



**Synteza oraz badania właściwości fizykochemicznych  
i biologicznych surfaktantów opartych na lipopeptydach**

Katarzyna Ewa Greber

Promotor  
prof. dr hab. n. farm. Jerzy Wojciech Łukasiak

Praca wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej  
Wydziału Farmaceutycznego z OML  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej  
prof. dr hab. n. farm. Wiesław Sawicki

Gdańsk, 2011

Praca naukowa finansowana ze środków MNiSW w latach 2010-2011  
jako projekt badawczy nr NN 305 412 438  
oraz projektu badawczego W-117 Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej GUMed

# SPIS TREŚCI

<b><u>SKOROWIDZ SKRÓTÓW I SYMBOLI STOSOWANYCH W PRACY</u></b>	<b>5</b>
<b><u>1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA</u></b>	<b>7</b>
<b>1.1. ZNACZENIE ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH I NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO W TECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ</b>	<b>7</b>
1.1.1. STAŁA POSTAĆ LEKU	7
1.1.2. EMULSYJNE UKŁADY DISPERSYJNE	15
1.1.3. NANOCZĄSTKI	23
<b>1.2. KONSERWACJA LEKÓW</b>	<b>27</b>
<b><u>2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY</u></b>	<b>30</b>
<b><u>3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</u></b>	<b>32</b>
<b>3.1. ODCZYNNIKI I APARATURA</b>	<b>32</b>
<b>3.2. OTRZYMYWANIE LIPOPEPTYDÓW METODĄ SYNTEZY NA NOŚNIKU STAŁYM</b>	<b>34</b>
3.2.1. SYNTEZA CHEMICZNA LIPOPEPTYDÓW	34
3.2.2. ANALIZA I OCZYSZCZANIE LIPOPEPTYDÓW	42
<b>3.3. WYBRANE METODY PROGNOZOWANIA WŁAŚCIWOŚCI OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW</b>	<b>45</b>
3.3.1. BILANS HYDROFILOWO-LIPOFILOWY (HLB)	45
3.3.2. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU N-OKTANOL/WODA - LOGP	47
3.3.3. WSPÓŁCZYNNIK DYSTRYBUCJI – LOGD	50
<b>3.4. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW</b>	<b>53</b>
3.4.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM HEKSADEKANOWYM	55
3.4.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM TETRADEKANOWYM	57
3.4.3. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM DODEKANOWYM	59
3.4.4. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM DEKANOWYM	61
3.4.5. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM OKTANOWYM	63
3.4.6. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW ZAWIERAJĄCYCH DWA ŁAŃCUCZY HYDROFOBOWE	65
<b>3.5. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI HEMOLITYCZNYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW</b>	<b>67</b>
<b>3.6. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW</b>	<b>69</b>
3.6.1. METODA POMIARU ZDOLNOŚCI LIPOPEPTYDÓW DO OBNIŻANIA NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO NA GRANICY FAZ POWIETRZE/WODA	70
3.6.1.1. IZOTERMY NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM HEKSADEKANOWYM	72

3.6.1.2. <i>IZOTERMY NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM TETRADEKANOWYM</i>	76
3.6.1.3. <i>IZOTERMY NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO LIPOPEPTYDÓW ZAWIERAJĄCYCH DWA ŁAŃCUCHY HYDROFOBOWE</i>	80
<b>4. <u>OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW</u></b>	<b>83</b>
4.1. <b>OCENA WYNIKÓW BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW</b>	<b>84</b>
4.2. <b>OCENA WYNIKÓW BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW</b>	<b>87</b>
4.3. <b>OCENA WYNIKÓW BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI HEMOLITYCZNYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW</b>	<b>94</b>
4.4. <b>OCENA WYNIKÓW BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH WYBRANYCH LIPOPEPTYDÓW</b>	<b>95</b>
<b>5. <u>PODSUMOWANIE</u></b>	<b>100</b>
<b>6. <u>WNIOSKI</u></b>	<b>101</b>
<b><u>PIŚMIENNICTWO</u></b>	<b>103</b>
<b><u>STRESZCZENIE</u></b>	<b>113</b>
<b><u>SUMMARY</u></b>	<b>115</b>
<b><u>ANEKS</u></b>	<b>117</b>

## SKOROWIDZ SKRÓTÓW I SYMBOLI STOSOWANYCH W PRACY

Stosowane w tekście pracy symbole aminokwasów są zgodne z postanowieniami Połączonej Komisji Nomenklatury Chemicznej i Biochemicznej IUPAC: J. Pept. Sci., 9, 1 (2003).

Pozostałe skróty i oznaczenia stosowane w pracy:

a – współczynnik kierunkowy równania regresji

A – 0,1 % roztwór TFA w wodzie

b – wyraz wolny równania regresji

B – 0,1 % roztwór TFA w acetonitrylu

$\alpha$  – poziom istotności

$\alpha_{\text{gran.}}$  – graniczny poziom istotności

ACN – acetonitryl

AMPs – endogenne antybiotyki peptydowe

Boc – tert-butyloksykarbonyl

C8 lub C<sub>8</sub> – reszta kwasu oktanowego

C10 lub C<sub>10</sub> – reszta kwasu dekanowego

C12 lub C<sub>12</sub> – reszta kwasu dodekanowego

C14 lub C<sub>14</sub> – reszta kwasu tetradekanowego

C16 lub C<sub>16</sub> – reszta kwasu heksadekanowego

C-8 – złożone krzemionkowe modyfikowane fazą oktylową

C-18 lub ODS – złożone krzemionkowe modyfikowane fazą oktadecylową

CFU – jednostka tworząca kolonię

CMC – krytyczne stężenie micelarne

DCM – dichlorometan

DIC – N,N'-diizopropylkarbodiimid

DMF – N,N-dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

Fmoc-AA – reszta aminokwasowa chroniona ugrupowaniem 9-fluorenylometoksykarbonylowym

Fmoc – 9-fluorenylometoksykarbonyl

## Skorowidz skrótów i symboli stosowanych w pracy

- g – przyspieszenie ziemskie
- G (+) – bakterie Gram dodatnie
- G (-) – bakterie Gram ujemne
- HLB – bilans hydrofilowo-lipofilowy
- HOBt – 1-hydroksybenzotriazol
- $H_0$  – hipoteza zerowa
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa
- $\lambda$  – długość fali
- k – współczynnik retencji
- LogD – współczynnik dystrybucji
- LogP – współczynnik podziału n-oktanol/woda
- MALDI-TOF – spektrometria mas z desorpcją laserową i jonizacją z udziałem matrycy i analizatorem czasu przelotu
- MBC – minimalne stężenie bakteriobójcze
- MeOH – alkohol metylowy
- MFC – minimalne stężenie grzybobójcze
- MHC – minimalne stężenie wywołujące hemolizę erytrocytów ludzkich
- MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii/grzybów
- PBS – bufor fosforanowy
- $pC_{20}$  – sprawność obniżania napięcia powierzchniowego
- $\Pi_{CMC}$  – ciśnienie powierzchniowe osiągnięte przez surfaktant przy stężeniu równym CMC
- r – współczynnik korelacji
- RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych
- $\sigma$  – napięcie powierzchniowe lub międzyfazowe
- $\sigma_{CMC}$  – napięcie powierzchniowe w punkcie CMC
- SPE – ekstrakcja do fazy stałej
- SPPS – synteza peptydów na nośniku stałym
- TFA – kwas trifluoroctowy
- TIS – triizopropylsilan
- $t_R$  – czas retencji
- $t_0$  – zerowy czas retencji

## 1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

### 1.1. ZNACZENIE ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH I NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO W TECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

Sprostanie wyzwaniu, jakim jest formułacja nowej postaci leku, wymaga od technologa znajomości nie tylko właściwości biologicznych czy farmakologicznych substancji leczniczej. Niezbędna jest również szeroka wiedza o parametrach fizykochemicznych wszystkich substancji, zarówno leczniczych jak i pomocniczych, używanych podczas otrzymywania leku. Jednym z takich parametrów jest napięcie powierzchniowe. Kontrola nad wielkością napięcia powierzchniowego jest możliwa dzięki zastosowaniu związków powierzchniowo czynnych. Technologia postaci leku zna wiele typów związków powierzchniowo czynnych. Są wśród nich surfaktanty kationowe, anionowe, amfoteryczne, niejonowe lub pochodzenia naturalnego i syntetyczne. Znajdują zastosowanie w wielu postaciach leku począwszy od tabletek, poprzez układy emulsyjne do nanocząstek.

#### 1.1.1. STAŁA POSTAĆ LEKU

##### *TABLETKI*

Tabletki są najbardziej popularną i rozpowszechnioną stałą postacią leku. Ich przewaga nad innymi postaciami leku związana jest z łatwością podania, możliwością produkcji na skalę przemysłową przy relatywnie niskich kosztach wytwarzania, stosunkowo długim okresem trwałości i przydatnością stosowania (1).

Jednym z etapów sporządzania tabletek może być powlekanie, czyli nanoszenie otoczki na rdzenie. Dzięki temu możliwe jest np. zamaskowanie nieprzyjemnego zapachu, smaku lub kontrola szybkości uwalniania substancji leczniczej. Powlekanie poprawia też wygląd i trwałość tabletki (2).

Głównymi składnikami mieszanin powlekających są polimery wielkocząsteczkowe. Można wśród nich wyróżnić następujące grupy: polimery rozpuszczalne w wodzie, np. alkohol poliwinylowy, metyloceluloza, hypromeloza, karmeloza sodu, Makrogole, powidon; polimery rozpuszczalne w środowisku kwaśnym, np. kopolimery kwasu metakrylowego (Eudragit E); polimery rozpuszczalne w środowisku zasadowym, np. octanoftalan celulozy, bursztynian acetylocelulozy, ftalan metylocelulozy, poliestry kwasu metakrylowego (Eudragit L i S); polimery

## Część teoretyczna

nierozpuszczalne w wodzie, w środowisku kwaśnym i zasadowym, np. etyloceluloza, octan celulozy, polichlorek winylu, poliamidy, żywice silikonowe (3; 4; 5). Oprócz polimerów w skład mieszanin powlekających wchodzi substancje pomocnicze, do których zalicza się między innymi związki powierzchniowo czynne (1).

Zadaniem związków powierzchniowo czynnych jest obniżenie napięcia powierzchniowego mieszanin powlekających. W przypadku, gdy napięcie powierzchniowe dyspersji powlekającej jest zbyt duże, kąt zwilżania  $\alpha$  ma wysoką wartość (ryc. 1). Powierzchnia rdzenia jest wtedy słabo zwilżana przez mieszaninę, co w efekcie prowadzi do powstania nierówności na powleczonej powierzchni (6).

Wpływ obecności surfaktantów na proces zwilżania powierzchni ciał stałych związany jest z ich adsorpcją na granicy faz ciało stałe/ciecz. Równanie Younga definiuje cosinus kąta zwilżania  $\alpha$  (7):

$$\cos \alpha = \frac{\sigma_S - \sigma_{SL}}{\sigma_L}$$

gdzie:

$\sigma_S$  – napięcie powierzchniowe na granicy faz powietrze/ciało stałe

$\sigma_{SL}$  – napięcie powierzchniowe na granicy faz ciecz/ciało stałe

$\sigma_L$  – napięcie powierzchniowe na granicy faz powietrze/ciecz



Rycina 1. Wpływ obecności surfaktantów na proces zwilżania modelowej powierzchni rdzenia tabletki. Po lewej dyspersja dobrze zwilżająca, po prawej słabo zwilżająca rdzeń. Oznaczenia jak w tekście (8).

Z równania wynika, że wartość kąta  $\alpha$  maleje gdy wartości  $\sigma_{SL}$  i  $\sigma_L$  maleją a wartość  $\sigma_S$  jest odpowiednio duża i nie zmienia się. Wówczas mówimy, że ciało stałe jest dobrze zwilżane przez ciecz.

W przypadku zwilżania powierzchni niepolarnych, zakładając, że wielkość adsorpcji na granicy faz ciało stałe/powietrze jest zanedbywalnie mała, zależność wpływu stężenia surfaktantu  $C$  na kąt zwilżania  $\alpha$  można opisać równaniem:

$$\frac{d(\sigma_L \cos \alpha)}{d \ln C} = -\frac{d \sigma_{SL}}{d \ln C} = R T \Gamma_{SL}$$

gdzie:

$R$  – stała gazowa

$T$  – temperatura

$\Gamma_{SL}$  – specyficzna adsorpcja surfaktantu na granicy faz ciecz/ciało stałe



## Część teoretyczna

Inną wersją tego równania, które pozwala określić czy dodatek surfaktantu poprawia zwilżalność jest:

$$\frac{d(\sigma_L \cos \alpha)}{d\sigma_L} = \frac{\Gamma_S - \Gamma_{SL}}{\Gamma_L}$$

gdzie:

$\Gamma_{SL}$  – specyficzna adsorpcja surfaktantu na granicy faz ciecz/ciało stałe

$\Gamma_S$  – specyficzna adsorpcja surfaktantu na granicy faz powietrze/ciało stałe

$\Gamma_L$  – specyficzna adsorpcja surfaktantu na granicy faz powietrze/ciecz

W przypadku, gdy napięcie powierzchniowe dyspersji powlekającej jest zbyt małe, krople mieszaniny powlekającej nie łączą się ze sobą wystarczająco szybko. Pod wpływem podwyższonej temperatury rozpuszczalnik odparowuje, a na powierzchni tabletki obserwuje się niewyrównaną powierzchnię otoczki powlekającej (6). Co więcej, defekty mogą być wywołane nawet przez lokalne zmiany napięcia powierzchniowego, powstałe w objętości mieszaniny powlekającej, w wyniku gradientu temperatury czy występowania zanieczyszczeń (9).

Na ryc. 2 przedstawiono mechanizm tworzenia otoczki polimerowej z dyspersji powlekającej na rdzeniach tabletek, obejmujący trzy główne etapy: adsorpcji kropelek dyspersji powlekającej na powierzchni rdzenia, koalescencję oraz końcowe suszenie i formowanie się właściwej otoczki.



Rycina 2. Mechanizm tworzenia polimerowej otoczki w procesie nanoszenia mieszaniny powlekającej na rdzeń tabletki (10).

Gwarantem uzyskania produktu wysokiej jakości jest kontrola oraz sterowanie wielkością, jaką jest napięcie powierzchniowe mieszanin powlekających.

Związki powierzchniowo czynne znajdują zastosowanie w badaniach uwalniania substancji leczniczych z doustnych stałych postaci leku, takich jak proszki, granulaty, tabletki czy peletki. Szybkość uwalniania substancji leczniczej jest nazywana dostępnością farmaceutyczną i wyraża się jako procent całkowitej dawki substancji leczniczej, uwolnionej w określonym czasie do płynu akceptorowego. O uwalnianiu można mówić wtedy, gdy substancja lecznicza przechodzi ze stałej formy do formy rozpuszczonej (rozproszenia molekularnego) w płynie akceptorowym. Jednak

uwalnianie nie zawsze jest tożsamy z rozpuszczaniem. W przypadku, gdy postać leku zawiera już rozpuszczoną substancję leczniczą, jej uwalnianie sprowadza się do prostej dyfuzji z formy leku do środowiska aplikacji. Badania nad szybkością uwalniania służą do oceny jakości wytworzonego produktu leczniczego, a po rejestracji leku stają się procedurą walidacyjną mającą na celu wykazanie powtarzalności procesu produkcyjnego. Warunki eksperymentu powinny być dobrane w taki sposób, by nie wpływały na szybkość uwalniania. Dlatego nie należy dopuścić do powstania roztworu nasyconego substancji leczniczej, której szybkość uwalniania jest oznaczana, gdyż osiągnięcie stanu równowagi ciało stałe/forma rozpuszczona spowoduje zahamowanie uwalniania substancji leczniczej z testowanej formy leku. W celu zapobieżenia osiągnięcia przez układ stanu równowagi, należy tak dobrać objętość płynu akceptorowego, aby stężenie substancji uwolnionej z formy leku było mniejsze od jej rozpuszczalności. W badaniach uwalniania przyjmuje się, że w końcowym punkcie stężenie uwolnionej substancji leczniczej nie może przekroczyć 30% stężenia roztworu nasyconego. Takie warunki testu określa się mianem *sink*. W przypadku substancji leczniczych trudno rozpuszczalnych, stan równowagi ciało stałe/forma rozpuszczona jest bardzo łatwo osiągalny. Zapewnienie warunków *sink* jest możliwe dzięki zastosowaniu związków powierzchniowo czynnych o właściwościach solubilizujących (11). Taka modyfikacja płynu akceptorowego sprawia, że substancja trudno rozpuszczalna, występująca w formie rozproszenia molekularnego, przechodząc z fazy wodnej do pseudofazy micelarnej, przesuwając równowagę procesu rozpuszczania w prawą stronę. Dzięki temu nie dochodzi do zahamowania uwalniania substancji leczniczej z badanej postaci leku. Solubilizatorem zwykle dodawanym do płynu akceptorowego jest laurylosiarczan sodu w stężeniu najczęściej 2 % (12). Jest to stężenie przekraczające krytyczne stężenie micelarne, które dla tego związku wynosi 0,0082 M. Innymi związkami powierzchniowo czynnymi o właściwościach solubilizujących, stosowanymi w badaniach uwalniania są Tween, Brij, poloksamer, Cremophor, Triton lub lecytyna (13; 14).

Największy wpływ na szybkość uwalniania *in vivo* mają właściwości fizykochemiczne postaci leku oraz samej substancji leczniczej. Nie bez znaczenia są też właściwości płynu żołądkowo-jelitowego, który w warunkach fizjologicznych jest roztworem akceptorowym, takie jak pH, obecność enzymów, jonów czy naturalnych związków powierzchniowo czynnych. Do naturalnych surfaktantów, obecnych w przewodzie pokarmowym człowieka można zaliczyć sole kwasów żółciowych i fosfolipidy. Do sekrecji fosfolipidów dochodzi już w żołądku, którego błona śluzowa wydziela w głównej mierze fosfatydylocholinę. Naturalne tenzydy produkowane przez wątrobę trafiają wraz z żółcią do dwunastnicy. Stąd ich znaczny wpływ na napięcie powierzchniowe płynów przewodu pokarmowego (15). Stwierdzono, że napięcie powierzchniowe ma różną wartość [mN/m] na różnych jego odcinkach: w żołądku  $33,6 \pm 5,9$ ; w dwunastnicy 32,3 a w jelicie czczym  $33,7 \pm 2,8$ . Tak niskie wartości napięcia powierzchniowego wpływają na stopień zwilżania hydrofobowej powierzchni stałej postaci leku (ryc. 1), przez co wpływają również na rozpuszczanie substancji leczniczej (16).

Natywne tenzydy mogą solubilizować trudno rozpuszczalną substancję leczniczą i zwiększać jej rozpuszczalność (17). Solubilizacja substancji leczniczej polega na włączaniu

## Część teoretyczna

jej cząsteczek do struktury miceli utworzonej w wodnym roztworze surfaktantu. Rozpuszczenie substancji hydrofobowej z wytworzeniem roztworu optycznie przezroczystego zajdzie tylko wtedy, gdy stężenie surfaktantu jest wyższe od wartości krytycznego stężenia micelnego (CMC) (18).

Z termodynamicznego punktu widzenia, solubilizację substancji leczniczej można uznać za podział między dwie fazy, pseudofazę micelną i fazę wodną. Swobodna energia solubilizacji  $\Delta G_s^0$  wyrażona jest wzorem:

$$\Delta G_s^0 = -RT \ln P$$

gdzie:

$\Delta G_s^0$  – swobodna energia solubilizacji

$R$  – stała gazowa

$T$  – temperatura

$P$  – współczynnik podziału między pseudofazę micelną i fazę wodną

Solubilizację micelną można opisać dwoma parametrami, charakterystycznymi dla tego procesu. Jest to siła solubilizacji  $\chi$  i wspomniany wyżej współczynnik podziału substancji hydrofobowej między pseudofazę micelną i fazę wodną  $P$ .

Siła solubilizacji  $\chi$  jest wielkością, która określa zdolność micel do włączania do swojej struktury substancji hydrofobowej. Określa ona liczbę moli substancji, jaka ulega solubilizacji w przeliczeniu na mol surfaktantu (19):

$$\chi = \frac{S_{tot} - S_w}{C_{surf} - CMC}$$

gdzie:

$\chi$  – siła solubilizacji

$S_{tot}$  – rozpuszczalność związku hydrofobowego w roztworze surfaktantu o stężeniu  $C_{surf}$

$S_w$  – rozpuszczalność związku hydrofobowego w czystej wodzie

$C_{surf}$  – stężenie związku powierzchniowo czynnego w roztworze

$CMC$  – krytyczne stężenie micelarne

Innymi słowy siłę solubilizacji  $\chi$  można zdefiniować, jako stosunek stężenia substancji solubilizowanej, obecnej w pseudofazie micelarnej ( $S_{tot} - S_w$ ), do stężenia związku powierzchniowo czynnego tworzącego pseudofazę micelną ( $C_{surf} - CMC$ ).

Współczynnik podziału  $P$  substancji solubilizowanej, między pseudofazę micelną a fazę wodną opisuje równanie:

$$P = \frac{S_{tot} - S_w}{S_w}$$

## Część teoretyczna

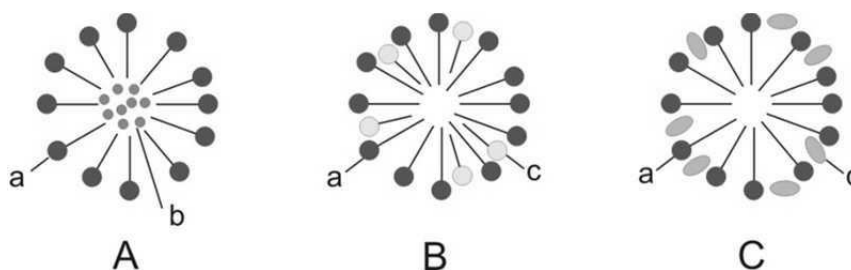
Łącząc dwa ostatnie równania można połączyć dwa parametry charakteryzujące proces solubilizacji:

$$P = \frac{\chi(C_{surf} - CMC)}{S_w}$$

W celu wyeliminowania zależności  $P$  od stężenia związku powierzchniowo czynnego w roztworze wodnym  $C_{surf}$ , wprowadzono molowy współczynnik podziału pseudofaza micelarna/woda  $P_M$ , odpowiadający współczynnikowi podziału przy stężeniu surfaktantu  $C_{surf} = 1M$ , wtedy  $P$  wyraża się wzorem:

$$P = \frac{\chi(1 - CMC)}{S_w}$$

Na ryc. 3 przedstawiono trzy najczęściej sugerowane mechanizmy opisujące proces solubilizacji. Pierwszym z nich jest rozpuszczanie hydrofobowego solubilizatu w niepolarnym wnętrzu miceli. Ten mechanizm charakterystyczny jest np. dla preparatów myjących i piorących (A). Drugi sprowadza się do głębokiej penetracji warstwy palisadowej miceli przez solubilizat (B). Przykładem tego typu solubilizacji może być wbudowywanie kosurfaktantów w strukturę miceli. Ulegają jej związki amfifilowe. Trzeci mechanizm można opisać, jako adsorpcję solubilizatu na polarnej powierzchni miceli (C) (19; 20).



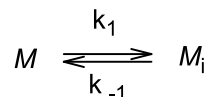
Rycina 3. Podstawowe typy mechanizmów A, B, C procesów solubilizacji substancji leczniczych o różnych właściwościach, przez micelle w wodnych roztworach surfaktantów. Oznaczenia: a - surfaktant, b - solubilizowana substancja niepolarna, c - solubilizowana substancja polarna z resztą hydrofobową, d - solubilizowana substancja polarna bez reszty hydrofobowej (19; 20).

Zjawisko solubilizacji odgrywa bardzo ważną rolę w procesie rozpuszczania hydrofobowych substancji leczniczych. Mechanizm procesu solubilizacji substancji hydrofobowej  $S$  przez micelle  $M$  obejmuje następujące etapy (19):

## Część teoretyczna

### Etap I

Asocjaty micelarne surfaktantów  $M$ , dyfundują z fazy objętościowej roztworu w kierunku granicy faz: wodny roztwór surfaktantu /substancja hydrofobowa  $S$ . Proces opisuje równanie:



gdzie:

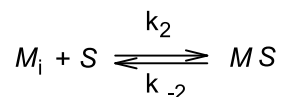
$M_i$  – stężenie asocjatów micelarnych na granicy faz: roztwór/substancja hydrofobowa

$k_1$  – stała szybkości procesu dyfuzji cząsteczek surfaktantu do granicy faz

$k_{-1}$  – stała szybkości procesu dyfuzji cząsteczek od granicy faz

### Etap II

Znajdujący się w pobliżu granicy faz asocjaty micelarny adsorbują się na powierzchni substancji hydrofobowej:



gdzie:

$S$  – wolne miejsce na powierzchni substancji hydrofobowej

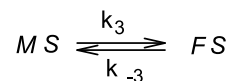
$M S$  – micela zaadsorbowana na powierzchni substancji hydrofobowej

$k_2$  – stała szybkości procesu adsorpcji asocjatu micelarnego na powierzchni ciała stałego

$k_{-2}$  – stała szybkości procesu desorpcji asocjatu micelarnego z powierzchni ciała stałego

### Etap III

Cząsteczki substancji hydrofobowej mieszają się z zaadsorbowanym asocjatem micelarnym  $M S$ . W przypadku nadmiaru substancji hydrofobowej  $S$  równowagę tego procesu opisuje równanie:



gdzie:

$F S$  – asocjaty micelarne zawierające substancje hydrofobowe związane z powierzchnią ciała stałego

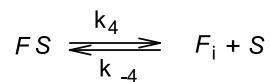
$k_3$  – stała szybkości procesu transportu substancji hydrofobowej zaadsorbowanej na powierzchni miceli do jej wnętrza

$k_{-3}$  – stała szybkości procesu transportu substancji hydrofobowej z wnętrza miceli na jej powierzchnię

## Część teoretyczna

### Etap IV

Asocjat micelarny (zawierający substancje hydrofobowe)  $FS$ , związany z powierzchnią ciała stałego, desorbuje unosząc ze sobą substancję hydrofobową w postaci asocjatu  $F_i$ , pozostawiając wolną powierzchnię  $S$  ciała stałego:



gdzie:

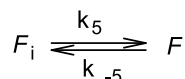
$F_i$  – agregat oderwany od powierzchni ciała stałego w pobliżu granicy fazy  $S$

$k_4$  – stała szybkości procesu desorpcji asocjatu micelarnego z substancją hydrofobową od powierzchni ciała stałego

$k_{-4}$  – stała szybkości procesu adsorpcji asocjatu micelarnego z substancją hydrofobową na powierzchni ciała stałego

### Etap V

Mieszane agregaty dyfundują z dala od powierzchni substratu:



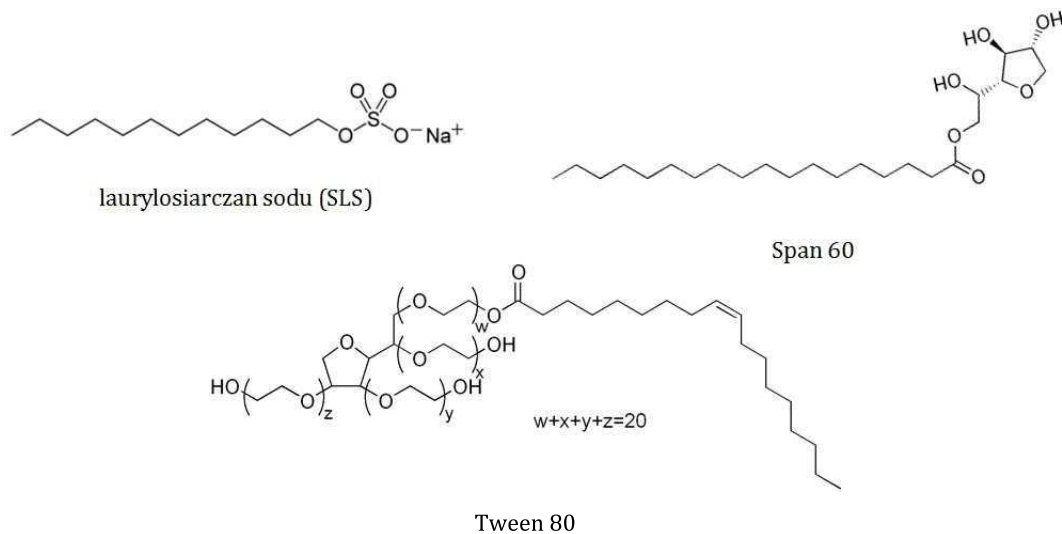
gdzie:

$F$  – agregat micela/substancja hydrofobowa w głębi roztworu surfaktantu

$k_5$  – stała szybkości procesu dyfuzji agregatu z substancją hydrofobową od powierzchni substratu

$k_{-5}$  – stała szybkości procesu dyfuzji agregatu z substancją hydrofobową do powierzchni ciała stałego (substratu)

Na ryc. 4 przedstawiono struktury związków powierzchniowo czynnych najczęściej wykorzystywanych w technologii stałej postaci leku. Należą do nich Tweeny, Spany oraz laurylosiarczan sodu (SLS).



Rycina 4. Związki powierzchniowo czynne najczęściej wykorzystywane w technologii stałej postaci leku.

### 1.1.2. EMULSYJNE UKŁADY DYSPERSYJNE

Kolejną postacią leku, w której znaczenie związków powierzchniowo czynnych jest bardzo istotne dla ich efektu działania i stabilności, są układy emulsyjne.

Emulsyjne układy dyspersyjne składają się z przynajmniej dwóch faz: dyspersyjnej – wewnętrznej i ciągłej – zewnętrznej. Ze względu na rozmiar cząstek fazy rozproszonej można podzielić je na (19):

- makroemulsje o rozmiarze kropli 200 – 500 nm,
- emulsje submikronowe (nanoemulsje) o rozmiarze kropli 100 – 400 nm,
- mikroemulsje o rozmiarze kropli 10 – 200 nm.

Ponieważ powyższa klasyfikacja, oparta na rozmiarze kropli, stwarza możliwość zaliczenia nanoemulsji zarówno do makroemulsji jak i mikroemulsji, wprowadzono podział, według kryterium trwałości termodynamicznej emulsji i wyszczególniono (19):

- makroemulsje wykazujące trwałość kinetyczną,
- mikroemulsje wykazujące trwałość termodynamiczną.

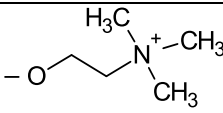
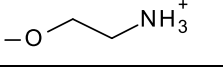
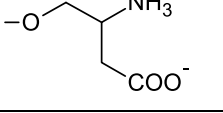
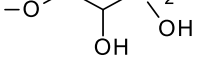
Trwałość kinetyczna emulsji oznacza stabilność jej właściwości fizycznych w określonym czasie. Jednak w sensie termodynamicznym nie jest to układ trwały, ponieważ nie znajduje się w stanie o najniższej, możliwej w danych warunkach energii swobodnej. Do przykładów takich układów możemy zaliczyć emulsje submikronowe, mleczka kosmetyczne, kremy, maści. Natomiast trwałość termodynamiczna emulsji oznacza stan, w którym stabilność jej właściwości fizycznych jest niezmienna w czasie. Nawet po nieograniczenie długim czasie układ emulsyjny ma, w danych warunkach, minimalną energię swobodną. Mikroemulsje należą do układów stabilnych termodynamicznie (19).

### *EMULSJE SUBMIKRONOWE – NANOEMULSJE*

Emulsje submikronowe, zwane też nanoemulsjami, są układami dyspersyjnymi fazy olejowej w wodzie (o/w), wodnej w oleju (w/o) lub dyspersjami wielokrotnymi (o/w/o) (21; 22). Mogą być stosowane pozajelitowo, przy czym emulsje typu w/o i o/w/o tylko domięśniowo. Nanoemulsje typu o/w stosuje się podskórną i domięśniowo. Jednak zdecydowanie najczęściej stosowane są dożylnie w żywieniu pozajelitowym, gdzie służą jako źródło energii pokrywające od 15 do nawet 60% zapotrzebowania energetycznego pacjenta. Dożylną podaż emulsji submikronowych umożliwia rozmiar cząstek nie większy niż 500 nm (23; 24). Rozmiary cząstek emulsji podawanej pozajelitowo większe niż 4 – 6  $\mu\text{m}$  mogą doprowadzić do nagłego zamknięcia

światła naczyń krwionośnego. Aby temu zapobiec, niezbędna jest kontrola rozmiarów cząstek emulsji submikronowych (25).

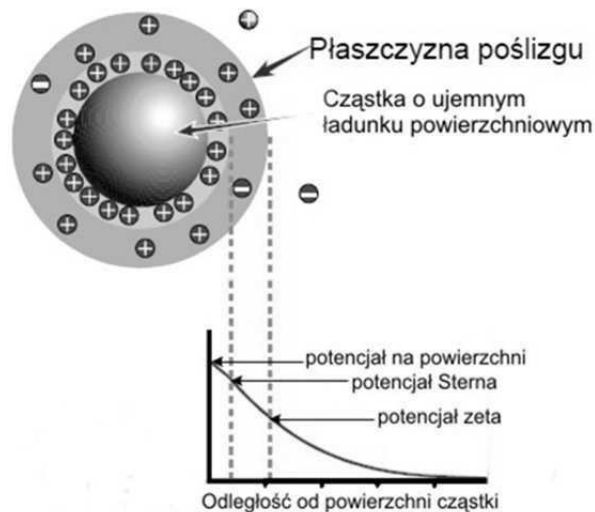
Do stabilizacji emulsji submikronowych podawanych dożylnie zdecydowanie najczęściej używa się fosfolipidów. Ich źródłem jest lecytyna pochodząca z żółtka jaj lub nasion soi. Nieoczyszczona lecytyna jest mieszaniną fosfolipidów, glikolipidów, triglicerydów, steroli, małych ilości kwasów tłuszczowych, węglowodanów i sfingolipidów. Poprzez ekstrakcję i frakcjonowanie otrzymuje się produkt złożony w głównej mierze z fosfatydylocholiny (PC) i fosfatydyloetanolaminy (PE) (ok. 90%) oraz z fosfatydyloseryny (PS) i fosfatydyloglicerolu (PG) (ok. 2 – 5%) (26). W związku z tym, że fosfolipidy są składnikami naturalnych błon komórkowych, lecytyna wykazuje doskonałą biogodność z tkankami organizmu człowieka. W tab. 1 przedstawiono struktury chemiczne fosfolipidów tworzących submikronowe układy dyspersyjne.

Tabela 1. Struktury chemiczne fosfolipidów stabilizujących submikronowe układy emulsyjne (27).			
Fragment hydrofobowy	Fragment hydrofilowy (HG)	Fosfolipid	Skrót
$  \begin{array}{c}  R_1\text{-CO-O-CH}_2 \\    \\  R_2\text{-CO-O-CH} \\    \\  \text{CH}_2\text{-OP}^-\text{-O}_3^-\text{(HG)}  \end{array}  $		fosfatydylocholina	PC
		fosfatydyloetanolamina	PE
		fosfatydyloseryna	PS
		fosfatydyloglicerol	PG

HG - hydrofilowy fragment cząsteczki fosfolipidu  
R<sub>1</sub> - nasycone i jednonienasycone kwasy tłuszczowe takie jak: palmitynowy, stearynowy, oleinowy  
R<sub>2</sub> - wielonienasycone kwasy tłuszczowe takie jak: oleinowy, linolowy, arachidonowy

Lecytyna jest słabym emulgatorem, zapewnia jednak kinetyczną trwałość emulsji submikronowych, która warunkowana jest przez niewielki rozmiar cząstek oraz potencjał zeta ( $\zeta$ ) (28). Cząstki nanoemulsji mniejsze niż 500 nm zachowują się zgodnie z teorią ruchów Browna, co zapobiega ich zlewaniu. Ponadto na powierzchni cząstki oleju stabilizowanej lecytyną istnieje podwójna warstwa elektryczna (ryc. 5): wewnętrzna warstwa Sterna, w której jony są silnie związane z jej powierzchnią oraz zewnętrzna warstwa dyfuzyjna, gdzie występują jony luźno związane. W obrębie warstwy dyfuzyjnej znajduje się pewna granica, poza którą cząstki zachowują się jak niezależne indywidua. Potencjał tej granicy nazywamy potencjałem zeta ( $\zeta$ ). Na trwałość submikronowych układów emulsyjnych wpływa więc ujemny ładunek elektryczny, wytworzony na powierzchni kropli oleju.

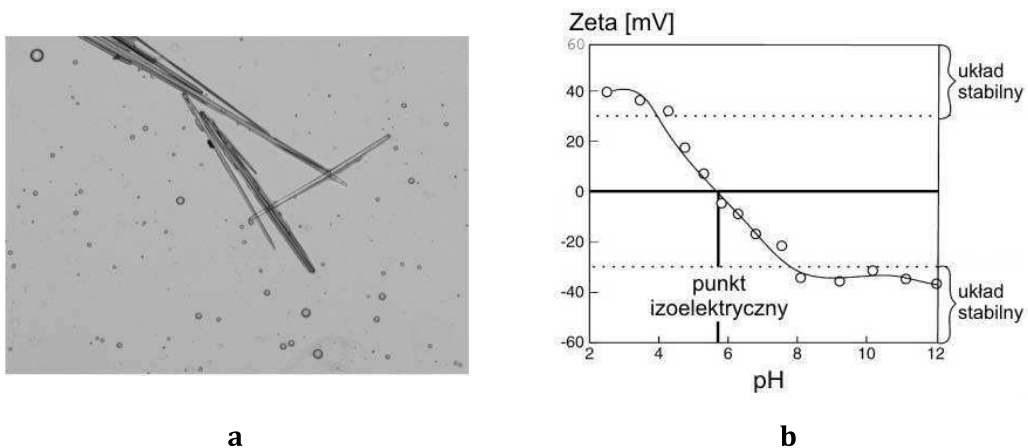




Rycina 5. Budowa ujemnie naładowanej cząstki koloidalnej (29).

Sumaryczny ładunek ujemny pojawia się w wyniku dysocjacji hydrofilowych fragmentów fosfatydyloseryny i fosfatydyloglicerolu (30). Tak wytworzony powierzchniowy ładunek stanowi barierę elektrostatyczną i zapobiega flokulacji i koalescencji. Potencjał zeta dla układów submikronowych stabilizowanych lecytyną waha się w granicach od -40 do -50 mV, przy czym stabilność takich układów zapewnia wartość powyżej +30 lub poniżej -30 mV (31; 29).

Nanoemulsje są wrażliwe na zmiany temperatury. Przechowywane w temperaturze do 25 °C, niezawierające substancji leczniczej są trwałe przez 2 lata. Zamrożenie i rozmrożenie układu może doprowadzić do krystalizacji substancji leczniczej, podawanej w formie emulsji submikronowej. Przykładem może być przedstawiony na ryc. 6a efekt wykrystalizowania fenytoiny z emulsji submikronowej. Kryształy substancji leczniczej pojawiły się w układzie po zamrożeniu i rozmrożeniu nanoemulsji. Emulsje submikronowe nie są odporne na drastyczne zmiany pH. Nagłe zakwaszenie środowiska nanoemulsji powoduje protonowanie grup funkcyjnych PS i PG i spadek wartości potencjału zeta, co w konsekwencji prowadzi do złamania emulsji. Zależność wartości  $\zeta$  nanoemulsji od pH przedstawiono na ryc. 6b (31; 29).



Rycina 6. Po lewej (a) kryształy fenytoiny powstałe w wyniku zamrożenia i rozmrożenia nanoemulsji, po prawej (b) zależność wartości potencjału zeta emulsji submikronowej od pH środowiska (31; 29).

Emulsje submikronowe mogą być nośnikami leczniczych substancji hydrofobowych, trudno rozpuszczalnych, podawanych dożylnie takich jak: flurbiprofen, diazepam, propofol oraz witamin A, D, E, K (32). W tab. 2 przedstawiono dostępne na rynku farmaceutycznym leki w postaci emulsji submikronowych.

<b>Tabela 2.</b> Przykłady emulsji submikronowych podawanych pozajelitowo.			
<b>Nazwa handlowa</b>	<b>Substancja lecznicza</b>	<b>Działanie</b>	<b>Producent</b>
Diazemuls®	Diazepam	Uspokajające	Pharmacia&Upjohn
Diazepam-®Lipuro	Diazepam	Uspokajające	Braun
Diprivan®	Propofol	Znieczulające	Astra Zeneca
Disoprivan®	Propofol	Znieczulające	ICI Pharma
Etomidate-®Lipuro	Etomidat	Podtrzymanie znieczulenia ogólnego	B. Braun Melsungen AG
FrekaVit®	Witaminy A, D, E, K	Żywienie pozajelitowe	Fresenius Kabi
Limethason®	Deksametazonu palmitynian	Przeciwzapalne, przeciwobrzękowe	Mitsubishi Pharmaceutical
Liple®	Alprostadyl (Prostaglandyna E1)	Rozszerzające naczynia krwionośne	Mitsubishi Pharmaceutical
Lipotalon®	Deksametoksazonu palmitynian	Przeciwzapalne, immunosupresyjne	Merckle
Propofol 1%/2% Fresenius	Propofol	Znieczulające	Fresenius Kabi
Ropion®	Flurbiprofen	Przeciwbólowe	Kaken Pharmaceuticals
Stesolid®	Diazepam	Uspokajające	Dumex
Vitalipid®	Witaminy A, D, E, K	Żywienie pozajelitowe	Fresenius Kabi

Jednocześnie w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są badania nad zastosowaniem układów submikronowych podawanych doustnie, doodbytniczo, transdermalnie lub miejscowo. W tab. 3 przedstawiono przykłady substancji leczniczych, które mogą w przyszłości stanowić nanoemulsyjną postać leku dostępną komercyjnie.

<b>Tabela 3.</b> Przykłady substancji leczniczych, nad którymi trwają badania naukowe dotyczące możliwości ich stosowania w leczeniu w postaci emulsji submikronowych.		
<b>Substancja lecznicza</b>	<b>Droga podania</b>	<b>Komentarz</b>
Amfoterycyna B	Pozajelitowo	Postać leku efektywniejsza niż Fungizone® (33)
Diazepam	Transdermalnie	Znaczna aktywność ogólnoustrojowa, porównywalna z podażą pozajelitową (34)
Diazepam	Doodbytniczo	Nanoemulsja fizykochemicznie stabilna, biodostępność nieco wyższa niż w przypadku podaży roztworu diazepam (35)
Diclofenac	Transdermalnie	Aktywność o 40% większa niż Voltaren Emulgel (36)
Ekonazol/ Mikonazol	Transdermalnie	Lepszy stopień przenikania przez skórę dodatnio naładowanych cząstek nanoemulsji (37)
Indometacyna	Do oka	Wydłużony czas ekspozycji na substancję leczniczą, lepsza zwilżalność rogówki (38)
Lorazepam	Pozajelitowo	Stabilna postać leku niewywołująca znacznej hemolizy (39)
Tirilazad	Pozajelitowo	Wysoka stabilność fizykochemiczna, znacznie zredukowane podrażnienie żyły (40; 41)

### *MIKROEMULSJE*

Termin mikroemulsja określa układ zawierający pozornie jednorodną mieszaninę wody i oleju z dużą ilością surfaktantu. W przeciwieństwie do makroemulsji, mikroemulsje tworzą się spontanicznie a energia niezbędna do ich wytworzenia jest minimalna. Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne takie jak: termodynamiczna stabilność, stosunkowa łatwość tworzenia, duża powierzchnia graniczna, duża zdolność solubilizacyjna, niska lepkość i transparentność, mały rozmiar cząstek, najczęściej rzędu 10-200 nm, mikroemulsje mogą być dobrym nośnikiem substancji leczniczych (42; 43).

Badania dotyczące możliwość zastosowania mikroemulsji obejmują następujące drogi podania: dożylną (44), doustną (45), transdermalną i miejscową na skórę (46; 47), donosową (48; 49), inhalacyjną w formie aerozolu (50), pozajelitową do jam ciała: np. dopochwową (51; 52) oraz doodbytniczą (53).

Charakter tworzonej mikroemulsji jest silnie uzależniony od właściwości zastosowanego związku powierzchniowo czynnego. W celu zdefiniowania tego charakteru oraz analizy wpływu geometrii surfaktantu na rodzaj tworzących się micel, wprowadzono parametr upakowania emulsji *CPP* (Critical Packing Parameter) (54):

$$CPP = \frac{V}{AL}$$

gdzie:

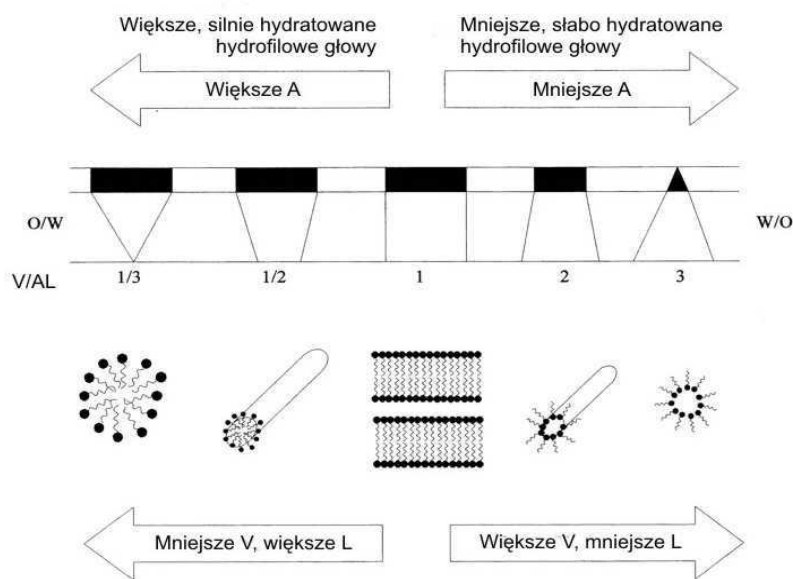
*V* – objętość hydrofobowego łańcucha alkilowego związku powierzchniowo czynnego

*L* – długość hydrofobowego łańcucha alkilowego związku powierzchniowo czynnego

*A* – optymalna powierzchnia grupy polarnej związku powierzchniowo czynnego

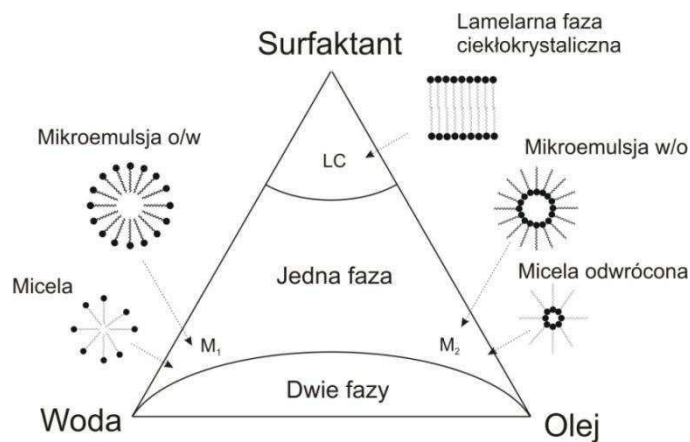
W przypadku, gdy parametr *CPP* dla surfaktantu jest mniejszy niż 1 granica faz ma krzywiznę dodatnią i tworzy mikroemulsję typu o/w, gdy *CPP* jest większe od 1 granica faz zakrzywia się ujemnie i tworzy emulsję typu w/o, gdy *CPP* jest równe 1 surfaktant tworzy strukturę lamelarną, w ten sposób powstają micelle warstwowe. Graficzną interpretację wpływu budowy geometrycznej cząsteczek surfaktantu, czyli parametru *CPP*, na typ tworzonych układów micelarnych przedstawiono na ryc. 7 (54).

## Część teoretyczna



Rycina 7. Wpływ geometrii cząsteczki surfaktantu na rodzaj tworzonych układów micelarnych (54).

Na charakter powstającej mikroemulsji wpływa skład mieszaniny trójskładnikowej surfaktant/woda/olej. Na ryc. 8 przedstawiono wykres fazowy dla układów surfaktantów zawierających mikroemulsje. W przypadku, gdy w układzie trójskładnikowym faza wodna występuje w nadmiarze w stosunku do dwóch pozostałych, tworzą się zwykle micelle, zwiększenie ilości fazy olejowej (obszar  $M_1$ ) doprowadzi do powstania mikroemulsji typu o/w. Przy wysokim stężeniu fazy olejowej surfaktant tworzy micelle odwrócone, które „solubilizują” cząsteczki wody w hydrofilowym wnętrzu. Wzrost stężenia fazy wodnej doprowadzi do powstania mikroemulsji typu w/o (obszar  $M_2$ ). Wysokie stężenie związku powierzchniowo czynnego przy jednoczesnym niskim stężeniu fazy olejowej i wodnej sprawia, że surfaktant tworzy lamelarną fazę ciekłokrystaliczną, LC (54).



Rycina 8. Wykres fazowy dla układów związków powierzchniowo czynnych zawierających mikroemulsje. Oznaczenia literowe:  $M_1$  – obszar występowania mikroemulsji typu o/w,  $M_2$  – obszar występowania mikroemulsji typu w/o, LC – obszar występowania lamelarniej fazy ciekłokrystalicznej (54).

## Część teoretyczna

Warunkiem otrzymania mikroemulsji jest bardzo niska wartość napięcia międzyfazowego (55):

$$\sigma_c = \sigma_{o/w} - P$$

gdzie:

$\sigma_c$  – całkowite napięcie międzyfazowe

$\sigma_{o/w}$  – napięcie międzyfazowe na granicy faz olej/woda bez surfaktantu

$P$  – ciśnienie rozprzestrzeniania się surfaktantu na granicy faz olej/woda

Warunkiem spontanicznego tworzenia się mikroemulsji jest ujemna wartość energii swobodnej układu  $\Delta G$  (54):

$$\Delta G = \sigma_c \Delta A - T\Delta S$$

gdzie:

$\Delta G$  – energia swobodna układu

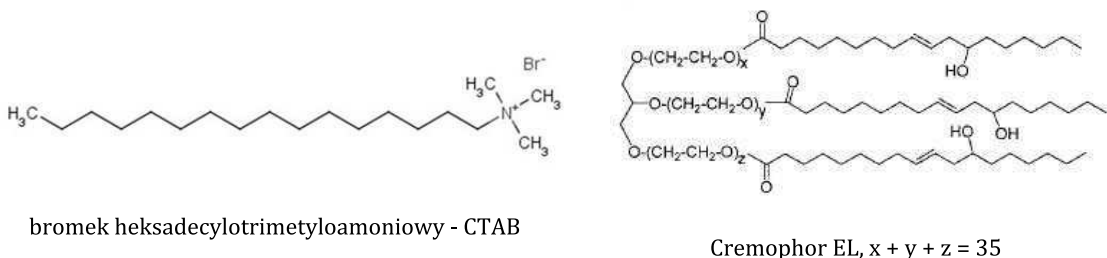
$\Delta A$  – zmiana powierzchni międzyfazowej

$\Delta S$  – zmiana entropii

$T$  – temperatura

Ze względu na dużą wielkość zmian powierzchni międzyfazowej  $\Delta A$ , powyższy warunek będzie spełniony jedynie dla skrajnie małych wartości całkowitego napięcia międzyfazowego  $\sigma_c$ . Dla układów mikroemulsyjnych wartość  $\sigma_c$  rzeczywiście jest bardzo niska i wynosi od  $10^{-4}$  do  $10^{-2}$  mN/m. Tak niską wartość napięcia międzyfazowego można osiągnąć jedynie poprzez wprowadzenie do układu bardzo dużej ilości związku powierzchniowo czynnego. Zawartość surfaktantu w mikroemulsji jest często wyższa niż 20 % (8; 56).

Do stabilizacji mikroemulsji wykorzystywanych jest szereg związków powierzchniowo czynnych, w tym: niejonowe (Brij 35, Span 80, Span 20, Tween 80, Cremophor EL), amfoteryczne (fosfolipidy), kationowe (bromek heksadecylotrimetyloamoniowy - CTAB, bromek didodecyldimetyloamoniowy - DDAB), anionowe (diodktylosulfobursztynian sodu - DOSS) (57; 58; 59; 60; 61; 62). Na ryc. 9 przedstawiono struktury przykładowych związków powierzchniowo czynnych wykorzystywanych w mikroemulsjach.



bromek heksadecylotrimetyloamoniowy - CTAB

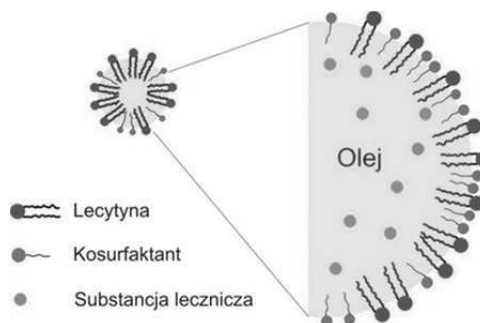
Cremophor EL,  $x + y + z = 35$

Rycina 9. Struktury związków powierzchniowo czynnych stosowanych do stabilizacji mikroemulsji. Po lewej kationowy bromek heksadecylotrimetyloamoniowy – CTAB, po prawej niejonowy Cremophor EL.

## Część teoretyczna

Mimo dużej różnorodności dostępnych surfaktantów, które są w stanie stworzyć stabilny układ mikroemulsyjny, to dostępnych na rynku postaci leku w tej właśnie formie jest ciągle niewiele. Duże stężenie związku powierzchniowo czynnego może wywołać niepożądane efekty uboczne. Zanotowano, że Cremophor EL w wysokim stężeniu, podany pozajelitowo może wywoływać szok anafilaktyczny oraz uwolnienie histaminy, a niektóre alkilowe etery polioksoetylenowe (Brij) hemolizę krwinek czerwonych (63; 64). Dlatego surfaktanty pochodzenia naturalnego, takie jak fosfolipidy, są zawsze najlepszym rozwiązaniem ze względu na swoją biogodność z tkankami organizmu ludzkiego.

Jednakże lecytyna, ze względu na wysoki stopień hydrofobowości cząsteczki ( $HLB = 4$ ), wykazuje silne tendencje do tworzenia lamelarnych form ciekłokrystalicznych (65). W związku z tym spontaniczne utworzenie pojedynczej, niezakrzywionej warstwy fosfolipidowej, niezbędnej do utworzenia mikroemulsji jest niemożliwe. Stąd też konieczne jest zastosowanie surfaktantu pomocniczego, tzw. kosurfaktantu. Kosurfaktanty zwiększają niejako HLB właściwego związku powierzchniowo czynnego poprzez zmniejszenie hydrofilowości rozpuszczalnika polarnego. Ponadto penetrują w głąb sztywnej monowarstwy fosfolipidowej nadając jej większą płynność, przez co zapobiegają powstawaniu ciekłej fazy krystalicznej (66; 67; 68). Na ryc. 10 przedstawiono mechanizm naprzemienną penetracji kropli oleju przez lecytynę i kosurfaktant. Dzięki różnym właściwościom penetrują kroplę oleju na zmianę i są w stanie wspólnie utworzyć krzywiznę dodatnią stabilizującą mikroemulsję typu o/w (54; 69).



Rycina 10. Naprzemienna penetracja kropli oleju przez lecytynę i kosurfaktant.

Jako kosurfaktanty wykorzystuje się głównie alkohole o krótkich łańcuchach alkilowych, jak: etanol, propanol, butanol ale także alkohol benzyłowy (62; 70; 60; 66). Oprócz alkoholi rolę surfaktanta pomocniczego mogą pełnić alifatyczne aminy i kwasy karboksylowe (54).

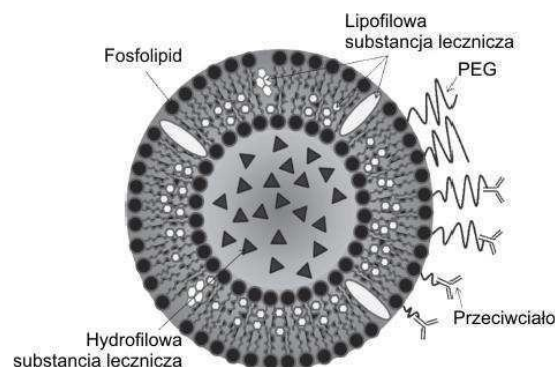
Mikroemulsje, ze względu na dużą powierzchnię międzyfazową, mają dużą zdolność solubilizacyjną hydrofobowych substancji leczniczych. Jednak wysokie stężenie związków powierzchniowo czynnych ogranicza ich zastosowanie do podania miejscowego lub doustnego. Układami bardzo zbliżonymi do mikroemulsji są mikroemulsyjne prekoncentraty, tzw. SMEDDS (Self Microemulsifying Drug Delivery Systems). Składają się z mieszaniny surfaktantu, fazy olejowej i rozpuszczonej w niej substancji leczniczej. Wprowadzenie takiego koncentratu do organizmu

powoduje nagłą dyspersję oleju w wodzie przy udziale surfaktantu. Powstające w ten sposób kropelki odpowiadają rozmiarom typowej mikroemulsji. Przykładami takiej postaci leku stosowanymi doustnie są: *Sandimmun Neoral*<sup>®</sup> - nośnik cyklosporyny A (działanie immunosupresyjne), *Fortovase*<sup>®</sup> - nośnik sakwinawiru (inhibitor proteazy HIV) oraz *Norvir*<sup>®</sup> - nośnik rytonawiru (inhibitor proteazy HIV) (71).

### 1.1.3. NANOCZĄSTKI

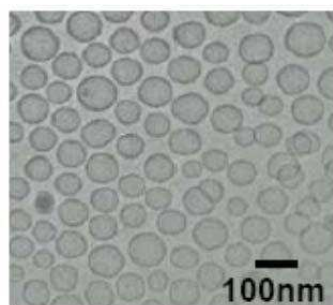
#### LIPOSOMY

Liposomy to kuliste pęcherzyki, których rozmiar waha się od 0,05 do 0,5  $\mu\text{m}$ . Podobnie jak w przypadku nanoemulsji i mikroemulsji otoczkę liposomu mogą tworzyć fosfolipidy. Zasadniczą różnicą jest to, że otoczka liposomalna zbudowana jest z podwójnej warstwy fosfolipidowej a rdzeń stanowi faza wodna (ryc. 11). Liposomalne otoczki mogą być zbudowane z naturalnych fosfolipidów tj. lecytyny lub syntetycznych fosfo- i sfingolipidów (72).

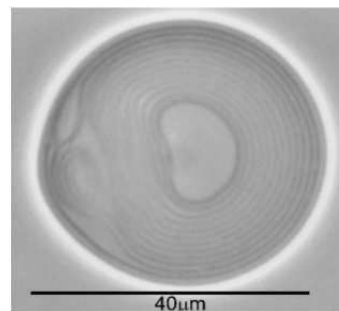


Rycina 11. Liposom jako nośnik hydrofilowych i hydrofobowych substancji leczniczych (73).

Liposomy można podzielić ze względu na krotność warstw otoczki oraz wielkość na: małe jednowarstwowe (SUV – Small unilamellar vesicles, ok. 30 nm), duże jednowarstwowe (LUV – Large unilamellar vesicles, ok. 100 nm), wielowarstwowe (MLV – Multilamellar vesicles, ok. 1000 – 2000 nm) i wielokrotne (MNV – Multivesicular vesicles, ok. 1000 – 20 000 nm). Liposomy złożone z naturalnych fosfolipidów są biodegradowalne i całkowicie biogodne z tkankami organizmu ludzkiego, dlatego nie wykazują działania toksycznego i uczulającego (74).



Rycina 12. Liposomy typu LUV (75).



Rycina 13. Liposom typu MLV (75).

Liposomy typu SUV, ze względu na małe rozmiary, charakteryzuje duża krzywizna błony i duże naprężenia w podwójnej warstwie lipidowej, której objętość jest około 5 krotnie większa niż objętość wewnętrznego, wodnego rdzenia. Występowanie naprężeń w błonie tych liposomów, nazywane stanem metastabilnym, sprawia, że mają one tendencję do zlewania się oraz interakcji z makromolekułami. Ponadto wykazują niski stosunek objętości wewnętrznej fazy wodnej do fazy lipidowej i mogą inkorporować niewielką ilość hydrofilowej substancji leczniczej, dlatego są wykorzystywane głównie w badaniach, jako model błony komórkowej. Z powodu braku naprężeń w podwójnej błonie lipidowej, duże liposomy jednolaminarne (LUV – ryc. 12) wykazują większą trwałość podczas przechowywania niż SUV. Stosunek objętości wewnętrznej fazy wodnej do fazy lipidowej jest wysoki, zatem są w stanie inkorporować znacznie większą ilość substancji leczniczej. Powłoczka wielkich, wielolaminarnych liposomów (MLV – ryc. 13) jest utworzona z wielu podwójnych warstw lipidowych. Z tego powodu następuje opóźnienie uwalniania hydrofilowych substancji leczniczych z ich wewnętrznego, wodnego rdzenia. Zjawisko to może być wykorzystane do uzyskania efektu przedłużonego działania. Liposomy wielokrotne (MVV) powstają wtedy, gdy kilka małych liposomów opłaszczy się dodatkową, wspólną, podwójną błoną fosfolipidową. MVV są dodatkowym produktem podczas wytwarzania MLV (76).

Ze względu na swoją budowę liposomy mogą być nośnikami substancji leczniczych o właściwościach hydrofilowych, amfifilowych lub posiadających ładunek oraz lipofilowych. Substancje hydrofilowe lokują się w wewnętrznym, wodnym rdzeniu. Amfifilowe i obdarzone ładunkiem umiejscawiają się na podwójnej fosfolipidowej warstwie a lipofilowe inkorporowane są do wnętrza fosfolipidowej ściany liposomów (ryc. 11). Substancja lecznicza zamknięta w pęcherzykach liposomalnych jest mniej wrażliwa na niekorzystne działanie czynników zewnętrznych, które mogą doprowadzić do jej rozkładu. Takimi czynnikami są np. enzymy, które z wysoce aktywnej substancji mogą uczynić nieaktywny metabolit. Inną zaletą układów liposomalnych jest możliwość zwiększenia rozpuszczalności substancji słabo rozpuszczalnej. Można to osiągnąć np. przez zmianę pH środowiska wewnętrznego, wodnego rdzenia (76; 77).

Liposomy mogą ulegać endocytozie lub po prostu zlewać się z błoną docelowej komórki poddawanej terapii. Czasami jednak dochodzi do wychwytywania liposomów przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego zlokalizowane w wątrobie i śledzionie. W celu wydłużenia



czasu przebywania liposomów w krwioobiegu, modyfikuje się ich ściany polimerami hydrofilowymi, np. glikolem polietylenowym lub amfilowymi, np. N-winylopirolidonem. Takie podejście zabezpiecza pęcherzyk przed opłaszczaniem białkami osocza, które z kolei umożliwiają fagocytom rozpoznawanie i wychwytywanie „niepożądaną” struktury. Istnieje również możliwość sprzęgania liposomów z monoklonalnymi przeciwciałami antyidiotypowymi, które skierowane są przeciwko receptorom immunoglobulinowym, znajdującym się na powierzchni chłoniakowych limfocytów B. Tworzenie immunoliposomów jest metodą zwiększającą wychwytywanie cytostatyków związanych z liposomami przez komórki nowotworowe (77; 78; 79).

Podanie substancji leczniczej w postaci liposomów, w porównaniu do jej konwencjonalnego sposobu stosowania w formie niezwiązanej, może przyczynić się do ewidentnej zmiany parametrów farmakokinetycznych i dostępności biologicznej. Przykładem są dane przedstawione w tab. 4 dla preparatów z doksorubicyną podawanych w formie wlewu dożylnego. Zestawienie zawiera parametry opisujące właściwości dwóch liposomalnych form: Doxil® i Myocetu™ w porównaniu z wolną doksorubicyną (80).

**Tabela 4.** Parametry dostępności biologicznej i farmakokinetyczne doksorubicyny po podaniu postaci leku w formie liposomów: Myocet™ i Doxil® oraz w klasycznej, niezwiązanej formie (81; 80).

Postać leku/nazwa handlowa	Dawka [mg/m <sup>2</sup> ]	AUC [mg·h/l]	V <sub>d</sub> [l]	Klirens [l/h]	Stężenie w tkance nowotworowej [µg/g]
Doxil® HSPC/chol./PEG-DSPE 56:39:5	25	609	4,1	0,08	7,7
Myocet™ EPC/chol. 55:45	25	19,7	18,8	23,3	Brak danych
Wolna doksorubicyna	25	1	254	45,3	0,8

EPC – fosfatydylocholina jajowa, chol. – cholesterol, HSPC – uwodorniona sojowa fosfatydylocholina, PEG-DSPE – pegylowana fosfatydyloetanolamina, AUC – pole powierzchni pod krzywą zależności stężenia leku we krwi od czasu, V<sub>d</sub> – objętość dystrybucji

Liposomy najczęściej wykorzystywane są jako nośniki leków cytostatycznych, takich jak doksorubicyna i daunorubicyna, gdzie są elementem terapii celowanej chorób nowotworowych (82; 83). Ponadto mogą być nośnikami antybiotyków przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych stosowanych w przypadkach ciężkich zakażeń, np. liposomalna amfoterycyna B stosowana jest w leczeniu ciężkiej, inwazyjnej kandydozy, inwazyjnej postaci aspergilozy, kryptokokowym zapaleniu opon mózgowych, rozsianej kryptokokozy u pacjentów z HIV, fuzariozie, kokcydiomykozie, zygomycykozie i blastomykozie (84). Ponieważ podaż substancji leczniczej w formie liposomów znacznie zmniejsza jej toksyczność, preparaty te można stosować u pacjentów, którym ze względu na nefrotoksyczność nie można podawać skutecznych dawek w konwencjonalnej postaci (85). W tab. 5 przedstawiono dostępne na rynku leki w postaci liposomów.

<b>Tabela 5.</b> Przykłady dostępnych na rynku liposomalnych postaci leku (74).			
<b>Nazwa handlowa</b>	<b>Substancja lecznicza</b>	<b>Działanie/zastosowanie</b>	<b>Producent</b>
Abelcet	Amfoterycyna B	Antybiotyk przeciwgrzybiczny/ lek drugiego rzutu w leczeniu ciężkich grzybic układowych	Liposome Company (USA)
Allovectin-7™	HLA-B7 Plazmid	Terapia nowotworów	Vical Incorporation (USA)
AmBisome	Amfoterycyna B	Antybiotyk przeciwgrzybiczny/ Leczenie ciężkich, układowych i/lub głębokich zakażeń grzybiczych	NeXatar Pharmaceuticals (USA)
Amphocil	Amfoterycyna B	Antybiotyk przeciwgrzybiczny/ Leczenie rozsianej aspergilozy, ciężkich grzybic układowych i/lub grzybic głębokich	SEQUUS Pharmaceuticals (USA)
Amphotec	Amfoterycyna B	Antybiotyk przeciwgrzybiczny/ Leczenie ciężkich, układowych i/lub głębokich zakażeń grzybiczych	SEQUUS Pharmaceuticals (USA)
Doxil/CAELYX	Doksorubicyna	Cytostatyk/ terapia nowotworów piersi, jajnika, szpiczaka mnogiego, mięsaka Kaposiego	SEQUUS Pharmaceuticals (USA)
Doxosome	Doksorubicyna	Cytostatyk/ terapia nowotworów piersi, jajnika, szpiczaka mnogiego, mięsaka Kaposiego	Indian Institute of Chemical Biology (India)
DaunoXome	Daunorubicyna	Cytostatyk/ leczenie indukujące ostrych białaczek	NeXatar Pharmaceuticals (USA)
EVACET	Doksorubicyna	Cytostatyk terapia nowotworów piersi, jajnika, szpiczaka mnogiego, mięsaka Kaposiego	Liposome Company (USA)
MiKasome™	Amikacyna	Antybiotyk aminoglikozydowy/ Zagrażające życiu infekcje bakteryjne, np. posocznica, zapalenie wsierdzia, zapalenie płuc	NeXatar Pharmaceuticals (USA)

## 1.2. KONSERWACJA LEKÓW

Celem konserwacji leków jest zachowanie jałowości lub czystości mikrobiologicznej przez cały okres przydatności. Ponadto konserwacja powinna zapobiegać wtórnemu zakażeniu i rozwojowi drobnoustrojów podczas przechowywania i pobierania leku z opakowań wielokrotnego użytku. Zanieczyszczenie leku drobnoustrojami chorobotwórczymi może być przyczyną wtórnego zakażenia pacjenta. Może także wywołać rozkład substancji aktywnych leku. Dlatego konserwacja zalecana jest wszędzie tam, gdzie skład postaci leku sprzyja rozwojowi i przeżywalności drobnoustrojów (86).

Środkami konserwującymi nazywamy substancje, które zabezpieczają postać leku przed rozwojem drobnoustrojów. Można je podzielić na substancje o działaniu bakteriostatycznym, tzn. takim, które zapobiega namnażaniu się drobnoustrojów oraz bakteriobójcze, czyli takie, które drobnoustroje niszczą (87). Substancji bakteriostatycznych używa się w lekach stosowanych doustnie lub zewnętrznie, niewymagających jałowości. Substancje bakteriobójcze używane są w postaciach leku wymagających jałowości, takich jak preparaty do oczu, rzadziej iniekcyjnych i stosowanych zewnętrznie (86).

Dobry konserwant powinien charakteryzować się (86):

- rozpuszczalnością w postaci leku wystarczającą do właściwej konserwacji preparatu,
- właściwościami hydrofilowymi i lipofilowymi,
- brakiem zapachu, smaku, barwy,
- trwałością i aktywnością bójczą w środowisku o różnym pH i temperaturze,
- brakiem wpływu na działanie farmakologiczne leku,
- odpornością na światło i tlen,
- aktywnością przeciwdrobnoustrojową w niskich stężeniach,
- szybkim działaniem przeciwdrobnoustrojowym,
- brakiem toksyczności, działania alergizującego i drażniącego.

Wiele postaci leku wymaga zastosowania chemicznego środka konserwującego, są wśród nich: roztwory leków stosowanych zewnętrznie oraz maści o charakterze emulsji typu o/w i w/o, leki doustne (syropy), krople do nosa, roztwory iniekcyjne i zawiesiny, leki do oczu. Istnieją jednak pewne ograniczenia co do stosowania konserwantów. Wolne od tych substancji powinny być iniekcje podawane jednorazowo w ilości przekraczającej 15 ml oraz leki podawane dordzeniowo i stosowane do leczenia oka zranionego lub po zabiegu chirurgicznym (1; 86). W tab. 6 przedstawiono najczęściej stosowane w technologii postaci leku środki konserwujące.

<b>Tabela 6.</b> Przykłady i charakterystyka środków konserwujących najczęściej stosowanych w preparatach farmaceutycznych (88).				
<b>Grupa - mechanizm działania</b>	<b>Środek konserwujący</b>	<b>Stężenie [%]</b>	<b>Droga podania</b>	<b>LogP</b>
<b>Alkohole</b> – zaburzenie integralności błony, denaturacja białek bakteryjnych, ingerencja w metabolizm komórki	Alkohol etylowy	5 – 10	Doustnie, pozajelitowo, zewnętrznie	-0,31 (89)
	Alkohol benzylowy	0,5 – 2	Pozajelitowo	1,10 (90)
		1 – 2	Zewnętrznie	
	Chlorobutanol	0,25 – 0,5	Do oczu, pozajelitowo	-
	Fenoksyetanol	0,5 – 1	zewnętrznie	1,16 (91)
Bronopol	0,01 – 0,1	Zewnętrznie	0,18 (92)	
<b>Kwasy</b> – blokada enzymów komórkowych	Kwas benzoesowy	0,1 – 0,2	Doustnie, zewnętrznie, dopochwowo, pozajelitowo	1,87 (93)
	Kwas sorbowy	0,05 – 0,2	Doustnie, zewnętrznie	1,33 (94)
<b>Organiczne pochodne rtęci</b> – blokada grup -SH białek i enzymów prowadząca do zaburzeń metabolizmu	Tiomersal	0,01	Pozajelitowo, do oczu	- 1,88 (94)
		0,01 – 0,02	Zewnętrznie	
		0,001 – 0,15	Doustnie	
	Azotan fenylortęciowy	0,002 – 0,02	Zewnętrznie, doodbytniczo, dopochwowo	1,27 (94)
0,001 – 0,002		Pozajelitowo, do oczu		
<b>IV-rzędowe sole amoniowe</b> – uszkodzenie błony, denaturacja białek, unieczynnienie enzymów	Chlorek benzalkoniowy	0,0025 – 0,02	Do oczu	1,90 (95)
		0,004 – 0,02	Doustnie, do nosa, do uszu, zewnętrznie	
		0,02	pozajelitowo	
	Chlorek benzetonowy	0,01	Do oczu	-
0,01 – 0,02	Do uszu, pozajelitowo, zewnętrznie			
<b>Biguanidy</b> – liza błony cytoplazmatycznej, wytrącanie białek i kwasów nukleinowych	Octan chlorheksydydny	0,01 – 0,05	Do oczu, zewnętrznie	4,85 (94)
<b>Fenole</b> – zaburzenie przepuszczalności błony bakteryjnej, denaturacja i koagulacja białek	m-krezol	0,15 – 0,3	Pozajelitowo, zewnętrznie	1,96 (94)
	Chlorokrezol	0,05	Do oczu	3,10 (94)
			Pozajelitowo, zewnętrznie	
Fenol	0,2 – 0,5	pozajelitowo	1,46 (94)	
<b>Estry kwasu p-hydroksybenzoowego</b> – antymetaboly	Paraben M	0,1 – 0,18	Dopochwowo	1,96 (94)
		0,065 – 0,25	Domięśniowo, dożylnie, podskórnice	
		0,15 – 0,2	Do oczu	
	Paraben P	0,01 – 0,02	Doustnie	3,04 (94)
		0,01 – 0,02	Doodbytniczo	
0,02 – 0,26		Śródskórnice		

Na aktywność przeciwdrobnoustrojową środków konserwujących wpływa wiele czynników. Jednym z nich jest odczyn pH. Cząsteczki środków konserwujących zawierają grupy jonizowalne, których dysocjacja zależy od pH środowiska. Najczęściej związki konserwujące działają przeciwdrobnoustrojowo w formie niezdisocjowanej. Brak ładunku sprawia, że cząsteczka staje

się bardziej lipofilowa, co w efekcie zwiększa jej powinowactwo do warstwy lipidowej komórki mikroorganizmu (96).

Jak wcześniej wspomniano, niemal wszystkie postacie leków zawierające w swoim składzie fazę wodną wymagają zastosowania środka konserwującego, ponieważ właśnie faza wodna jest środowiskiem sprzyjającym namnażaniu drobnoustrojów. Do tego typu form leków zalicza się przykładowo emulsje. Jako że są to układy wielofazowe, to w ich skład wchodzi związek powierzchniowo czynne. W przypadku gdy konserwowana postać leku zawiera surfaktanty, możliwym jest, że związek, którego zadaniem jest ochrona fazy wodnej przed rozwojem drobnoustrojów, ulegnie dystrybucji do fazy olejowej, międzyfazy lub zostanie zamknięty w strukturach formowanych przez te surfaktanty. Konsekwencją jest spadek stężenia środka konserwującego w fazie wodnej i jej niewłaściwa ochrona. Obawa przed wystąpieniem działania toksycznego dla pacjenta powoduje, że zwiększenie stężenia konserwantu w postaci leku nie jest możliwe (97).

W tab. 7 przedstawiono przykłady środków konserwujących, dla których zanotowano zmniejszoną aktywność przeciwdrobnoustrojową wywołaną zawartością związków powierzchniowo czynnych.

**Tabela 7.** Dezaktywacja środków konserwujących przez różne typy związków powierzchniowo czynnych (97; 98).

<b>Środek konserwujący</b>	<b>Typ interferujących związków powierzchniowo czynnych</b>
Alkohol etylowy	Niejonowe
Chlorobutanol	Niejonowe
Alkohol benzylowy	Niejonowe
Alkohol 2,4-dichlorobenzylowy	Niejonowe, anionowe
Fenoksyetanol	Niejonowe
Kwas sorbowy	Niejonowe
Kwas benzoesowy	Niejonowe
Parabeny	Niejonowe, anionowe
p-chloro-m-krezol	Niejonowe
Chloroksylenol	Niejonowe, kationowe
Chlorotymol	Niejonowe
Dichloro-m-ksylenol	Niejonowe
Chlorofen	Niejonowe
Dichlorofen	Niejonowe
Heksahlorofen	Polisorbaty
Chlorheksydyna	Anionowe, polisorbaty
Chlorek benzalkoniowy	Anionowe, mydła, lecytyna
Chlorek srebra	Kationowe
Ditlenek tytanu	Kationowe

## 2. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Niektóre ze związków chemicznych o budowie peptydowej charakteryzują się dość wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Należą do nich endogenne antybiotyki peptydowe (Antimicrobial Peptides – AMPs) (99). Ich rozpowszechnienie obejmuje cały takson *Eucaryota*, gdzie stanowią rodzaj obrony nieswoistej. Oprócz aktywności przeciwbakteryjnej zaobserwowano, że antybiotyki peptydowe wykazują również właściwości cytotoksyczne w stosunku do grzybów i pierwotniaków (100; 101). Istnieją dowody na to, że niektóre z endogennych antybiotyków peptydowych są w stanie unieszkodliwić wirusa HIV i wirusa opryszczki pospolitej (*Herpes Simplex*) (102; 103). Poznano też wiele sekwencji aminokwasowych, które działają toksycznie wobec komórek nowotworowych (104).

Dotychczas opisano kilka mechanizmów działania endogennych antybiotyków peptydowych. Jeden z nich polega przede wszystkim na wiązaniu z błoną komórkową bakterii i jej permeabilizacji. Uszkodzenie błony patogenu powoduje utratę ATP, niekontrolowany przepływ elektrolitów do/z komórki, co w efekcie przyczynia się do jej śmierci. Uważa się, że za zdolność większości peptydów do rozrywania błony bakteryjnej odpowiada obecność w sekwencji aminokwasów zasadowych (lizyna, arginina), które determinują kationowy charakter cząsteczki oraz amfipatyczność, czyli dobrze wyodrębnione w strukturze II-rzędowej regiony hydrofilowe i hydrofobowe (105; 106; 107). Stwierdzono też, że oprócz mechanizmu błonowego, możliwe jest oddziaływanie peptydu kationowego na struktury wewnątrzkomórkowe bakterii/grzyba (108).

Istotną kwestią w technologii postaci leku jest dobór odpowiedniego środka konserwującego. Obecność konserwantów wymagana jest szczególnie tam, gdzie produkt leczniczy zawiera fazę wodną oraz substancje organiczne, które mogą być pożywką dla drobnoustrojów (109; 110; 111).

Znaczna część konserwantów stosowanych w postaciach leku w formie dyspersji ma właściwości lipofilowe. Stąd też ochrona fazy wodnej może być niedostateczna. Innym utrudnieniem są wzajemne interakcje między środkiem konserwującym a związkiem powierzchniowo czynnym. Istnieje możliwość, że konserwant zostanie zamknięty w miceli utworzonej przez surfaktant, przez co zmniejszą się jego właściwości przeciwdrobnoustrojowe (97). Obecnie we wszystkich emulsyjnych postaciach leku na skórę, błony śluzowe i kosmetykach, środek konserwujący i surfaktant to dwie różne substancje.

Celem pracy było otrzymanie, na drodze syntezy chemicznej, nowych, kationowych surfaktantów lipopeptydowych o prostych łańcuchach alkilowych. Założono, że otrzymane związki będą charakteryzować się zarówno właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi jak też powierzchniowo czynnymi.

## Cel i założenia pracy

Postanowiono zaprojektować i otrzymać 40 nowych, syntetycznych, kationowych lipopeptydów, które byłyby zdolne spełniać rolę środka konserwującego oraz jednocześnie funkcję substancji powierzchniowo czynnej. Główną koncepcją podczas projektowania, było odwzorowanie właściwości struktury II-rzędowej endogennych antybiotyków peptydowych, warunkujących aktywność przeciwdrobnoustrojową i przełożenie ich na strukturę I-rzędową. Założono, że dodatni ładunek cząsteczek zaprojektowanych związków będzie pochodził od reszt aminokwasu zasadowego - lizyny. Warunek amfipatyczności lipopeptydów postanowiono osiągnąć przez przyłączenie fragmentu hydrofobowego, jakim jest kwas tłuszczowy: heksadekanowy, tetradekanowy, dodekanowy, dekanowy oraz oktanowy. Biegunowa budowa takich związków ma zapewnić, że otrzymane lipopeptydy będą wykazywały właściwości powierzchniowo czynne.

### 3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

#### 3.1. ODCZYNNIKI I APARATURA

##### ***ODCZYNNIKI I MATERIAŁY***

ACD/LogP – program ACD/Chem Sketch 10.05 (Advanced Chemistry Development, Kanada)

Acetaldehyd (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Acetonitryl (Scharlau, Hiszpania)

ALOGPs 2.1 – program (VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, Niemcy)

Bufor fosforanowy (POCH S.A., Polska)

Ciekły azot (Air Products, Warszawa)

Chloranil (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Dichlorometan (POCH S.A., Polska)

Dimetylosulfotlenek (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Eter dietylowy (POCH S.A., Polska)

Excel 2007 (Microsoft, USA)

Fmoc-Lys(Boc)-OH (Iris Biotech GmbH, Niemcy)

Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (Iris Biotech GmbH, Niemcy)

Fmoc-Gly-OH (Iris Biotech GmbH, Niemcy)

Fmoc-Rink Amide AM Polystyrene Resin (Iris Biotech GmbH, Niemcy)

HOBt – 1-hydroksybenzotriazol (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Kwas dekanowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Kwas dodekanowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Kwas heksadekanowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Kwas oktanowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Kwas tetradekanowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Kwas trifluorooctowy (Iris Biotech GmbH, Niemcy)

Marvin LogP – program Marvin Sketch 5.4.0.0 (Chem Axon, Węgry)

Metanol (POCH S.A., Polska)

N,N'-diizopropylkarbodiimid (Iris Biotech GmbH, Niemcy)

N,N-dimetyloformamid (Sigma-Aldrich, Niemcy)



## Część doświadczalna

Piperydyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)  
Podłoże Mueller-Hinton II Broth (Becton Dickinson, Francja)  
Podłoże Mueller-Hinton II Agar (Becton Dickinson, Francja)  
Podłoże Sabouraud Dextrose Broth (Sigma-Aldrich, Niemcy)  
Podłoże Sabouraud 2% Glucose Agar (Sigma-Aldrich, Niemcy)  
Triizopropylosilan (Iris Biotech GmbH, Niemcy)  
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Niemcy)  
Woda oczyszczona (system HLP 5, Hydrolab, Polska)  
96-dołkowe płytki polistyrenowe (Greiner Bio-One, Niemcy)

### **APARATURA**

Aparat do ekstrakcji do fazy stałej – SPE 12G, kolumnki SPE – Bakerbond C-18, 1000 mg/6 ml J.T. Baker, USA  
Pompa próżniowa N810FT.18 Laboport KNF Neuberger, Niemcy  
Wysokosprawny chromatograf cieczowy – pompa K-120, pompa K-1001, detektor UV K-2501, autosampler Smartline 3800, Knauer GmbH, Niemcy  
Monolityczna kolumna analityczna – Chromolith Performance 100-4,6 mm, C-18, Merck, Niemcy  
Kolumna semipreparatywna – Kromasil 100-5, 250-8 mm, C-8, Knauer GmbH, Niemcy  
Liofilizator –Alpha 1-2 LD, Christ, Niemcy  
Mieszadło magnetyczne – ES-21H, Spółdzielnia Rzemieśnicza Specjalistyczna Elektryków, Polska  
Naczynko reakcyjne do SPPS – wykonane na zamówienie  
Palnik laboratoryjny gazowy – Techniport, Polska  
Tensjometr – EasyDyne, Krüss GmbH, Niemcy  
Waga elektroniczna – WAS 160/X Radwag, Polska  
Wirówka – MPW-350, MPW Med Instruments, Polska  
Wyparka rotacyjna – Laborota 4000 efficient, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Niemcy  
Wytrząsarka – MiliGen 504 shaker, MiliGen, USA  
Autoklaw – Tau Clave 3000, Tau Steril, Włochy  
Inkubator z wytrząsaniem – IKA KS 4000i control, IKA Werke GmbH & Co. KG, Niemcy  
Spektrometr mas MALDI-TOF –Biflex III, Bruker, Niemcy  
System do otrzymywania wody oczyszczonej – HLP 5, Hydrolab, Polska

## 3.2. OTRZYMYWANIE LIPOPEPTYDÓW METODĄ SYNTEZY NA NOŚNIKU STAŁYM

### 3.2.1. SYNTEZA CHEMICZNA LIPOPEPTYDÓW

Wszystkie lipopeptydy otrzymano metodą syntezy na nośniku stałym (SPPS) (112). Do osłony grupy  $\alpha$ -aminowej wykorzystano ugrupowanie 9-fluorenylometoksykarbonylowe (Fmoc) (113). Jako stałego nośnika użyto Fmoc-Rink Amide AM o osadzeniu 0,59 mmol/g, dlatego na C-końcu każdego z lipopeptydów występuje grupa amidowa. Do syntezy lipopeptydów nr 1 – 35 (tab. 8 – 12) jako osłony grupy  $\epsilon$ -aminowej lizyny używano ugrupowania tert-butyloksykarbonylowego (Boc). W przypadku lipopeptydów nr 36 – 40 (tab. 13) obydwie grupy aminowe ( $\alpha$  i  $\epsilon$ ) pierwszej lizyny w sekwencji były chronione ugrupowaniem Fmoc.

Syntezę lipopeptydów prowadzono według następującego schematu:

1. Deprotekcja grupy  $\alpha$ -aminowej, czyli usunięcie osłony Fmoc za pomocą 20% (v/v) roztworu piperydyny w N,N-dimetyloformamidzie (DMF) (114; 115):
  - 1 x 10 ml, 2 min.
  - 1 x 10 ml, 20 min.
2. Przemycanie stałego nośnika roztworami DMF oraz dichlorometanu (DCM), przygotowanie do acylowania:
  - 2 x 10 ml, DMF – 2 min.
  - 3 x 10 ml, mieszanina DMF : DCM (v/v 1:1) – 2 min.
  - 2 x 10 ml, DCM – 2 min.
3. Kontrola deprotekcji:

Usuwanie grupy ochronnej Fmoc kontrolowano za pomocą przygotowanego testu na obecność wolnych grup aminowych – chloranilowego (116). Sposób wykonania testu polegał na pobraniu z naczynka reakcyjnego 0,5 mg żywicy polimerowej i przeniesieniu do ampułki szklanej o pojemności 2 ml. Do ampułki dodano 200  $\mu$ l 2% roztworu acetaldehydu w DMF oraz 50  $\mu$ l 2% roztworu chloranilu w DMF. Pozytywny wynik testu, czyli obecność zabarwionych na kolor zielony lub granatowy ziaren żywicy świadczyła o obecności wolnych grup aminowych.
4. Acylowanie, tworzenie wiązania peptydowego:

Aktywacji N-chronionych (Fmoc-AA) aminokwasów dokonano metodą aktywnych pochodnych z wykorzystaniem N,N'-diizopropylkarbodiimidu (DIC) oraz 1-hydroksybenzotriazolu (HOBt) (117). Równomolowe ilości odpowiednich N-chronionych aminokwasów i HOBt rozpuszczano w 10 ml roztworu DMF : DCM (v/v 1:1), dodawano DIC i przenoszono do naczynia reakcyjnego z żywicą. Reakcję sprzęgania prowadzono przez 1,5 godziny. Stosowano 3-krotny nadmiar Fmoc-AA w stosunku do osadzenia stałego nośnika. Stosunek molowy Fmoc-AA : HOBt : DIC wynosił 1:1:1 (118).

## Część doświadczalna

5. Przemycanie, przygotowanie do deprotekcji lub do odszczepienia od stałego nośnika:

2 x 10 ml, DMF – 2 min.

3 x 10 ml, mieszanina DMF : DCM (1:1) – 2 min.

2 x 10 ml, DCM – 2 min.

6. Kontrola acylowania:

Kompletność acylowania badano za pomocą testu chloranilowego. Negatywny wynik testu, czyli brak zabarwionych ziaren żywicy, świadczył o braku wolnych grup aminowych i kończył proces acylowania. W przypadku pozytywnego wyniku testu powtarzano sprzęganie począwszy od etapu 4.

Acylowanie peptydów kwasami tłuszczowymi: heksadekanowym, tetradekanowym, dodekanowym, dekanowym i oktanowym przebiegało zgodnie z opisaną wyżej procedurą. Po zakończonym procesie syntezy żywicę przemycano eterem dietylowym i suszono w eksykatorze próżniowym w temperaturze pokojowej.

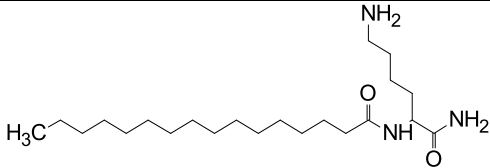
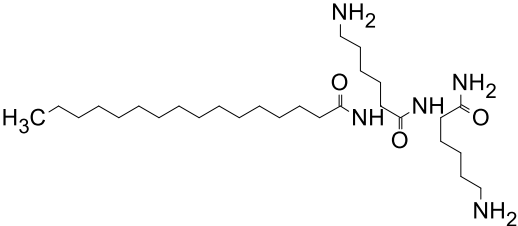
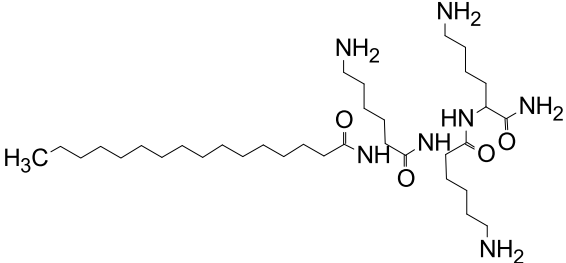
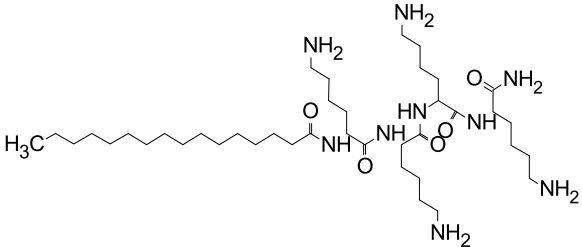
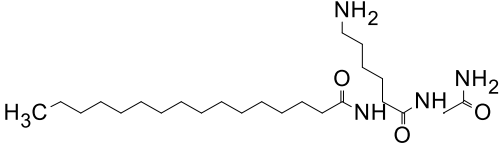
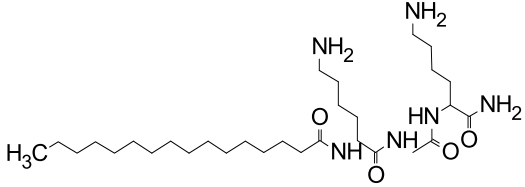
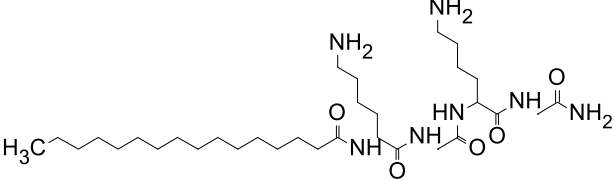
Odszczepienie peptydu od nośnika wraz z usunięciem bocznych grup ochronnych osiągnięto jednoetapowo za pomocą kwasu trifluorooctowego (TFA). Jako wymiataczy jonowych w procesie odszczepiania używano triizopropylsilanu (TIS) i wody oczyszczonej. Suchą żywicę z przyłączonym lipopeptydem umieszczano w kolbie okrągłodennej (50 ml), dodawano 15 ml mieszaniny TFA : TIS : H<sub>2</sub>O w stosunku objętościowym 95 : 2,5 : 2,5 i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 2 godziny.

Odszczepianie lipopeptydu od żywicy przebiegało w temperaturze pokojowej. Po upływie 2 godzin, roztwór TFA : TIS : H<sub>2</sub>O wraz z lipopeptydem odsączono a następnie odparowywano część TFA na wyparce rotacyjnej, tak by objętość zagęszczonego roztworu była nie większa niż 2 ml. Z zagęszczonego roztworu wytrącano lipopeptyd za pomocą zimnego eteru dietylowego. Wytrącony osad lipopeptydu odwirowywano, rozpuszczano w wodzie z niewielką ilością acetonitrylu, niezbędną do całkowitego rozpuszczenia, zamrażano w ciekłym azocie i liofilizowano w warunkach ciśnienia 0,7 mbar i temperatury -24 °C w kolbie, -50 °C w wymrażaczu (118).

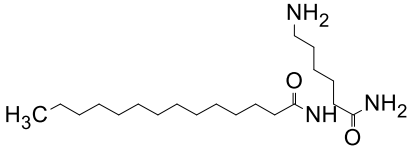
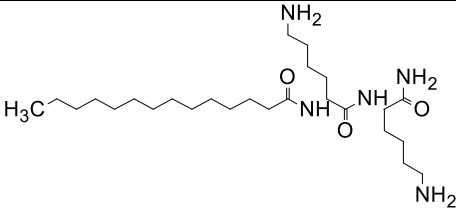
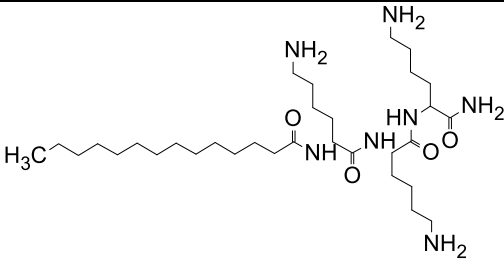
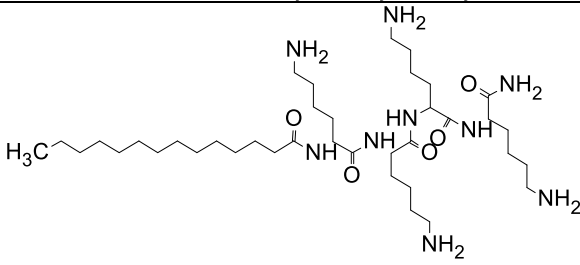
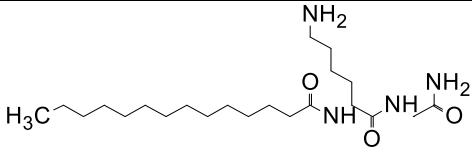
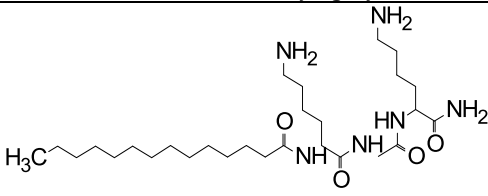
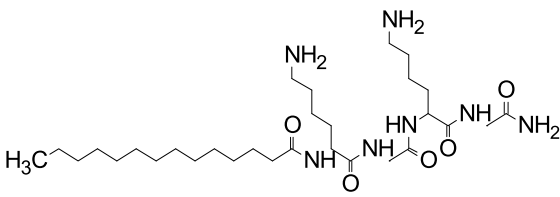
Struktury otrzymanych sześciu grup lipopeptydów modyfikowanych odpowiednimi kwasami tłuszczowymi przedstawiono w tabelach:

- tab. 8 - modyfikowane kwasem heksadekanowym (1 grupa),
- tab. 9 - modyfikowane kwasem tetradekanowym (2 grupa),
- tab. 10 - modyfikowane kwasem dodekanowym (3 grupa),
- tab. 11 - modyfikowane kwasem dekanowym (4 grupa),
- tab. 12 - modyfikowane kwasem oktanowym (5 grupa),
- tab. 13 - zawierające dwa łańcuchy hydrofobowe (6 grupa).

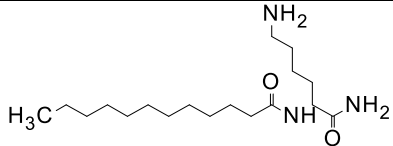
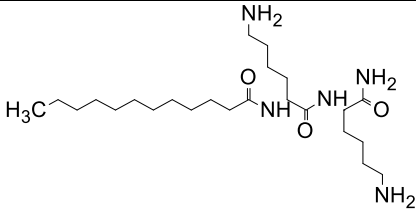
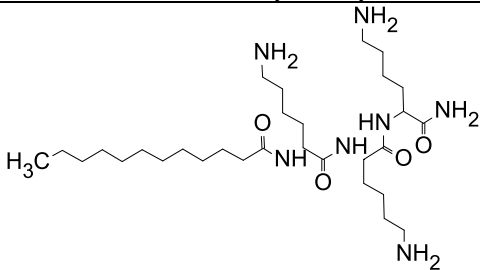
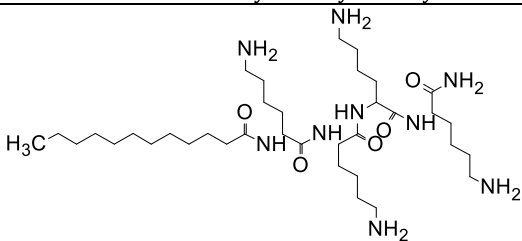
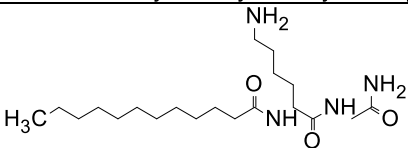
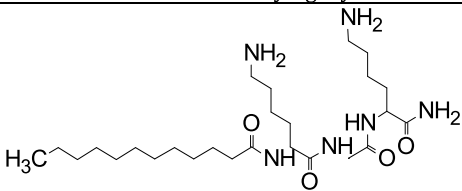
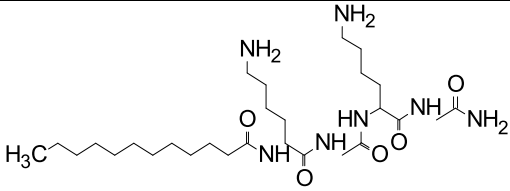
**Tabela 8.** Lipopeptydy modyfikowane kwasem heksadekanowym (1 grupa).

Lipopeptyd	Wzór strukturalny i nazwa systematyczna
1. C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-heksadekanoilo-L-lizynamid</p>
2. C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-heksadekanoilo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
3. C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-heksadekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
4. C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-heksadekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
5. C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-heksadekanoilo-L-lizyloglicynamid</p>
6. C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-heksadekanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizynamid</p>
7. C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-heksadekanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizyloglicynamid</p>

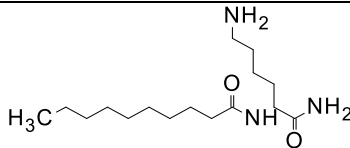
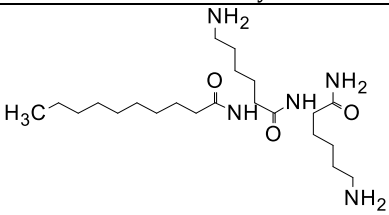
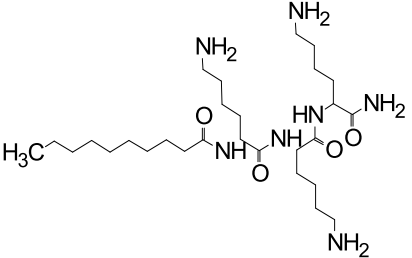
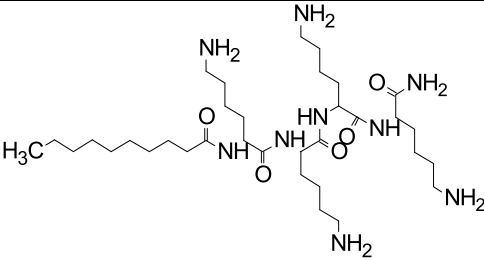
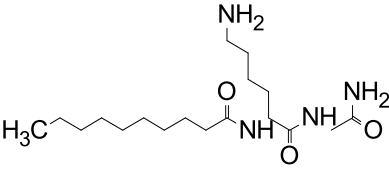
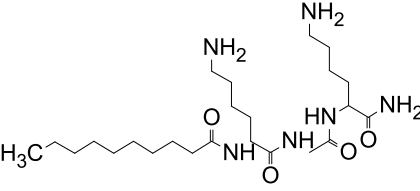
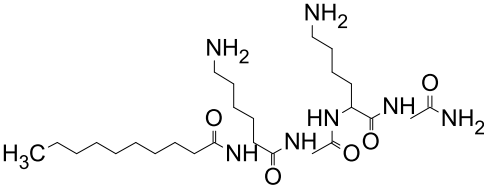
**Tabela 9.** Lipopeptydy modyfikowane kwasem tetradekanowym (2 grupa).

Lipopeptyd	Wzór strukturalny i nazwa systematyczna
8. C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-tetradekanoilo-L-lizynamid</p>
9. C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-tetradekanoilo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
10. C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-tetradekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
11. C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-tetradekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
12. C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-tetradekanoilo-L-lizyloglicynamid</p>
13. C <sub>14</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-tetradekanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizynamid</p>
14. C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-tetradekanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizyloglicynamid</p>

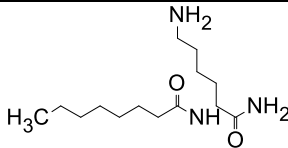
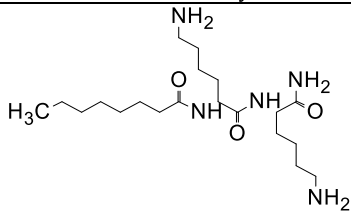
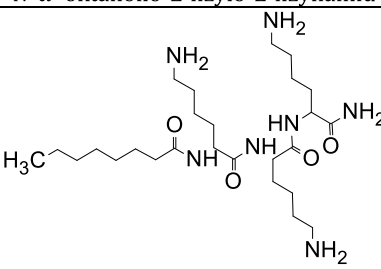
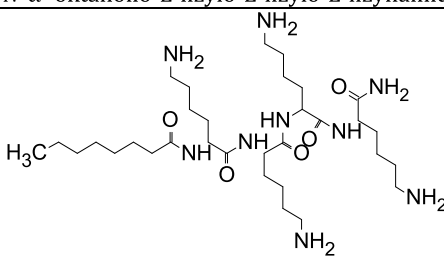
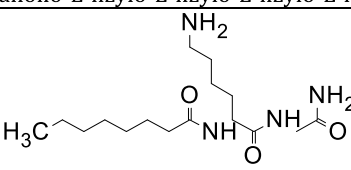
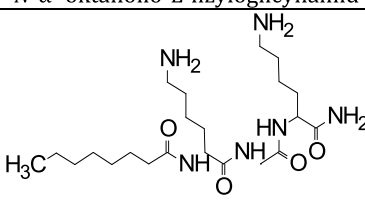
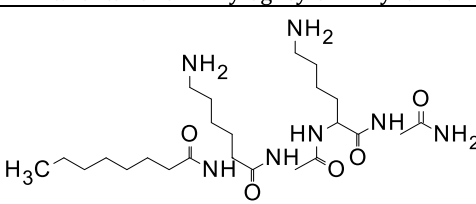
**Tabela 10.** Lipopeptydy modyfikowane kwasem dodekanowym (3 grupa).

Lipopeptyd	Wzór strukturalny i nazwa systematyczna
15. C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dodekanoilo-L-lizynamid</p>
16. C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dodekanoilo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
17. C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dodekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
18. C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dodekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
19. C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dodekanoilo-L-lizyloglicynamid</p>
20. C <sub>12</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dodekanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizyny</p>
21. C <sub>12</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dodekanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizyloglicynamid</p>

**Tabela 11.** Lipopeptydy modyfikowane kwasem dekanowym (4 grupa).

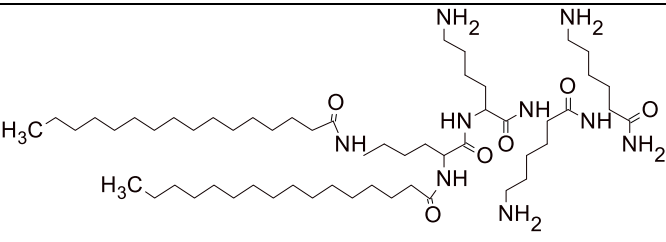
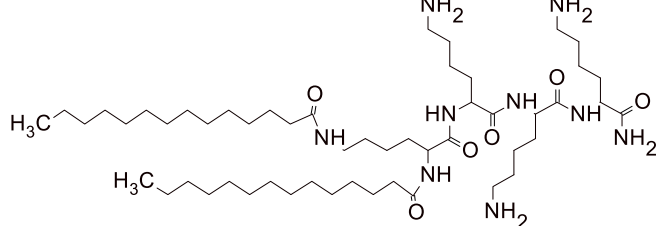
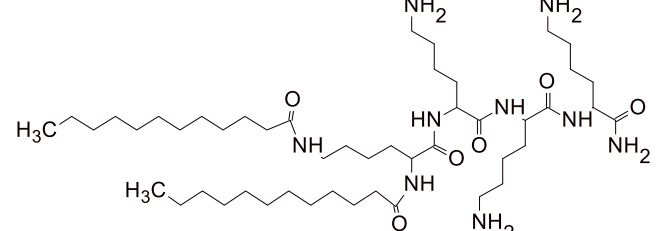
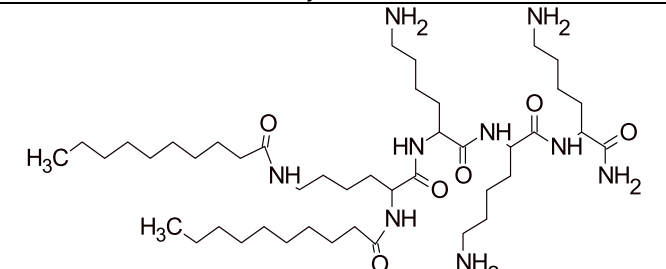
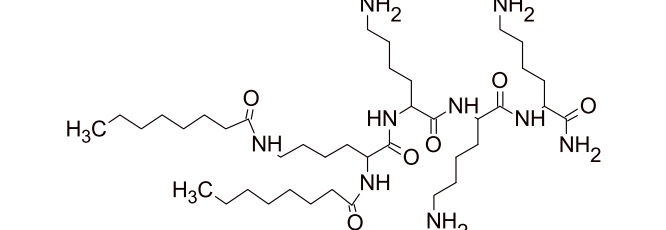
Lipopeptyd	Wzór strukturalny i nazwa systematyczna
22. C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dekanoilo-L-lizynamid</p>
23. C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dekanoilo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
24. C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
25. C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
26. C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dekanoilo-L-lizyloglicynamid</p>
27. C <sub>10</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dekanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizynamid</p>
28. C <sub>10</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dekanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizyloglicynamid</p>

**Tabela 12.** Lipopeptydy modyfikowane kwasem oktanowym (5 grupa).

Lipopeptyd	Wzór strukturalny i nazwa systematyczna
29. C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-α-oktanoilo-L-lizynamid</p>
30. C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-α- oktanoilo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
31. C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-α- oktanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
32. C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-α- oktanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
33. C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-α- oktanoilo-L-lizyloglicynamid</p>
34. C <sub>8</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-α- oktanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizynamid</p>
35. C <sub>8</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	 <p><i>N</i>-α- oktanoilo-L-lizyloglicylo-L-lizyloglicynamid</p>



**Tabela 13.** Lipopeptydy zawierające dwa łańcuchy hydrofobowe, przyłączone w pozycji  $\alpha$  i  $\epsilon$  pierwszej w sekwencji lizyny (6 grupa).

Lipopeptyd	Wzór strukturalny i nazwa systematyczna
36. $(C_{16})_2$ -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p data-bbox="659 571 1329 638"><i>N</i>-<math>\alpha</math>-heksadekanoilo-<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-heksadekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
37. $(C_{14})_2$ -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p data-bbox="659 884 1329 936"><i>N</i>-<math>\alpha</math>-tetradekanoilo-<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-tetradekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
38. $(C_{12})_2$ -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p data-bbox="659 1187 1329 1234"><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dodekanoilo-<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-dodekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
39. $(C_{10})_2$ -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p data-bbox="659 1523 1329 1585"><i>N</i>-<math>\alpha</math>-dekanoilo-<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-dekanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>
40. $(C_8)_2$ -KKKK-NH <sub>2</sub>	 <p data-bbox="659 1836 1329 1915"><i>N</i>-<math>\alpha</math>-oktanoilo-<i>N</i>-<math>\epsilon</math>-oktanoilo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizylo-L-lizynamid</p>

### 3.2.2. ANALIZA I OCZYSZCZANIE LIPOPEPTYDÓW

Liofilizowane, surowe lipopeptydy rozpuszczano w wodzie z dodatkiem acetonitrylu i analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC), przy użyciu chromatografu Knauer, na kolumnie monolitycznej Chromolith Performance C-18 (100 x 4,6 mm) z prekolumną. Stosowano następujący układ rozpuszczalników: A – 0,1 % TFA w wodzie, B – 0,1 % TFA w acetonitrylu (ACN). Lipopeptydy eluowano w liniowym gradiencie 0 – 100% roztworu B. Pozostałe parametry analizy: szybkość przepływu 2 ml/min, czas analizy 15 min., długość fali  $\lambda = 214$  nm. Wstępna analiza HPLC pozwoliła na dobór odpowiedniej, gradientowej metody oczyszczania.

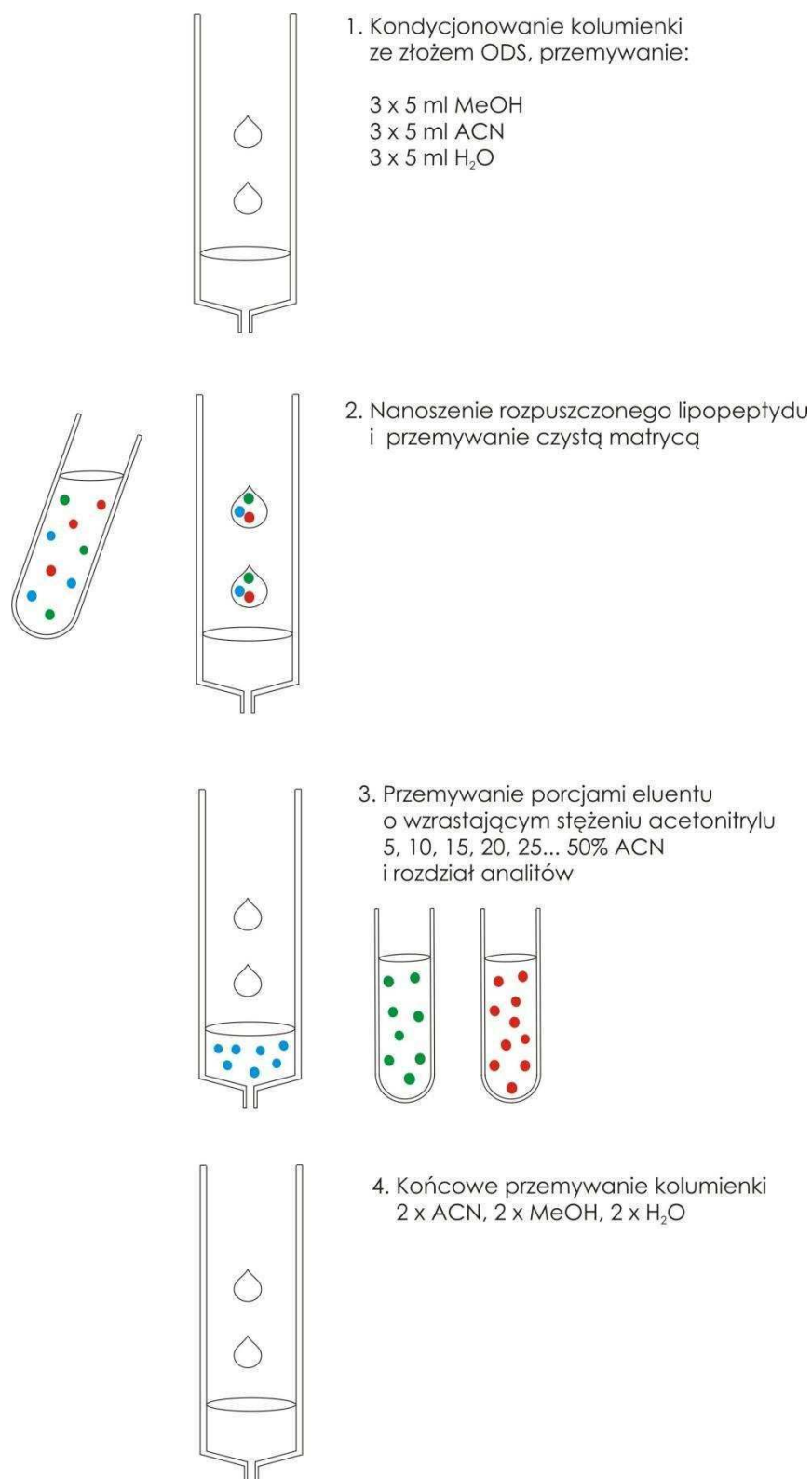
W celu odsolenia i wstępnego oczyszczenia lipopeptydów wykorzystywano zestaw do ekstrakcji do fazy stałej – SPE. Na kolumnienki ze złożem Bakerbond C-18 (1g) nanoszono rozpuszczony, surowy lipopeptyd w ilości maksymalnej 200 mg. Szczegółowy sposób postępowania przedstawiono na ryc. 14.

Do oczyszczenia właściwego wykorzystywano RP-HPLC, przy użyciu chromatografu Knauer z kolumną semipreparatywną Knauer C-8, 5  $\mu\text{m}$  (8 x 250 mm). Lipopeptydy eluowano w liniowym gradiencie 20 – 60 % fazy B w 120 min. lub 10 – 45 % fazy B w 120 min. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 3 ml/min., oczyszczanie prowadzono przy długości fali  $\lambda = 214$  nm.

W celu potwierdzenia jednorodności lipopeptydów, zarówno po etapie SPE jak i semi-preparatywnego RP-HPLC, zebrane frakcje eluatu analizowano w warunkach analizy wcześniej opisanych.

W celu potwierdzenia tożsamości otrzymanych lipopeptydów, wykonano ich widma masowe metodą desorpcji laserowej z jonizacją wspomaganą matrycą i analizatorem czasu przelotu (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry – MALDI-TOF*). Widma wykonano na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w Zespole Pracowni Fizyko-Chemicznych, w Pracowni Spektrometrii Mas *MALDI-TOF*. Widma masowe otrzymanych lipopeptydów kationowych załączono w aneksie (ryc. 52 – 91).

W tab. 14 przedstawiono uzyskane parametry fizykochemiczne charakteryzujące otrzymane związki.



Rycina 14. Ogólny schemat procedury wstępnego oczyszczania lipopeptydów metodą ekstrakcji do fazy stałej.

Tabela 14. Wybrane parametry fizykochemiczne otrzymanych lipopeptydów.

L.p.	Zapis sekwencyjny	Wzór sumaryczny	Obliczona masa molowa [g/mol]	Jon molekularny [M+H <sup>+</sup> ] [g/mol]	Współczynnik retencji $k_{tr} - t_0/t_0$
1.	C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	383,6	384,4	8,17
2.	C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>57</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	511,8	512,5	7,02
3.	C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	639,9	640,5	6,58
4.	C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>40</sub> H <sub>81</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	768,1	768,6	6,2
5.	C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	440,7	441,4	8,24
6.	C <sub>16</sub> -KGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	568,8	569,4	7,07
7.	C <sub>16</sub> -KGGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>63</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	625,9	626,5	7,1
8.	C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	355,6	356,4	7,22
9.	C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>53</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	483,7	484,3	6,33
10.	C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>65</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	611,9	612,5	5,93
11.	C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>77</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	740,1	740,2	5,57
12.	C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	412,6	413,4	7,00
13.	C <sub>14</sub> -KGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	540,8	541,2	6,25
14.	C <sub>14</sub> -KGGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>59</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	597,8	598,4	6,31
15.	C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	327,5	328,2	6,44
16.	C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>49</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	455,7	456,6	5,43
17.	C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>61</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	583,8	584,2	4,92
18.	C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>73</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	712,0	712,2	4,37
19.	C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	384,6	385,4	6,52
20.	C <sub>12</sub> -KGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	512,7	513,2	5,20
21.	C <sub>12</sub> -KGGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	569,8	570,2	5,42
22.	C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	299,5	300,3	5,22
23.	C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	427,6	428,3	4,57
24.	C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>57</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	555,8	556,5	4,33
25.	C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>69</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	683,9	684,3	4,00
26.	C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	356,5	357,3	5,31
27.	C <sub>10</sub> -KGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	484,7	485,2	4,45
28.	C <sub>10</sub> -KGGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	541,7	542,3	4,68
29.	C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	271,4	272,2	4,33
30.	C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	399,6	400,3	3,54
31.	C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>53</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	527,7	528,2	3,28
32.	C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>65</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	655,9	656,4	3,11
33.	C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	328,5	329,3	4,24
34.	C <sub>8</sub> -KGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	456,6	457,4	3,58
35.	C <sub>8</sub> -KGGG-NH <sub>2</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>47</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	513,7	514,1	5,50
36.	(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>111</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	1006,5	1006,9	10,83
37.	(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>52</sub> H <sub>103</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	950,4	950,8	8,64
38.	(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>95</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	894,3	894,6	8,00
39.	(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>44</sub> H <sub>87</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	838,2	838,5	6,16
40.	(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	C <sub>40</sub> H <sub>79</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	782,1	782,5	5,27

### 3.3. WYBRANE METODY PROGNOZOWANIA WŁAŚCIWOŚCI OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW

Poszukiwanie nowej substancji czynnej, która ma być elementem nowego produktu leczniczego, jest procesem kosztownym i czasochłonnym. Zwykle procedura poszukiwania sprowadza się do syntezy substancji wiodącej, sprawdzenia jej spodziewanych właściwości fizykochemicznych lub biologicznych i w końcu do optymalizacji jej struktury, poprzez syntezę licznych analogów o korzystniejszych cechach użytkowych. By zmniejszyć koszty i skrócić czas badań do niezbędnego minimum, należy zrozumieć efekty działania substancji aktywnej w kontekście jej struktury. Do tego celu mogą posłużyć parametry bilansu hydrofilowo-lipofilowego (HLB), współczynnika podziału n-oktanol/woda (LogP) oraz współczynnika dystrybucji (LogD).

#### 3.3.1. BILANS HYDROFILOWO-LIPOFILOWY (HLB)

Praktyczne wykorzystanie związków powierzchniowo czynnych wymaga znajomości, jaki udział we właściwościach danego związku wykazuje część hydrofilowa i hydrofobowa. Wyrazem tego stosunku jest wskaźnik HLB, którego wartość liczbową określa się doświadczalnie lub oblicza na podstawie wzorów strukturalnych. Do najczęściej stosowanych metod obliczeniowych wskaźnika HLB należą metody Griffina, Daviesa oraz McGowana. Wszystkie oparte są na znajomości budowy związków powierzchniowo czynnych, co stwarza możliwość prognozowania ich cech użytkowych (19).

Do obliczenia wartości bilansu hydrofilowo-lipofilowego lipopeptydów wykorzystano metodę McGowana. W metodzie tej wartość HLB oblicza się przez sumowanie udziałów grup, atomów i wiązań (119; 120).

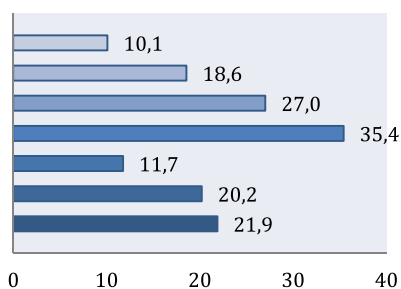
$$\text{HLB} = \Sigma \text{ udział grup hydrofilowych} + \Sigma \text{ udział grup hydrofobowych} + 7$$

W tab. 15. przedstawiono wartości HLB dla poszczególnych elementów strukturalnych wchodzących w skład lipopeptydów, na podstawie których dokonano obliczeń bilansu hydrofilowo-lipofilowego otrzymanych związków. W tab. 16 przedstawiono obliczone wartości HLB dla otrzymanych lipopeptydów kationowych.

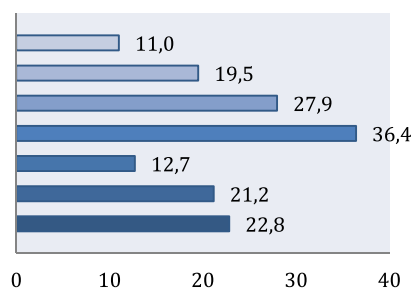
**Tabela 15.** Wartości udziałów HLB elementów strukturalnych cząsteczek surfaktantów w metodzie McGowana (19).

Grupy hydrofilowe	HLB	Grupy hydrofobowe	HLB
-CONH-	+ 2,136	CH <sub>3</sub> -	- 0,658
-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	+ 8,52	-CH <sub>2</sub> -	- 0,475
-CONH <sub>2</sub>	+ 1,953	-CH<	- 0,295

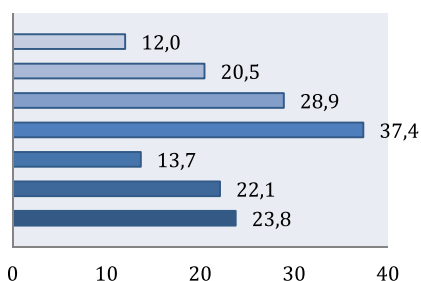
**Tabela 16.** Wartości HLB otrzymanych lipopeptydów kationowych obliczone na podstawie wzorów strukturalnych. Szacowanie metodą McGowana.



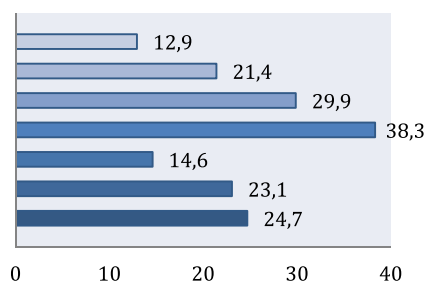
■ C16-K-NH2      ■ C16-KK-NH2  
■ C16-KKK-NH2      ■ C16-KKKK-NH2  
■ C16-KG-NH2      ■ C16-KGK-NH2  
■ C16-KGKG-NH2



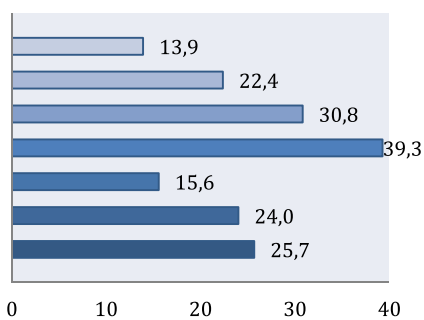
■ C14-K-NH2      ■ C14-KK-NH2  
■ C14-KKK-NH2      ■ C14-KKKK-NH2  
■ C14-KG-NH2      ■ C14-KGK-NH2  
■ C14-KGKG-NH2



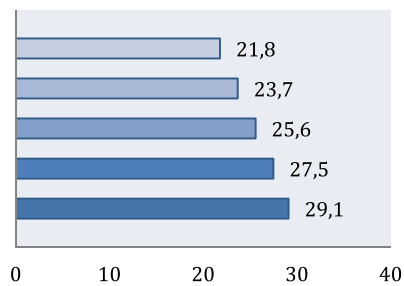
■ C12-K-NH2      ■ C12-KK-NH2  
■ C12-KKK-NH2      ■ C12-KKKK-NH2  
■ C12-KG-NH2      ■ C12-KGK-NH2  
■ C12-KGKG-NH2



■ C10-K-NH2      ■ C10-KK-NH2  
■ C10-KKK-NH2      ■ C10-KKKK-NH2  
■ C10-KG-NH2      ■ C10-KGK-NH2  
■ C10-KGKG-NH2



■ C8-K-NH2      ■ C8-KK-NH2  
■ C8-KKK-NH2      ■ C8-KKKK-NH2  
■ C8-KG-NH2      ■ C8-KGK-NH2  
■ C8-KGKG-NH2



■ (C16)2-KKKK-NH2      ■ (C14)2-KKKK-NH2  
■ (C12)2-KKKK-NH2      ■ (C10)2-KKKK-NH2  
■ (C8)2-KKKK-NH2

### 3.3.2. WSPÓŁCZYNNIK PODZIAŁU N-OKTANOL/WODA - LOGP

Lipofilowość substancji leczniczej jest jedną z charakterystycznych cech, która w znaczący sposób wpływa na aktywność biologiczną (121). Pozwala wnioskować o takich procesach jak wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie oraz toksyczność (122). Parametrem określającym wymiar lipofilowości jest współczynnik podziału n-oktanol/woda, wyrażany jako LogP.

Wartość LogP można wyznaczyć doświadczalnie lub przewidzieć za pomocą modelowania komputerowego. Eksperymentalne podejście wymaga zastosowania klasycznych metod pomiaru stężenia badanej substancji w fazie wodnej i olejowej np. spektroskopii UV-Vis. Instrumentalne wyznaczenie LogP często jest bardzo skomplikowane. Pomiar może być wręcz niemożliwy ze względu na zanieczyszczenie próbki, niestabilność substancji, bardzo silne powinowactwo do jednej z faz układu czy tworzenie emulsji podczas pomiaru.

Istnieje wiele programów komputerowych, które umożliwiają teoretyczne wyznaczenie współczynnika podziału. W pracy wykorzystano trzy aplikacje: Marvin LogP, ALOGPs 2.1 oraz ACD/LogP, które nie wymagały zakupu licencji.

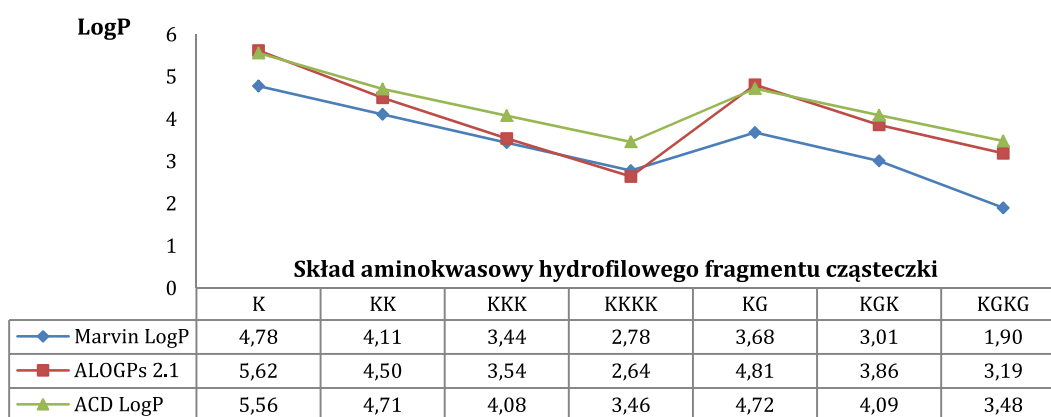
**Marvin LogP** – aplikacja programu Marvin Sketch 5.4.0.0 (Chem Axon, Węgry) szacuje wartości LogP badanej cząsteczki na podstawie wartości współczynników podziału dla poszczególnych atomów. Program pobrano ze strony internetowej <http://www.chemaxon.com/> (123; 124).

**ALOGPs 2.1** – program (VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, Niemcy), którego metoda przewidywania współczynnika podziału LogP została oparta o analizę współczynników elektrotopologicznego stanu cząsteczki. Wykorzystuje bazę PHYSPROP (Syracuse Research Corporation), która dysponuje doświadczalnie wyznaczonymi wartościami współczynnika LogP dla 12908 związków organicznych. Program wymaga notacji SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) - sposobu jednoznacznego zapisu struktury cząsteczek związków chemicznych z wykorzystaniem ciągu znaków ASCII (125; 126). Z programu korzystano on-line <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>.

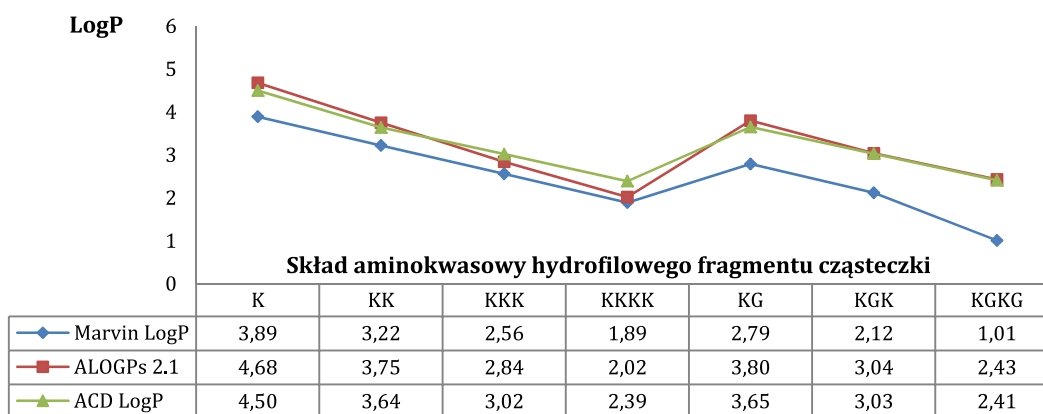
**ACD/LogP** – jest dodatkową aplikacją programu ACD/ChemSketch 10.05 (Advanced Chemistry Development, Kanada). Algorytm programu opiera się na sumowaniu znanych wartości LogP poszczególnych atomów i fragmentów cząsteczki, uwzględnia też oddziaływania międzycząsteczkowe. Baza danych programu ACD/LogP zawiera informacje o eksperymentalnie wyznaczonych wartościach LogP dla 18400 struktur (127). Program został pobrany ze strony internetowej <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/>.

## Część doświadczalna

Na ryc. 15 – 19 przedstawiono przebieg zależności współczynnika podziału n-oktanol/woda od budowy hydrofilowego fragmentu cząsteczki lipopeptydu. Na osiach OX każdej z rycin odłożono skład aminokwasowy hydrofilowych głów otrzymanych lipopeptydów a na osiach OY wartości LogP. Na ryc. 20 przedstawiono przebieg zależności LogP od długości hydrofobowych fragmentów lipopeptydów.



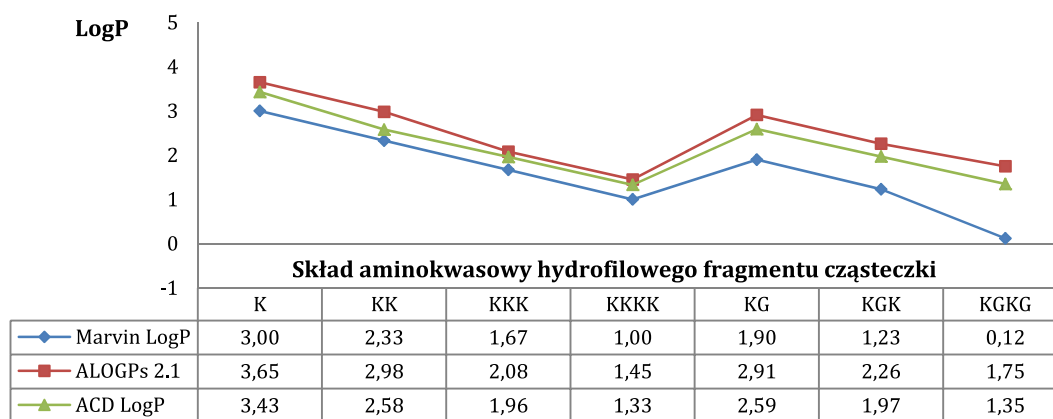
Rycina 15. Teoretycznie wyznaczone wartości LogP analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadecanowym.



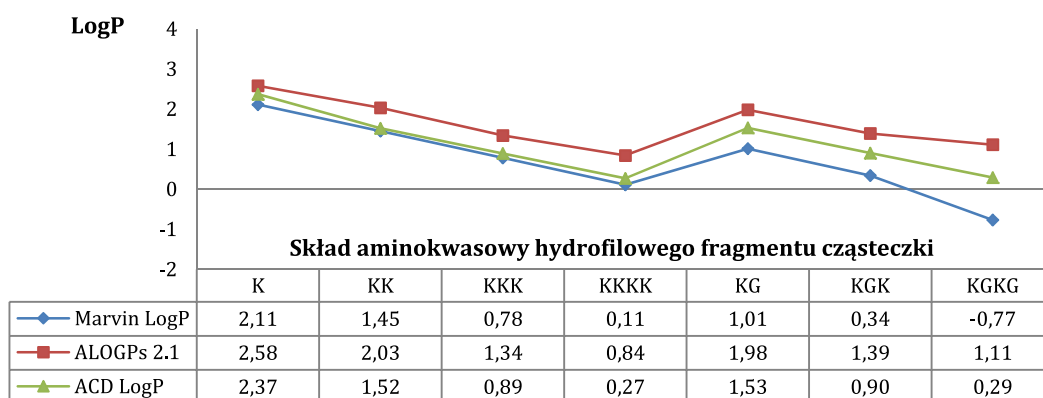
Rycina 16. Teoretycznie wyznaczone wartości LogP analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem tetradecanowym.



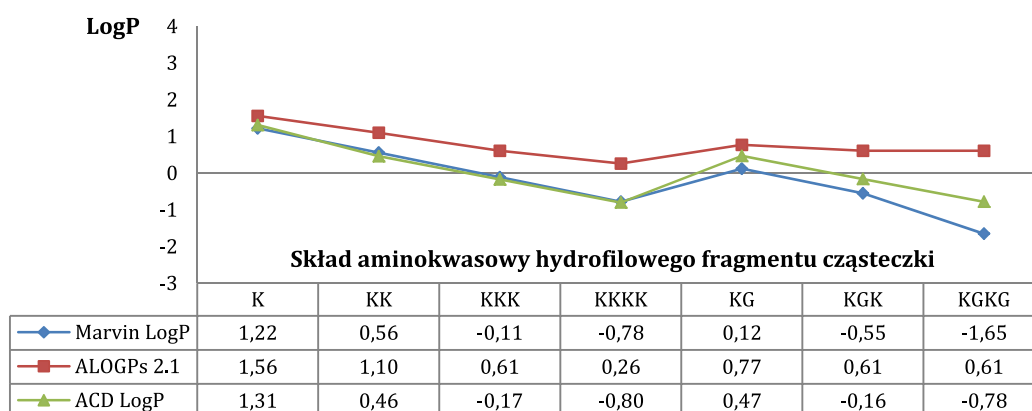
## Część doświadczalna



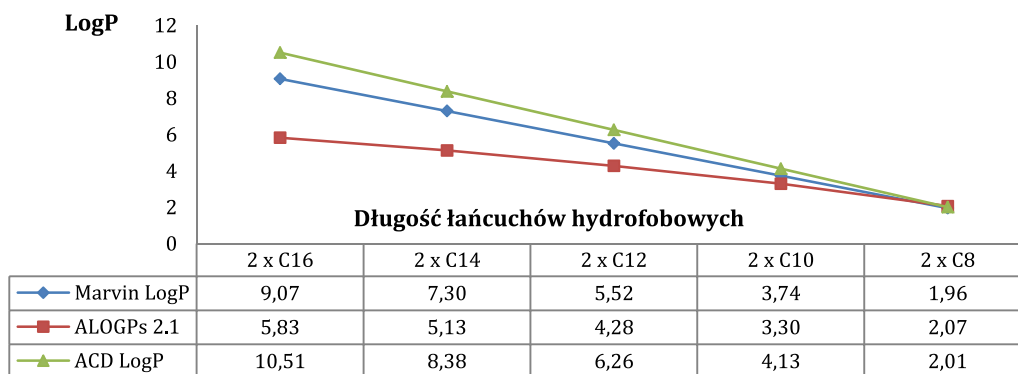
Rycina 17. Teoretycznie wyznaczone wartości LogP analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dodekanowym.



Rycina 18. Teoretycznie wyznaczone wartości LogP analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dekanowym.



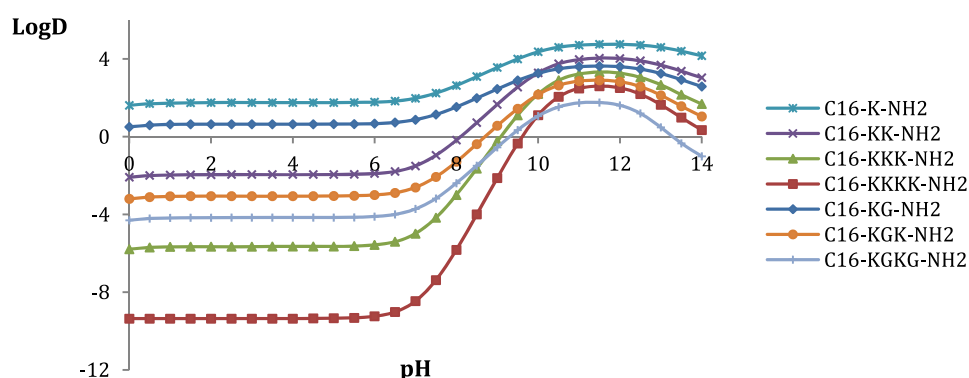
Rycina 19. Teoretycznie wyznaczone wartości LogP analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem oktanowym.



Rycina 20. Teoretycznie wyznaczone wartości LogP analogów lipopeptydowych zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe.

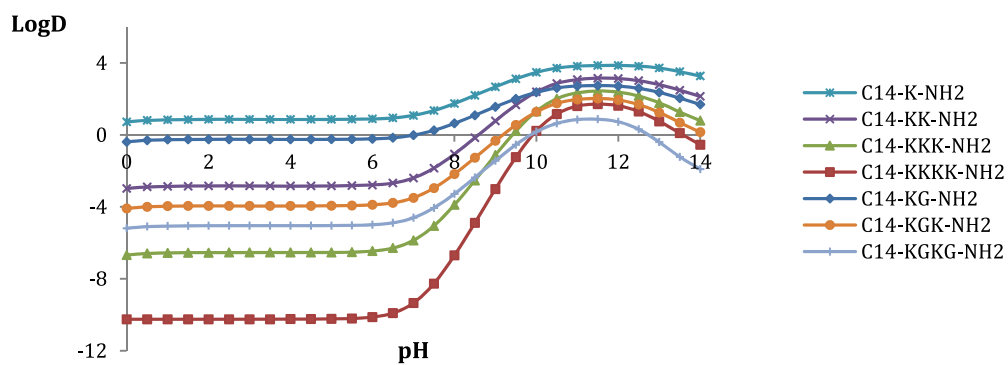
### 3.3.3. WSPÓŁCZYNNIK DYSTRYBUCJI – LOGD

W przypadku, gdy analizowana cząsteczka zawiera jedną lub więcej grup jonizalnych, oznacza to, że może występować w postaci mieszaniny różnorodnych jonów. Skład takiej mieszaniny jest silnie uzależniony od wartości pH. Wartość LogD charakteryzuje właściwości związku ulegającego jonizacji w roztworze o danej wartości pH. Stąd też może być z powodzeniem wykorzystywana przy ocenie właściwości farmakokinetycznych, metabolicznych i toksycznych substancji leczniczych, jeśli tylko te wielkości zależą od wartości pH. Teoretycznego określenia wartości współczynnika dystrybucji dokonano za pomocą programu Marvin Sketch 5.4.0.0, aplikacja Marvin LogD. Na ryc. 21 – 26 przedstawiono przebieg zależności wartości LogD od pH dla otrzymanych związków.

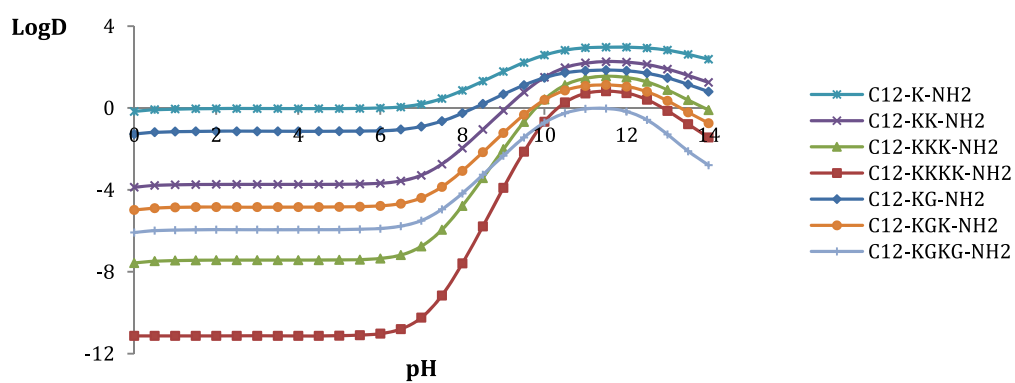


Rycina 21. Teoretycznie wyznaczone wartości LogD analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadekanowym.

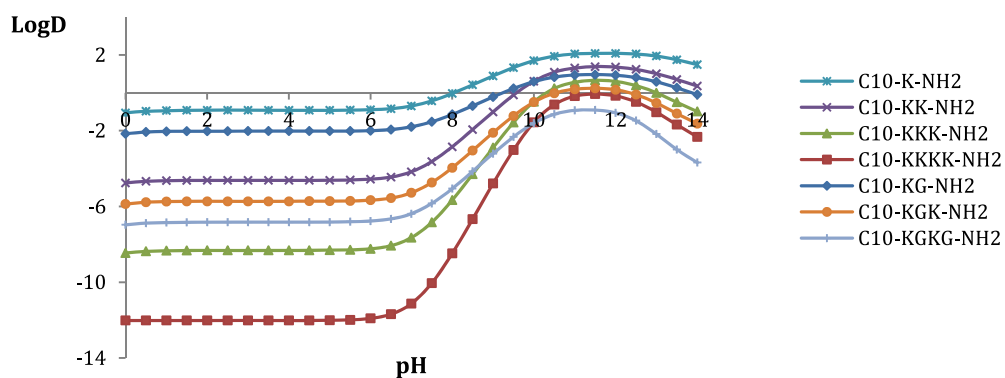
## Część doświadczalna



Rycina 22. Teoretycznie wyznaczone wartości LogD analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem tetradekanowym.

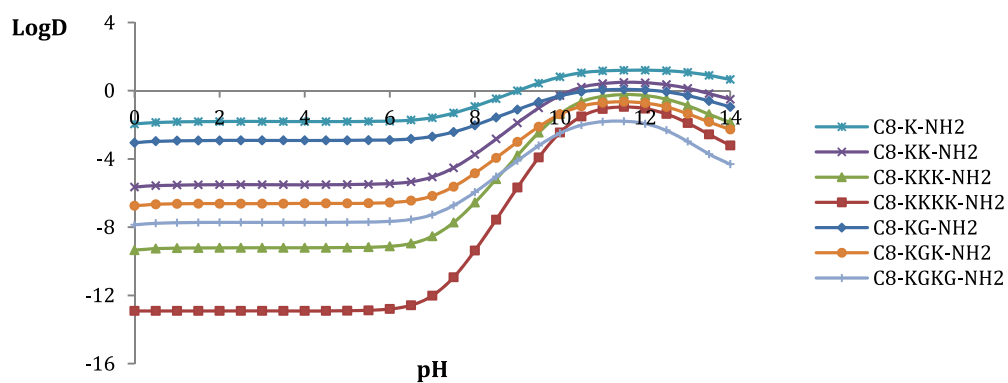


Rycina 23. Teoretycznie wyznaczone wartości LogD analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dodekanowym.

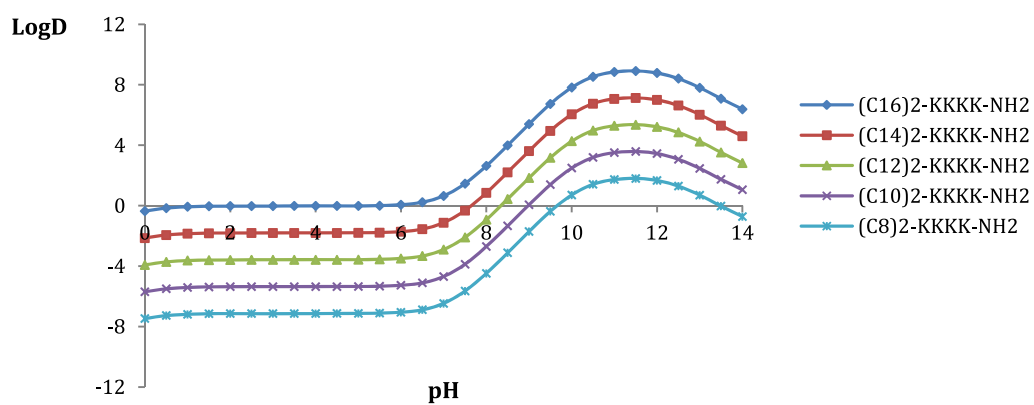


Rycina 24. Teoretycznie wyznaczone wartości LogD analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dekanowym.

## Część doświadczalna



Rycina 25. Teoretycznie wyznaczone wartości LogD analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem oktanowym.



Rycina 26. Teoretycznie wyznaczone wartości LogD analogów lipopeptydowych zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe.

### 3.4. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW

Badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych otrzymanych związków lipopeptydowych zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Celem badań mikrobiologicznych było wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost (Minimal Inhibitory Concentration – MIC), minimalnego stężenia bakteriobójczego (Minimal Bactericidal Concentration – MBC) oraz minimalnego stężenia grzybobójczego (Minimal Fungicidal Concentration – MFC).

Badaniami objęto następujące referencyjne szczepy bakterii i grzybów:

**bakterie Gram dodatnie:** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (PCM 2118), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212),

**bakterie Gram ujemne:** *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Proteus vulgaris* (PCM 2668), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027),

**drożdżaki:** *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (PCM 2681),

**pleśnie:** *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

Wszystkie drobnoustroje pochodziły z Polskiej Kolekcji Drobnoustrojów Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Testy zostały wykonane metodą seryjnych rozcieńczeń w pożywce płynnej zgodnie z zaleceniami CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (128; 129).

Dla szczepów bakteryjnych wykorzystano podłoże płynne Mueller-Hinton II Broth, natomiast oznaczenia MIC dla grzybów wykonano w bulionie Sabouraud Dextrose Broth.

Badane związki rozpuszczano w buforze fosforanowym (PBS – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) po uprzednim rozpuszczeniu w dimetylosulfotlenku (DMSO) w takiej ilości, aby stężenie DMSO w próbce zawierającej mikroorganizmy nie przekraczało 10% (ustalono, że 15% roztwór DMSO wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe). Związki nanoszono na 96-dołkowe płytki polistyrenowe i rozcieńczano seryjnie w odpowiedniej pożywce mikrobiologicznej, po czym dodawano zawiesinę drobnoustrojów o gęstości 10<sup>5</sup> CFU/ml dla bakterii oraz 10<sup>3</sup> CFU/ml dla grzybów. Inkubacja bakterii trwała 18 godzin w 37 °C a grzybów 48 godzin w 25 °C. Po inkubacji dokonywano wizualnego odczytu wyników.

## Część doświadczalna

Za MIC uznawano stężenie, po zastosowaniu którego nie obserwowano wzrostu drobnoustrojów. Następnie stężenia równe MIC oraz dwa kolejne wyższe wysiewano na odpowiednie podłoża stałe (dla szczepów bakteryjnych Mueller-Hinton II Agar, natomiast dla grzybów Sabouraud 2% Glucose Agar) celem oznaczenia MBC i MFC.

Dla każdej serii badań równolegle przeprowadzono kontrolę wzrostu szczepów na podłożach niezawierających badanych lipopeptydów.

Badania MIC, MBC i MFC wykonano trzykrotnie dla każdego z otrzymanych lipopeptydów.

W tabelach 17 – 34 przedstawiono uzyskane wartości MIC i MBC dla przebadanych referencyjnych szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych oraz MIC i MFC dla przebadanych referencyjnych szczepów drożdżaków i pleśni.

3.4.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW  
MODYFIKOWANYCH KWASEM HEKSADEKANOWYM

**Tabela 17.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadekanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram dodatnich.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]				
Związek	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>512	8	8	32
C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	8	4	4	8
C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	8	4	8	16
C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	4	4	4	16
C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	8	4	4	16
C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	8	4	4	8
C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	16	4	4	16

Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]				
Związek	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>512	16	8	64
C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	8	4	4	8
C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	8	4	8	16
C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	8	4	4	16
C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	8	4	4	16
C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	8	4	4	16
C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	32	4	4	16

**Tabela 18.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadekanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram ujemnych.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]				
Związek	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	512	512	>512	>512
C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	8	16	8	>512
C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	8	4	8	>512
C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	8	4	8	>512
C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	256	128	256	>512
C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	8	16	16	>512
C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	16	16	8	>512

Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]				
Związek	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>512	>512	>512	>512
C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	8	16	8	>512
C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	16	4	8	>512
C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	8	8	8	>512
C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	256	256	1·10 <sup>3</sup>	>512
C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	8	16	32	>512
C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	16	16	8	>512

**Tabela 19.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia grzybobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadekanowym. Aktywność oznaczana wobec drożdżaków i pleśni.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]			
Związek	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	512	>512	>512
C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	128	128	128
C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	128	128	128
C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	128	128	128
C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	128	256	512
C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	128	256	128
C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	128	256	128
Minimalne stężenie grzybobójcze [MFC µg/ml]			
C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	512	>512	>512
C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	128	128	128
C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	128	128	128
C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	128	128	128
C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	128	512	512
C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	128	256	128
C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	128	256	128



3.4.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW  
MODYFIKOWANYCH KWASEM TETRADEKANOWYM

**Tabela 20.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem tetradekanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram dodatnich.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]				
Związek	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	64	16	32	32
C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	64	4	4	32
C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	64	8	4	64
C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	64/128	16	4	64
C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	32	16	16	32
C <sub>14</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	64	16	8	64
C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	64	32	16	64

Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]				
Związek	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	256	16	32	32
C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	64	4	4	64
C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	64	8	4	64
C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	128	16	4	64
C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	32	16	16	32
C <sub>14</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	128	16	8	64
C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	128	32	16	64

**Tabela 21.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem tetradekanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram ujemnych.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]				
Związek	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	128	64	128	>512
C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	64	128	32	>512
C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	128	128	32	>512
C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	128	256	>512
C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	64	32	32	>512
C <sub>14</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	128	64	32	>512
C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	128	128	64	>512

Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]				
Związek	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	128	512	1·10 <sup>3</sup>	>512
C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	128	128	64	>512
C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	128	128	128	>512
C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	256	512	>512
C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	64	32	64	>512
C <sub>14</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	128	64	64	>512
C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	128	128	128	>512

**Tabela 22.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia grzybobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem tetradekanowym. Aktywność oznaczana wobec drożdżaków i pleśni.

Związek	Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	512	>512	512
C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	128	256	256
C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	128	128	64
C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	128	128	64
C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	128	256	128
C <sub>14</sub> -K GK-NH <sub>2</sub>	128	256	128
C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	128	512	128
Minimalne stężenie grzybobójcze [MFC µg/ml]			
C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	512	>512	512
C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	128	256	256
C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	128	128	64
C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	128	128	64
C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	128	256	128
C <sub>14</sub> -K GK-NH <sub>2</sub>	128	256	128
C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	128	512	128

### 3.4.3. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM DODEKANOWYM

**Tabela 23.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dodekanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram dodatnich.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]				
Związek	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	256	128	128	256
C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	64	64	512
C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	64	64	512
C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	64	128	512
C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	256	128	128	256
C <sub>12</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	64	512	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	256	64	512

Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	256	128	256	256
C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	64	128	512
C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	64	128	512
C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	64	256	512
C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	512	128	256	256
C <sub>12</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	128	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	512	64	512

**Tabela 24.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dodekanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram ujemnych.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]				
Związek	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	256	256	128	>512
C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	512	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	256	256	256	>1·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]				
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	256	256	256	>1·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	1·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	512	512	512	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

**Tabela 25.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia grzybobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dodekanowym. Aktywność oznaczana wobec drożdżaków i pleśni.

Związek	Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	256	256	256
C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	512
C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	256	128
C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	512	512	256
C <sub>12</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
Związek	Minimalne stężenie grzybobójcze [MFC µg/ml]		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	512	512	512
C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	512
C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	512	256
C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	512	512	512
C <sub>12</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>

3.4.4. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW  
MODYFIKOWANYCH KWASEM DEKANOWYM

**Tabela 26.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dekanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram dodatnich.

Związek	Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	256	256	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	128	128	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	64	128	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	512	512	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	512	512	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	512	512	2·10 <sup>3</sup>

Związek	Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	512	512	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	256	256	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	128	128	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	512	>1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	512	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	512	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

**Tabela 27.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwas dekanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram ujemnych.

Związek	Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]			
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	512	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

Związek	Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]			
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

**Tabela 28.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia grzybobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dekanowym. Aktywność oznaczana wobec drożdżaków i pleśni.

Związek	Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	512
C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	512	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	512	1·10 <sup>3</sup>
Minimalne stężenie grzybobójcze [MFC µg/ml]			
C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>

3.4.5. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW  
MODYFIKOWANYCH KWASEM OKTANOWYM

**Tabela 29.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem oktanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram dodatnich.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]				
Związek	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>256	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -K GK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	256	512	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]				
Związek	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	512	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -K GK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

**Tabela 30.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem oktanowym. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram ujemnych.

Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]				
Związek	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -K GK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]				
Związek	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -K GK-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>	>2·10 <sup>3</sup>

**Tabela 31.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia grzybobójczego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem oktanowym. Aktywność oznaczana wobec drożdżaków i pleśni.

<b>Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]</b>			
<b>Związek</b>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
<b>Minimalne stężenie grzybobójcze [MFC µg/ml]</b>			
C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>3</sup>



### 3.4.6. AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA LIPOPEPTYDÓW ZAWIERAJĄCYCH DWA ŁAŃCUCZY HYDROFOBOWE

**Tabela 32.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram dodatnich.

Związek	Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	32	64	512
(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	8	2	2	16
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	16	4	2	8
(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	128	128	64
(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	>512	512	512

Związek	Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>512	64	64	512
(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	16	4	4	16
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	32	4	2	16
(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>512	256	256	256
(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>512	>512	>512	>512

**Tabela 33.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego analogów lipopeptydowych zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe. Aktywność oznaczana wobec bakterii Gram ujemnych.

Związek	Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]			
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	256	256	>512
(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	16	32	16	512
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	64	32	32	>512
(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	512	512	512
(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	512	512	>512

Związek	Minimalne stężenie bakteriobójcze [MBC µg/ml]			
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	512	512	>512
(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	16	128	16	512
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	64	32	32	>512
(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>512	512	512	>512
(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>512	>512	>512	>512

**Tabela 34.** Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz minimalnego stężenia grzybobójczego analogów lipopeptydowych zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe. Aktywność oznaczana wobec drożdżaków i pleśni.

Związek	Minimalne stężenie hamujące wzrost [MIC µg/ml]		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	512	128
(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	128	256	256
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	256	256
(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	512	512
(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	512	256
	Minimalne stężenie grzybobójcze [MFC µg/ml]		
(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	>512	512
(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256	512	512
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	512	512
(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	512	>512	>512
(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>512	>512	512

### 3.5. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI HEMOLITYCZNYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW

Krew ludzka od jednego, zdrowego dawcy w ilości 5 ml została pobrana prosto z żyły do probówek zawierających kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA). Tego samego dnia krwinki czerwone oddzielono od osocza poprzez wirowanie (500 x g przez 12 min.), przemyto trzykrotnie PBS i sporządzono ich zawiesinę w PBS. Lipopeptydy seryjnie rozcieńczono w PBS, następnie do tak przygotowanych roztworów dodawano zawiesinę erytrocytów (stężenie krwinek czerwonych w próbce wynosiło 4% v/v). Po 18 godzinach inkubacji w inkubatorze IKA KS 4000i Control w temperaturze 37°C dokonano wizualnej oceny wyników. Roztwór Tritonu X – 100 o stężeniu 1% , wywołujący całkowitą hemolizę, został wykorzystany jako kontrola pozytywna a roztwór PBS niezawierający lipopeptydów jako kontrola negatywna (130).

W tab. 35 – 40 zamieszczono uzyskane wartości minimalnego stężenia wywołującego hemolizę (Minimal Hemolytic Concentration – MHC) erytrocytów ludzkich dla otrzymanych lipopeptydów modyfikowanych odpowiednimi kwasami tłuszczowymi.

**Tabela 35.** Wartości minimalnego stężenia wywołującego hemolizę erytrocytów ludzkich analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadekanowym.

Związek	MHC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	512
C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	256
C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	32
C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	16
C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	256
C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	64
C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	64

**Tabela 36.** Wartości minimalnego stężenia wywołującego hemolizę erytrocytów ludzkich analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem tetradekanowym.

Związek	MHC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	512
C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	128
C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	256
C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	256
C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>1·10 <sup>3</sup>
C <sub>14</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	128
C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	512

**Tabela 37.** Wartości minimalnego stężenia wywołującego hemolizę erytrocytów ludzkich analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dodekanowym.

Związek	MHC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
C <sub>12</sub> -K-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	512
C <sub>12</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	1·10 <sup>3</sup>
C <sub>12</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	256

**Tabela 38.** Wartości minimalnego stężenia wywołującego hemolizę erytrocytów ludzkich analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem dekanowym.

Związek	MHC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
C <sub>10</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	4·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>10</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>

**Tabela 39.** Wartości minimalnego stężenia wywołującego hemolizę erytrocytów ludzkich analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem oktanowym.

Związek	MHC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
C <sub>8</sub> -K-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>
C <sub>8</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	>4·10 <sup>3</sup>

**Tabela 40.** Wartości minimalnego stężenia wywołującego hemolizę erytrocytów ludzkich analogów lipopeptydowych zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe.

Związek	MHC [ $\mu\text{g/ml}$ ]
(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	>512
(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	32
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	16
(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	64
(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	32

### 3.6. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW

Związki powierzchniowo czynne charakteryzuje specyficzna, biegunowa budowa cząsteczki. Dzięki temu mogą rozpuszczać się jednocześnie w dwóch różnych rozpuszczalnikach. Mogą też adsorbować się na granicy dwóch faz o różnych właściwościach fizykochemicznych. Adsorpcja surfaktantów na granicy faz prowadzi do zmiany jej składu, potencjału elektrycznego oraz do zmniejszenia nadmiarowej energii międzyfazowej. Dlatego surfaktanty znajdują zastosowanie tam, gdzie stosunek pola powierzchni międzyfazowej do objętości fazy jest wysoki. Adsorpcja cząsteczek surfaktantu na styku faz powietrze/woda lub woda/olej, skutkuje obniżeniem napięcia powierzchniowego na granicy tych faz. Umożliwia to np. łatwiejsze tworzenie stabilnych emulsji. Adsorpcja na granicy faz ciało stałe/ciecz ułatwia zwilżanie hydrofobowych powierzchni ciała stałego lub dyspergowanie go w cieczy (19).

Zjawisko adsorpcji surfaktantów opisują parametry:

**CMC** – krytyczne stężenie micelarne, czyli stężenie cząsteczek surfaktantu, powyżej którego związek powierzchniowo czynny tworzy maksymalnie upakowaną monowarstwę na styku faz oraz formuje agregaty, czyli micelle,

**pC<sub>20</sub>** – sprawność obniżania napięcia powierzchniowego, wyrażana jako ujemny logarytm ze stężenia związku powierzchniowo czynnego, niezbędnego do obniżenia napięcia powierzchniowego rozpuszczalnika o 20 mN/m,

**σ<sub>CMC</sub>** – napięcie powierzchniowe w punkcie CMC,

**Π<sub>CMC</sub>** – ciśnienie powierzchniowe osiągnięte przez surfaktant, przy stężeniu równym CMC, wyrażone wzorem:

$$\Pi_{CMC} = \sigma_0 - \sigma_{CMC}$$

gdzie:

σ<sub>0</sub> – napięcie międzyfazowe dla czystego układu bez surfaktantu.

### 3.6.1. METODA POMIARU ZDOLNOŚCI LIPOPEPTYDÓW DO OBNIŻANIA NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO NA GRANICY FAZ POWIETRZE/WODA

Badania napięć na granicy faz powietrze/woda miały potwierdzić zdolność lipopeptydów do obniżania napięcia powierzchniowego. Do pomiaru napięcia powierzchniowego roztworów otrzymanych lipopeptydów używano tensjometru automatycznego EasyDyne. Wykorzystano metodę pierścieniową, która opiera się na pomiarze dynamometrycznym siły jakiej należy użyć, by oderwać od powierzchni cieczy pierścień wykonany z cienkiego drutu platynowo-irydowego.

W metodzie Du Noüya ciecz jest podnoszona do góry aż do zarejestrowania kontaktu z pierścieniem. Następnie próbka cieczy opuszczana jest w dół, co powoduje powstanie pod pierścieniem filmu cieczy, który jest rozciągany w miarę opuszczania naczynia pomiarowego. W trakcie rozciągania filmu cieczy osiąga się wartość maksymalną siły, która jest rejestrowana. W punkcie maksimum wektor siły jest dokładnie równoległy do kierunku ruchu, w tym momencie kąt zwilżania pierścienia jest równy 0°.

W praktyce wysokość podnoszenia pierścienia wzrasta aż do momentu przekroczenia obszaru maksymalnej siły. Następnie naczynie pomiarowe jest podnoszone, aby ponownie przejść przez punkt maksymalnej siły. Ta maksymalna wartość siły, używana do obliczania napięcia powierzchniowego, jest oznaczana w trakcie ruchu powrotnego naczynka pomiarowego (131).

Obliczenia napięcia powierzchniowego dokonuje się według wzoru (131):

$$\sigma = \frac{F_{max} - F_v}{L \cdot \cos\alpha}$$

gdzie:

$\sigma$  – napięcie powierzchniowe lub międzyfazowe

$F_{max}$  – siła maksymalna

$F_v$  – masa objętości podniesionej cieczy

$L$  – długość zwilżania

$\alpha$  – kąt zwilżania

Badania objęły pomiary napięcia powierzchniowego wodnych roztworów lipopeptydów, dla których obserwowano wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową, czyli modyfikowanych kwasem heksadekanowym, tetradekanowym oraz zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe. Do przygotowania roztworów surfaktantów do badań fizykochemicznych stosowano wodę, której napięcie powierzchniowe wynosiło 71,5 mN/m. Pomiary wykonano w stałej temperaturze  $25 \pm 0,2$  °C pod stałym ciśnieniem atmosferycznym. Przed każdym pomiarem pierścień przemywano strumieniem wody oczyszczonej i wypalano w płomieniu palnika gazowego.

## Część doświadczalna

Dla każdego z lipopeptydów wykonano badania napięcia powierzchniowego w 3 niezależnych seriach pomiarowych. Jedna seria oznaczała pomiar  $\sigma$  w zakresie powyżej i poniżej CMC, w której pojedynczego odczytu wartości  $\sigma$  dla danego stężenia  $c$  (mmol/l) lipopeptydu dokonywano po ustaleniu się stanu równowagi na granicy faz powietrze/woda, czyli gdy  $\sigma$  nie ulegało zmianom. Odchylenie standardowe pojedynczego pomiaru  $\sigma$  było obliczane automatycznie przez tensjometr na podstawie 10 cząstkowych pomiarów i było równe rozdzielczości aparatu (0,1 mN/m).

Metoda pierścieniowa wymaga korekcji zmierzonych wartości, uwzględniającej masę cieczy podwieszanej pod pierścieniem. W tym celu wykorzystano metodę Harkinsa i Jordana (131).

Na podstawie uzyskanych danych z 3 serii pomiarowych wyznaczono wartości średnie  $\sigma$  dla danego stężenia i wykreślono izotermy adsorpcji lipopeptydów, w postaci zależności logarytmu ze stężenia w osi argumentów i napięcia powierzchniowego w osi wartości funkcji. Wartości CMC zostały wyznaczone z punktu przecięcia się dwóch prostych: w zakresie spadku (poniżej CMC) i względnej stałości napięcia powierzchniowego (powyżej CMC). Proste na wykresach tworzono przez dodanie linii trendu, w tym celu korzystano z programu Excel 2007.

Aby potwierdzić, że stężenie lipopeptydu nie ma wpływu na wartości napięcia powierzchniowego powyżej CMC, wykonano badanie istotności wartości współczynnika  $a$  równania regresji liniowej i współczynnika korelacji  $r$  (132).

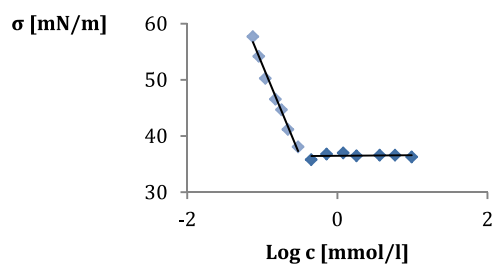
Istotność współczynnika  $a$  i  $r$  zweryfikowano testem Studenta przy  $n - 2$  stopniach swobody. Postawiono hipotezę zerową  $H_0: a = 0, r = 0$ . Wyznaczono graniczny poziom istotności  $\alpha_{\text{gran.}}$ , którego znajomość pozwala przeprowadzić testowanie dla dowolnego poziomu istotności  $\alpha$  (132):

- odrzucamy hipotezę zerową  $H_0$  gdy:  $\alpha_{\text{gran.}} \leq \alpha$ ,
- nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej  $H_0$ , gdy:  $\alpha_{\text{gran.}} > \alpha$ .

Do wnioskowania o istotności wyznaczonych współczynników równania regresji  $a$  i  $r$  przyjęto wartość  $\alpha$  równą 0,01.

Na rycinach 27 – 33 przedstawiono izotermy napięcia powierzchniowego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadekanowym, 34 – 40 tetradekanowym, 41 – 45 zawierających dwa łańcuch hydrofobowe. Pod każdą ryciną znajduje się tabela zawierająca wartości współczynników  $a$ ,  $b$  i  $r$  równań regresji dwóch prostych, wyznaczonych w zakresach powyżej i poniżej CMC oraz ocenę statystyczną obliczonych współczynników równania  $a$  i  $r$  prostej wyznaczonej w zakresie powyżej CMC.

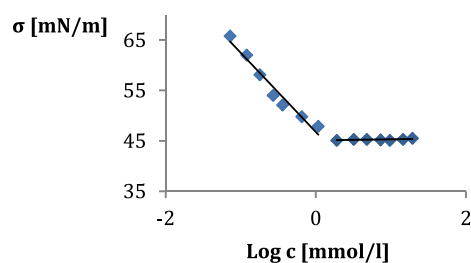
3.6.1.1. IZOTERMY NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM HEKSADEKANOWYM



Rycina 27. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>16</sub>-K-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 41.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>16</sub>-K-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,012	-83,9
α <sub>gran.</sub>	0,821	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	36,5	61,1
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,106	-0,959
α <sub>gran.</sub>	0,074	



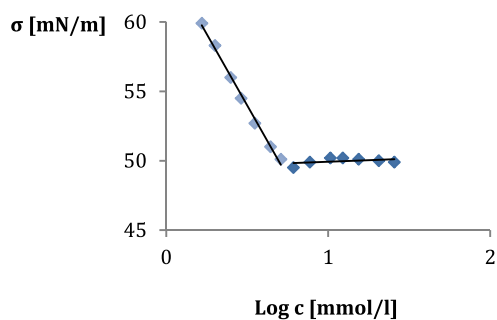
Rycina 28. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 42.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	0,0141	-15,4
α <sub>gran.</sub>	0,119	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	45,1	61,7
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	0,644	-0,847
α <sub>gran.</sub>	0,0329	



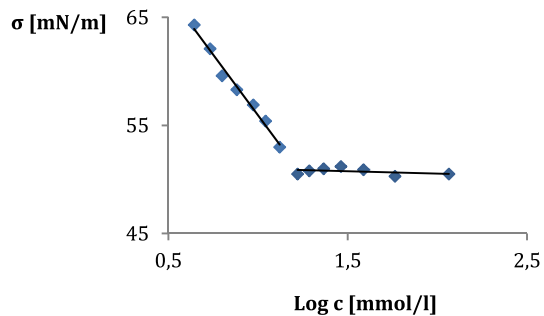
## Część doświadczalna



Rycina 29. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 43.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	0,0083	-2,83
α <sub>gran.</sub>	0,602	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	49,9	63,6
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	0,241	-0,975
α <sub>gran.</sub>	0,0694	

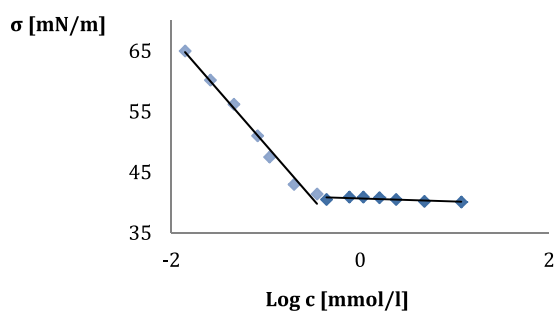


Rycina 30. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 44.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0042	-1,19
α <sub>gran.</sub>	0,293	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	50,9	68,3
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,465	-0,977
α <sub>gran.</sub>	0,0528	

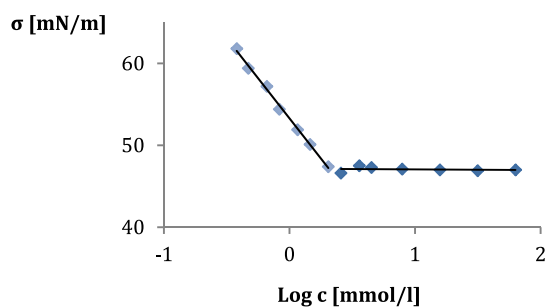
## Część doświadczalna



Rycina 31. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>16</sub>-KG-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 45.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>16</sub>-KG-NH<sub>2</sub>.

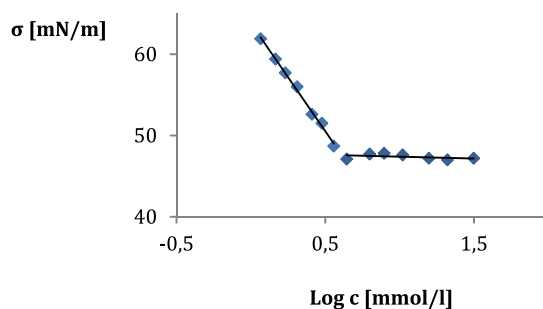
	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0815	-64,1
α <sub>gran.</sub>	0,0243	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	40,8	59,6
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,819	-0,87
α <sub>gran.</sub>	0,0114	



Rycina 32. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 46.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0026	-8,38
α <sub>gran.</sub>	0,669	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	47,1	62,9
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,198	-0,964
α <sub>gran.</sub>	0,0713	



Rycina 33. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>16</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 47.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>16</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub>.

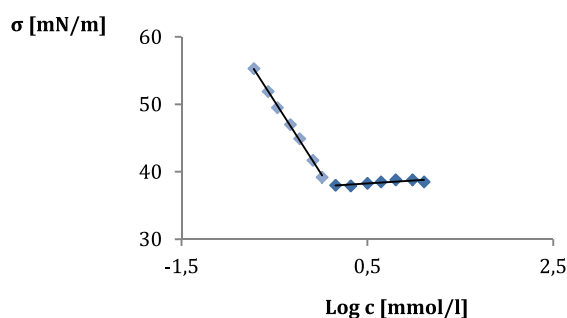
	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0166	-5,28
α <sub>gran.</sub>	0,255	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	47,6	67,1
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,499	-0,991
α <sub>gran.</sub>	0,0494	

W tab. 48 przedstawiono, wyznaczone na podstawie izoterm napięcia powierzchniowego wodnych roztworów lipopeptydów, wybrane parametry opisujące zjawisko adsorpcji lipopeptydów modyfikowanych kwasem heksadekanowym na granicy faz powietrze/woda.

**Tabela 48.** Wybrane parametry lipopeptydów modyfikowanych kwasem heksadekanowym (granica faz powietrze/woda).

Lipopeptyd	CMC wyznaczone		Sprawność pC <sub>20</sub>	Efektywność σ <sub>CMC</sub> [mN/m]	Π <sub>CMC</sub> [mN/m]
	[mmol/l]	[μg/ml]			
C <sub>16</sub> -K-NH <sub>2</sub>	0,29	111,2	3,40	36,5	35,0
C <sub>16</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	1,07	547,60	3,23	45,1	26,4
C <sub>16</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	4,80	3,07·10 <sup>3</sup>	2,41	49,9	21,6
C <sub>16</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	14,60	11,2·10 <sup>3</sup>	1,88	50,9	20,6
C <sub>16</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	0,29	127,80	3,95	40,8	30,7
C <sub>16</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	1,89	1,07·10 <sup>3</sup>	2,90	47,1	24,4
C <sub>16</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	3,70	2,3·10 <sup>3</sup>	2,55	47,6	23,9

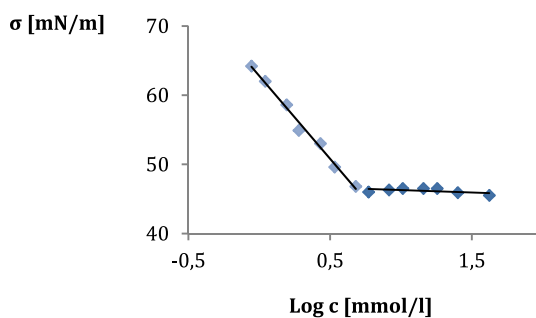
3.6.1.2. IZOTERMY NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM TETRADEKANOWYM



Rycina 34. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>14</sub>-K-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 49.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>14</sub>-K-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	0,058	-18,1
α <sub>gran.</sub>	0,0865	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	38,1	56,7
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	0,689	-0,976
α <sub>gran.</sub>	0,0272	

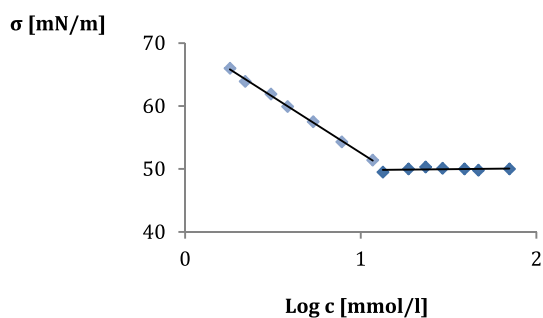


Rycina 35. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>14</sub>-KK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 50.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>14</sub>-KK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0223	-4,37
α <sub>gran.</sub>	0,0666	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	46,6	65,8
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,723	-0,959
α <sub>gran.</sub>	0,0231	

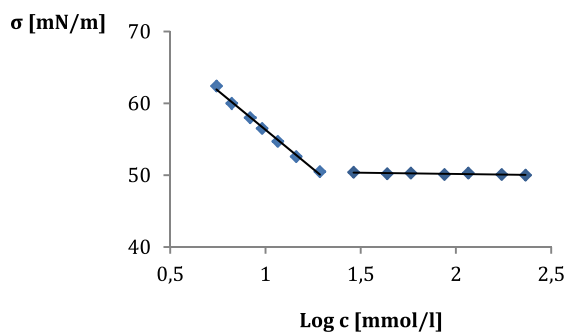
## Część doświadczalna



Rycina 36. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>14</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 51.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>14</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	0,0018	-1,42
α <sub>gran.</sub>	0,759	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	49,9	66,5
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	0,143	-0,965
α <sub>gran.</sub>	0,0734	

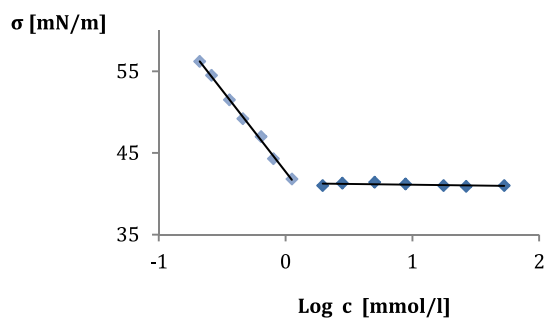


Rycina 37. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>14</sub>-K<sub>4</sub>KKK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 52.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>14</sub>-K<sub>4</sub>KKK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0015	-0,834
α <sub>gran.</sub>	0,0376	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	50,4	65,4
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,782	-0,968
α <sub>gran.</sub>	0,0157	

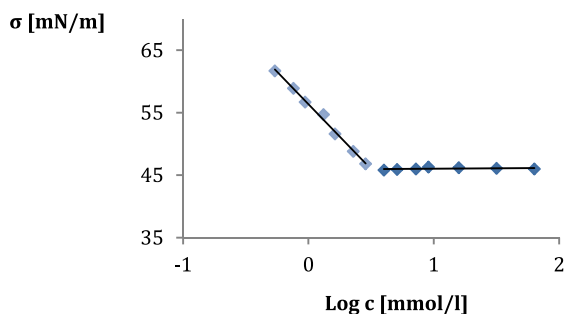
## Część doświadczalna



Rycina 38. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>14</sub>-KG-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 53.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>14</sub>-KG-NH<sub>2</sub>.

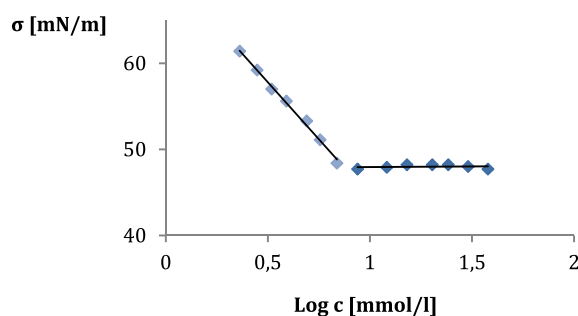
	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0056	-15,6
α <sub>gran.</sub>	0,203	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	41,2	57,8
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,548	-0,970
α <sub>gran.</sub>	0,0442	



Rycina 39. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>14</sub>-KGK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 54.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>14</sub>-KGK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	0,0007	-6,25
α <sub>gran.</sub>	0,855	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	46,0	63,4
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	0,0856	-0,977
α <sub>gran.</sub>	0,0748	



Rycina 40. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu C<sub>14</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 55.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu C<sub>14</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub>.

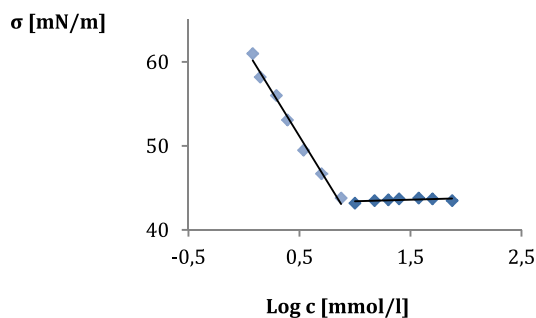
	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0018	-2,73
α <sub>gran.</sub>	0,863	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	48,0	66,7
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,0812	-0,992
α <sub>gran.</sub>	0,0749	

W tab. 56 przedstawiono, wyznaczone na podstawie izoterm napięcia powierzchniowego wodnych roztworów lipopeptydów, wybrane parametry opisujące zjawisko adsorpcji lipopeptydów modyfikowanych kwasem tetradekanowym na granicy faz powietrze/woda.

**Tabela 56.** Wybrane parametry lipopeptydów modyfikowanych kwasem tetradekanowym (granica faz powietrze/woda).

Lipopeptyd	CMC wyznaczone		Sprawność pC <sub>20</sub>	Efektywność σ <sub>CMC</sub> [mN/m]	Π <sub>CMC</sub> [mN/m]
	[mmol/l]	[μg/ml]			
C <sub>14</sub> -K-NH <sub>2</sub>	1,02	362,66	3,64	38,1	33,4
C <sub>14</sub> -KK-NH <sub>2</sub>	4,40	2,13·10 <sup>3</sup>	2,52	46,6	24,9
C <sub>14</sub> -KKK-NH <sub>2</sub>	11,70	7,16·10 <sup>3</sup>	2,00	49,9	21,6
C <sub>14</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	18,04	13,35·10 <sup>3</sup>	1,81	50,4	21,1
C <sub>14</sub> -KG-NH <sub>2</sub>	1,06	437,36	3,46	41,2	30,3
C <sub>14</sub> -KGK-NH <sub>2</sub>	2,80	1,5·10 <sup>3</sup>	2,77	46,0	25,5
C <sub>14</sub> -KGKG-NH <sub>2</sub>	6,90	4,12·10 <sup>3</sup>	2,28	48,0	23,5

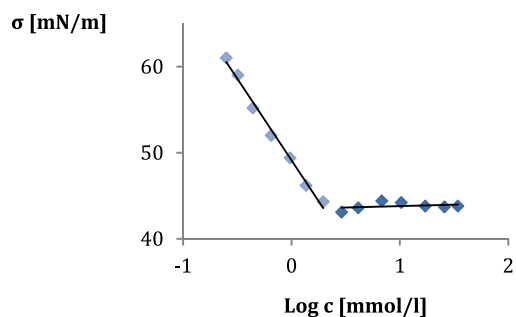
3.6.1.3. IZOTERMY NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO LIPOPEPTYDÓW ZAWIERAJĄCYCH DWA ŁAŃCUCZY HYDROFOBOWE



Rycina 41. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu (C<sub>8</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 57.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu (C<sub>8</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	0,0027	-2,59
α <sub>gran.</sub>	0,487	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	43,5	61,1
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	0,318	-0,943
α <sub>gran.</sub>	0,0649	



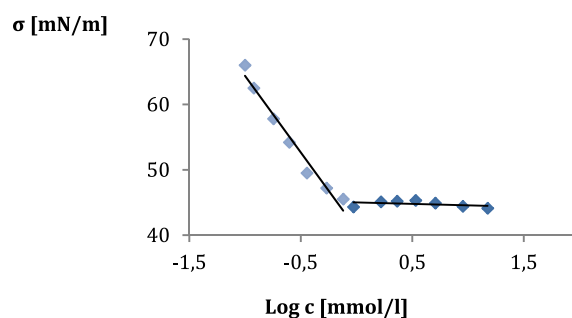
Rycina 42. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 58.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	0,0033	-9,44
α <sub>gran.</sub>	0,844	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	43,8	60,5
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	0,0926	-0,938
α <sub>gran.</sub>	0,0747	



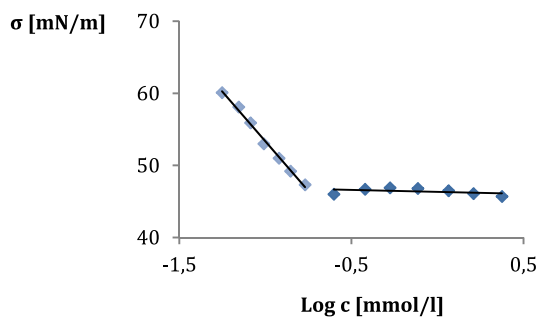
## Część doświadczalna



Rycina 43. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu  $(C_{12})_2\text{-KKKK-NH}_2$ .

**Tabela 59.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu  $(C_{12})_2\text{-KKKK-NH}_2$ .

	Powyżej CMC, $H_0: a = 0; r = 0$	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,0612	-29,0
$\alpha_{\text{gran.}}$	0,122	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	45,1	64,3
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,639	-0,906
$\alpha_{\text{gran.}}$	0,0335	

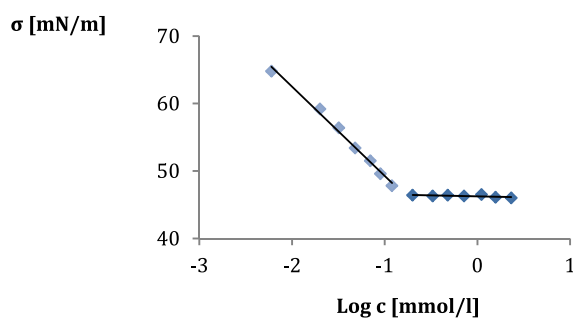


Rycina 44. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu  $(C_{14})_2\text{-KKKK-NH}_2$ .

**Tabela 60.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu  $(C_{14})_2\text{-KKKK-NH}_2$ .

	Powyżej CMC, $H_0: a = 0; r = 0$	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,382	-114,0
$\alpha_{\text{gran.}}$	0,121	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	46,8	65,5
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,641	-0,98
$\alpha_{\text{gran.}}$	0,0333	

## Część doświadczalna



Rycina 45. Izoterma napięcia powierzchniowego lipopeptydu (C<sub>16</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 61.** Statystyczna analiza wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia lipopeptydu (C<sub>16</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

	Powyżej CMC, H <sub>0</sub> : a = 0; r = 0	Poniżej CMC
<b>współczynnik kierunkowy prostej:</b>		
wartość - a	-0,179	-137,0
α <sub>gran.</sub>	0,0428	
<b>wyraz wolny:</b>		
wartość - b	46,5	62,2
<b>współczynnik korelacji:</b>		
obliczony - r	-0,770	-0,941
α <sub>gran.</sub>	0,0172	

W tab. 62 przedstawiono, wyznaczone na podstawie izoterm napięcia powierzchniowego wodnych roztworów lipopeptydów, wybrane parametry opisujące zjawisko adsorpcji lipopeptydów zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe na granicy faz powietrze/woda.

**Tabela 62.** Wybrane parametry lipopeptydów modyfikowanych kwasem tetradekanowym (granica faz powietrze/woda).

Lipopeptyd	CMC wyznaczone		Sprawność pC <sub>20</sub>	Efektywność σ <sub>CMC</sub> [mN/m]	Π <sub>CMC</sub> [mN/m]
	[mmol/l]	[μg/ml]			
(C <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	6,80	5,32·10 <sup>3</sup>	2,48	43,5	28,0
(C <sub>10</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	1,76	1,47·10 <sup>3</sup>	3,10	43,8	27,7
(C <sub>12</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	0,66	590,20	3,40	45,1	26,4
(C <sub>14</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	0,16	152,06	3,96	46,8	24,7
(C <sub>16</sub> ) <sub>2</sub> -KKKK-NH <sub>2</sub>	0,11	110,70	4,15	46,5	25,0

## 4. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

### *OCENA JAKOŚCI I TOŻSAMOŚCI OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW*

Zastosowana w pracy metoda syntezy na nośniku stałym (SPPS) jest obecnie najczęściej wybieraną metodą do otrzymywania związków peptydowych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (133; 134), ale także przeciwwirusowych (135) lub przeciwnowotworowych (136).

Zastosowane w części doświadczalnej sposoby oczyszczania lipopeptydów (SPE, RP-HPLC) były wystarczające do otrzymania produktu, którego czystość sięgała >98%. W obu przypadkach złoża krzemionkowe było modyfikowane łańcuchem oktadecylowym, choć niektórzy autorzy donoszą, że zastosowanie złoża chromatograficznego C-4 do oczyszczania lipopeptydów, jest równie dobrym rozwiązaniem (137).

Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej, jako pierwszego etapu oczyszczania, nie jest powszechne. Znaczna część autorów wskazuje RP-HPLC, jako jedyną metodę oczyszczania. Jednak etap ekstrakcji do fazy stałej poprzedzający właściwe oczyszczanie, umożliwił usunięcie znacznej części drobnocząsteczkowych zanieczyszczeń hydrofobowych (138). Takie podejście zabezpieczało układ HPLC, stosowany w drugim etapie oczyszczania przed nagłym wzrostem ciśnienia, spowodowanym przez naniesienie na kolumnę dużej ilości substancji niepolarnych.

Zastosowaną do potwierdzenia tożsamości lipopeptydów metodą MALDI-TOF charakteryzuje łagodna metoda jonizacji próbki, w związku z czym nie dochodzi do fragmentacji badanej substancji. Dlatego interpretacja widm masowych dla otrzymanych lipopeptydów sprowadzała się do odczytania wartości masy cząsteczkowej badanego związku powiększonej o masę protonu  $[M+H]^+$  i porównaniu jej z obliczoną teoretycznie masą lipopeptydu. Z analizy widm masowych przedstawionych w aneksie, na ryc. 52 – 91 wynika, że wszystkie otrzymane metodą SPPS lipopeptydy odpowiadają zaprojektowanym wcześniej strukturom. Ponieważ analizę MS lipopeptydów wykonywano w dwóch różnych matrycach: kwasie  $\alpha$ -cyjano-4-hydroksycynamonowym (CCA) i kwasie 2,5-dihydroksibenzoowym (DHB) na załączonych w aneksie widmach masowych mogą być widoczne piki pochodzące od tych matryc. W przypadku matrycy CCA są to piki o wartościach: 164,0; 172,0; 190,0; 288,2; 316,3; 335,1; 379,0; 416,0. Z kolei dla matrycy DHB: 118,0; 137,1; 154,0; 163,0; 244,2; 272,3; 288,3; 316,3; 332,3; 358,3; 412,1. W aneksie załączono widma MALDI-TOF dla tych matryc (ryc. 50 i 51). Ponadto obok głównego piku molekularnego danego lipopeptydu mogą pojawiać się piki adduktów  $[M+Na]^+$  i  $[M+K]^+$  o mniejszej intensywności, powstające na skutek zbyt niskiego stężenia jonów  $H^+$  w analizowanej próbce.

Giacometti i wsp. (139) oraz Sarig i wsp. (140) również wykorzystywali metodę MALDI-TOF do identyfikacji syntetycznych związków o budowie peptydowej. Niektóre prace badawcze donoszą o możliwości dodatkowego potwierdzenia tożsamości związków peptydowych poprzez wykonanie analizy aminokwasowej (107; 106).

### 4.1. OCENA WYNIKÓW BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW

#### *OCENA BILANSU HYDROFILOWO-LIPOFILOWEGO*

Wartość HLB pozwala na wstępne określenie potencjalnego wykorzystania związku powierzchniowo czynnego. W tab. 63 przedstawiono zakresy HLB surfaktantów i odpowiadające im zastosowanie (19).

Do wyznaczenia HLB zastosowano metodę McGowana, gdyż określa ona cząstkowe wartości HLB dla wszystkich elementów strukturalnych tworzących otrzymane lipopeptydy. W tab. 16 przedstawiono obliczone wartości bilansu hydrofilowo-lipofilowego dla otrzymanych lipopeptydów. Obliczeń dokonywano przy założeniu sprotonowania wszystkich grup  $\epsilon$ -aminowych występujących w lipopeptydach.

**Tabela 63.** Potencjalne zastosowanie surfaktantów na podstawie wartości bilansu hydrofilowo lipofilowego (19).

Zakres HLB	Zastosowanie
3 – 6	Emulgatory w/o
7 – 9	Środki zwilżające
8 – 18	Emulgatory o/w
13 – 15	Detergenty
15 – 18	Solubilizatory

Na podstawie szacunków wykonanych metodą McGowana można stwierdzić, że HLB dla wszystkich 40 otrzymanych lipopeptydów jest większe od 10 stąd można przypuszczać o prawdopodobnym braku zastosowania otrzymanych lipopeptydów kationowych, jako emulgatorów w/o, które wymagają HLB surfaktantu od 3 do 6 oraz środków zwilżających, dla których optymalny zakres HLB to 7 – 9.

W przypadku lipopeptydu  $C_{16}\text{-KG-NH}_2$  uzyskano wartość HLB zawartą w przedziale 15 – 18. Może to świadczyć o prawdopodobnych właściwościach solubilizujących tego związku. W przedział HLB o wartości 13 – 15, który obejmuje detergenty, wpisują się lipopeptydy  $C_{12}\text{-KG-NH}_2$ ,  $C_{10}\text{-KG-NH}_2$  i  $C_8\text{-K-NH}_2$ . Na podstawie klasyfikacji zamieszczonej w tab. 63, do emulgatorów o/w, oprócz trzech wyżej wymienionych lipopeptydów można zaliczyć także  $C_{16}\text{-K-NH}_2$ ,  $C_{16}\text{-KG-NH}_2$ ,  $C_{14}\text{-K-NH}_2$ ,  $C_{14}\text{-KG-NH}_2$ ,  $C_{12}\text{-K-NH}_2$  i  $C_{10}\text{-K-NH}_2$ . Dla wszystkich pozostałych lipopeptydów obliczona

## Omówienie i dyskusja wyników

wartość HLB jest większa od 18. Dla lipopeptydów zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe wartość HLB nie spada poniżej 20. Tak wysoka wartość HLB może wskazywać na potencjalne zastosowanie tych lipopeptydów jako substancji solubilizujących.

### *OCENA UZYSKANYCH WARTOŚCI LOGP*

Do wyznaczenia współczynnika podziału n-oktanol/woda (ryc. 15 – 20) dla otrzymanych lipopeptydów wykorzystano trzy programy komputerowe. Zatem dla każdego z lipopeptydów wyznaczono trzy wartości LogP.

W rozdz. 2.2. otrzymane lipopeptydy podzielono na grupy od 1 do 6, gdzie grupa 1 to lipopeptydy modyfikowane kwasem heksadekanowym, 2 – tetradekanowym, 3 – dodekanowym, 4 – dekanowym, 5 – oktanowym oraz 6 to lipopeptydy zawierające dwa łańcuchy hydrofobowe.

Na ryc. 15 – 19 przedstawiono przebieg zależności uzyskanych wartości LogP od składu aminokwasowego lipopeptydów z grup 1 – 5, a na ryc. 20 przedstawiono przebieg zależności LogP od długości przyłączonych łańcuchów hydrofobowych dla lipopeptydów z grupy 6, dla których skład aminokwasowy hydrofilowego fragmentu jest stały (KKKK).

Uzyskane wartości LogP, w obrębie grup 1 – 5 wykazują silną zależność od składu aminokwasowego hydrofilowych fragmentów lipopeptydów. W miarę zwiększania ilości reszt aminokwasowych wchodzących w skład hydrofilowego fragmentu cząsteczki, wartość LogP spada, co wskazuje na ogólny wzrost hydrofilowości tych związków. Z uzyskanych wartości LogP dla lipopeptydów z grupy 6 wynika, że wartość ta jest najwyższa dla związku zawierającego dwa łańcuchy heksadekanowe, co może wskazywać na jego najwyższą lipofilowość. Najmniej lipofilowym z tej grupy okazał się związek modyfikowany kwasem oktanowym.

Porównując wartości LogP wyznaczone za pomocą trzech różnych programów komputerowych można zauważyć, że są one podobne. Największą rozbieżność uzyskanych wartości LogP zaobserwowano w przypadku, gdy związek charakteryzuje zbliżona rozpuszczalność w n-oktanolu i w wodzie (LogP w granicach od -1 do 1) oraz, gdy jest wysoce lipofilowy (LogP > 5).

Oceniając wyznaczone wartości LogP dla poszczególnych lipopeptydów należy porównać je do powszechnie stosowanych środków konserwujących. Z danych literaturowych przedstawionych w tab. 6 wynika, że wartość LogP dla fenoksyetanolu wynosi 1,16; dla chlorku benzalkoniowego 1,9; parabenu M 1,96; parabenu P 3,04. Są to zatem związki o właściwościach lipofilowych. Podobne wartości LogP, sugerujące lipofilowość, uzyskano dla szeregu lipopeptydów, np. wartości LogP wyznaczone dla C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> wynoszą od 2,64 do 3,46 (ryc. 15); dla C<sub>14</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> od 2,56 do 3,02 (ryc. 16); dla C<sub>10</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> od 0,78 do 1,34 (ryc. 18) a dla (C<sub>8</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> od 1,96 do 2,07 (ryc. 20). Wśród otrzymanych lipopeptydów są zatem takie,

## Omówienie i dyskusja wyników

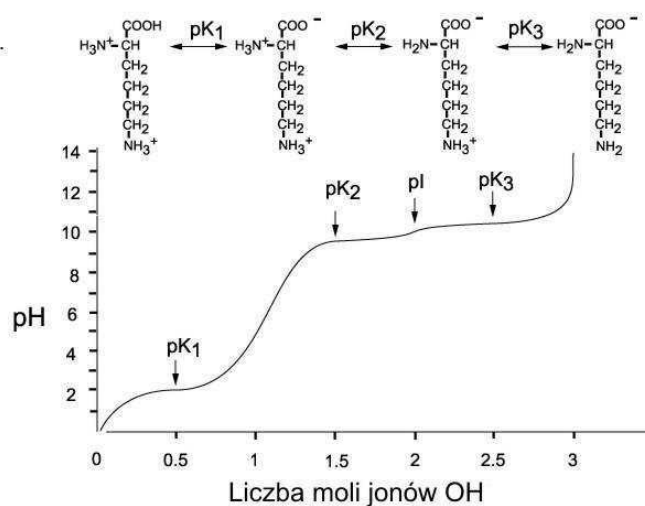
których wartości współczynnika podziału n-oktanol/woda mogą być porównywalne z wartościami LogP środków konserwujących stosowanych komercyjnie.

Ponieważ definicja LogP każe rozpatrywać cząsteczkę elektrycznie obojętną, a otrzymane lipopeptydy są cząsteczkami naładowanymi dodatnio, to odosobnione spojrzenie tylko na ich wartość LogP może dawać niepełny obraz ich zachowania na granicy faz. Należy zatem przeanalizować ich prawdopodobne zachowanie na granicy faz olej/woda w zmieniającym się pH fazy wodnej, czyli wartość współczynnika dystrybucji LogD.

### OCENA UZYSKANYCH WARTOŚCI LOGD

Otrzymane lipopeptydy są związkami zawierającymi jonizowalne grupy  $\epsilon$ -aminowe w łańcuchach bocznych lizyny, która jest składową hydrofilowego fragmentu cząsteczki surfaktantu. Konsekwencją jest silna zależność współczynnika podziału od pH środowiska.

Z krzywej potencjometrycznego miareczkowania lizyny (ryc. 46) można odczytać, że w fizjologicznym pH = 7,4 grupa  $\epsilon$ -aminowa jest sprotonowana. W pH poniżej  $pK_1$  sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi +2, w pH między  $pK_1$  a  $pK_2$  +1, w pH między  $pK_2$  a  $pK_3$  0 a w pH powyżej  $pK_3$  -1. Wynika z tego, że dopiero w pH powyżej 10,5 grupa  $\epsilon$ -aminowa jest elektrycznie obojętna (141).



Rycina 46. Krzywa potencjometrycznego miareczkowania lizyny, gdzie:  $pK_1 = 2,2$ ;  $pK_2 = 9,1$ ;  $pK_3 = 10,5$  (141).

Wartość stałej dysocjacji grupy  $\epsilon$ -aminowej nie zmienia się znacznie pod wpływem tworzenia wiązania peptydowego i dla związków o budowie peptydowej wynosi 10 (142).  $pK_3$  implikuje zachowanie lipopeptydów w układach dwufazowych. Skoro grupa  $\epsilon$ -aminowa w przybliżonym zakresie pH 0 – 10 jest dodatnio naładowana, to sumaryczny ładunek dodatni lipopeptydu będzie

w tym zakresie równy liczbie cząsteczek lizyny wbudowanych w hydrofilowy fragment cząsteczki. Powyższe przesłanki pozwalają domniemywać, że przedstawione na ryc. 21 – 26 zależności LogD od pH mogą być prawdopodobne. Dla wszystkich grup (1 – 6) otrzymanych lipopeptydów w zakresie pH od 0 do ok. 7,5 stwierdzono brak zależności LogD od pH. Jest to przypuszczalnie związane z pełnym protonowaniem całej populacji grup  $\epsilon$ -aminowych związków, które warunkuje stałą wartość rozpuszczalności lipopeptydów w układzie dwufazowym, w omawianym zakresie pH.

Analizując  $\text{LogD} = f(\text{pH})$  w zakresie pH 0 – 7,5 dla grup 1 – 5 lipopeptydów, można stwierdzić, że najniższe wartości LogD charakteryzują lipopeptydy, których hydrofilowy fragment cząsteczki składa się z czterech reszt lizyny. Najwyższe wartości LogD obserwowano dla lipopeptydów, których hydrofilowy fragment stanowi jedna reszta lizyny. Wartości LogD lipopeptydów z grupy 6 są zależne od długości łańcuchów hydrofobowych. Najniższe LogD zaobserwowano dla  $(\text{C}_8)_2\text{-KKKK-NH}_2$ , najwyższe zaś dla  $(\text{C}_{16})_2\text{-KKKK-NH}_2$ .

W zakresie pH od 7,5 do ok. 10,5 następuje wzrost wartości LogD wszystkich lipopeptydów. W obrębie grup 1 – 5 otrzymanych związków, nachylenie krzywej jest największe dla lipopeptydów zawierających cztery cząsteczki lizyny. Najmniej strome nachylenie krzywych obserwujemy dla lipopeptydów, których fragment hydrofilowy zbudowany jest z jednej cząsteczki lizyny (K i KG). Lipopeptydy z grupy 6 charakteryzuje jednakowe nachylenie krzywej w omawianym zakresie pH, ze względu na identyczny skład aminokwasowy hydrofilowego fragmentu cząsteczki. Wzrost LogD w zakresie od 7,5 do ok. 10,5 pH spowodowany jest najprawdopodobniej spadkiem ilości w pełni sprotonowanych grup  $\epsilon$ -aminowych lipopeptydów, co prowadzi do zmniejszenia rozpuszczalności w rozpuszczalniku polarnym.

Wartość  $\text{pK}_3$  i przebieg  $\text{LogD} = f(\text{pH})$  pozwala przypuszczać, że lipopeptydy zawierające więcej niż jedną resztę aminokwasu zasadowego, będą dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalniku polarnym układów wielofazowych w szerokim zakresie pH. Ponadto będą obdarzone ładunkiem dodatnim, który z założenia ma odpowiadać za ich aktywność przeciwdrobnoustrojową.

### 4.2. OCENA WYNIKÓW BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW

#### *OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM HEKSADEKANOWYM*

Na podstawie danych zawartych w tab. 17 – 19 stwierdzono, że lipopeptydy modyfikowane kwasem heksadekanowym wykazują wysoką aktywność mikrobiologiczną zarówno wobec szczepów bakterii Gram dodatnich G (+) jak i Gram ujemnych G (-), przy czym bardziej aktywne są w stosunku do bakterii G (+).

## Omówienie i dyskusja wyników

Najskuteczniejsze działanie hamujące wzrost bakterii zaobserwowano dla analogów zawierających więcej niż jedną resztę aminokwasu zasadowego: C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> i C<sub>16</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub>. Wykazano, że wszystkie hamują wzrost drobnoustrojów G (+) i G (-) w zakresie stężeń 4 – 16 µg/ml. Wyjątek stanowi szczep *P. vulgaris*, który jest odporny na działanie najaktywniejszych palmitynianów a wartość MIC osiąga wartość 512 µg/ml dla wszystkich analogów. Najłabsze zahamowanie wzrostu szczepów bakterii G (-) zanotowano dla lipopeptydów zawierających jeden zasadowy aminokwas: C<sub>16</sub>-K-NH<sub>2</sub> i C<sub>16</sub>-KG-NH<sub>2</sub>.

Najaktywniejsze lipopeptydy modyfikowane kwasem heksadekanowym: C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> i C<sub>16</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub> działają bójczo na bakterie G (+) i G (-) w zakresach stężeń zbliżonych do MIC, bo od 4 do 32 µg/ml. Aktywność bakteriobójcza analogów zawierających jedną lizynę: C<sub>16</sub>-K-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>16</sub>-KG-NH<sub>2</sub> jest wyraźnie niższa. Wprawdzie *S. epidermidis*, *B. subtilis* i *E. fecalis* są wrażliwe na ich działanie już przy stężeniu 4 – 64 µg/ml, ale *S. aureus* dopiero przy 512 µg/ml. W przypadku bakterii G (-) zaobserwowano dużo słabsze właściwości bójcze. Wartości MBC związków, których sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi +1 osiągają wartości zawarte w przedziale 256 - 1·10<sup>3</sup> µg/ml.

Ponadto stwierdzono, że badane związki są słabo aktywne wobec drożdżaków z rodzaju *Candida* i pleśni z rodzaju *Aspergillus*. Wskazują na to zarówno wartości MIC jak i MFC.

Spośród siedmiu analogów najlepsze właściwości hamujące wzrost drożdżaków i grzybów zanotowano dla C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>. Zarówno stężenie hamujące wzrost MIC jak i grzybobójcze MFC wynosi dla nich 128 µg/ml. Analogi zawierające w sekwencji aminokwasowej glicynę: C<sub>16</sub>-KG-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>16</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub> wykazują słabszą aktywność wobec szczepów *C. tropicalis* i *A. niger*. W przypadku lipopeptydu zawierającego jedną lizynę C<sub>16</sub>-K-NH<sub>2</sub> wykazano najniższą aktywność przeciwgrzybiczną spośród wszystkich otrzymanych palmitynianów.

W literaturze opisany jest związek C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>. Interesujące są badania przeprowadzone na modelach szczurzych, gdzie C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> wykazywał się skutecznością wobec indukowanych infekcji gronkowcowych, nie wywołując jednocześnie szkodliwych skutków ubocznych u badanych zwierząt (143; 144; 145). Kamysz i wsp. badali aktywność C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>16</sub>-KK-OH wobec Gram dodatnich ziarniaków opornych na metycylinę i wankomycynę. Badane związki wykazywały się wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec badanych szczepów oraz niewielkie działanie synergistyczne w połączeniu z amoksycyliną, imipenemem oraz wankomycyną (146).

Oznaczano również aktywność przeciwbakteryjną krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *S. aureus*. Badane związki: C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KG-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> wykazywały wysoką aktywność przeciwgronkowcową w stosunku do wszystkich badanych szczepów w tym opornych na chloramfenikol, erytromycynę i penicylinę G (147).



### OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM TETRADEKANOWYM

Na podstawie danych zawartych w tab. 20 – 22 można stwierdzić, że lipopeptydy modyfikowane kwasem tetradekanowym wykazują wysoką aktywność mikrobiologiczną wobec szczepów bakterii Gram dodatnich i średnią wobec bakterii Gram ujemnych.

Najsukutechniej hamują wzrost drobnoustrojów Gram dodatnich analogi C<sub>14</sub>-KK-NH<sub>2</sub> i C<sub>14</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>. Ich wartości MIC mieszczą się w przedziale 4 – 64 µg/ml. Spośród czterech badanych szczepów bakterii G (+), najbardziej wrażliwy jest szczep *B. subtilis* a najmniej szczep *S. aureus*. Słabszą aktywność tych lipopeptydów zaobserwowano w stosunku do bakterii G (-), spośród których *P. vulgaris* przejawiał najmniejszą wrażliwość. Uzyskana wartość MIC tego szczepu to aż 512 µg/ml.

Mirystyniany, podobnie jak palmityniany przejawiają słabszą aktywność bakteriobójczą w stosunku do bakterii G (-) niż G (+). Najbardziej aktywne bójczo okazały się analogi C<sub>14</sub>-KK-NH<sub>2</sub> i C<sub>14</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>. Najbardziej wrażliwymi na ich działanie szczepami są *B. subtilis* i *S. epidermidis*, a MBC wyznaczone dla tych drobnoustrojów zawiera się w przedziale 4 – 8 µg/ml.

Szczep *P. vulgaris* okazał się odporny na bójcze działanie wszystkich analogów modyfikowanych kwasem tetradekanowym, na co wskazuje wartość MBC powyżej 512 µg/ml.

Lipopeptydy modyfikowane kwasem tetradekanowym są średnio aktywne wobec grzybów z rodzaju *Candida* i *Aspergillus*. Najniższą wartość stężenia hamującego wzrost i grzybobójczego, które wyniosło 64 µg/ml wobec *A. niger* zanotowano w dwóch przypadkach: C<sub>14</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> i C<sub>14</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>. Wymienione związki hamują wzrost *C. albicans* i *C. tropicalis* nieco słabiej, bo w stężeniu dwa razy wyższym (128 µg/ml).

Stwierdzono, że wszystkie lipopeptydy modyfikowane kwasem tetradekanowym działają hamująco i bójczo na badane szczepy *C. albicans*, *C. tropicalis* i *A. niger* w tych samych stężeniach.

Makovitzki i wsp. otrzymali lipopeptydy złożone z cząsteczek lizyny, glicyny, alaniny, leucyny i izoleucyny acylowane kwasami dodekanowym, tetradkanowym i heksadekanowym. Do każdego z lipopeptydów wprowadzono aminokwas o konfiguracji D. Najniższe wartości MIC otrzymano dla związku C<sub>16</sub>-KGG-[D]-K-NH<sub>2</sub> jednocześnie zanotowano jego silne właściwości hemolizujące (148).

### OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM DODEKANOWYM

Na podstawie wartości MIC, MBC i MFC zawartych w tab. 23 – 25 stwierdzono, że lipopeptydy modyfikowane kwasem dodekanowym wykazują średnią lub słabą aktywność mikrobiologiczną wobec szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych.

Spśród wszystkich związków modyfikowanych kwasem dodekanowym najbardziej wyrównaną aktywnością hamującą wzrost wyróżniły się analogi zawierające jedną resztę aminokwasu zasadowego: C<sub>12</sub>-K-NH<sub>2</sub> i C<sub>12</sub>-KG-NH<sub>2</sub>. Wartość MIC wyznaczone dla tych związków w stosunku do bakterii G (+) i G (-) zawierają się w przedziale 128-256 µg/ml. Wyjątek stanowi szczep *P. vulgaris*, dla którego stężenie hamujące wzrost i bakteriobójcze wynosi 512 µg/ml. Z porównania aktywności hamującej wzrost drobnoustrojów G (+) i G (-) omawianych związków wynika brak tendencji do skuteczniejszej aktywności wobec szczepów G (+), którą obserwowano dla związków modyfikowanych kwasami heksadekanowym i tetradekanowym.

Lipopeptydy zawierające dwie i trzy reszty lizyny (C<sub>12</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>12</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>) charakteryzuje niewyrównana aktywność. Hamują wzrost *S. epidermidis* i *B. subtilis* w stężeniu 64µg/ml, ale *S. aureus* dopiero przy stężeniu 2 i 1 mg/ml odpowiednio. Rozważane wyżej związki są praktycznie nieaktywne wobec szczepów bakterii G (-).

Aktywność bójcza lipopeptydów: C<sub>12</sub>-K-NH<sub>2</sub> i C<sub>12</sub>-KG-NH<sub>2</sub> przedstawia się identycznie jak aktywność hamująca wzrost tylko dla *S. epidermidis* i *E. fecalis*. Dla szczepów *S. aureus* i *B. subtilis* zaobserwowano dwukrotny wzrost stężenia wywołującego śmierć komórki.

Lipopeptydy zawierające dwie i trzy reszty lizyny (C<sub>12</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>12</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>) nie są aktywne bakteriobójczo w stosunku do żadnego z przebadanych szczepów G (-). Najbardziej wrażliwy na działanie C<sub>12</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> okazał się szczep *P. aeruginosa*, przy czym MBC w tym przypadku sięga wartości 512 µg/ml.

Lipopeptydy modyfikowane kwasem dodekanowym słabo hamują wzrost drożdżaków z rodzaju *Candida* i kropidlaka *A. niger*. Najskuteczniej działa związek zawierający cztery lizyny C<sub>12</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, MIC dla tego związku zawiera się w zakresie 128-256 µg/ml. Prawie identyczne właściwości wykazano dla C<sub>12</sub>-K-NH<sub>2</sub>. Pozostałe analogi nie wykazywały znacznej aktywności hamującej wzrost badanych grzybów. Najlepsze wyniki minimalnego stężenia grzybobójczego zanotowano dla C<sub>12</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>. Analogi C<sub>12</sub>-K-NH<sub>2</sub> i C<sub>12</sub>-KG-NH<sub>2</sub> prezentowały identyczną aktywność grzybobójczą – 512 µg/ml.

Sarig i wsp. otrzymali lipopeptyd złożony z 3 cząsteczek lizyny i dwóch łańcuchów dodekanowych (C<sub>12</sub>-KK-C<sub>12</sub>-K-NH<sub>2</sub>), przy czym jeden z łańcuchów hydrofobowych rozdzielał fragment aminokwasowy na dwie części. Dla tego związku stwierdzono bardzo wysoką aktywność

## Omówienie i dyskusja wyników

przeciwdrobnoustrojową wobec szczepów *S. aureus* (2,5 – 5 µg/ml) i słabszą wobec *E. coli* ( $\geq 40$  µ/ml) (149).

### OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM DEKANOWYM

Na podstawie danych zawartych w tab. 26 – 28 stwierdzono, że lipopeptydy modyfikowane kwasem dekanowym charakteryzuje średnia, słaba aktywność wobec szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych lub jej brak.

Spośród przebadanych lipopeptydów najskuteczniej hamują wzrost drobnoustrojów G (+) analogi C<sub>10</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>10</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>. Średnio wrażliwe na ich działanie są szczepy *S. epidermidis* i *B. subtilis*. Szczepy *S. aureus* i *E. fecalis* pozostają odporne na ich działanie. Żaden z otrzymanych lipopeptydów modyfikowanych kwasem dekanowym nie hamował wzrostu bakterii G (-). Jedynie analog C<sub>10</sub>-K-NH<sub>2</sub> wykazywał bardzo słabą aktywność wobec szczepu *P. aeruginosa*, a wartość MIC zanotowano na poziomie 512 µg/ml.

Wszystkie analogi modyfikowane kwasem dekanowym charakteryzuje brak aktywności bakteriobójczej wobec szczepów *S. aureus* i *E. fecalis*. Szczepy *S. epidermidis* i *B. subtilis* są bardziej wrażliwe na ich działanie, w szczególności na analogi C<sub>10</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>10</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> a wartości MBC wyznaczone dla tych związków przyjmują wartości od 128 do 256 µg/ml. Badania minimalnego stężenia bakteriobójczego w stosunku do bakterii G (-) wskazują, że otrzymane analogi nie działają bójczo na żaden testowany szczep.

Lipopeptydy modyfikowane kwasem dekanowym nie hamują wzrostu drożdżaków z rodzaju *Candida* i pleśni z rodzaju *Aspergillus*. Słabą aktywność na poziomie 512 µg/ml zauważono dla związków C<sub>10</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> i C<sub>10</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub> w stosunku do *C. tropicalis*, oraz dla C<sub>10</sub>-K-NH<sub>2</sub> w stosunku do *A. niger*.

### OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM OKTANOWYM

Na podstawie danych zawartych w tab. 29 – 31 stwierdzono, że lipopeptydy modyfikowane kwasem oktanowym są nieaktywne wobec szczepów bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych.

Spośród siedmiu otrzymanych analogów jedynie dla C<sub>8</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> i C<sub>8</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> zauważono działanie hamujące wzrost bakterii G (+) dla szczepu *S. epidermidis* na poziomie 256 µg/ml.

## Omówienie i dyskusja wyników

Dodatkowo C<sub>8</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> hamował wzrost *B. subtilis* w stężeniu 512 µg/ml. Szczepy *S. aureus* i *E. fecalis* nie były wrażliwe na ich działanie.

Wszystkie przebadane szczepy bakterii G (-) wykazywały się odpornością na działanie hamujące wzrost otrzymanych lipopeptydów modyfikowanych kwasem oktanowym.

Badania minimalnego stężenia bakteriobójczego wskazały, że jedynie analog C<sub>8</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> działał bójczo na szczep *S. epidermidis* w stężeniu 512 µg/ml. Pozostałe analogi nie działały bakteriobójczo na szczepy bakterii Gram dodatnich ani Gram ujemnych.

Żaden z otrzymanych związków nie hamował wzrostu testowanych szczepów drożdżaków *C. albicans* i *C. tropicalis* oraz pleśni *A. niger*. Ponadto ani jeden z analogów modyfikowanych kwasem oktanowym nie działał bójczo na badane szczepy grzybów. Wskazują na to bardzo wysokie wartości MIC i MFC.

### OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ LIPOPEPTYDÓW ZAWIERAJĄCYCH DWA ŁAŃCUCZY HYDROFOBOWE

Na podstawie danych zawartych w tab. 32 – 34 stwierdzono, że lipopeptydy złożone z czterech zasadowych aminokwasów, acylowane różnymi kwasami tłuszczowymi w dwóch pozycjach α i ε pierwszej lizyny w sekwencji (oktanowym, dekanowym, dodekanowym, tetradekanowym i heksadekanowym), charakteryzuje zróżnicowana aktywność przeciwdrobnoustrojowa.

Spośród pięciu otrzymanych lipopeptydów najaktywniejsze są analogi (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> oraz (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>. Hamują one wzrost *B. subtilis* już przy stężeniu 2 µg/ml a *S. epidermidis* przy 2 i 4 µg/ml odpowiednio. Nieco słabiej hamują wzrost *E. fecalis* i *S. aureus* bo w zakresie stężeń 8 – 16 µg/ml. Stwierdzono też, że związki modyfikowane kwasami oktanowym, tetradekanowym i heksadekanowym mają zdecydowanie niższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec przebadanych szczepów referencyjnych. Stężenie hamujące wzrost bakterii G (+) zawiera się dla nich w zakresie od 64 do 512 µg/ml.

Analogi (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> oraz (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> są również aktywne w stosunku bakterii G (-). Hamują wzrost *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* w zakresie stężeń 16 – 64 µg/ml. Jedynie szczep *P. vulgaris* jest słabo wrażliwy na ich działanie. Pozostałe analogi: (C<sub>8</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, (C<sub>14</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> i (C<sub>16</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> są słabo aktywne wobec wszystkich szczepów testowanych bakterii G (-). Wartości MIC dla tych związków zawierają się w przedziale od 256 do 512 µg/ml.

Aktywność bójcza analogów (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> i (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> również jest wysoka i wobec szczepów *S. epidermidis* i *B. subtilis* wynosi od 2 do 4 µg/ml. Ponadto wykazują nieco słabsze działanie bakteriobójcze w stosunku do bakterii G (-), bo w zakresie od 16 do 128 µg/ml.

## Omówienie i dyskusja wyników

*P. vulgaris* jest odporny na działanie bójcze tych lipopeptydów. Dla pozostałych analogów wykazano słabą aktywność bakteriobójczą zarówno w stosunku do bakterii G (+) jak i G (-).

Aktywność badanych związków wobec grzybów jest zdecydowanie niższa niż wobec bakterii. Najskuteczniejszym związkiem jest (C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>, ale i tak jego wartości MIC i MFC nie spadają poniżej 128 µg/ml. Nieco słabiej aktywne wobec grzybów okazały się analogi (C<sub>8</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> i (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>. Oba hamują wzrost *C. albicans* w stężeniu 256 µg/ml. (C<sub>8</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> hamuje wzrost *A. niger* w stężeniu 128 µg/ml a (C<sub>12</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> przy 256 µg/ml. Aktywność hamująca wzrost drobnoustrojów charakteryzująca pozostałe związki jest słaba i zawiera się w przedziale 256 – 512 µg/ml.

Z przeprowadzonych badań mikrobiologicznych wynika, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa otrzymanych lipopeptydów zależy zarówno od długości hydrofobowego łańcucha jak też od składu aminokwasowego hydrofilowego fragmentu cząsteczki. Najaktywniejsze przeciwdrobnoustrojowo okazały się analogi modyfikowane kwasem heksadekanowym, najslabiej aktywne były lipopeptydy modyfikowane kwasem oktanowym. Ponadto można zaobserwować, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa lipopeptydów zależy od ilości reszt lizyny w cząsteczce. Analogi z jednym kationowym aminokwasem są słabo aktywne, za to te zawierające dwie lizyny można zaliczyć do bardzo aktywnych. Przyłączenie kolejnych reszt lizynowych podnosi aktywność lipopeptydu ale nieznacznie. C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> jest prawie tak samo aktywny jak C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> czy C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub>.

Podsumowując uzyskane wartości MIC dla otrzymanych lipopeptydów kationowych, porównano je z wartościami minimalnego stężenia hamującego wzrost dla konwencjonalnych środków konserwujących. W tab. 64 przedstawiono wartości MIC dla wybranych środków konserwujących wobec referencyjnych szczepów bakterii G (+), G (-) oraz drożdżaków i pleśni.

**Tabela 64.** Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wybranych środków konserwujących (109).

Środek konserwujący	Minimalne stężenie hamujące wzrost MIC [µg/ml]					Optymalne pH
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>	
Alkohol benzylowy	25	2000	2000	2500	5000	<5
Chlorobutanol	650	1000		2500	5000	<5,5
Paraben M	2000	1000	4000	2000	1000	4-8
Paraben P	500	100-500	>1000	250	200-500	4-8
Fenoksyetanol	8500	3600	3200	5400	3300	<7
Tiomersal	0,2	4	8	32	128	7-8

Z danych zawartych w tab. 64 wynika, że klasyczne środki konserwujące charakteryzuje bardzo wysoka wartość MIC. Wyjątek stanowi tiomersal, który hamuje wzrost *S. aureus* już w stężeniu 0,2 µg/ml. Wybrane lipopeptydy modyfikowane kwasami heksadekanowym i tetradekanowym oraz zawierające dwa łańcuchy hydrofobowe mają zdecydowanie lepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe, na co wskazują ich niskie wartości MIC i MBC.

### 4.3. OCENA WYNIKÓW BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI HEMOLITYCZNYCH OTRZYMANYCH LIPOPEPTYDÓW

W tab. 35 – 40 przedstawiono wyniki badań właściwości hemolitycznych otrzymanych lipopeptydów kationowych. Aktywność lityczna wobec erytrocytów ludzkich obrazuje stopień toksyczności lipopeptydów wobec komórek organizmów eukariotycznych.

Analogi lipopeptydowe z grupy 1 wykazują dość silne działanie hemolityczne. W przypadku tej grupy związków można zaobserwować silną zależność wartości MHC od budowy hydrofilowej głowy lipopeptydu. Związkiem najbardziej aktywnym hemolitycznie jest analog, którego sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi +4, MHC dla tego związku jest równe 16 µg/ml. W przypadku analogu C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> zanotowano MHC na poziomie 32 µg/ml. W badanej grupie związków występują trzy, których sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi +2, są to C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> i C<sub>16</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub>. Spośród nich najmniej toksyczny okazał się C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, bo MHC tego związku wyniosło 256 µg/ml. Pozostałe dwa związki działają litycznie na krwinki czerwone w stężeniu równym 64 µg/ml. Najniższą aktywność hemolizującą wykazywał związek, którego hydrofilowa głowa zbudowana jest z jednego aminokwasu C<sub>16</sub>-K-NH<sub>2</sub>.

Lipopeptydy z grupy 2 wykazują zróżnicowaną aktywność hemolizującą. Najsilniejsze działanie destrukcyjne na ludzkie erytrocyty wykazano dla dwóch analogów C<sub>14</sub>-KK-NH<sub>2</sub> i C<sub>14</sub>-KGK-NH<sub>2</sub>. Doprowadzają do lizy krwinek czerwonych już przy stężeniu 128 µg/ml. Analogi zawierające 3 i 4 reszty zasadowego aminokwasu powodują lizę erytrocytów w stężeniu wyższym, bo dopiero przy 256 µg/ml. Najmniej toksyczne są analogi, których głowa hydrofilowa zawiera jeden zasadowy aminokwas oraz analog C<sub>14</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub>. Zakres MHC tych związków to 512 - 1·10<sup>3</sup> µg/ml.

Lipopeptydy z grupy 3 wykazują niską aktywność hemolityczną. Najwyższą aktywność hemolizującą zaobserwowano dla analogu C<sub>12</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub>. MHC tego związku wynosi 256 µg/ml. Analog zawierający trzy reszty zasadowego aminokwasu działa hemolitycznie w niższym stężeniu (512 µg/ml) niż analog zawierający cztery reszty lizyny (1·10<sup>3</sup> µg/ml). Najmniej aktywny jest analog zawierający dwie reszty aminokwasu zasadowego C<sub>12</sub>-KK-NH<sub>2</sub>. W jego przypadku nie zauważono hemolizy nawet w stężeniu równym 4·10<sup>3</sup> µg/ml.

Stężenie lipopeptydów z grupy 4, równe 4·10<sup>3</sup> µg/ml, nie wywołuje lizy erytrocytów ludzkich. Wyjątek stanowi analog C<sub>10</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, który w odróżnieniu od pozostałych działa hemolizująco

## Omówienie i dyskusja wyników

w stężeniu równym  $4 \cdot 10^3 \mu\text{g/ml}$ . Skład aminokwasowy analogów nie ma wpływu na aktywność lityczną otrzymanych lipopeptydów.

Analogi lipopeptydowe z 5 grupy zachowują się w stosunku do erytrocytów ludzkich podobnie jak te modyfikowane kwasem dekanowym. Dla wszystkich siedmiu otrzymanych związków stężenie wywołujące hemolizę przewyższa wartość  $4 \cdot 10^3 \mu\text{g/ml}$ . Na aktywność lipopeptydów modyfikowanych kwasem oktanowym nie ma wpływu liczba ani rodzaj aminokwasów tworzących hydrofilowe fragmenty związków.

Lipopeptydy z grupy 6 charakteryzują się zróżnicowanymi właściwościami hemolizującymi. Spośród pięciu otrzymanych lipopeptydów najbardziej toksyczny okazał się związek, który zawiera reszty kwasu dodekanowego, a jego wyznaczona wartość MHC wynosi  $16 \mu\text{g/ml}$ . Nieco słabsze właściwości hemolityczne zaobserwowano dla lipopeptydów zawierających dwa łańcuchy heksadekanowe i dekanowe. Lizę erytrocytów w ich przypadku zaobserwowano w stężeniu  $32 \mu\text{g/ml}$ . W przypadku analogu zawierającego dwa łańcuchy oktanowe hemolizę zauważono dopiero w stężeniu przewyższającym  $512 \mu\text{g/ml}$ .

Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywność hemolityczna lipopeptydów wzrasta wraz z długością łańcucha hydrofobowego. Spośród lipopeptydów z grup 1 – 5 największą aktywność hemolityczną zaobserwowano dla lipopeptydów modyfikowanych kwasem heksadekanowym, zaś dla lipopeptydów zawierających fragment kwasu oktanowego nie zaobserwowano hemolizy nawet przy stężeniu równym  $4 \cdot 10^3 \mu\text{g/ml}$ . Ponadto w obrębie 1 grupy lipopeptydów zauważono silną zależność aktywności hemolitycznej od składu aminokwasowego hydrofilowego fragmentu cząsteczki. Związki obdarzone większym ładunkiem dodatnim były bardziej toksyczne wobec erytrocytów ludzkich.

### 4.4. OCENA WYNIKÓW BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH WYBRANYCH LIPOPEPTYDÓW

Ocenie właściwości powierzchniowo czynnych poddano 19 najaktywniejszych przeciwdrobnoustrojowo spośród 40 otrzymanych lipopeptydów, czyli: modyfikowane kwasem heksadekanowym (1 grupa) i tetradekanowym (2 grupa) oraz lipopeptydy zawierające dwa łańcuchy hydrofobowe (6 grupa).

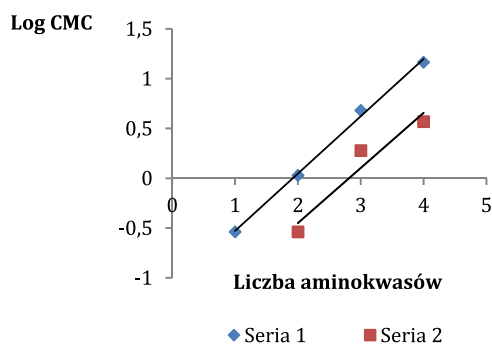
W tab. 41 – 47 zamieszczono statystyczną analizę wyników pomiarów zależności napięcia powierzchniowego od stężenia analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadekanowym, w tab. 49 – 55 tetradekanowym i w tab. 57 – 61 zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe.

## Omówienie i dyskusja wyników

Z badań istotności współczynników  $a$  i  $r$  równań regresji, wyznaczonych w zakresie powyżej CMC wynika, że  $\alpha_{\text{gran.}}$  jest we wszystkich przypadkach większe od przyjętego poziomu istotności  $\alpha = 0,01$ . Nie ma zatem podstaw do odrzucenia postawionej  $H_0: a = 0, r = 0$ , dlatego przebieg prostej powyżej CMC uznano za stały i niezależny od stężenia lipopeptydu.

### *OCENA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM HEKSADKANOWYM*

Z przebiegu izoterm napięcia powierzchniowego wodnych roztworów lipopeptydów z 1 grupy, których hydrofilowy fragment zbudowany jest z cząsteczek lizyny, przedstawionych na ryc. 27 – 30 oraz danych przedstawionych w tab. 48 wynika, że aktywność powierzchniowa na granicy faz powietrze/woda zależy od składu aminokwasowego tego fragmentu. Najniższą wartość CMC uzyskano dla związku  $C_{16}\text{-K-NH}_2$  (0,29 mmol/l). Wartość CMC wzrasta wraz z ilością aminokwasów wbudowanych w hydrofilową głowę lipopeptydu. Najwyższą wartość CMC (14,6 mmol/l) wyznaczono dla  $C_{16}\text{-K-K-K-K-NH}_2$ . Podobną zależność zaobserwowano dla lipopeptydów modyfikowanych kwasem heksadkanowym, których hydrofilowy fragment zbudowany jest z cząsteczek lizyny i glicyny (ryc. 31 – 33). Najniższą wartość CMC zanotowano dla  $C_{16}\text{-K-G-NH}_2$  (0,29 mmol/l). Najwyższą wartość CMC (3,7 mmol/l) zanotowano dla  $C_{16}\text{-K-G-K-G-NH}_2$ . Na ryc. 47 przedstawiono zależność Log CMC od liczby aminokwasów tworzących hydrofilowy fragment cząsteczki surfaktantu.



Rycina 47. Zależność Log CMC od liczby aminokwasów wbudowanych w hydrofilowy fragment lipopeptydów modyfikowanych kwasem heksadkanowym. Seria 1 przedstawia zależność dla lipopeptydów, których hydrofilowy fragment zbudowany jest tylko z cząsteczek lizyny, seria 2 przedstawia zależność dla lipopeptydów, których hydrofilowy fragment zbudowany jest z cząsteczek lizyny i glicyny.

Z wykresu wynika liniowa zależność Log CMC od ilości aminokwasów tworzących hydrofilowy fragment lipopeptydów 1 grupy. W miarę wzrostu ilości aminokwasów wzrasta też krytyczne stężenie micelarne. Tadros T.F. podaje, że dla wszystkich surfaktantów jonowych obserwuje się spadek CMC wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego (8). Tendencja otrzymanych



lipopeptydów, obserwowana w seriach 1 i 2 może wynikać zatem z faktu, że wraz ze zwiększaniem się wielkości głowy surfaktantu jego ogon ulega relatywnemu skróceniu, co wpływa na zwiększenie wartości krytycznego stężenia micelnego. Brito i wsp. również zauważyli, że dla surfaktantów lipopeptydowych, których hydrofilowy fragment stanowią reszty seryny i tyrozyny, wartość CMC spada wraz z długością przyłączonego łańcucha hydrofobowego (150).

Parametr efektywności obniżania napięcia powierzchniowego informuje, do jakiej wartości badany surfaktant obniża napięcie powierzchniowe na granicy faz powietrze/woda w punkcie krytycznego stężenia micelnego. Im  $\sigma_{CMC}$  ma mniejszą wartość tym  $\Pi_{CMC}$  większe, więc układ charakteryzuje się lepszą skutecznością obniżania napięcia powierzchniowego.

W przypadku lipopeptydów z 1 grupy, których hydrofilowy fragment zbudowany jest tylko z cząsteczek lizyny, efektywność spada (tab. 48) wraz ze wzrostem ilości aminokwasów wchodzących w jego skład. Najbardziej efektywny jest  $C_{16}\text{-K-NH}_2$ , obniża napięcie powierzchniowe wody do 36,5 mN/m, zaś najmniej efektywny  $C_{16}\text{-K-K-K-K-NH}_2$ , do 50,9 mN/m. Takie zachowanie lipopeptydów można wytłumaczyć wzrastającą hydrofilowością cząsteczki. Traktując fazę wodną jako fazę polarną a powietrze jako fazę niepolarną, związki bardziej hydrofilowe będą wykazywały silniejszą tendencję do przebywania „wewnątrz” fazy wodnej. Mniej hydrofilowe chętniej będą przemieszczały się w kierunku fazy niepolarniej – powietrza. Stąd ich lepsza efektywność w obniżaniu napięcia powierzchniowego. Dla lipopeptydów, których głowa hydrofilowa zbudowana jest z reszt lizyny i glicyny zaobserwowano taką samą tendencję. Najbardziej efektywny okazał się  $C_{16}\text{-KG-NH}_2$  ( $\sigma_{CMC} = 40,8$  mN/m), najmniej zaś  $C_{16}\text{-KGKG-NH}_2$  ( $\sigma_{CMC} = 47,6$  mN/m).

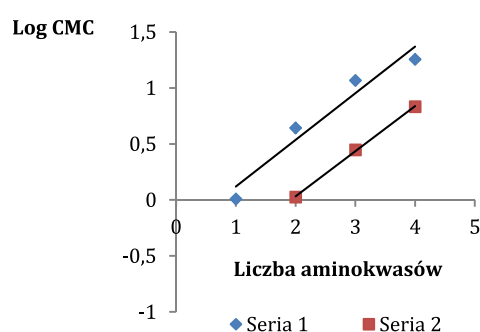
Parametr sprawności obniżania napięcia powierzchniowego ( $pC_{20} = -\log c$ ) przedstawiony w tab. 48 również pozwala ocenić aktywność powierzchniową. Określa się ją jako całkowite stężenie surfaktantu, niezbędne do obniżenia napięcia powierzchniowego o 20 mN/m.  $pC_{20}$  dla lipopeptydów zawierających w hydrofilowym fragmencie jedynie cząsteczki lizyny spada wraz z ilością przyłączonych reszt aminokwasowych. Najwyższą wartość ( $pC_{20} = 3,40$ ) zaobserwowano dla  $C_{16}\text{-K-NH}_2$ , najniższą zaś ( $pC_{20} = 1,88$ ) dla  $C_{16}\text{-K-K-K-K-NH}_2$ . Dla lipopeptydów, których głowa hydrofilowa zbudowana jest z reszt lizyny i glicyny zaobserwowano identyczną zależność parametru  $pC_{20}$  od składu aminokwasowego związku. Najwyższą wartość ( $pC_{20} = 3,95$ ) zaobserwowano dla  $C_{16}\text{-KG-NH}_2$ , najniższą zaś ( $pC_{20} = 2,55$ ) dla związku  $C_{16}\text{-KGKG-NH}_2$ .

### *OCENA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH LIPOPEPTYDÓW MODYFIKOWANYCH KWASEM TETRADEKANOWYM*

Ocena przebiegu izoterm napięcia powierzchniowego wodnych roztworów lipopeptydów z 2 grupy przedstawionych na ryc. 34 – 40 i w tab. 56, pozwala stwierdzić, że aktywność powierzchniowa tych związków zależy od składu aminokwasowego ich hydrofilowej głowy.

## Omówienie i dyskusja wyników

Podobną zależność zaobserwowano dla lipopeptydów modyfikowanych kwasem heksadekanowym. Najniższą wartość krytycznego stężenia micelnarnego wyznaczono dla związku  $C_{14}\text{-K-NH}_2$  (1,02 mmol/l), którego fragment hydrofilowy cząsteczki stanowi jedna reszta aminokwasu zasadowego. Najwyższą wartość CMC zanotowano dla  $C_{14}\text{-K-K-K-K-NH}_2$  (18,04 mmol/l), którego hydrofilowa głowa zbudowana jest z czterech reszt lizyny. Identyczną zależność zaobserwowano dla lipopeptydów modyfikowanych kwasem tetradekanowym, których hydrofilowa głowa zbudowana jest z cząsteczek lizyny i glicyny. Najniższą wartość CMC zanotowano dla  $C_{14}\text{-K-G-NH}_2$  (1,06 mmol/l). Najwyższą wartość CMC (6,9 mmol/l) zanotowano dla  $C_{14}\text{-K-G-K-G-NH}_2$ . Na ryc. 48 przedstawiono zależność Log CMC od liczby aminokwasów tworzących hydrofilowy fragment cząsteczki surfaktantu.



Rycina 48. Zależność Log CMC od liczby aminokwasów wbudowanych w hydrofilowy fragment lipopeptydów modyfikowanych kwasem tetradekanowym. Seria 1 przedstawia zależność dla lipopeptydów, których hydrofilowy fragment zbudowany jest tylko z cząsteczek lizyny, seria 2 przedstawia zależność dla lipopeptydów, których hydrofilowy fragment zbudowany jest z cząsteczek lizyny i glicyny.

Z wykresu wynika liniowa zależność Log CMC od ilości aminokwasów tworzących hydrofilową głowę lipopeptydów modyfikowanych kwasem tetradekanowym. Tendencja ta może mieć związek faktem, że wraz ze wzrostem wielkości fragmentu hydrofilowego surfaktantu jego hydrofobowy fragment ulega relatywnemu skróceniu. Perez i wsp. otrzymali estry metylowe  $\epsilon$ -acylowanych surfaktantów lipopeptydowych, których hydrofilowy fragment stanowiła reszta lizyny. Zauważyli liniowy spadek CMC wraz z wydłużaniem fragmentu hydrofobowego cząsteczki (151).

Efektywność obniżania napięcia powierzchniowego  $\sigma_{CMC}$ , charakteryzująca mirystyniany (tab. 56) spada wraz ze wzrostem wielkości fragmentu hydrofilowego. Zależność ta analogicznie przedstawia się dla palmitynianów. Najbardziej efektywnie napięcie powierzchniowe wody obniża  $C_{14}\text{-K-NH}_2$  (38,1 mN/m), najmniej zaś  $C_{14}\text{-K-K-K-K-NH}_2$  (50,4 mN/m). Dla lipopeptydów, których głowa hydrofilowa zbudowana jest z reszt lizyny i glicyny zaobserwowano identyczną tendencję. Najbardziej efektywny okazał się  $C_{14}\text{-K-G-NH}_2$  (41,2 mN/m), najmniej zaś  $C_{14}\text{-K-G-K-G-NH}_2$  (48,0 mN/m).

Parametr  $pC_{20}$  przedstawiony w tab. 56 dla lipopeptydów zawierających w hydrofilowym fragmencie jedynie cząsteczki lizyny spada wraz z ilością przyłączonych reszt aminokwasowych.

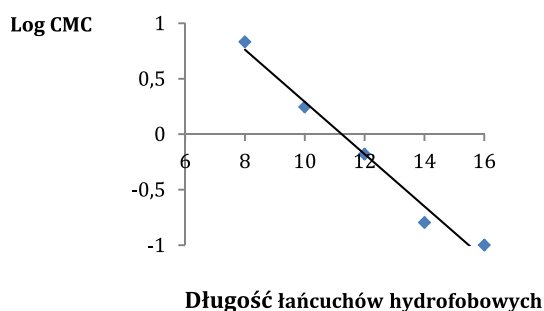
## Omówienie i dyskusja wyników

Najwyższą wartość (3,64) zaobserwowano dla  $C_{14}$ -K-NH<sub>2</sub>, najniższą zaś (1,81) dla  $C_{16}$ -K-K-K-K-NH<sub>2</sub>. Z kolei dla lipopeptydów, których głowa hydrofilowa zbudowana jest z reszt lizyny i glicyny zaobserwowano identyczną zależność parametru  $pC_{20}$  od składu aminokwasowego związku. Najwyższą wartość (3,46) zaobserwowano dla  $C_{14}$ -KG-NH<sub>2</sub> a najniższą (2,28) dla  $C_{14}$ -KGKG-NH<sub>2</sub>.

### *OCENA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH LIPOPEPTYDÓW ZAWIERAJĄCYCH DWA ŁAŃCUCZY HYDROFOBOWE*

Przebieg izoterm napięcia powierzchniowego na granicy faz powietrze/woda wodnych roztworów lipopeptydów zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe, przedstawiony na ryc. 41 – 45 oraz dane z tab. 62 pozwalają wnioskować, że aktywność powierzchniowa tych związków zależy od długości przyłączonych łańcuchów hydrofobowych.

Najniższą wartość CMC wyznaczono dla związku  $(C_{16})_2$ -K-K-K-K-NH<sub>2</sub> (0,11 mmol/l), najwyższą zaś dla  $(C_8)_2$ -K-K-K-K-NH<sub>2</sub> (6,80 mmol/l). Na ryc. 49 przedstawiono liniową zależność LogCMC od długości łańcuchów tłuszczowych tworzących hydrofobowy fragment cząsteczki lipopeptydu. Podobną zależność dla kationowych bromków amonowych z dwoma łańcuchami alkilowymi zaobserwował Haas S. i Hoffmann H. (152).



Rycina 49. Zależność Log CMC od długości łańcuchów hydrofobowych dla lipopeptydów zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe.

Efektywność badanych lipopeptydów zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe maleje wraz ze wzrostem ich długości. Najmniej efektywny (46,5 mN/m) okazał się analog  $(C_{16})_2$ -K-K-K-K-NH<sub>2</sub> najbardziej zaś  $(C_8)_2$ -K-K-K-K-NH<sub>2</sub> (43,6 mN/m).

Parametr  $pC_{20}$ , przedstawiony w tab. 62 dla lipopeptydów z 6 grupy, wzrasta wraz z długością przyłączonych reszt kwasów tłuszczowych. Najwyższą wartość (4,15) zaobserwowano dla  $(C_{16})_2$ -K-K-K-K-NH<sub>2</sub> a najniższą (2,48) dla  $(C_8)_2$ -K-K-K-K-NH<sub>2</sub>.

## 5. PODSUMOWANIE

Z przeprowadzonych badań mikrobiologicznych wynika, że najwyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową charakteryzują się związki, których ładunek cząsteczki jest większy niż +1, np. C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>. Ładunek  $\geq +2$  jest warunkiem koniecznym lecz niewystarczającym. Przykładowo w gr. 5 lipopeptydów występują takie, które obdarzone są ładunkiem  $\geq +2$  a mimo to nie są aktywne. Zatem drugim warunkiem, który powinien być spełniony, jest odpowiednia proporcja między hydrofilowym a hydrofobowym fragmentem cząsteczki. Wyrazem tego stosunku jest HLB. Obliczone wartości HLB najaktywniejszych lipopeptydów z gr. 1 i nieaktywnych z gr. 5 o identycznej budowie fragmentu hydrofilowego (KK, KKK, KKKK) mieszczą się w zbliżonych zakresach 18,6 – 35,4 i 22,4 – 39,3 odpowiednio, zatem zależności tego parametru z aktywnością przeciwdrobnoustrojową nie znaleziono.

Innym parametrem charakteryzującym właściwości hydrofilowo-lipofilowe jest LogP. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa zależy od lipofilowości cząsteczki. Zauważono, że aby związek wykazywał wysoką aktywność (2 – 16  $\mu\text{g/ml}$ ) powinien charakteryzować się wartością LogP  $\geq 2,5$ . Tak jest m.in. w przypadku lipopeptydów z 1 grupy: C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>. Lipopeptydy z 5 grupy charakteryzują niskie wartości LogP, często mniejsze niż 1. Jednak w fizjologicznym pH, lipopeptydów nie można uznać za lipofilowe, obdarzone są bowiem ładunkiem dodatnim w zakresie pH 0 – 7,5. Stąd dla większości z nich LogD przyjmuje wartości ujemne. Lipofilowy charakter cząsteczki aktywnego przeciwdrobnoustrojowo lipopeptydu ujawnia się najprawdopodobniej dopiero w zetknięciu z błoną patogenu. Ujemnie naładowane elementy błony komórkowej bakterii G (+) i G (-) mogą oddziaływać elektrostatycznie z kationowymi lipopeptydami, w wyniku czego może dochodzić do wzajemnej neutralizacji ładunków. Obojętny elektrycznie (lipofilowy) lipopeptyd prawdopodobnie w ten sposób indukuje defekty (szczeliny) w błonie komórkowej drobnoustroju, które zaburzają jej przepuszczalność i w efekcie niszczą mikroorganizm. Lipopeptydy wysoce aktywne przeciwdrobnoustrojowo wykazywały też aktywność hemolityczną. Wyznaczone wartości MHC odpowiednich lipopeptydów (np. C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub>, C<sub>16</sub>-KKK-NH<sub>2</sub>) były jednak generalnie wyższe od ich MIC i MBC. Jest to najprawdopodobniej związane z występowaniem słabszych oddziaływań z elektrycznie obojętną błoną komórek eukariotycznych.

Wyznaczone wartości CMC lipopeptydów z grup 1, 2 i 6 wskazują na brak zależności z MIC, MBC i MFC. Lipopeptydy o ładunku  $\geq +2$  z wymienionych grup działają przeciwdrobnoustrojowo w stężeniach dużo niższych niż CMC. Można zatem przypuszczać, że formowanie przez lipopeptydy większych agregatów nie jest obligatoryjne w kontekście ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

## 6. WNIOSKI

1. W ramach pracy otrzymano 40, w większości nieopisanych związków o budowie lipopeptydowej. Wszystkie lipopeptydy sporządzono metodą syntezy na nośniku stałym z zastosowaniem strategii Fmoc/tBu.

2. Na podstawie budowy strukturalnej lipopeptydów obliczono ich wartość bilansu hydrofobowo-lipofilowego, która zawierała się w przedziale od 10,1 do 39,3. Obliczone wartości HLB pozwalają na klasyfikację poszczególnych związków lipopeptydowych jako potencjalne substancje powierzchniowo czynne o właściwościach emulgujących i solubilizujących.

3. Na podstawie obliczonych teoretycznie wartości współczynnika podziału n-oktanol/woda można stwierdzić, że dla niektórych lipopeptydów wartość ta jest zbliżona do powszechnie stosowanych w technologii farmaceutycznej środków konserwujących, np. parabenu M i P, fenoksyetanolu czy chlorku benzalkoniowego.

Wyznaczone wartości współczynnika dystrybucji wskazują, że lipopeptydy zawierające więcej niż jedną resztę aminokwasu zasadowego, będą dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalniku polarnym układów wielofazowych w szerokim zakresie pH (1 – 7,5), ponadto będą obdarzone sumarycznym ładunkiem dodatnim, który odpowiada za ich aktywność przeciwdrobnoustrojową.

4. Wyznaczone doświadczalnie wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost, minimalnego stężenia bakteriobójczego i minimalnego stężenia grzybobójczego wskazują na znaczną aktywność przeciwdrobnoustrojową lipopeptydów modyfikowanych kwasem heksadekanowym i tetradekanowym oraz zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe. Przykładowo związki:  $C_{16}$ -KK-NH<sub>2</sub>,  $C_{16}$ -KKK-NH<sub>2</sub> i  $C_{16}$ -KKKK-NH<sub>2</sub> oraz  $(C_{10})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> i  $(C_{12})_2$ -KKKK-NH<sub>2</sub> charakteryzują się dużo niższymi wartościami MIC, niż większość powszechnie stosowanych, konwencjonalnych środków konserwujących.

Lipopeptydy modyfikowane kwasem heksadekanowym i tetradekanowym oraz zawierające dwa łańcuchy hydrofobowe wykazują wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do bakterii Gram dodatnich niż Gram ujemnych i grzybów.

Stwierdzono też, że analogi modyfikowane kwasem dodekanowym, dekanowym i oktanowym charakteryzują się słabą aktywnością przeciwdrobnoustrojową lub jej brakiem.

5. Wyznaczone doświadczalnie wartości minimalnego stężenia wywołującego hemolizę erytrocytów ludzkich dla otrzymanych lipopeptydów wskazują, że właściwościami hemolitycznymi obdarzone są związki modyfikowane kwasem heksadekanowym i tetradekanowym oraz zawierające dwa łańcuchy hydrofobowe. Stwierdzono jednak, że często działają one litycznie na erytrocyty ludzkie w stężeniach wyższych niż minimalne stężenie hamujące wzrost i minimalne stężenie bakteriobójcze.
6. Na podstawie wyznaczonego krytycznego stężenia micelnego analogów lipopeptydowych modyfikowanych kwasem heksadekanowym i tetradekanowym oraz zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe można stwierdzić, że wartość krytycznego stężenia micelnego zależy od składu aminokwasowego hydrofilowego fragmentu cząsteczki oraz od długości łańcucha hydrofobowego.
7. Zbadano efektywność obniżania napięcia powierzchniowego dla 19 najaktywniejszych przeciwdrobnoustrojowo lipopeptydów, tj.: modyfikowanych kwasem heksadekanowym i tetradekanowym oraz zawierających dwa łańcuchy hydrofobowe. Stwierdzono, że lipopeptydy modyfikowane kwasem heksadekanowym i tetradekanowym posiadają podobną efektywność obniżania napięcia powierzchniowego. Lipopeptydy zawierające dwa łańcuchy hydrofobowe są mniej efektywne.
8. Niektóre spośród nowo otrzymanych związków o budowie lipopeptydowej spełniają zakładane dla nich na etapie projektowania struktur parametry, tj. odpowiednio wysokie właściwości przeciwdrobnoustrojowe i zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego.

## PIŚMIENNICTWO

1. **Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M.** *Farmacja Stosowana*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2002.
2. **Sawicki W., Łeppek P., Kleina M.** Otoczki na tabletkach i peletkach - budowa, funkcja, mechanizm i metody powlekania. *Farm. Pol.* 2010, Tom 66, 5.
3. **Mazgalski J., Sawicki W.** Nowoczesne metody powlekania tabletek i kapsułek otoczkami polimerowymi. [red.] Jelińska A., Zając M. Grześkowiak E. *Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych*. Poznań: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2010.
4. **Sawicki W., Makulec A.** Badania preformulacyjne w procesie powlekania otoczkami polimerowymi. *Farm. Pol.* 2009, Tom 65, 4.
5. **Szymańska E., Winnicka K.** Mikrosfery – nowoczesna postać leku do oczu o kontrolowanym uwalnianiu. *Farm. Pol.* 2009, Tom 65, 5.
6. **Wulf M., Uhlmann P., Michel S., Grundke K.** Surface tension studies of leveling additives in powder coatings. *Prog. Org. Coat.* 2000, Tom 38, 2.
7. **Owens D.K., Wendt R.C.** Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polymer Sci.* 2003, Tom 13, 8.
8. **Tadros T.F.** *Applied Surfactants. Principles and Applications*. Weinheim: Wiley, 2005.
9. **Bierwagen G.P.** Surface defects and surface flows in coatings. *Prog. Org. Coat.* 1991, Tom 19, 1.
10. **Wen H., Park K.** *Oral controlled release formulation design and drug delivery. Theory and practise*. New Jersey: Wiley, 2010.
11. **Janicki S., Sznitowska M., Zieliński W.** *Dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna leków*. Warszawa : Ośrodek Informacji Naukowej "Polfa" Sp. z o.o., 2001.
12. **Bajerski L., Rossi R.C., Dias C.L., Bergold A.M., Fröhlich P.E.** Development and validation of a discriminating in vitro dissolution method for a poorly soluble drug, olmesartan medoxomil: comparison between commercial tablets. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2010, Tom 11, 2.
13. **Lee H., Park S., Sah H.** Surfactant effects upon dissolution patterns of carbamazepine. *Arch. Pharm. Res.* 2005, Tom 28, 1.
14. **Brown C.K., Chokshi H.P., Nickerson B., Reed R.A.** Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. *Pharm. Techn.* 2004, December.
15. **Mackie A., Macierzanka A.** Colloidal aspects of protein digestion. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2010, Tom 15, 1-2.
16. **McConnell E.L., Fadda H.M., Basit A.W.** Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2008, Tom 364, 2.

17. **Shah V.P., Noory A., Noory C., McCullough B., Clarke S., Everett R., Naviasky H., Srinivasan B.N., Fortman D., Skelly J.P.** In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. *Int. J. Pharm.* 1995, Tom 125, 1.
18. **Rosen M.J.** *Surfactants and interfacial phenomena*. New Jersey: Wiley, 2004.
19. **Zieliński R.** *Surfaktanty, budowa, właściwości, zastosowania*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, 2009.
20. **Rangel-Yagui C.O., Pessoa A. Jr, Tavares L.C.** Micellar solubilization of drugs. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2005, Tom 8, 2.
21. **Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N., Garcia-Celma M.J.** Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2005, Tom 10, 3-4.
22. **Delmas T., Piraux H., Couffin A.C., Texier I., Vinet F., Poulin P., Cates M.E., Bibette J.** How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. *Langmuir*. 2011, Tom 27, 5.
23. **Sznitowska M., Janicki S., Dabrowska E.A., Gajewska M.** Physicochemical screening of antimicrobial agents as potential preservatives for submicron emulsions. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002, Tom 15, 5.
24. **Pertkiewicz M.** *Standardy żywienia pozajelitowego i żywienia dojelitowego*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2005.
25. **Gonyon T., Patel P., Owen H., Dunham A.J., Carter P.** Physicochemical stability of lipid injectable emulsions: correlating changes in large globule distributions with phase separation behavior. *Int. J. Pharm.* 2007, Tom 343, 1-2.
26. **Palacios L.E., Wang T.** Extraction of Egg-Yolk Lecithin. *JAACS*. 2005, Tom 82, 8.
27. **Kawaguchia E., Shimokawaa K., Ishii F.** Physicochemical properties of structured phosphatidylcholine in drug carrier lipid emulsions for drug delivery systems. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2008, Tom 62, 1.
28. **Sznitowska M.** Lecithin – Pharmaceutical applications expanded beyond liposomes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2005, Tom 10, Supplement.
29. **Li L. C., Tian Y.** Zeta potential. [aut. książki] Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Informa Healthcare, 2007.
30. **Floyd A.G.** Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm. Sci. Technol. Today*. 1999, Tom 4, 2.
31. **Stevens J., Mims P., Coles N.** Lipid emulsions as drug delivery systems. *Business Briefing: Pharmtech*. 2003.
32. **Sznitowska M., Janicki S., Dąbrowska E., Żurowska-Pryczkowska K.** Submicron emulsions as drug carriers. Studies on destabilization potential of various drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, Tom 12, 3.
33. **Levy M.Y., Polacheck I., Barenholz Y., Benita S.** Efficacy evaluation of a novel submicron amphotericin B emulsion in murine candidiasis. *J. Med. Vet. Mycol.* 1993, Tom 31, 3.
34. **Schwarz J.S., Weisspapir M.R., Friedman D.I.** Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. *Pharm Res.* 1995, Tom 12, 5.



35. **Sznitowska M., Gajewska M., Janicki S., Radwanska A., Lukowski G.** Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001, Tom 52, 2.
36. **Friedman D.I., Schwarz J.S., Weisspapir M.** Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Pharm. Sci.* 1995, Tom 84, 3.
37. **Piemi M.P., Korner D., Benita S., Marty J.P.** Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *J. Control. Release.* 1999, Tom 58, 2.
38. **Klang S.H., Abdulrazik M., Benita S.** Influence of emulsion droplet surface charge on indomethacin ocular tissue distribution. *Pharm. Dev. Technol.* 2000, Tom 5, 4.
39. **Yalin M., Öner F., Öner L., Hincal A.A.** Preparation and properties of a stable intravenous lorazepam emulsion. *J. Clin. Pharm. Ther.* 1997, Tom 22, 1.
40. **Wang Y., Cory A.L.** A novel stable supersaturated submicron lipid emulsion of tirilazad. *Pharm. Dev. Technol.* 1999, Tom 4, 3.
41. **Wang Y., Mesfin G.M., Rodríguez C.A., Slatter J.G., Schuette M.R., Cory A.L., Higgins M.J.** Venous irritation, pharmacokinetics, and tissue distribution of tirilazad in rats following intravenous administration of a novel supersaturated submicron lipid emulsion. *Pharm. Res.* 1999, Tom 16, 6.
42. **Danielsson I., Lindman B.** The definition of microemulsion. *Coll. Surfaces B.* 1981, Tom 3, 391-392.
43. **Wennerström H., Daicic J., Olsson U., Jerke G., Schurtenberger P.** Sponge phases and balanced microemulsions: What determines their stability? *J. Mol. Liquids.* 1997, Tom 72, 1-3.
44. **von Corswant C., Thorén P., Engström S.** Triglyceride-based microemulsion for intravenous administration of sparingly soluble substances. *J. Pharm. Sci.* 1998, Tom 87, 2.
45. **Ghosh P.K., Majithiya R.J., Umrethia M.L., Murthy R.S.R.** Design and development of microemulsion drug delivery system of acyclovir for improvement of oral bioavailability. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2006, Tom 7, 3.
46. **Guptaa R.R., Jainb S.K., Varshneya M.** AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. *Colloid. Surf. B: Biointerfaces.* 2005, Tom 41, 1.
47. **Biruss B., Kählig H., Valenta C.** Evaluation of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones. *Int. J. Pharm.* 2007, Tom 328, 2.
48. **Vyas T.K., Babbar A.K., Sharma R.K., Singh S., Misra A.** Intranasal mucoadhesive microemulsions of clonazepam: preliminary studies on brain targeting. *J. Pharm. Sci.* 2006, Tom 95, 3.
49. **Li L., Nandi I., Kim K.H.** Development of an ethyl laurate-based microemulsion for rapid-onset intranasal delivery of diazepam. *Int. J. Pharm.* 2002, Tom 237, 1-2.
50. **Sommerville M.L., Cain J.B., Johnson C.S. Jr, Hickey A.J.** Lecithin inverse microemulsions for the pulmonary delivery of polar compounds utilizing dimethylether and propane as propellants. *Pharm. Dev. Technol.* 2000, Tom 5, 2.

51. **D'Cruz O.J., Yiv S.H., Uckun F.M.** GM-144, a novel lipophilic vaginal contraceptive gel-microemulsion. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2001, Tom 2, 2.
52. **D'Cruz O.J., Uckun F.M.** Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. *Contraception.* 2001, Tom 64, 2.
53. **Cho Y.W., Flynn M.J.** *Pharmaceutical formulations that have a biologically active hydrophilic phase and a chylomicra-containing hydrophobic phase.* Patent US 5656289 USA, 1997.
54. **Lawrence M.J., Rees G.D.** Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, Tom 45, 1.
55. **Ruckenstein E.** Thermodynamic Approaches to Microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 1998, Tom 204, 1.
56. **Yuan J.S., Yip A., Nguyen N., Chu J., Wen X.Y., Acosta E.J.** Effect of surfactant concentration on transdermal lidocaine delivery with linker microemulsions. *Int. J. Pharm.* 2010, Tom 392, 1-2.
57. **Tsai Y.H., Fu L.T., Huang C.T., Chang J.S., Huang Y.B., Wu P.C.** Formulation optimization of estradiol microemulsion using response surface methodology. *J. Pharm. Sci.* wileyonlinelibrary.com, 2011, Tom doi: 10.1002/jps.22600.
58. **Wanga J.L., Wanga Z.W., Liua F., Zhaoa D.Y.** Preparation and in vitro release test of insulin loaded w/o microemulsion. *J. Disp. Sci. Tech.* 2008, Tom 29, 5.
59. **Huang Y.B., Lin Y.H., Lu T.M., Wang R.J., Tsai Y.H., Wu P.C.** Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles. *Int. J. Pharm.* 2008, Tom 349, 1-2.
60. **Paolino D., Ventura C.A., Nisticò S., Puglisi G., Fresta M.** Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *Int. J. Pharm.* 2002, Tom 244, 1-2.
61. **Zachar C.L.** Pharmaceutically relevant microemulsions with potential topical, ophthalmic, and parenteral applications. The University of Toledo, 2010, Ph.D. Thesis.
62. **Zhu W., Yu A., Wang W., Dong R., Wu J., Zhai G.** Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. *Int. J. Pharm.* 2008, Tom 360, 1-2.
63. **Söderlind E., Wollbratt M., von Corswant C.** The usefulness of sugar surfactants as solubilizing agents in parenteral formulations. *Int. J. Pharm.* 2003, Tom 252, 1-2.
64. **Tije A.J., Verweij J., Loos W.J., Sparreboom A.** Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. *Clin. Pharmacokinet.* 2003, Tom 42, 7.
65. **Constantinides P.P.** Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm. Res.* 1995, Tom 12, 11.
66. **Date A.A., Nagarsenker M.S.** Parenteral microemulsions: an overview. *Int. J. Pharm.* 2008, Tom 355, 1-2.
67. **Yuan J.S.** Linker-based lecithin microemulsions as transdermal drug delivery systems. University of Toronto, 2009, Ph.D.

68. **Moreno M.A., Ballesteros M.P., Frutos P.** Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies. *J. Pharm. Sci.* 2003, Tom 92, 7.
69. **Saint Rutha H., Attwood D., Ktistis G., Taylor C.J.** Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *Int. J. Pharm.* 1995, Tom 116, 2.
70. **Changez M., Varshney M., Chander J., Dinda A.K.** Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: In vitro. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2006, Tom 50, 1.
71. **Narang S.A., Delmarre D., Gao D.** Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *Int. J. Pharm.* 2007, Tom 345, 1-2.
72. **Sharma A., Sharma U.S.** Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int. J. Pharm.* 1997, Tom 154, 2.
73. **Kim S.W., Park K.** Polymer micelles for drug delivery. [red.] Mahato R, Narang A. *Targeted Delivery of Small and Macromolecular Drugs: Problems Faced and Approaches Taken.* New Jersey: Taylor and Francis Group, 2010.
74. **Goyal P., Goyal K., Vijaya Kumar S.G., Singh A., Katare O.P., Mishra D.N.** Liposomal drug delivery systems - clinical applications. *Acta Pharm.* 2005, Tom 55, 1.
75. **Pedersen P.J.** Liposomal Drug Delivery of Anticancer Agents, Synthesis, Biophysical Characterization and Biological Studies of Enzyme Sensitive Phospholipid Prodrugs. Technical University of Denmark, 2010, Ph.D. Thesis.
76. **Muller R.H., Hildebrand G.E.** *Technologia nowoczesnych postaci leków.* Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2003.
77. **Potemski P., Płużańska A.** Doksorubicyna liposomalna - właściwości i zastosowanie kliniczne. *Onkol. Pol.* 1999, Tom 2, 2.
78. **Yamakov I.A., Kuskov A.N., Babievsky K.K., Berezin B.B., Krayukhina M.A., Samoylova N.A., Tikhonov V.E., Shtilman M.I.** Novel liposomal forms of antifungal antibiotics modified by amphiphilic polymers. *Appl. Bioch. Microb.* 2008, Tom 44, 6.
79. **Gad S.C.** *Pharmaceutical manufacturing handbook: production and processes.* New Jersey: Wiley, 2008.
80. **Maurer N., Fenske D.B., Cullis P.R.** Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2001, Tom 1, 6.
81. **Yang X., Zhao X., Phelps M.A., Piao L., Rozewski D.M., Liu Q., Lee L.J., Marcucci G., Grever M.R., Byrd J.C., Dalton J.T., Lee R.J.** A novel liposomal formulation of flavopiridol. *Int. J. Pharm.* 2009, Tom 365, 1-2.
82. **Avendano C., Menendez J.C.** *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs.* Oxford: Elsevier, 2008.
83. **Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D.** Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* 1999, Tom 51, 4.

84. **Moen M.D., Lyseng-Williamson K.A., Scott L.J.** Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs*. 2009, Tom 69, 3.
85. **Lee R.J.** Liposomal delivery as a mechanism to enhance synergism between anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* 2006, Tom 5, 7.
86. **Muszyński Z., Ratajczak M.** Konserwacja przeciwdrobnoustrojowa leków. *Farm. Pol.* 2009, Tom 65, 2.
87. **Denyer S.P., Hodges N.A., Baird R.M.** *Handbook of Microbiological Quality Control in Pharmaceuticals and Medical Devices*. Londyn: Taylor and Francis Inc., 2000.
88. **Wątróbska-Świetlikowska D.** Badanie dystrybucji środków konserwujących w fazach nowoczesnych, submikronowych układów dyspersyjnych. Akademia Medyczna w Gdańsku, 2008, Rozprawa doktorska.
89. <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/Help/LogP.html>.
90. <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0833.htm>.
91. <http://edetox.ncl.ac.uk/Chemicals.aspx?id=25>.
92. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/98.htm>.
93. **European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General.** Review report for the active substance benzoic acid. 2003.
94. **SRC PhysProp Database.** <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>.
95. **Shokri J., Nokhodchi A., Dashbolaghi A., Hassan-Zadeh D., Ghafourian T., Barzegar Jalali M.** The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *Int. J. Pharm.* 2001, Tom 228, 1-2.
96. **Parnowska W.** *Konserwacja leków*. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1982.
97. **Rieger M.M., Rhein L.D.** *Surfactants in cosmetics*. New York: Marcel Dekker, 1997.
98. **Steinberg D.** *Preservatives for cosmetics*. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2006.
99. **Gordon Y.J., Romanowski E.G., McDermott A.M.** A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* 2005, Tom 30, 7.
100. **Arrighi R.B.G., Nakamura C., Miyake J., Hurd H., Burgess J.G.** Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malaras. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, Tom 46, 7.
101. **Kieffer A.E., Goumon Y., Ruh O., Chasserot-Golaz S., Nullans G., Gasnier C., Aunis D., Metz-Boutigue M.H.** The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J.* 2003, Tom 17, 6.
102. **Carriel-Gomes M.C., Kratz J.M., Barracco M.A., Bachère E., Barardi C.R., Simões C.M.** In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2007, Tom 102, 4.

103. **Cole A.M., Lehrer R.I.** Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. *Curr. Pharm. Des.* 2003, Tom 9, 18.
104. **Dennison S.R., Harris F., Bhatt T., Singh J., Phoenix D.A.** A theoretical analysis of secondary structural characteristics of anticancer peptides. *Mol. Cell Biochem.* 2010, Tom 333, 1-2.
105. **Shai Y.** Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2002, Tom 66, 4.
106. **Chen Y., Guarnieri M.T., Vasil A.I., Vasil M.L., Mant C.T., Hodges R.S.** Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2007, Tom 51, 4.
107. **Jiang Z., Vasil A.I., Hale J., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S.** Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Pep. Sci.* 2007, Tom 90, 3.
108. **Hale J.D., Hancock R.E.** Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2007, Tom 5, 6.
109. **Meyer B. K., Ni A., Hu B., Shi L.** Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. *J. Pharm. Sci.* 2007, Tom 96, 12.
110. **Lund W.** *The pharmaceutical codex - principles and practise of pharmaceutics.* London: The Pharmaceutical Press, 1994.
111. **Thompson, E. J.** *A practical guide to contemporary pharmacy practise.* Baltimore : Williams&Wilkins, 1998.
112. **Merrifield R.B.** Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, Tom 85, 14.
113. **Fields G.B., Noble R.L.** Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide. Protein. Res.* 1990, Tom 35, 3.
114. **Fields G.B.** Methods for removing the Fmoc group. [red.] Dunn B.M. Pennington M.W. *Methods in molecular biology. Peptide synthesis protocols.* New Jersey: Humana Press, 1994.
115. **Carpino L.A.** The 9-fluorenylmethoxycarbonyl family of base-sensitive amino-protecting group. *Act. Chem. Res.* 1987, Tom 20, 11.
116. **Christensen T.** Qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil. *Acta Chem. Scand. Ser. B.* 1979, Tom 33, 763.
117. **König W., Geiger R.** A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. *Chem. Ber.* 1970, Tom 103, 3.
118. **Chan W.C., White P.D.** *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A practical Approach.* New York: Oxford University Press, 2004.
119. **McGowan J.** A new approach for the calculation of HLB valuer of surfactants. *Tenside Surf. Det.* 1990, Tom 27, 4.
120. **Szymanowski J., Voelkel A.** Hydrophile lipophile balance of hydroxyoximes in McGowan scale and their partition and extraction properties. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1992, Tom 54, 1.

121. **Pyka A., Bbuńska M., Zachariasz M.** A comparison of theoretical methods of calculation of partition coefficients for selected drugs. *Acta Pol. Pharm.* 2006, Tom 63, 3.
122. **Tetko I., Poda G.I., Ostermann C., Mannhold R.** Large-scale evaluation of log P predictors: local corrections may compensate insufficient accuracy and need of experimentally testing every other compound. *Chem. Biodivers.* 2009, Tom 6, 11.
123. **Bennett E.R., Clausen J., Linkov E., Linkov I.** Predicting physical properties of emerging compounds with limited physical and chemical data: QSAR model uncertainty and applicability to military munitions. *Chemosphere.* 2009, Tom 77, 10.
124. [www.uwosh.edu/faculty\\_staff/gutow/marvin.1/chemaxon/marvin/help/calculator-plugins.html](http://www.uwosh.edu/faculty_staff/gutow/marvin.1/chemaxon/marvin/help/calculator-plugins.html).
125. **Tetko I., Tanchuk V., Villa A.** Prediction of n-octanol/water partition coefficients from PHYSPROP database using artificial neural networks and E-state indices. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2001, Tom 41, 5.
126. **Tetko I., Bruneau P.** Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house database. *J. Pharm. Sci.* 2004, Tom 93, 12.
127. **Mannhold R., Poda G.I., Ostermann C., Tetko I.** Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds. *J. Pharm. Sci.* 2008, Tom 98, 3.
128. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard: eighth edition. 2009, Wayne, M07-A8, PA: CLSI.
129. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. 2010, Wayne, M100-S20-U, PA: CLSI.
130. **Andra J., Jakovkin I., Grotzinger J., Hecht O., Krasnosdembskaya A.D., Goldmann T., Gutschmann T., Leippe M.** Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin. *Biochem. J.* 2008, Tom 410, 1.
131. [www.kruss.de/en/theory/measurements/surface-tension/ring-method.html](http://www.kruss.de/en/theory/measurements/surface-tension/ring-method.html).
132. **Czerwiński J.B., Iwasiewicz A., Paszek Z., Sikorski A.** *Metody statystyczne dla chemików.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1992.
133. **Ahn H., Cho W., Kang S., Ko S., Park M., Cho H., Lee K.** Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of  $\alpha$  helical domain of Tenecin 1, an insect defensin protein, and structure-activity relationship study. *Peptides.* 2006, Tom 27, 4.
134. **Hea J., Anderson M.H., Shia W., Eckert R.** Design and activity of a 'dual-targeted' antimicrobial peptide. *Int. J. of Antimicrob. Agents.* 2009, Tom 33, 6.
135. **Schieck A., Müller T., Schulze A., Haberkorn U., Urban S., Mier W.** Solid-phase synthesis of the lipopeptide Myr-HBVpreS/2-78, a hepatitis B virus entry inhibitor. *Molecules.* 2010, Tom 15, 7.
136. **Joseph L.C., Bennett J.A., Kirschner K.N., Shields G.C., Hughes J., Lostritto N., Jacobson H.I., Andersen T.T.** Antiestrogenic and anticancer activities of peptides derived from the active site of alpha-fetoprotein. *J. Pept. Sci.* 2009, Tom 15, 4.

137. **Malina A., Shai Y.** Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. *Biochem. J.* 2005, Tom 390, 3.
138. **Kamysz W., Okrój M., Łempicka E., Ossowski T., Łukasiak J.** Fast and efficient purification of synthetic peptides by solid-phase extraction. *Acta Chromatographica.* 2004, 14.
139. **Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., Silvestri C., Del Prete M.S., Licci A., D'Amato G., Łukasiak J., Scalise G.** In vitro activity and killing effect of citropin 1.1 against gram-positive pathogens causing skin and soft tissue infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, Tom 49, 6.
140. **Sarig H., Rotem S., Ziserman L., Danino D., Mor A.** Impact of self-assembly properties on antibacterial activity of short acyl-lysine oligomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, Tom 52, 12.
141. **Kołodziejczyk A.** *Naturalne związki organiczne.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003.
142. **Nagai A., Nagai Y., Qu H., Zhang S.** Dynamic behaviors of lipid-like self-assembling peptide A6D and A6K nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2007, Tom 7, 7.
143. **Barchiesi F., Giacometti A., Cirioni O., Arzeni D., Silvestri C., Kamysz W., Abbruzzetti A., Riva A., Kamysz E., Scalise G.** In vitro activity of the synthetic lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH(2) alone and in combination with antifungal agents against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Peptides.* 2007, Tom 28, 8.
144. **Simonetti O., Arzeni D., Ganzetti G., Silvestri C., Cirioni O., Gabrielli E., Castelletti S., Kamysz W., Kamysz E., Scalise G., Offidani A., Barchiesi F.** In vitro activity of the lipopeptide derivative (Pal-Lys-Lys-NH), alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of dermatophytes. *Br. J. Dermatol.* 2009, Tom 161, 2.
145. **Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Kamysz W., Silvestri C., Orlando F., Mocchegiani F., Vittoria A. D., Kamysz E., Saba V.** The lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH<sub>2</sub> and Pal-Lys-Lys soaking alone and in combination with intraperitoneal vancomycin prevent vascular graft biofilm in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *Peptides.* 2007, Tom 28, 6.
146. **Kamysz W., Silvestri C., Cirioni O., Giacometti A., Licci A., Della Vittoria A., Okroj M., Scalise G.** In vitro activities of the lipopeptides palmitoyl (Pal)-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys alone and in combination with antimicrobial agents against multiresistant gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, Tom 51, 1.
147. **Dawgul M., Barańska-Rybak W., Greber K., Guzik Ł., Nowicki R., Łukasiak J., Kamysz W.** Aktywność przeciwbakteryjna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. *Alergia Astma Immunologia.* 2011, Tom 16, 1.
148. **Makovitzki A., Avrahami D., Shai Y.** Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, Tom 103, 43.
149. **Sarig H., Livne L., Held-Kuznetsov V., Zaknoon F., Ivankin A., Gidalevitz D., Mor A.** A miniature mimic of host defense peptides with systemic antibacterial efficacy. *FASEB J.* 2010, Tom 24, 6.
150. **Brito R.O., Silva S.G., Fernandes R.M., Marques E.F., Enrique-Borges J., do Vale M.L.** Enhanced interfacial properties of novel amino acid-derived surfactants: Effects of headgroup chemistry and of alkyl chain length and unsaturation. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2011, Tom 86, 1.

151. **Pérez L., Pinazo A., Teresa García M., Lozano M., Manresa A., Angelet M., Pilar Vinardell M., Mitjans M., Pons R., Rosa Infante M.** Cationic surfactants from lysine: synthesis, micellization and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, Tom 44, 5.
152. **Haas S., Hoffmann H.** Interfacial tension of double-chain cationic surfactants. *Progr. Colloid. Polym. Sci.* 1996, Tom 101, 141.



## STRESZCZENIE

Niemal wszystkie postacie leku, których elementem jest faza wodna wymagają zastosowania środka konserwującego. Jego zadaniem jest zachowanie jałowości i czystości mikrobiologicznej środka leczniczego oraz prewencja zakażeń wtórnych w czasie pobierania leków z opakowań wielokrotnego użytku. Do leków zawierających fazę wodną zalicza się między innymi emulsje. Ponieważ są to układy wielofazowe, to w ich skład wchodzi związek powierzchniowo czynny. Między środkami konserwującymi a związkami powierzchniowo czynnymi często dochodzi do wzajemnych interakcji. Polegają one przede wszystkim na zamykaniu środka konserwującego w strukturach formowanych przez surfaktanty. W rezultacie takiej niezgodności recepturowej następuje spadek stężenia środka konserwującego w fazie wodnej. Prowadzi to do jej niedostatecznej ochrony przed namnażaniem drobnoustrojów. Stąd też dobór odpowiedniego środka konserwującego do wielofazowej formy leku jest ciągle aktualną kwestią w technologii postaci leku.

Celem pracy było zaprojektowanie i otrzymanie na drodze syntezy chemicznej, nowych, kationowych związków lipopeptydowych o prostych łańcuchach alkilowych, które mogłyby spełniać jednocześnie rolę środka konserwującego oraz funkcję związku powierzchniowo czynnego.

Głównym założeniem podczas projektowania było odwzorowanie właściwości struktury II-rzędowej endogennych antybiotyków peptydowych, warunkujących ich aktywność przeciwdrobnoustrojową, jakimi są amfipatyczność i sumaryczny ładunek dodatni cząsteczki oraz przełożenie ich na strukturę I-rzędową. Założono, że dodatni ładunek cząsteczek zaprojektowanych związków będzie pochodził od reszt aminokwasu zasadowego - lizyny. Warunek amfipatyczności postanowiono osiągnąć przez przyłączenie fragmentu hydrofobowego jakim jest kwas tłuszczowy: heksadekanowy, tetradekanowy, dodekanowy, dekanowy oraz oktanowy. Biegunowa budowa takich związków ma zapewnić, że otrzymane lipopeptydy będą wykazywały właściwości powierzchniowo czynne.

Lipopeptydy otrzymano metodą syntezy na nośniku stałym z wykorzystaniem metodologii Fmoc/tBu. Surowe lipopeptydy oczyszczano za pomocą ekstrakcji do fazy stałej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Potwierdzenia tożsamości otrzymanych lipopeptydów dokonano metodą MALDI-TOF.

Otrzymane związki lipopeptydowe przebadano pod kątem właściwości fizykochemicznych i biologicznych.

## Streszczenie

Obliczone metodą McGowana wartości HLB otrzymanych związków pozwalają na ich klasyfikację jako potencjalne substancje powierzchniowo czynne o właściwościach emulgujących i solubilizujących.

W celu scharakteryzowania właściwości lipofilowych otrzymanych lipopeptydów, wyznaczono teoretycznie wartości współczynnika podziału n-oktanol/woda. Korzystano z trzech programów komputerowych: Marvin LogP, ALOGPs 2.1 oraz ACD/LogP. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dla niektórych lipopeptydów wartość LogP jest zbliżona do powszechnie stosowanych w technologii farmaceutycznej środków konserwujących.

Biorąc pod uwagę jonowy charakter lipopeptydów, podjęto próbę scharakteryzowania ich właściwości lipofilowych w zależności od pH środowiska. W tym celu wyznaczono teoretyczne wartości LogD dla każdego ze związków. Z szacunków wynika, że lipopeptydy obdarzone są ładunkiem dodatnim w szerokim zakresie pH.

Wykonano badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych lipopeptydów wobec referencyjnych szczepów bakterii Gram dodatnich, Gram ujemnych i grzybów. Wyznaczone doświadczalnie wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC), minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) i minimalnego stężenia grzybobójczego wskazują (MFC) na znaczną aktywność przeciwdrobnoustrojową niektórych lipopeptydów. Wybrane związki charakteryzuje znacznie lepsza aktywność przeciwdrobnoustrojowa niż powszechnie stosowanych, konwencjonalnych środków konserwujących.

Zbadano właściwości hemolityczne otrzymanych lipopeptydów. Najniższe wartości minimalnego stężenia hemolitycznego (MHC), czyli najwyższą aktywność lityczną, zaobserwowano dla lipopeptydów najaktywniejszych przeciwdrobnoustrojowo. Stwierdzono jednak, że często działają one destrukcyjnie na erytrocyty ludzkie w stężeniach wyższych niż MIC, MBC.

Pomiaru zdolności lipopeptydów do obniżania napięcia powierzchniowego na granicy faz powietrze/woda dokonano za pomocą tensjometru automatycznego EasyDyne. Zbadano efektywność obniżania napięcia powierzchniowego. Stwierdzono, że w stężeniach powyżej CMC wszystkie, przebadane lipopeptydy obniżają napięcie powierzchniowe wody przynajmniej o 20 mN/m. Ponadto zaobserwowano zależność  $\sigma_{CMC}$  od długości fragmentu hydrofobowego cząsteczki oraz od składu aminokwasowego fragmentu hydrofilowego. Stwierdzono też, że wielkość krytycznego stężenia micelnego zależy od tych samych parametrów cząsteczki CO  $\sigma_{CMC}$ .

Z przeprowadzonych badań wynika, że niektóre spośród nowo otrzymanych związków o budowie lipopeptydowej spełniają zakładane dla nich na etapie projektowania struktur parametry, tj. odpowiednio wysokie właściwości przeciwdrobnoustrojowe i zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego.

## SUMMARY

Essentially, any kind of drug formulation containing aqueous phase requires the application of preservatives in order to maintain its sterility, microbiological purity, and to prevent against secondary microbial contamination, during storage and usage of drugs from the multiple usage packages. Emulsions are a large group of water rich formulations. Because they are multiphase systems, their composition involves surface-active compounds. Between the surface active compounds and preservatives reciprocal interactions often appear. Generally they are based on the closing of the preservative in the structures formed by the surfactant. The result of such incompatibilities is a decrease of the preservative' concentration in the aqueous phase and consequential insufficient protection against microorganisms' growth. Therefore, an adequate form of the preservative for multiphase medicines constitutes a current issue of pharmaceutical technology.

The main objective of this work was to design and obtain by chemical synthesis new, cationic lipopeptide compounds of simple alkyl chains, which would fulfill simultaneously the role of the preservative and surface active agent.

The main assumption while designing, was to imitate the properties of the secondary structure of endogenous peptides responsible for their antimicrobial activity, i.e. amphipathicity and the positive net charge of the molecule, and translating them into the primary structure. It was assumed that the positive charge of designed molecules is derived by the basic amino acid residues - lysine. The amphipathicity condition was achieved by joining the hydrophobic fragment of fatty acid: hexadecanoic, tetradecanoic, dodecanoic, decanoic and octanic. Amphiphilic construction of such compounds has to ensure that received lipopeptides will demonstrate surface-active properties.

Lipopeptides were obtained by solid phase peptide synthesis (SPPS) using Fmoc/tBu methodology. Crude lipopeptides were purified using solid phase extraction and high performance liquid chromatography. The identity of lipopeptides was confirmed by *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight mass spectrometry – MALDI-TOF*.

Afterwards the physicochemical and biological properties of received lipopeptide compounds were tested.

Calculated according to McGowan's method the HLB values of received compounds allow for their classification as potential surfactants with emulsifying and solubilizing properties.

In order to characterize the lipophilic properties of lipopeptides, the theoretical calculation values of the partition coefficient n-octanol/water was made. Three computer programs were used: Marvin LogP, ALOGPs 2.1 and ACD/LogP. On the basis of the obtained results, it was found that for

## Summary

some of the lipopeptides' value of LogP are similar to preservatives which are commonly used in pharmaceutical technology.

Taken into account the ionic character of the lipopeptides, an attempt was made to characterize their lipophilic properties, depending on the pH of the environment. To this end, the theoretical value of LogD was designated for each of the molecules. According to estimates lipopeptides are endowed with positive charge across a wide range of pH.

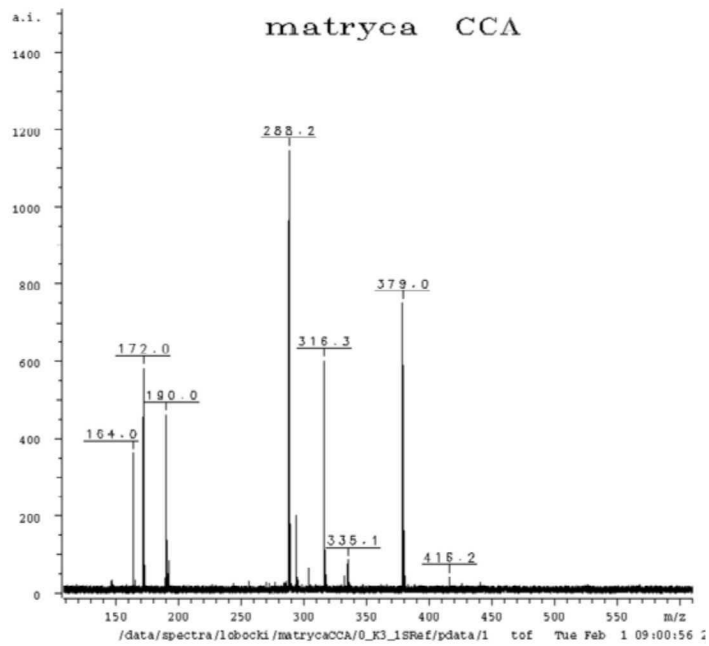
The antimicrobial activity tests of lipopeptides against reference strains of Gram positive and Gram negative bacteria and fungi were carried out. Experimentally determined values of the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) indicate on a significant antimicrobial activity of some lipopeptides. Selected compounds have a considerably stronger antimicrobial activity than commonly-used conventional preservatives.

The hemolytic properties of obtained lipopeptides were examined. The lowest values of the minimum hemolytic concentration (MHC), which means the highest lytic activity, has been observed for the lipopeptides endowed with the highest antimicrobial activity. However, it was found that they present the lytic activity to human erythrocytes in concentrations higher than their MIC and the MBC.

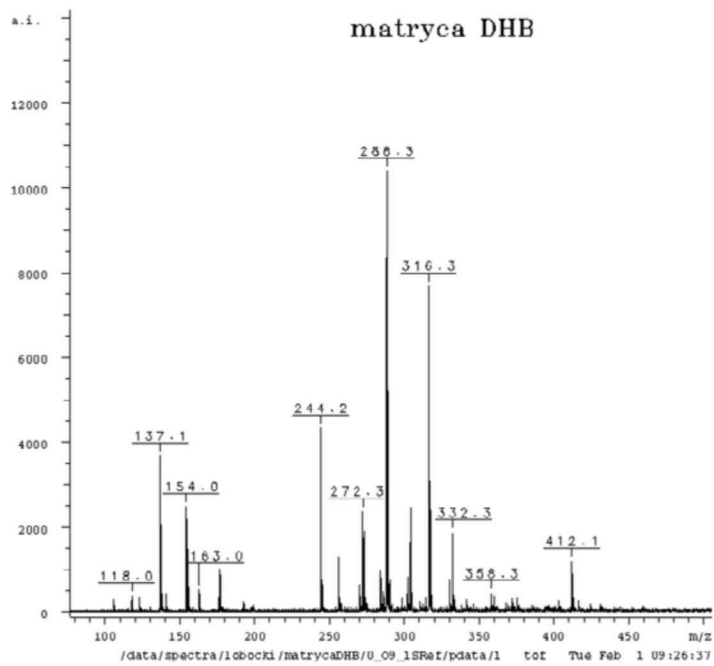
Measuring the capacity of lipopeptides for lowering the surface tension on air/water interface was achieved by automatic EasyDyne tensiometer. The effectiveness of reducing surface tension was examined. It was found that at concentrations above critical micelle concentration (CMC) all tested lipopeptides reduced the surface tension of water by at least 20 mN/m. Moreover, the relationship between  $\sigma_{\text{CMC}}$  and the length of the hydrophobic fragment of the molecule as well as of the composition of the hydrophilic amino acid fragment has been observed. It was found that the value of CMC of lipopeptides depends on these same parameters of molecules that were noticed for  $\sigma_{\text{CMC}}$ .

Research shows that some of the newly reconstituted lipopeptide compounds meet the predicted parameters at the structures design stage, i.e. correspondingly high antimicrobial properties and ability to reduce surface tension.

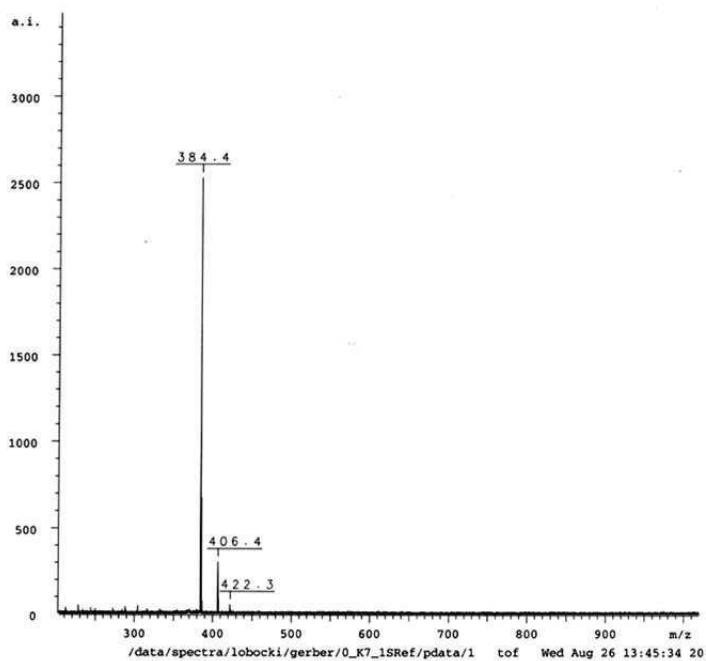
# ANEKS



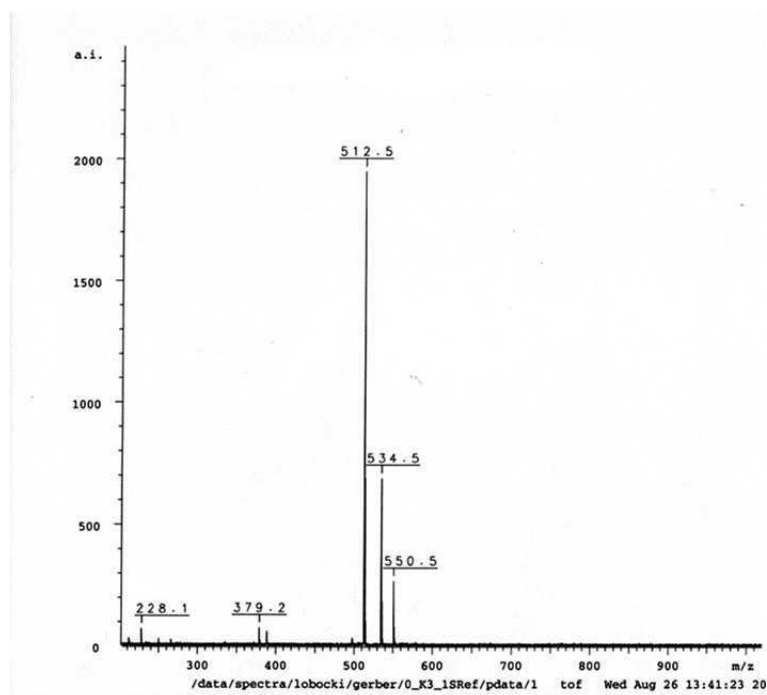
Rycina 50. Widmo MALDI-TOF dla matrycy CCA.



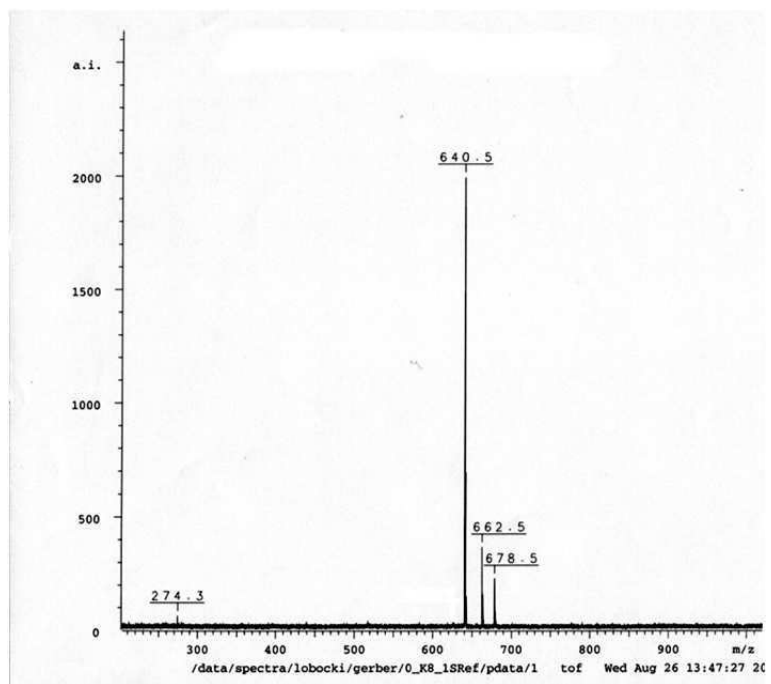
Rycina 51. Widmo MALDI-TOF dla matrycy DHB.



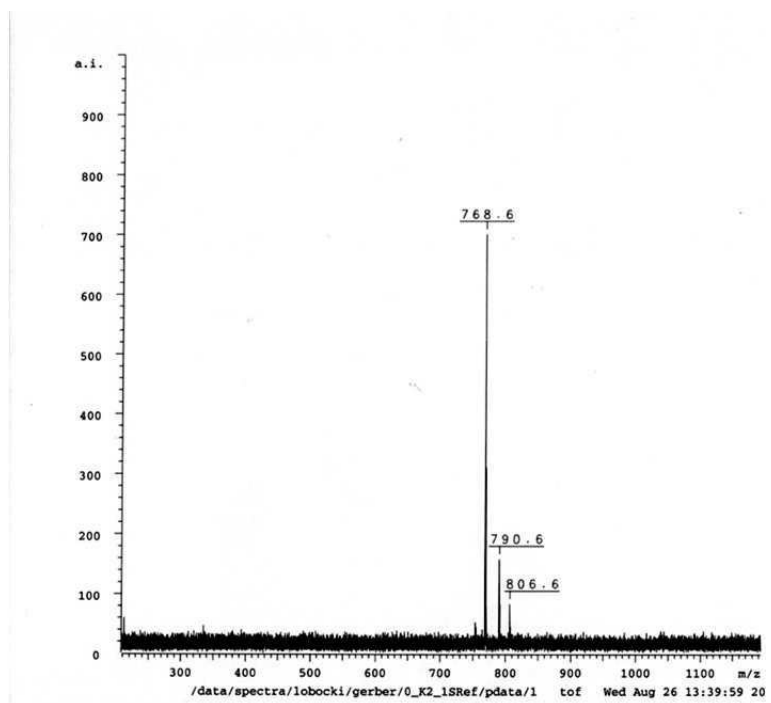
Rycina 52. Widmo masowe C<sub>16</sub>-K-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



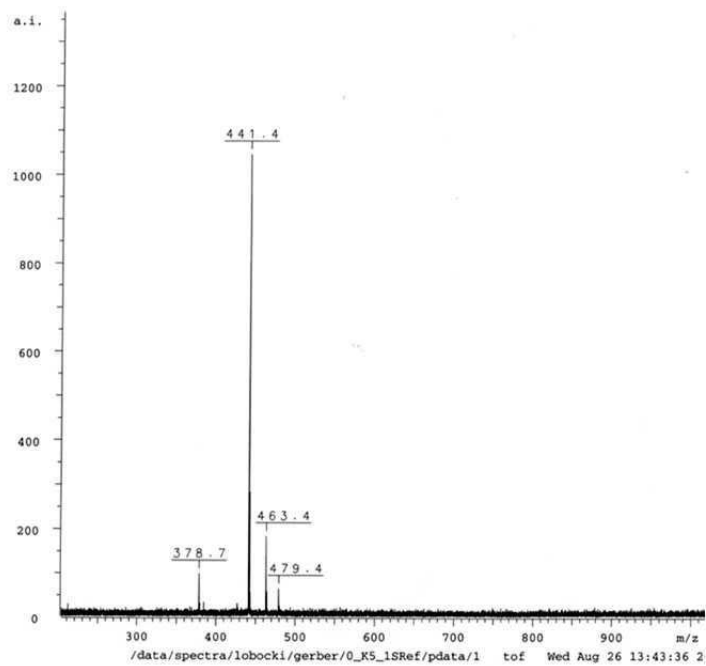
Rycina 53. Widmo masowe C<sub>16</sub>-KK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



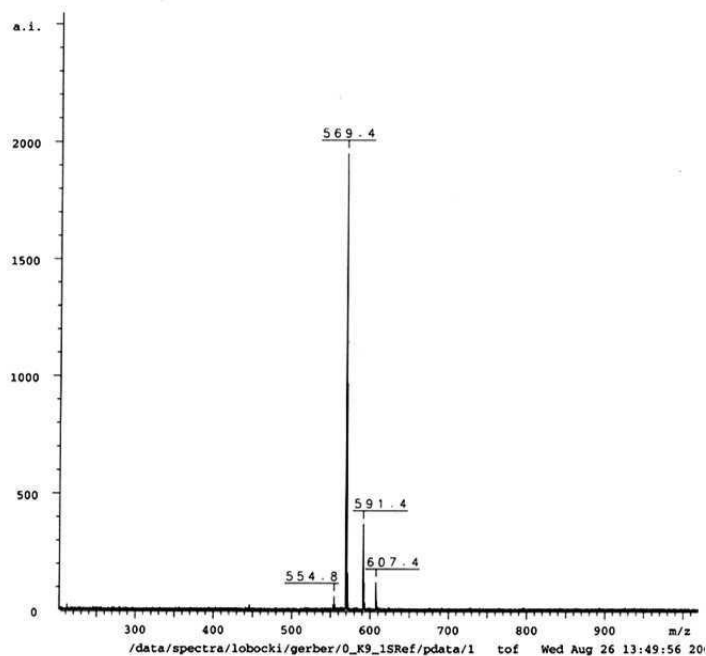
Rycina 54. Widmo masowe  $C_{16}$ -KKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



Rycina 55. Widmo masowe  $C_{16}$ -KKKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

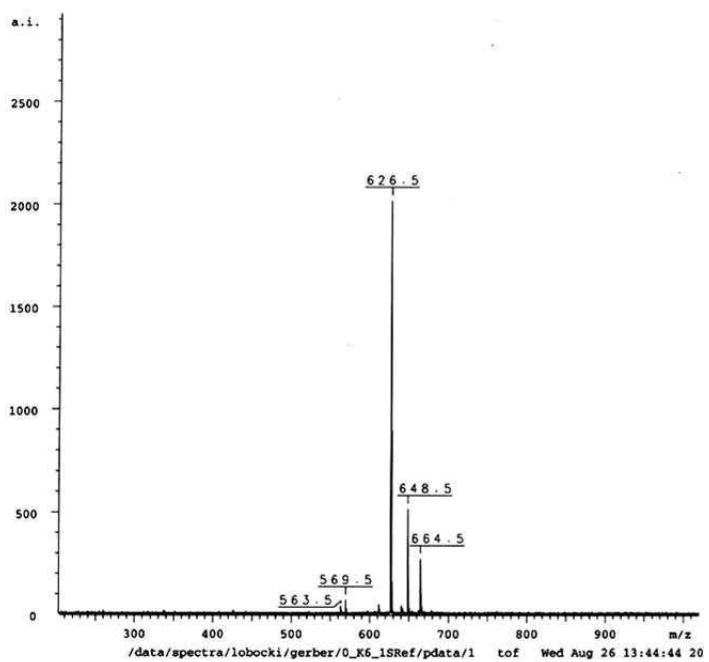


Rycina 56. Widmo masowe C<sub>16</sub>-KG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

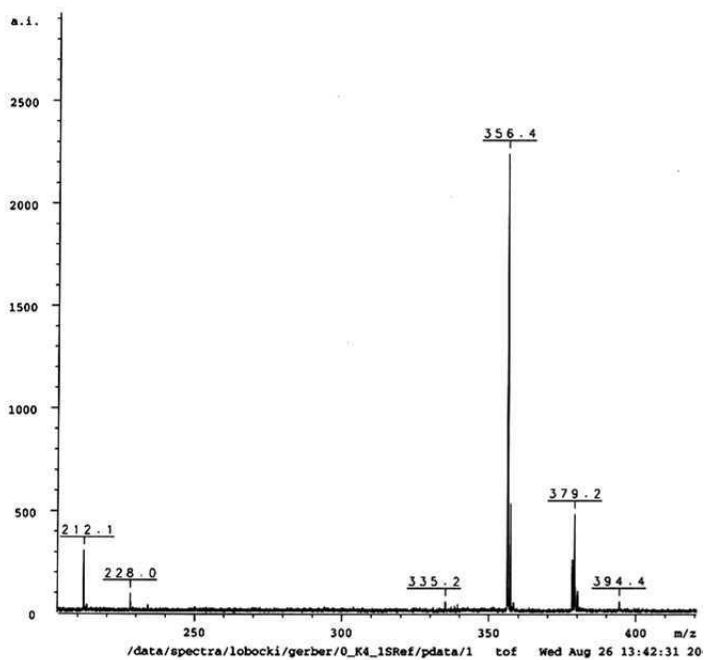


Rycina 57. Widmo masowe C<sub>16</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

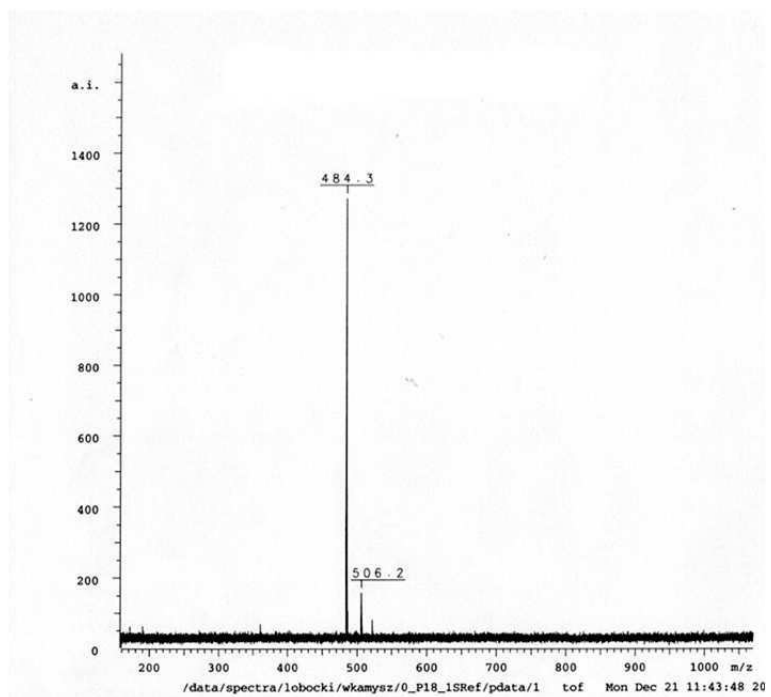




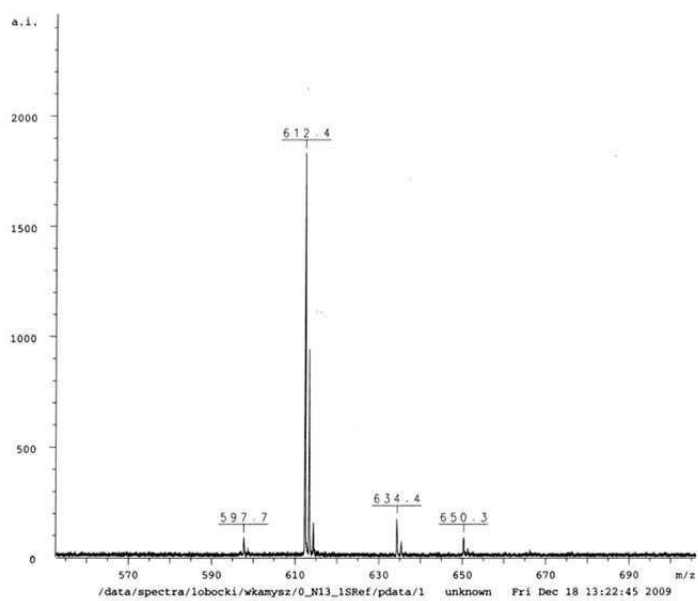
Rycina 58. Widmo masowe C<sub>16</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



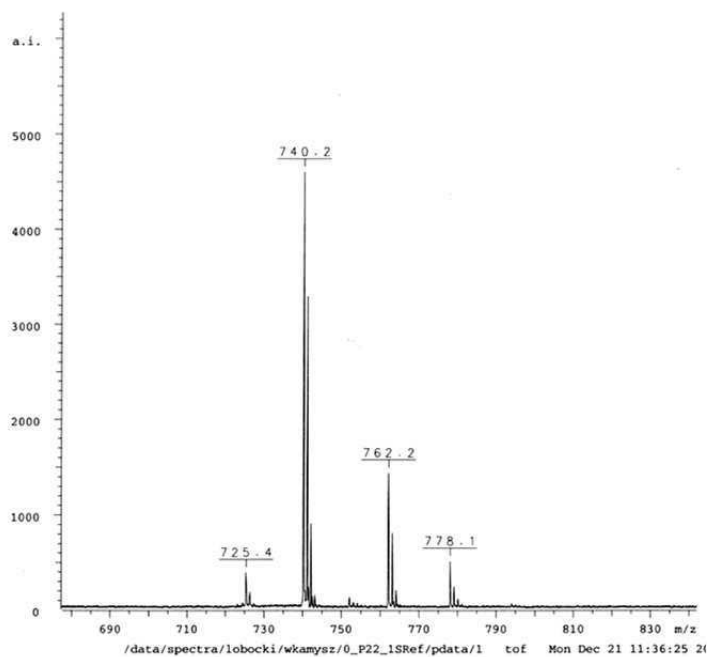
Rycina 59. Widmo masowe C<sub>14</sub>-K-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



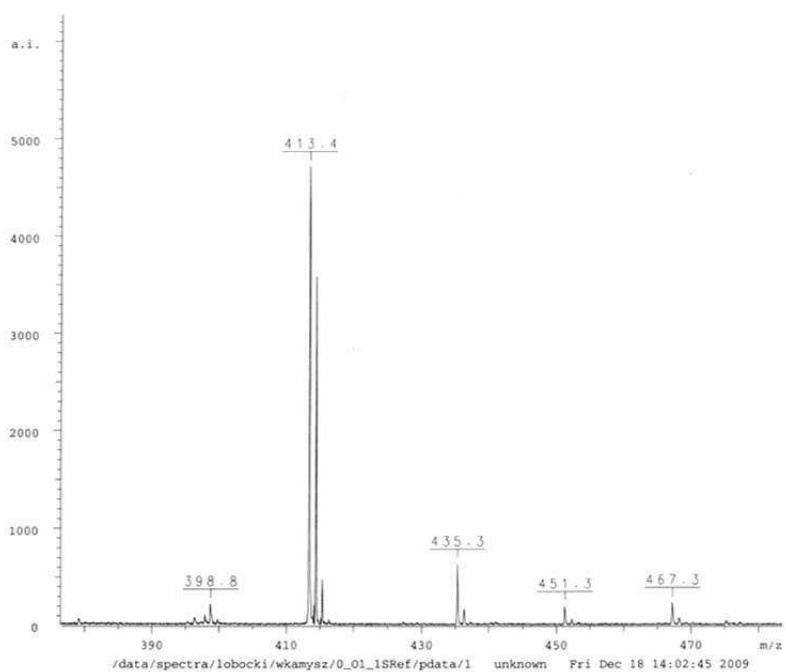
Rycina 60. Widmo masowe C<sub>14</sub>-KK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



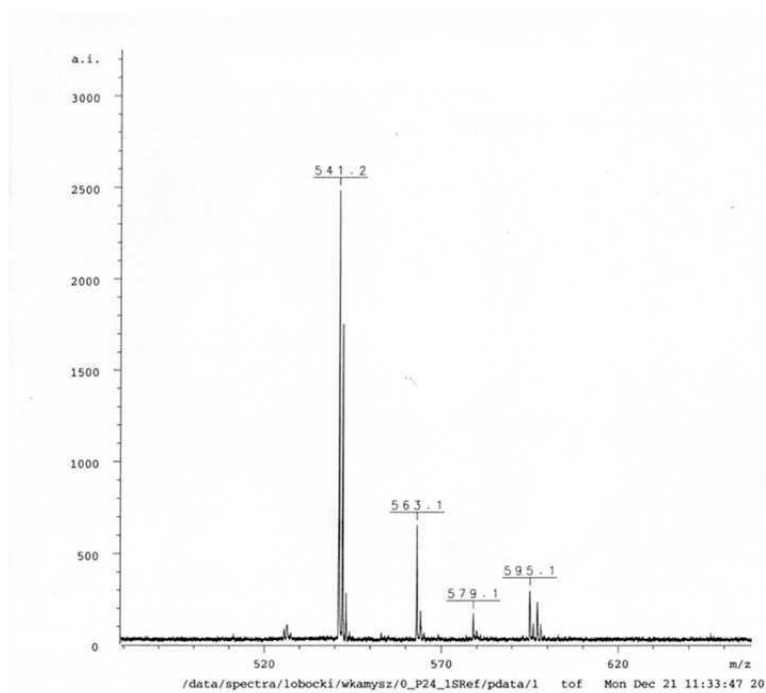
Rycina 61. Widmo masowe C<sub>14</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



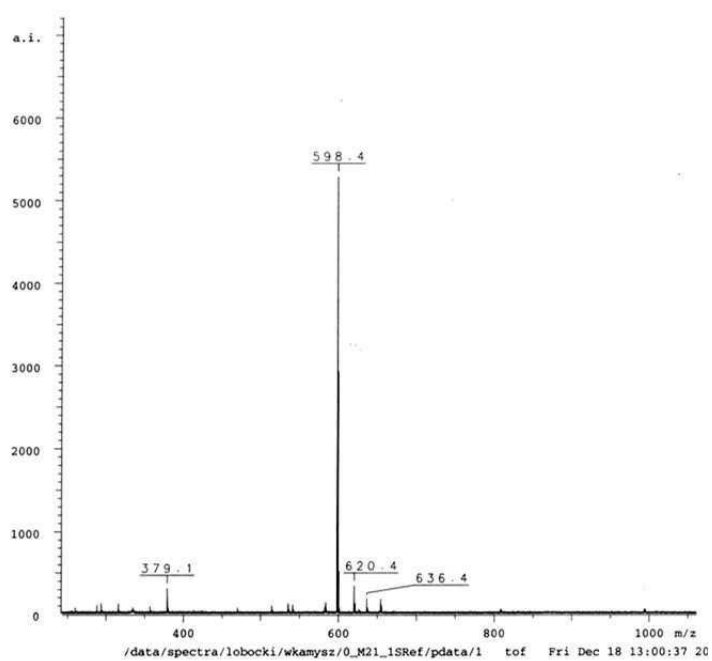
Rycina 62. Widmo masowe C<sub>14</sub>-K<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



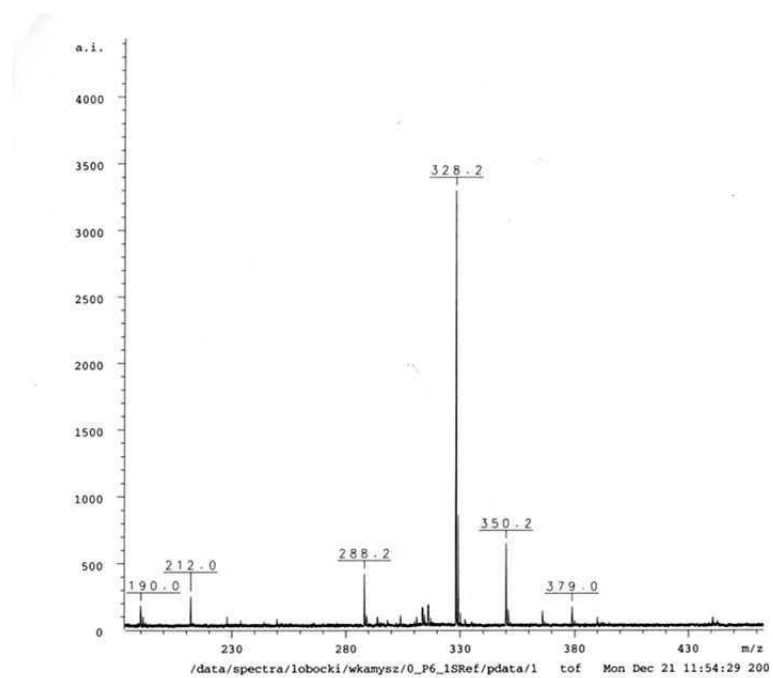
Rycina 63. Widmo masowe C<sub>14</sub>-K<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



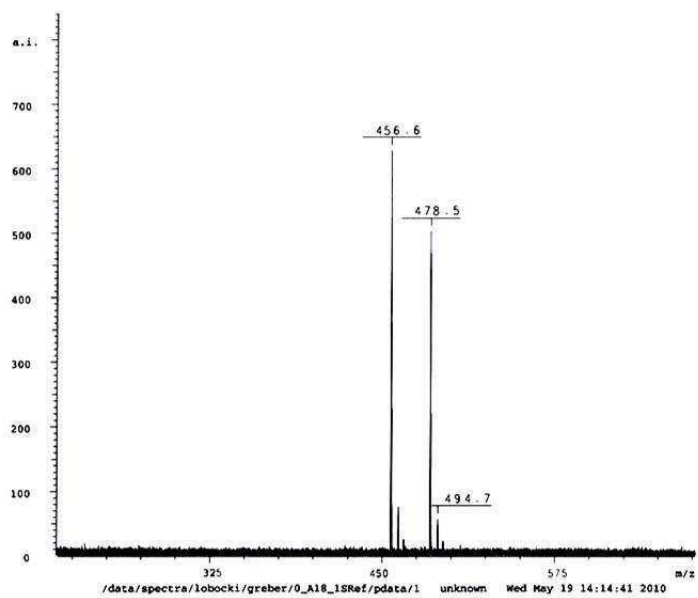
Rycina 64. Widmo masowe C<sub>14</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



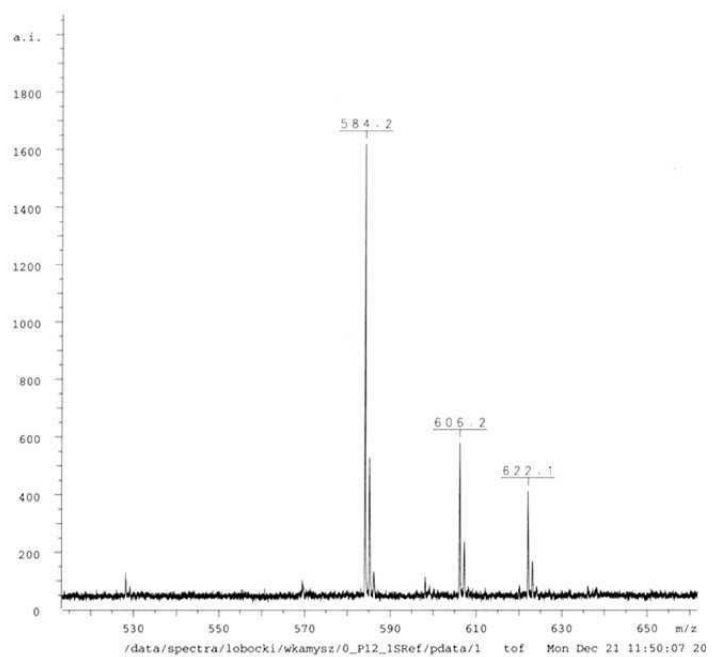
Rycina 65. Widmo masowe C<sub>14</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



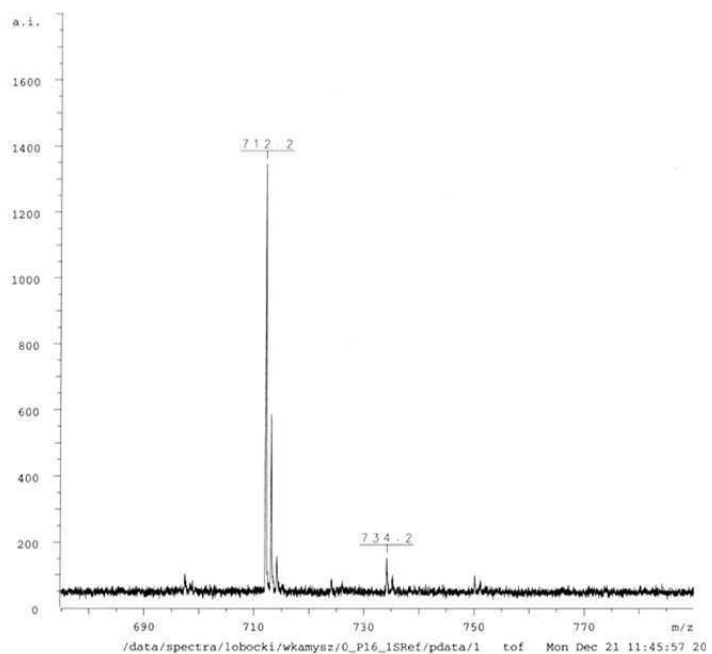
Rycina 66. Widmo masowe C<sub>12</sub>-K-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



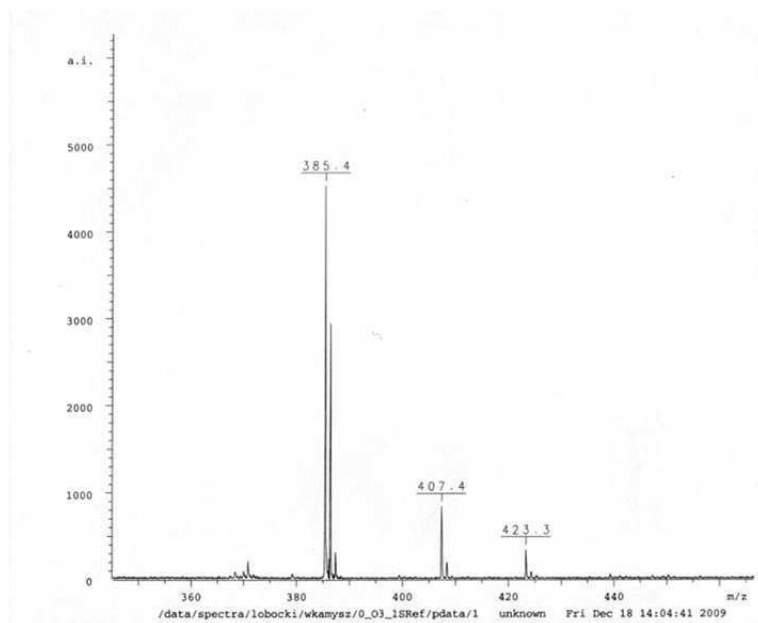
Rycina 67. Widmo masowe C<sub>12</sub>-KK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



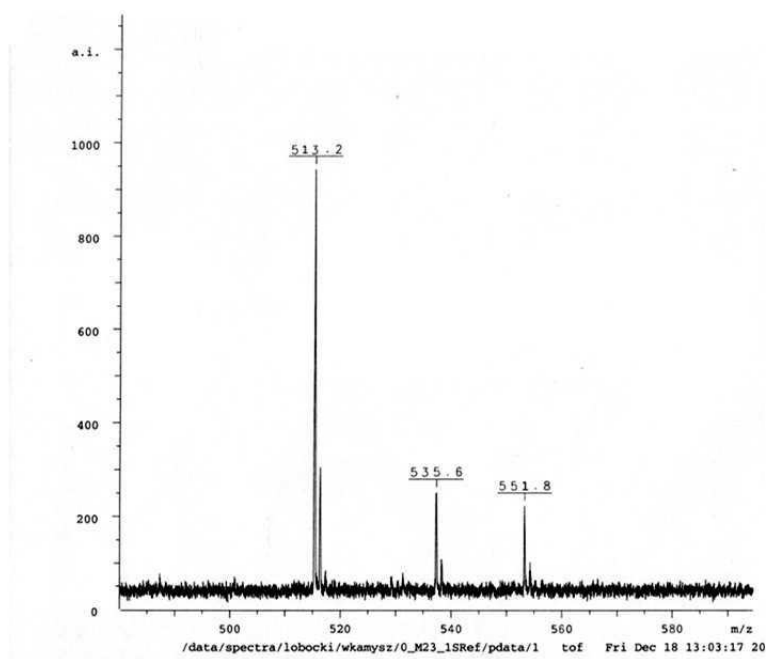
Rycina 68. Widmo masowe C<sub>12</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



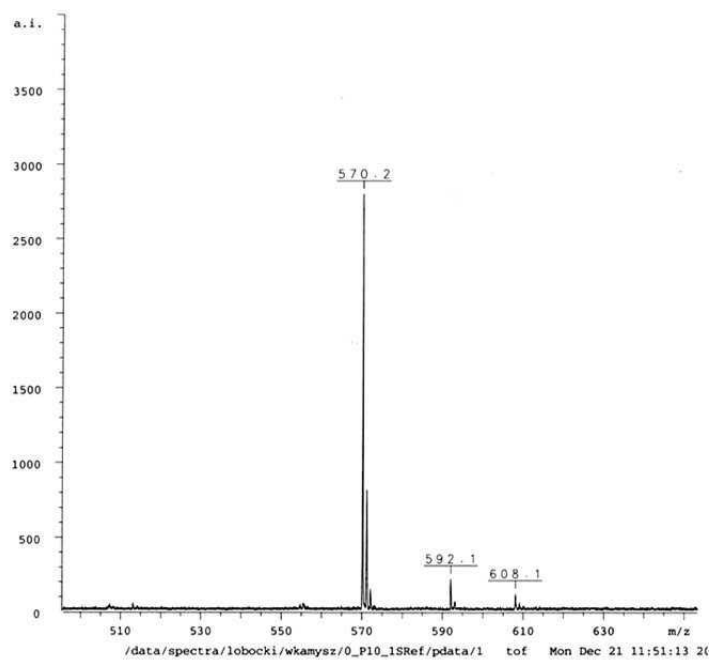
Rycina 69. Widmo masowe C<sub>12</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



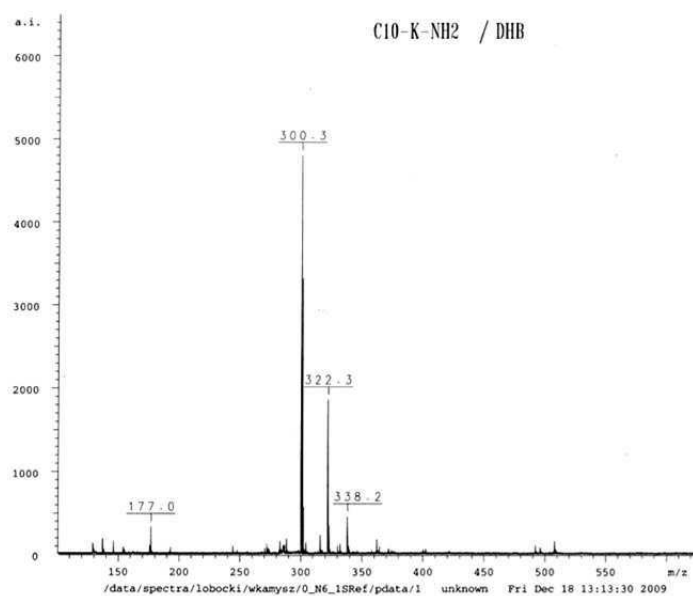
Rycina 70. Widmo masowe C<sub>12</sub>-KG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



Rycina 71. Widmo masowe C<sub>12</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

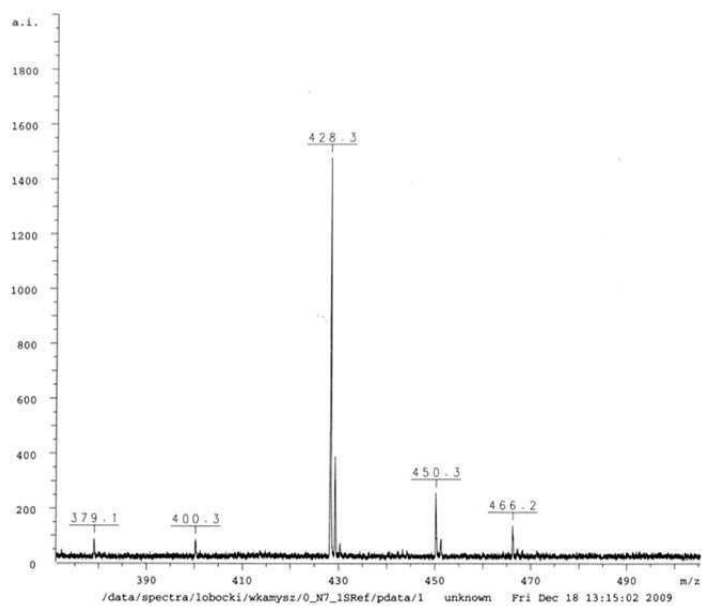


Rycina 72. Widmo masowe C<sub>12</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

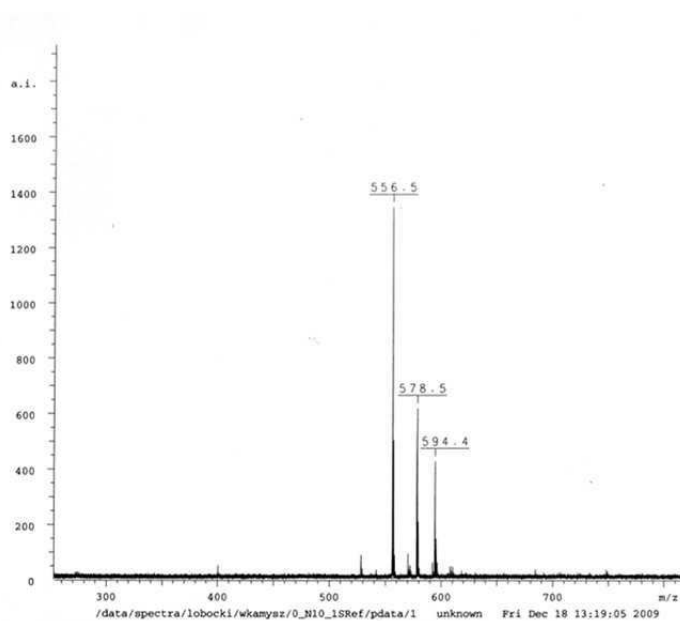


Rycina 73. Widmo masowe C<sub>10</sub>-K-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

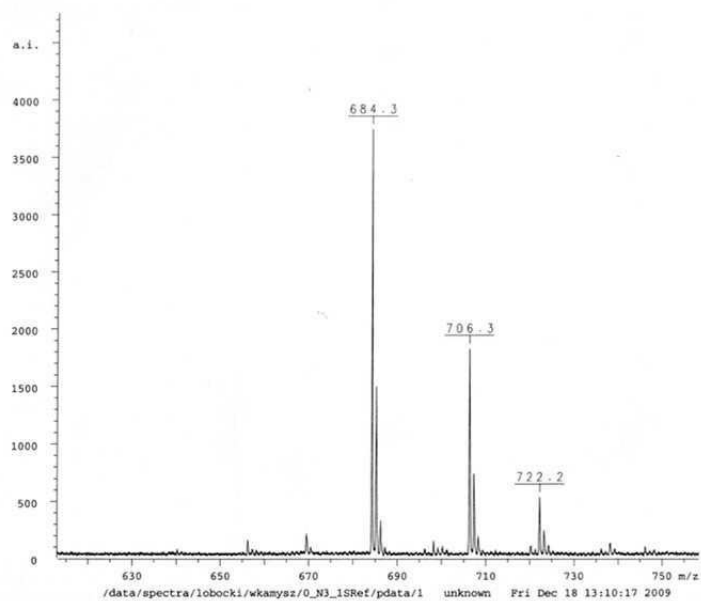




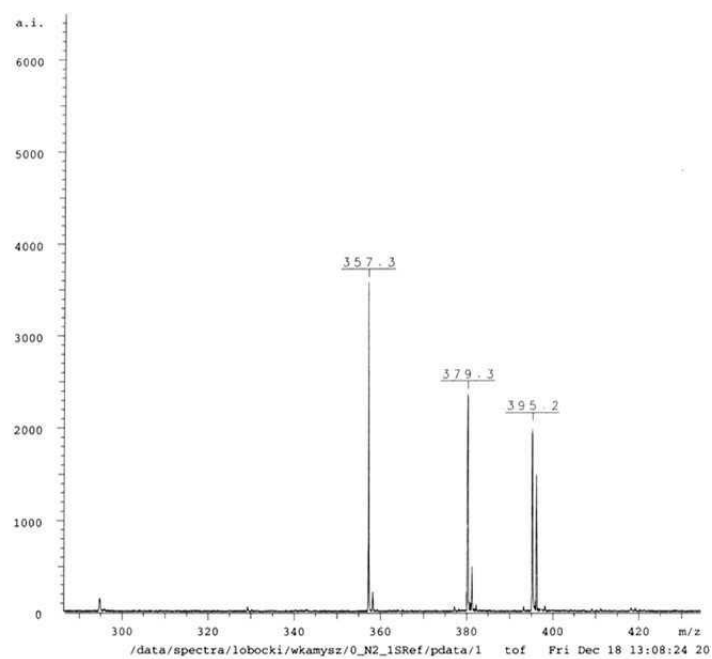
Rycina 74. Widmo masowe C<sub>10</sub>-KK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



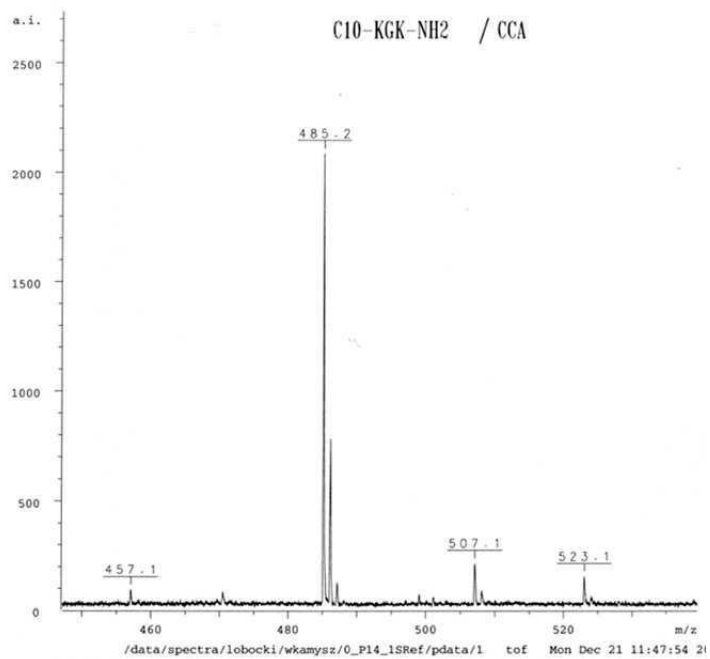
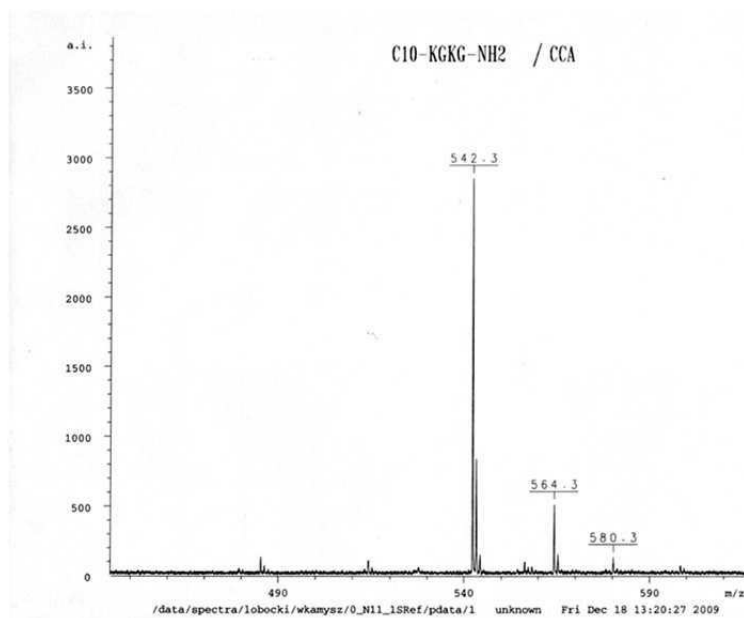
Rycina 75. Widmo masowe C<sub>10</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

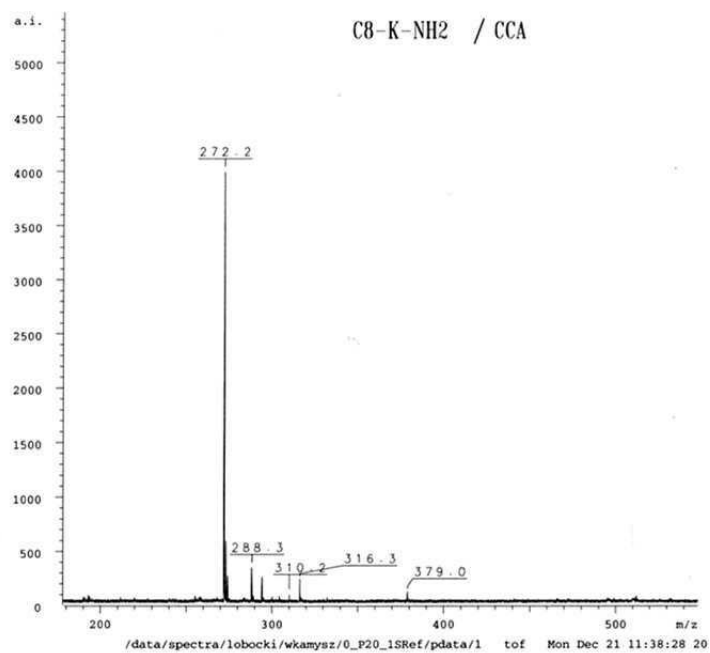


Rycina 76. Widmo masowe C<sub>10</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

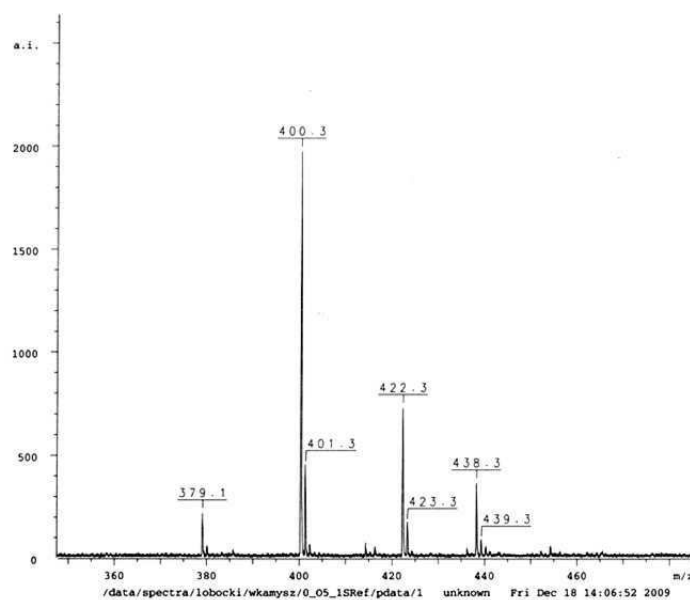


Rycina 77. Widmo masowe C<sub>10</sub>-KG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

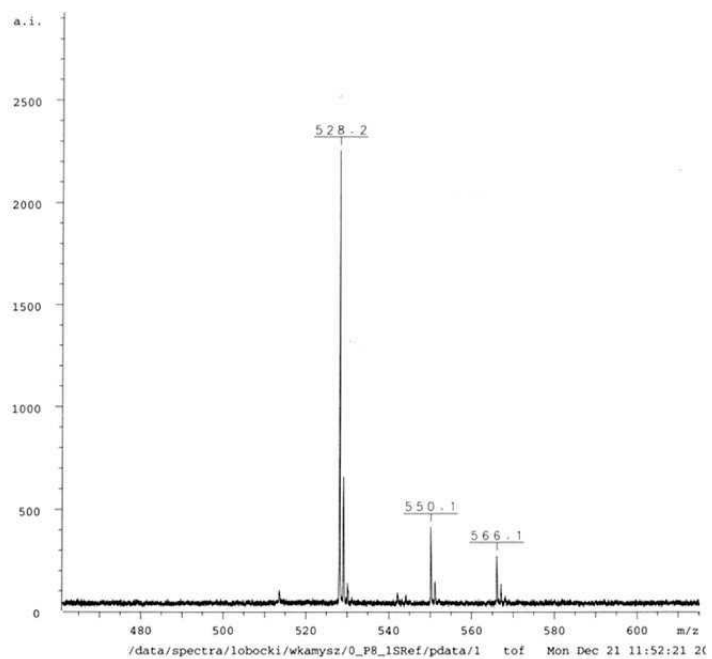
Rycina 78. Widmo masowe C<sub>10</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.Rycina 79. Widmo masowe C<sub>10</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



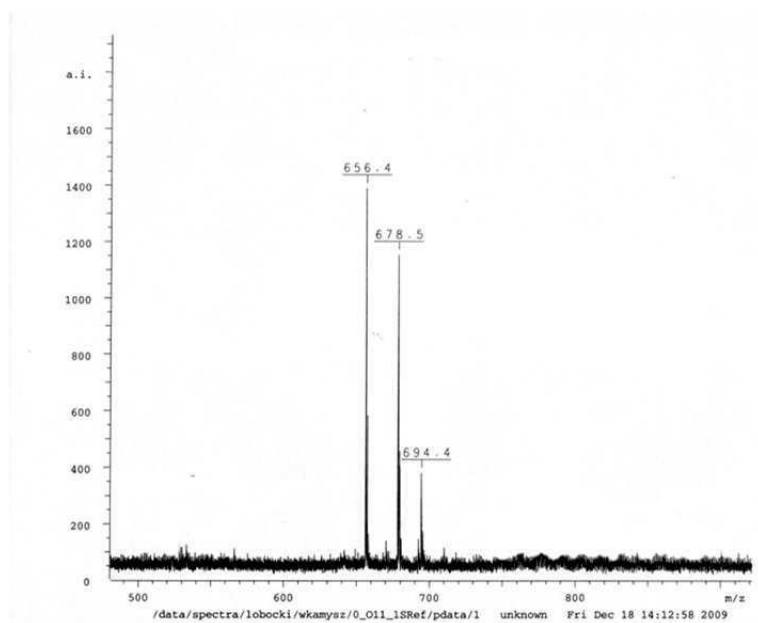
Rycina 80. Widmo masowe C<sub>8</sub>-K-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



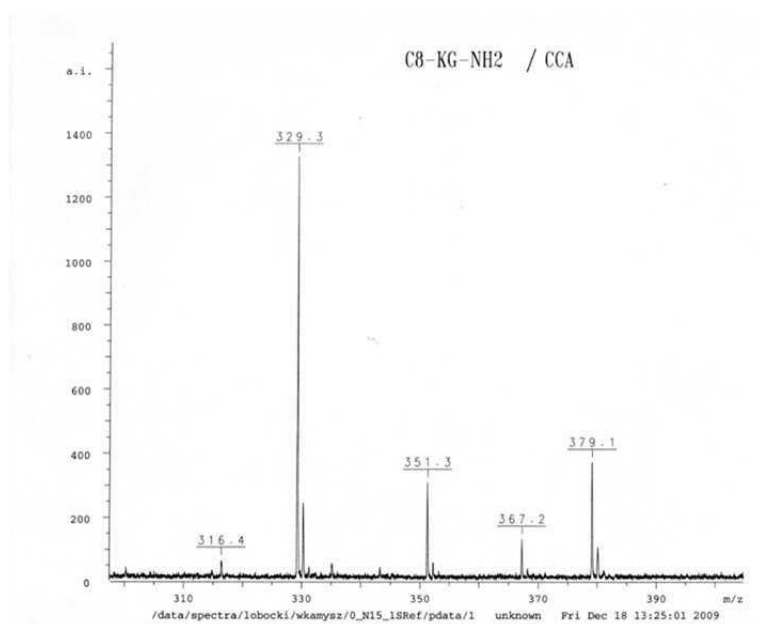
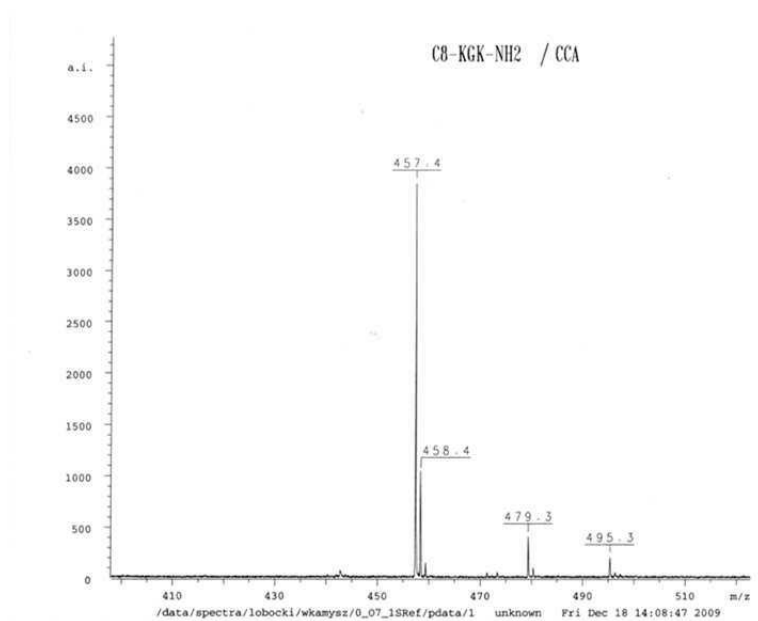
Rycina 81. Widmo masowe C<sub>8</sub>-KK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

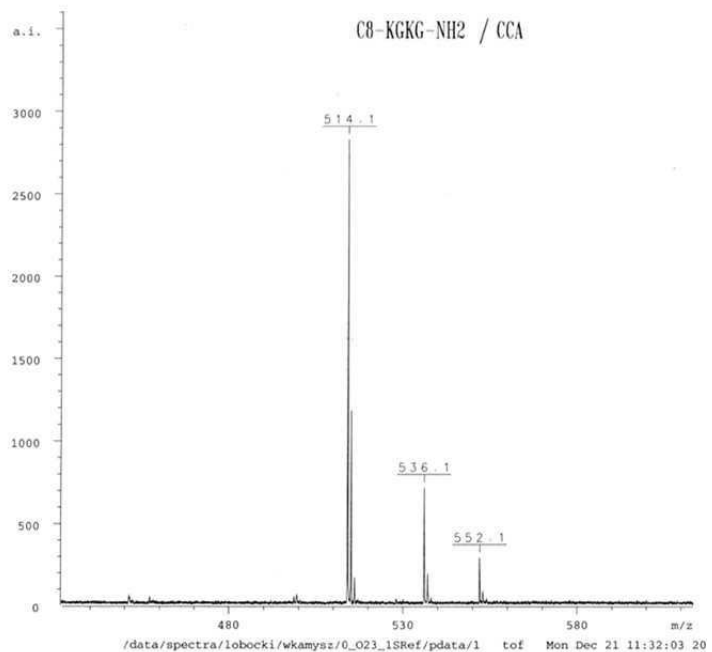


Rycina 82. Widmo masowe C<sub>8</sub>-KKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

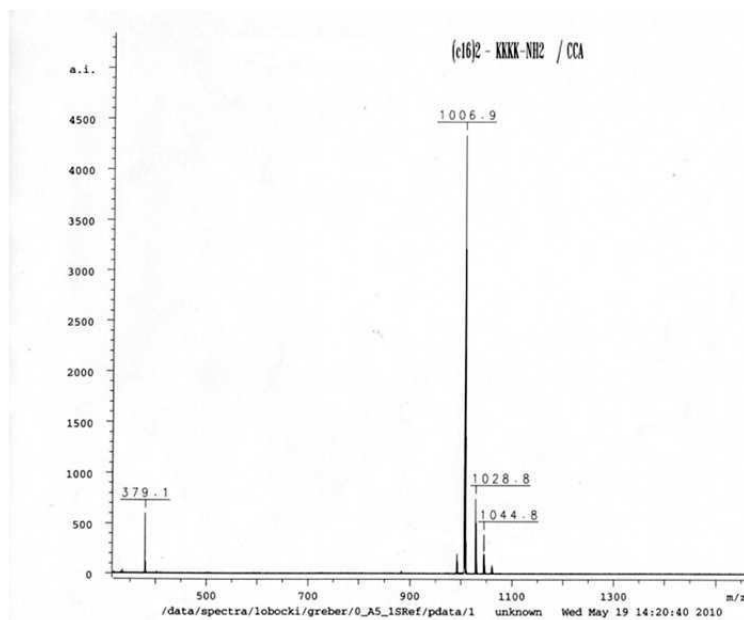


Rycina 83. Widmo masowe C<sub>8</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

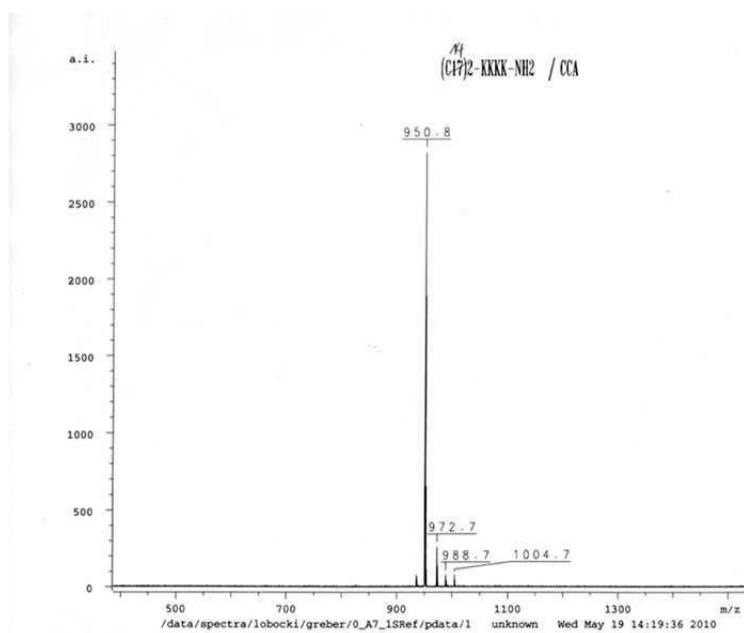
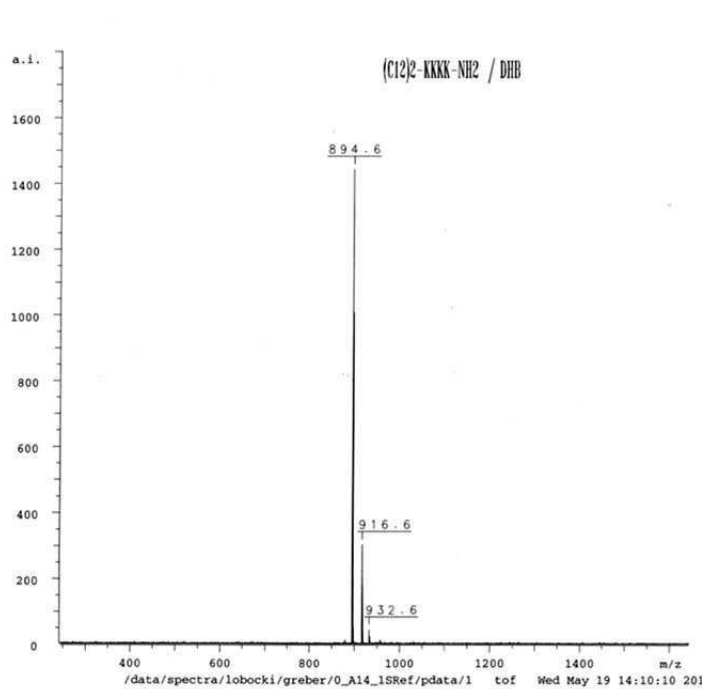
Rycina 84. Widmo masowe C<sub>8</sub>-KG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.Rycina 85. Widmo masowe C<sub>8</sub>-KGK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



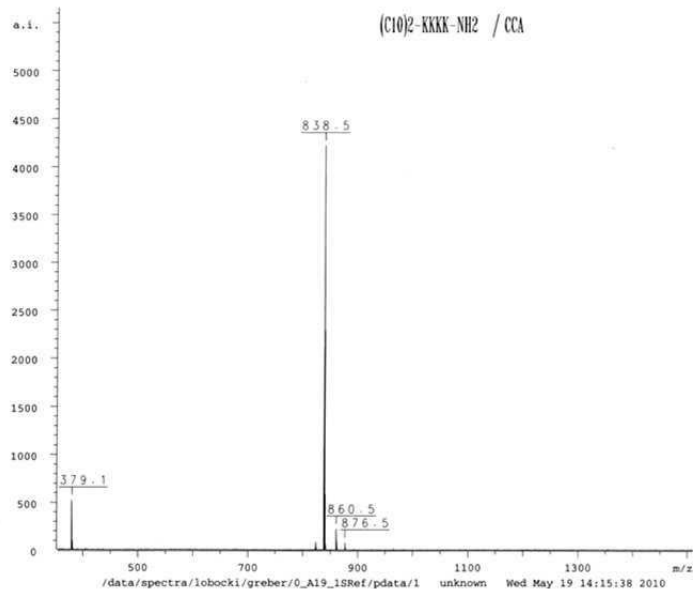
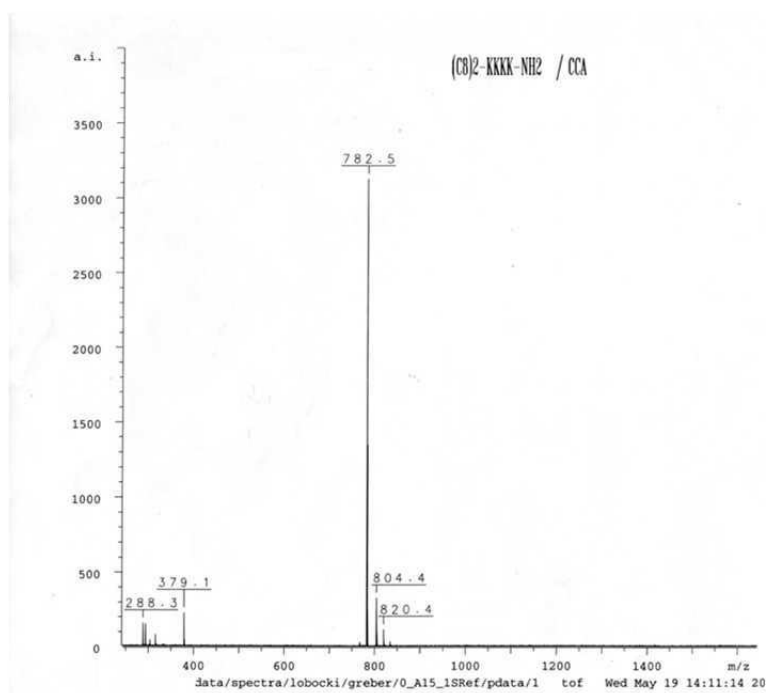
Rycina 86. Widmo masowe C<sub>8</sub>-KGKG-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.



Rycina 87. Widmo masowe (C<sub>16</sub>)<sub>2</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> wykonane metodą MALDI - TOF.

Rycina 88. Widmo masowe  $(C_{14})_2\text{-KKKK-NH}_2$  wykonane metodą MALDI - TOF.Rycina 89. Widmo masowe  $(C_{12})_2\text{-KKKK-NH}_2$  wykonane metodą MALDI - TOF.



Rycina 90. Widmo masowe  $(C_{10})_2\text{-KKKK-NH}_2$  wykonane metodą MALDI - TOF.Rycina 91. Widmo masowe  $(C_8)_2\text{-KKKK-NH}_2$  wykonane metodą MALDI - TOF.