowym, przy czym istnieją dwa typy alergii na kobalt: izolowana – gdy metal uczula sam oraz współistniejąca z alergią na chrom bądź alergią na nikiel [9].

W alergii kobaltowej szczególnie niekorzystna jest ekspozycja na dwuwartościowy kobalt  $\text{Co(II)}$ , będący haptentem [10]. Podobnie jak chrom może on wywoływać nadwrażliwość typu IV opóźnionego według mechanizmu przedstawionego na rysunku 1. Do najczęstszych objawów alergii kobaltowej należy występowanie ogniska wyprysku (najczęściej w okolicach brzucha, na rękach i w okolicach oczu), "ropienie" małżowin usznych, którym towarzyszy uczucie silnego swędzenia i zaczerwienienia [11].

Alergia na kobalt dotyczy 5-7% światowej populacji [12], przy czym liczba osób uczulonych na ten metal w poszczególnych krajach Europy (Rys. 3) znacznie się waha [13]:



Rys. 3 Epidemiologia alergii kobaltowej w wybranych państwach Europy w latach 2007-2008 [13].

Podobne wahania liczby uczulonych obserwuje się w państwa azjatyckich - alergia na kobalt najczęściej występuje w Tajlandii (16,0%), Kuwejcie (9,1%) oraz Singapurze (8,2%) natomiast kraje, w których obserwuje się średni odsetek uczulenia to m.in. Indie i Turcja [14]–[18]. Amerykańskie badania NACDG (*The North American Contact Dermatitis Group*) wykazały również podobną charakterystykę częstości występowania alergii kobaltowej w Stanach Zjednoczonych [19].

### 3. Zastosowanie modyfikowanych biopolimerów do wychwytywania jonów Cr(III)/Cr(VI) i Co(II)

Chitozan jest biopolimerem powstającym w wyniku deacetylacji chityny, naturalnego surowca pozyskiwanego najczęściej ze skorup krabów, krewetek, kryli i innych skorupiaków. Chitozan, dzięki swoim właściwościom chemicznym znajduje szerokie zastosowanie w farmakologii (kontrolowane uwalnianie leków), biomedycynie (implantowanie), przemyśle spożywczym (dietetyka – wiązanie tłuszczów, redukcja cholesterolu, ochronne powłoki antybakteryjne i antygrzybiczne owoców) oraz oczyszczaniu wody i ścieków, a także usuwaniu jonów metali (głównie ciężkich) [20]–[22].

Struktura chitozanu pozwala wprowadzać różnorodne modyfikacje, takie jak podstawienie (np. karboksylacja, cyjanoetylacja), zmianę długości łańcucha (usieczanie, kopolimeryzacja), depolaryzację chemiczną (kwasy, wolne rodniki) oraz enzymatyczną (np. chitanaza). Ponadto, chitozan może tworzyć struktury morfologiczne, takie jak filmy, włókna, hydrożele, membrany, nanocząstki i mikrokulki itd., co w połączeniu z szerokim spektrum potencjalnych modyfikacji umożliwia – w zależności od wymagań – jego optymalne zastosowanie [22].

Wykazano, iż modyfikacja chitozanu za pomocą aminokwasów (np. glicyny, kwasu asparginowego w środowisku chlorku fluorenylometoksykarbonylu), EDTA czy kwasu p-aminobenzoesowego (PABA) pozwala znacznie poprawić zdolność chelatacji jonów metali [23]–[25].

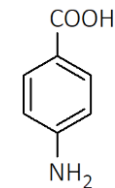
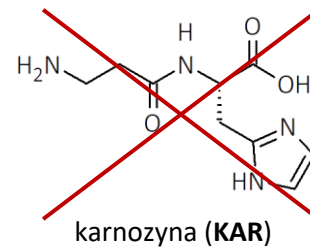
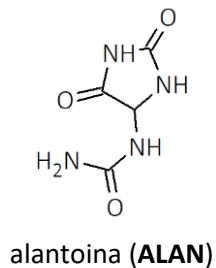
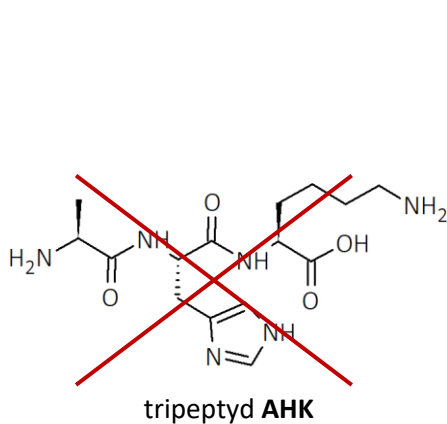


Niemniej, przy opracowywaniu formulacji preparatu kosmeceutycznego należy wziąć również pod uwagę nie tylko zdolność do wychwytywania jonów metali, ale także aktywność biologiczną chelatora i jego zdolność do penetrowania skóry i przenikania do organizmu (*Raport ekspert ds. koordynacji metali – pomoc merytoryczna: Zadanie 1*). Wymienione wcześniej modyfikatory EDTA i PABA mogą wywoływać podrażnienia i odczyn alergiczny skóry, a w skrajnych przypadkach działać toksycznie (EDTA [26]) lub prowadzić do uszkodzenia DNA (PABA [27]). Niemniej ważne jest również, środowisko prowadzenia reakcji modyfikacji chitozanu - wykorzystany przez badaczy w [23] odczynnik sprzęgający - kwas glioksalowy może bowiem wywoływać reakcję alergiczną skóry [28].

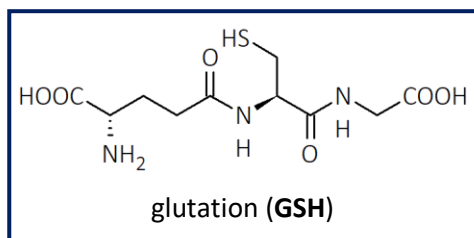
W związku z powyższym, dla potrzeb opracowania formulacji preparatów kosmeceutycznych pozwalających w sposób bezpieczny i skuteczny zapobiegać alergii kontaktowej na chrom i kobalt, zaproponowano modyfikacje biopolimeru – chitozanu w oparciu o biogodne i nietoksyczne komponenty. Strategia syntezy została oparta na modyfikacji biopolimeru – za pomocą molekuly modyfikatora (np. cząsteczki peptydu), w celu zwiększenia zdolności chelatacji metali. Szczególny nacisk położono na biogodność wytworzonych substancji aktywnych i samego procesu ich wytwarzania, co jest niezwykle istotne dla osób ze skórą alergiczną i wrażliwą. Jako modyfikatory zaproponowano następujące związki: tripeptyd **GHK**, melatonina (**MEL**), glutation (**GSH**), karnozyna (**KAR**), kwas p-aminobenzoowy (**PABA**), tripeptyd **AHK**, alantoina (**ALAN**), kwas 2-pikolinowy (**PIK**), kwas laktobionowy (**LA**), N-acetylocysteina (**NAC**). Struktury zaproponowanych modyfikatorów przedstawiono na rysunku 4.

Zanim przystąpiono do badań zaproponowane modyfikatory zostały poddane ocenie przez Eksperta ds. koordynacji metali – prof. dr. hab. Wojciecha Bala. W szczególności, analizie teoretycznej poddano zdolności chelatujące, utleniające lub redukujące jony chromu(III) i (VI) oraz kobaltu(II):

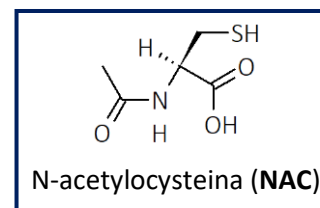
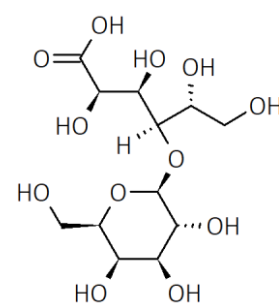
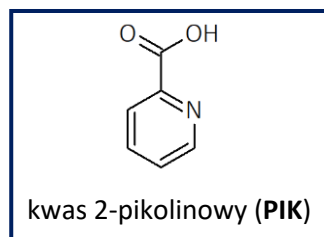
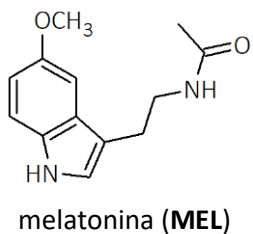
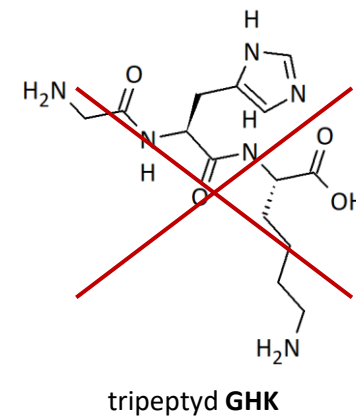
- karnozyna (**KAR**) oraz tripeptydy **GHK** i **AHK** ze względu na zbyt niskie stałe wiązania nie znajdują zastosowania do immobilizacji omawianych jonów, nie mają też pożądaných zdolności redoks;
- glutation (**GSH**) jest potencjalnie dobrym czynnikiem wiążącym jony Co(II), natomiast ze względu na niekorzystne ułożenie grup karboksylowych, może wykazywać niższe powinowactwo do wiązania jonów Cr(III). Jest natomiast dobrym czynnikiem redukującym chromiany, choć N-acetylocysteina (**NAC**) wykazuje większe powinowactwo do redukcji jonów Cr(VI);
- właściwości koordynacyjne kwasu p-aminobenzoowego (**PABA**) zależą od wzajemnej orientacji jego grup funkcyjnych: synergii wiązania zapewnia tylko forma *orto*, natomiast niezbędne byłoby dalsze podstawienie jego cząsteczki dla umożliwienia immobilizacji na nośniku polimerowym jako jednostki chelatującej dla jonu Co(II);
- melatonina (**MEL**) nie posiada zdolności chelatujących, jest natomiast dogodnym i w pełni biogodnym akceptorem rodnikowym, może więc zostać zastosowana jako substancja pomocnicza przy redukcji Cr(VI) do Cr(III), który wykazuje znacznie mniejsze zdolności do penetrowania naskórka;
- kwas laktobionowy (**LA**) może być dobrym czynnikiem wiążącym jony Cr(III), znana jest jednak jego reaktywność wobec chromianów, w której ulega on przemianie do keto-pochodnych, jako produktów utleniania. Ponadto w tym procesie powstają potencjalnie toksyczne, względnie stabilne kompleksy Cr(V), które mogą reagować podobnie jak wolne rodniki [21]. A zatem, konieczne jest przetestowanie reakcji **LA** z chromianami w masie kosmetycznej i rozważenie jego immobilizacji.



kwas p-aminobenzoesowy (**PABA**)



Rys. 4 Wyniki analizy teoretycznej zdolności modyfikatorów do chelatowania, utleniania lub redukcji jonów chromu Cr(VI)/Cr(III) i Co(II). Do najbardziej obiecujących modyfikatorów należą **GSH**, **NAC** i **PIK**. Z kolei, w przypadku tripeptydu **AHK** i **GHK** oraz **KAR**, analiza teoretyczna wykazała, że modyfikatory te nie posiadają pożądanych właściwości. Skutkiem tego, zostały wykluczone z dalszych badań już na etapie analizy poznawczej.



Fundusze Europejskie Program Regionalny

**Wazowsze.** serce Polski

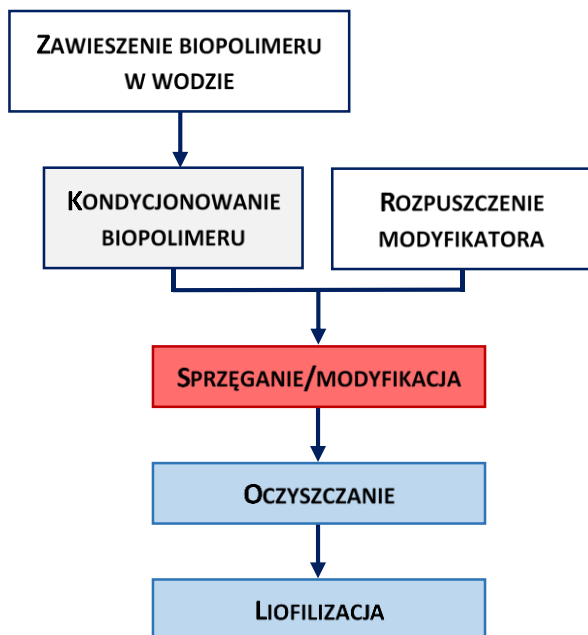
Unia Europejska Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego



## II. SYNTEZA NOWYCH SUBSTANCJI – ZADANIE NR 2

### 1. Procedura sprzęgania chitozanu z modyfikatorem

Substancje aktywne otrzymano w reakcji sprzęgania chitozanu z wybranymi modyfikatorami (Rys. 4) według procedury schematycznie przedstawionej na rysunku 5. Przy przeprowadzaniu reakcji sprzęgania uwzględniono zasady koncepcji zielonej chemii (*green chemistry*), nie dodając rozpuszczalników i odczynników sprzęgających.



Rys. 5 Schemat procesu sprzęgania chitozanu z wybranymi modyfikatorami.

Uzyskano siedem substancji aktywnych – chitozanu modyfikowanego: alantoiną (**CH-ALAN**), glutationem (**CH-GSH**), kwasem laktobionowym (**CH-LA**), kwasem p-aminobenzoesowym (**CH-PABA**), kwasem 2-pikolinowym (**CH-PIK**), melatoniną (**CH-MEL**) oraz N-acetylocysteiną (**CH-NAC**).

### 2. Wstępna ocena wytworzonych substancji aktywnych

Przeprowadzono wstępną ocenę substancji aktywnych poddając je analizie sensorycznej (wygląd, barwa, zapach) i badaniom kolorymetrycznym po dodaniu roztworów metali Cr(III), Cr(VI), Co(II), Ni(II). Ponadto, biorąc pod uwagę, że substancja aktywna jest wprowadzana do formułacji kosmetycznej w postaci żelu, dodatkowo zbadano jej rozpuszczalność w 2% roztworze kwasu mlekowego.

Substancja aktywna występuje w postaci proszku (pylistego lub drobnego) o barwie od jasno- do ciemnożółtej. Szczególnie ważnym parametrem oceny sensorycznej jest zapach, który może mieć znaczenie przy zastosowaniu substancji aktywnej w formułacji kosmetycznej i ocenie konsumenckiej właściwości końcowego produktu. Wszystkie badane substancje mają zapach charakterystyczny, ale co należy podkreślić nie jest on drażniący.

Badaniom kolorymetrycznym poddano substancje aktywne w roztworach metali Cr(III), Cr(VI), Co(II), Ni(II). Choć przedmiotem badań w niniejszym projekcie jest poznanie zdolności substancji aktywnych do chelatowania, redukcji lub utleniania Cr(III)/Cr(VI) i Co(II) to z punktu widzenia analiz porównawczych kluczowe było przeprowadzenie badań również dla Ni(II). W szczególności, porównanie obserwacji dla dobrze przebadanego i poznanego układu **CH-GSH**/Ni(II) pozwala wnioskować o zdolnościach kompleksotwórczych pozostałych substancji.



Zmiany we wszystkich układach koloidalnych obserwowano tuż po zmieszaniu składników, a następnie po upływie 5 i 24 godzin.

W układzie **CH-GSH**/Ni(II) w efekcie chelatowania jonów niklu przez substancję aktywną, po upływie 24 godzin ma miejsce zmiana barwy substancji aktywnej z brązowej ( $t = 0$ ) na zielonobrązową ( $t = 24h$ ). Analogiczną zmianę obserwuje się również w układzie **CH-NAC**/Ni(II). W przypadku pozostałych układów początkowa barwa substancji aktywnej jest jasnozielona ( $t = 0$ ), co może wynikać z braku obecności grupy tiolowej (-SH) w cząsteczce modyfikatora (**GSH** i **NAC** zawierają tę grupę funkcyjną). Po upływie 24 godzin we wszystkich układach nastąpiła zmiana barwy na zieloną. Zmiana barwy substancji aktywnej w roztworze Ni(II) świadczy o zdolnościach chelatujących, utleniających lub redukujących badanych substancji aktywnych.

Dla roztworów substancji aktywnej w Cr(III) we wszystkich układach, zaobserwowano częściowe rozpuszczenie substancji, a następnie zgęstnienie próbki. Ze względu na tę specyficzną właściwość niezwykle trudno jest obserwować zmiany kolorystyczne substancji aktywnej i jednoznacznie wnioskować o jej potencjalnych zdolnościach chelatujących, utleniających lub redukujących. Badanie to nie jest jednak uznawane za kluczowe dla oceny wymienionych powyżej zdolności, biorąc pod uwagę, iż przede wszystkim Cr(VI) ma zdolność przenikania przez skórę, rysunek 1.

W ocenie kolorymetrycznej przeprowadzonej dla Cr(VI) obserwuje się pomarańczową ( $t = 0$ ) barwę substancji aktywnej w przypadku **CH-GSH** i **CH-NAC** oraz żółtą ( $t = 0$ ) w przypadku pozostałych substancji aktywnych. Po upływie 24 godzin we wszystkich badanych układach obserwowana jest wyraźna zmiana barwy: na szarozieloną dla **CH-LA** i ciemnobrązową we przypadku pozostałych substancji. Tak wyraźna zmiana zabarwienia może świadczyć o zdolnościach substancji aktywnych do chelatowania, utleniania lub redukcji Cr(VI).

Ostatnim przebadanym metalem, dla którego dokonano oceny kolorymetrycznej jest Co(II). W przypadku **CH-GSH** i **CH-NAC** obserwuje się brązową ( $t = 0$ ) barwę substancji aktywnej, a w pozostałych przypadkach różową lub jasnoróżową barwę. Efekt kolorymetryczny po upływie 24 godzin jest znacznie mniej zauważalny niż w przypadku badań dla Ni(II) i Cr(VI), za wyjątkiem **CH-GSH**, który zmienia barwę na ciemnobrązową ( $t = 24 h$ ).

Na podstawie przeprowadzonych badań kolorymetrycznych można przyjąć, że otrzymane substancje aktywne wykazują zróżnicowane zdolności chelatujące, utleniające lub redukujące jony chromu(III) i (VI) oraz kobaltu(II).

Wszystkie przebadane substancje aktywne rozpuszczają się w 2% roztworze kwasu mlekowego (co jest niezwykle ważne z punktu widzenia opracowania samej formułacji kosmetycznej i jej stabilności). Żele wykazują pH ok. 5.35-5.79, a zatem w granicach pH bezpiecznego dla skóry.

### III. OPTIMALIZACJA PROCESÓW SYNTEZY SUBSTANCJI AKTYWNEJ – ZADANIE NR 3

Zrealizowane w ramach badań przemysłowych zadanie polegało na przeprowadzeniu optymalizacji syntezy substancji aktywnej w celu **doboru ustawień procesowych** – czasu, temperatury i mocy mikrofal. Prace prowadzono przy wykorzystaniu zestawu do syntezy mikrofalowej, w którego skład wchodził **syntezator MARS 6**, wirówka, zamrażarka i liofilizator.

#### 1. Optymalizacja syntezy substancji aktywnej – etap kondycjonowania i etap sprzęgania

Synteza substancji aktywnej opierała się na modyfikacji chitozanu, zawierającego reaktywne grupy aminowe za pomocą molekuly modyfikatora, z wykorzystaniem tworzenia wiązania peptydowego, estrowego lub oddziaływań van der Waalsa. Synteza prowadzona była w wariacie *green chemistry* (bez dodatku rozpuszczalników i odczynników sprzęgających) wg *know-how* KF Niccolum. Proces syntezy był wieloetapowy, przy czym kluczowe była **moc mikrofal** oraz **czas kondycjonowania** chitozanu w aparacie MARS 6. W celu uzyskania najlepszego jakościowo produktu, poddano optymalizacji te dwa parametry.

Optymalizację procesu syntezy przeprowadzono dla wybranej substancji aktywnej – chitozanu modyfikowanego glutationem. Substancja aktywna została wytworzona w **dwóch wariantach** ustawień parametrów syntezatora MARS 6 dla etapu kondycjonowania oraz etapu sprzęgania:

**Metoda I:** przy **narastającej** mocy mikrofal i czasie **5 minut**.

**Metoda II:** przy **stałej** mocy mikrofal i czasie **4 minut**.

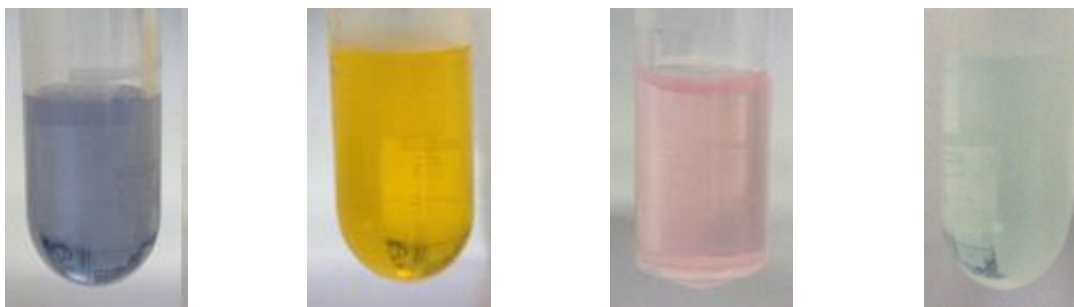
Parametry procesowe dla obu metodyk zestawiono w Tabela 1.

Tabela 1 Parametry prowadzenia procesu syntezy substancji aktywnej (etapu kondycjonowania i etapu sprzęgania) dla **metody I** oraz **metody II**

PARAMETRY:	METODA:	
	I	II
<b>Moc mikrofal</b>	200 W, narastająca	200 W, stała
<b>Czas</b>	5 minut	4 minuty
<b>Temperatura</b>	40 °C	40 °C
<b>Szybkość mieszania</b>	wysoka	wysoka

2. Ocena właściwości fizykochemicznych wytworzonych substancji aktywnych

Wytworzona badanymi metodami (**metoda I** oraz **metoda II**) substancja aktywna – biopolimer modyfikowany glutationem, została poddana badaniom fizykochemicznym. Badania obejmowały: ocenę sensoryczną, wyznaczenie pH 1%-owej zawiesiny wodnej biopolimeru, oznaczenie zawartości siarki oraz analizę kolorymetryczną. Analiza kolorymetryczna polegała na ocenie zmiany barwy po dodaniu roztworu zawierającego jony metalu – chromu i kobaltu. Badania przeprowadzono również dla jonów nikiel(II). Na Rys. 6 przedstawiono wodne roztwory jonów metali Cr, Co oraz Ni o różnych stężeniach.



Rys. 6. Roztwory jonów metali: od lewej – Cr(III) o stężeniu 50 mmol/L, Cr(VI) o stężeniu 25 mmol/L, Co(II) o stężeniu 50 mmol/L, Ni(II) o stężeniu 50 mmol/L

Wyniki przeprowadzonych badań porównawczych przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2 Ocena właściwości fizykochemicznych substancji aktywnej wytworzonej metodą I oraz metodą II


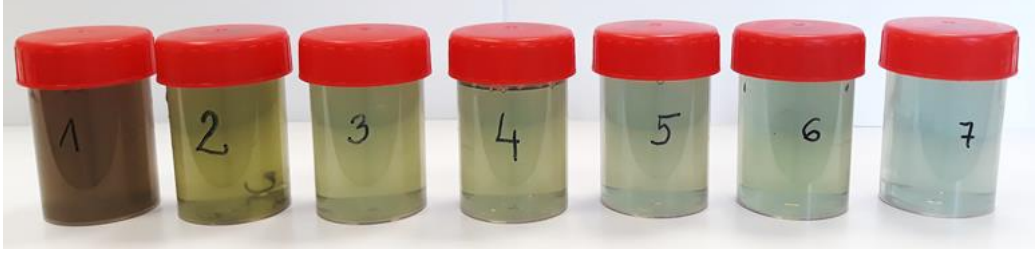

METODA:	I	II
WYGLĄD:	drobny proszek	drobny proszek
BARWA:	jasnożółta	jasnożółta
ZAPACH:	charakterystyczny, niedrażniący	charakterystyczny, niedrażniący
pH (1% ZAWIESINA WODNA):	4,20	4,23
ZAWARTOŚĆ SIARKI [%]:	1,17	1,07
<b>ZABARWIENIE W ROZTWORZE:</b>		
Cr(III)		
Cr(VI)		
Co(II)		
Ni(II)		

### 3. Optymalizacja etapu oczyszczania substancji aktywnej

Badanie przeprowadzono dla wybranej substancji aktywnej – chitozanu modyfikowanego glutationem.

Dalsza optymalizacja procesu syntezy substancji aktywnej obejmowała **etap oczyszczania** prowadzony przy użyciu wirówki. W procesie wykonano 7 wirowań, w wyniku czego zużyto łącznie ok. 6 litrów wody. **Proces oczyszczania** polegał na kilkukrotnym **ptukaniu substancji** aktywnej wodą dejonizowaną bezpośrednio po procesie syntezy, a następnie **odwirowaniu** i zlaniu **supernatantu**. Badano tak uzyskane **supernatanty po kolejnych wirowaniach**. Wyznaczano pH oraz przeprowadzono reakcję barwną z roztworem jonów rozтворów metali z Rys. 6 poprzez dodanie ich do 50 ml supernatantu. Otrzymane wyniki zestawiono w Tabela 3.

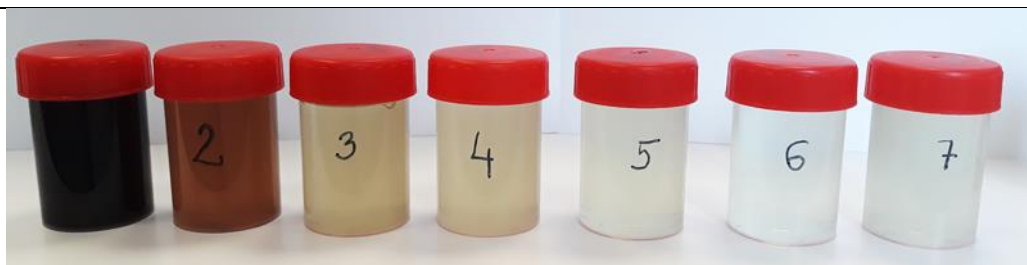
Tabela 3 Proces oczyszczania substancji aktywnej – porównanie otrzymanych supernatantów oraz zmian pod wpływem dodatku roztworu zawierającego jony chromu(III), jony chromu(VI), jony kobaltu(II) oraz jony niklu(II)

WIROWANIE							
	1	2	3	4	5	6	7
Ilość zużytej wody [L]:	0	~2	~1	~1	~1	~0,5	~0,5
pH:	6,19	5,86	5,61	5,51	5,45	5,30	4,97
Zabarwienie po odwirowaniu:							
Zabarwienie po dodatku Cr(III):							
Zabarwienie po dodatku Cr(VI):							

Zabarwienie  
po dodatku Co(II):



Zabarwienie  
po dodatku Ni(II):



#### 4. Podsumowanie

Zrealizowane badania miały na **celu dobór parametrów procesowych** dla syntezy substancji aktywnej metodą syntezy mikrofalowej. Podczas etapu kondycjonowania oraz etapu sprzęgania porównano 2 warianty ustawień parametrów pracy syntezy MARS 6, tj. **narastająca moc mikrofal i czas 5 minut – metoda I**, oraz **stała moc mikrofal i czas 4 minuty – metoda II**. Wydajność procesu syntezy w obu przypadkach była porównywalna, dla **metody I wynosiła 64,6%** a dla **metody II - 63,7%**. Badania kontrolne wykazały brak różnic właściwości fizykochemicznych substancji otrzymanych obiema metodami.

Przy zastosowaniu **metody I** zużycie prądu podczas etapu kondycjonowania i sprzęgania zostało oszacowane na **0,0477 kWh/syntezę**, natomiast przy **metodzie II** zużyto **0,0533 kWh/syntezę**.

Przy założeniu kosztu energii 0,50 zł/kWh odpowiada to odpowiednio wartości 0,024 zł/syntezę oraz 0,027 zł/syntezę. Koszt produkcji **1 kg** substancji aktywnej w przypadku zastosowania **metody II** będzie o **0,018 zł wyższy** niż przy zastosowaniu **metody I**, i **1,8 zł wyższy** dla produkcji **100 kg**.

Stosując **metodę II** czas produkcji ulegnie **skróceniu – o 24 minuty** dla produkcji 1 kg substancji, i **40 godzin dla produkcji 100 kg**. Mając na uwadze powyższe dane, bardziej korzystne będzie zatem prowadzenie procesu syntezy substancji aktywnej stosując **metodę II**.

Badania nad oczyszczaniem substancji aktywnej, które polegały na kilkukrotnym jej płukaniu wodą dejonizowaną bezpośrednio po procesie syntezy, a następnie odwirowaniu i zlanu supernatantu, wykazały natomiast, że **ilość wirowań, tj. 7, jest właściwie dobrana**.

#### IV. BADANIA BIOINFORMATYCZNE – ZADANIE NR 4

Badania bioinformatyczne (*Raport Badania bioinformatyczne – przeszukanie baz danych pod kątem wyodrębnienia chelatorów chromu i kobaltu*) wykonano w celu poszerzenia stanu wiedzy o substancji chemicznych posiadających zdolności chelatujące chrom i kobalt. W analizie bioinformatycznej dla wiązania chromu zaproponowano dimeryczne kompleksy liganda tren [29], [30], sekwencje białkowe inspirowane białkiem ADAM19 (*A Disintegrin And Metalloproteinase domain 19*, [31]), TBA[Cr(SA)<sub>2</sub>(en)] [29] i pochodne fosforanowe [32].

Z kolei, dla wiązania kobaltu zaproponowano zastosowanie pochodnych fosforanowych [32], szereg domen białkowych [33], B-box [34], opatentowany kompleks CTC-96 [35] i syntetyczne sekwencje peptydów E42C i R39C [36].

Rezultaty analizy bioinformatycznej następnie poddano ocenie przez Eksperta ds. koordynacji metali – prof. dr. hab. Wojciecha Bala. W ocenie eksperta szeregi domen białkowych nie znajdują zastosowania do chelatowania jonów kobaltu ze względu na właściwości fizyczne omawianych cząsteczek, tj. bardzo duża masa i objętość elementu wiążącego pojedynczy jon Co(II), a dodatkowo ich zastosowanie nie znajduje uzasadnienia ekonomicznego. Z kolei, CTC-96, ze względu na swoje bardzo interesujące zdolności chelatujące jony Co(II), pomimo iż jest substancją opatentowaną może stanowić inspirację dla opracowania nowych chelatorów immobilizowanych na biopolimerze (w tym przypadku należy jednak przeprowadzić badania czystości patentowej). Z kolei, zastosowanie peptydów inspirowanych sekwencją białka ADAM19 do chelatowania jonów chromu jest w opinii eksperta obiecujące, zarówno alternatywnie, jak i wspólnie z pochodnymi fosforanowymi. Potencjalne zastosowanie pochodnych fosforanowych jest ponadto zgodne z wynikami raportu Eksperta ds. koordynacji metali przeprowadzonego na potrzeby pomocy merytorycznej, omówionej w rozdziale I.

Rezultaty badań bioinformatycznych stanowią wartościowe i inspirujące uzupełnienie analizy poznawczej (rozdział I). Ponadto, poznanie właściwości wyodrębnionych w analizie chelatorów chromu i kobaltu stanowi silne potwierdzenie dla zastosowania modyfikatorów omówionych w rozdziale I.3. i przedstawionych na rysunku 4. Wynika to z faktu, że wyodrębnione chelatory nie spełniają kryteriów istotnych przy doborze surowców do produkcji substancji aktywnej na potrzeby kosmeceutyku. I tak, na podstawie rezultatów badań przedstawionych w raporcie bioinformatycznym, w przypadku kobaltu należy również wziąć pod uwagę, iż:

- dla szeregu domen białkowych, należałoby uwzględnić jeszcze jeden eksperymentalny etap polegający na wyodrębnieniu krótkich wiążących kobalt fragmentów. Jest to podejście niekorzystne zarówno z punktu widzenia przeprowadzenia dodatkowych badań eksperymentalnych, jak i konieczności wprowadzenia dodatkowego etapu w procesie produkcyjnym. Nieznana jest również potencjalna toksyczność takich fragmentów białkowych;
- B-box jest motywem z domeny RING, który ze względu na dużą reaktywność może negatywnie wpływać na stabilność kosmeceutyku.
- modyfikacje CTC-96 (patent) obarczone są ryzykiem naruszenia prawa patentowego;
- peptydy E42C i R39C to sekwencje syntetyczne, a zatem trudno przewidzieć ich toksyczność i efekt działania na skórę człowieka.

Z kolei, w przypadku kobaltu należy również wziąć pod uwagę, iż:

- nieuzasadnione ekonomicznie jest zastosowanie sekwencji białkowych inspirowanych białkiem ADAM19 (koszt zakupu 323 €/1 g przy zakupie 1-20 g – zapytanie ofertowe z dnia 1 sierpnia 2017);
- TBA[Cr(SA)<sub>2</sub>(en)] – substratami w reakcji kompleksowania chromu(III) są drażniące dla skóry i błon śluzowych oczu wodorotlenek tetrabutylamonowy (TBAOH [37]) i etylenodiamina [38];
- dimeryczne kompleksy liganda tren mogą być toksyczne dla skóry człowieka.

W raporcie bioinformatycznym zaproponowano również zastosowanie małych chelatorów z odpowiednimi buforami i związkami zawierającymi grupy fosforanowe.

## V. CHEMICZNA ANALIZA STRUKTURALNA, JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA SUBSTANCJI AKTYWNYCH – ZADANIE NR 5

### 1. Analiza elementarna: oznaczenie zawartości C, H, N, S

Celem ustalenia składu pierwiastkowego substancji aktywnych wykonano analizę elementarną i oznaczono zawartość C, H, N, S. Procent masowy pierwiastków wchodzących w skład badanej substancji przedstawiono w tabeli 4. Rezultaty wszystkich przeprowadzonych badań i metodologię ich przeprowadzenia przedstawiono w *Raporcie końcowym z realizacji umowy na przeprowadzenie badań substancji aktywnych – Analiza elementarna: oznaczenie zawartości C, H, N, S*.

Tabela 4. Wybrane wyniki analizy elementarnej: oznaczenie zawartości C, H, N, S w chitozanie (**CH**) i substancjach aktywnych dla cząsteczki modyfikatora: alantoiny (**CH-ALAN**), glutationu (**CH-GSH**), kwasu laktobionowego (**CH-LA**), kwasu p-aminobenzoesowego (**CH-PABA**), kwasu 2-pikolinowego (**CH-PIK**), melatoniny (**CH-MEL**), N-acetylocysteiny (**CH-NAC**). W tabeli zestawiono wartości średnie z dwóch pomiarów (symbol<sup>-</sup>) oraz obliczony procentowy skład pierwiastkowy, przy założeniu, że cząsteczka modyfikatora przyłącza się do biopolimeru co dziesiąty mer.

Nazwa	$\bar{S}$ [%]	S <sub>obl</sub> [%]	$\bar{C}$ [%]	C <sub>obl</sub> [%]	$\bar{H}$ [%]	H <sub>obl</sub> [%]	$\bar{N}$ %	N <sub>obl</sub> [%]
CH	-	-	40,10	44,72	6,67	6,83	7,37	8,70
CH-GSH	1,10	1,69	41,24	44,23	6,76	6,58	8,14	9,58
CH-PABA	-	-	40,66	46,50	6,73	6,65	7,50	8,91
CH-PIK	-	-	40,58	45,71	6,80	6,42	7,37	8,75
CH-NAC	1,06	1,82	42,67	44,44	6,69	6,67	7,12	8,77
CH-MEL	-	-	41,25	48,03	6,75	6,80	8,00	9,21
CH-ALAN	-	-	39,85	43,89	6,55	6,51	8,34	11,20
CH-LA	-	-	39,61	44,31	6,49	6,67	6,86	7,18

Wyniki analizy elementarnej umożliwiają ustalenie przybliżonego wzoru sumarycznego badanej substancji aktywnej. Szczególnie przydatne są oznaczenia zawartości specyficznych heteroatomów innych niż węgiel czy wodór, potwierdzające obecność modyfikatora w próbce.

W przypadku modyfikacji glutationem (**CH-GSH**) i N-acetylocysteiną (**CH-NAC**) oznaczenie siarki pozwala potwierdzać zmodyfikowanie cząsteczki chitozanu i uzyskanie nowej substancji aktywnej, a także określenie co który mer cząsteczka modyfikatora przyłącza się do chitozanu.

Z kolei, w przypadku pozostałych badanych substancji aktywnych analiza elementarna nie dostarcza jednoznacznych informacji o przeprowadzonych modyfikacjach. Azot, pomimo iż jest specyficznym heteroatomem, to jako pierwiastek znajdujący się w składzie substancji modyfikowanej chitozanu





i siedmiu substancji aktywnych w trzech różnych rozpuszczalnikach, różnicując czas pomiaru celem obserwacji przebiegu kinetyki reakcji kompleksowania). Metodologię i rezultaty przeprowadzonych badań, a także niezbędne dodatkowe badania literaturowe przedstawiono w *Raporcie z zadania nr 5: Analiza spektroskopii UV-Vis*. Ze względu na obszerność tego raportu prezentację wyników ograniczono do wybranych, reprezentatywnych wyników dla substancji aktywnych, których modyfikatory wykazały największą zdolność chelatowania jonów Co(II), Cr(III)/Cr(VI) i Ni(II).

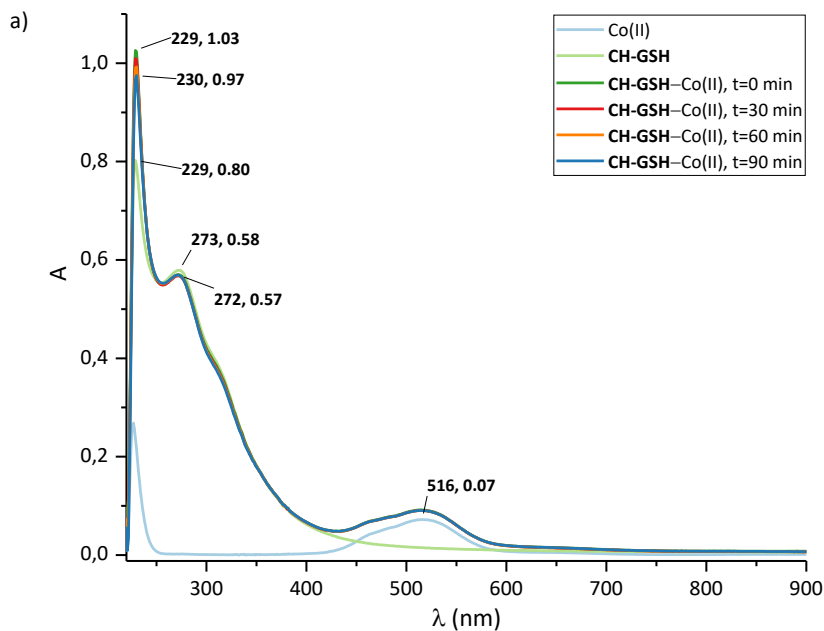
Badania spektrofotometryczne UV-Vis przeprowadzono w trzech rozpuszczalnikach: wodzie, 0,8% kwasie mlekowym i 0,8% buforze mleczanowym (pH = 4,2). Biorąc pod uwagę fakt, że pH kosmeceutyku jest determinowane przez pH skóry i zakres skutecznego działania konserwantu, dalszą prezentację wyników ograniczono do buforu mleczanowego (pH = 4,2), którego pH jest najbardziej zbliżone do rzeczywistych warunków stosowania preparatów zawierających substancję aktywną.

Spośród przebadanych substancji najefektywniej jony Co(II), Cr(III)/Cr(VI) i Ni(II) chelatują **CH-GSH**, **CH-NAC** oraz **CH-PIK** tj. w widmie UV-Vis obserwuje się efekty zmiany absorbancji (efekty hipochromowe i hiperchromowe) i/lub długości fal (przesunięcia hipochromowe i batochromowe)).

Widma substancji **CH-GSH**, **CH-NAC** po dodaniu roztworu jonów kobaltu(II) w czasie  $t = 0, 30, 60$  i  $90$  min oraz **CH-PIK** w czasie  $t = 0$  zestawione z widmami roztworu chlorku kobaltu(II) oraz roztworu odpowiedniej substancji aktywnej w 0,8 % buforze mleczanowym (pH = 4,2) przedstawiono na rysunku 9.

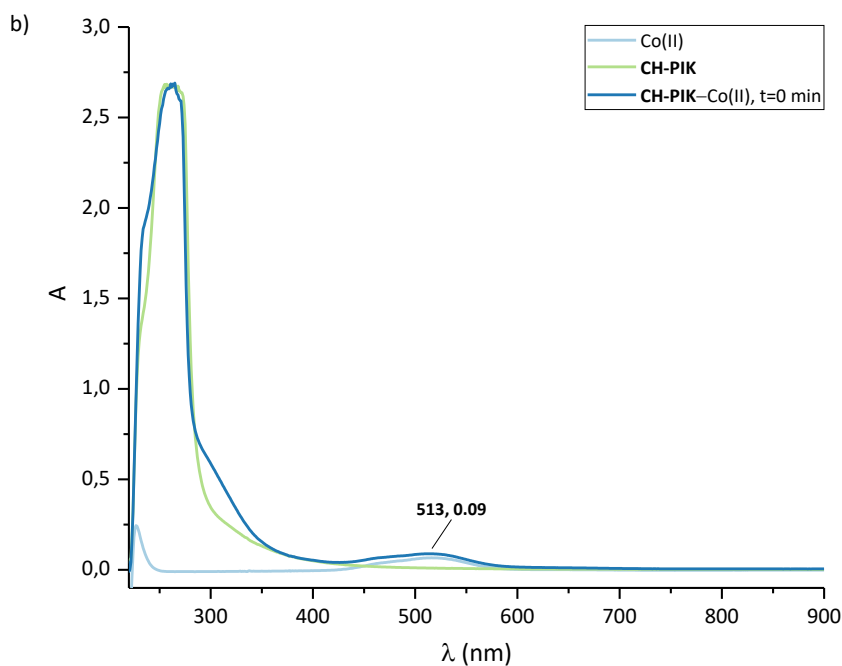
Obserwacja kinetyki wiązania jonów Co(II) przez substancję aktywną **CH-GSH** (rysunek 9 a), przy zastosowaniu spektroskopii UV-VIS pozwala potwierdzić zdolności chelatujące **CH-GSH**. W miarę postępu wiązania jonów Co(II) przy długości fali  $\lambda_{\max} = 229$  nm, charakterystycznej dla **GSH** związanego z nośnikiem polimerowym, obserwuje się niewielki efekt hipochromowy, który w miarę upływu czasu ulega wzmocnieniu z  $A_{\max} = 1,03$ , przy długości fali  $\lambda_{\max} = 229$  nm w czasie  $t = 0$  min do  $A_{\max} = 0,97$  przy długości fali  $\lambda_{\max} = 230$  nm w czasie  $t = 90$  min (efektowi temu towarzyszy niewielkie przesunięcie batochromowe pasma charakterystycznego dla wiązania **GSH-Co(II)**). Jednocześnie, przy długości fali  $\lambda_{\max} = 273$  nm charakterystycznej dla matrycy polimerowej **CH**, obserwuje się słabe przesunięcie hipochromowe do długości fali  $\lambda_{\max} = 272$  nm. Ponadto, niewielki pik charakterystyczny dla kobaltu(II), o intensywności  $A_{\max} = 0,07$ , którego maksimum odpowiada długości fali  $\lambda_{\max} = 516$  nm uległ niewielkiemu wzrostowi intensywności  $A_{\max} = 0,09$ .

W przypadku substancji aktywnej **CH-PIK**, nie było możliwe obserwowanie kinetyki wiązania jonów Co(II) przy zastosowaniu spektroskopii UV-VIS, ze względu na fakt, że widmo nie ulega zmianom w czasie (rysunek 9 b). Również sama analiza widma jest niezwykle trudna ze względu na przekroczenie zakresu pomiaru absorbancji w zakresie długości fal od  $\lambda = 255$  nm do  $\lambda = 275$  nm. Widmo to nie jest jednak prostą sumą widm składników roztworu, co świadczy o natychmiastowym chelatowaniu Co(II) przez **CH-PIK**.

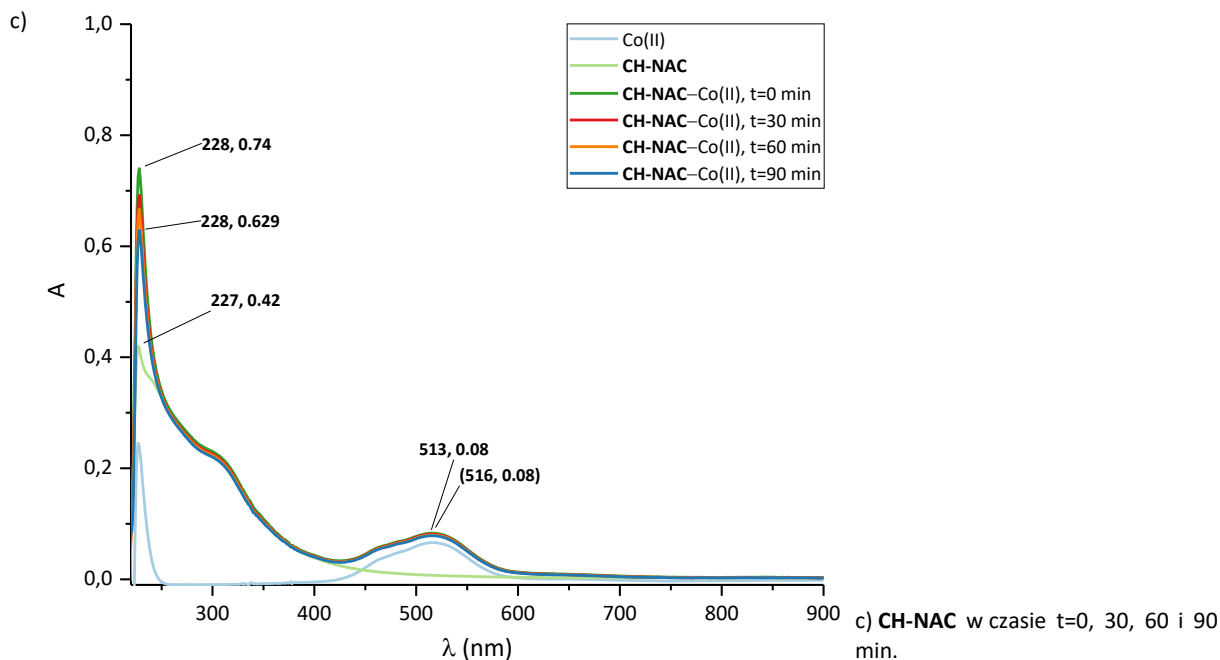


Rys. 9 Porównanie widm UV-Vis 10 mmol/dm<sup>3</sup> roztworu chlorku kobaltu(II) i 0,3 % roztworu substancji aktywnej w 0,8 % buforze mleczanowym (pH = 4,2) oraz tego samego roztworu po dodaniu 10 μl 1 mol/dm<sup>3</sup> roztworu chlorku kobaltu(II) w wodzie (wynikowe stężenie CoCl<sub>2</sub> wyniosło 10 mmol/dm<sup>3</sup>), dla:

a) CH-GSH w czasie t=0, 30, 60 i 90 min.



b) CH-PIK w czasie t=0 (widmo nie ulega zmianom w czasie).



Obserwacja kinetyki wiązania jonów Co(II) przez substancję aktywną **CH-NAC** (rysunek 9 c), pozwala obserwować bardzo podobny przebieg zmian w widmach, jak w przypadku **CH-GSH** (rysunek 9 a). W miarę postępu wiązania jonów Co(II) przy długości fali  $\lambda_{\max} = 228$  nm, charakterystycznej dla **NAC** związanego z nośnikiem polimerowym, obserwuje się niewielki efekt hipochromowy, który w miarę upływu czasu ulega wzmocnieniu z  $A_{\max} = 0,74$  ( $\lambda_{\max} = 228$  nm,  $t = 0$  min) do  $A_{\max} = 0,629$  ( $\lambda_{\max} = 228$  nm,  $t = 90$  min). Również, niewielki pik charakterystyczny dla kobaltu(II) przy długości fali  $\lambda_{\max} = 516$  nm uległ przesunięciu hipsochromowemu do długości fali  $\lambda_{\max} = 513$  nm. Widmo substancji aktywnej po dodaniu jonów kobaltu(II) nie jest sumą widm składników roztworu, co pozwala potwierdzić zdolności chelatujące **CH-NAC** względem jonów Co(II).

Warto jest również zwrócić uwagę, że w przypadku **CH-GSH** (rysunek 9 a) i **CH-NAC** (rysunek 9 b), po czasie  $t = 90$  min obserwuje się zmniejszenie intensywności pików charakterystycznych dla **GSH** i **NAC** związanych z nośnikiem polimerowym. Może to świadczyć o wieloetapowym mechanizmie wiązania jonów kobaltu(II) oraz zróżnicowanej stabilności utworzonych chelatów.

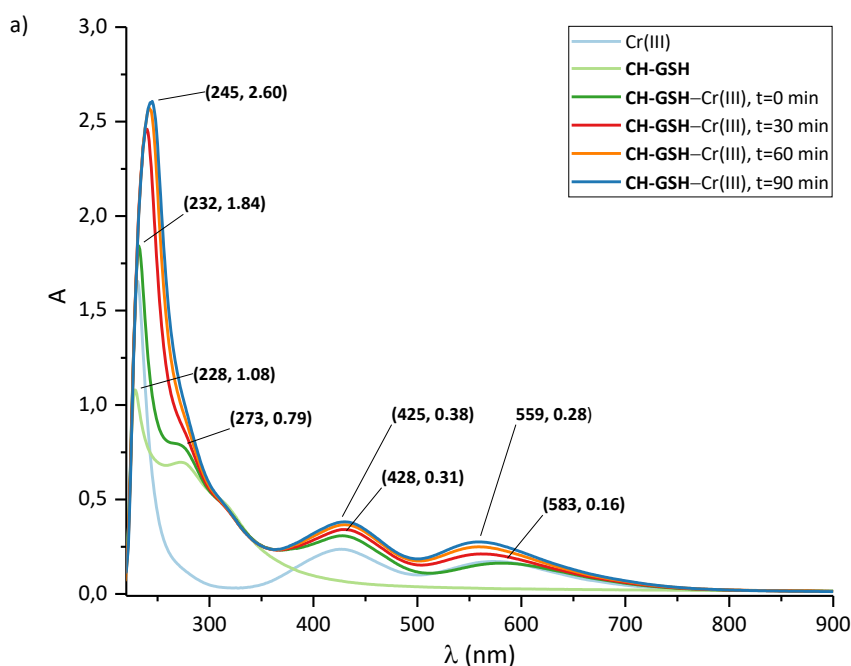
Widma **CH-GSH**, **CH-NAC** oraz **CH-PIK** po dodaniu roztworu jonów chromu(III) w czasie  $t = 0, 30, 60$  i  $90$  min zestawione z widmami roztworu chlorku chromu(III) w wodzie oraz roztworu substancji aktywnych w 0,8 % buforze mleczanowym ( $\text{pH}=4,2$ ) przedstawiono na rysunku 10.

Zastosowanie spektroskopii UV-VIS pozwala potwierdzić zdolności chelatujące **CH-GSH** również względem jonów Cr(III), (rysunek 10 a). W miarę postępu wiązania jonów Cr(III) przy długości fali  $\lambda_{\max} = 232$  nm, charakterystycznej dla **GSH** związanego z nośnikiem polimerowym, obserwuje się efekt hiperchromowy i przesunięcie batochromowe, które ulegają wzmocnieniu z  $A_{\max} = 1,84$  ( $\lambda_{\max} = 232$  nm,  $t = 0$  min) do  $A_{\max} = 2,60$  ( $\lambda_{\max} = 245$  nm,  $t = 90$  min). Równolegle obserwuje się poszerzenie pasma i zanik szerokiego ramienia pików przy długości fali  $\lambda = 273$  nm. W przypadku pików charakterystycznych dla chromu(III) obserwuje się przesunięcie hipsochromowe i efekt hiperchromowy, tj. intensywność  $A_{\max} = 0,31$  pików przy maksimum długości fali  $\lambda_{\max} = 428$  nm dla  $t = 0$  min wzrasta do  $A_{\max} = 0,38$ ,



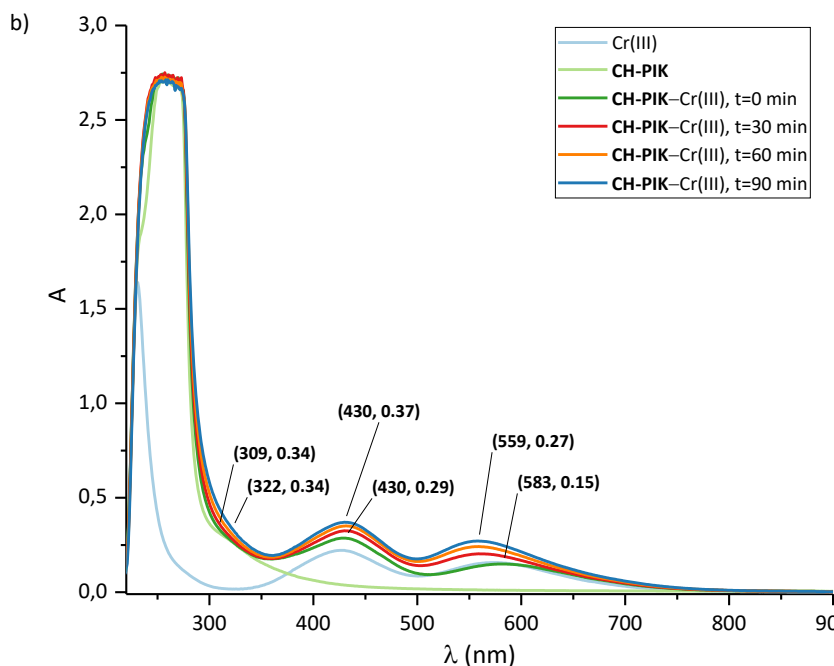
a maksimum długości fali ulega przesunięciu do  $\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$  dla  $t = 90 \text{ min}$ , analogicznie  $A = 0,16$ ,  $\lambda_{\max} = 583 \text{ nm}$  dla  $t = 0 \text{ min}$  ulega przesunięciu do  $\lambda_{\max} = 559 \text{ nm}$  dla  $A_{\max} = 0,28$  w czasie  $t = 90 \text{ min}$ .

W porównaniu do analizy spektroskopii UV-VIS wiązania jonów  $\text{Co(II)}$  przez substancję aktywną **CH-PIK** (rysunek 9 b), analiza spektroskopii UV-VIS wiązania jonów  $\text{Cr(III)}$ , pozwala uzyskać wgląd w kinetykę tego procesu (rysunek 10 b). Analogicznie jak w przypadku wiązania jonów  $\text{Co(II)}$ , w zakresie długości fal  $\lambda = 220 - 300 \text{ nm}$  zakres pomiaru absorbancji przez spektrofotometr został przekroczony, skutkiem czego ta część widma nie może zostać poddana wnikliwej analizie. Niemniej, we wskazanym obszarze obserwuje się wyraźne poszerzenie pasma tego piku, wraz upływem czasu od  $t = 0 \text{ min}$  do  $t = 90 \text{ min}$ , powiązane z przesunięciem batochromowym z długości fali  $\lambda = 309 \text{ nm}$  do długości fali  $\lambda = 322 \text{ nm}$  dla absorbancji o intensywności  $A = 0,34$ .

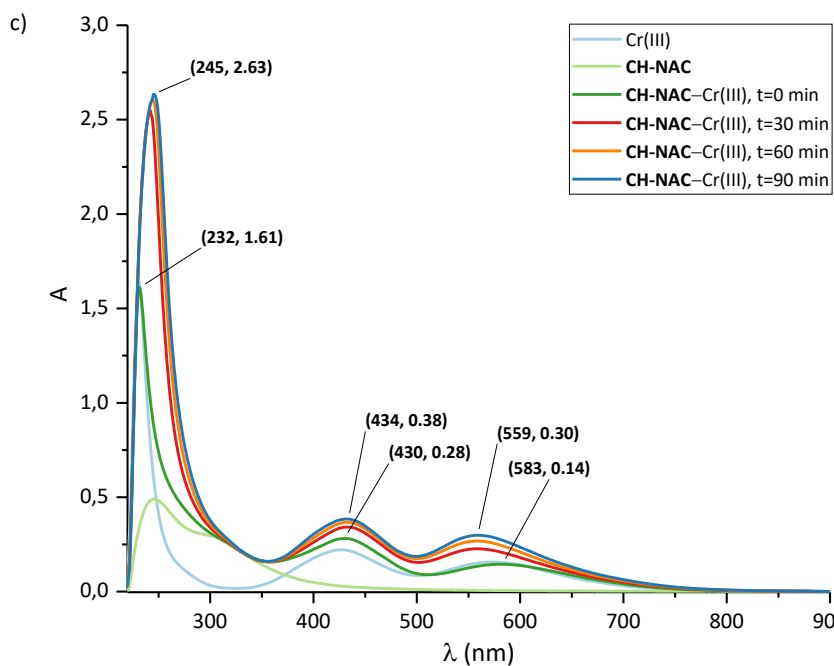


Rys. 10 Porównanie widm UV-Vis  $10 \text{ mmol/dm}^3$  roztworu chlorku chromu(III) i  $0,4 \%$  roztworu substancji aktywnej w  $0,8 \%$  buforze mleczanowym ( $\text{pH} = 4,2$ ) oraz tego samego roztworu po dodaniu  $10 \mu\text{l}$   $1 \text{ mol/dm}^3$  roztworu chlorku chromu(III) w wodzie (wynikowe stężenie  $\text{CrCl}_3$  wyniosło  $10 \text{ mmol/dm}^3$ ), dla:

a) **CH-GSH** w czasie  $t=0, 30, 60$  i  $90 \text{ min}$ .



b) CH-PIK w czasie t=0, 30, 60 i 90 min.



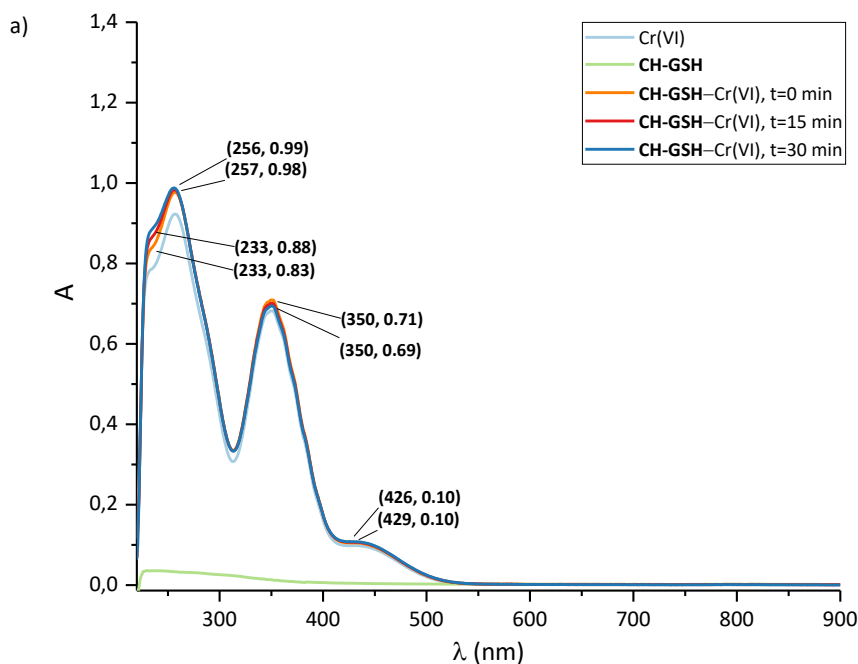
c) CH-NAC w czasie t=0, 30, 60 i 90 min.

Interesujących informacji dostarcza natomiast analiza widm UV-VIS w obszarze długości fal charakterystycznych dla chromu(III), (rysunek 10 b). W obszarze tym obserwuje się efekty hipso- i hiperchromowe, tj. intensywność  $A_{\max} = 0,15$  piksu przy maksimum długości fali  $\lambda_{\max} = 583$  nm dla  $t = 0$  min wzrasta do  $A_{\max} = 0,27$ , a maksimum długości fali ulega przesunięciu do  $\lambda_{\max} = 559$  nm dla  $t = 90$  min. Z kolei, w czasie  $t = 0$  min piks o długości fali  $\lambda_{\max} = 430$  nm i intensywności  $A_{\max} = 0,28$  ulega wzmocnieniu do  $A_{\max} = 0,37$  po czasie  $t = 90$  min.

Kinetyka wiązania jonów Cr(III) przez **CH-NAC** (rysunek 10 c) ma bardzo podobny przebieg jak omówione już **CH-GSH** i **CH-PIK**. Obserwuje się, zarówno efekt hiperchromowy  $A_{\max}(t = 0 \text{ min}) = 1,61 \rightarrow A_{\max}(t = 90 \text{ min}) = 2,63$ , jak i przesunięcie batochromowe  $\lambda_{\max}(t = 0 \text{ min}) = 232 \rightarrow \lambda_{\max}(t = 90 \text{ min}) = 245$ .

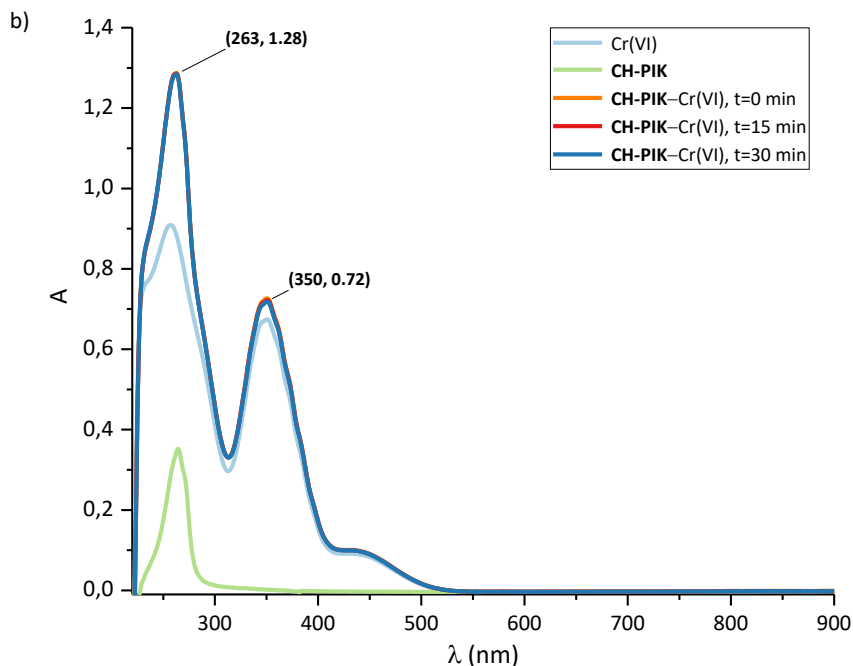
Z kolei, w przypadku pików charakterystycznych dla chromu(III) obserwuje się przesunięcie hipsokromowe i efekt hiperchromowy, tj. intensywność  $A_{\max} = 0,14$  piku przy maksimum długości fali  $\lambda_{\max} = 583 \text{ nm}$  dla  $t = 0 \text{ min}$  wzrasta do  $A_{\max} = 0,30$ , a maksimum długości fali ulega przesunięciu do  $\lambda_{\max} = 559 \text{ nm}$  dla  $t = 90 \text{ min}$ , analogicznie  $A = 0,28$ ,  $\lambda_{\max} = 430 \text{ nm}$  dla  $t = 0 \text{ min}$  ulega przesunięciu do  $\lambda_{\max} = 434 \text{ nm}$  dla  $A_{\max} = 0,38$  w czasie  $t = 90 \text{ min}$ .

Widma substancji **CH-GSH** i **CH-PIK** po dodaniu roztworu jonów chromu(VI) w czasie  $t = 0, 15, 30 \text{ min}$  oraz **CH-NAC** w czasie  $t = 0$  zestawione z widmami roztworu dichromianu (VI) potasu w wodzie oraz roztworu odpowiedniej substancji aktywnej w 0,8 % buforze mleczanowym ( $\text{pH} = 4,2$ ) przedstawiono na rysunku 11.

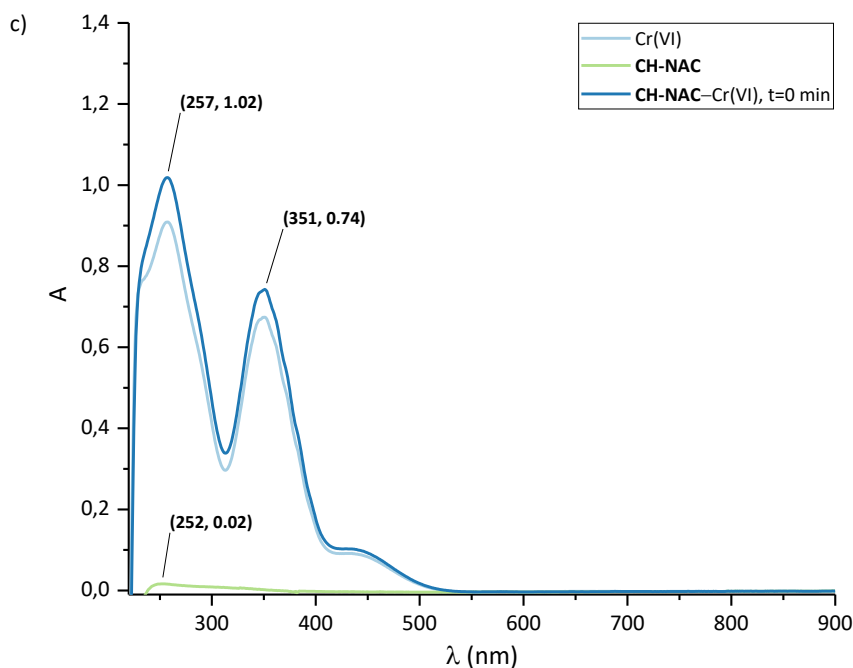


Rys. 11 Porównanie widm UV-Vis 1 mmol/dm<sup>3</sup> roztworu dichromianu (VI) potasu i 0,02 % roztworu substancji aktywnej w 0,8 % buforze mleczanowym ( $\text{pH} = 4,2$ ) oraz tego samego roztworu po dodaniu 1,5  $\mu\text{l}$  1 mol/dm<sup>3</sup> roztworu dichromianu (VI) potasu w wodzie (wynikowe stężenie roztworu  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  wyniosło 1 mmol/dm<sup>3</sup>), dla:

a) **CH-GSH** w czasie  $t = 0, 15$  i  $30 \text{ min}$ .



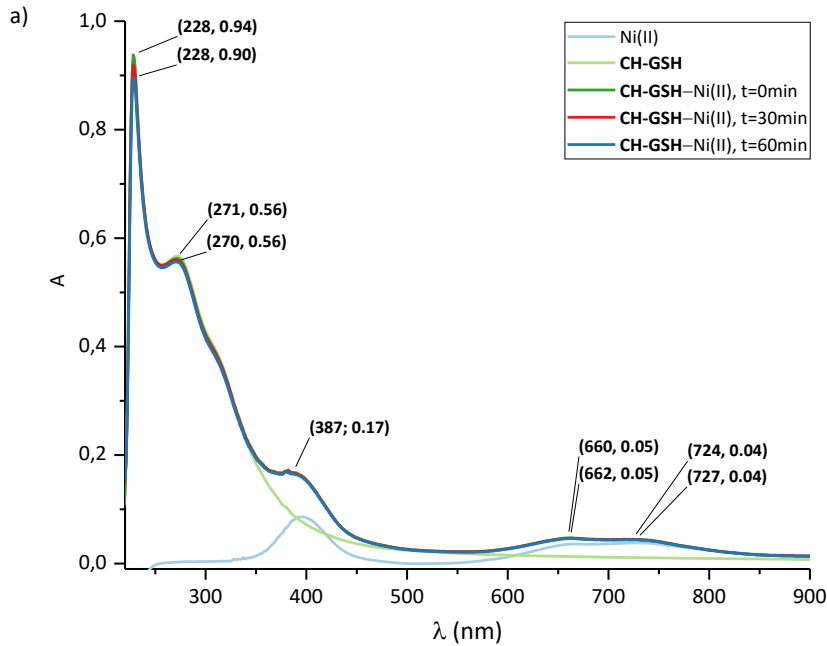
b) CH-PIK w czasie  $t = 0, 15$  i  $30$  min.



c) CH-NAC w czasie  $t=0$  (widmo nie ulega zmianom w czasie).

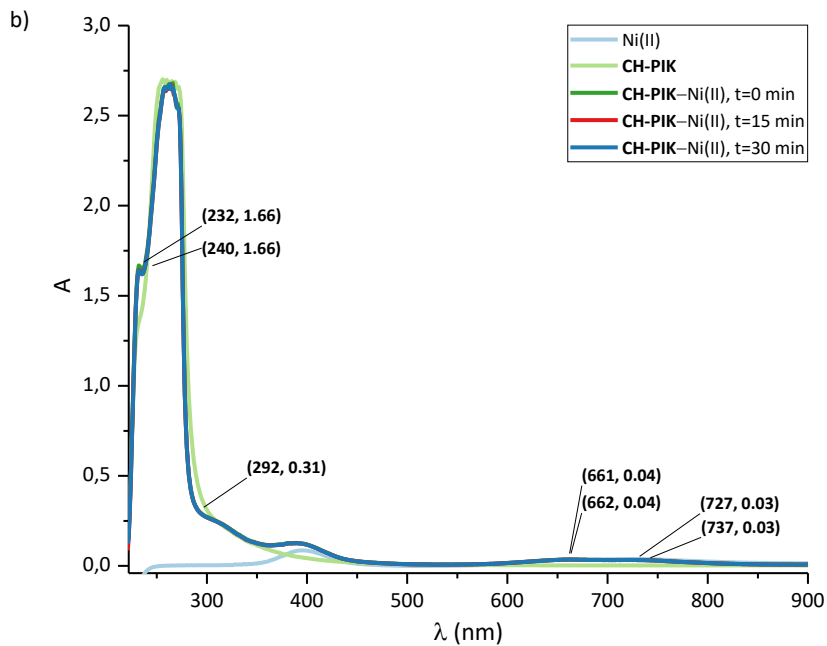
Obserwacja kinetyki wiązania jonów Cr(VI) przez substancję aktywną **CH-GSH** (rysunek 11 a), przy zastosowaniu spektroskopii UV-VIS pozwala potwierdzić zdolności chelatujące **CH-GSH**. W miarę postępu wiązania jonów Cr(VI) przy długości fali  $\lambda_{\max} = 233$  nm, charakterystycznej dla **GSH** związanego z nośnikiem polimerowym, obserwuje się niewielki efekt hipochromowy, który ulega wzmocnieniu z  $A_{\max} = 0,83$  w czasie  $t = 0$  min do  $A_{\max} = 0,98$  w czasie  $t = 30$  min. Efektowi temu towarzyszy niewielkie przesunięcie hipsokromowe pików charakterystycznych dla chromu(VI) z długości fali  $\lambda_{\max} = 429$  nm w czasie  $t = 0$  min do długości fali  $\lambda_{\max} = 426$  nm w czasie  $t = 30$  min, przy zachowaniu stałej intensywności  $A_{\max} = 0,10$ .



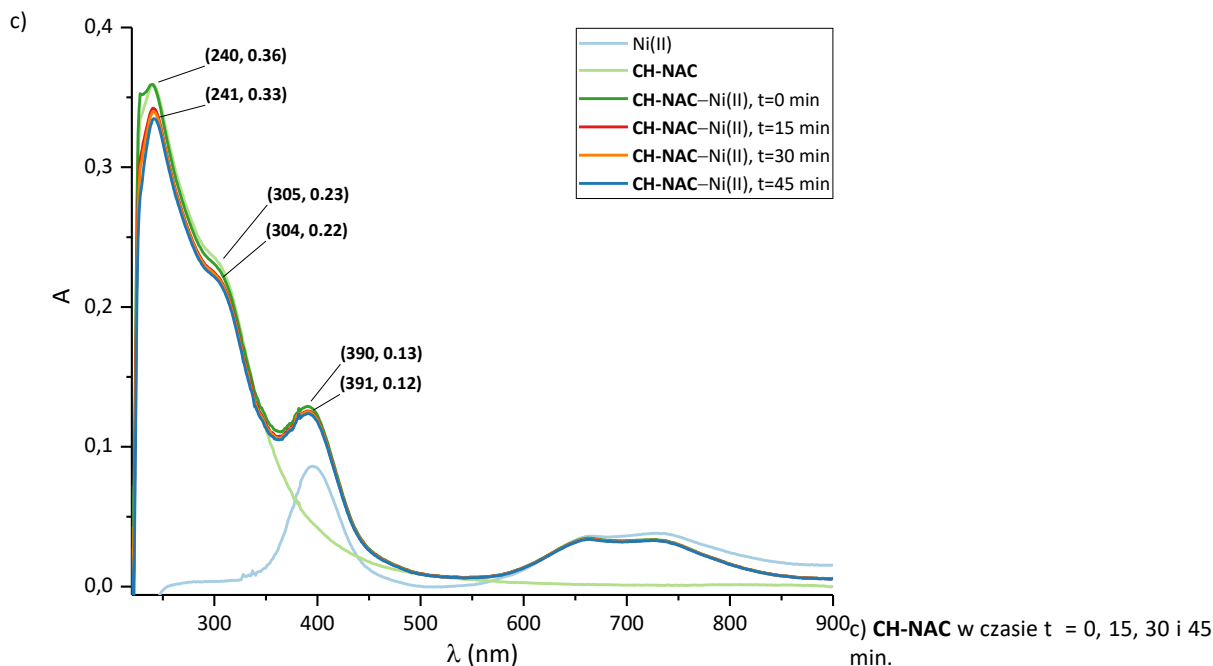


Rys. 12 Porównanie widm UV-Vis 10 mmol/dm<sup>3</sup> roztworu chlorku niklu(II) i 0,4 % roztworu substancji aktywnej w 0,8 % buforze mleczanowym (pH = 4,2) oraz tego samego roztworu po dodaniu 10 μl 1 mol/dm<sup>3</sup> roztworu chlorku niklu(II) w wodzie (wynikowe stężenie roztworu NiCl<sub>2</sub> wyniosło 10 mmol/dm<sup>3</sup>), dla:

a) CH-GSH w czasie t = 0, 30 i 60 min.



b) CH-PIK w czasie t = 0, 15 i 30 min.



Z kolei, analiza widm UV-Vis wiązaniu jonów Cr(VI) przez substancje aktywne **CH-PIK** i **CH-NAC** jest niezwykle trudna, zważywszy na niemalże stały charakter tych widm w czasie. Należy jednak podkreślić, że widma te nie są prostą sumą widm składników roztworu, co może świadczyć o chelatowaniu jonów Cr(VI) przez obydwie te substancje.

Ostatnią już serię widm substancji aktywnych **CH-GSH**, **CH-PIK** i **CH-NAC** po dodaniu roztworu jonów niklu(II), przedstawiono na rysunku 12. Ze względu na zróżnicowaną kinetykę wiązania tych jonów przez substancje aktywne, pomiary wykonano w czasie  $t = 0, 30, 60$  min dla **CH-GSH**,  $t = 0, 15, 30$  min dla **CH-PIK** oraz  $t = 0, 15, 30, 45$  min dla **CH-NAC**. Dla porównania przedstawiono widma roztworu chlorku niklu(II) oraz substancji aktywnych w 0,8 % buforze mleczanowym ( $\text{pH} = 4,2$ ).

Obserwacja kinetyki wiązania jonów Ni(II) przez substancję aktywną **CH-GSH** (rysunek 12 a), przy zastosowaniu spektroskopii UV-VIS pozwala potwierdzić zdolności chelatujące **CH-GSH**. W miarę postępu wiązania jonów Ni(II) przy długości fali  $\lambda_{\text{max}} = 228$  nm, charakterystycznej dla **GSH** związanego z nośnikiem polimerowym, obserwuje się niewielki efekt hipochromowy, który w miarę upływu czasu ulega wzmocnieniu z  $A_{\text{max}} = 0,94$ , przy długości fali  $\lambda_{\text{max}} = 228$  nm w czasie  $t = 0$  min do  $A_{\text{max}} = 0,90$  przy długości fali  $\lambda_{\text{max}} = 228$  nm w czasie  $t = 60$  min. Jednocześnie, przy długości fal  $\lambda_{\text{max}} = 271$  nm charakterystycznej dla matrycy polimerowej **CH**, obserwuje się słabe przesunięcie hipsochromowe do długości fali  $\lambda_{\text{max}} = 270$  nm. Z kolei, w przypadku pików charakterystycznych dla niklu(II), przy długości fal  $\lambda_{\text{max}} = 660$  nm i  $\lambda_{\text{max}} = 724$  nm przesunięcie batochromowe do długości fal odpowiednio  $\lambda_{\text{max}} = 662$  nm i  $\lambda_{\text{max}} = 727$  nm. Przesunięciom tym nie towarzyszy znacząca zmiana intensywności pików. Uzyskane rezultaty pozwalają potwierdzić zdolności chelatujące **CH-GSH**.

W przypadku substancji aktywnej **CH-PIK** (rysunek 12 b) w miarę postępu wiązania jonów Ni(II) przy długości fali  $\lambda_{\text{max}} = 232$  nm, obserwuje się wyodrębnienie piku dla **PIK** związanego z nośnikiem polimerowym, wiążącego jony Ni(II). Z kolei, w przypadku pików charakterystycznych dla niklu(II), przy długości fal  $\lambda_{\text{max}} = 661$  nm i  $\lambda_{\text{max}} = 727$  nm obserwuje się przesunięcia batochromowe do długości fal



$\lambda_{\max} = 662 \text{ nm}$  i  $\lambda_{\max} = 737 \text{ nm}$ . Przesunięciom tym nie towarzyszy znacząca zmiana intensywności pików.

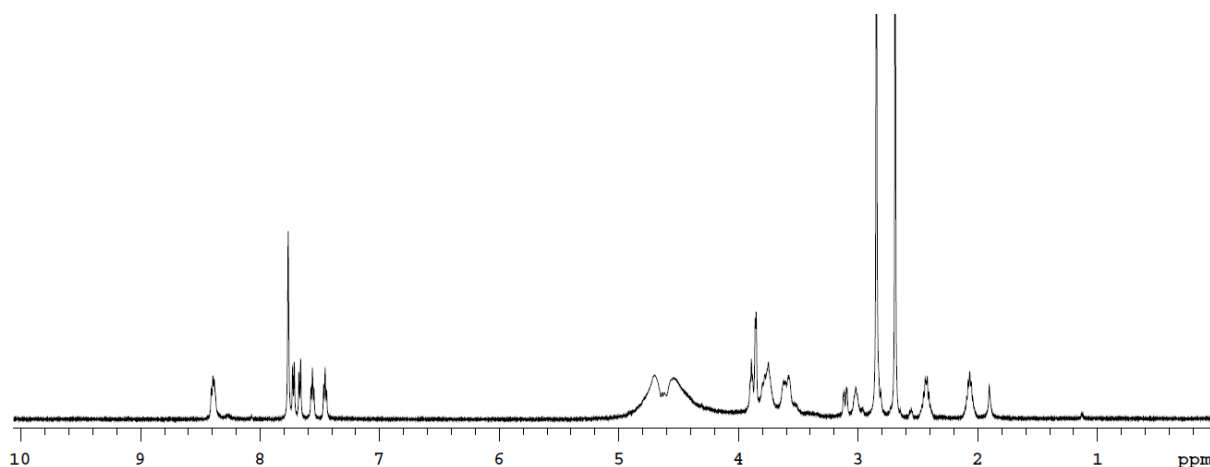
Odmianą charakterystykę zmian w przebiegu widma obserwuje się natomiast w przypadku **CH-NAC** (rysunek 12 c). Po upływie 45 minut obserwuje się zmniejszenie intensywności z  $A_{\max} = 0,36$  i  $A_{\max} = 0,23$  do  $A_{\max} = 0,33$  i  $A_{\max} = 0,22$  oraz niewielkie przesunięcie batochromowe z długości fali  $\lambda_{\max} = 240$  do  $\lambda_{\max} = 241$  i niewielkie przesunięcie hipsochromowe z  $\lambda_{\max} = 350$  do  $\lambda_{\max} = 304$ . Z kolei, w przypadku pików charakterystycznych dla niku(II) obserwuje się przesunięcie batochromowe z długości fali  $\lambda_{\max} = 390 \text{ nm}$  dla  $t = 0 \text{ min}$  do długości fali do  $\lambda_{\max} = 391 \text{ nm}$ , przy niewielkim spadku absorbancji o 0,01.

### 3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego – $^1\text{H}$ NMR, 2D $^{13}\text{C}$ NMR

Syntezę wszystkich substancji aktywnych oparto o ten sam schemat sprzęgania chitozanu z wybranymi modyfikatorami, poprzez utworzenie wiązania peptydowego (rysunek 5). Zastosowanie takiego samego schematu syntezy pozwoliło na ograniczenie kosztocłonych badań spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego do jednej substancji aktywnej. Do tego celu wybrano substancję **CH-GSH**, a dodatkowo zmierzono widma modyfikatora **GSH** i matrycy polimerowej **CH**. Łącznie wykonano osiem pomiarów widm:

- $^1\text{H}$  NMR matrycy polimerowej **CH** w  $\text{D}_2\text{O}$ ;
- widma korelacyjne  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  gHSQC matrycy polimerowej **CH** w  $\text{D}_2\text{O}$  z sekwencją impulsów gHSQCAD;
- widma korelacyjne  $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$  COSY modyfikatora **GSH** w  $\text{D}_2\text{O}$  z sekwencją impulsów gCOSY;
- widma korelacyjne  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  gHMBC modyfikatora **GSH** w 10% DCI i 90%  $\text{D}_2\text{O}$  z sekwencją impulsów gHMBCAD;
- $^1\text{H}$  NMR substancji aktywnej **CH-GSH**, dwukrotnie dla dwóch partii **CH-GSH** z dwóch różnych syntez;
- widma pseudodwuwymiarowe (DOSY) substancji aktywnej **CH-GSH** w  $\text{D}_2\text{O}$  z sekwencją pomiarów DgcsteSL, dwukrotnie dla dwóch partii **CH-GSH** z dwóch różnych syntez;
- widma korelacyjne  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  gHMBC substancji aktywnej **CH-GSH** w 10% DCI i 90%  $\text{D}_2\text{O}$  z sekwencją impulsów gHMBCAD, dwukrotnie dla dwóch partii **CH-GSH** z dwóch różnych syntez;
- widma korelacyjne  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  gHSQC substancji aktywnej **CH-GSH** w 10% DCI i 90%  $\text{D}_2\text{O}$  z sekwencją impulsów gHSQCAD, dwukrotnie dla dwóch partii **CH-GSH** z dwóch różnych syntez.

Na rysunku 13 przedstawiono przykładowe widmo  $^1\text{H}$  NMR substancji aktywnej **CH-GSH** w 10% DCI i 90%  $\text{D}_2\text{O}$ . Na potrzeby niniejszego raportu wystarczające jest wskazanie, że na podstawie tego widma można stwierdzić uzyskanie pożądanej modyfikacji w wyniku sprzęgania chitozanu z GSH. Jednoznacznie świadczy o tym charakterystyczny dublet o przesunięciu chemicznym 1,2 ppm pochodzący od protonu -SH, którego sygnał jest rozszczepiony przez dwa sąsiadujące protony grupy metylenowej -CH<sub>2</sub>- oraz sygnały pochodzące od pierścienia 2-deoksy-2-aminoglukozy o przesunięciach chemicznych, zbliżonych do danych literaturowych 4.51 ppm, 2.93 ppm i 3.64-3.86 ppm [43].



Rys. 13 Przykładowe widmo  $^1\text{H}$  NMR substancji aktywnej **CH-GSH** w 10% DCl i 90% D<sub>2</sub>O.

#### 4. Oznaczanie Co(II), Cr(VI) i Ni(II) techniką ICP-MS

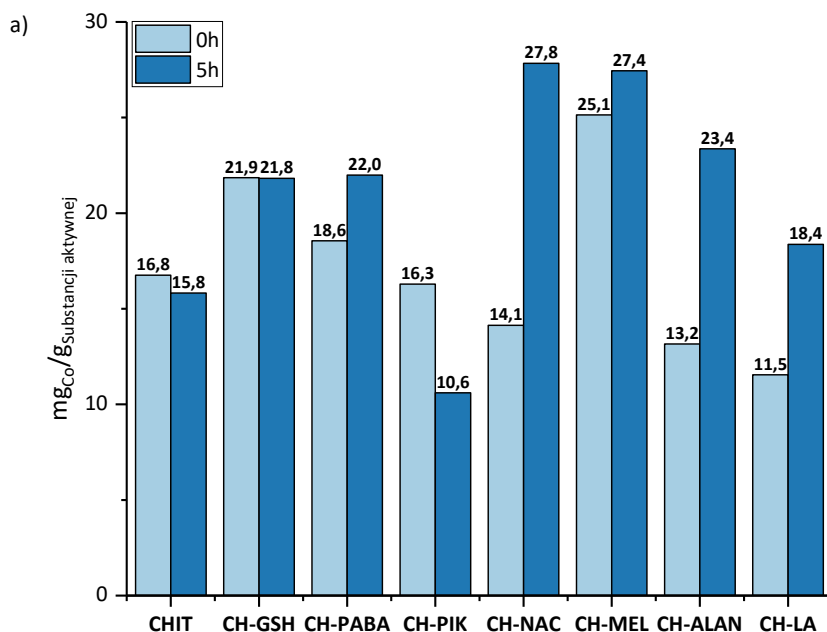
Pojemności substancji aktywnych na jony Co(II), Cr(VI) i Ni(II) oraz stabilność wiązania tych jonów oznaczono techniką ICP-MS. Wyniki badań ICP-MS w postaci zbiorczej przedstawiono w *Raporcie: Chemiczna analiza strukturalna, jakościowa i ilościowa substancji aktywnych*. Pojemność substancji aktywnych na jony Cr(III) nie została zbadana, ponieważ substancje te po dodaniu do roztworu chlorku chromu(III), uległy rozpuszczeniu w efekcie kwasowego odczynu pH ~3.5.

Wyniki pomiarów techniką ICP-MS stężenia wolnych jonów metali w roztworze, w obecności substancji aktywnych **CH-ALAN**, **CH-GSH**, **CH-LA**, **CH-PABA**, **CH-MEL**, **CH-PIK**, **CH-NAC** oraz dla porównania niezmodyfikowanego **CH**, przedstawiono w przeliczeniu na pojemność substancji aktywnej. W celu zbadania stabilności wiązania jonów Co(II), Cr(VI) i Ni(II) pomiary wykonano tuż po bezpośrednim dodaniu substancji aktywnej (czas  $t = 0$ ) oraz po upływie pięciu godzin (czas  $t = 5\text{h}$ ).

Z porównania przedstawionego na rysunkach 14, a) i b) wynika, że **CH-GSH** i **CH-MEL** wykazują największą pojemność na jony Co(II), tuż po dodaniu substancji aktywnej do roztworu. Co ciekawe, w przypadku substancji aktywnych modyfikowanych N-acetylocysteiną (**NAC**), alantoiną (**ALAN**) i kwasem laktobionowym (**LA**) pojemność na jony Co(II) jest niższa niż w przypadku niezmodyfikowanego chitozanu. A zatem modyfikacja chitozanu wskazanymi modyfikatorami powoduje zmniejszenie zdolności koordynacyjnych, w porównaniu do niezmodyfikowanego chitozanu.

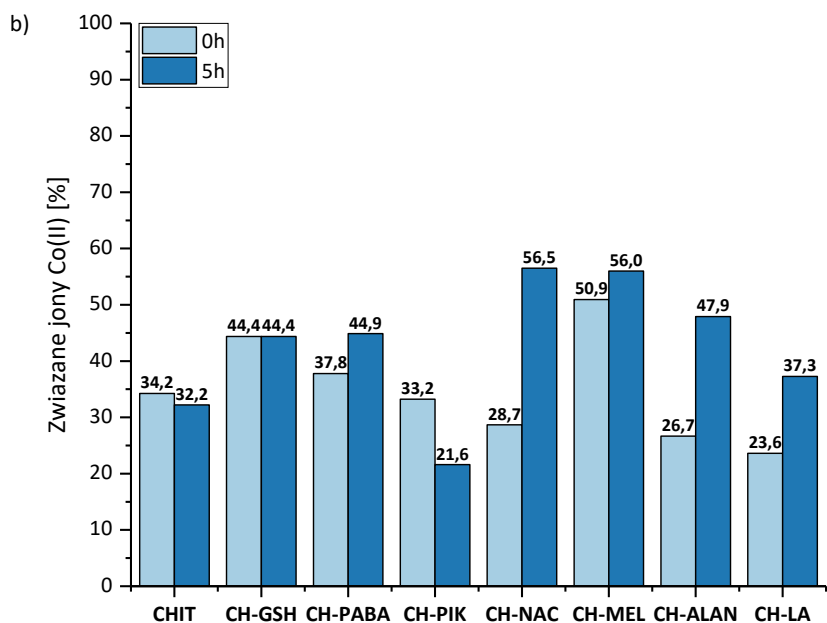
Ciekawą właściwością jest zdecydowany wzrost pojemności **CH-NAC** i **CH-ALAN** po upływie pięciu godzin inkubacji. Wskazuje to na dwufazowy charakter reakcji chelatowania, w którym w pierwszej fazie obserwuje się związanie ~50% jonów Co(II). Wzrost aktywności substancji aktywnej w czasie jest interesujący z punktu widzenia rzeczywistych warunków stosowania preparatów kosmetycznych i może stanowić podstawę do wydłużenia czasu ochronnego, zalecanego przez producenta.

Za wyjątkiem niezmodyfikowanego chitozanu i **CH-PIK** wszystkie substancje aktywne tworzą stabilne wiązania z jonami kobaltowymi, Co(II).



Rys. 14 Wyniki pomiarów ICP-MS pojemności substancji aktywnej na jony Co(II), przedstawione jako:

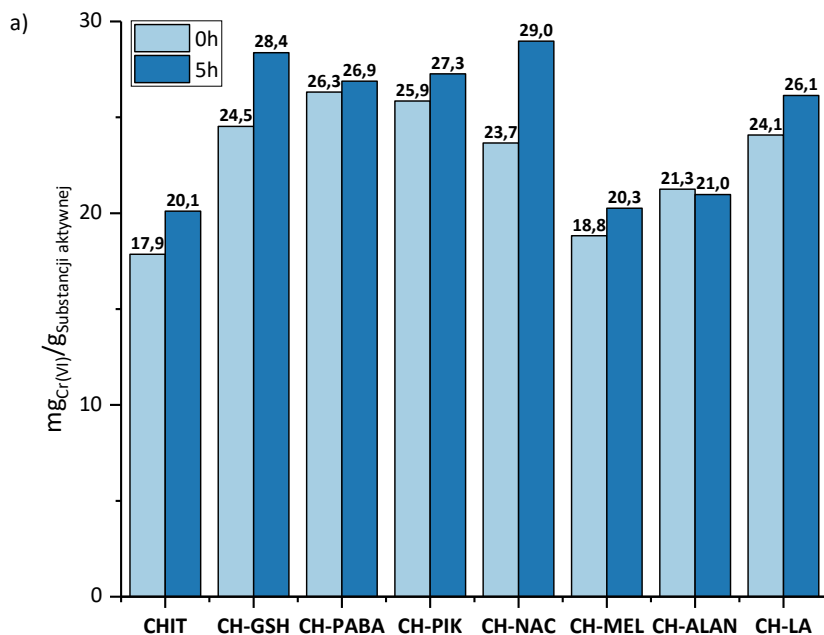
a) Stosunek masowy schelatowanego Co(II) do masy substancji aktywnej.



b) Wyrażona w procentach, ilość jonów Co(II) związanych przez substancje aktywne.

Z kolei, przedstawione na rysunkach 15, a) i b) wyniki badania pojemności substancji aktywnej na jony Cr(VI) w porównaniu z rezultatami przedstawionymi dla Co(II), na rysunkach 14, a) i b), pozwalają stwierdzić, że modyfikacja chitozanu pozwala zwiększyć zdolności koordynacyjne substancji aktywnej względem jonów Cr(VI) w większym stopniu niż w przypadku Co(II).

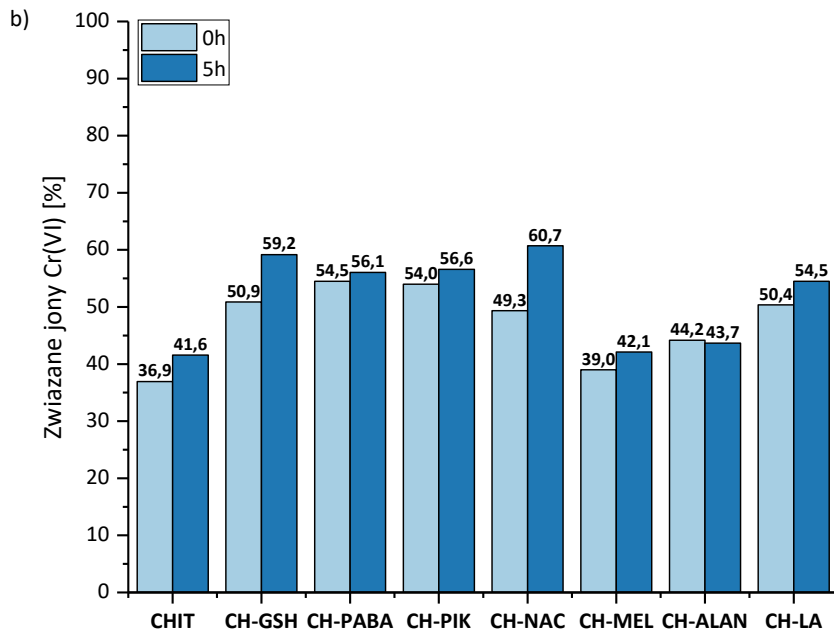
Tuż po dodaniu substancji aktywnej do roztworu jonów Cr(VI), **CH-PIK** i **CH-PABA** wykazują największą pojemność na jony Cr(VI), przy czym rozbieżności w pojemnościach pomiędzy pozostałymi substancjami aktywnymi są zdecydowanie mniejsze niż w przypadku jonów Co(II) i zarazem większe od niezmodyfikowanego chitozanu.



Rys. 15 Wyniki pomiarów ICP-MS pojemności substancji aktywnych na jony Cr(VI), przedstawione jako:

a) Stosunek masowy schelatowanego Cr(VI) do masy substancji aktywnej.

Za wyjątkiem **CH-ALAN**, po upływie pięciu godzin inkubacji obserwuje się wzrost pojemności substancji aktywnych na jony Cr(VI). Świadczy to o dwufazowym charakterze reakcji chelatowania, z tym że pierwsza faza jest szybsza, a związaniu ulega aż ponad 80% jonów Cr(VI). Również, za wyjątkiem **CH-ALAN** wszystkie substancje aktywne tworzą stabilne wiązania z jonami chromu(VI).



b) Wyrażona w procentach, ilość jonów Cr(VI) związanych przez substancje aktywne.

Wyniki badania pojemności substancji aktywnych na jony Ni(VI) dały ujemne wartości pojemności uzyskanych dla chitozanu i substancji aktywnych **CH-PIK**, **CH-MEL** oraz **CH-LA** świadczą o tym, że stężenia wolnych jonów metali w badanym roztworze, są wyższe niż stężenie zmierzone dla roztworu odniesienia. W związku z powyższym, uzyskano nierzeczywiste rezultaty przeliczenia na pojemność substancji aktywnej ( $\text{mg}_{\text{metal}}/\text{m}_{\text{substancji aktywnej}}$ ), a przeprowadzenie analiz analogicznych jak dla jonów metali Co(II) i Cr(VI) nie jest możliwe.

## VI. BADANIA NA SZTUCZNEJ SKÓRZE, NA KOMÓRKACH HODOWLANYCH – ZADANIE NR 6

### 1. Cel badań

Celem badań przeprowadzonych w ramach zlecenia było **określenie cytotoksyczności** wybranych **substancji aktywnych** o właściwościach **chelatujących jony chromu i kobaltu** na liniach ludzkiej skóry (keratynocyty i fibroblasty) w warunkach hodowli tkankowej, w celu oceny ich przydatności do **zastosowania w kosmetykach**.

### 2. Metodologia badania

Do badań zostały wybrane dwie modelowe linie komórkowe: keratynocyty, stanowiące główną masę naskórka oraz fibroblasty, tworzące tkankę łączną włóknistą skóry właściwej.

Wybrana linia keratynocytów HaCaT to nienowotworogenna, nieśmiertelniona linia komórkowa keratynocytów człowieka. Linia wykazuje różnicowanie typowe dla keratynocytów. Jest to pierwsza chronologicznie wyodrębniona linia keratynocytarna powszechnie używana w badaniach naukowych.

Wybrana do badań linia fibroblastów BJ (ATCC® CRL2522™) jest pierwotną linią komórkową pobraną z tkanki skórnej zdrowego noworodka. Linia komórkowa BJ ma długą żywotność w porównaniu z innymi normalnymi liniami ludzkich komórek fibroblastów. Komórki te mają zgłoszony prawidłowy diploidalny kariotyp do 61-go podwojenia populacji. Dają ujemny wynik aktywności telomerazy.

Komórki HaCaT hodowano w pożywce DMEM z dodatkiem 10 % surowicy płodowej cielęcej. Komórki BJ hodowano na pożywce EMEM z dodatkiem 10 % surowicy płodowej cielęcej. Obie linie w momencie rozpoczęcia testów wykazywały ujemny test na mykoplazmę.

Wykonano testy na dostarczonych substancjach aktywnych i ich nośnikach, łącznie **14 preparatów** (Tabela 5). Dokonano doboru zakresu stężeń do badania na podstawie rozpuszczalności dostarczonych preparatów. **Substancje aktywne 1-6** roztwarzano sterylnie w pożywkach z dodatkiem surowicy cielęcej w temp. 37°C, intensywnie mieszając. Po przygotowaniu roztworów pH zobojętniono (warunki hodowli komórkowej w pożywce typu MEM). **Substancje 7-13** roztwarzano sterylnie w pożywkach z dodatkiem surowicy za pomocą homogenizatora. Uzyskane zawiesiny, stabilne przez 3 dni w 37°C, dodawano do hodowli komórkowej bezpośrednio po przygotowaniu. W przypadku **substancji 7-13** dostosowanie pH nie było możliwe, ponieważ substancje strącały się z roztworów obojętnych. Dlatego w przypadku tych substancji zastosowano jako kontrolę nośnik o pH wyjściowym (**preparat 14**). Maksymalne stężenia dla substancji aktywnych, jakie udało się osiągnąć w pożywkach do hodowli komórkowej wynosiły odpowiednio (Tabela 5):

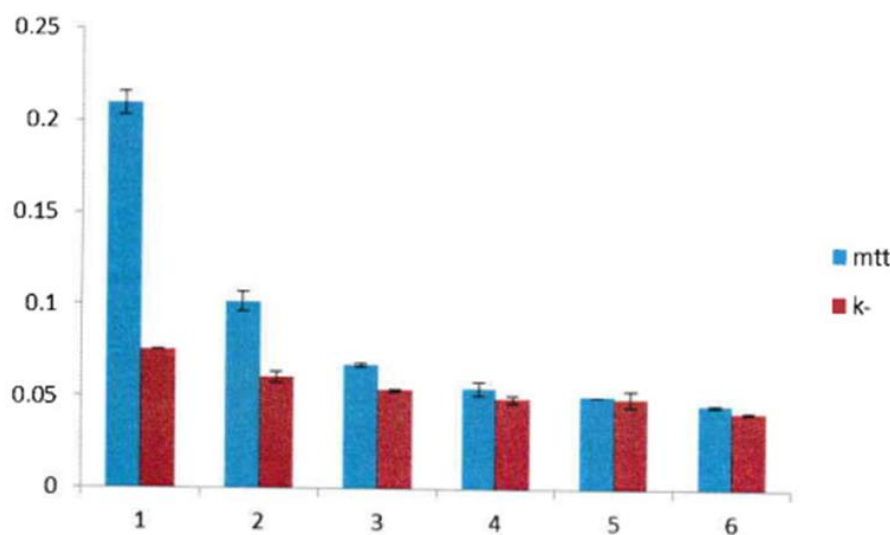
Tabela 5. Zestawienie preparatów aktywnych badanych w teście cytotoksyczności na komórkach HaCaT i BJ; zastosowane maksymalne stężenia.

nr wewnętrzny badania	opis substancji aktywnej*	zastosowane stężenie max. w badaniu
1	Polimer modyfikowany CH-GSH w 2% kwasie mlekowym	0,5%
2	Substancja aktywna W (7.7%) w glicerynie i pantenolu	1,8%
3	Substancja aktywna W (13.9%) w pantenolu	0,5%
4	Kwas mlekowy (2%), pH 7	0,2%
5	gliceryna (76,9%) + pantenol (15,4)	15% gliceryny 3% pantenolu
6	pantenol (69,4%)	2.4% pantenolu
7	PO-G w 2% kwasie mlekowym	0,5%
8	PM6-G w 2% kwasie mlekowym	0,5%
9	PM5-G w 2% kwasie mlekowym	stock:pożywka v/v 1:9
10	PM4-G w 2% kwasie mlekowym	stock:pożywka v/v 1:9
11	PM2-G w 2% kwasie mlekowym	stock:pożywka v/v 1:9
12	P-GJ w 2% kwasie mlekowym	stock:pożywka v/v 1:9
13	PM3-G w 2% kwasie mlekowym	stock:pożywka v/v 1:9
14	Kwas mlekowy (2%), pH 3	0,2%

\*Roztwory wodne

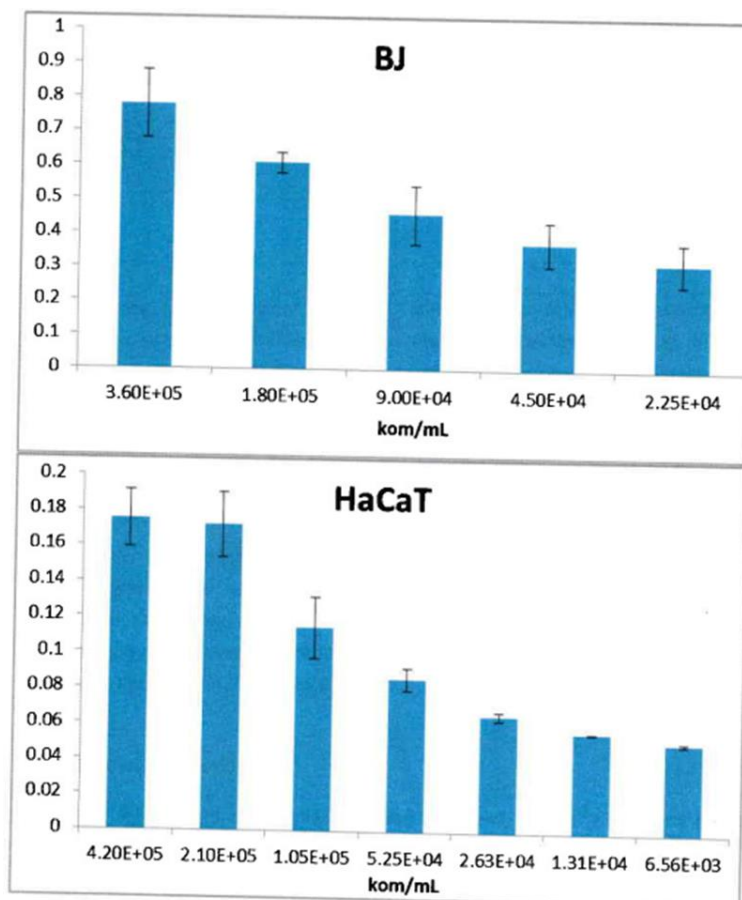
### 3. Dobór testu przeżywalności

Dokonano doboru testu cytotoksyczności właściwego dla zastosowanych związków i linii komórkowych. Wykluczono możliwość zastosowania testu aktywności metabolicznej oksydoreduktaz na podstawie redukcji bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego (test MTT, (3)) ze względu na właściwości redukujące związków aktywnych (Rys. 16).



Rys. 16. Preparat CH-GSH (nr wew. badania: 1) wykazuje zdolność do redukcji MTT niezależną od obecności oksydoreduktazy. 100 uL żelu o stężeniach 0.50; 0.25; 0.13; 0.06; 0.03; 0; w stosunku do wyjściowego, w wodzie, inkubowano w 37°C 4 h. Po tym czasie dodano 100 mL DMSO i wytrząsano 1 min. Zmierzone absorbancję Przy 570 nm. Jako próbę kontrolną zmierzono absorbancję w próbkach bez MTT. Jako próby 0 użyto wody. Doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach.





Rys. 17. Test proliferacyjny dla różnych początkowych gęstości komórkowych linii BJ i HaCaT. Przeżywalność mierzona pochłanianiem czerwieni obojętnej.

Do oceny cytotoksyczności preparatów wybrano test żywotności komórek na podstawie zdolności pochłaniania czerwieni obojętnej (chlorowodoru 3-amino-7-dimetyloamino-2-metylofenylozyny). Zmierzone stężenie czerwieni obojętnej było wprost proporcjonalne do ilości proliferujących (żywych) komórek w próbce. Wykonano eksperymenty dla trzech powtórzeń prób pomiarowych. W ramach kontroli negatywnej (tło) wykonano pomiary dla studzienek niezawierających hodowli komórkowych. W ramach kontroli pozytywnej wykonano pomiary dla studzienek zawierających nietraktowane hodowle komórkowe. Na podstawie uzyskanych krzywych przeżywalności oceniono wartości stężeń **półmaksymalnego hamowania (IC<sub>50</sub>)**. W celu wyznaczenia tych wartości zastosowano dopasowanie funkcji krzywych dawka-odpowiedź na podstawie zmodyfikowanego równania Hilla.

Obie linie komórkowe pochłaniały czerwień obojętną w zakresie odpowiednim do przeprowadzenia testu. Dokonano doboru właściwej gęstości komórkowej. Na podstawie pochłaniania czerwieni obojętnej wybrano gęstości hodowli, przy których komórki były w fazie eksponentialnej wzrostu (Rys. 17), t.j. 105 kom/mL (104 komórek na dołek 96-dołkowej płytki hodowlanej) dla linii HaCaT oraz  $2 \times 10^5$  kom/mL dla linii BJ.

Nie stwierdzono interakcji pomiędzy badanymi substancjami aktywnymi a intensywnością fluorescencji i absorpcji czerwieni obojętnej.

Zastosowano stężenia początkowe wymienione w Tabeli 5, oraz 8 kolejnych rozcieńczeń w stosunku 1:1. Do wyznaczenia IC<sub>50</sub> użyto odczytanych wartości fluorescencji z uwagi na lepszą powtarzalność i specyficzność odczytu fluorescencyjnego niż absorpcji. Wyniki testu pochłaniania czerwieni obojętnej dla poszczególnych substancji aktywnych i nośników są przedstawione w Tabeli 6.

Tabela 6 Wyniki testów proliferacyjnych dla poszczególnych substancji aktywnych oraz ich nośników.

nr wew. substancji	wartości IC50	
	HaCaT	BJ
	IC50 (%subst)	IC50 (%subst)
1	n/t	0.245
2	0.012	0.164
3	0.015	n/a*
4	n/t	n/t
5	n/t	n/a
6	n/t	n/a
7	n/a	0.180
8	n/a	0.090
9	n/a	0.179
10	n/a	0.175
11	n/a	0.157
12	n/a	0.308
13	n/a	0.052
14	n/t	0.072

n/t: związek nie wykazywał istotnego statystycznie obniżenia żywotności komórek; n/a: toksyczność związku w osiągalnym zakresie stężeń nie dawała dolnego plateau krzywej przeżywalności. \*związek wywołał zmiany żywotności wyrażające się krzywą dzwonową (typu dawka optymalna).

#### 4. Omówienie wyników

Linia HaCaT: Jedynie **substancje 2 i 3** wykazywały się toksycznością o mierzalnym IC<sub>50</sub> w osiągalnym zakresie stężeń.

Linia BJ: W komórkach ludzkich fibroblastów **substancje 1-3** oraz **7-13** wykazywały się toksycznością o mierzalnym IC<sub>50</sub> w osiągalnym zakresie stężeń. Wartości toksyczności były jednak porównywalne z toksycznością samego nośnika substancji aktywnych. Z uwagi na niską toksyczność substancji aktywnych 7-13 nie było możliwe wyznaczenie bezwzględnych (niezależnych od efektu nośnika) indeksów IC<sub>50</sub> dla tych substancji w osiągalnym zakresie stężeń.

## 5. Podsumowanie i wnioski

Komórki HaCaT, które wchodzi w skład naskórka, zatem tkanki bezpośrednio narażonej na kontakt z preparatem **nie były wrażliwe na obecność polimerów modyfikowanych (substancje 1, 7 - 13)** ani ich nośników. Substancje 2 i 3 (substancje aktywne W) wykazywały wysoką toksyczność w zakresie uzyskanych stężeń,  $IC_{50}$  na poziomie 0,12 i 0,15% zawartości substancji.

Polimery modyfikowane (**substancje 1,7-13**) w komórkach BJ wykazywały umiarkowaną toksyczność o mierzalnym  $IC_{50}$ , jednak poziom toksyczności **substancji aktywnych 7-13** był związany z koniecznością zastosowania roztworów o niskim pH i porównywalny z toksycznością samego nośnika - kwasu mlekowego. Poza efektem nośnika **substancje 7-13** wykazywały niską toksyczność w zakresie zastosowanych stężeń, której wartość nie przekraczała toksyczności zawartego w próbach kwasu mlekowego. W przypadku **substancji 7-13** zaobserwowano efekt ochronny względem nośnika.

## VII. BADANIA SUBSTANCJI AKTYWNYCH - BADANIA CZYSTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ, BADANIA FIZYKOCHEMICZNE, BADANIA TOKSYKOLOGICZNE – ZADANIE NR 7

### 1. Badania dermatologiczne testem kontaktowym półotwartym

#### Cel badania

Ocena u zdrowego, dorosłego ochotnika lokalnej tolerancji skórnej produktu kosmetycznego poprzez jednokrotne nałożenie testu płatkowego i odczyt reakcji skóry po upływie 48 h i 72 h.

Podstawa wykonania badań. Potwierdzona w badaniu czystość mikrobiologiczna wyrobu wykonana w S.L.B. „ITA-TEST”. W badanych próbkach **KFN0001 KF NICCOLUM** oraz **KFN0003 KF NICCOLUM** **nie stwierdzono obecności tlenowych drobnoustrojów mezofilnych.**

#### Charakterystyka wyrobu.

Jednorodna, połyskliwa emulsja, barwa kremowa, zapach delikatny. Deklarowane przeznaczenie wyrobu: wyrób przeznaczony jest do pielęgnacji skóry.

#### Sposób prowadzenia badań

Badany wyrób w ilości 0,1 g nanoszono na krążki bibułowe (Whatmann 3), które umocowywano plastrem porowatym - hypoalergicznym (chirurgicznym) na ramionach po stronie wyprostnej lub na plecach. Próby zdejmowano po 48h. Pierwszego odczytu dokonywano 15 minut po zdjęciu próby, następnego - po 72h od nałożenia testu. Ocen odczynów dokonano według skali, która zgodna jest z ogólnie przyjętą skalą w badaniach dermatologicznych. Badania trwały 4 dni.

#### Wyniki badań dermatologicznych

W grupie badanych 20 osób, w tym 13 z dodatnim wywiadem alergicznym nie stwierdzono dodatnich odczynów, co świadczy o tym, że badany wyrób nie wykazuje własności drażniących lub uczulających.

#### Opinie i interpretacje

Na podstawie wyników przeprowadzonych testów kontaktowych półotwartych stwierdzono, że badany pod względem dermatologicznym **KFN0001 KF NICCOLUM** oraz **KFN0003 KF NICCOLUM** spełnia wymagania testu zgodności ze skórą (Skin Compatibility Test).

## 2. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne zostały przeprowadzone przez Laboratorium Badawcze ITS-TES.

Badania przeprowadzono na obecność *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz została oznaczona ogólna liczba tlenowych drobnoustrojów mezofilowych, w tym ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilowych oraz liczba drożdży i zarodników pleśni. Metoda oznaczania była metoda PB93/ChM ITA-TEST wd. 2 z dnia 05.08.2008.

Zostały przebadane próbki **SG 1801**, **SC 1801A**, **CH-JAP**.

### Badanie mikrobiologiczne próbki **SG 1801**

Tabela 7 Wyniki badania mikrobiologicznego próbki **SG 1801**

L.p.	Rodzaj badania	Wynik oznaczenia	Metoda oznaczania
1.	Oznaczanie ogólnej liczby tlenowych drobnoustrojów mezofilnych, w tym:	<10 jtk/g	PB 39/ChM ITA-TEST wyd. 2 z dnia 05.08.2008
	- ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilnych	<10 jtk/g	
	- liczba drożdży i zarodników pleśni	<10 jtk/g	
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	
4.	<i>Candida albicans</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	

Na podstawie wyników zamieszczonych w Tabeli 7. Badania wykazały nieobecność *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* w 0,1 g. W badanej próbce **SG 1801** nie stwierdzono obecności tlenowych drobnoustrojów mezofilnych przekraczających <10 jtk/g.

### Badanie mikrobiologiczne próbki **SC 1801A**

Tabela 8 Wyniki badan mikrobiologicznych próbki **SC 1801A**

L.p.	Rodzaj badania	Wynik oznaczenia	Metoda oznaczenia
1.	Oznaczenie ogólnej liczby tlenowych drobnoustrojów mezofilnych, w tym:	7,5x 10 <sup>1</sup> jtk/g	PB 39/ChM ITA-TEST wyd. 2 z dnia 05.08.2008
	- ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilnych	7,5x 10 <sup>1</sup> jtk/g	
	- liczba drożdży i zarodników pleśni	<10 jtk/g	
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	
4.	<i>Candida albicans</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	

Badania wykazały nieobecność *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* w 0,1 g. Na podstawie wyników zamieszczonych w Tabela 8, w badanej próbce **SC 1801A** stwierdzono obecność tlenowych drobnoustrojów mezofilnych wynoszącą 75 jtk/g. Specyfikacja producenta zakłada jednak, że dopuszczalne jest skarżenie surowca do 1000 jtk/g .

### Badanie mikrobiologiczne próbki **CH-JAP**

Tabela 9 Wyniki badan mikrobiologicznych próbki **CH-JAP**

L.p.	Rodzaj badania	Wynik oznaczenia	Metoda oznaczenia
1.	Oznaczenie ogólnej liczby tlenowych drobnoustrojów mezofilnych, w tym:	<10 jtk/g	PB 39/ChM ITA-TEST wyd. 2 z dnia 05.08.2008
	- ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilnych	<10 jtk/g	
	- liczba drożdży i zarodników pleśni	<10 jtk/g	
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	
4.	<i>Candida albicans</i>	Nie stwierdzono obecności w 0,1 g próbki	

Badania wykazały nieobecność *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* w 0,1 g. W Na podstawie wyników zamieszczonych w Tabela 9, w badanej próbce **CH-JAP** nie stwierdzono obecności tlenowych drobnoustrojów mezofilnych przekraczających <10 jtk/g.

### Test konserwacji

Testem obciążeniowym poddano próbkę **KFPJ074**

Badania wstępne wykazały, że jest produkt jest czysty mikrobiologicznie. Stosowaną metodą była metodyka akredytowana, zgodnie z normą PN-EN ISO 11930:2012 + Ap1:2017-05. Wyniki testu obciążeniowego zamieszono w Tabela 10.

Tabela 10 Wyniki badania obciążającego – testu konserwacji dla próbki **KFPJ074**

Lab.	Badany szczep	Ilość drobnoustrojów w standaryzowanej zawieszynie	Poziom kontaminacji	Uzyskane wyniki		
				Po 7 dniach	Po 14 dniach	Po 28 dniach
Łt	Pseudomonas Aeruginosa ATCC 9027	N= 1,9x10 <sup>8</sup> jtk/ml	N <sub>0</sub> = 1,9x10 <sup>5</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g
				Log R= ≥4,3	Log R= ≥4,3	Log R= ≥4,3
Łt	Staphylococcus aureus ATCC 6538	N= 1,5x10 <sup>8</sup> jtk/ml	N <sub>0</sub> = 1,5x10 <sup>5</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g
				Log R= ≥4,2	Log R= ≥4,2	Log R= ≥4,2
Łt	Escherichia coli ATCC 8739	N= 1,6x10 <sup>8</sup> jtk/ml	N <sub>0</sub> = 1,6x10 <sup>5</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g
				Log R= ≥4,2	Log R= ≥4,2	Log R= ≥4,2

	Candida albicans ATCC 10231	N= 6,9x10 <sup>7</sup> jtk/ml	N <sub>0</sub> = 6,9x10 <sup>4</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> <1,0x10 <sup>1</sup> jtk/g
Lł				Log R= ≥3,8	Log R= ≥3,8	Log R= ≥3,8
Lł	Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	N= 4,9x10 <sup>7</sup> jtk/ml	N <sub>0</sub> = 4,9x10 <sup>4</sup> jtk/g	x	N <sub>x</sub> = 4,5x10 <sup>2</sup> jtk/g	N <sub>x</sub> = 1,7x10 <sup>2</sup> jtk/g
					Log R= 2,0	Log R= 2,5
Wymagania <sup>a</sup>	Log redukcji (Kryterium A)	Bakterie		≥3	≥3 i NI	≥3 i NI
		Candida albicans		≥1	≥1 i NI	≥1 i NI
		Aspergillus brasiliensis		x	≥0b	≥1
* - badanie podzlecane objęte systemem zarządzania laboratorium, a – dopuszczalne odchylenie od wartości akceptowalnej stopnia redukcji liczby drobnoustrojów wynosi 0,5 log, (A)- metodyka akredytowana nb- nieobecne jtk-jednostki tworzące kolonie, b- liczba drobnoustrojów nie zwiększa się w stosunku do początkowego poziomu kontaminacji próbki, N <sub>0</sub> =liczba jtk w 1 g próbki po kontaminacji, N- ilość drobnoustrojów w standaryzowanej zawieszynie, N <sub>x</sub> = liczba jtk w 1 g próbki po określonym czasie, Log R= stopień redukcji liczby drobnoustrojów w Log gdzie R= N <sub>0</sub> -N <sub>x</sub> ; x- badania nie wykonuje się, NI- liczba drobnoustrojów nie zwiększa się						
Walidacja neutralizacji						
Lab.	Szczep	Wyniki				Wymagania
		Nvf/ Nvn	Nvn	Nv		
Lł	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	0,66	119	129	Nvf/ Nvn ≥ 0,5 Nvn= Nv	
Lł	Staphylococcus aureus ATCC 6538	0,75	105	115		
Lł	Escherichia coli ATCC 8739	0,73	102	112		
Lł	Candida albicans ATCC 10231	0,66	65	69		
Lł	Aspergillus brasiliensis ATCC 16404	0,76	54	58		
Nvf – liczba jtk w 1 ml próbki testowej (neutralizator+ badany produkt); Nvn- liczba jtk w 1 ml próbki kontrolnej (neutralizator + rozcieńczalnik); Nv- liczba jtk w 1 ml kontroli inokulum						

INFORMACJE DODATKOWE: Użyty neutralizator: Bulion D/E, Zastosowane konserwanty: Euxyl K712 1,00% (Sodium Benzoate 28,5-31,5%→ 0,32%; Potassium Sorbate 14,3%-15,7%→0,16%). Zastosowane podłoża i warunki inkubacji: Pożywka z hydrolizatem kazeinowo-sojowym 32,5°C±2,5°C / 3dni (bakterie), Sabouraud Dextrose Agar 32,5°C±2,5°C / 3 dni (Candida albicans), Potato Dextrose Agar 22,5°C ± 2,5°C / 5 dni (Aspergillus brasiliensis).

#### Wyniki testu

Testy obciążeniowe próbnej formułacji oceniły próbkę jako: „**Sposób zakonserwowania produktu kosmetycznego spełnia kryterium A stopnia redukcji drobnoustrojów testowych**”. Badania wykazały, że konserwant **uniemożliwia rozwój bakterii**, co więcej, jego działanie spowodowało zdecydowany zanik kontaminacji mikrobiologicznej, która była sztucznie spowodowana na początku badania. Niezwykle istotne jest to, że poziom kontaminacji w wyniku działania konserwantu spadł i wynosił mniej niż 1,0x10<sup>1</sup> jtk/g dla każdego monitorowanego szczepu.



3. Oznaczenie As, Cd, Pb, Ni w surowcach użytych do syntezy substancji aktywnych

Celem prowadzonych badań było oznaczenie całkowitej zawartości arsenu, kadmu, ołowiu i niklu w sześciu próbkach: **SG 1801, SC 1801A, SC 1801B, SC 1801C, SC 1801D, CH-JAP**.

Oznaczenie prowadzono techniką spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej ICP MS, po uprzedniej, wspomaganej mikrofalowo mineralizacji próbek. Granice wykrywalności i oznaczalności procedury dla arsenu, kadmu, ołowiu i niklu oznaczanych techniką ICP-MS zamieszczono w Tabeli 11. Wyniki całkowitej zawartości arsenu, kadmu, ołowiu i niklu w próbkach z uwzględnieniem rozcieńczenia umieszczono w Tabeli 12.

Tabela 11. Granica wykrywalności (GW) i granica oznaczalności (GO) procedury dla arsenu, kadmu, ołowiu i niklu uzyskane techniką ICP MS (mg/kg).

	Arsen (As) [mg/kg]	Kadm (Cd) [mg/kg]	Ołów (Pb) [mg/kg]	Nikiel (Ni) [mg/kg]
<b>Granica wykrywalności (GW)</b>	0,73	0,35	0,73	1,38
<b>Granica oznaczalności (GO)</b>	0,95	0,45	0,95	1,80

Tabela 12. Całkowita zawartość arsenu, kadmu, ołowiu i niklu uzyskana techniką ICP MS, niepewność oznaczeń +/- 10 %.

	Arsen (As) [mg/kg]	Kadm (Cd) [mg/kg]	Ołów (Pb) [mg/kg]	Nikiel (Ni) [mg/kg]
<b>SG 1801</b>	<GO	<GO	0,076	<GO
<b>SC 1801A</b>	1,344	0,014	0,875	9,691
<b>SC 1801B</b>	1,306	0,015	0,836	9,729
<b>SC 1801C</b>	1,335	0,011	0,854	10,087
<b>SC 1801D</b>	1,305	0,014	0,837	9,845
<b>CH-JAP</b>	<GO	0,010	0,051	6,140

Na podstawie wyników przedstawionych w Tabeli 12 możemy zauważyć, że zbadane próbki zawierały ilości As, Cd, Pd poniżej GO. Całkowita zawartość arsenu w próbkach **SC 1801A, SC 1801B, SC 1801C, SC 1801D**, z dokładnością +/-10% nie przekraczała 40% od wartości GO (0,95 ppm). Dla próbek **SG 1801** i **CH-JAP** ilość As miała wartości poniżej GW (czyli poniżej 0,73 ppm). W badaniu ilości kadmu, jego całkowita zawartość w **SG 1801, SC 1801A, SC 1801B, SC 1801C, SC 1801D, CH-JAP** była znacznie niższa od GW (0,45 ppm) przy niepewności +/-10%. Badanie zawartości ołowiu wykazało, że jego całkowita ilość w **SC 1801A, SC 1801B, SC 1801C, SC 1801D**, była niższa od GW (0,95 ppm), z dokładnością +/- 10%. Dla próbek **SG 1801** i **CH-JAP** ilość Pb była dziesięciokrotnie niższa od GW = 0,73 ppm.

Całkowita zawartość niklu w surowcach **SC 1801A, SC 1801B, SC 1801C, SC 1801D, CH-JAP** zawierała się niewiele powyżej granicy oznaczalności (GO = 1,80 ppm). Dla próbki próbek **SG 1801** zawartość Ni była poniżej granicy oznaczalności.

#### 4. Podsumowanie

##### *Badania dermatologiczne*

Na podstawie wyników przeprowadzonych testów kontaktowych półotwartych badany produkt **KFN0001 KF NICCOLUM** oraz **KFN0003 KF NICCOLUM** spełnia wymagania testu zgodności ze skórą (Skin Compatibility Test) pod względem dermatologicznym.

##### *Badania mikrobiologiczne*

Badania mikrobiologiczne wykazały nieobecność *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* w 0,1 g. W badanej próbce **SG 1801** i **CH-JAP** nie stwierdzono obecności tlenowych drobnoustrojów mezofilnych przekraczających <math><10</math> jtk/g.

Badania wykazały nieobecność *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* w 0,1 g. W badanej próbce **SC 1801A** stwierdzono obecność tlenowych drobnoustrojów mezofilnych wynoszącą 75 jtk/g. Specyfikacja producenta zakłada jednak, dopuszczalne skarżenie surowca do 1000 jtk/g.

##### *Test konserwacji*

Testom obciążeniowym poddano próbkę **KFPJ074**. **Sposób zakonserwowania produktu kosmetycznego spełnia kryterium A stopnia redukcji drobnoustrojów testowych**. Badania wykazały, że konserwant **uniemożliwia rozwój bakterii**, co więcej, jego działanie spowodowało zdecydowany zanik kontaminacji mikrobiologicznej, która była sztucznie spowodowana na początku badania. Niezwykle istotne jest to, że poziom kontaminacji w wyniku działania konserwantu spadł i wynosił mniej niż  $1,0 \times 10^1$  jtk/g dla każdego monitorowanego szczepu.

##### *Oznaczenie As, Cd, Pb, Ni w surowcach użytych do syntezy substancji aktywnych techniką ICP-MS*

Całkowita zawartość arsenu w próbkach **SC 1801A**, **SC 1801B**, **SC 1801C**, **SC 1801D**, nie przekraczała 40% od wartości granicy oznaczalności (0,95 ppm), z dokładnością +/- 10%. Dla próbek **SG 1801** i **CH-JAP** ilość As była znacznie poniżej granicy wykrywalności (poniżej 0,73 ppm).

Całkowita zawartość kadmu, we wszystkich badanych próbkach była poniżej granicy wykrywalności (0,45 ppm).

Całkowita zawartość ołowiu w próbkach **SC 1801A**, **SC 1801B**, **SC 1801C**, **SC 1801D**, była poniżej granicy oznaczalności (0,95 ppm), z dokładnością +/- 10%. Dla próbek **SG 1801** i **CH-JAP** ilość Pb była dziesięciokrotnie niższa od granicy wykrywalności (od 0,73 ppm).

Całkowita zawartość niklu w próbkach **SC 1801A**, **SC 1801B**, **SC 1801C**, **SC 1801D**, **CH-JAP** zawierała się niewiele powyżej granicy oznaczalności (GO = 1,80 ppm). Dla próbki próbek **SG 1801** zawartość Ni była poniżej granicy oznaczalności.

## VIII. WNIOSKI KOŃCOWE

Zebrano dane literaturowe dotyczące potencjalnych modyfikatorów biopolimeru, mogących służyć do celów założonych w projekcie. Następnie wyselekcjonowane substancje zostały sprzęgnięte z chitozaniem. Otrzymane substancje aktywne zostały poddane szeregowi badań chemicznych, fizykochemicznych i biologicznych. Celem tych badań było określenie przede wszystkim zdolności chelatujących jonów metali: Co(II), Ni(II), Cr(III), Cr(VI). Badania miały na celu również ocenę bezpieczeństwa stosowania analizowanych substancji aktywnych w kosmetykach.

Na podstawie wyników badań wykonywanych w ramach zadań 1-7 stwierdzono zdolności do chelatowania jonów Co(II), Cr(III), Cr(VI), Ni(II) przez zsyntezowane substancje aktywne.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że substancją wykazującą najlepsze właściwości spełniające cele założonego projektu, jest **chitozan modyfikowany glutationem (CH-GSH)**.



## Bibliografia

- [1] A. Bielański, "Chromowce," in *Podstawy chemii nieorganicznej*, 2005, pp. 882–902.
- [2] D. Bregnbak, J. D. Johansen, M. S. Jellesen, C. Zachariae, T. Menné, and J. P. Thyssen, "Chromium allergy and dermatitis: Prevalence and main findings," *Contact Dermatitis*, vol. 73, no. 5, pp. 261–280, 2015.
- [3] J. Buters and T. Biedermann, "Chromium(VI) contact dermatitis: getting closer to understanding the underlying mechanisms of toxicity and sensitization!," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 137, no. 2, pp. 274–277, 2017.
- [4] Y. S. Hedberg, C. Lidén, and I. Odnevall Wallinder, "Chromium released from leather - I: Exposure conditions that govern the release of chromium(III) and chromium(VI)," *Contact Dermatitis*, vol. 72, no. 4, pp. 206–215, 2015.
- [5] A. Bielański, "Żelazo, kobalt i nikiel," in *Podstawy chemii nieorganicznej*, 2005, pp. 917–948.
- [6] D. Hamann, C. R. Hamann, P. Kishi, T. Menné, J. D. Johansen, and J. P. Thyssen, "Leather contains cobalt and poses a risk of allergic contact dermatitis: cobalt indicator solution and X-ray fluorescence spectrometry as screening tests," *Dermatitis*, vol. 27, no. 4, pp. 202–207, 2016.
- [7] J. F. Fowler, "Cobalt," *Dermatitis*, vol. 27, no. 1, pp. 3–8, 2016.
- [8] M. Aquino, T. Mucci, M. Chong, M. D. Lorton, and L. Fonacier, "Mobile phones: potential sources of nickel and cobalt exposure for metal allergic patients," *Pediatr. Allergy. Immunol. Pulmonol.*, vol. 26, no. 4, pp. 181–186, 2013.
- [9] M. Kiec-Świerczyńska, "Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry," *Alerg. Astma Immunol.*, vol. 3, no. 2, pp. 61–65, 1998.
- [10] B. Raghavan, S. F. Martin, P. R. Esser, M. Goebeler, and M. Schmidt, "Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2," *EMBO Rep.*, vol. 13, no. 12, pp. 1109–1115, 2012.
- [11] T. Fischer and I. Rystedt, "Cobalt allergy in hard metal workers," *Contact Dermatitis*, vol. 9, no. 2, pp. 115–121, 1983.
- [12] O. de Fine and T. Menné, "Skin reactivity to metallic cobalt in patients with a positive patch test to cobalt chloride," *Contact Dermatitis*, vol. 27, no. 4, pp. 241–243, 1992.
- [13] W. Uter *et al.*, "Current patch test results with the European baseline series and extensions to it from the 'European Surveillance System on Contact Allergy' network, 2007-2008," *Contact Dermatitis*, vol. 67, no. 1, pp. 9–19, 2012.
- [14] A. Bajaj, A. Saraswat, G. Mukhija, S. Rastogi, and S. Yadav, "Patch testing experience with 1000 patients.," *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, vol. 73, no. 5, pp. 313–318, 2007.
- [15] A. T. . J. Jin and C. L. Goh, "Metal allergy in Singapore," *Contact Dermatitis*, vol. 52, no. 3, pp. 130–132, 2005.
- [16] N. Almutairi and F. Almutawa, "Allergic contact dermatitis pattern in Kuwait: Nickel leads the pack. In-depth analysis of nickel allergy based on the results from a large prospective patch test series report," *Postep. Dermatologii i Alergol.*, vol. 34, no. 3, pp. 207–215, 2017.

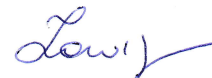


- [17] A. Akyol, A. Boyvat, Y. Peksari, and E. Gürgey, "Contact sensitivity to standard series allergens in 1038 patients with contact dermatitis in Turkey," *Contact Dermatitis*, vol. 52, no. 6, pp. 333–337, 2005.
- [18] W. Boonchai and P. Iamtharachai, "Risk factors for common contact allergens and patch test results using a modified European baseline series in patients tested during between 2000 and 2009 at Siriraj Hospital," *Asian Pacific J. Allergy Immunol.*, vol. 32, no. 1, pp. 60–65, 2014.
- [19] E. M. Warshaw *et al.*, "North American contact dermatitis group patch test results: 2011-2012," *Contact Dermatitis*, vol. 26, no. 1, pp. 49–59, 2015.
- [20] M. N. V. Ravi Kumar, "A review of chitin and chitosan applications," *React. Funct. Polym.*, vol. 46, no. 1, pp. 1–27, 2000.
- [21] A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, and K. de la Caba, "Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 105, pp. 1358–1368, 2017.
- [22] A. Ali and S. Ahmed, "A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 273–286, 2018.
- [23] H. Ishii, M. Minegishi, B. Lavitpichayawong, and T. Mitani, "Synthesis of chitosan-amino acid conjugates and their use in heavy metal uptake," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 17, no. 1, pp. 21–23, 1995.
- [24] Y. S. Petrova, L. K. Neudachina, A. V. Mekhaev, and A. V. Pestov, "Simple synthesis and chelation capacity of N-(2-sulfoethyl)chitosan, a taurine derivative," *Carbohydr. Polym.*, vol. 112, pp. 462–468, 2014.
- [25] Y. S. Petrova, E. I. Kapitanova, L. K. Neudachina, and A. V. Pestov, "Sorption isotherms of metal ions onto an N-(2-sulfoethyl)chitosan-based material from single- and multi-component solutions," *Sep. Sci. Technol.*, vol. 52, no. 15, pp. 2385–2394, 2017.
- [26] Merck, "Karta charakterystyki: Ethylenediaminetetraacetic Acid Tetrasodium Salt." pp. 1–8, 2017.
- [27] Sigma-Aldrich, "Karta charakterystyki: 4-Aminobenzoic acid." pp. 1–8, 2015.
- [28] Merck, "Karta Charakterystyki: Glyoxylic acid," pp. 1–17, 2017.
- [29] B. Liu, Y. J. Zhang, and B. S. Yang, "Two novel Cr(III) complexes [Cr(SA)<sub>2</sub>(en)]TBA and [Cr(SA)(en)<sub>2</sub>]Br: Synthesis, characterization and spectral studies," *Inorg. Chem. Commun.*, vol. 30, pp. 163–167, 2013.
- [30] S. J. Brudenell, S. J. Crimp, J. K. E. Higgs, B. Moubaraki, K. S. Murray, and L. Spiccia, "Binuclear chromium(III) complexes bridged by hydroxide and acetate groups," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 247, pp. 35–41, 1996.
- [31] D. Dinakarandian, V. Morrissette, S. Chaudhary, K. Amini, B. Bennett, and D. J. Van Horn, "An informatics search for the low-molecular weight chromium-binding peptide," *BMC Chem. Biol.*, vol. 4, pp. 1–7, 2004.
- [32] R. F. Carbonaro and A. T. Stone, "Speciation of chromium(III) and cobalt(III) (amino)carboxylate complexes using capillary electrophoresis," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 1, pp. 155–164, 2005.



- [33] E. Raux, C. Thermes, P. Heathcote, A. Rambach, and M. J. Warren, "A role for Salmonella typhimurium cbiK in cobalamin (vitamin B12) and siroheme biosynthesis," *J. Bacteriol.*, vol. 179, no. 10, pp. 3202–3212, 1997.
- [34] K. L. B. Borden *et al.*, "Characterisation of a novel cysteine/histidine-rich metal binding domain from Xenopus nuclear factor XNF7," *FEBS Lett.*, vol. 335, no. 2, pp. 255–260, 1993.
- [35] P. Asbell, S. Epstein, J. A. Wallace, D. Epstein, C. C. Stewart, and R. M. Burger, "Efficacy of cobalt chelates in the rabbit eye model for epithelial herpetic keratitis," *Cornea*, vol. 17, no. 5, pp. 550–557, 1998.
- [36] D. Todorova-Balvay, I. Stoilova, S. Gargova, and M. Vijayalakshmi, "Modular, self-assembling peptide linkers for stable and regenerable carbon nanotube biosensor interfaces," *J. Mol. Recognit.*, vol. 19, pp. 363–371, 2006.
- [37] Sigma-Aldrich, "Karta charakterystyki: Tetrabutylammonium hydroxide solution in methanol." pp. 1–10, 2014.
- [38] Merck, "Karta charakterystyki: Ethylenediamine." pp. 1–9, 2018.
- [39] S. Bosinco, E. Guibal, J. Roussy, and P. Leclourec, "Adsorption of Hexavalent Chromium on Chitosan Beads: Sorption Isotherms and Kinetics," *Miner. Process. Extr. Metall. Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 277–291, 1998.
- [40] W. Kaminski, E. Tomczak, and K. Jaros, "Interactions of metal ions sorbed on chitosan beads," *Desalination*, vol. 218, no. 1–3, pp. 281–286, 2008.
- [41] PK Components, "Specyfikacja Chitosan." p. 1, 2017.
- [42] KF NICCOLUM Sp. z o. o., "Karta charakterystyki: Chitathione." pp. 1–8, 2017.
- [43] J. Li *et al.*, "A chitosan-glutathione based injectable hydrogel for suppression of oxidative stress damage in cardiomyocytes," *Biomaterials*, vol. 34, no. 36, pp. 9071–9081, 2013.

Dr Izabela Zawisz  
Członek zarządu



KF NICCOLUM Sp. z o.o.  
ul. Tadeusza Kościuszki 43  
05-270 Marki, mazowieckie  
NIP: 1251632838, REGON: 361408655