

POLITECHNIKA POZNAŃSKA
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zakład Technologii Chemicznej



Rozprawa doktorska

**Projektowanie, synteza i właściwości farmakologiczne
aktywnych soli organicznych zawierających jony
występujące w przyrodzie**

mgr inż. Adriana Olejniczak

Promotor: dr hab. inż. Michał Niemczak, prof. PP

Poznań 2026

*Serdeczne wyrazy wdzięczności składam
dr hab. inż. Michałowi Niemczakowi, prof. PP
za niezwykle cenne wsparcie naukowe, inspirację oraz życzliwość,
za poświęcony czas, merytoryczne wskazówki i konstruktywne uwagi
i za nieustanne motywowanie do dalszego rozwoju, wiarę w moje możliwości
oraz stworzenie warunków do realizacji pracy badawczej i rozwoju naukowego.
Dziękuję również za atmosferę współpracy, która sprzyjała nie tylko naukowej rzetelności,
lecz także dawała poczucie swobody, otwartości i autentycznego zaangażowania.*

*Serdeczne podziękowania kieruję również do Współautorów publikacji naukowych,
w tym szczególnie
dr hab. inż. Danieli Gwiazdowskiej, prof. UEP,
dr hab. Annie Olejnik prof. UPP
oraz dr Danielowi Zientalowi,
z którymi miałam przyjemność współpracować podczas realizacji badań,
za wspólne zaangażowanie w rozwój prowadzonych prac badawczych.*

*Serdeczne podziękowania składam również
dr. inż. Damianowi Kaczmarkowi,
za pomoc, życzliwe rozmowy,
a także za dzielenie się doświadczeniem i wiedzą,
które miały istotny wkład w realizację niniejszej rozprawy
i uczyniły tę drogę znacznie łatwiejszą.*

Spis treści

WSTĘP LITERATUROWY	9
1. Leki na przestrzeni lat - definicja leku, zarys historyczny, substancje aktywne biologicznie.	9
2. Sole organiczne w farmacji	12
2.1. Koncepcja API-QASs	12
2.2. Wpływ doboru jonów na właściwości fizykochemiczne API-QASs	15
2.3. Charakterystyka pochodnych zawierających w swojej strukturze kation nikotynamidu	19
2.4. Charakterystyka pochodnych zawierających w swojej strukturze kation lidokainy	21
2.5. Związki pochodzenia naturalnego jako źródło anionu w API-QASs	24
3. Kluczowe właściwości farmakologiczne leków w zależności od drogi podania i przeznaczenia ...	26
3.1. Właściwości przeciwzapalne	26
3.2. Właściwości antybakteryjne	27
4. Drogi podawania leków – mechanizmy, zastosowania i ograniczenia	30
5. Bariery biologiczne i ich pokonywanie przez sole organiczne	32
5.1. Droga doustna	32
5.2. Droga skórna	35
6. Metody <i>in silico</i> w projektowaniu soli farmaceutycznych	37
6.1. Predykcja ADME	37
6.2. Ocena potencjału przeciwzapalnego i anestetycznego metodą dokowania molekularnego	40
5. Ekotoksyczność substancji farmaceutycznych	44
CEL I ZAKRES PRACY	48
HIPOTEZY BADAWCZE	50
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	51
Wykaz stosowanych odczynników znajduje się w aneksie (tabele A1-A8)	51
6.1. Sposoby prowadzenia syntez	51
6.1.1. Synteza soli potasowych kwasów organicznych	51
6.1.2. Synteza prekursorów soli z kationem nikotynamidu – reakcja czwartorzędowania nikotynamidu	51
6.1.3. Synteza prekursorów soli z kationem lidokainy – reakcja czwartorzędowania lidokainy	52
6.1.4. Synteza soli z kationem nikotynamidu	52
6.1.5. Synteza soli z kationem lidokainy	54
6.1.6. Otrzymywanie mieszaniny nikotynamidu i kwasu nikotynowego oraz kokryształów nikotynamidu i kwasu salicylowego, jak i kwasu <i>p</i> -aminobenzoowego	56
6.1.5. Otrzymywanie salicylanu lidokainy oraz mieszaniny lidokainy i kwasu <i>p</i> -aminobenzoowego	57

6.2. Analiza produktów	57
6.2.1. Oznaczanie zawartości jonów bromkowych w QASs metodą Mohra	57
6.2.2. Analiza spektroskopowa	58
6.2.3. Temperatura topnienia	58
6.2.4. Oznaczanie zawartości wody.....	59
6.2.5. Współczynnik podziału oktanol–woda	59
6.2.6. Ocena potencjału przeciwzapalnego: test denaturacji albuminy	59
6.2.7. Ocena aktywności antybakteryjnej: wyznaczanie parametrów MIC i MBC/MFC	60
6.2.8. Właściwości antybiofilmowe	61
6.2.9. Wizualizacja biofilmu za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej	62
6.2.10. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania QASs	62
6.2.11. Test PAMPA.....	63
6.2.12. Napięcie powierzchniowe (γ) i ciśnienie powierzchniowe (π).....	65
6.2.13. Pomiary kąta zwilżania	65
6.2.14. Rozpuszczalność badanych soli i układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH.....	65
6.2.15. Stabilność badanych soli oraz układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH.....	65
6.2.16. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (<i>Artemia franciscana</i>)	66
6.2.17. Określenie cytotoksyczności wobec ludzkich komórek jelitowych.....	67
6.2.18. Farmakokinetyka z zastosowaniem grafowych sygnatur molekularnych (pkCSM).....	67
6.2.19. Współczynnik przepuszczalności skóry (K_p)	68
6.2.20. Ocena aktywności przeciwzapalnej: dokowanie molekularne oparte na strukturze cyklooksygenazy-2 (COX-2)	68
6.2.21. Ocena aktywności znieczulających: dokowanie molekularne ukierunkowane na kanał sodowy (NaV1.7)	69
OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ	70
7.1. Bromki <i>N</i> -alkilnikotynamidu (1–7) jako prekursorzy do syntezy soli o właściwościach farmakologicznych.....	70
7.1.1. Synteza i analiza produktów	70
7.1.2. Współczynnik podziału oktanol–woda	72
7.1.3. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (<i>Artemia franciscana</i>)	74
7.2. Leki stosowane doustnie.....	76
7.2.1. Analiza nikotynianów <i>N</i> -alkilnikotynamidu (N1–N4) oraz <i>p</i> -aminobenzoesanów <i>N</i> -alkilnikotynamidu (P1–P4).....	76
7.2.1.1. Synteza i analiza produktów	76
7.2.1.2. Współczynnik podziału oktanol–woda	81

7.2.1.3. Ocena potencjału przeciwzapalnego: test denaturacji albuminy	82
7.2.1.4. Ocena potencjału przeciwzapalnego: dokowanie molekularne oparte na strukturze enzymu cyklooksigenazy-2 (COX-2)	84
7.2.1.5. Ocena aktywności antybakteryjnej: wyznaczanie parametrów MIC i MBC/MFC	87
7.2.1.6. Właściwości antybiofilmowe.....	89
7.2.1.7. Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego QASs	91
7.2.1.8. Test GIT–PAMPA	94
7.2.1.9. Napięcie powierzchniowe (γ) i ciśnienie powierzchniowe (π).....	99
7.2.1.10. Rozpuszczalność badanych soli i układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH.....	101
7.2.1.11. Stabilność badanych soli i układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH.....	102
7.2.1.12. Określenie cytotoksyczności wobec ludzkich komórek jelitowych.....	104
7.2.1.13. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (<i>Artemia franciscana</i>).....	106
7.2.1.14. Predykcja ADME.....	107
7.3. Leki do stosowania miejscowego na skórę.	110
7.3.1. Analiza salicylanów <i>N</i> -alkilnikotynamidu (S1–S7).....	110
7.3.1.1. Synteza i analiza produktów	110
7.3.1.2. Współczynnik podziału oktanol–woda	112
7.3.1.3. Ocena potencjału przeciwzapalnego: test denaturacji albuminy	113
7.3.1.4. Ocena potencjału przeciwzapalnego: dokowanie molekularne oparte na strukturze enzymu cyklooksigenazy-2 (COX-2)	115
7.3.1.5. Ocena aktywności antybakteryjnej: wyznaczanie parametrów MIC i MBC/MFC	117
7.3.1.6. Ocena przenikania związków przez barierę skórną z wykorzystaniem metody SKIN-PAMPA	119
7.3.1.7. Pomiary kąta zwilżania	122
7.3.1.8. Rozpuszczalność badanych soli i układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH.....	124
7.3.1.9. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (<i>Artemia franciscana</i>)	125
7.3.2. Analiza salicylanów <i>N</i> -alkilidokainy (SL1–SL3) oraz <i>p</i> -aminobenzoesanów <i>N</i> -alkilidokainy (PL1–PL3).....	126
7.3.2.1. Synteza i analiza produktów	126
7.3.2.2. Współczynnik podziału oktanol–woda	133
7.3.2.3. Rozpuszczalność w wodzie destylowanej i PBS	134
7.3.2.4. Ocena potencjału przeciwzapalnego: test denaturacji albuminy	135
7.3.2.5. Ocena potencjału przeciwzapalnego: dokowanie molekularne oparte na strukturze cyklooksigenazy-2 (COX-2)	138

7.3.2.6. Potencjał znieczulający: Potencjał znieczulający: dokowanie molekularne do kanałów sodowych (NaV1.7).....	140
7.3.2.7. Ocena przenikania związków przez barierę skórną z wykorzystaniem metody SKIN-PAMPA	141
7.3.2.8. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (<i>Artemia franciscana</i>)	144
PODSUMOWANIE I WNIOSKI	146
BIBLIOGRAFIA	148
STRESZCZENIE.....	165
ANEKS	171
DOROBIEK NAUKOWY	243

WSTĘP LITERATUROWY

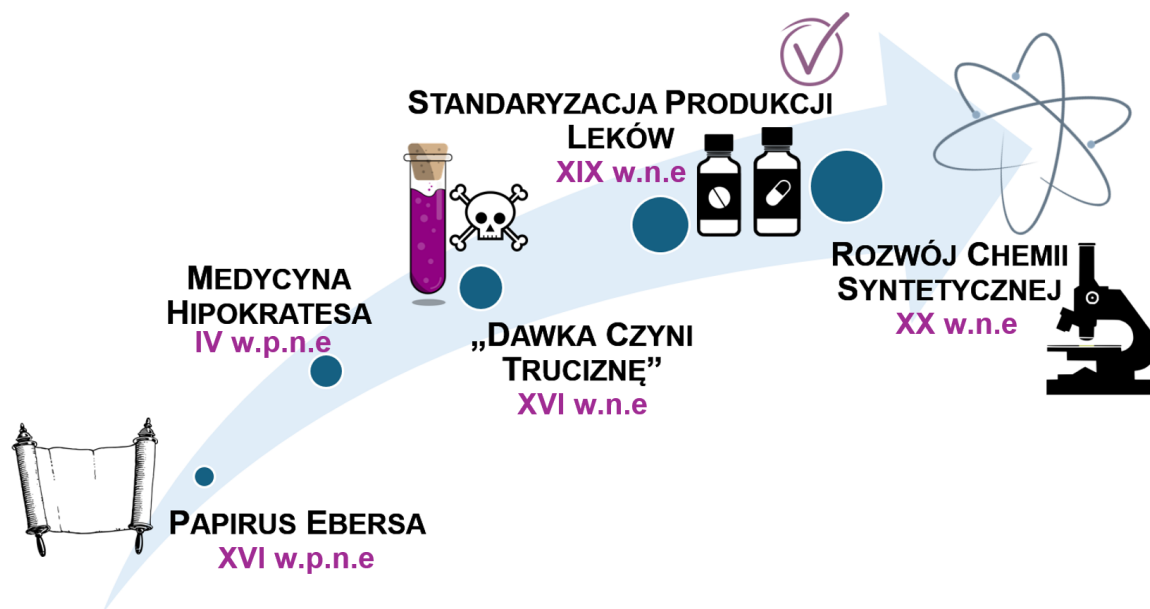
1. Leki na przestrzeni lat - definicja leku, zarys historyczny, substancje aktywne biologicznie.

Pojęcie leku jest jednym z fundamentalnych pojęć we współczesnej nauce o zdrowiu i farmakoterapii, a jego znaczenie jest ściśle regulowane przez prawo i praktykę kliniczną. W obecnym polskim systemie prawnym, opartym na przepisach *Prawa farmaceutycznego* (art. 2 pkt 32), lek definiuje się jako substancję lub mieszaninę substancji mającą właściwości zapobiegające chorobom lub lecznicze, podawaną w celu postawienia diagnozy, przywrócenia, poprawy lub modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu poprzez działanie farmakologiczne, immunologiczne lub metaboliczne. Definicja ta wyraźnie podkreśla cel terapeutyczny i diagnostyczny oraz aktywny wpływ na procesy biologiczne, wyróżniając produkty lecznicze spośród innych kategorii dostępnych na rynku.

Podobne podejście stosują międzynarodowe organy regulacyjne, takie jak EMA (ang. *European Medicines Agency*) i FDA (ang. *Food and Drug Administration*), definiując lek jako substancję wpływającą na strukturę lub funkcję organizmu i mającą na celu zapobieganie, łagodzenie lub leczenie chorób. Definicja WHO (ang. *World Health Organization*) jest nieco szersza, podkreślając znaczenie leków dla poprawy zdrowia publicznego, polityki lekowej i dostępności terapii. Wspólne dla wszystkich podejść jest stwierdzenie, że lek musi wykazywać udokumentowaną skuteczność i bezpieczeństwo, potwierdzone odpowiednimi badaniami naukowymi i oceną przedrejestracyjną. Kluczowym elementem produktu leczniczego jest substancja czynna (API, ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*), czyli związek odpowiedzialny za wywołanie efektu terapeutycznego poprzez specyficzny mechanizm farmakodynamiczny – interakcje z receptorami, enzymami, układem odpornościowym lub materiałem genetycznym komórki.¹ Substancja czynna charakteryzuje się również specyficznym profilem farmakokinetycznym, obejmującym wchłanianie, dystrybucję, metabolizm i eliminację, co bezpośrednio wpływa na dawkowanie i skuteczność terapeutyczną.² Oprócz API, lek zawiera również substancje pomocnicze, które pełnią funkcje technologiczne lub stabilizujące, a także umożliwiają stworzenie odpowiedniej postaci farmaceutycznej, co warunkuje biodostępność i bezpieczeństwo stosowania.³ Definicja leku wymaga również wyraźnego oddzielenia go od produktów niepodlegających regulacjom farmaceutycznym, mimo że często są one postrzegane jako alternatywy terapeutyczne. Suplementy diety nie są przeznaczone do leczenia ani diagnozowania chorób. Ich przeznaczeniem jest wyłącznie uzupełnienie diety i co warto podkreślić, nie wymagają badań klinicznych.⁴ Wyroby medyczne działają przede wszystkim poprzez mechanizmy fizyczne, a nie farmakologiczne, immunologiczne czy metaboliczne.⁵

Kosmetyki z kolei, działają jedynie powierzchownie i nie mogą modyfikować funkcji organizmu.^{6,7} Te granice są kluczowe nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale także dla ochrony pacjenta, reklamy produktu, jak i nadzoru rynku.

Historia medycyny sięga początków ludzkości i odzwierciedla równoległy rozwój wiedzy medycznej, chemii, biologii i systemów społecznych związanych z leczeniem (rysunek 1). Najwcześniejsze zapisy praktyk terapeutycznych pochodzą z cywilizacji starożytnego Bliskiego Wschodu i Egiptu, gdzie stosowano przede wszystkim naturalne środki lecznicze, przede wszystkim rośliny o właściwościach przeciwbólowych, przeciwzapalnych i przeczyszczających.⁸



Rysunek 1. Główne etapy rozwoju medycyny i praktyk terapeutycznych.

Źródła takie jak Papirus Ebersa wskazują na istnienie katalogów substancji o właściwościach leczniczych, stosowanych zarówno w leczeniu objawowym, jak i w rytuałach religijno-magicznych.⁹ W świecie grecko-rzymskim ujęcie leczenia w ramy naukowe jest uważane za znaczący krok w stronę jej rozwoju. Medycyna Hipokratesa i późniejsze koncepcje Galena stworzyły podwaliny późniejszej farmacji europejskiej, wprowadzając koncepcję równowagi humoralnej i katalogi surowców leczniczych.¹⁰ W średniowieczu tradycje farmakoterapeutyczne zachowały się przede wszystkim w środowisku monastycznym i arabskim.¹¹ Apteki klasztorne systematycznie uprawiały i przetwarzały rośliny lecznicze, podczas gdy medycyna islamska, reprezentowana przez Ibn Sinę (Awicennę), dokonała szerokiej syntezy wiedzy greckiej i perskiej.^{12,13} W tym okresie utrwaliła się koncepcja receptury i sporządzania leków zgodnie z opisanymi przepisami. Renesans i wczesna epoka nowożytna przyniosły stopniowe odejście od spekulatywnych modeli leczenia na rzecz eksperymentów. Prace Paracelsusa, który podkreślał, że „dawka czyni truciznę” i że substancje chemiczne mogą mieć działanie terapeutyczne, jeśli zostaną odpowiednio dobrane i zastosowane, stały się ważnym symbolem tej epoki.¹⁴ Prawdziwy przełom w historii medycyny nastąpił w XIX wieku wraz z rozwojem chemii

organicznej i farmakologii eksperymentalnej.^{15,16} Izolacja aktywnych alkaloidów, takich jak morfina, chinina, kofeina i nikotyna, umożliwiła określenie mechanizmów działania substancji oraz łatwiejszą kontrolę ich dawkowania.¹⁷ W tym czasie rozpoczęła się standaryzacja produkcji leków, a także pojawiły się pierwsze farmakopee.¹⁸ XX wiek był epoką gwałtownego rozwoju farmacji opartej na dowodach. Odkrycie penicyliny i wprowadzenie antybiotyków radykalnie zmieniło prognozowanie chorób zakaźnych, a rozwój chemii syntetycznej doprowadził do powstania wielu substancji wpływających na układ krążenia, ośrodkowy układ nerwowy i procesy metaboliczne. Wprowadzono badania kliniczne, nadzór regulacyjny i zasady nadzoru nad bezpieczeństwem farmakoterapii, co znacznie zmniejszyło ryzyko dla pacjentów i umożliwiło porównywanie skuteczności leczenia.^{19,20}

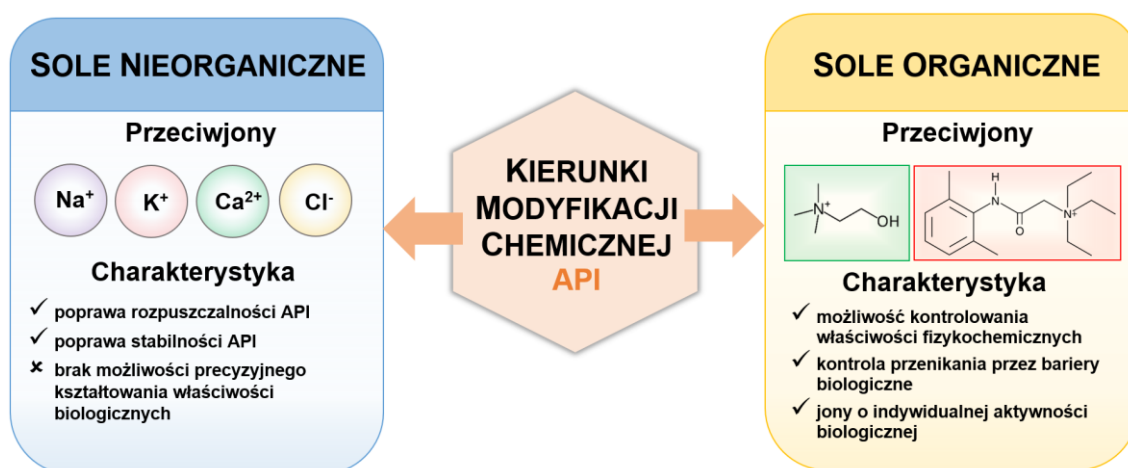
W XX wieku intensywny rozwój chemii syntetycznej pozwolił nie tylko na otrzymywanie zupełnie nowych klas związków, ale także na celową modyfikację struktur znanych już substancji czynnych w celu poprawy ich właściwości terapeutycznych, farmakokinetycznych i technologicznych. Kluczową rolę odegrały tu procesy prowadzące do powstawania tzw. soli substancji czynnych (ang. *API-salts*), jonowych form związków, które zachowując identyczny rdzeń farmakoforowy, charakteryzowały się korzystniejszymi parametrami rozpuszczalności, biodostępności i stabilności chemicznej.^{21–23} W praktyce umożliwiło to produkcję leków o lepszym współczynniku wchłaniania, niższych dawkach i mniejszej zmienności działania. Synteza soli stała się fundamentalnym narzędziem pokonywania ograniczeń formulacyjnych typowych dla wielu substancji słabo rozpuszczalnych, hydrofobowych lub niestabilnych w warunkach farmaceutycznych. Równolegle rozwijano podejścia umożliwiające połączenie dwóch biologicznie aktywnych cząsteczek w stabilne pary jonowe, co umożliwiało jednoczesną modulację wielu mechanizmów działania i optymalizację transportu przez bariery biologiczne.^{24,25} Ten typ projektowania leków, wpisywał się w szerszy trend tworzenia związków o wielopoziomowym profilu aktywności, zdolnych do synergistycznej interakcji z receptorami, enzymami lub kanałami jonowymi. Postęp technologiczny doprowadził również do powstania innowacyjnych systemów dostarczania substancji czynnych, umożliwiających kontrolowane, ukierunkowane uwalnianie API do określonych tkanek lub w wydłużonym czasie działania. Należą do nich plastry transdermalne²⁶, preparaty o przedłużonym uwalnianiu²⁷, liposomy²⁸ czy mikrokapsułki²⁹. Działania te miały na celu zwiększenie skuteczności terapeutycznej, minimalizację działań niepożądanych i poprawę przestrzegania zaleceń przez pacjentów. W tym sensie druga połowa XX wieku położyła podwaliny pod farmację opartą na inżynierii materiałowej, przewidywalnej farmakokinetyce i świadomej modyfikacji profilu farmakologicznego leku, co stało się jednym z filarów współczesnego podejścia do projektowania terapii.

2. Sole organiczne w farmacji

2.1. Koncepcja API-QASs

W kontekście farmacji sól farmaceutyczna to forma substancji czynnej (API), w której cząsteczka leku występuje jako jon dodatni lub ujemny i jest związana elektrostatycznie z odpowiednio dobranym przeciwjonem o przeciwnym ładunku. Innymi słowy, sól farmaceutyczna powstaje poprzez połączenie API z inną cząsteczką, tworząc stabilny układ jonowy^{23,30}. Należy podkreślić, że w tej formie API nie traci swojej tożsamości chemicznej ani aktywności biologicznej, lecz może funkcjonować w formie korzystniejszej z farmaceutycznego i klinicznego punktu widzenia. W farmacji sól nie jest uważana za substancję pomocniczą, lecz za pełnoprawną postać leku, która może znacząco wpływać na jego właściwości fizykochemiczne, farmakokinetyczne i technologiczne. Ta sama substancja czynna może występować w kilku różnych formach soli, z których każda charakteryzuje się inną rozpuszczalnością, stabilnością i szybkością uwalniania. Dlatego wybór odpowiedniej soli jest częścią świadomego projektowania leku, a nie jedynie krokiem technologicznym.

Pod względem chemicznym sole farmaceutyczne dzielą się na sole nieorganiczne i organiczne, w zależności od charakteru przeciwjonu (rysunek 2).³¹ Sole nieorganiczne najczęściej tworzą się z jonów prostych, takich jak kation sodu, potasu, wapnia, magnezu lub anion chlorkowy. Są one szeroko stosowane ze względu na dobrą tolerancję organizmu, łatwość syntezy i ugruntowaną rolę regulacyjną. Jednak ich funkcja ogranicza się głównie do poprawy rozpuszczalności lub stabilności API, bez możliwości dalszego, precyzyjnego kształtowania właściwości biologicznych.³²



Rysunek 2. Ogólna charakterystyka nieorganicznych oraz organicznych soli farmaceutycznych.

Sole organiczne natomiast wykorzystują związki organiczne o bardziej złożonej strukturze jako przeciwjony, które można projektować z uwzględnieniem specyficznych właściwości

fizykochemicznych. Pozwala to na świadomą kontrolę lipofilowości, temperatury topnienia, zdolności przenikania przez bariery biologiczne i interakcji z błonami komórkowymi.^{33,34}

W przeciwieństwie do soli nieorganicznych, przeciwjon organiczny może aktywnie wpływać na zachowanie leku w organizmie, a w niektórych przypadkach wykazywać własną aktywność biologiczną. Sól farmaceutyczna nie jest jedynie alternatywną postacią leku, ale strategicznym narzędziem w projektowaniu nowoczesnych terapii, umożliwiającym optymalizację działania substancji czynnej bez zmiany jej podstawowej struktury chemicznej. Współczesne apteki coraz częściej wykorzystują tę koncepcję w zaawansowany sposób, przechodząc od prostych soli nieorganicznych do bardziej złożonych układów, takich jak sole organiczne lub tzw. układy API-QAS (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient-Quaternary Ammonium Salt*).

Czwartorzędowe sole amoniowe (QASs, ang. *Quaternary Ammonium Salts*) stanowią szeroką i różnorodną grupę związków organicznych, których wspólną cechą jest obecność dodatnio naładowanego atomu azotu.^{35,36} W kontekście chemii i farmacji, QASs cieszą się szczególnym zainteresowaniem ze względu na swoje unikalne właściwości jonowe, stabilność, jak i zdolność do interakcji z układami biologicznymi. Związki te są od wielu lat stosowane jako środki dezynfekujące, konserwujące, surfaktanty, a coraz częściej także jako składniki nowoczesnych systemów farmaceutycznych.^{36–39} Z chemicznego punktu widzenia, cząsteczki QASs charakteryzują się atomem azotu trwale związanym z czterema podstawnikami organicznymi, co skutkuje trwałym dodatnim ładunkiem elektrycznym. W przeciwieństwie do amin pierwszorzędowych, drugorzędowych i trzeciorzędowych, które mogą ulegać procesom protonowania i deprotonowania w zależności od pH środowiska, QASs nie wykazują zdolności zmiany stopnia jonizacji. Oznacza to, że ich ładunek dodatni jest niezależny od warunków fizjologicznych i utrzymuje się w szerokim zakresie pH. Ta cecha jest kluczowa w przemyśle farmaceutycznym, ponieważ zapewnia przewidywalne zachowanie jonów cząsteczki zarówno w formulacji, jak i po podaniu.

Stały ładunek dodatni przekłada się na wysoką stabilność chemiczną QASs, co oznacza, że związki te nie ulegają łatwo przemianom chemicznym związanym z równowagą kwasowo-zasadową.⁴⁰ Skutkuje to stabilną formą kationową i przewidywalnymi oddziaływaniami elektrostatycznymi, co sprzyja ich zastosowaniu w układach jonowych. Kluczowym elementem struktury QASs jest obecność jednego lub więcej hydrofobowych łańcuchów alkilowych, których długość i struktura mogą być swobodnie modyfikowane podczas syntezy.^{40–42} To właśnie łańcuch alkilowy w dużej mierze determinuje właściwości fizykochemiczne QASs, takie jak lipofilowość, zdolność do samoorganizacji oraz interakcje z błonami lipidowymi. Wydłużenie łańcucha alkilowego zazwyczaj prowadzi do zwiększenia hydrofobowości i wzmocnienia

interakcji z błonami komórkowymi, podczas gdy krótsze łańcuchy sprzyjają lepszej rozpuszczalności w wodzie. Pozwala to na precyzyjne dostrojenie ich właściwości w zależności od planowanego zastosowania farmaceutycznego. Połączenie stałego ładunku dodatniego z hydrofobowym fragmentem molekularnym nadaje czwartorzędom solom amoniowym amfifilowy charakter, co oznacza, że mogą one jednocześnie oddziaływać z fazą wodną i lipidową. Ta właściwość leży u podstaw ich aktywności powierzchniowo czynnej i zdolności do integracji z błonami biologicznymi. Z tego powodu są one od dawna stosowane jako surfaktanty, emulgatory i składniki środków dezynfekujących.^{38,43}

W kontekście biologicznym QASs wykazują znaczącą aktywność przeciwdrobnoustrojową, szczególnie wobec bakterii i grzybów. Mechanizm tego działania jest związany z elektrostatyczną interakcją dodatnio naładowanej grupy amoniowej z ujemnie naładowanymi składnikami błon komórkowych drobnoustrojów, a następnie fizyczną destabilizacją struktury błony przez hydrofobowy łańcuch alkilowy.⁴⁴ Połączenie właściwości jonowych i hydrofobowych sprawia, że QASs są wyjątkowo skutecznymi związkami przeciwbakteryjnymi. Ich kationy, dzięki stabilności oraz możliwości precyzyjnego projektowania struktury, stanowią szczególnie interesujący element w koncepcji API-QAS. Właściwe zestawienie jonów pozwala nie tylko na stabilizację substancji czynnej, lecz także na aktywne kształtowanie jej właściwości biologicznych i farmaceutycznych, co czyni je istotnym elementem nowoczesnych strategii projektowania leków.

Ze względu na swoje unikalne właściwości, systemy API-QASs są szczególnie przydatne w zastosowaniach farmaceutycznych, gdzie tradycyjne postaci leków napotykać na znaczne ograniczenia. Jednym z najbardziej obiecujących obszarów są formułacje miejscowe, takie jak maści, kremy, żele i roztwory do stosowania na skórę i błony śluzowe.³⁷ Dzięki lepszej kontroli lipofilowości i obecności kationów QAS o właściwościach powierzchniowo czynnych, systemy API-QAS mogą charakteryzować się lepszą penetracją w głąb warstw skóry i równomiernym rozprowadzaniem substancji czynnej w miejscu aplikacji. Kolejnym ważnym obszarem zastosowań są systemy transdermalne, gdzie kluczowym wyzwaniem jest pokonanie bariery naskórkowej i zapewnienie kontrolowanego transportu substancji czynnej do krążenia ogólnego.⁴⁵ Dzięki amfifilowej naturze i zdolności do regulacji właściwości jonowych, systemy API-QAS mogą działać zarówno jako formułacja leku, jak i środek wspomagający penetrację. Pozwala to na projektowanie systemów transdermalnych o zwiększonej skuteczności i stabilności, bez konieczności stosowania agresywnych środków wspomagających penetrację.⁴⁵

Systemy API-QAS, w tym ciecze jonowe (API-ILs, ang. *Active Pharmaceutical Ingredient-Ionic Liquids*), czyli unikalna podgrupa API-QAS charakteryzująca się temperaturą topnienia poniżej temperatury 100 °C, stanowią nie tylko nowoczesne leki nowej

generacji,⁴⁶ ale także skutecznie wspomagać transport przez nabłonek jelitowy i służyć jako zaawansowane doustne systemy dostarczania leków. Mechanizmy te wynikają nie tylko ze zmian rozpuszczalności, ale również z aktywnej interakcji z barierą jelitową. Dowiedziono, że API-ILs mogą tymczasowo modyfikować organizację lipidową błon enterocytów lub modyfikować połączenia pomiędzy komórkami nabłonka, prowadząc do zwiększonej przepuszczalności cząsteczek. Potencjalnie oznacza to, że API-QASs mogą przyczyniać się do zwiększonego transportu substancji terapeutycznych przez nabłonek jelitowy, poprawiając ich wchłanianie i biodostępność po podaniu doustnym.⁴⁷

Ponadto właściwości układów opartych na API-QASs są szczególnie istotne w przypadku małych cząsteczek o ograniczonej rozpuszczalności lub silnej polarności, dla których konwencjonalne nośniki i formułacje często okazują się nieskuteczne. Systemy dostarczania leków oparte na ILs, będących podgrupą QASs, wykazały również obiecujące wyniki w przypadku peptydów i białek, które z natury są wrażliwe na degradację enzymatyczną oraz działanie bariery śluzowej jelit. Oznacza to, że API-QASs, jako szersza grupa soli organicznych, mogą pełnić funkcję doustnych systemów dostarczania leków zapewniając jednocześnie kontrolę nad profilem uwalniania. Co więcej, dzięki zdolności do stabilizacji struktury białek, ograniczania denaturacji oraz ułatwiania transportu przez nabłonek jelitowy, układy API-QAS mogą być projektowane w celu zwiększenia biodostępności doustnej peptydów i białek, co stanowi jedno z największych wyzwań współczesnych strategii terapeutycznych.⁴⁷ To podejście nie tylko integruje unikalne właściwości tych soli organicznych, ale także podkreśla potencjał API-QAS jako wszechstronnej platformy dostarczania leków.

2.2. Wpływ doboru jonów na właściwości fizykochemiczne API-QASs

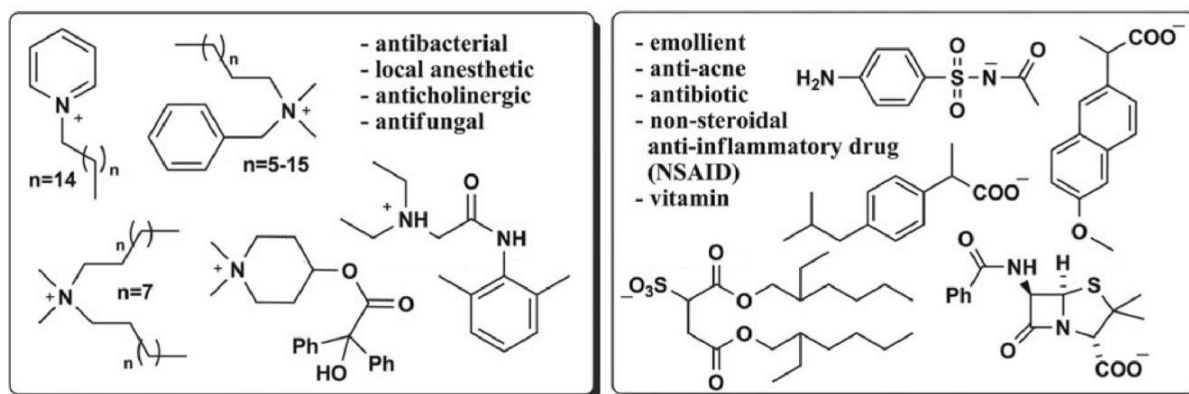
Kluczowym aspektem koncepcji API-QASs jest to, że właściwości końcowej soli nie wynikają wyłącznie z charakteru substancji czynnej, ale mogą być wynikiem synergistycznej interakcji np. między anionem aktywnym farmaceutycznie a kationem organicznym. Oznacza to, że API-QAS należy postrzegać jako nowy, funkcjonalny układ jonowy, a nie prostą sumę cech jego składników. W tym podejściu zarówno anion, jak i kation współdeterminują rozpuszczalność, lipofilowość, stabilność, przepuszczalność przez bariery biologiczne i także potencjalną aktywność biologiczną całego układu. W klasycznych solach farmaceutycznych, zwłaszcza zawierających jony nieorganiczne, zmiana przeciwjonu najczęściej prowadzi do umiarkowanych różnic w rozpuszczalności lub stabilności, bez znaczącego wpływu na inne parametry (rysunek 2). W przypadku API-QASs sytuacja jest zasadniczo inna, ponieważ kation QAS jest strukturalnie złożonym i funkcjonalnym elementem układu. Jej struktura, w szczególności długość i rodzaj

łańcucha alkilowego, rodzaj podstawników i stopień hydrofobowości, bezpośrednio wpływa na sposób, w jaki para jonowa oddziałuje ze środowiskiem chemicznym i biologicznym. Literatura wielokrotnie wskazuje, że zmiana pojedynczego elementu strukturalnego kationu w QASs może radykalnie zmienić zachowanie całego układu API-QAS. Badania soli niesteroidowych leków przeciwzapalnych z kationami QASs wykazały, że wydłużenie łańcucha alkilowego w kationie prowadzi do znacznego wzrostu lipofilowości i zwiększonej zdolności przenikania przez błony lipidowe, w tym przez barierę skórną.^{33,48,49} Inne doniesienia literaturowe opisują przypadki, w których tworzenie par jonowych QASs z API może prowadzić do przejścia od klasycznych, krystalicznych ciał stałych do niskotopliwych soli, a w niektórych przypadkach nawet do cieczy jonowych. Zjawisko to wynika z wydłużania łańcucha alkilowego w kationach czwartorzędowych amoniowych, które zwiększa zaburzenie uporządkowania sieci krystalicznej, obniża energię sieci krystalicznej oraz w konsekwencji temperaturę topnienia.⁵⁰ Na przestrzeni lat dowiedziono, że takie układy charakteryzują się odmienną reologią, zwiększoną jednorodnością i zmodyfikowanym profilem uwalniania substancji czynnej. Co ważne, sama substancja czynna pozostaje chemicznie niezmieniona, a zaobserwowane różnice wynikają wyłącznie z innego doboru przeciwjonu. Synergistyczny charakter w układach API-QASs jest również widoczny w kontekście badań biologicznych. W literaturze opisano układy, w których połączenie przeciwzapalnego API z kationem QAS o właściwościach przeciwbakteryjnych skutkowało powstaniem formułacji o podwójnym profilu aktywności (tzw. leki wielofunkcyjne). W takich przypadkach API zapewniało główny efekt terapeutyczny, podczas gdy QAS wzmacniał aktywność przeciwdrobnoustrojową i ułatwiał kontakt między systemem a błonami komórkowymi drobnoustrojów.^{51–53} Efekt ten był wyraźnie uzależniony od struktury QASs, gdzie zbyt krótkie łańcuchy alkilowe nie zapewniały odpowiedniej aktywności, a zbyt długie, choć odznaczały się zwiększoną aktywnością antybakteryjną, jednocześnie mogły prowadzić do zwiększonej cytotoksyczności, znacząco ograniczającej potencjał aplikacyjny nowo otrzymanego leku.^{54,55} Odpowiednie zaprojektowanie struktury API-QASs ma zatem istotne implikacje dla bezpieczeństwa i tolerancji biologicznej. Zmiany w strukturze kationu mogą wpływać na selektywność interakcji z błonami komórkowymi bakterii w porównaniu z błonami komórkowymi eukariotycznymi, co znajduje odzwierciedlenie w profilu toksyczności wobec człowieka jak organizmów żyjących w środowisku. Literatura wskazuje, że racjonalne projektowanie par jonowych może zmniejszyć działania niepożądane, jednocześnie utrzymując lub wzmacniając pożądane właściwości terapeutyczne.^{25,54,56,57}

Rozpuszczalność substancji czynnej jest jednym z kluczowych parametrów decydujących o jej biodostępności, skuteczności terapeutycznej i możliwościach zastosowania w wybranych formułacjach.^{58,59} Tworzenie par jonowych obejmujących kationy QASs może zwiększyć

hydrofobowość i powinowactwo API do faz lipidowych, co może sprzyjać transportowi przez bogate w lipidy bariery biologiczne, takie jak warstwa rogowa naskórka.^{60–62} Zwiększona lipofilowość sprzyja lepszej kompatybilności z lipidowymi składnikami skóry i ułatwia przenikanie przez bariery biologiczne, które w dużej mierze składają się z lipidów. Jednocześnie należy podkreślić, że zwiększenie lipofilowości poprzez zastosowanie QASs może prowadzić do zmniejszenia rozpuszczalności w wodzie całego układu, zwłaszcza w przypadku kationów zawierających długie, liniowe łańcuchy alkilowe, takie jak heksadecylowy czy dłuższy. Z drugiej strony zastosowanie krótszych łańcuchów alkilowych lub wprowadzenie grup polarnych, może prowadzić do utrzymania, a nawet zwiększenia rozpuszczalności w wodzie.^{63,64}

Lipofilowość, często wyrażana jako współczynnik podziału oktanol–woda ($\log K_{OW}$), jest jednym z kluczowych parametrów określających zachowanie się substancji czynnej w organizmie. $\log K_{OW}$ opisuje stosunek stężenia związku w fazie lipidowej do stężenia w fazie wodnej i jest wskaźnikiem skłonności cząsteczki do akumulacji w środowisku hydrofobowym. W przypadku układów API-QASs, obecność hydrofobowego łańcucha alkilowego w kationie QASs oraz amfifilowy charakter całej pary jonowej powodują, że $\log K_{OW}$ takich układów jest często wyższy niż $\log K_{OW}$ samego API lub jego klasycznych soli nieorganicznych. Wskazuje to na większe powinowactwo układu jonowego do lipidów i środowisk hydrofobowych. Zwiększona lipofilowość sprzyja przenikaniu przez błony biologiczne, takie jak skóra czy nabłonek jelitowy. Warstwa rogowa naskórka (łac. *stratum corneum*) pełni funkcję bariery lipidowej, dlatego efektywność transportu przez tę strukturę jest w dużej mierze uzależniona od właściwości hydrofobowych penetrujących cząsteczek. Związki charakteryzujące się wyższą wartością $\log K_{OW}$ wykazują większe powinowactwo do lipidowych składników skóry, co ułatwia ich dyfuzję do warstw naskórka oraz może zwiększać lokalną dostępność API w miejscu podania. W konsekwencji układy o podwyższonej lipofilowości mogą wykazywać większą retencję w warstwach lipidowych skóry, sprzyjając przedłużonemu działaniu miejscowemu przy jednoczesnym ograniczeniu przenikania do krążenia ogólnego.⁴⁹ Jest to szczególnie istotne w przypadku preparatów miejscowych, takich jak kremy, maści czy żele, gdzie pożądane jest uzyskanie efektu terapeutycznego w miejscu aplikacji przy minimalizacji działań ogólnoustrojowych. Podobna zależność obserwowana jest również w przypadku podania doustnego, gdzie umiarkowana lipofilowość może sprzyjać przenikaniu przez nabłonek jelitowy, wpływając na wchłanianie oraz biodostępność substancji czynnej.⁶⁵



Rysunek 3. Przykłady struktur chemicznych (kationów i anionów) determinujących określone właściwości biologiczne.⁶⁶

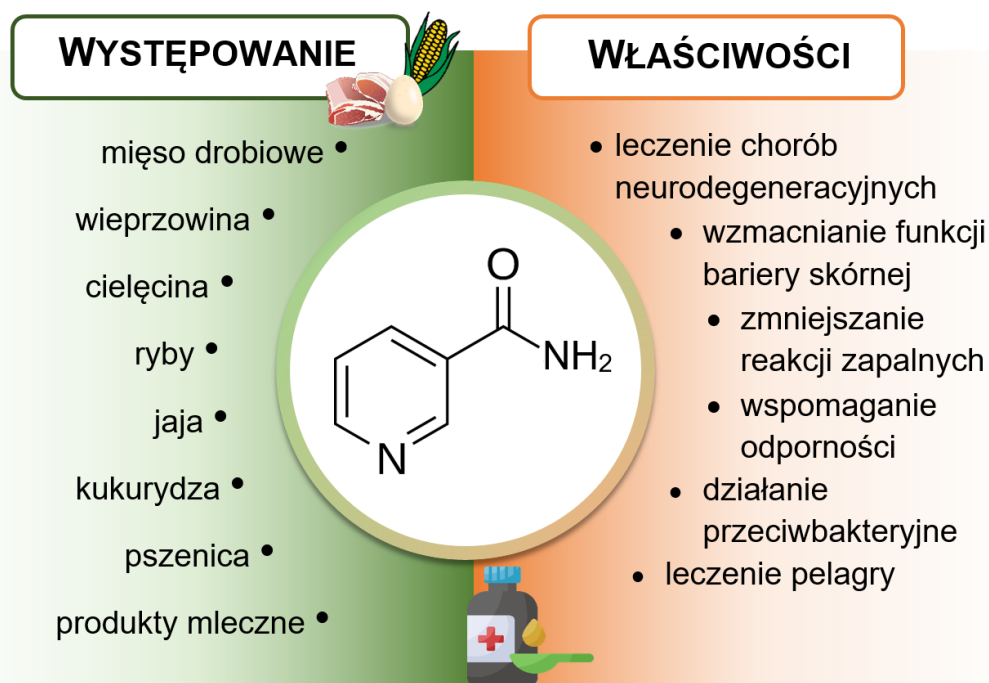
Należy podkreślić, że jednym z najciekawszych i najbardziej innowacyjnych aspektów systemów typu API-QAS jest możliwość modulowania ich aktywności biologicznej poprzez odpowiedni dobór kationu i anionu, wykraczający poza działanie samego składnika aktywnego, co ilustruje rysunek 3. Czwartorzędowe sole amoniowe są powszechnie znane ze swojej aktywności przeciwbakteryjnej, jak i przeciwgrzybiczej wynikającej z ich zdolności do oddziaływania z błonami komórkowymi drobnoustrojów.^{24,53,67} Wprowadzenie API do struktury QASs powoduje, że ta aktywność nie zostanie utracona, ale może być utrzymana lub modyfikowana, w zależności od struktury użytego kationu. Szczególnie istotnym zjawiskiem obserwowanym w układach API-QASs jest efekt synergii, w którym aktywność biologiczna całego układu jest większa lub bardziej kompleksowa w porównaniu z sumą aktywności poszczególnych składników.^{33,68} Stany zapalne skóry i zmiany dermatologiczne często współwystępują z infekcjami bakteryjnymi. Dzięki połączeniu działania przeciwzapalnego i przeciwbakteryjnego preparat może jednocześnie wspierać leczenie objawów skórnych oraz typowych infekcji bakteryjnych, które w innych przypadkach wymagają antybiotyków.^{69,70} Takie podejście eliminuje konieczność stosowania kilku odrębnych substancji czynnych, zmniejszając tym samym obciążenie organizmu, upraszczając skład formułacji i ograniczając ryzyko interakcji między składnikami.

Wybór pary jonowej pełni zatem funkcję projektową na wielu poziomach, łącząc aspekty chemiczne, farmaceutyczne i biologiczne. Zmieniając długość łańcucha alkilowego w QASs, rodzaj podstawników lub naturę chemiczną anionu API, możliwe jest „dostrojenie” układu jonowego do specyficznych wymagań aplikacji bez konieczności modyfikowania samej struktury chemicznej API. W praktyce oznacza to, że projektowanie soli API-QASs jest świadomym narzędziem optymalizacji leków, umożliwiającym jednoczesne osiągnięcie kilku celów: poprawy biodostępności, zwiększenia stabilności, dostosowania właściwości lokalnych lub systemowych oraz wprowadzenia synergistycznych efektów biologicznych. To podejście odróżnia API-QASs

od tradycyjnych soli farmaceutycznych i umieszcza je w obszarze nowoczesnego, funkcjonalnego projektowania leków.

2.3. Charakterystyka pochodnych zawierających w swojej strukturze kation nikotynamidu

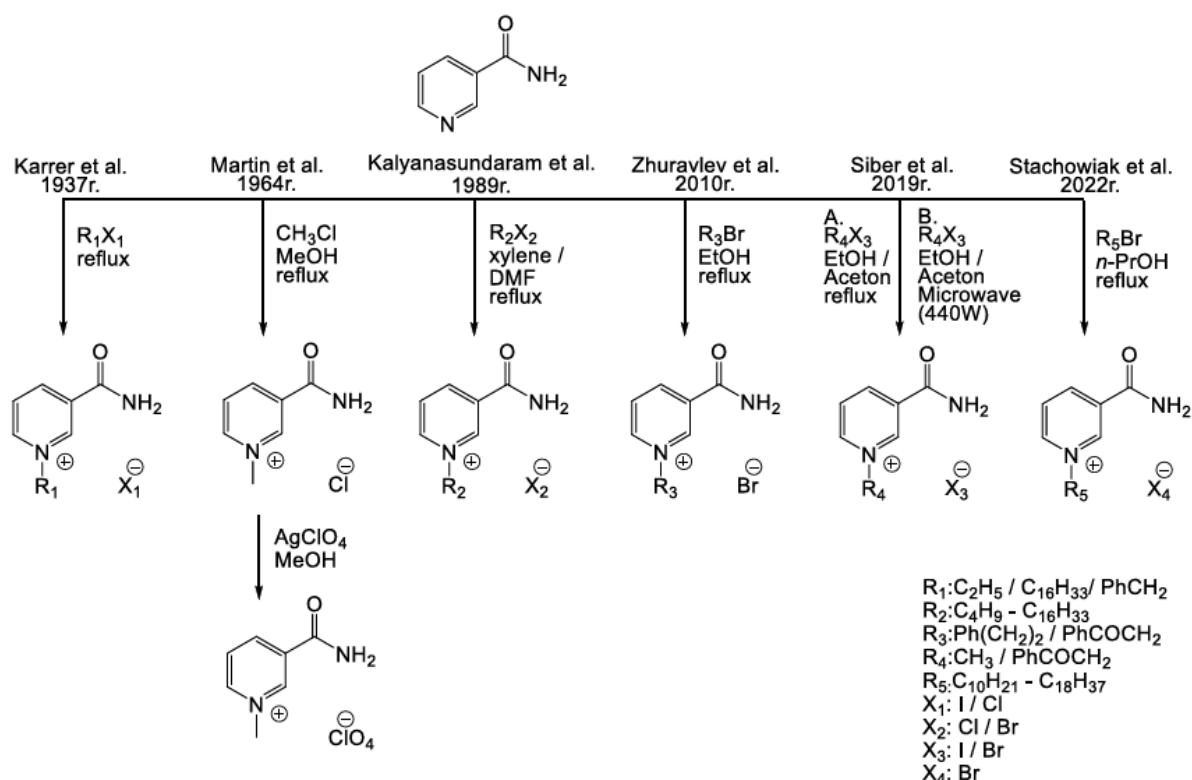
Nikotynamid (NA) znany jest również jako lub jako jedna z form witaminy B₃. Związek ten charakteryzuje się zróżnicowanym spektrum aktywności biologicznej, obejmującym korzystny wpływ na zdrowie skóry oraz działanie neuroprotektoryjne. NA naturalnie znaleźć można m.in. w mięsie, rybach, jajach czy produktach mlecznych. Ponadto występuje także w dojrzałych ziarnach zbóż, takich jak kukurydza i pszenica, gdzie wiąże się z cząsteczkami cukru w postaci glikozydów. Jest często stosowany jako suplement diety i lek w zapobieganiu i leczeniu pelagry, choroby Alzheimera) i zaburzeń psychicznych.⁷¹ NA jest substancją w pełni biokompatybilną i niskotoksyczną (bezpieczna dzienna dawka sięga 1000 mg/kg masy ciała).⁷¹ Jego zdolność do wzmacniania funkcji bariery skórnej i zmniejszania reakcji zapalnych uczyniła go ważnym składnikiem aktywnym w leczeniu schorzeń dermatologicznych, takich jak trądzik pospolity i trądzik różowaty (rysunek 4).



Rysunek 4. Struktura nikotynamidu, jego występowanie w naturze oraz kluczowe właściwości.

NA odgrywa kluczową rolę w reakcjach enzymatycznych, wspomagając procesy regeneracyjne i odpornościowe. Oprócz podstawowych funkcji biologicznych, wykazuje również działanie przeciwbakteryjne, co czyni go obiecującym kandydatem do terapii przeciwinfekcyjnych.⁷² Właściwości przeciwzapalne tej formy witaminy B₃ są dobrze udokumentowane, co czyni ją szczególnie cennym składnikiem, niezbędnym do utrzymywania

optymalnego stanu zdrowia.⁷³ Ponadto **NA** jest szeroko stosowany w suplementach diety i preparatach dermatologicznych, gdzie wspomagają regenerację skóry, metabolizm i zmniejsza stany zapalne. Te właściwości czynią go zatem atrakcyjną podstawą do ich wykorzystania jako produktów farmaceutycznych *per se*. Obecnie istnieje wiele doniesień skupiających się na derywatach **NA**, który jest powszechnie znany jako atrakcyjny surowiec do syntez chemicznych ze względu nie tylko na bogaty zakres właściwości, ale także opłacalność ekonomiczną. W przeszłości podejmowano różne próby modyfikacji jego struktury poprzez przyłączenie podstawników alkilowych do azotu w jego pierścieniu pirydynowym.³³ Najważniejsze odkrycia dotyczące modyfikacji strukturalnych **NA** poprzez przyłączanie do łańcucha alkilowego do atomu azotu, znajdującego się w pierścieniu pirydynowym podsumowano na rysunku 5.



Rysunek 5. Podsumowanie opisanych reakcji czwartorzędowania nikotynamidu (**NA**) halogenkami alkilowymi.

Znane są również pochodne jonowe **NA** utworzone przez wymianę anionu halogenkowego na jon wykazujący aktywność biologiczną.⁷¹ Zaprojektowane QASs składały się z kationu *N*-alkilnikotynamidu oraz komercyjnie dostępnych anionów herbicydowych: 2,4-dichlorofenoksyoctanowego (2,4-D) i 4-chloro-2-metylofenoksyoctanowego (MCPA). Przeprowadzone testy potwierdziły silny wpływ długości łańcucha alkilowego w produktach na właściwości fizykochemiczne, a także na rozwój chabra bławatka (*Centaurea cyanus*) i rzepaku ozimego (*Brassica napus*). Większość badanych soli wykazała istotnie lepszą aktywność

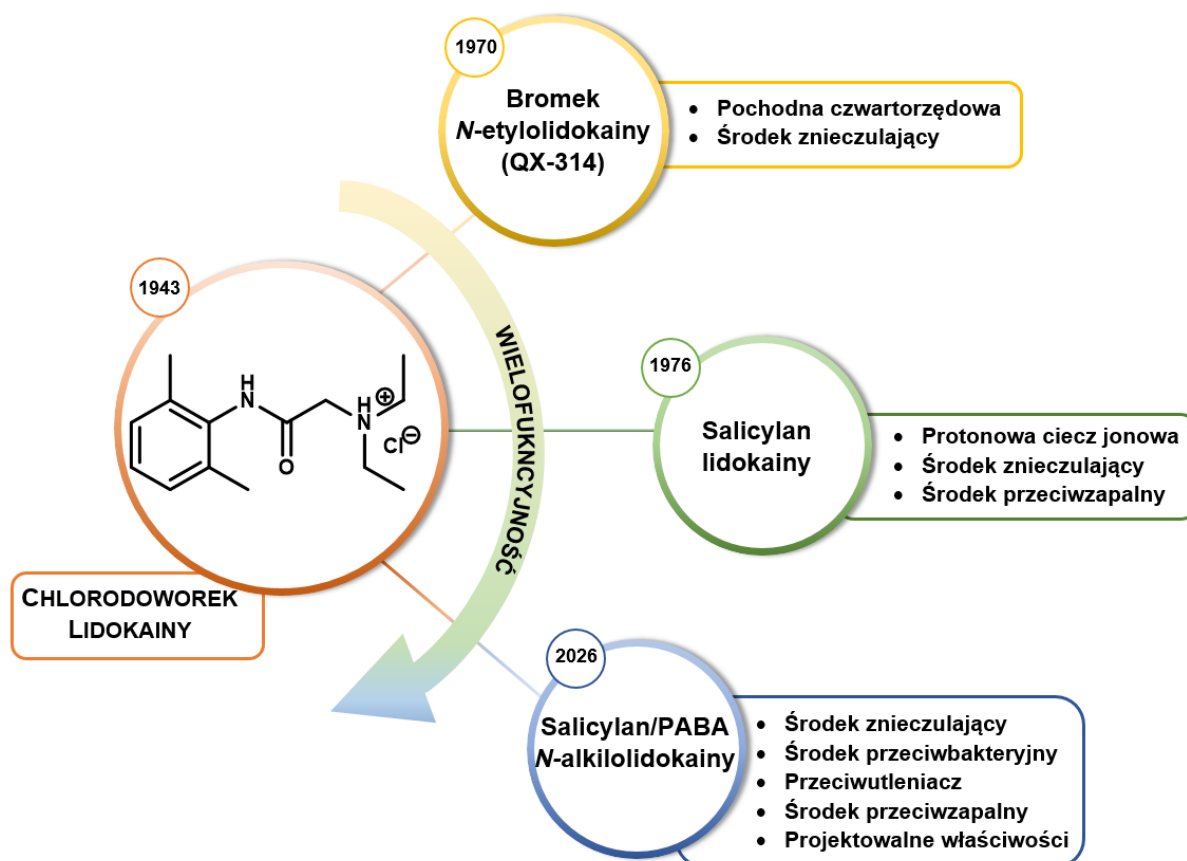
herbicydową (nawet o 50%) w porównaniu z herbicydem referencyjnym. Udowodniono także, iż ryzyko migracji lub bioakumulacji tych produktów w środowisku jest wyjątkowo niskie. W literaturze opisano także sól z czwartorzędowym kationem *N*-heksylonikotynamidu i anionem salicylanowym.⁷⁴ Badany związek wykazywał wyższą aktywność przeciwbakteryjną niż kwas salicylowy, przy jednoczesnym zachowaniu bardzo dobrej tolerancji skórnej po aplikacji miejscowej w stężeniach do 5%. Ponadto w innej pracy przebadano szereg homologiczny bromków *N*-alkilonikotynamidu pod kątem skuteczności przeciwgrzybiczej.⁷⁵ Zsyntetyzowane związki, charakteryzujące się zróżnicowaną długością łańcucha węglowego w kationie, testowano na grzybach *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*. Wykazano, że tempo wzrostu badanych szczepów malało wraz ze wzrostem liczby atomów węgla w łańcuchu alkilowym. Efekt ten obserwowano aż do bromku *N*-tetradecylonikotynamidu, a dalsze wydłużanie łańcucha prowadziło do ponownego wzrostu tempa rozwoju drobnoustrojów.

Pomimo licznych doniesień literaturowych na temat modyfikacji struktury **NA**, badania te są fragmentaryczne i nie pozwalają na systematyczną i kompletną ocenę zależności między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną w ramach uporządkowanych szeregów homologicznych. Wskazuje to na potrzebę dalszych badań w tym obszarze i głębokiej analizy nowych homologów substancji czynnych będących pochodnymi **NA**.

2.4. Charakterystyka pochodnych zawierających w swojej strukturze kation lidokainy

Lidokaina jest syntetycznym lekiem znieczulającym miejscowo wprowadzonym do praktyk klinicznych w połowie XX wieku i do dziś jest jednym z najczęściej używanych medykamentów do znieczuleń miejscowych.⁷⁶ Mechanizm działania lidokainy polega przede wszystkim na blokowaniu kanałów sodowych w błonach komórkowych neuronów, co prowadzi do ograniczenia powstawania i przewodzenia impulsów nerwowych, a w konsekwencji do minimalizowania odczuwania bólu w miejscu stosowania. Ze względu na szybki profil działania i skuteczność, lidokaina znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny, w tym w stomatologii, chirurgii, dermatologii oraz anestezjologii.⁷⁶ Istotną zaletą lidokainy jest stosunkowo rzadkie występowanie działań niepożądanych. W większości przypadków obserwowane reakcje uboczne są związane raczej z niewłaściwym sposobem podania lub przekroczeniem dawki terapeutycznej niż z samym mechanizmem działania tej substancji.⁷⁷ W praktyce klinicznej lidokainę stosuje się najczęściej w postaci chlorowodoru, który charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, co umożliwia przygotowanie stabilnych preparatów leczniczych.⁷⁸ Ze względu na szerokie zastosowanie chlorowodoru lidokainy oraz

jego cenne właściwości, na przestrzeni lat podejmowano liczne działania ukierunkowane na jego derywatyzację i poszerzenie zakresu zastosowań terapeutycznych (rysunek 6).



Rysunek 6. Kluczowe etapy rozwoju pochodnych lidokainy.^{79–81}

Bromek *N*-etylolidokainy oraz bromek *N*-dodecyloidokainy, oceniono *in vitro* pod kątem zdolności do blokowania jonów sodowych (Na^+) w hodowanych komórkach neuronalnych szczura linii GH₃. Przeprowadzono również ocenę działania *in vivo* w modelu blokady nerwu kulszowego u szczurów, analizując funkcje czuciowe i motoryczne. Bromek *N*-etylolidokainy wykazywał silne właściwości blokujące kanały Na^+ *in vitro*, a u testowanych zwierząt powodował całkowitą i istotnie wydłużoną blokadę przewodnictwa nerwowego w porównaniu z lidokainą.⁸² Zsyntetyzowano także serię API-ILs zawierających lidokainę oraz średniołańcuchowe kwasy dikarboksylowe jako przeciwyjony. Następnie zbadano wpływ długości łańcucha alkilowego anionu na charakter powstających faz. W obrębie badanej serii zaobserwowano zróżnicowane zmiany w morfologii, temperaturze topnienia, temperaturze zeszklenia oraz parametrach strukturalnych nowo powstałych faz. Uzyskane wyniki stanowią cenną bazę danych dotyczącą opracowania systematycznego podejścia do projektowania i rozwoju farmaceutycznych cieczy jonowych.⁸³ Badania z wykorzystaniem nikotynowego receptora acetylocholinowego wykazały, że czwartorzędowe analogi lidokainy (trietyloamoniowa sól QX-314 oraz trimetyloamoniowa sól QX-222) wykazują aktywność blokującą kanały jonowe, wiążąc się w obrębie pora kanału

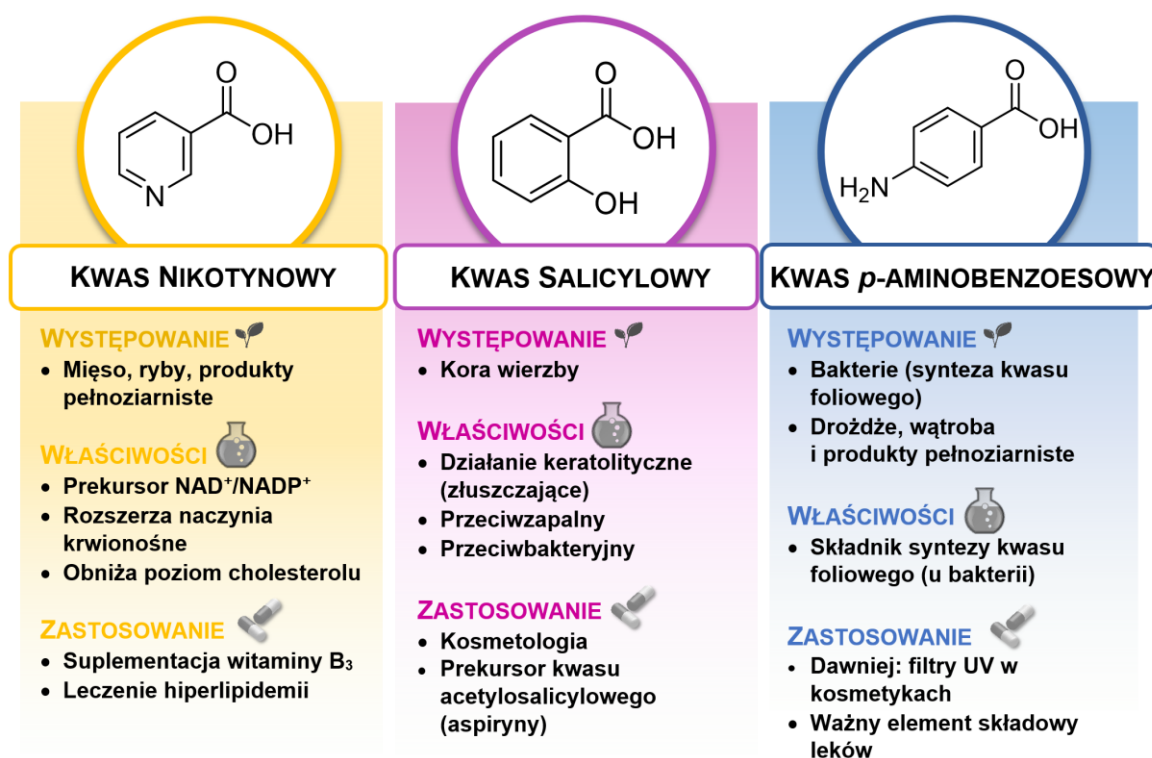
i powodując fizyczną blokadę przepływu jonów. Wyniki te dostarczają ogólnego wglądu w mechanizm, w jaki kationowe pochodne lidokainy blokują kanały jonowe, i mogą stanowić model ułatwiający interpretację ich interakcji z innymi kanałami jonowymi odpowiedzialnymi za przewodzenie impulsów bólowych.⁸⁴ W literaturze opisano również protonowe cieczy jonowe oparte na lidokainie, w których rolę przeciwjonów pełnią aniony o właściwościach przeciwzapalnych. Dla układów zawierających aniony salicylanowy i ibuprofenianowy przeprowadzono szczegółową charakterystykę fizykochemiczną oraz analizę strukturalną.⁸⁵ Protonowe ILs na bazie lidokainy oraz kwasu salicylowego zostały również otrzymane w postaci układów oligomerycznych, a uzyskane wyniki sugerują, że taka strategia tworzenia nowych substancji aktywnych farmaceutycznie może mieć głęboki wpływ na poprawę właściwości API, np. w celu ich upłynniania do różnych dróg podawania leku.⁸⁶ Analizie poddano także serię asymetrycznych surfaktantów *gemin* opartą na strukturze lidokainy, z amfifilową grupą węglanową ($-O-CO-O-$), które mogą samoczynnie organizować się w cząsteczki Janusa, będące unikalną klasą cząstek o asymetrycznej strukturze, posiadających dwie odrębne powierzchnie o różnych właściwościach.⁸⁷ Niektóre z otrzymanych związków wykazywały większy wzrost przenikania do tkanek w porównaniu z cząsteczkami opartymi na tradycyjnej strukturze surfaktantu. Cząsteczki te mają zatem wysoki potencjał wykorzystania jako farmaceutyczna substancja pomocnicza o podwójnej funkcji – znieczulenia miejscowego i promotorów przenikania w systemach dostarczania leków.⁸⁸ Symulacje molekularne przeprowadzone dla dokuzynianu lidokainy oraz układów pokrewnych (chlorku lidokainy, dokuzynianu sodu i chlorku sodu) umożliwiły wstępną interpretację mechanizmów leżących u podstaw obserwowanych właściwości synergistycznych dokuzynianu lidokainy jako substancji czynnej w postaci cieczy jonowej. Wykazano, że zwiększona skłonność do asocjacji jonów w badanym układzie może sprzyjać poprawie przepuszczalności przez bariery biologiczne. Dodatkowo, zastosowanie formy cieczy jonowej jako postaci substancji czynnej pozwala na eliminację typowych problemów związanych z krystalicznymi formami stałymi, takich jak ograniczona rozpuszczalność czy polimorfizm.⁸⁹

Zebrane dotychczas dane literaturowe dotyczą głównie wybranych pochodnych lidokainy oraz ich specyficznych właściwości, co ogranicza możliwość systematycznej i pogłębionej analizy. W szczególności brakuje kompleksowego przeglądu różnych form czwartorzędowych pochodnych lidokainy w połączeniu z anionami o aktywności farmaceutycznej, obejmującego zarówno ich właściwości fizykochemiczne, jak i skuteczność biologiczną. Tego typu informacje są kluczowe dla lepszego zrozumienia charakteru oddziaływań kation–anion oraz określenia wpływu obecności podstawników alkilowych w pochodnych lidokainy na właściwości związku. Dalsze badania są kluczowe do opracowania systematycznego podejścia umożliwiającego

projektowanie nowych, efektywnych substancji znieczulających i ich dalszej implementacji na kolejnych etapach rozwoju leku.

2.5. Związki pochodzenia naturalnego jako źródło anionu w API-QASs

Naturalnie występujące związki organiczne stanowią ważną grupę substratów wykorzystywanych w projektowaniu nowych związków chemicznych i materiałów, w tym formulacji farmaceutycznych. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na wykorzystanie związków pochodzenia naturalnego jako składników układów jonowych, ponieważ często charakteryzują się one dobrą biodostępnością, znanym profilem toksykologicznym i potwierdzoną aktywnością biologiczną. Do wspomnianych związków należą aromatyczne kwasy karboksylowe, takie jak kwas nikotynowy, kwas salicylowy i kwas *p*-aminobenzoesowy (**PABA**), których właściwości zaprezentowano na rysunku 7. Wprowadzenie biologicznie aktywnego anionu do struktury czwartorzędowej soli amoniowej może prowadzić do powstania związków o zmodyfikowanych właściwościach fizykochemicznych, a także do uzyskania nowych właściwości biologicznych wynikających z synergii między kationem a anionem.



Rysunek 7. Struktura kwasów użytych jako źródło anionu do syntezy układów typu API-QAS oraz ich występowanie w naturze, właściwości i zastosowanie.

Istotną cechą tych kwasów jest ich powszechne występowanie w środowisku naturalnym oraz w diecie człowieka. Kwas nikotynowy, obok nikotynamidu, jest kolejną formą witaminy B₃

(niacyny). Występuje szeroko w żywności pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, w tym w zbożach, roślinach strączkowych, mięsie i rybach. W organizmie człowieka odgrywa ważną rolę jako prekursor koenzymów NAD^+ i NADP^+ , które uczestniczą w licznych procesach metabolicznych oraz reakcjach utleniania-redukcji.⁹⁰ Ze względu na swoją rolę biologiczną, kwas nikotynowy i jego pochodne są stosowane zarówno jako składniki suplementów diety, jak i w leczeniu zaburzeń lipidowych oraz niedoborów witaminy B_3 . Ponadto jest on podawany z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) w leczeniu bólu i zapalenia stawów.⁹¹ Kwas salicylowy z kolei w naturze występuje głównie w korze wierzby białej, gdzie uczestniczy w regulacji procesów fizjologicznych i mechanizmach obronnych przed patogenami. Jego pochodne od dawna są stosowane w farmacji ze względu na właściwości przeciwzapalne, przeciwbólowe i keratolityczne, a sam kwas salicylowy stał się także ważnym półproduktem w syntezie wielu leków.⁹²⁻⁹⁴ **PABA**, znany również jako witamina B_{10} , jest związkiem aromatycznym występującym w naturze jako metabolit mikroorganizmów oraz jako składnik niektórych produktów spożywczych, takich jak drożdże, wątroba i produkty pełnoziarniste.⁹⁵ **PABA** charakteryzuje się znaczną wszechstronnością strukturalną, szczególnie ze względu na możliwość substytucji zarówno w grupie aminowej, jak i karboksylowej, co umożliwia projektowanie bioaktywnych pochodnych dostosowanych do indywidualnych potrzeb.^{96,97} Ta unikalna cecha sprawia, że **PABA** jest cennym elementem składowym preparatów chroniących przed promieniowaniem UV oraz formulacji farmaceutycznych. W bazie danych zawierających 12 111 leków komercyjnych, **PABA** jest włączony jako składnik strukturalny aż w 1,5% z nich. Co istotne, leki te wykazują szeroki zakres zastosowań terapeutycznych, w tym działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe i przeciwzapalne, w zależności od strategii derywatyzacji.^{98,99}

Aktualny stan wiedzy na temat QASs zawierających aniony kwasu nikotynowego, salicylowego czy *p*-aminobenzoesowego wskazuje, że związki składające się z kationu chlormekwatu i anionów indukujących odporność roślin, w tym pochodzących od kwasu nikotynowego, charakteryzują się lepszą aktywnością biologiczną oraz niższą fitotoksycznością w porównaniu z ich odpowiednikami w formach kwasowych. Badania dowiodły, że otrzymane związki wykazały zdolność do aktywowania reakcji obronnych tytoniu i zwiększyły odporność na infekcje wirusowe.¹⁰⁰ Ponadto czwartorzędowe pochodne chitozanu zawierające anion *p*-aminobenzoesanowy, w postaci pięcio- i sześcioczłonowych heterocyklicznych zasad Schiffa, poddano systematycznej ocenie pod kątem ich aktywności antyoksydacyjnej oraz przeciwbakteryjnej. Uzyskane wyniki wykazały wysoką aktywność biologiczną badanych związków, natomiast przeprowadzone testy cytotoksyczności i hemolizy potwierdziły ich dobrą biogodność oraz bezpieczeństwo stosowania w analizowanym zakresie stężeń.¹⁰¹

Anion kwasu salicylowego jest szeroko stosowanym i dobrze scharakteryzowanym anionem funkcyjnym, wykorzystywanym w syntezie różnorodnych układów, w tym API-QASs. Sole zawierające anion salicylanowy wykazują różnorodną aktywność biologiczną, w tym właściwości przeciwbakteryjne i przeciwutleniające.^{74,102–105} Ponadto anion salicylowy jest szeroko stosowany w syntezie związków przeznaczonych do stosowania na skórę ze względu na udokumentowane właściwości keratolityczne i przeciwzapalne oraz zdolność wspomagania penetracji substancji czynnych przez barierę naskórkową.^{74,85,103,104}

Przeprowadzona analiza jednoznacznie wskazuje, że anion salicylanowy został szeroko opisany w literaturze, a liczne badania potwierdzają jego korzystne właściwości fizykochemiczne i biologiczne oraz szeroki potencjał aplikacyjny. To sprawia, że jest on szczególnie interesującym układem modelowym i odpowiednim kandydatem do dalszych badań w szeregach homologicznych. Co ciekawe, pomimo rosnącego zainteresowania substancjami pochodzenia biologicznego, zastosowanie nikotynianu i *p*-aminobenzoesanu w układach jonowych pozostaje stosunkowo słabo zbadane, co podkreśla potrzebę dogłębnych badań nad ich właściwościami i potencjalnymi zastosowaniami.

3. Kluczowe właściwości farmakologiczne leków w zależności od drogi podania i przeznaczenia

3.1. Właściwości przeciwzapalne

Przeciwzapalne właściwości leków stanowią fundamentalny aspekt wielu współczesnych farmakoterapii. Stan zapalny to naturalna odpowiedź organizmu na uraz, infekcję lub inne czynniki uszkodzające tkanki, mająca na celu wyeliminowanie przyczyny uszkodzenia, naprawę tkanek i przywrócenie homeostazy.¹⁰⁶ Jednak w sytuacjach, gdy reakcja zapalna jest nadmierna lub przewlekła, zamiast chronić organizm, zaczyna osłabiać jego funkcje, utrudniając powrót do zdrowia i sprzyjając rozwojowi chorób przewlekłych.^{106,107} Właśnie w takich sytuacjach kluczowe staje się ograniczenie szkodliwego wpływu nadreaktywnego układu odpornościowego. Leki przeciwzapalne mogą pomóc przywracać prawidłowe funkcjonowanie organizmu na różnych poziomach. Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), takie jak kwas salicylowy, diklofenak, ibuprofen lub celekoksyb, działają na poziomie enzymatycznym, hamując aktywność cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2), zmniejszając syntezę prostaglandyn, będących mediatorami odpowiedzialnymi za ból, gorączkę i stan zapalny w tkankach. Zmniejsza to obrzęk, zaczerwienienie, ból i podwyższoną temperaturę.^{108–110} Glikokortykosteroidy z kolei hamują ekspresję genów kodujących odpowiedzialnych za stan zapalny, co skutkuje szerokim działaniem przeciwzapalnym, immunosupresyjnym i przeciwalergicznym.¹¹¹ Znaczenie leków

przeciwzapalnych wynika nie tylko z ich zdolności do łagodzenia objawów, ale także z ich wpływu na przebieg choroby. Skuteczna kontrola stanu zapalnego pomaga ograniczyć uszkodzenia tkanek, zapobiega przewlekłym powikłaniom i poprawia jakość życia pacjenta. Skuteczność działania przeciwzapalnego zależy od wielu czynników, w tym drogi podania, właściwości chemicznych substancji czynnej, biodostępności, rozpuszczalności oraz zdolności do penetracji w miejsce objęte stanem zapalnym. Podawanie leków przeciwzapalnych różnymi drogami znacząco wpływa na ich biodostępność, siłę działania i profil bezpieczeństwa. Doustne podawanie NLPZ pozwala na działanie ogólnoustrojowe, co jest szczególnie ważne w leczeniu chorób zapalnych obejmujących wiele stawów lub narządów. Substancja czynna wchłania się z przewodu pokarmowego i po rozprowadzeniu w organizmie hamuje aktywność enzymów cyklooksygenazy, zmniejszając tym samym syntezę prostaglandyn w organizmie. Ta droga podawania pozwala również na kontrolę przewlekłego stanu zapalnego, ale wiąże się z wyższym ryzykiem działań niepożądanych, w tym uszkodzenia błony śluzowej żołądka, zaburzeń czynności nerek i interakcji z innymi lekami.^{111,112} W odpowiedzi na te ograniczenia opracowano preparaty o zmodyfikowanym uwalnianiu, środki ochronne dla przewodu pokarmowego oraz strategie dawkowania minimalizujące ryzyko powikłań.^{113,114} Z drugiej strony, podanie miejscowe umożliwia skoncentrowane działanie leku w tkankach objętych stanem zapalnym. Preparaty takie jak żele, maści, kremy czy plastry osiągają wysokie stężenie substancji czynnej w miejscu działania, jednocześnie ograniczając ekspozycję ogólnoustrojową.^{115–117} W praktyce znacząco zmniejsza to ryzyko działań niepożądanych przy jednoczesnym zachowaniu skuteczności terapeutycznej. Rozwiązania te zapewniają zarówno szybkie działanie miejscowe, jak i długotrwałe stężenie terapeutyczne, co poprawia skuteczność leczenia i komfort pacjenta.

Właściwości chemiczne substancji czynnej również determinują jej skuteczność przeciwzapalną. Substancje lipofilowe łatwiej przenikają przez barierę skórną i błony biologiczne, co zwiększa ich skuteczność w terapii miejscowej. Substancje hydrofilowe, które nie przenikają łatwo do tkanek, wymagają podania ogólnoustrojowego lub zastosowania specjalnych nośników, takich jak liposomy, nanocząsteczki lub proleki, które poprawiają rozpuszczalność, stabilność i biodostępność leku. Ponadto modyfikacje chemiczne API-QASs, polegające na tworzeniu soli, estrów i proleków, pozwalają na dostosowanie farmakokinetyki i farmakodynamiki leku do potrzeb klinicznych, umożliwiając kontrolę szybkości uwalniania, penetracji tkanek i siły działania w miejscu zapalenia.

3.2. Właściwości antybakteryjne

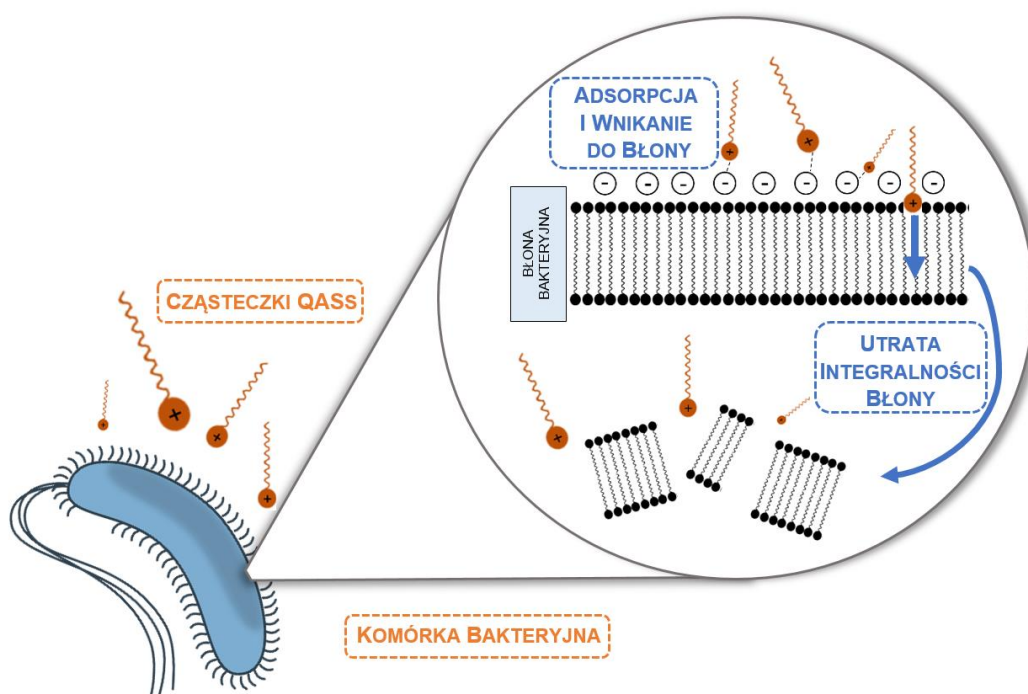
Leki przeciwbakteryjne stanowią kluczowy element leczenia infekcji bakteryjnych, zarówno ostrych, jak i przewlekłych. Ich właściwości antybakteryjne (przeciwbakteryjne) obejmują hamowanie wzrostu, namnażania lub bezpośrednie zabijanie bakterii, co pozwala na eliminację patogenu i przywrócenie homeostazy organizmu. Mechanizmy ich działania są zróżnicowane i często zależą od rodzaju bakterii (Gram-dodatnie lub Gram-ujemne) oraz miejsca zakażenia. Istotną rolę odgrywa różna struktura osłon komórkowych tych organizmów, wpływając na ich penetrację, a tym samym skuteczność substancji przeciwbakteryjnych. Bakterie Gram-dodatnie, z grubą warstwą peptydoglikanu i brakiem błony zewnętrznej, są zazwyczaj bardziej wrażliwe na związki bezpośrednio oddziałujące na błonę cytoplazmatyczną, takie jak QASs. Z kolei bakterie Gram-ujemne, ze względu na obecność dodatkowej błony zewnętrznej zawierającej lipopolisacharyd, wykazują zwiększoną naturalną oporność na takie substancje, ograniczając ich penetrację do miejsca docelowego.^{39,118} Te różnice determinują odmienne profile aktywności przeciwdrobnoustrojowej i mają kluczowe znaczenie przy wyborze odpowiedniej strategii terapeutycznej i dezynfekcyjnej.

Warto podkreślić, że właściwości antybakteryjne to pojęcie szersze niż antybiotyki, obejmujące wszystkie substancje zdolne do hamowania wzrostu lub eliminacji bakterii, w tym środki dezynfekujące, antyseptyczne i związki syntetyczne. Antybiotyki natomiast stanowią specyficzną grupę substancji antybakteryjnych przeznaczonych do bezpiecznego stosowania terapeutycznego w organizmie, charakteryzujących się selektywną toksycznością wobec mikroorganizmów chorobotwórczych.¹¹⁹

Należy nadmienić, że mechanizmy działania leków przeciwbakteryjnych są zróżnicowane w zależności od danego antybiotyku i obejmują hamowanie syntezy ściany komórkowej (np. beta-laktamy, wankomycyna), blokowanie syntezy białek (np. aminoglikozydy, tetracykliny), zaburzanie funkcji błony cytoplazmatycznej (np. polimyksyny i daptomycyna) oraz hamowanie syntezy kwasów nukleinowych (np. fluorochinolony, ryfampicyna).¹²⁰ W efekcie, skuteczność antybiotyków w dużej mierze zależy nie tylko od mechanizmu ich działania, ale także od drogi podania, która determinuje osiągnięte stężenia w tkankach i płynach ustrojowych.¹²¹ Podanie doustne jest wygodne i umożliwia leczenie wielu zakażeń, zwłaszcza jeśli substancja czynna wykazuje odpowiednią stabilność w przewodzie pokarmowym i wysoką biodostępność.^{122,123} Antybiotyki doustne stosuje się w leczeniu zakażeń układu moczowego, dróg oddechowych, przewodu pokarmowego oraz skóry i tkanek miękkich.^{124,125} W przypadku ciężkich zakażeń (takich jak sepsa), konieczne jest podanie dożylnie, zapewniające 100% biodostępność, szybki początek działania i utrzymanie odpowiedniego stężenia hamującego leku (MIC, ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) w całym organizmie.^{126,127} Takie podejście jest szczególnie ważne w przypadku zakażeń zagrażających życiu lub w przypadku opornych szczepów bakteryjnych.

Preparaty do stosowania miejscowego, w tym kremy, żele, krople do oczu i inhalacje, umożliwiają uzyskanie wysokich stężeń leku w miejscu zakażenia przy minimalnej ekspozycji ogólnoustrojowej, co ogranicza działania niepożądane i ryzyko selektywnej presji antybiotykowej na mikroflorę jelitową.^{128–131}

Wysoka skuteczność przeciwbakteryjna czwartorzędowych soli amoniowych wynika z unikalnego połączenia dodatnio naładowanego atomu azotu w kationie i hydrofobowego długiego łańcucha alkilowego, co zaprezentowano na rysunku 8.



Rysunek 8. Proponowany mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej QASs.

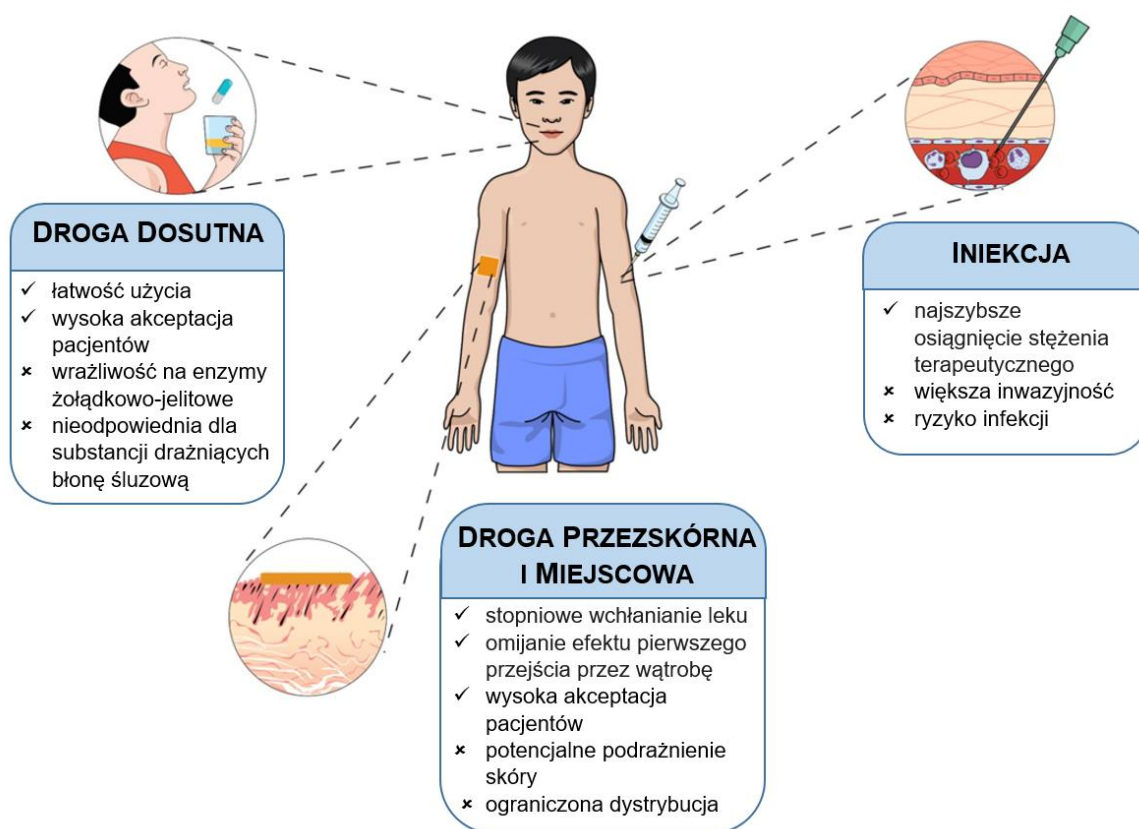
Dodatni ładunek w kationach przyciąga je do ujemnie naładowanej powierzchni bakterii, obecnej głównie na błonie cytoplazmatycznej i w otocze komórkowej, szczególnie u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Ta interakcja elektrostatyczna umożliwia silne przyleganie do bakterii przez cząsteczki QASs, co jest pierwszym krokiem w ich działaniu bakteriobójczym. Drugim kluczowym elementem mechanizmu jest przenikanie hydrofobowego łańcucha alkilowego przez warstwę lipidową błony komórkowej. Powoduje to destabilizację struktury lipidowej, zaburza integralność błony, tworzy pory i powoduje wyciek składników komórkowych i finalnie prowadzi to do szybkiej śmierci komórki bakteryjnej.^{44,132} Długość i struktura łańcucha alkilowego mają kluczowe znaczenie dla skuteczności działania takiej soli organicznej. Zbyt krótki łańcuch alkilowy nie zapewnia wystarczającej interakcji z lipidami błonowymi, natomiast optymalna długość (zwykle 12–16 atomów węgla) wiąże się z maksymalną aktywnością przeciwbakteryjną przy zachowaniu korzystnego profilu cytotoksyczności względem komórek ssaków. Interesującym jest, że wraz z dalszym wydłużaniem łańcucha alkilowego, aktywność przeciwbakteryjna często maleje, co określa się mianem efektu „cut-off”, wynikającego m.in.

z ograniczonej rozpuszczalności i tendencji do tworzenia miceli. QASs wykazują również działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec biofilmów bakteryjnych, co czyni je interesującymi w kontekście leczenia przewlekłych zakażeń w tkankach o utrudnionej dostępności.^{35,133,134}

Narastająca oporność na konwencjonalne antybiotyki stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny.¹³⁵ Zjawisko to ogranicza zastosowanie dotychczasowych metod leczenia i wprowadza nowe środki przeciwdrobnoustrojowe oraz innowacyjne metody ich podawania. W odpowiedzi na te wyzwania rozwijane są nowoczesne strategie formułacyjne, które powodują skuteczność leczenia przeciwbakteryjnego poprzez kontrolowane i/lub przedłużone uwalnianie leku czy precyzyjne dostarczanie go do miejsca działania.^{136,137} Dlatego obecnie duży nacisk kładzie się na świadome projektowanie cząsteczek pod kątem poprawy ich rozpuszczalności, stabilności oraz zdolności penetracji do tkanek, co ma na celu zwiększenie skuteczności zarówno tradycyjnych antybiotyków, jak i związków opartych na QASs. Współczesna antybiotykoterapia coraz częściej opiera się na synergii między klasycznymi mechanizmami działania a zaawansowanymi systemami dostarczania leków, co pozwala nie tylko zwiększyć efektywność leczenia, ale także ograniczyć ryzyko działań niepożądanych oraz spowolnić rozwój oporności bakteryjnej.

4. Drogi podawania leków – mechanizmy, zastosowania i ograniczenia

Sposób podania leku odgrywa kluczową rolę w określaniu jego skuteczności farmakologicznej, bezpieczeństwa i profilu działania w organizmie. Wybór odpowiedniej drogi podania nie tylko determinuje sposób i szybkość, z jaką substancja czynna dociera do miejsc docelowych, ale także wpływa na jej wchłanianie, metabolizm, dystrybucję i eliminację. Różne drogi podania mogą znacząco zmieniać biodostępność leku (ilość substancji, która pozostaje biologicznie aktywna po dotarciu do krążenia ogólnego) a także wpływać na ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. W literaturze farmaceutycznej jednymi z podstawowych sposobów podania leku są droga doustna, przezskórna, miejscowa i iniekcja. Każda z nich wpływa na farmakokinetykę leku, determinując profil wchłaniania, biodostępność oraz zakres działania miejscowego lub ogólnoustrojowego (rysunek 9).^{138,139}



Rysunek 9. Podstawowe drogi podania leku.¹⁴⁰

Doustne przyjmowanie leków jest najczęściej stosowaną i najwygodniejszą metodą, obejmującą formy stałe, takie jak tabletki i kapsułki, oraz formy płynne, takie jak syropy i zawiesiny. Zaletami tej drogi podania są łatwość użycia, wysoka akceptacja pacjentów oraz możliwość długotrwałego leczenia, przy jednoczesnym zachowaniu stosunkowo niskich kosztów. Do ograniczeń należy wrażliwość na czynniki żołądkowo-jelitowe, w tym obecność pokarmu czy pH żołądka, które mogą wpływać na szybkość i stopień wchłaniania. Ponadto droga doustna nie jest odpowiednia dla substancji drażniących błonę śluzową lub wrażliwych na obecność enzymów żołądkowo-jelitowych.¹³⁸

Podawanie przezskórne, w tym plastry i żele transdermalne, pozwala na stopniowe wchłanianie leku do krążenia ogólnego, omijając efekt pierwszego przejścia przez wątrobę i utrzymując stałe stężenie terapeutyczne w czasie. Metoda ta jest wygodna dla pacjenta i dobrze sprawdza się w przypadku leków o wysokiej lipofilowości i niskiej masie cząsteczkowej, ale jej zastosowanie jest ograniczone przez potencjalne podrażnienie skóry i wolniejsze tempo osiągania maksymalnego stężenia terapeutycznego w porównaniu z podaniem dożylnym.^{141,142}

Podawanie miejscowe polega na podaniu leku bezpośrednio na skórę lub błony śluzowe w celu uzyskania działania miejscowego lub ograniczonego wchłaniania ogólnoustrojowego. Ta droga podawania jest szczególnie korzystna w przypadku substancji działających miejscowo, minimalizując ryzyko działań niepożądanych w innych narządach. Wadami są jednak ograniczona

dystrybucja i konieczność stosowania formulacji, które dobrze przylegają i wnikają w miejsce działania.¹⁴³

Podawanie drogą iniekcji, w tym podskórną, domięśniową, dożylną lub dootrzewnową, charakteryzuje się najszybszym i najbardziej przewidywalnym osiągnięciem stężenia leku w krążeniu ogólnym. Metoda ta jest stosowana w leczeniu doraźnym, w warunkach szpitalnych oraz w przypadku leków o niskiej biodostępności doustnej. Jej ograniczenia obejmują jednak większą inwazyjność, ryzyko infekcji oraz konieczność stosowania sprzętu medycznego, jak i odpowiedniego monitorowania.¹³⁹

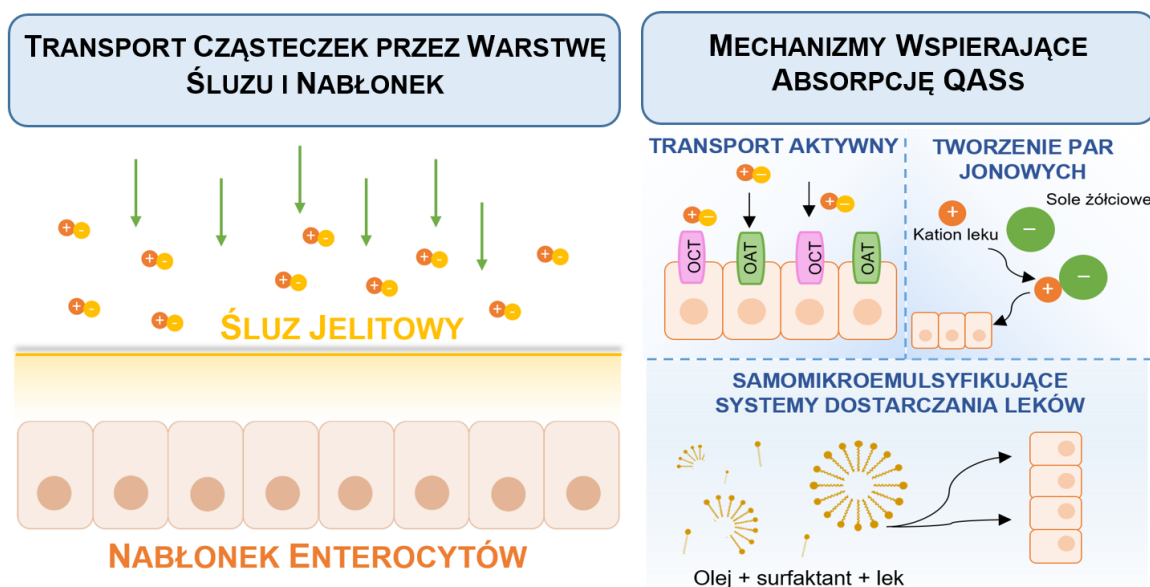
Wybór odpowiedniej drogi podania zależy zatem od właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych leku, jego celu terapeutycznego oraz oczekiwanej wygody i bezpieczeństwa pacjenta. Zrozumienie zalet i ograniczeń każdej metody ma kluczowe znaczenie dla skutecznego projektowania terapii lekowej oraz optymalizacji biodostępności i skuteczności substancji czynnych.

5. Bariery biologiczne i ich pokonywanie przez sole organiczne

5.1. Droga doustna

Podanie doustne jest najpowszechniej stosowaną drogą podawania leków ze względu na wygodę, wysoką akceptację pacjentów i niski koszt. Szacuje się, że ponad połowa leków jest podawana doustnie, najczęściej w postaci tabletek i kapsułek.¹⁴⁴ Pomimo ograniczeń związanych z barierami wchłaniania i efektem pierwszego przejścia, droga ta pozostaje podstawową strategią w farmakoterapii.

Jelito cienkie jest zasadniczym miejscem wchłaniania większości leków podawanych drogą doustną, co wynika z jego dużej powierzchni chłonnej, intensywnego ukrwienia oraz relatywnie długiego czasu kontaktu substancji leczniczej z błoną śluzową.¹⁴⁵ Aby substancja czynna mogła zostać wchłonięta, musi pokonać dwie główne bariery biologiczne: warstwę śluzu jelitowego (mukusu) oraz nabłonek enterocytów (rysunek 10).



Rysunek 10. Schemat transportu cząsteczek przez główne bariery biologiczne jelita cienkiego oraz mechanizmu wspierające absorpcję QASs; OCT – Transportery Kationów Organicznych; OAT – Transportery Anionów Organicznych).

Warstwa mukusu stanowi pierwszą, dynamiczną przeszkodę dyfuzyjną, ograniczającą kontakt cząsteczek z powierzchnią nabłonka. Jest to hydrożel zbudowany głównie z wody (90–98%) oraz mucyn (wysokocząsteczkowych glikoprotein), którego właściwości elektrostatyczne mogą istotnie wpływać na dystrybucję związków jonowych. W przypadku czwartorzędowych soli amoniowych, trwały dodatni ładunek sprzyja odwracalnym interakcjom z ujemnie naładowanymi składnikami mucyny, co może spowalniać dyfuzję, ale jednocześnie wydłużać czas przebywania cząsteczek w pobliżu nabłonka. Zjawisko to potencjalnie zwiększa szanse na wykorzystanie alternatywnych mechanizmów absorpcji.^{146,147}

Kolejną barierę stanowi jednowarstwowy nabłonek jelitowy, w którym enterocyty połączone są ścisłymi połączeniami międzykomórkowymi, determinującymi selektywną przepuszczalność.^{148,149} Trwały dodatni ładunek QASs oraz ich silna hydratacja istotnie ograniczają zdolność do pasywnej dyfuzji przez błony lipidowe, co czyni transport transkomórkowy mało efektywnym. W konsekwencji związki te charakteryzują się zazwyczaj niską przepuszczalnością, jednak dostępne są mechanizmy mogące wspierać ich absorpcję. Jednym z nich jest transport aktywny, w którym biorą udział białka transportujące, takie jak OCT (ang. *Organic Cation Transporter*, Transportery Kationów Organicznych) i PMAT (ang. *Plasma Membrane Monoamine Transporter*, Transporter Monoamin Błony Plazmatycznej), odpowiedzialne za transport kationów organicznych oraz OAT (ang. *Organic Anion Transporter*, Transportery Anionów Organicznych).¹⁵⁰ Choć ich ekspresja w jelicie jest ograniczona, mogą one odgrywać istotną rolę w wybranych strukturach. Alternatywny mechanizm polega na tworzeniu par jonowych z odpowiednio dobranymi anionami, co prowadzi do obniżenia

efektywnego ładunku elektrostatycznego i zwiększenia lipofilowości układu. W środowisku wodnym QASs występują głównie w postaci zdysocjowanej i silnie uwodnionej, ale obecność lipidów lub anionów może sprzyjać tworzeniu przejściowych kompleksów elektrostatycznych, ułatwiając interakcję z błonami biologicznymi.

Istotną rolę w tym kontekście mogą odgrywać również kwasy żółciowe, które dzięki swojej amfipatycznej naturze (czyli obecności zarówno części hydrofilowej, jak i hydrofobowej) są zdolne do tworzenia par jonowych z cząsteczkami kationowymi.¹⁵¹ Powstałe kompleksy charakteryzują się zwiększoną lipofilowością, co może ułatwiać ich transport przez błony komórkowe. Wskazuje się, że zjawisko to może sprzyjać absorpcji QASs, szczególnie w warunkach fizjologicznych, jednak jego efektywność zależy od wielu czynników, w tym obecności składników pokarmowych. Badania eksperymentalne potwierdzają znaczenie tego mechanizmu. Wykazano, że w przypadku chlorku trospium (leku antycholinergicznego stosowanego w leczeniu nadreaktywności pęcherza moczowego) obecność kwasów żółciowych prowadzi do powstawania kompleksów jonowych oraz zwiększenia przenikalności przez monowarstwy komórkowe oraz tkanki jelitowe. Jednocześnie obserwowano, że efekt ten może być ograniczony w obecności emulsji lipidowych, co sugeruje istotny wpływ warunków fizjologicznych na efektywność tego procesu.^{151,152}

Jednym z najlepiej opisanych związków z grupy QASs jest berberyna, naturalny alkaloid izochinolinowy o szerokim spektrum aktywności farmakologicznej, obejmującym właściwości przeciwcukrzycowe, przeciwnowotworowe i przeciwzapalne. Niemniej jednak, biodostępność berberyny po podaniu doustnym jest niska ze względu na ograniczoną przepuszczalność błonową. Zastosowanie systemów, takich jak samomikroemulsyfikujące systemy dostarczania leków, znacznie poprawiło przenikanie tego alkaloidu, co dowodzi potencjału strategii formulacyjnych w pokonywaniu barier absorpcyjnych.¹⁵³

Istotnym aspektem w kontekście potencjalnego zastosowania QASs jako substancji o aktywności terapeutycznej jest również ich cytotoksyczność, która może ograniczać bezpieczeństwo ich użycia jako leków i wymaga uwzględnienia przy projektowaniu nowych formulacji. Trwały dodatni ładunek sprzyja interakcjom z ujemnie naładowanymi składnikami błon komórkowych, co może prowadzić do ich destabilizacji i zwiększenia przepuszczalności. Zjawisko jest szczególnie widoczne w przypadku kationowych surfaktantów, dla których aktywność biologiczna często koreluje z lipofilowością.^{154,155} Działanie cytotoksyczne QASs jest silnie uzależnione od ich struktury, a także czasu ekspozycji i nie stanowi uniwersalnego narzędzia dla całej grupy. Należy jednak podkreślić, że w wielu przypadkach wyszczególniono brak istotnej toksyczności w zakresie stężeń terapeutycznych.^{155–157} Dodatkowo zastosowanie odpowiednich strategii formulacyjnych może ograniczać bezpośredni kontakt cząsteczki z błoną

komórkową, zmniejszając ryzyko działania niepożądanego. Cytotoksyczność należy zatem uwzględnić jako parametr projektowy, który przy odpowiednim podejściu może być kontrolowany i nie wyklucza QASs jako grupy związków o wysokim potencjale do stosowania doustnego. Wszystkie te obserwacje wskazują, że zaprojektowanie QASs o potencjalnie dobrej biodostępności po podaniu doustnym jest możliwe, choć wymaga przemyślanego podejścia pod kątem właściwości fizykochemicznych, jak i mechanizmów transportu. Nawet umiarkowana biodostępność może być wystarczająca w przypadku związków o wysokiej aktywności biologicznej. Bariera jelitowa jest złożonym systemem, który przez długi czas uznawano za istotne ograniczenie dla skutecznej absorpcji doustnej wielu związków chemicznych. Obecnie wiadomo, że ograniczenie nie ma charakteru absolutnego, a ich uzyskanie jest możliwe przy spełnieniu warunków strukturalnych i formulacyjnych.

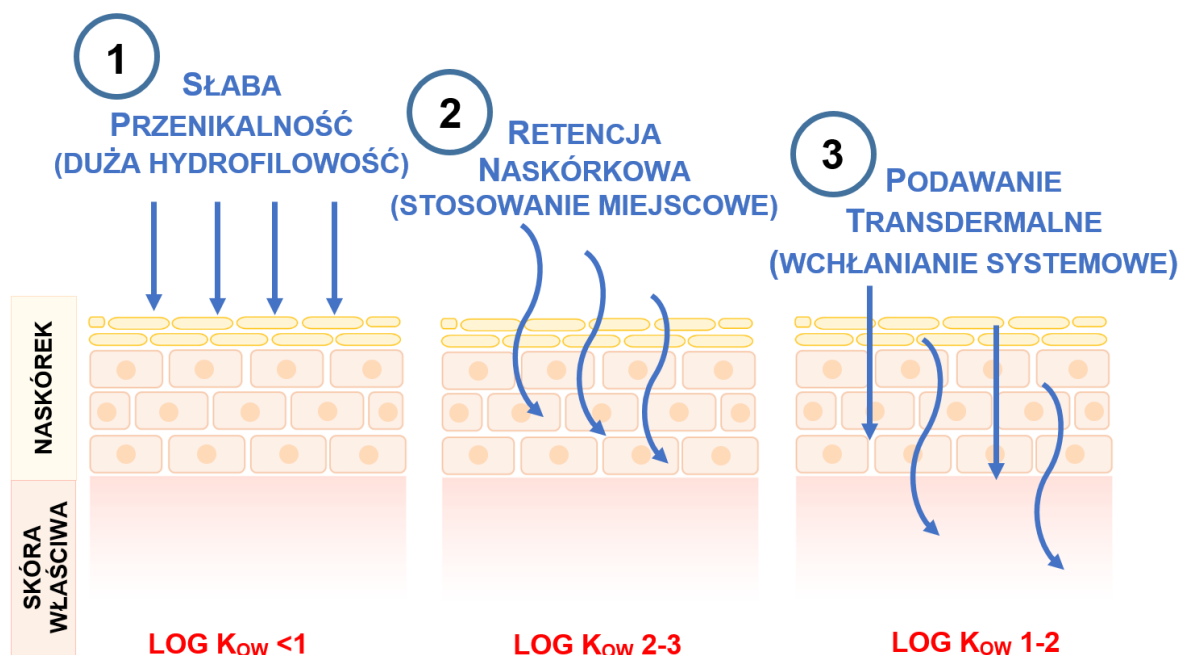
5.2. Droga skórna

Droga skórna stanowi atrakcyjną alternatywę dla tradycyjnych metod podawania leków, szczególnie w kontekście terapii miejscowej i plastrów transdermalnych o kontrolowanym uwalnianiu.¹⁵⁸ Jej główne zalety to możliwość ominięcia efektu pierwszego przejścia przez wątrobę, utrzymanie stabilnego stężenia substancji czynnej w krążeniu ogólnym oraz poprawa komfortu i przestrzegania zaleceń przez pacjenta.¹⁵⁸ Podanie przezskórne minimalizuje również ryzyko działań niepożądanych związanych z drogą doustną lub pozajelitową, takich jak podrażnienie przewodu pokarmowego czy powikłania wstrzyknięcia.¹⁵⁹ Pomimo tych zalet, skuteczność podawania leków przez skórę jest poważnie ograniczona przez jej specjalistyczną strukturę barierową. Skóra, jako największy narząd organizmu, chroni przed czynnikami środowiskowymi, jednocześnie regulując utratę wody i przenikanie substancji egzogennych. Warstwa rogowa naskórka odgrywa kluczową rolę w tym procesie, stanowiąc główną barierę dla transportu większości związków chemicznych.¹⁶⁰

Warstwa rogowa (łac. *Stratum corneum*) to najbardziej zewnętrzna, najbardziej funkcjonalnie zróżnicowana część naskórka, odpowiedzialna za ograniczanie przeznaskórkowej utraty wody i kontrolowanie przenikania substancji obcych.¹⁶¹ Transport przez warstwę rogową naskórka może odbywać się trzema głównymi drogami: międzykomórkową, transkomórkową oraz przez przydatki skóry, takie jak mieszki włosowe i gruczoły potowe.¹⁶² Droga międzykomórkowa jest dominująca i obejmuje dyfuzję cząsteczek przez macierz lipidową, która wymaga odpowiedniej lipofilowości i zdolności do rozpuszczania się w tej fazie. Droga transkomórkowa wymaga naprzemiennej środowiska hydrofilowego i lipofilowego, co czyni ją mniej skuteczną w przypadku większości związków. Transport przez przydatki skóry jest ważny

przede wszystkim dla dużych lub silnie polarnych cząsteczek, ale jego wkład w ogólną absorpcję jest zazwyczaj ograniczony.¹⁶²

Skuteczność przenikania substancji przez skórę zależy od szeregu parametrów fizykochemicznych oraz czynników związanych z formulacją i stanem fizjologicznym skóry. Masa cząsteczkowa, lipofilowość, stopień jonizacji i rozpuszczalność mają kluczowe znaczenie. Cząsteczki o masie poniżej 500 Da, temperaturze topnienia nieprzekraczającej 200 °C, umiarkowanej lipofilowości (współczynnik podziału oktanol–woda ($\log K_{ow}$) w zakresie 1–3) i ograniczonej polarności są uważane za optymalne dla przenikania przezskórnego.^{163–165} Związki nadmiernie hydrofilowe nie przenikają skutecznie przez macierz lipidową warstwy rogowej naskórka, podczas gdy związki wysoce lipofilowe mogą w niej zatrzymywać się, nie docierając do głębszych warstw skóry.¹⁶⁶ Powyższe zależności prowadzą do rozróżnienia dwóch głównych efektów działania substancji stosowanych na skórę: działania miejscowego i działania przezskórnego (transdermalnego), co ilustruje rysunek 11.



Rysunek 11. Główne drogi po naskórnym podaniu leku wraz z korespondującymi im wartościami $\log K_{ow}$.

Pomimo ograniczonej zdolności penetracji warstwy rogowej naskórka, czwartorzędowe sole amoniowe są szeroko stosowane w preparatach przeznaczonych do stosowania na skórę.^{33,167} Wynika to z faktu, że w wielu przypadkach celem terapeutycznym nie jest uzyskanie działania ogólnoustrojowego, lecz efekt miejscowy, ograniczony do powierzchni skóry lub jej najbardziej zewnętrznych warstw. W szczególności wykorzystuje się ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe, dzięki którym znajdują zastosowanie jako składniki preparatów dezynfekujących oraz wspomagających leczenie zakażeń skóry. Natomiast ich ograniczona penetracja przez warstwę rogową naskórka minimalizuje jednocześnie ryzyko działań

ogólnoustrojowych i toksyczności, co jest ważnym aspektem od strony bezpieczeństwa stosowania.

Ponadto zatrzymanie substancji czynnej w warstwie rogowej naskórka może prowadzić do retencji substancji czynnej na powierzchni skóry, przedłużając czas jej działania i zwiększając jej skuteczność w miejscu aplikacji.¹⁶⁸ Zjawisko to może być szczególnie korzystne w przypadku preparatów o działaniu antyseptycznym, gdzie dłuższy kontakt z powierzchnią skóry zwiększa skuteczność eliminacji patogenów.

Kolejnym ważnym obszarem badań jest wykorzystanie właściwości powierzchniowo czynnych QASs. Jako związki amfifilowe, mogą one wpływać na strukturę lipidów warstwy rogowej naskórka, zwiększając ich płynność, a tym samym działając jako promotory penetracji.¹⁶⁹ Przy odpowiednio dobranych stężeniach efekt ten może prowadzić do zwiększenia przepuszczalności skóry bez trwałego uszkodzenia bariery skórnej. Należy także podkreślić, że właściwości powierzchniowo czynne QASs mogą być również związane z niekorzystnym działaniem cytotoksycznym, wynikającym z ich zdolności do zakłócania integralności błon komórkowych.¹⁷⁰ W wyższych stężeniach lub przy długotrwałej ekspozycji może to prowadzić do podrażnienia i przejściowego uszkodzenia bariery naskórkowej. Jednakże, ze względu na ciągły proces odnowy i złuszczenia warstwy rogowej naskórka, potencjalne gromadzenie się substancji w jej obrębie ma charakter przejściowy, co ogranicza ryzyko wystąpienia długotrwałych skutków ogólnoustrojowych.¹⁷¹ W praktyce oznacza to, że potencjalna cytotoksyczność czwartorzędowych soli amoniowych ma charakter przede wszystkim miejscowy i zależy od stężenia oraz czasu ekspozycji, natomiast ryzyko długotrwałej kumulacji w skórze pozostaje ograniczone w warunkach prawidłowo funkcjonującej bariery naskórkowej.

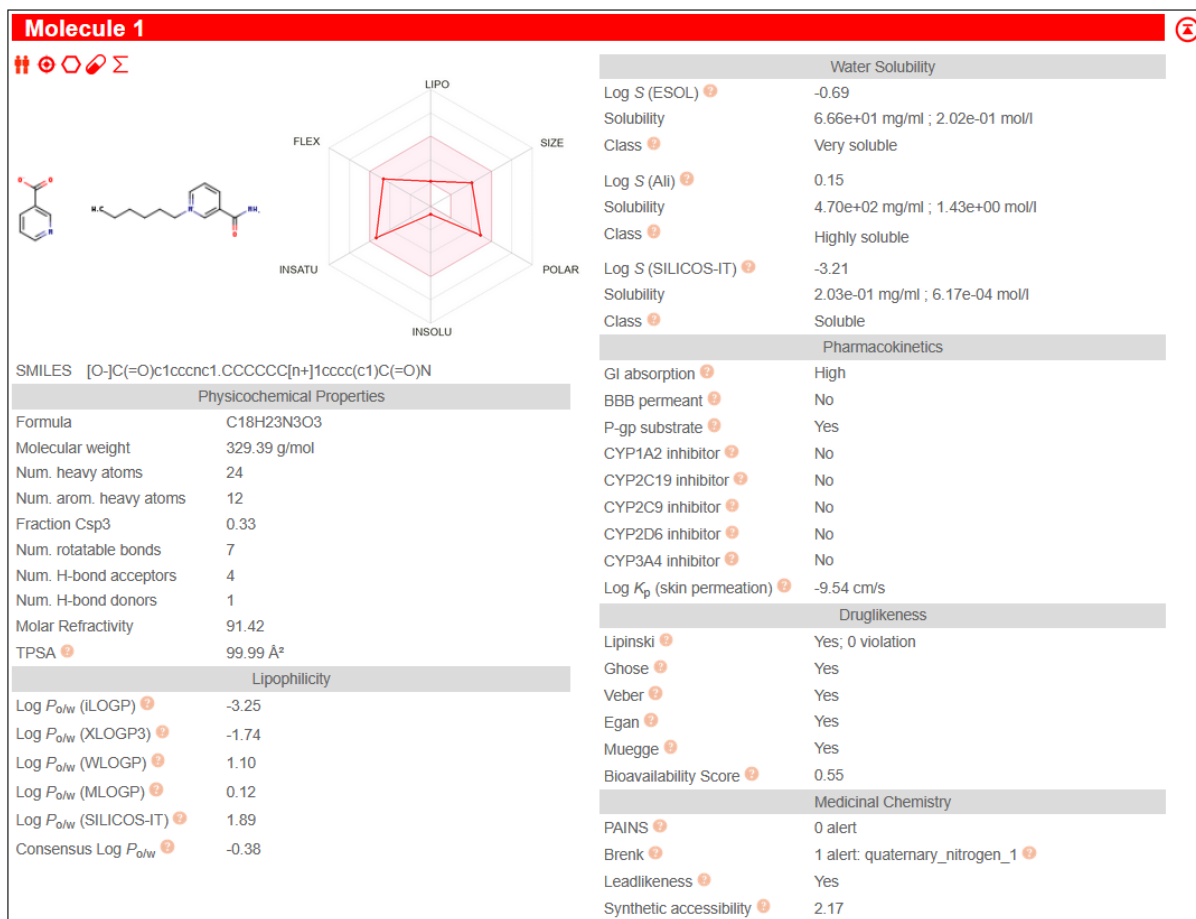
6. Metody *in silico* w projektowaniu soli farmaceutycznych

6.1. Predykcja ADME

Współczesny rozwój leków w coraz większym stopniu opiera się na metodach *in silico*, tj. symulacjach komputerowych, które przewidują właściwości farmakokinetyczne cząsteczek przed ich syntezą. Znaczenie tych metod wynika z rosnącej potrzeby efektywnej selekcji związków o optymalnych właściwościach już na wczesnych etapach projektowania. Obecnie sukces kandydata na lek zależy nie tylko od jego aktywności biologicznej, ale przede wszystkim od profilu ADME (ang. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*), który określa, czy substancja będzie skutecznie wchłaniana, dystrybuowana w organizmie, bezpiecznie metabolizowana i wydajnie wydalana.^{172,173} Szacuje się, że nawet 40–60% projektów badawczo-rozwojowych kończy się niepowodzeniem nie z powodu braku aktywności farmakologicznej

cząsteczki, ale z powodu niespełnienia kryteriów ADME – wykazywania niepożądanego toksyczności, zbyt szybkiej degradacji, słabego wchłaniania czy akumulacji w tkankach.^{174,175} W tym kontekście modelowanie komputerowe stało się narzędziem redukcji kosztów i ryzyka, umożliwiając m.in. weryfikację tysięcy struktur chemicznych w ciągu kilku godzin, zamiast eksperymentów laboratoryjnych, które mogłyby trwać miesiące, a nawet lata.

Prognozowanie ADME odpowiada również na współczesne wyzwania etyczne i logistyczne. Zmniejszenie liczby nieudanych syntez związków ogranicza wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych i materiału biologicznego, a jednocześnie skraca czas przejścia od fazy projektowania do badań przedklinicznych. Modele predykcyjne umożliwiają ocenę także potencjalnej toksyczności i mutagenności przed pierwszym kontaktem substancji z organizmem żywym. Pozwala to na szybsze i bardziej racjonalne decyzje projektowe, kierując inwestycje wyłącznie do cząsteczek o obiecujących właściwościach farmakokinetycznych. Za pomocą obliczeń komputerowych naukowcy mogą wstępnie oszacować los metaboliczny, interakcje z enzymami, przenikanie przez bariery biologiczne (np. BBB), zdolność dyfuzji przez błony komórkowe oraz potencjał akumulacji w tkankach lipidowych (rysunek 12).¹⁷³



Rysunek 12. Wyniki analizy ADME kandydata na lek w programie SwissADME.

Programy QSAR (ang. *Quantitative Structure–Activity Relationship*; ilościowa analiza zależności struktura–aktywność), dokowanie molekularne, symulacje dynamiki molekularnej oraz

uczenie maszynowe umożliwiają identyfikację tzw. deskryptorów, czyli parametrów opisujących cechy strukturalne związków, które mogą być następnie korelowane z ich właściwościami biologicznymi i farmakokinetycznymi.^{176,177} W rezultacie cząsteczkę można celowo zmodyfikować wpływając na zwiększenie rozpuszczalności, zmniejszenie toksyczności lub poprawę jej zdolności do penetracji przez skórę czy przewód pokarmowy. Obecnie predykcja ADME stała się integralną częścią farmakologii cyfrowej i racjonalnego projektowania leków. Wspiera ona nie tylko wysokoprzepustowe badania przesiewowe, ale także umożliwia opracowywanie proleków, form soli, par jonowych, nanonośników oraz systemów transdermalnych, jeszcze zanim laboratorium przeprowadzi jakiekolwiek doświadczenie. Ostatecznie celem predykcji ADME jest zwiększenie pewności, że potencjalny lek dotrze do miejsca działania w odpowiednim stężeniu i czasie, z akceptowalnym profilem bezpieczeństwa, co oznacza, że spełni wymagania dotyczące skuteczności klinicznej, toksykologii i potrzeb rynku farmaceutycznego.¹⁷⁸

Do kluczowych parametrów ocenianych w analizach *in silico* należą przepuszczalność przez komórki Caco-2 określaną przez współczynnik przepuszczalności (P_{app}) oraz wchłanianie w jelicie człowieka (WJ), które pozwalają przewidzieć dostępność biologiczną po podaniu doustnym, a tym samym potencjalną skuteczność farmakologiczną związku.^{179,180} P_{app} odzwierciedla zdolność cząsteczki do pokonania barier błonowych, natomiast WJ uwzględnia również inne czynniki wpływające na wchłanianie w przewodzie pokarmowym, takie jak rozpuszczalność i oddziaływania z błoną jelitową. Równocześnie istotną rolę odgrywa określenie frakcji niezwiązanej w osoczu (FN), która informuje o udziale cząsteczek pozostających w formie niezwiązanej z białkami osocza.¹⁸¹ Wysoka wartość FN jest pożądana, ponieważ wskazuje, że znaczna część związku pozostaje farmakologicznie aktywna i zdolna do interakcji z miejscami docelowymi, co może przyspieszać początek działania leku i zwiększać jego dystrybucję do tkanek. Z drugiej strony niska FN, mimo wysokiej przepuszczalności, może ograniczać ilość leku dostępnego w formie wolnej i tym samym wpływać na jego skuteczność farmakologiczną.¹⁸² Kolejnym istotnym parametrem jest rozpuszczalność w wodzie (RW), ponieważ słaba rozpuszczalność w płynach żołądkowo-jelitowych może ograniczać rozpuszczenie, wchłanianie leku i ostatecznie zmniejszać jego biodostępność.¹⁸³ Szczególne znaczenie ma także TPSA (ang. *Topologiczna Polar Surface Area*, Topologiczna Powierzchnia Polarna), która opisuje całkowitą powierzchnię atomów polarnych (głównie tlenu i azotu z przyłączonymi atomami wodoru). Wartości TPSA $\leq 140 \text{ \AA}^2$ są uważane za szczególnie korzystne, ponieważ związki w tym zakresie wykazują zazwyczaj lepszą absorpcję jelitową i wyższą biodostępność doustną.¹⁸⁴ Wczesna ocena tych parametrów w modelach komputerowych pozwala

na identyfikację najbardziej obiecujących struktur czy systemów do badań eksperymentalnych, minimalizując jednocześnie ryzyko późniejszych niepowodzeń klinicznych.

Potencjalnie predykcja ADME umożliwia projektowanie leków, w tym QASs o optymalnych właściwościach farmakokinetycznych i wysokim bezpieczeństwie stosowania, m.in. poprzez odpowiednie modyfikacje strukturalne, takie jak zmiana długości łańcucha alkilowego w kationie lub rodzaju anionu.

6.2. Ocena potencjału przeciwzapalnego i anestetycznego metodą dokowania molekularnego

Dokowanie molekularne to nowoczesna technika stosowana w projektowaniu leków, umożliwiająca przewidywanie sposobu oddziaływania danej cząsteczki z określonym celem biologicznym, takim jak białko, enzym lub receptor. Metoda ta opiera się na modelowaniu interakcji między lekiem a miejscem wiązania białka, tzw. modelu „klucza i zamka”. Cząsteczka leku musi dopasować się do miejsca wiązania białka, aby wywołać pożądany efekt biologiczny. Dokowanie molekularne przewiduje zarówno siłę interakcji, jak i orientację cząsteczki w miejscu wiązania, co ma kluczowe znaczenie dla skuteczności i selektywności leku. Kluczową zaletą dokowania molekularnego jest jego szybkość i opłacalność w porównaniu z tradycyjnymi badaniami eksperymentalnymi.^{185,186} Symulacje komputerowe pozwalają na przebadanie setek, a nawet tysięcy potencjalnych leków w krótkim czasie, wybierając te o największym potencjale. Metoda ta jest obecnie szeroko stosowana w projektowaniu leków przeciwzapalnych i znieczulających, a także w badaniach przeciwnowotworowych, przeciwbakteryjnych i wirusologicznych, stanowiąc integralną część nowoczesnego projektowania leków i farmakoinformatyki.^{178,187}

W przypadku leków przeciwzapalnych, dokowanie molekularne umożliwia analizę interakcji z enzymami i receptorami zaangażowanymi w kaskadę zapalną. Do typowych celów molekularnych w przypadku określania właściwości przeciwzapalnych należą cyklooksigenazy: COX-1 i COX-2. COX-1 jest uważana głównie za enzym pełniący przede wszystkim funkcje fizjologiczne, takie jak ochrona błony śluzowej żołądka, utrzymanie i ochrona funkcji nerek. Natomiast COX-2 odpowiada głównie za inicjowanie i utrzymywanie procesów zapalnych, pełniąc jedynie niewielkie funkcje fizjologiczne.¹⁸⁸ Enzymy te odgrywają kluczową rolę w biosyntezie mediatorów zapalnych, w tym prostaglandyn i leukotrienów. Dokowanie molekularne pozwala przewidywać sposób wiązania potencjalnych inhibitorów z miejscem aktywnym enzymu, identyfikować kluczowe interakcje stabilizujące kompleks ligand-białko oraz oceniać selektywność wobec poszczególnych izoform, takich jak COX-2 w porównaniu z COX-1. Ma to istotne implikacje kliniczne, ponieważ zwiększona selektywność wobec COX-2

może wiązać się ze zmniejszonym ryzykiem działań niepożądanych ze strony przewodu pokarmowego. Analiza energii wiązania i rodzajów oddziaływań (wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania π - π i oddziaływania elektrostatyczne) umożliwia identyfikację związków o potencjalnie silnym działaniu przeciwzapalnym. Wstępna selekcja kandydatów z wykorzystaniem metod *in silico* znacząco przyspiesza poszukiwania nowych niesteroidowych leków przeciwzapalnych i selektywnych inhibitorów enzymów prozapalnych.

Miejsce aktywne COX ma postać hydrofobowego kanału zakończonego obszarem katalitycznym, w którym kluczową rolę odgrywają zarówno reszty odpowiedzialne za zakotwiczenie ligandu (np. poprzez oddziaływania jonowe z arginina), jak i aminokwasy uczestniczące w stabilizacji kompleksu za pośrednictwem wiązań wodorowych oraz oddziaływań hydrofobowych i aromatycznych. W kontekście selektywności względem izoform COX-1 i COX-2 istotne znaczenie ma również obecność tzw. kieszeni bocznej, która umożliwia wiązanie większych, selektywnych inhibitorów.^{189,190} Kieszeń wiążąca C1 odpowiada głównemu kanałowi katalitycznemu, w którym wiążą się substraty oraz klasyczne inhibitory COX, a jej charakter związany jest z bezpośrednim blokowaniem dostępu do miejsca aktywnego. Kieszeń C2 stanowi natomiast boczną, powiększoną przestrzeń charakterystyczną dla COX-2, wynikającą z różnic strukturalnych względem COX-1, umożliwiającą wiązanie większych grup funkcjonalnych obecnych w selektywnych inhibitorach COX-2. W analizie dokowania molekularnego penetracja ligandu do kieszeni C2 może wskazywać na potencjalną selektywność wobec COX-2, podczas gdy oddziaływania ograniczone do C1 sugerują charakter mniej selektywny. Dokowanie molekularne względem COX-2 stanowi zatem użyteczne narzędzie do wstępnej oceny potencjału przeciwzapalnego badanych związków, umożliwiając analizę ich powinowactwa do miejsca aktywnego oraz identyfikację kluczowych oddziaływań. Należy jednak podkreślić, że uzyskane wyniki mają charakter predykcyjny i wymagają potwierdzenia w badaniach eksperymentalnych. W tabeli 1 przedstawiono kluczowe reszty aminokwasowe zidentyfikowane w obrębie tych kieszeni wiążących (C1 i C2), wraz z ich funkcjonalnym znaczeniem w procesie wiązania inhibitorów.

W przypadku leków znieczulających, dokowanie molekularne pozwala badać interakcje z receptorami i kanałami jonowymi w układzie nerwowym, które regulują przewodzenie nerwowe i odczuwanie bólu. Typowe cele molekularne obejmują kanały sodowe i potasowe, a także receptory kwasu gamma-aminomasłowego (GABA). Dokowanie pozwala przewidywać, w jaki sposób środek znieczulający wiąże się z tymi receptorami, jak zmienia ich konformację i jak blokuje przekazywanie sygnałów nerwowych, prowadząc do efektu znieczulającego.^{195–197} W efekcie umożliwia to projektowanie leków o większej selektywności, szybszym działaniu oraz niższym ryzyku wystąpienia działań niepożądanych.

Tabela 1. Charakterystyka kluczowych reszt aminokwasowych w miejscach aktywnych COX-2 istotnych dla wiązania inhibitorów przeciwzapalnych.^{191–194}

Kieszon wiążąca C1			
Numer reszty aminokwasowej	Pełna nazwa reszty aminokwasowej	Typ interakcji/rola	Opis funkcji
R120	Arginina (Arg)	Jonowe / kotwiczące	Tworzy mostek solny z grupą karboksylową ligandu; kotwiczycząsteczkę przy wejściu do kanału aktywnego.
Y385	Tyrozyna (Tyr)	Aromatyczne / katalityczne	Reszta katalityczna; uczestniczy w tworzeniu rodników i układaniu π - π z aromatycznymi częściami ligandu.
S530	Seryna (Ser)	Katalityczne / kowalencyjne	Niezbędny katalitycznie; miejsce acetylacji aspiryny, które blokuje dostęp substratu do miejsca aktywnego.
S353	Seryna (Ser)	Wiązania wodorowe / stabilizujące	Tworzy wiązania wodorowe, które stabilizują orientację ligandu w kanale aktywnym.
L352	Leucyna (Leu)	Hydrofobowe / stabilizujące	Przyczynia się do hydrofobowego upakowania i stabilizacji van der Waalsa kompleksu inhibitor-enzym.
V523	Walina (Val)	Hydrofobowe / selektywne	Kształtuje kieszon hydrofobową i przyczynia się do selektywności inhibitorów wobec COX-2.
Kieszon wiążąca C2			
R2120	Arginina (Arg)	Jonowe / kotwiczące	Tworzy mostek solny z grupą karboksylową ligandu; kotwiczycząsteczkę przy wejściu do kanału aktywnego.
Y2385	Tyrozyna (Tyr)	Aromatyczne / katalityczne	Reszta katalityczna; uczestniczy w tworzeniu rodników i układaniu π - π z aromatycznymi fragmentami ligandu.
S2530	Seryna (Ser)	Katalityczne / kowalencyjne	Niezbędny katalitycznie; miejsce acetylacji aspiryny, które blokuje dostęp substratu do miejsca aktywnego.
Y2355	Tyrozyna (Tyr)	Wiązania wodorowe / stabilizujące	Stabilizuje ligand w kanale aktywnym.
V2523	Walina (Val)	Hydrofobowe / selektywność	Kształtuje kieszon hydrofobową i przyczynia się do selektywności inhibitorów COX-2.
R2513	Arginina (Arg)	Polarne / selektywność	Stabilizuje ligand w kieszeni bocznej, determinuje kształt kieszeni.
F2518	Fenylalanina (Phe)	Aromatyczne / hydrofobowe	Układanie π - π i π -alkil z aromatycznymi fragmentami ligandu.
M2522	Metionina (Met)	Hydrofobowe / elastyczne połączenie	Dopasowuje się do ligandu w kieszeni bocznej.

Blokowanie kanałów sodowych (NaV1.7) prowadzi do zahamowania przewodnictwa nerwowego i zniesienia odczuwania bólu.¹⁹⁸ Szczególne znaczenie mają oddziaływania elektrostatyczne z kationową (czwartorzędową) grupą amoniową ligandu, a także kontakty typu kation- π , wiązania wodorowe oraz oddziaływania hydrofobowe, które determinują siłę i czas blokady kanału. Miejsce wiązania ligandów w obrębie kanału obejmuje centralny przedsionek oraz regiony stabilizujące, w których istotną rolę odgrywają reszty aromatyczne, kwasowe oraz polarne zdolne do tworzenia wiązań wodorowych. Kluczowe reszty aminokwasowe w obrębie kieszeni C1, z podziałem na reszty rdzeniowe bezpośrednio uczestniczące w wiązaniu ligandu oraz reszty stabilizujące wpływające na utrzymanie kompleksu ligand-kanał przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Kluczowe reszty aminokwasowe kieszeni wiążącej C1 kanału sodowego NaV1.7 zaangażowane w oddziaływanie z ligandami o potencjalnym działaniu przeciwbólowym.^{199,200}

Kieszeń wiążąca C1			
Numer reszty aminokwasowej	Pełna nazwa reszty aminokwasowej	Typ interakcji/rola	Opis funkcji
Y1215	Tyrozyna (Tyr)	Aromatyczne / kationowe- π	Stabilizuje dodatnio naładowany czwartorzędowy amoniak ligandu poprzez kontakty kation- π i π - π ; centralnie blokuje przepływ jonów.
D1677	Asparaginian (Asp)	Jonowe / kotwiące	Tworzy mostek solny/silny kontakt elektrostatyczny z ligandem kationowym; zakotwicza ligand w porach.
E1628	Glutaminian (Glu)	Jonowe / polarne	Przyciąganie elektrostatyczne do czwartorzędowego amoniaka; pomaga w umiejscowieniu ligandu w centralnym przedsionku.
M1678	Metionina (Met)	Wiązania wodorowe / stabilizujące	Część hydrofobowej wyściółki porów; zapewnia stabilizację ligandu wewnątrz przedsionka poprzez oddziaływania van der Waalsa.
T319	Treonina (Thr)	Wiązania wodorowe / orientujące	Przenosi/akceptuje wiązania wodorowe w celu orientacji grup polarnych ligandu i stabilizacji jego pozycji wiązania.
N1686	Asparagina (Asn)	Wiązania wodorowe / stabilizujące	Tworzy wiązania wodorowe z polarnymi częściami ligandu; przyczynia się do wydłużenia czasu przebywania i wierności pozycji.
F1212	Fenylalanina (Phe)	Aromatyczne / hydrofobowe	Zapewnia oddziaływania hydrofobowe π - π z aromatycznymi grupami ligandu; pomaga w hydrofobowym uszczelnieniu porów.
N1680	Asparagina (Asn)	Wiązania wodorowe / stabilizujące	Dodatkowy partner wiązania wodorowego; poprawia orientację ligandu i może wpływać na selektywność podtypów.

Kieszeń wiążąca C1 – reszty stabilizujące			
Numer reszty aminokwasowej	Pełna nazwa reszty aminokwasowej	Typ interakcji/rola	Opis funkcji
E1217	Glutaminian (Glu)	Jonowe / kotwiące	Reszta kwasowa; może tworzyć oddziaływania elektrostatyczne z kationową (czwartorzędową) grupą ligandu – działa jak kotwica.
G1723	Glicyna (Gly)	Strukturalne / elastyczne	Zapewnia elastyczność obszaru; pozwala ligandowi dopasować się do kształtu kieszeni.
S1724	Seryna (Ser)	Wiązania wodorowe / stabilizujące	Może tworzyć wiązania wodorowe z polarnością ligandu – stabilizuje orientację.
P1722	Prolina (Pro)	Strukturalne	Nadaje kąt/strukturę helisie/pętli; wpływa na kształt i dostępność kieszeni.
S1725	Seryna (Ser)	Wiązania wodorowe / stabilizujące	Może tworzyć wiązania wodorowe z polarnością ligandu – stabilizuje orientację.
V1720	Walina (Val)	Hydrofobowe / stabilizujące	Hydrofobowe wsparcie ściany przedsonka; van der Waals – stabilizuje położenie ligandu.

Dokowanie molekularne łączy w sobie modelowanie strukturalne białek, chemię obliczeniową oraz fizykę oddziaływań molekularnych. W praktyce proces dokowania obejmuje kilka etapów: przygotowanie modelu białka (receptora lub enzymu), przygotowanie cząsteczki leku, symulację możliwych orientacji i konformacji leku w miejscu wiązania oraz obliczenie energii wiązania, która określa siłę i stabilność kompleksu lek-cel. Niższa energia wiązania wskazuje na większą stabilność kompleksu ligand-receptor i potencjalnie silniejsze powinowactwo.²⁰¹ Narzędzie to umożliwia również analizę specyficznych oddziaływań, takich jak wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe i oddziaływania elektrostatyczne, które determinują selektywność i potencjał leku.

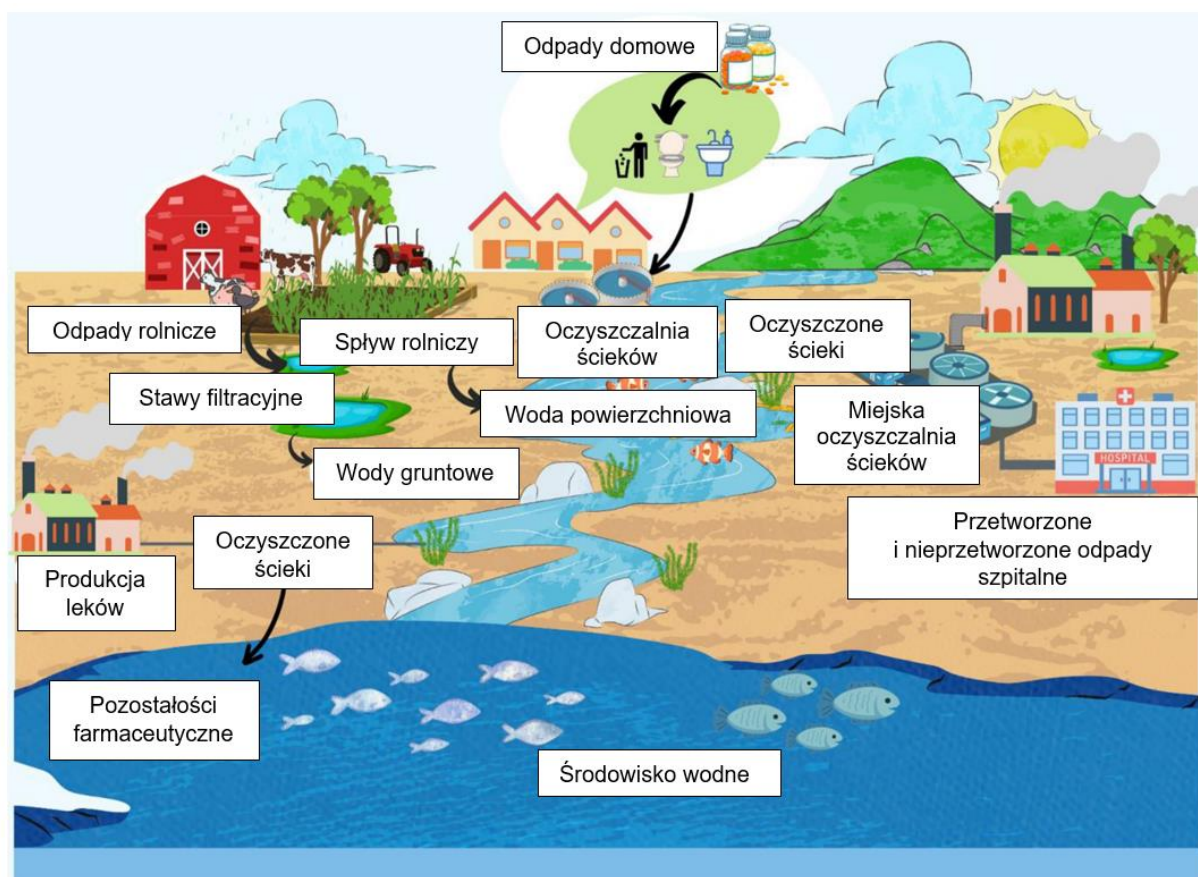
5. Ekotoksyczność substancji farmaceutycznych

Ekotoksyczność leków oznacza zdolność substancji farmaceutycznych do wywoływania niekorzystnych efektów biologicznych u organizmów, które nie są ich bezpośrednim celem działania, a które mogą być narażone na ich obecność w środowisku. W ostatnich dekadach zanieczyszczenie środowiska produktami leczniczymi zostało uznane za istotny i narastający problem ekologiczny o zasięgu globalnym.²⁰² Rozwój zaawansowanych technik analitycznych umożliwił oznaczanie farmaceutyków w matrycach środowiskowych na poziomach śladowych, ujawniając skalę ich powszechnego występowania w wodach powierzchniowych, osadach dennych oraz glebach.²⁰³

Rosnąca liczba doniesień o obecności farmaceutyków w środowisku przyczyniła się do intensyfikacji badań nad ich oddziaływaniem ekotoksykologicznym, obejmujących zarówno kontrolowane testy laboratoryjne z wykorzystaniem organizmów modelowych, jak i badania terenowe.^{204,205} Wiele międzynarodowych organów regulacyjnych i naukowych, w tym Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD), Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA) i Organizacja Narodów Zjednoczonych (ONZ), uznają parametr EC₅₀ (ang. *Half Maximal Effective Concentration*, stężenie substancji wywołujące 50% maksymalnego efektu biologicznego) za kluczowy punkt końcowy ekotoksykologiczny wskazujący potencjalny wpływ substancji chemicznych na środowisko wodne.³³ Wykazano, że nawet niskie, środowiskowo istotne stężenia tych związków mogą prowadzić do długotrwałych konsekwencji biologicznych, takich jak selekcja szczepów bakterii opornych na antybiotyki oraz zaburzenia funkcjonowania organizmów wodnych, w tym ryb i bezkręgowców.^{204,206} Mechanizmy te są szczególnie trudne do przewidzenia, ponieważ farmaceutyki projektowane są do działania na poziomie molekularnym (np. poprzez oddziaływanie z określonymi receptorami lub enzymami), a ich współwystępowanie w środowisku może skutkować różnymi efektami synergistycznymi.²⁰⁷

Substancje czynne, mimo że opracowywane z myślą o specyficznym działaniu terapeutycznym u ludzi i zwierząt, przedostają się do środowiska różnorodnymi drogami emisji, w tym poprzez ścieki komunalne i szpitalne, odpady z produkcji farmaceutycznej, niewłaściwą utylizację przeterminowanych produktów leczniczych oraz wydalenie z organizmu niezmienionych substancji czynnych i ich metabolitów (rysunek 13). W konsekwencji mogą one wywoływać efekty toksyczne i subletalne, prowadząc do zaburzeń reprodukcji, zmian tempa wzrostu oraz zahamowania rozwoju wielu organizmów żyjących w środowisku naturalnym i stanowiących element lokalnego ekosystemu.^{208,209} Szczególne znaczenie przypisuje się lekom hormonalnym, niesteroidowym lekom przeciwzapalnym oraz antybiotykom, które poprzez oddziaływanie na szlaki enzymatyczne i receptory mogą wpływać na funkcjonowanie organizmów wodnych reprezentujących różne poziomy troficzne.²¹⁰

Dodatkowym czynnikiem ryzyka jest zdolność niektórych farmaceutyków do bioakumulacji, szczególnie w przypadku związków lipofilowych lub wykazujących wysoką trwałość środowiskową.^{211,212} Substancje te mogą kumulować się w tkankach organizmów wodnych oraz ulegać biomagnifikacji w łańcuchu pokarmowym, stanowiąc zagrożenie dla drapieżników, a pośrednio również dla człowieka jako konsumenta zasobów wodnych.



Rysunek 13. Możliwe drogi rozprzestrzeniania się produktów farmaceutycznych przeznaczonych dla ludzi w środowisku.²⁰⁸

Właściwości fizykochemiczne substancji farmaceutycznych, w szczególności lipofilowość oraz rozpuszczalność w wodzie, odgrywają kluczową rolę w określaniu ich losu środowiskowego oraz potencjału bioakumulacyjnego. Związki o wysokiej lipofilowości wykazują zwiększoną zdolność do przenikania przez lipidowe błony komórkowe, co sprzyja ich kumulacji w tkankach organizmów wodnych. Z kolei substancje dobrze rozpuszczalne w wodzie łatwo rozprzestrzeniają się w środowisku wodnym, zwiększając zakres narażenia żyjących tam organizmów.²¹³

W badaniach ekotoksykologicznych szeroko wykorzystuje się organizmy modelowe, w tym słonowodnego skorupiaka – solowca, *Artemia franciscana*, który stanowi uznany model do oceny toksyczności środowiskowej. Gatunek ten charakteryzuje się krótkim cyklem życiowym, łatwością hodowli laboratoryjnej oraz wysoką wrażliwością na zmiany parametrów środowiskowych, takich jak pH, temperatura czy zasolenie. Zdolność do akumulacji substancji organicznych oraz wyraźna, mierzalna odpowiedź na ekspozycję na zanieczyszczenia czynią go wartościowym bioindykatorem w ocenie wpływu farmaceutyków na organizmy wodne. Testy letalności prowadzone z wykorzystaniem tego modelu umożliwiają ocenę przeżywalności, tempa wzrostu oraz zdolności reprodukcyjnych w warunkach narażenia na substancje czynne.^{214–216}

Zielona chemia stanowi podejście projektowe ukierunkowane na ograniczanie negatywnego wpływu procesów i produktów chemicznych na środowisko oraz zdrowie ludzi już na etapie planowania ich struktury i syntezy. W kontekście projektowania nowych farmaceutyków oznacza to dążenie do tworzenia substancji o wysokiej skuteczności terapeutycznej przy jednoczesnym uwzględnieniu ich losów środowiskowych, w tym podatności na biodegradację, trwałości oraz potencjału bioakumulacji. Takie podejście pozwala integrować wymagania farmakologiczne z zasadami zrównoważonego rozwoju, prowadząc do ograniczenia ryzyka ekotoksykologicznego jeszcze na etapie projektowania kandydata na lek.²¹⁷ Współczesne strategie rozwoju farmaceutyków coraz częściej zakładają również optymalizację procesów syntezy pod kątem ich efektywności, energooszczędności oraz minimalizacji powstawania odpadów, co sprzyja redukcji obciążenia środowiska. Jednocześnie coraz większą rolę odgrywa projektowanie cząsteczek o korzystnym profilu ADME i ograniczonej trwałości środowiskowej, co może zmniejszać ich akumulację w ekosystemach wodnych. W odpowiedzi na rosnącą obecność farmaceutyków w środowisku rozwijane są także strategie obejmujące bardziej efektywne systemy oczyszczania ścieków, odpowiedzialną utylizację leków oraz projektowanie nowych substancji czynnych o zwiększonej podatności na degradację.

CEL I ZAKRES PRACY

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie, synteza i kompleksowa charakterystyka nowych farmaceutycznie aktywnych czwartorzędowych soli amoniowych (API-QASs) zawierających w swojej strukturze kationy pochodzące z nikotynamidu i lidokainy, połączone z biologicznie aktywnymi anionami pochodzącymi zarówno ze związków naturalnych, jak i substancji o udowodnionym potencjale farmakologicznym, takich jak kwas salicylowy, kwas *p*-aminobenzoowy oraz kwas nikotynowy. Głównym celem badań było opracowanie nowych układów jonowych o zoptymalizowanych właściwościach fizykochemicznych, biologicznych i farmakokinetycznych, umożliwiających zwiększenie skuteczności terapeutycznej i poprawę biodostępności substancji czynnych przeznaczonych do podawania doustnego i miejscowego.

Pierwszy etap badań obejmował syntezę prekursorów w postaci bromków *N*-alkilnikotynamidu i *N*-alkilolidokainy poprzez czwartorzędowanie odpowiednich związków wyjściowych. Następny krok stanowiło otrzymanie docelowych farmaceutycznie aktywnych soli organicznych poprzez:

- wymianę jonową pomiędzy otrzymanymi czwartorzędowymi bromkami amoniowymi oraz solami potasowymi wybranych kwasów organicznych
- neutralizację bazującą na zobojętnieniu otrzymanych produktów pośrednich – czwartorzędowych wodorotlenków amoniowych za pomocą odpowiednich kwasów organicznych.

Dodatkowo przygotowano układy odniesienia, obejmujące klasyczne kombinacje API (nikotynamid oraz lidokaina) z kwasami organicznymi, umożliwiające porównawczą ocenę wpływu formy leku na badane właściwości. Strukturę i czystość otrzymanych związków potwierdzono analizą spektroskopową (UV, FT-IR oraz ^1H i ^{13}C NMR), po czym wyznaczono dla nich zawartość jonów bromkowych, temperatury topnienia, zawartość wody oraz określono wartość współczynnika podziału oktanol–woda. Kluczowym elementem badań była również ocena wpływu struktury chemicznej, w tym długości łańcucha alkilowego i rodzaju użytego anionu, na właściwości fizykochemiczne, takie jak rozpuszczalność w środowiskach o zmiennym pH, stabilność chemiczna, aktywność powierzchniowa, napięcie powierzchniowe i przenikalność przez bariery biologiczne.

W kolejnym etapie badań oceniono potencjał biologiczny otrzymanych soli, analizując ich właściwości przeciwzapalne (test denaturacji albuminy i dokowanie molekularne wobec enzymu COX-2), aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą (MIC, MBC/MFC), zdolność do zapobiegania tworzeniu biofilmu oraz mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego. Szczególną uwagę zwrócono również na określenie potencjału otrzymanych związków jako

nowoczesnych formułacji leków przeznaczonych do podawania doustnego i przezskórnego, poprzez badania przepuszczalności z wykorzystaniem modeli PAMPA (w tym GIT-PAMPA i SKIN-PAMPA), analizę współczynnika przepuszczalności skóry oraz predykcję parametrów ADME metodami *in silico*.

Ostatecznym celem badań była wieloaspektowa ocena bezpieczeństwa projektowanych soli organicznych, obejmująca badania cytotoksyczności na komórkach jelit ludzkich oraz ocenę ekotoksyczności na modelowym organizmie wodnym (*Artemia franciscana*), co pozwoliło na określenie ich potencjału aplikacyjnego jako nowej generacji farmaceutycznych form jonowych o wysokiej skuteczności terapeutycznej, kontrolowanej biodostępności i ograniczonym wpływie na środowisko.

HIPOTEZY BADAWCZE

- Niniejsza praca opiera się na założeniu, że projektowanie farmaceutycznie aktywnych soli organicznych typu API-QAS, łączących kationy o znanej aktywności biologicznej z odpowiednio dobranymi anionami, może prowadzić do uzyskania układów o wielofunkcyjnym działaniu terapeutycznym. Zakłada się, że w takich strukturach chemicznych możliwe jest zachowanie aktywności biologicznej poszczególnych jonów, wynikające z ich występowania w formie jednej molekuly.
- Hipotezą pracy jest również, że odpowiedni dobór pary kation–anion może prowadzić do efektów synergicznych, przejawiających się zwiększoną aktywnością biologiczną w porównaniu z działaniem poszczególnych składników stosowanych oddzielnie, przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych właściwości fizykochemicznych.
- Zakłada się ponadto, że modyfikacja struktury kationu, w szczególności poprzez zmianę długości łańcucha alkilowego, istotnie wpływa na właściwości fizykochemiczne otrzymanych soli, takie jak rozpuszczalność, lipofilowość, aktywność powierzchniowa oraz zdolność przenikania przez bariery biologiczne, co bezpośrednio przekłada się na ich aktywność biologiczną.
- Kolejna hipoteza zakłada, że projektowanie układów API-QASs umożliwia jednocześnie kształtowanie właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, prowadząc do uzyskania związków o zwiększonej biodostępności oraz skuteczności terapeutycznej w porównaniu z klasycznymi formami substancji czynnych.
- Istotnym założeniem pracy jest również to, że odpowiednie projektowanie struktury chemicznej QASs pozwala na uzyskanie układów charakteryzujących się korzystnym profilem bezpieczeństwa, obejmującym zarówno niską cytotoksyczność, jak i ograniczony wpływ ekotoksykologiczny.
- W konsekwencji przyjmuje się, że opracowane układy jonowe mogą stanowić obiecującą platformę dla rozwoju nowej generacji formułacji farmaceutycznych, łączących wysoką skuteczność terapeutyczną z kontrolowaną biodostępnością i ograniczonym wpływem na środowisko.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Wykaz stosowanych odczynników znajduje się w aneksie (tabele A1-A8)

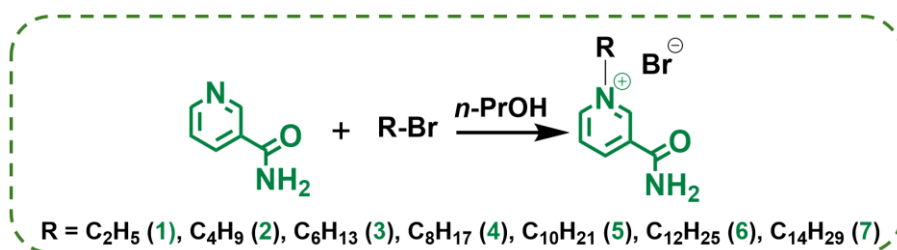
6.1. Sposoby prowadzenia syntez

6.1.1. Synteza soli potasowych kwasów organicznych

W kolbie okrągłodennej o pojemności 500 mL umieszczono 0,20 mola odpowiedniego kwasu organicznego: salicylowego (**SAL**) lub nikotynowego (**NIK**) lub *p*-aminobenzoowego (**PABA**), po czym dodano równomolową ilość wodorotlenku potasu (0,20 mola) rozpuszczonego w 150 mL odwodnionego metanolu w półautomatycznym reaktorze EasyMax 102 (Mettler Toledo, Szwajcaria) wyposażonym w pH-metr z kalibrowaną elektrodą szklaną. Zawartość kolby mieszano w temperaturze 50-60 °C, aż do uzyskania klarownych roztworów o pH = 7,0. Za pomocą wyparki próżniowej odparowano wodę, a otrzymane sole: salicylan potasu (**[K][SAL]**), nikotynian potasu (**[K][NIC]**) i *p*-aminobenzoetan potasu (**[K][PABA]**), suszono w suszarce próżniowej (1–2 mbar) w temperaturze 40°C przez 24 godziny.

6.1.2. Synteza prekursorów soli z kationem nikotynamidu – reakcja czwartorzędowania nikotynamidu

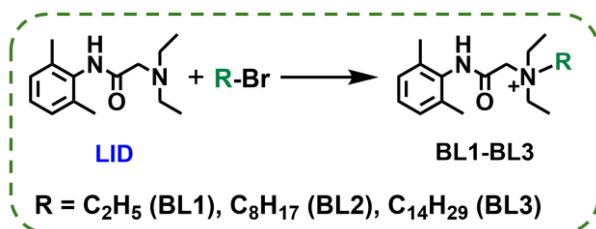
Bromki *N*-alkilonikotynamidu (**1–7**) otrzymano w reakcji czwartorzędowania nikotynamidu z liniowymi 1-bromoalkanami (C₂H₅Br–C₁₄H₂₉Br), które prowadzono w reaktorze EasyMax (Mettler Toledo, Szwajcaria), zgodnie z wcześniej opisaną metodologią (rysunek 14).⁷¹ Nikotynamid (0,20 mola) i 1-bromoalkan (0,21 mola) rozpuszczono w 20 mL *n*-propanolu, a otrzymaną mieszaninę ogrzewano w temperaturze 97 °C pod chłodnicą zwrotną przez 12 godzin. Po schłodzeniu roztworu osad produktów reakcji odfiltrowano pod zmniejszonym ciśnieniem i trzykrotnie przemyto porcjami (10 mL) acetonu. Zastosowanie acetonu umożliwiało usunięcie nieprzereagowanych 1-bromoalkanów, które są w nim rozpuszczalne, podczas gdy otrzymane bromki pozostają nierozpuszczalne. Na koniec produkty suszono pod próżnią (1–2 mbar) w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Wszystkie zsyntetyzowane sole (**1–7**) przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



Rysunek 14. Synteza bromków *N*-alkilonikotynamidu (**1–7**), gdzie R = C₂H₅–C₁₄H₂₉.

6.1.3. Synteza prekursorów soli z kationem lidokainy – reakcja czwartorzędowania lidokainy

Część syntez prowadzono przy udziale dr. inż. Damiana Kaczmarka z Politechniki Poznańskiej. Odpowiednie bromki *N*-alkilolidokainy uzyskano poprzez czwartorzędowanie lidokainy (**LID**) odpowiednim liniowym 1-bromoalkanem (rysunek 15). W przypadku bromku *N*-etylolidokainy (**BL1**), stechiometryczne ilości (0,1 mola) bromoetanu i lidokainy rozpuszczono w 50 mL acetonitrylu. Reakcję prowadzono w temperaturze 35 °C przez 7 dni. Wytrącony produkt odsączono, przemyto małymi porcjami heksanu i suszono w suszarce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem (1–2 mbar) w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Bromek *N*-oktylolidokainy (**BL2**) i bromek *N*-tetradecylolidokainy (**BL3**) uzyskano w drodze syntezy bezrozpuszczalnikowej, w której 0,1 mola lidokainy rozpuszczono w 0,2 mola odpowiedniego bromoalkanu i ogrzewano w temperaturze 60 °C przez 7 dni. Wytrącony produkt odsączono, przemyto małymi porcjami (10 mL) heksanu i suszono w suszarce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem (1–2 mbar) w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Wszystkie zsyntetyzowane sole (**BL1–BL3**) przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



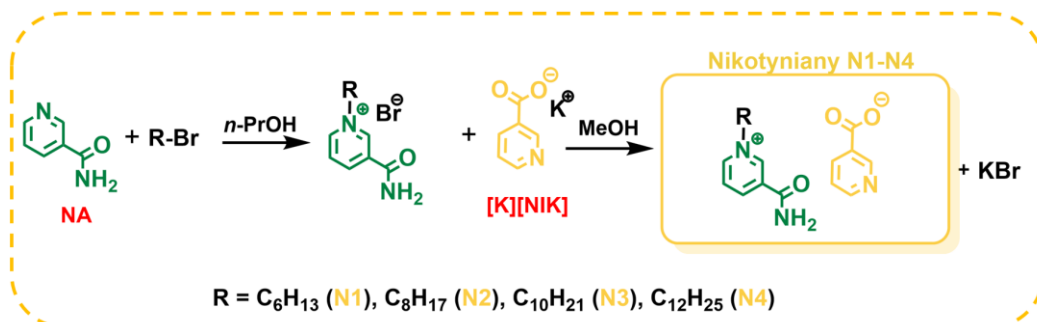
Rysunek 15. Synteza bromków *N*-alkilolidokainy (**BL1–BL3**).

6.1.4. Synteza soli z kationem nikotynamidu

Synteza nikotynianów *N*-alkilonikotynamidu (**N1–N4**)

W kolbie okrągłodennej wyposażonej w mieszadło mechaniczne umieszczono 0,01 mola odpowiedniego bromku *N*-alkilonikotynamidu (**3–6**), który rozpuszczono w 10 mL odwodnionego metanolu. Następnie dodano [**K**][**NIK**] rozpuszczony w 10 mL odwodnionego metanolu, z 2% nadmiarem molowym (0,0102 mola), aby przeprowadzić reakcję wymiany jonowej (rysunek 16). Mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano w temperaturze 40 °C przez 15 minut, a następnie schłodzono do 0 °C. W wyniku wymiany jonowej z mieszaniny poreakcyjnej wytrącił się osad bromku potasu, który następnie odfiltrowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a z filtratu odparowano rozpuszczalnik za pomocą wyparki próżniowej rotacyjnej. Otrzymane produkty zostały dodatkowo oczyszczone poprzez dodanie niewielkiej ilości (10–15 mL) acetonu, co umożliwiło wyizolowanie pozostałości nieorganicznych zanieczyszczeń i nadmiaru reagentów

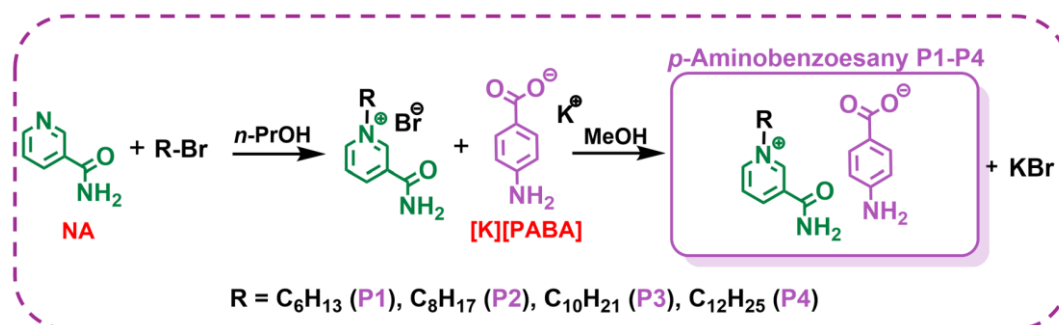
poprzez filtrację próżniową. Po odparowaniu acetonu z przesączu za pomocą wyparki próżniowej rotacyjnej otrzymane produkty suszono w suszarce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem (1–2 mbar) w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Wszystkie zsyntetyzowane sole (**N1–N4**) przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



Rysunek 16. Synteza nikotynianów *N*-alkilonikotynamidu (**N1–N4**).

Synteza *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilonikotynamidu (**P1–P4**)

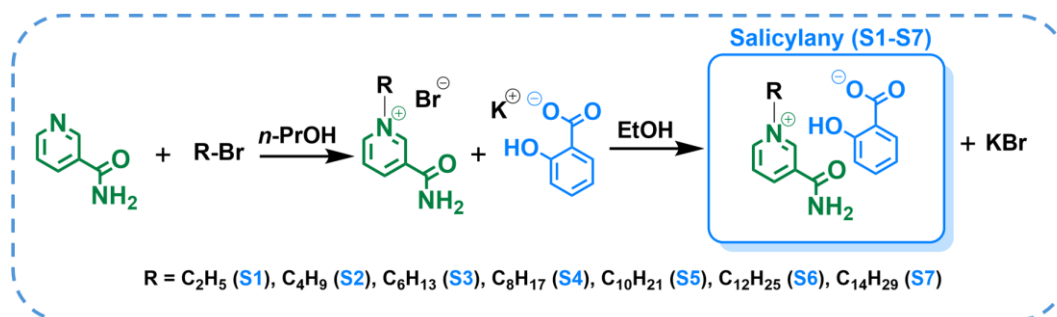
Do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło mechaniczne wprowadzono 0,01 mola odpowiedniego bromku *N*-alkilonikotynamidu (**3–6**) oraz 10 mL odwodnionego metanolu (rysunek 14). Następnie dodano **[K][PABA]** rozpuszczony w 10 mL metanolu, z 2% nadmiarem molowym (0,0102 mola), aby przeprowadzić reakcję wymiany jonowej (rysunek 17). Układ reakcyjny intensywnie mieszano w temperaturze 40 °C przez 15 minut, a następnie schłodzono do 0 °C. Reakcja wymiany jonowej doprowadziła do wytrącenia bromku potasu, który został oddzielony techniką filtracji próżniowej, po czym rozpuszczalnik został usunięty z filtratu za pomocą wyparki próżniowej rotacyjnej. Uzyskane produkty dodatkowo oczyszczono przez dodanie mieszaniny gorącego acetonu i metanolu (20–25 mL) w stosunku objętościowym 20:1, a następnie poddano filtracji próżniowej. Po schłodzeniu filtratu nastąpiło wytrącenie pożądanego produktu, który oddzielono pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskane związki finalnie suszono w suszarce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem (1–2 mbar) w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Wszystkie zsyntetyzowane sole (**P1–P4**) przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



Rysunek 17. Synteza *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilonikotynamidu (**P1–P4**).

Synteza salicylanów *N*-alkilnikotynamidu (S1–S7)

0,01 mola odpowiedniego bromku *N*-alkilnikotynamidu (**1–7**) rozpuszczono w 10 mL etanolu w kolbie okrągłodennej wyposażonej w mieszadło mechaniczne (rysunek 12). Następnie **[K][SAL]** rozpuszczony w 10 mL etanolu dodano z 2% nadmiarem molowym (0,0102 mol), aby przeprowadzić reakcję wymiany jonowej (rysunek 18). Mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano w temperaturze 40 °C przez 15 min, a następnie schłodzono do 0 °C. W wyniku wymiany anionowej z układu reakcyjnego wytrącił się bromek potasu, który odfiltrowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie rozpuszczalnik z filtratu usunięto poprzez odparowanie na wyparce próżniowej rotacyjnej. Otrzymane produkty dodatkowo oczyszczono przez dodanie niewielkiej ilości (10–15 mL) acetonu, co umożliwiło usunięcie pozostałości nieorganicznych zanieczyszczeń oraz nadmiaru reagentów w procesie filtracji próżniowej. Po odparowaniu acetonu na wyparce próżniowej rotacyjnej otrzymane produkty suszono w temperaturze 40 °C przez 24 godziny pod zmniejszonym ciśnieniem (1–2 mbar). Wszystkie zsyntetyzowane sole (**S1–S7**) przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



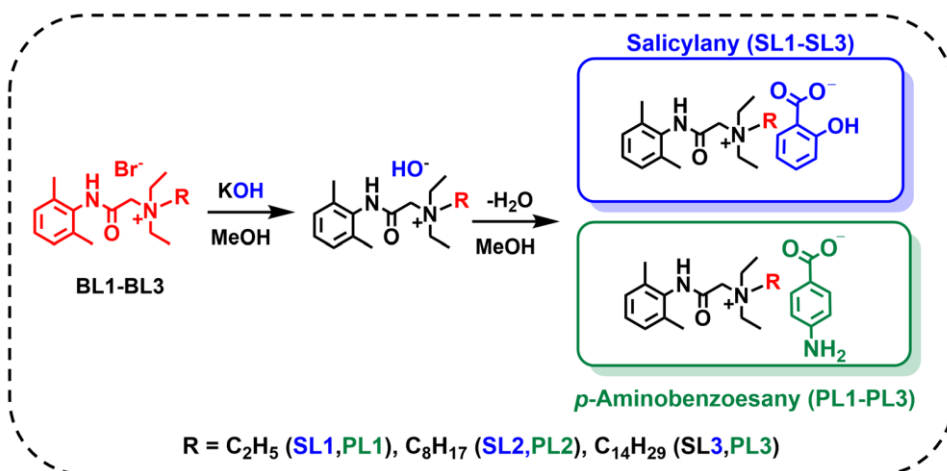
Rysunek 18. Synteza salicylanów *N*-alkilnikotynamidu (**S1–S7**).

6.1.5. Synteza soli z kationem lidokainy

Synteza metodą zobojętniania

W kolbie okrągłodennej wyposażonej w mieszadło mechaniczne umieszczono 0,01 mola odpowiedniego prekursora - bromku *N*-alkilolidokainy (**BL1–BL3**), który rozpuszczono w 10 mL bezwodnego metanolu. Następnie dodano wodorotlenek potasu rozpuszczony w 10 mL bezwodnego metanolu z 2% nadmiarem molowym (0,0102 mola), celem przeprowadzenia reakcji wymiany jonowej (rysunek 19). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, a następnie schłodzono ją do 0 °C. W wyniku wymiany anionowej z mieszaniny reakcyjnej wytrącił się osad bromku potasu, który odsączono techniką sączenia próżniowego, a zasadowy filtrat zobojętniono odpowiednim kwasem do pH = 7 w półautomatycznym reaktorze EasyMax 102 (Mettler Toledo, Szwajcaria) wyposażonym w pH-metr ze skalibrowaną elektrodą szklaną. Następnie z filtratu odparowano rozpuszczalnik, a otrzymane produkty dodatkowo

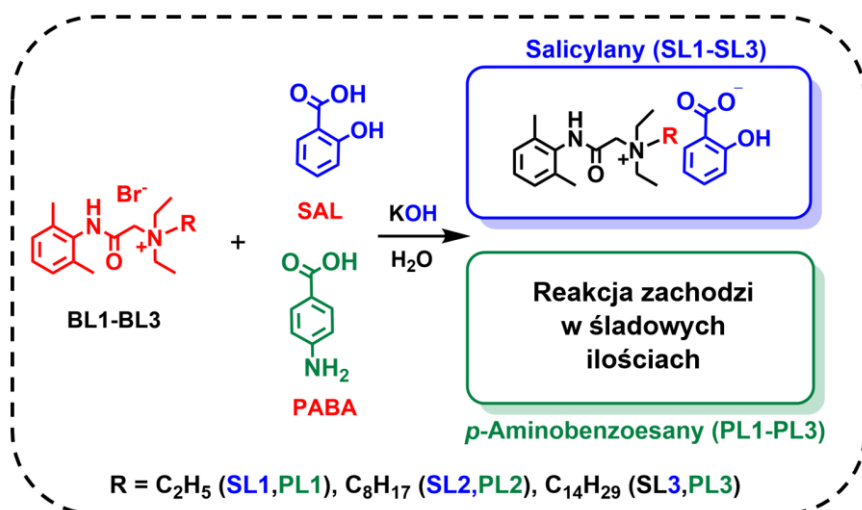
oczyszczono poprzez rozpuszczenie w niewielkiej ilości (10–15 mL) acetonu i usunięcie pozostałości zanieczyszczeń nieorganicznych. Po odparowaniu acetonu z filtratu, produkty (**SL1–SL3** oraz **PL1–PL3**) suszono pod zmniejszonym ciśnieniem (1–2 mbar) w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Wszystkie zsyntetyzowane sole (**SL1–SL3** oraz **PL1–PL3**) przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



Rysunek 19. Synteza salicylanów (**SL1–SL3**) i *p*-aminobenzoesanów (**PL1–PL3**) *N*-alkilidokainy poprzez zobojętnianie.

Synteza poprzez wymianę jonową

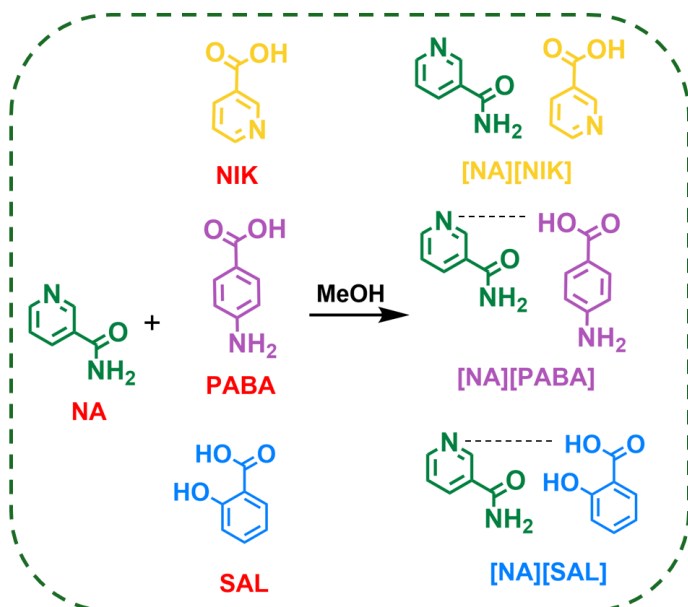
Do kolby okrągłodennej wyposażonej w mieszadło mechaniczne dodano 0,01 mola odpowiedniego prekursora - bromku *N*-alkilidokainy (**BL1–BL3**), który rozpuszczono w 10 mL wody destylowanej. Następnie do kolby dodano stechiometryczne ilości (0,01 mola) odpowiedniego kwasu organicznego i wodorotlenku potasu, rozpuszczone uprzednio w 10 mL wody destylowanej, celem przeprowadzenia reakcji wymiany jonowej (rysunek 20). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Następnie produkty wyizolowano metodą ekstrakcji dwufazowej ciecz–ciecz poprzez dodanie 20 mL chloroformu i intensywne wymieszanie układu. Wyodrębnioną fazę organiczną oddzielono i przemyto 3-krotnie wodą destylowaną, po czym rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce rotacyjnej. Następnie rozpuszczalnik odparowano za pomocą wyparki rotacyjnej, a otrzymane związki suszono pod zmniejszonym ciśnieniem (1–2 mbar) w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Zsyntetyzowane sole (**SL1–SL3**) przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



Rysunek 20. Synteza salicylanów (SL1–SL3) i *p*-aminobenzoesanów (PL1–PL3) *N*-alkilidokainy poprzez wymianę jonową.

6.1.6. Otrzymywanie mieszaniny nikotynamidu i kwasu nikotynowego oraz kokryształów nikotynamidu i kwasu salicylowego, jak i kwasu *p*-aminobenzoesowego.

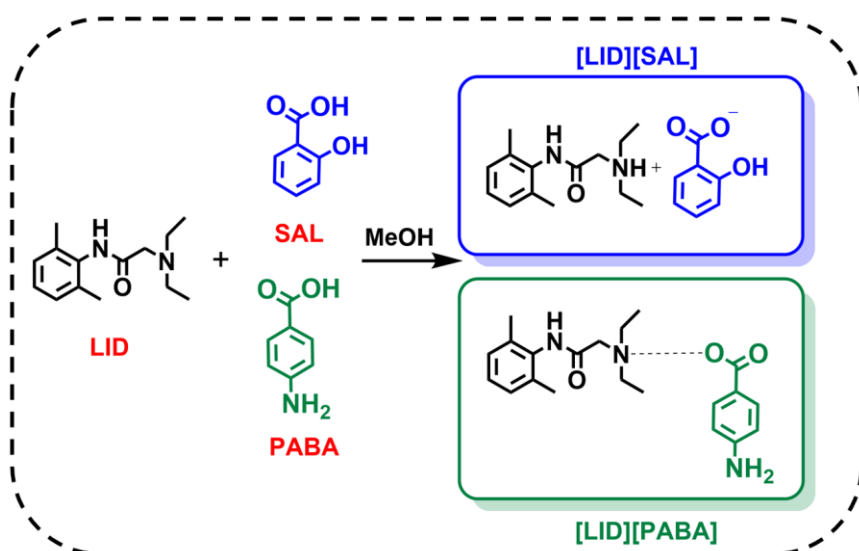
Mieszaniny nikotynamidu (NA) z kwasem nikotynowym (NIK) oraz kokryształów NA z kwasami organicznymi (salicylowym (SAL) oraz *p*-aminobenzoesowym (PABA)) przygotowano poprzez zmieszanie nikotynamidu (0,01 mola) z równomolową ilością odpowiedniego kwasu w 25 mL metanolu, a następnie układ mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu procesu rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej rotacyjnej (rysunek 21). Wydajności [NA][NIK], [NA][SAL] i [NA][PABA] obliczono na podstawie masy substancji stałych otrzymanych po wysuszeniu. Otrzymane układy przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



Rysunek 21. Otrzymywanie mieszaniny nikotynamidu i kwasu nikotynowego ([NA][NIK]) oraz kokryształów nikotynamidu i kwasu salicylowego ([NA][SAL]), jak i kwasu *p*-aminobenzoesowego ([NA][PABA]).

6.1.5. Otrzymywanie salicylanu lidokainy oraz mieszaniny lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoowego

Jak zaprezentowano na rysunku 22, salicylan lidokainy **[LID][SAL]** otrzymywano poprzez zmieszanie odpowiedniej ilości lidokainy (0,01 mola) z ekwimolarną ilością kwasu salicylowego w 25 mL metanolu i mieszanie przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Pozostały rozpuszczalnik następnie usunięto za pomocą wyparki rotacyjnej. Tę samą metodologię zastosowano do syntezy mieszaniny lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoowego **[LID][PABA]** (rysunek 22). Na koniec **[LID][SAL]** i **[LID][PABA]** suszono pod zmniejszonym ciśnieniem (1–2 mbar) w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Otrzymane układy przechowywano w eksykatorze próżniowym z środkiem osuszającym (P₄O₁₀).



Rysunek 22. Otrzymywanie salicylanu lidokainy (**[LID][SAL]**) oraz mieszaniny lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoowego (**[LID][PABA]**).

6.2. Analiza produktów

6.2.1. Oznaczanie zawartości jonów bromkowych w QASs metodą Mohra

Stężenie pozostałości jonów bromkowych wykonano zgodnie z metodą opisaną w literaturze.³³ Uzyskane czwartorzędowe bromki amoniowe o masie $1,0000 \pm 0,0001$ g odważono i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 100 mL, po czym rozpuszczono w wodzie dejonizowanej i uzupełniono do kreski. Następnie dodano 1 mL 5% roztworu chromianu potasu (K₂CrO₄) i rozpoczęto miareczkowanie, stosując mianowany roztwór azotanu(V) srebra (AgNO₃) o stężeniu 0,1 mol/L, energicznie mieszając. Miareczkowanie kontynuowano do uzyskania jednolitej brązowo-czerwonej zawiesiny, co oznaczało zakończenie miareczkowania. Zawartość bromków obliczono następnie, korzystając następującego równania (1):

$$X = \frac{(A - B) \cdot M \cdot 79904}{m} \quad (1)$$

gdzie:

X – zawartość bromku [ppm],

A – objętość AgNO₃ zużyta podczas miareczkowania analizowanej próbki [mL],

B – objętość AgNO₃ zużyta podczas miareczkowania ślepej próby [mL],

M – stężenie molowe AgNO₃ [mol·L⁻¹],

m – masa analizowanej próbki [g].

6.2.2. Analiza spektroskopowa

Widma UV dla testowanych związków zebrano przy użyciu spektrofotometru VWR UV-6300PC. Widma FT-IR dla soli z kationem *N*-alkilnikotynamidu zebrano przy użyciu półautomatycznego systemu EasyMax 102 (Mettler Toledo, Szwajcaria) podłączonego do sondy ReactIR iC15 (Mettler Toledo, Szwajcaria) wyposażonej w detektor MCT i sondę AgX 9,5 mm z końcówką diamentową. Dane zostały pobrane w zakresie od 3000 do 650 cm⁻¹ z rozdzielczością 8 cm⁻¹ i przetworzone za pomocą oprogramowania iCIR 4.3. W przypadku pochodnych lidokainy analizy FT-IR wykonano przy użyciu spektrofotometru Perkin Elmer Spectrum BX (Massachusetts, USA) i skanowano w zakresie od 4000 do 400 cm⁻¹ z rozdzielczością 4 cm⁻¹ i 32 skanami. Widma ¹H NMR zarejestrowano na spektrometrze Varian VNMR-S 400 MHz (Palo Alto, USA) z TMS jako wewnętrznym standardem. Widma ¹³C NMR uzyskano przy użyciu tego samego urządzenia przy częstotliwości 100 MHz. Za rozpuszczalnik dla badanych próbek posłużyły deuterowane rozpuszczalniki: sulfotlenek dimetylu (*DMSO-d*₆), metanol (*CD*₃*OD*) oraz woda (*D*₂*O*). Badania wykonano w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Naukowej działającym przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Widma 2D NMR (HSQC) zarejestrowano w University of Aveiro (Portugalia) dla roztworów badanych związków, przy użyciu spektrometru Bruker Avance III (400 MHz) oraz standardowych parametrów eksperymentalnych umożliwiających korelację sygnałów ¹H i ¹³C.

6.2.3. Temperatura topnienia

Pomiaru temperatury topnienia dokonano przy wykorzystaniu urządzenia MP 90 melting point system (Mettler Toledo, Switzerland). Pomiary wykonano z dokładnością ±1 °C, natomiast gradient temperatury ogrzewania testowanych substancji wyznaczono jako 5 °C na minutę.

Kalibrację aparatu wykonuje się, wykorzystując materiały wzorcowe o zdefiniowanych temperaturach topnienia (wanilina - 81,7 °C, fenacetyna - 134,8 °C, oraz kofeina - 234,0 °C). Próbkę badanej substancji umieszczono w szklanej kapilarze, a następnie ogrzewano ze stałym gradientem temperatury. Moment topienia określano wizualnie.

6.2.4. Oznaczanie zawartości wody

Zawartość oznaczono metodą miareczkowania Karla Fischera, przy użyciu aparatu TitroLine 7500 KF (SI Analytics, Niemcy). Analizę przeprowadzono w roztworach badanych substancji sporządzonych w odwodnionym metanolu o znanej zawartości wody (zawartość wody w metanolu badano 5-krotnie, a uzyskane wartości uśredniono). Próby powtórzono 3 razy, a wyniki zaprezentowano jako średnią arytmetyczną z tych pomiarów, z uwzględnieniem wody w wykorzystanym rozpuszczalniku – metanolu.

6.2.5. Współczynnik podziału oktanol–woda

Współczynniki podziału oktanol–woda (K_{OW}) syntetyzowanych produktów określono metodą powolnego mieszania zgodnie z wytycznymi testu OECD nr 123. Pomiarów przeprowadzono przy użyciu wzajemnie nasyconych wody destylowanej i *n*-oktanolu w szklanej fiolce zawierającej mieszadło magnetyczne. Na początku badane substancje rozpuszczono w *n*-oktanolu w wybranym stężeniu (0,01 mola na 1 L oktanolu), a następnie dodano odpowiednią ilość wody. Następnie przeprowadzono dwa powtórzenia z różnymi proporcjami rozpuszczalników: 4 mL *n*-oktanolu i 2 mL wody (2:1), 4 mL *n*-oktanolu i 4 mL wody (1:1) oraz 4 mL *n*-oktanolu i 8 mL wody (2:1). Wszystkie próbki były mieszane przy 10 obr./min w stałej temperaturze 25 °C. Po 72 godzinach, fazy wodna oraz oktanolowa zostały zebrane za pomocą strzykawki. Stężenia związków w wodzie określono za pomocą spektrofotometru VWR UV-6300PC na podstawie wcześniej sporządzonych krzywych kalibracyjnych w stosunku do stężenia każdej substancji. Każdy pomiar powtórzono dwukrotnie w określonym stosunku rozpuszczalników (1:1, 1:2 i 2:1). Na koniec obliczono $\log K_{OW}$ jako średnią z sześciu wyników zebranych dla każdego związku.

6.2.6. Ocena potencjału przeciwzapalnego: test denaturacji albuminy

Test denaturacji albuminy jajecznej przeprowadzono zgodnie z metodą Chaiya²¹⁸, wprowadzając niewielkie modyfikacje w celu uproszczenia procesu i poprawy powtarzalności wyników. Test przeprowadzono poprzez połączenie 2 mL 1% roztworu albuminy jajecznej (z dostępnego w handlu proszku albuminy jajecznej), 1 mL roztworu badanej substancji lub standardu (diklofenak sodowy) w różnych stężeniach (1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001

i 0,0001 µg/mL) w celu uzyskania mieszaniny o całkowitej objętości 3 mL. Całkowitą objętość 3 mL kontroli uzyskano poprzez połączenie 1 mL buforowanego roztworu soli fizjologicznej (PBS) i 2 mL 1% roztworu albuminy jaja kurzego w fiolkach o pojemności 20 mL. Mieszaniny inkubowano w temperaturze $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 25 minut w piecu MEMMERT UF55, pozwalając roztworom w fiolkach osiągnąć temperaturę $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (wzrost temperatury w fiolkach testowych był monitorowany za pomocą termopary). Następnie zawartość fiolek ochłodzono w wodzie do temperatury $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Absorbancję mieszaniny po inkubacji mierzono dla każdego stężenia przy 660 nm za pomocą spektrofotometru VWR UV-6300PC. Każdy test powtórzono trzykrotnie i obliczono średnią absorbancję. Procentowe zahamowanie białka określono (równanie 2) jako procentowy spadek absorbancji w porównaniu z kontrolą:

$$\text{Inhibicja (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbancja kontroli} - \text{Absorbancja badanej próbki}}{\text{Absorbancja kontroli}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

6.2.7. Ocena aktywności antybakteryjnej: wyznaczanie parametrów MIC i MBC/MFC

Badania aktywności antybakteryjnej nikotynianów *N*-alkilonikotynamidu (**N1–N4**) oraz *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilonikotynamidu (**P1–P4**), a także **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]** zostały wykonane przez dr. hab. inż. Danielę Gwiazdowską, prof. UEP oraz dr. inż. Krzysztofa Jusia z Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu w ramach współpracy naukowej. Aktywność przeciwbakteryjną określono w odniesieniu do bakterii Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *M. catarrhalis*, *S. marcescens*, *C. jejuni*, *S. Enteritidis*, *P. vulgaris*), Gram-dodatnich (*L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. subtilis*) oraz grzybów (*C. albicans*, *R. mucilaginosa*, *C. neoformans*). Minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze/grzybobójcze (MBC/MFC) badanych związków określono metodą mikrorozcieńczeń. Najpierw przygotowano serię dwukrotnych rozcieńczeń badanych substancji w zakresie stężeń od 0,49 do 1000 µg/mL w 96-dołkowych mikropłytkach w bulionie MH (dla *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli*), MH z 10% TSB (dla *S. marcescens*, *M. catarrhalis* i *M. luteus*), MH z 10% BHI (dla *L. monocytogenes* i *E. faecalis*), PDB (dla *C. albicans*, *C. neoformans* i *R. mucilaginosa*). Z 24-godzinnych hodowli inokulum mikroorganizmów wskaźnikowych o gęstości optycznej dostosowanej do standardu 0,5 McFarlanda przygotowano zawiesiny w pożywkach bulionowych. Następnie do każdej studzienki dodano 100 µL przygotowanych roztworów, aby uzyskać końcowe stężenie 10⁵ CFU/mL, a płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30 lub 37°C, w zależności od wytypowanego mikroorganizmu. Po inkubacji gęstość optyczną wzrostu bakterii i drożdży określono przy 600 nm za pomocą czytnika mikropłytek BioTek Epoch 2. Wyniki wyrażono jako średnią z trzech powtórzeń. Wartość MIC zdefiniowano jako stężenie badanych substancji hamujące wzrost mikroorganizmu

o co najmniej 90%, natomiast 100% hamowanie zdefiniowano jako minimalne stężenie bakteriobójcze/grzybobójcze (MBC/MFC).

Badania aktywności antybakteryjnej salicylanów *N*-alkilnikotynamidu (**S1–S7**), **[NA][SAL]**, **NA** oraz **SAL** zostały wykonane przez dr. Daniela Zientała oraz dr hab. Jolantę Długaszewską z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w ramach współpracy naukowej. Aktywność antybakteryjną określono w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. acnes*, do bakterii Gram-ujemnych: *P. aeruginosa* oraz do grzybów: *C. albicans*. Związki rozcieńczono seryjnie (2-krotnie) w odpowiednich pożywkach (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* – MHB, *C. acnes* – TGB, *C. albicans* – SDB w 96-dołkowych płytkach) i dodano zawiesiny mikroorganizmów. Związki badano w zakresie stężeń końcowych od 4 096 µg/mL do 0,125 µg/mL, a końcowa inokulum mikroorganizmów wynosiło około 5·10⁵ CFU/mL. Testy inkubowano w temperaturze 35°C±1°C przez 18 godzin (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*) lub 24 godziny (*C. albicans*) lub 48 godzin (*C. acnes*). *C. acnes* inkubowano w atmosferze beztlenowej przy użyciu GENbag anaer (bioMerieux, Francja). Jako kontrolę wzrostu ujemną zastosowano odpowiednio pożywki (bez szczepów) dodane do różnych stężeń badanych związków oraz pożywki zaszczerpione zawiesiną mikroorganizmów. MIC zdefiniowano jako najniższe stężenie, przy którym widoczny wzrost został zahamowany. Stężenia MBC i MFC określono jako rozszerzenie testu MIC. Po przeprowadzeniu testu MIC i zarejestrowaniu punktu końcowego MIC, każda studzienka, w której nie wykazano wzrostu (stężenie równe lub większe od MIC), została poddana subkulturze na podłożu agarowym: Typcase Soy Agar (TSA; bioMerieux) – *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*; Columbia Agar z krwią owczą (CA; Thermo Scientific, Wielka Brytania) – *C. acnes*, agar Sabouraud z dekstrozą (SDA; Merck, Niemcy) – drożdże. Płytki inkubowano w temperaturze 35±1°C przez 18–72 godziny. *C. acnes* inkubowano w atmosferze beztlenowej. MBC/MFC zdefiniowano jako najniższe stężenie, przy którym nie zaobserwowano wzrostu. Wszystkie testy przeprowadzono dwukrotnie.

6.2.8. Właściwości antybiofilmowe

Badania właściwości antybiofilmowych zostały wykonane przez dr. hab. inż. Daniełę Gwiazdowską, prof. UEP oraz dr. inż. Krzysztofa Jusia z Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu w ramach współpracy naukowej. Dwa wybrane związki (**N4** i **P4**) zostały przetestowane pod kątem tworzenia biofilmu przez *P. aeruginosa* i *S. Aureus*. Tworzenie biofilmu przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Somrani²¹⁹ przy użyciu sterylnych 48-dołkowych płytek mikrotitracyjnych z płaskim dnem. Do każdego dołka wprowadzono 150 µL standaryzowanych hodowli bakteryjnych w bulionie odżywczym o stężeniu 10⁶ CFU/mL, a następnie dodano 150 µL badanych związków, aby uzyskać końcowe stężenia 0,5 MIC i 1 MIC.

Przygotowane płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37 °C. Następnie zawiesinę usunięto z dołków i trzykrotnie przepłukano sterylną wodą w celu usunięcia pozostałości pożywki i nieprzylegających komórek. Następnie płytki mikrotitracyjne suszono na powietrzu przez 2 godziny, a biomase biofilmu oznaczono ilościowo przy użyciu zmodyfikowanej metody krystalicznej fioletu opracowanej przez O'Toole'a. Do wysuszonego biofilmu dodano 300 µL 0,1% roztworu fioletu krystalicznego, inkubowano przez 15 minut, a następnie płytki przemyto wodą i suszono przez noc. Następnie do studzienek dodano 300 µL 30% kwasu octowego i pozostawiono na 10-15 minut w temperaturze pokojowej (25 °C ± 1 °C). Roztwór z każdego dołka przeniesiono do nowej płytki mikrotitracyjnej i zmierzono gęstość optyczną przy długości fali 550 nm za pomocą czytnika płytek mikrotitracyjnych BioTek Epoch 2. Jako ślepej próby użyto 30% kwasu octowego w wodzie. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech równoległych powtórzeniach, a wyniki wyrażono jako procentowe zahamowanie tworzenia się biofilmu. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną (±odchylenie standardowe) z sześciu równoległych powtórzeń.

6.2.9. Wizualizacja biofilmu za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej

Wizualizacja biofilmu za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej została wykonana przez dr. hab. inż. Danielę Gwiazdowską, prof. UEP oraz dr. inż. Krzysztofa Jusia z Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu w ramach współpracy naukowej. Biofilm przygotowano wspomnianą wcześniej metodą (6.2.8.), ale w płytkach Petriego (55 mm). Do oceny żywotności komórek w biofilmie zastosowano sondy fluorescencyjne, diacetat fluoresceiny (FDA) i jodek propidyny (PI) (Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy). Przed barwieniem przygotowano roztwór podstawowy FDA (1 mg/mL) w acetonie oraz roztwór podstawowy PI (1 mg/mL) w wodzie destylowanej i przechowywano je w lodówce. Po wyschnięciu biofilmu do próbek dodano bufor PBS (1000 µL) zawierający 25 µL FDA i 5 µL PI. Płytki inkubowano z barwnikami fluorescencyjnymi przez 30 minut w temperaturze 30 °C w ciemności. Następnie usunięto roztwór barwiący, biofilm wysuszono w temperaturze pokojowej i zbadano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus BX53 (Olympus Corporation, Tokio, Japonia) wyposażonym w zestaw filtrów o określonej długości fali (wzbudzenie/emisja FDA: 485/530; wzbudzenie/emisja PI: 538/617). Jako próbki kontrolne wykorzystano biofilm badanych bakterii poddanych działaniu sterylnej wody.

6.2.10. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania QASs

Badanie mechanizmu aktywności przeciwdrobnoustrojowej zostało przeprowadzone przez dr. hab. inż. Danielę Gwiazdowską, prof. UEP oraz dr. inż. Krzysztofa Jusia z Uniwersytetu

Ekonomicznego w Poznaniu w ramach współpracy naukowej. Uwalnianie składników komórkowych oceniano na podstawie zmodyfikowanej metody opisanej przez Paula *et al.*²²⁰ oraz Zhanga *et al.*²²¹. Komórki wybranych mikroorganizmów (*S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *C. albicans*) ze świeżej hodowli odwirowywano (8000 obr./min, 5 min), zawieszano w 1 mL sterylnego PBS z dodatkiem dwóch związków (**N4** i **P4**) o różnych stężeniach (1000 µg/mL oraz 1*MIC), a następnie inkubowano w temperaturze 37 °C przez 3 godziny. Po inkubacji próbki ponownie odwirowywano (8000 obr./min, 5 min), a supernatant rozcieńczano sterylną wodą w stosunku 100 µL:900 µL. Wpływ składników komórkowych mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. Fluorescencyjną sondę – jodek propidyny (PI) (Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy) – zastosowano do oceny żywotności wybranych mikroorganizmów (*S. aureus* oraz *P. aeruginosa*). Roztwór podstawowy PI (1 mg/mL) przygotowano w wodzie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4 °C. Odwirowane hodowle bakterii, traktowane dwoma wybranymi związkami przez 2 godziny, zawieszano w 5 mL buforu fosforanowego (50 mM) z dodatkiem 5 µL PI i inkubowano w temperaturze 30 °C przez 15 minut. Następnie roztwór barwiący usuwano przez wirowanie (8000 obr./min, 1 min). Osad analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym Olympus BX53 wyposażonym w odpowiednie zestawy filtrów długości fal (CFDA wzbudzenie/emisja: 485/530; PI wzbudzenie/emisja: 538/617). Hodowle *C. albicans* traktowane dwoma wybranymi związkami przez 2 godziny odwirowywano, a następnie nanoszono na szkiełka podstawowe z błękitem metylenowym i bez niego, po czym wykonywano zdjęcia przy użyciu mikroskopu świetlnego (Olympus BX53, Olympus Corporation, Tokio, Japonia) przy 400-krotnym powiększeniu. Komórki traktowane sterylną wodą stosowano jako próbki kontrolne. Zmiany morfologiczne wybranych bakterii: *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*, eksponowanych na 0,5 oraz 1*MIC związków **N4** i **P4** przez 24 godziny, oceniano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego Zeiss EVO 10 wyposażonego w detektor STEM.

6.2.11. Test PAMPA

Przepuszczalność badanych związków przez modelową błonę biologiczną oceniono z wykorzystaniem testu PAMPA (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), symulującego pasywną dyfuzję przez warstwę lipidową. W badaniu jako donor permeacji wykorzystano płytkę filtracyjną z 12 studzienkami, a jako akceptor permeacji płytkę odbiorczą z 12 studzienkami. Jako medium fazy donorowej i akceptorowej zastosowano bufor PBS (pH 7,4).

W wariacie GIT-PAMPA przygotowano 2% (w/v) roztwór lecytyny w dodekanie, który następnie nanoszono (10 µL) na każdy dołek płytki dawcy, tworząc hydrofobową warstwę lipidową na membranie filtracyjnej (0,40 µm). Bezpośrednio po naniesieniu warstwy lipidowej do każdego dołka płytki dawcy wprowadzano 0,7 mL roztworu badanej substancji

(N1–N4, P1–P4, [NA][NIK] oraz [NA][PABA]) o stężeniu 1000 µg/mL w PBS. Do każdego dołka płytki odbiorczej dodawano 2,5 mL buforu PBS. Następnie płytkę dawcy umieszczano w płytce odbiorczej, zapewniając bezpośredni kontakt membrany z fazą akceptorową. Zmontowany układ inkubowano w temperaturze 37 °C, bez mieszania, przez 0,5, 1, 6 lub 16 godzin. Całość umieszczano w szczelnym pojemniku w celu ograniczenia parowania. Po zakończeniu inkubacji pobierano próbki z fazy akceptorowej, a stężenie badanych związków oznaczano spektrofotometrycznie przy użyciu aparatu VWR UV-6300PC. Ilościową analizę przeprowadzono na podstawie wcześniej sporządzonych krzywych kalibracyjnych dla każdego związku, przy długościach fal odpowiadających maksimum absorpcji. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach. Do analizy danych wykorzystano wartości średnie. Współczynniki przepuszczalności (P_{app}) obliczono przy użyciu równań 3 i 4²²²:

$$P_{app} = -2.303 \times \frac{V_{dn} \times V_{ac}}{V_{dn} + V_{ac}} \times \frac{1}{S \times t} \times \log\left(1 - \frac{flux\%}{100}\right) \quad (3)$$

$$flux\% = \frac{OD_{ac}}{OD_{ref}} \times 100 \quad (4)$$

gdzie:

V_{dn} – objętość komory dawcy (0,7 mL)

V_{ac} – objętość komory biorcy (2,5 mL)

OD_{ac} – gęstość optyczna roztworu w komorze biorcy

OD_{ref} – gęstość optyczna roztworu odniesienia

S – powierzchnia membrany (1,13 cm²)

t – czas inkubacji (s)

W wariantach SKIN-PAMPA przygotowano 35% (v/v) roztwór składający się z 70% oleju silikonowego i 30% IPM, rozpuszczony w heksanie i ostrożnie dodano (10 µL) do każdego dołka płytki dawcy, aby utworzyć hydrofobowy materiał filtracyjny (0,40 µm) dołków płytki filtracyjnej. Natychmiast po nałożeniu warstwy przygotowanego roztworu do każdego dołka płytki dawcy dodano 0,7 mL roztworu leku. W przypadku pochodnych lidokainy zastosowano następujące stężenia w PBS: [LID][CL]-2,00%; [LID][SAL]-2,00%; SL1-2,00%; SL2-0,03%; SL3-0,0005%; [LID][PABA]-2,00%; PL1-2,00%; PL2-0,03%; SL3-0,01% w PBS). Natomiast dla pochodnych nikotynamidu stężenia wynosiły odpowiednio: S5-0,25%; S6-0,03%; S7-0,01%; [NA][SAL]- 0,25%; NA-0,25% i SAL-0,25%. Do każdego dołka płytki odbiorczej dodano PBS (2,5 mL). Następnie płytkę dawcy wypełnioną lekiem umieszczono w płytce odbiorczej,

upewniając się, że spód membrany styka się bezpośrednio z buforem. Płytkę dawcy połączono z płytką odbiorczą, a zestaw płytek inkubowano w temperaturze 32 °C bez mieszania przez okres 6 lub 24 godzin.

6.2.12. Napięcie powierzchniowe (γ) i ciśnienie powierzchniowe (π)

Napięcie powierzchniowe (γ) określono metodą kropli wiszącej. Urządzeniem pomiarowym był analizator DSA 100 (Krüss, Niemcy, dokładność $\pm 0,01 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) ustawiony na temperaturę 25 °C (temperatura kontrolowana za pomocą łaźni termostatycznej Fisherbrand FBH604 – Fisher, z dokładnością 0,1 °C). Analizowane związki rozpuszczono w PBS w celu przygotowania roztworów o początkowym stężeniu 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Zasada metody kropli wiszącej polega na utworzeniu kropli osiowo-symetrycznej na końcu igły strzykawki. Kamera CCD rejestruje obraz kropli, a napięcie powierzchniowe oblicza się poprzez analizę profilu kropli zgodnie z równaniem Laplace'a. Wartości ciśnienia powierzchniowego (π) obliczono zgodnie z Olila et al.²²³, stosując PBS jako medium odniesienia.

6.2.13. Pomiary kąta zwilżania

Pomiary kąta zwilżania (CA) przeprowadzono przy użyciu analizatora DSA100S (Krüss, Niemcy, dokładność $\pm 0,1^\circ$) w temperaturze 25 °C. Kąt zwilżania wyznaczono metodą kropli osiadłej, polegającą na naniesieniu kropli analizowanego roztworu na powierzchnię stałą (parafinę). Obrazy kropli zarejestrowano kamerą CCD, a następnie poddano digitalizacji i analizie z wykorzystaniem dopasowania krzywej Younga–Laplace'a. CA określano jako kąt między styczną do profilu kropli w punkcie trójfazowym a powierzchnią stałą, w miejscu kontaktu faz: roztworu, parafiny i powietrza.

6.2.14. Rozpuszczalność badanych soli i układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH

Rozpuszczalność badanych substancji określono w SGF (pH = 1,2), wodzie destylowanej (pH = 6,0) i PBS (pH = 7,4) poprzez umieszczenie 1 g ($\pm 0,0001 \text{ g}$) badanego związku w kolbie okrągłodennej i dodanie określonych części roztworów wodnych w porcjach aż do całkowitego rozpuszczenia. Próbkę mieszano energicznie przez co najmniej 5 minut przed dodaniem kolejnej porcji roztworów wodnych, a układy utrzymywano w temperaturze 36,6 °C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$). Na koniec analizowane związki podzielono na różne klasy rozpuszczalności.⁵⁹ Dla każdego związku wykonano trzy powtórzenia pomiaru.

6.2.15. Stabilność badanych soli oraz układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH

Stabilność wybranych związków w różnych wartościach pH (SGF (pH=1,2), woda destylowana (pH=6,0) i PBS (pH=7,4)) została oszacowana dla roztworów wodnych o stężeniu 50 µmol/L. Pomiar przeprowadzono w zamkniętych szklanych fiolkach zawierających magnetyczny mieszadło. Wszystkie fiołki były wytrząsane w mieszadle Heidolph MR Hei-End wyposażonym w blok grzejny Heat-On w stałej temperaturze 36,6 °C (±0,1 °C) w ciemności. Po upływie określonego czasu z każdej fiołki pobrano próbkę i zmierzono absorbancję otrzymanych roztworów przy odpowiednich maksimach absorpcji przy użyciu spektrofotometru VWR UV-6300PC. Wyniki przedstawiono jako średnią z trzech oddzielnych pomiarów.

6.2.16. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (*Artemia franciscana*)

W celu określenia parametru EC₅₀ dla związków przeprowadzono badania na skorupiakach morskich – *Artemia franciscana*. Metodologia zaproponowana w teście Artoxkit M (MicroBioTests Inc., Gandawa, Belgia) została opracowana zgodnie z normą ASTM E1440-91 (Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów).

Najpierw rozpoczęto proces wylęgania. W tym celu 50 mg cyst przeniesiono do szalek Petriego dołączonych do zestawu Artoxkit M, które następnie zanurzono w 10 mL sztucznej wody morskiej o zasoleniu 35‰ (środek do rozwoju badanych organizmów, a także rozpuszczalnik do przygotowania roztworów badanych związków) i umieszczono w temperaturze 25 °C, z dostępem do światła (6000–10 000 luksów) przez 30 godzin. Następnie, na 2 godziny przed umieszczeniem ich na płytkach Artoxkit M, do hodowanych artemii dodano 20 mg spiruliny. Ponadto na godzinę przed analizą używaną wodę morską natleniono, przepuszczając strumień powietrza przez roztwór. Do każdej z 4 komórek w danym rzędzie płytki z zestawu Artoxkit M wprowadzono 1 mL roztworu o określonych stężeniach (lub odpowiedniego podłoża w przypadku kontroli). W pierwszej kolumnie komórek (próbka kontrolna i 5 wybranych stężeń) umieszczono nie mniej niż 30 artemii z wcześniej przygotowanych szalek Petriego. Następnie, począwszy od pierwszej komórki w pierwszej kolumnie, zebrano artemie w wybranym stężeniu i dodano je do kolejnych trzech komórek w wybranym rzędzie, po 10 organizmów na komórkę. Po wprowadzeniu organizmów do odpowiednich komórek płytki przykryto parafilmem, a następnie zamknięto plastikową nakładką. Przygotowany zestaw inkubowano w temperaturze 25°C i chroniono przed światłem. Liczbę nieruchomych organizmów zliczono po 24 i 48 godzinach. Następnie obliczono immobilizację (I_{imm}; równanie 5) w odniesieniu do liczby organizmów na początku testu:

$$Imm = 100 \cdot \left(1 - \frac{\text{Liczba organizmów ruchomych}}{\text{Liczba organizmów ruchomych na początku}} \right) \quad (5)$$

Następnie sporządzono wykres zależności między działaniem a stężeniem badanych związków i na tej podstawie określono wartość EC_{50} .

6.2.17. Określenie cytotoksyczności wobec ludzkich komórek jelitowych

Cytotoksyczności wobec ludzkich komórek jelitowych została zbadana przez dr hab. Annę Olejnik, prof. UPP na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Cytotoksyczność badanych związków (**N1–N4** oraz **P1–P4**, **[NA][NIK]** lub **[NA][PABA]**) oraz referencyjnego środka farmaceutycznego (chlorku benzalkoniowego) oceniono przy użyciu ludzkiej linii komórek nabłonkowych jelita cienkiego HIEC-6 (ATCC, CRL-3266), uzyskanej z American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) i hodowanej zgodnie z warunkami zalecanymi przez ATCC. W eksperymentach dotyczących cytotoksyczności komórki hodowano w 96-dołkowych płytkach przy początkowej gęstości $2,5 \cdot 10^4$ komórek/cm². Po 24 godzinach komórki poddano działaniu analizowanych związków w stężeniach 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 i 5000 µg/mL przez kolejne 24 godziny w standardowych warunkach hodowli. Przed podaniem związku rozpuszczono w pożywce hodowlanej i wysterylizowano przez filtrację przez membrany o porach 0,22 µm. Wpływ analizowanych związków na komórki jelitowe człowieka oceniono za pomocą testu mierzącego rozszczepianie żółtego barwnika MTT (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-1-tetrazoliowy; Sigma–Aldrich). W wyniku tego rozszczepienia powstają fioletowe kryształy formazanu, które są tworzone przez enzymy dehydrogenazy mitochondrialnej aktywne tylko w żywych komórkach. Po obróbce do każdej studzienki dodano roztwór MTT w końcowym stężeniu 0,5 mg/mL, a hodowle komórkowe inkubowano w temperaturze 37 °C przez 3 godziny. Po inkubacji kryształy formazanu ekstrahowano kwaśnym izopropanolem przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zmierzono absorbancję przy 570 i 690 nm za pomocą czytnika mikropłytek Tecan M200 Infinite (Tecan Group Ltd., Männedorf, Szwajcaria). Na podstawie wyników testu MTT wykreślono krzywe dawka-odpowiedź i określono dawki cytotoksyczne (IC_{50}) badanych związków.

6.2.18. Farmakokinetyka z zastosowaniem grafowych sygnatur molekularnych (pkCSM)

Właściwości farmakokinetyczne i toksyczne wybranych związków zostały przewidziane przy użyciu pkCSM.¹⁷³ Przewidywane parametry obejmowały wchłanianie jelitowe u ludzi (WJ), przepuszczalność Caco-2 i frakcję niezwiązaną w osoczu (FN). Wszystkie prognozy zostały wykonane przy użyciu domyślnych ustawień pkCSM. Rozpuszczalność w wodzie badanych związków, oraz TPSA (topologiczna powierzchnia polarna) została przewidziana przy użyciu SwissADME.¹⁷² W celu wykonania analiz struktury związków zostały przekształcone w ciągi SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry System*).

6.2.19. Współczynnik przepuszczalności skóry (K_p)

Współczynnik przenikania przez skórę (K_p) dla wybranych związków wyznaczono przy użyciu kalkulatora przenikania przez skórę udostępnionego przez Narodowy Instytut Bezpieczeństwa i Higieny Pracy (ang. *National Institute for Occupational Safety & Health Skin Permeation Calculator*, NIOSH).³³ Kalkulator ten szacuje wartość K_p z roztworu wodnego przy użyciu modelu Potts i Guya.

6.2.20. Ocena aktywności przeciwzapalnej: dokowanie molekularne oparte na strukturze cyklooksygenazy-2 (COX-2)

Badania dokowania molekularnego przeprowadzono przy użyciu serwera internetowego CB-Dock2²²⁴, który integruje AutoDock Vina jako silnik dokowania i automatycznie identyfikuje potencjalne wnęki wiązania na powierzchni białka. Podejście to wykorzystuje protokół ślepego dokowania oparty na strukturze, umożliwiającą obiektywną eksplorację potencjalnych miejsc wiązania ligandów. Strukturę krystaliczną cyklooksygenazy-2 (COX-2) uzyskano z Protein Data Bank (PDB ID: 1CVU). Struktura białka została wstępnie przetworzona poprzez usunięcie cząsteczek wody, heteroatomów i nieistotnych ligandów. Podczas wstępnego przetwarzania w CB-Dock2 automatycznie dodano polarne atomy wodoru i ładunki Gasteigera. W przypadku testowanych soli amoniowych poszczególne jony analizowano oddzielnie w celu oceny ich potencjalnych interakcji molekularnych z COX-2. Podejście to odzwierciedla fakt, że w roztworze wodnym jony pozostają swobodnie zdysocjowane, a stężenia efektywne są znacznie niższe od krytycznego stężenia micelizacji (CMC) związków, co minimalizuje efekty agregacji. Dodatkowo, osobno oceniono również odpowiedniki układy referencyjne pozbawione łańcucha alkilowego w kationie. Badane związki zostały zadokowane jako indywidualne ligandy w celu oceny ich odrębnych profili wiązania i potencjalnych miejsc interakcji w aktywnym kanale COX-2. Struktury ligandów zostały narysowane w programie ChemBioDraw Ultra, przekształcone w trójwymiarowe konformacje i zminimalizowane pod względem energii przed zadokowaniem. Wszystkie struktury zostały przesłane w formacie PDB, z dostosowaniem stanów protonowania do fizjologicznego pH (7,4). Symulacje dokowania przeprowadzono przy użyciu domyślnych parametrów AutoDock Vina w CB-Dock2. Dla każdej pary białko–ligand automatycznie wykryto pięć potencjalnych wnęk wiązania. Wynik obejmował przewidywane powinowactwo wiązania (wynik Vina, kcal·mol⁻¹), objętość wnęki (Å²) oraz środek i rozmiar siatki (Å). Do szczegółowej interpretacji strukturalnej wybrano tryb wiązania o najniższej energii. Szczególną uwagę zwrócono na kluczowe reszty katalityczne COX-2: **R120** (arginina), **T385** (tyrozyna) i **S530** (seryna) oraz na dodatkowe reszty przyczyniające się do stabilizacji i selektywności liganda **S353** (seryna), **L352** (leucyna), **V523** (walina). Interakcje białko–ligand

zostały zwizualizowane i przeanalizowane przy użyciu programu NGL-viewer. Wykorzystując kieszeń C zbadano wiązania wodorowe, jonowe, π - π i interakcje hydrofobowe, ze szczególnym uwzględnieniem tworzenia mostków solnych między grupami karboksylowymi a resztami naładowanymi dodatnio (Arg, Lys).

6.2.21. Ocena aktywności znieczulających: dokowanie molekularne ukierunkowane na kanał sodowy (NaV1.7)

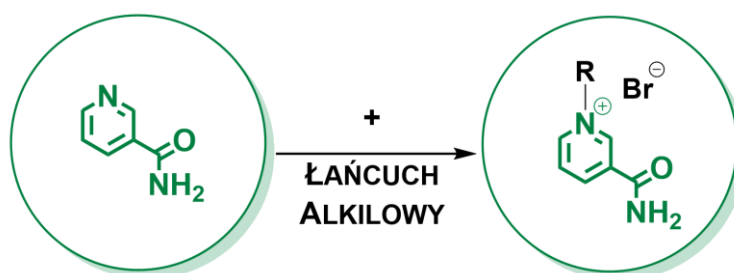
Dokowanie molekularne ukierunkowane na napięcioczulny kanał sodowy NaV1.7 przeprowadzono analogicznie do procedury opisanej w sekcji 6.2.20. W badaniach wykorzystano strukturę białka pochodzącą z bazy Protein Data Bank (PDB ID: 7W9K), zamiast modelu cyklooksygenazy-2 (COX-2). Przygotowanie struktury białka, ligandów (generowanie struktur trójwymiarowych, minimalizacja energii oraz dobór stopni protonacji), parametry dokowania, jak również sposób identyfikacji miejsc wiązania i analizy wyników przeprowadzono w sposób analogiczny jak w przypadku dokowania do COX-2, z wykorzystaniem serwera CB-Dock2 oraz algorytmu AutoDock Vina. Różnice w analizie dotyczyły przede wszystkim charakteru badanego celu molekularnego. W przypadku kanału NaV1.7 szczególną uwagę zwrócono na oddziaływanie w obrębie centralnej kieszeni C1, istotnej dla mechanizmu blokowania przewodnictwa jonów sodowych. Kluczowe reszty aminokwasowe zaangażowane w rozpoznanie i stabilizację ligandów obejmowały reszty aromatyczne (np. **Y1215** (tyrozyna), **F1212** (fenyloalanina)), uczestniczące w oddziaływaniach typu kation- π oraz π - π , a także reszty naładowane ujemnie (**D1677** (kwas asparaginowy), **E1628** (kwas glutaminowy), **E1217** (kwas glutaminowy)), odpowiedzialne za elektrostatyczne zakotwiczenie ligandów kationowych. Dodatkowo analizowano reszty polarne (**T319** (treonina), **N1680** (asparagina), **N1686** (asparagina), **S1724** (seryna), **S1725** (seryna)) pod kątem ich udziału w tworzeniu wiązań wodorowych oraz orientacji ligandu, natomiast reszty hydrofobowe i strukturalne (**M1678** (metionina), **V1720** (walina), **P1722** (prolina), **G1723** (glicyna)) rozpatrywano w kontekście dopasowania sterycznego i stabilizacji kompleksu w obrębie kanału. Analizie poddano w szczególności oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy kationowymi fragmentami badanych związków a resztami kwasowymi (Asp, Glu), a także interakcje typu kation- π i π - π z udziałem reszt aromatycznych. Dodatkowo oceniano udział wiązań wodorowych oraz oddziaływań hydrofobowych w stabilizacji kompleksów ligand-białko oraz ich potencjalny wpływ na blokowanie kanału.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

7.1. Bromki *N*-alkilnikotynamidu (1–7) jako prekursory do syntezy soli o właściwościach farmakologicznych

7.1.1. Synteza i analiza produktów

Szereg homologiczny bromków *N*-alkilnikotynamidu, zawierający łańcuchy alkilowe (R) o długości od etylu (1) do tetradecylu (7), otrzymano w wyniku reakcji czwartorzędowania nikotynamidu odpowiednimi bromoalkanami (rysunek 23). Podążając wraz z zasadami zielonej chemii oraz koncepcją zrównoważonego rozwoju, proces syntezy zaprojektowano z wykorzystaniem niedrogich, w pełni odnawialnych, biodegradowalnych i bezpiecznych rozpuszczalników, co stanowi istotną przewagę w porównaniu z innymi metodami opisanymi w literaturze.²²⁵ Otrzymane produkty (1–7) izolowano z wysoką wydajnością, przekraczającą 75% (tabela A9 w aneksie). Bromki *N*-alkilnikotynamidu z łańcuchem etylowym (C₂H₅) (1), butylowym (C₄H₉) (2), heksylowym (C₆H₁₃) (3), oktylowym (C₈H₁₇) (4), decylowym (C₁₀H₂₁) (5), dodecylowym (C₁₂H₂₅) (6), tetradecylowym (C₁₄H₂₅) (7) otrzymano w postaci białych, krystalicznych substancji stałych. Strukturę chemiczną wszystkich produktów potwierdzono na podstawie wyników badań spektroskopowych, obejmujących spektroskopię UV, FT-IR oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H i ¹³C NMR. Pełną charakterystykę widm dla soli 1-7 przedstawiono w aneksie (strony 174-177; rysunki A5–A8).



Rysunek 23. Struktura bromów *N*-alkilnikotynamidu (prawa strona), po przeprowadzaniu reakcji czwartorzędowania nikotynamidu (lewa strona).

Zebrane widma UV badanych bromków *N*-alkilnikotynamidu wykazują charakterystyczne cechy typowe dla układów zawierających kation pirydyniowy. Dla niepodstawionego kationu pirydyniowego obserwuje się pojedyncze, wyraźne maksimum absorpcji przy długości fali około 262 nm, przypisywane przejściu elektronowemu $\pi \rightarrow \pi^*$ (pasmo B) w obrębie aromatycznego pierścienia pirydynowego. W przypadku bromków *N*-alkilnikotynamidu maksimum to ulega niewielkiemu przesunięciu batochromowemu i występuje przy około 265 nm. Obserwowane przesunięcie wskazuje na wpływ podstawników alkilowych, które poprzez efekt indukcyjny (+I) oraz oddziaływania hipersprężone modyfikują rozkład gęstości elektronowej w pierścieniu aromatycznym, stabilizując stan wzbudzony.

Podobieństwo widm i niewielkie różnice w położeniach maksimów absorpcji między poszczególnymi homologami wskazują, że długość łańcucha alkilowego nie wpływa znacząco na charakter przejść elektronowych w pierścieniu pirydyniowym, a obserwowane zmiany wynikają głównie z czwartorzędowania atomu azotu.

Analizę UV uzupełniają widma FT-IR, które dostarczyły szczegółowych informacji na temat obecnych grup funkcyjnych w analizowanych związkach. We wszystkich widmach bromków *N*-alkilopirydynamidów obserwuje się intensywne pasma w zakresie 2946–2863 cm^{-1} , odpowiadające drganiom rozciągającym wiązań C–H w alifatycznym łańcuchu węglowym. Intensywność tych pasm rośnie wraz z wydłużaniem łańcucha alkilowego, co jest zgodne z oczekiwaną strukturą badanych związków. Wyraźne pasmo przy liczbie falowej około 1701 cm^{-1} przypisano drganiom rozciągającym wiązania karbonylowego C=O, charakterystycznym dla ugrupowania amidowego nikotynamidu. Obecność grupy aminowej –NH₂ potwierdzają pasma zlokalizowane przy 1655 cm^{-1} i 702 cm^{-1} , odpowiadające odpowiednio drganiom rozciągającym i deformującym wiązań N–H. Dodatkowo, w widmach obserwuje się pasmo przy 1403 cm^{-1} , przypisywane drganiom rozciągającym wiązania C–N, co potwierdza obecność ugrupowania amidowego i kationu pirydyniowego w strukturze badanych soli. Pasma przy 1460 cm^{-1} można przypisać drganiom deformującym wiązań C–H w alifatycznym łańcuchu węglowym.

Uzyskane widma ¹H NMR wyraźnie odzwierciedlają obecność zarówno łańcucha alkilowego, jak i kationu pirydyniowego wraz z ugrupowaniem amidowym. W obszarze alifatycznym charakterystyczna grupa sygnałów odpowiada protonom łańcucha alkilowego. Sygnał od terminalnej grupy metylowej (CH₃) jest obserwowany w zakresie 0,70–0,95 ppm, podczas gdy protony metylowe i metylenowe środkowej części łańcucha tworzą szeroki multiplet zlokalizowany w zakresie 1,2–1,4 ppm. Protony metylenowe bezpośrednio przylegające do dodatnio naładowanego atomu azotu (N–CH₂–) pojawiają się jako wyraźny triplet przy około 4,8 ppm, dostarczając jednoznacznego dowodu na czwartorzędowy charakter centrum azotowego. Z kolei protony z sąsiedniej grupy metylenowej (N–CH₂–CH₂–) pojawiają się przy około 1,9–2,0 ppm. Analiza widm ¹H NMR wskazuje również, że sygnały pochodzące od protonów grupy amidowej (CONH₂) pojawiają się jako dwa odrębne singlety zlokalizowane około 8,2 i 8,8 ppm. Ich rozdzielenie wynika z braku równoważności magnetycznej protonów amidowych, co jest konsekwencją ograniczonej rotacji wokół wiązania C–N w ugrupowaniu amidowym oraz asymetrycznego otoczenia elektronowego tego fragmentu cząsteczki.

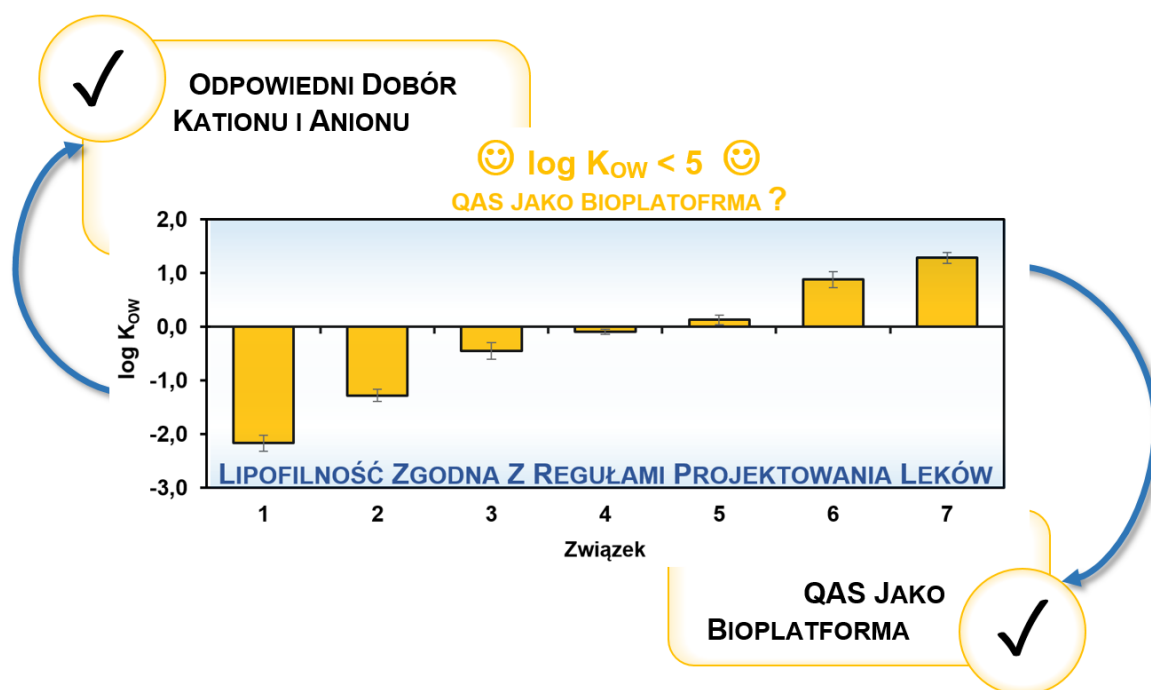
Analogiczna analiza widm ¹³C NMR ujawniła, że sygnały odpowiadające atomom węgla terminalnej grupy metylowej pojawiają się przy wartościach przesunięcia chemicznego około 14,0 ppm. Atomy węgla grup metylenowych łańcucha alifatycznego były natomiast

odpowiedzialne, za sygnały w zakresie 22,0-32,0 ppm. Zgodnie z oczekiwaniami, atom węgla grupy metylenowej bezpośrednio związany z dodatnio naładowanym atomem azotu był wyraźnie przesunięty w kierunku wyższych wartości przesunięcia chemicznego względem pozostałych atomów węgla łańcucha alkilowego i pojawił się jako wyraźny sygnał przy około 61,0 ppm. Sygnały pochodzące od atomów węgla pierścienia aromatycznego obserwowano w szerokim zakresie 128,0-163,0 ppm, co odzwierciedla zróżnicowane środowisko elektronowe wynikające z obecności dodatnio naładowanego atomu azotu i fragmentu amidowego. Największe przesunięcie sygnału w tym obszarze przypisano atomowi węgla grupy amidowej (CONH₂), które wynika z wysokiej elektroujemności atomu tlenu i jego udziału w sprzężeniu z pierścieniem aromatycznym.

Zawartość wody badanych bromków *N*-alkilonikotynamidu mieściła się w zakresie 0,48–1,20% (tabela A9 w aneksie) i nie wykazywała wyraźnej zależności wielkości tego parametru od długości łańcucha alkilowego. Związki te charakteryzowały się stosunkowo wysokimi temperaturami topnienia, mieszczącymi się w zakresie od około 152–153 °C (dla **2**) do około 184–186°C (dla soli **4**). Nie udało się ustalić temperatury topnienia dla soli **1**, **5**, **6**, **7**, ponieważ uległy one rozkładowi termicznemu w temperaturze odpowiednio 146 °C, 205 °C, 207 °C oraz 206 °C (tabela A9 w aneksie). W przypadku pozostałych substancji, dla których udało się określić zakres temperatury topnienia, procesowi topnienia towarzyszyła szybka degradacja, prowadząca do powstania brązowo-czerwonego produktu. Obserwowana niska odporność termiczna badanych związków może wynikać z obecności kationu pirydyniowego, który wykazuje ograniczoną trwałość w podwyższonych temperaturach, zwiększając podatność układów na rozkład termiczny.

7.1.2. Współczynnik podziału oktanol–woda

Wyznaczone wartości współczynnika podziału oktanol–woda (log K_{OW}) dla badanych bromków *N*-alkilonikotynamidu (**1**–**7**) przedstawiono na rysunku 24 (oraz w tabeli A10 w aneksie). Wartości dla związków mieszczą się w zakresie od -2,16 do 1,28, wskazując na szerokie spektrum właściwości hydrofilowo–lipofilowych, istotnych dla ich potencjalnego wykorzystania jako bioplatfomy dla nowych substancji leczniczych, co jest zgodne z założeniami reguły Lipińskiego.²²⁶ Związki o ujemnych wartościach log K_{OW} charakteryzują się wysoką hydrofilowością, co sprzyja dobrej rozpuszczalności w środowisku wodnym i może ułatwiać ich formulację w postaciach przeznaczonych do podawania pozajelitowego lub miejscowego. Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego obserwuje się stopniowy wzrost lipofilowości, co prowadzi do wartości log K_{OW} bliskich zeru lub dodatnich, które często uważa się za korzystne dla penetracji przez bariery biologiczne.



Rysunek 24. Wartości współczynnika podziału oktanol–woda dla bromków *N*-alkilnikotynamidu (1–7).

Związki 6 i 7 o umiarkowanie dodatnich wartościach $\log K_{ow}$ (0,88–1,28) wykazują charakter amfifilowy, wynikający z obecności zarówno polarnego centrum kationowego, jak i hydrofobowego łańcucha alkilowego. Równowaga między hydrofilowością a lipofilowością jest pożądana w projektowaniu nośników leków i układów proleków, ponieważ umożliwia jednoczesną interakcję z fazą wodną środowiska biologicznego oraz lipidowymi składnikami błon komórkowych. Obecność szerokiego zakresu wartości $\log K_{ow}$ pozwala również na modulowanie profilu dystrybucji badanych związków poprzez odpowiedni dobór długości łańcucha alkilowego, co stanowi istotną zaletę z punktu widzenia racjonalnego projektowania układów terapeutycznych.

Z perspektywy projektowania substancji leczniczej, szczególnie istotny jest zakres współczynnika podziału oktanol–woda uważany za optymalny dla biodostępności. W przypadku leków przeznaczonych do podawania doustnego, zakres $\log K_{ow}$ od 0 do 3 jest najczęściej wskazywany jako sprzyjający równowadze między rozpuszczalnością w środowisku wodnym przewodu pokarmowego a zdolnością do przenikania przez lipidowe bariery biologiczne.⁶⁵ Podobny zakres wartości (1–3) jest również uważany za korzystny dla substancji stosowanych miejscowo na skórę, gdzie odpowiednia lipofilowość umożliwia przenikanie przez warstwę rogową naskórka, zachowując jednocześnie wystarczającą rozpuszczalność w płynach biologicznych.¹⁶⁶ W analizowanej serii bromków *N*-alkilnikotynamidu, tylko niektóre związki osiągają wartości $\log K_{ow}$ w tym preferowanym zakresie, podczas gdy pozostałe związki charakteryzują się nadmierną hydrofilowością. Może to ograniczać ich zdolność do skutecznego przenikania przez bariery biologiczne, zmniejszając tym samym potencjał terapeutyczny do bezpośredniego zastosowania farmaceutycznego. Zjawisko to podkreśla istotną rolę anionu

w modulacji właściwości fizykochemicznych cieczy jonowych i wskazuje, że formy zawierające aniony bromkowe w QASs należy traktować przede wszystkim jako związki prekursorowe.

Zastąpienie anionu bromkowego anionem o wyższej lipofilowości lub wykazującym własną aktywność biologiczną jest powszechnie stosowaną strategią w projektowaniu farmaceutycznie aktywnych czwartorzędowych soli amoniowych (API-QASs), w tym cieczy jonowych (API-ILs). Takie podejście potencjalnie pozwala nie tylko na dostosowanie parametrów dystrybucji i transportu cząsteczki, ale także na uzyskanie efektu synergistycznego wynikającego z połączonej aktywności obu jonów. W konsekwencji, dalsza funkcjonalizacja badanych bromków poprzez modyfikację części anionowej może prowadzić do uzyskania układów o korzystniejszym profilu farmakokinetycznym i zwiększonej skuteczności biologicznej. Obserwowane właściwości amfifilowe w połączeniu z projektowalną strukturą badanych soli, sugerują ich potencjalną przydatność jako uniwersalnych bioplatform do dalszych modyfikacji chemicznych i funkcjonalizacji mających na celu optymalizację biodostępności, transportu i interakcji z celami biologicznymi.

Wyniki te potwierdzają, że czwartorzędowe bromki amoniowe, powszechnie stosowane jako półprodukty w syntezie cieczy jonowych, wykazują istotny potencjał biologiczny. Jednocześnie należy wziąć pod uwagę potencjalne ograniczenia związane z obecnością anionu bromkowego. Bromki są związkami historycznie stosowanymi i znanymi w farmakoterapii. Jednak ich długotrwałe stosowanie może prowadzić do kumulacji w organizmie i wystąpienia działań niepożądanych, znanych jako bromizm.²²⁷ Doniesienia literaturowe wskazują, że jony bromkowe mogą wpływać na funkcjonowanie układu nerwowego i zaburzać równowagę elektrolitową. Z tego powodu, pomimo obserwowanej aktywności biologicznej, zastosowanie QASs z anionem bromkowym jako bezpośrednich środków terapeutycznych może być ograniczone, podczas gdy ich rola jako prekursorów w syntezie bardziej zaawansowanych par jonowych wydaje się szczególnie uzasadniona.

7.1.3. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (*Artemia franciscana*)

Toksyczność bromków *N*-alkilnikotynamidu (1–7) wobec modelowych organizmów – skorupiaków słonowodnych z gatunku *A. franciscana* oceniono na podstawie wyznaczonych wartości EC_{50} (tabela 3). W przypadku soli 1–3 i 7 nie zaobserwowano 50% efektu biologicznego w całym badanym zakresie stężeń, co uniemożliwiło określenie wartości EC_{50} dla tych substancji. Zgodnie z przyjętymi kryteriami pozwala na zaklasyfikowanie ich jako „Względnie nieszkodliwych”. Związki 4 i 5, zawierające łańcuchy alkilowe o średniej długości, wykazały umiarkowany wpływ na badane organizmy i charakteryzowały się wartościami EC_{50} odpowiednio 260,6 mg/L i 242,6 mg/L. Zgodnie z powszechnie stosowanymi kryteriami klasyfikacji

toksyczności związki te zostały sklasyfikowane jako „Praktycznie nietoksyczne”. Najwyższą toksyczność w badanej serii zaobserwowano dla soli **6** z wartością EC_{50} wynoszącą 88,5 mg/L, co czyni ją „Słabo toksyczną”.

Tabela 3. Ekotoksyczność bromków *N*-alkilonikotynamidu (1–7) wobec *A. franciscana*.

Związek	EC_{50} (mg/L)	Zakres klasy (mg/L)	Klasa ^a
1	-	>1000	Stosunkowo nieszkodliwy
2	-	>1000	Stosunkowo nieszkodliwy
3	-	>1000	Stosunkowo nieszkodliwy
4	260,6±8,6	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
5	242,6±1,3	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
6	88,5±4,8	10-100	Słabo toksyczny
7	-	>1000	Stosunkowo nieszkodliwy

^a zgodnie ze skalą oceny toksyczności ostrej według Fish and Wildlife Service

Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi surfaktantów kationowych, czwartorzędowych soli amoniowych, jak i cieczy jonowych. Dowiedziono wielokrotnie, że ich toksyczność dla organizmów wodnych często wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego, osiągając maksimum dla struktur o średniej długości łańcucha.²²⁸ Obserwowaną zależność można tłumaczyć wzrostem hydrofobowości molekularnej wraz z wydłużaniem łańcucha alkilowego, co sprzyja oddziaływaniom badanych związków z lipidowymi składnikami błon komórkowych *A. franciscana*. Zwiększona zdolność do wbudowywania się w błony biologiczne może prowadzić do ich destabilizacji oraz zaburzeń funkcji komórkowych. Jednocześnie brak wyraźnego działania toksycznego **7**, zawierającego najdłuższy łańcuch alkilowy, może wskazywać na występowanie tzw. efektu „cut-off”, często obserwowanego w szeregach homologicznych związków amfifilowych, gdzie dalsze wydłużanie łańcucha alkilowego prowadzi do zmniejszenia biodostępności i obniżenia aktywności biologicznej.

W porównaniu z klasycznymi czwartorzędowymi solami amoniowymi lub analogami imidazoliowymi o podobnej długości łańcucha alkilowego, badane bromki *N*-alkilonikotynamidu wykazywały porównywalną lub niższą toksyczność, co wskazuje na korzystny profil środowiskowy dla tej klasy związków. W przypadku bromków 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych wykazano, że wydłużenie łańcucha alkilowego od butylowego do oktylowego prowadzi do znacznego wzrostu toksyczności dla glonów słodkowodnych: *S. quadricauda* i *C. reinhardtii*, co przekłada się na znaczne obniżenie wartości EC_{50} , odpowiednio do zakresów 0,005–13,23 mg/L i 4,07–2138 mg/L.²²⁹ Analogiczne zależności struktura–toksyczność opisano również dla czwartorzędowych soli amoniowych, w których kation oparty był na strukturze

betainy, natomiast anion pochodził od herbicydu, dikamby.²¹⁶ W przypadku soli zawierającej łańcuch alkilowy złożony z dziesięciu atomów węgla wartość EC_{50} wobec *A. franciscana* wynosiła $12,1 \pm 0,2$ mg/L, co klasyfikuje ten związek o jedną kategorię toksyczności niżej w porównaniu z bromkami *N*-alkilonikotynamidu o zbliżonej długości łańcucha. Co istotne, dla analogicznej soli z łańcuchem heksadecylowym również zaobserwowano występowanie efektu „cut-off”, objawiającego się znacznym obniżeniem aktywności toksycznej. Ponadto chlorowodorki alkilobetain, których łańcuch alkilowy zawierał od 8 do 12 atomów węgla, wykazywały zbliżony do *N*-alkilonikotynamidów poziom toksyczności wobec *A. franciscana*. W efekcie związki te można było zaklasyfikować jako „Praktycznie nietoksyczne”. Wyjątek stanowiła pochodna o najdłuższym łańcuchu alkilowym, która została przypisana do niższej klasy toksyczności, osiągając wartość EC_{50} w przedziale 10–100 mg/mL. Znacznie bardziej wrażliwe na działanie chlorowodorków okazały się być skorupiaki słodkowodne *D. magna*. W tym teście już krótkołańcuchowe pochodne zidentyfikowano jako toksyczne (EC_{50} w zakresie 10–100 mg/mL), natomiast związki z łańcuchem decylowym i dodecylowym, z wartościami EC_{50} mieszczącymi się w przedziale 1–10 mg/mL, można było określić jako „Umiarkowanie toksyczne”. Podsumowując, uzyskane wyniki stanowią istotne potwierdzenie, że otrzymane bromki mogą być użyte jako półprodukty do syntezy docelowych substancji aktywnych i nie stanowić przy tym toksycznych odpadów przemysłu chemicznego.

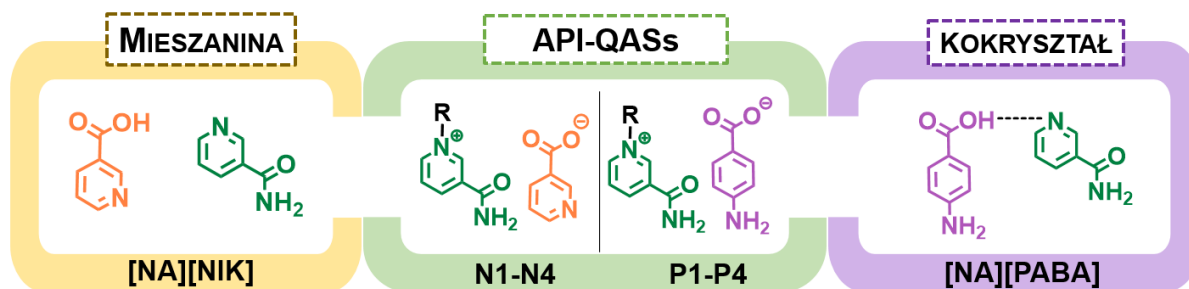
7.2. Leki stosowane doustnie

7.2.1. Analiza nikotynianów *N*-alkilonikotynamidu (N1–N4) oraz *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilonikotynamidu (P1–P4)

7.2.1.1. Synteza i analiza produktów

W toku badań zsyntetyzowano dwa szeregi homologiczne QASs, wychodząc z różnych form witaminy B jako materiałów wyjściowych. Początkowo witamina B₃ w formie nikotynamidu (NA) została poddana reakcji czwartorzędowania, co doprowadziło do powstania bromków *N*-alkilonikotynamidu (1–7). Spośród nich wytypowano sole z łańcuchami alkilowymi od heksylowego do dodecylowego (3–6). Następnie, w wyniku reakcji wymiany jonowej kationy *N*-alkilonikotynamidu zostały połączone z inną formą witaminy B₃ (anionem kwasu nikotynowego (N1–N4)) lub z witaminą B₁₀ (anionem kwasu *p*-aminobenzoesowego (P1–P4)). Jak pokazano na rysunku 25, w celu zbadania potencjalnych korzyści wynikających ze stosowanej strategii API-QAS, pochodne jonowe witaminy B (N1–N4 i P1–P4) porównano z substancjami referencyjnymi pozbawionymi wiązań jonowych i łańcuchów alkilowych: mieszaniną

nikotynamidu z kwasem nikotynowym ([NA][NIK]) oraz mieszaniną nikotynamidu z kwasem *p*-aminobenzoesowym ([NA][PABA]) otrzymaną jako kokryształ.



Rysunek 25. Analizowane formy API pochodzące z nikotynamidu i kwasu nikotynowego lub *p*-aminobenzoesowego. Związki **N1** i **P1** zawierały łańcuch heksylowy (C₆H₁₃), **N2** i **P2** – łańcuch oktylowy (C₈H₁₇), **N3** i **P3** – łańcuch decylowy (C₁₀H₂₁), **N4** i **P4** – łańcuch dodecylowy (C₁₂H₂₅).

Synteza QASs, oparta na czwartorzędowaniu **NA**, a następnie wymianie jonowej anionu bromku na nikotynian (**N1–N4**) lub *p*-aminobenzoesan (**P1–P4**), wymagała różnych metod oczyszczania produktów końcowych. Zauważono, że w przeciwieństwie do nikotynianów (**N1–N4**), *p*-aminobenzoesany szybko wytrącały się z schłodzonego roztworu acetonowego w postaci żółtych krystalicznych ciał stałych. W konsekwencji sole **N1–N4** zostały wyizolowane poprzez odparowanie acetonu z przesączu po filtracji, natomiast związki **P5–P8** zostały dokładnie wyizolowane z acetonu, przemyte i wysuszone. Należy zauważyć, że monitorowanie i utrzymanie pH wszystkich mieszanin reakcyjnych w okolicy wartości neutralnej miało kluczowe znaczenie, biorąc pod uwagę, że nikotynamid jest podatny na szybki rozkład w środowisku zasadowym.²³⁰ Jak podsumowano w tabeli A11 (w aneksie), zawartość bromków w produktach znajdowała się w przedziale 2 345–8 997 ppm, a wydajność obu etapów okazała się wysoka i przekraczała 80%; jednakże, ze względu na wspomniane powyżej rozbieżności w metodologii syntezy, wydajność *p*-aminobenzoesanów (**P1–P4**) była nieco niższa. Należy nadmienić, że przygotowanie **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]** nie wymagało żadnego etapu oczyszczania, a produkty te uzyskano z najwyższą wydajnością (prawie 100%). Struktury syntetyzowanych soli potwierdzono za pomocą spektroskopii UV, FT-IR oraz ¹H i ¹³C NMR. Ich dokładna analiza znajduje się w aneksie (strony 177-184, rysunki A9–A24).

Zebrane widma UV wskazywały, że referencyjna mieszanina **[NA][NIK]** wykazywała dwa dobrze zdefiniowane maksima absorpcji przy 216 nm i 262 nm, przy czym pierwsze z nich było około trzy razy bardziej intensywne, odzwierciedlając przejścia $\pi-\pi^*$ zlokalizowane głównie w układzie aromatycznym nikotynamidu. W przypadku jej czwartorzędowych analogów (**N1–N4**) ogólny charakter widm pozostał zbliżony, jednak pierwsze pasmo uległo wyraźnemu przesunięciu hipsochromowemu. W efekcie pierwsze maksimum absorpcji przesunęło się do zakresu 200–205 nm, natomiast drugie pozostało przy około 263 nm. Obserwowane przesunięcie można

wiązać z efektem elektronoakceptorowym kationowego centrum azotowego, które powoduje obniżenie gęstości elektronowej w obrębie pierścienia aromatycznego. W przypadku **[NA][PABA]** zaobserwowano trzy wyraźne maksima absorpcji przy 204, 214 i 290 nm, wszystkie o porównywalnej intensywności (współczynniki absorpcji molowej różniły się o około 10%). Natomiast w przypadku QASs (**P1–P4**) zawierających anion pochodzący od **PABA** dwa pasma o niższej długości fali połączyły się w jedno przy 206–208 nm, czemu towarzyszyło także drugie maksimum przy około 273 nm. To ostatnie reprezentuje charakterystyczne przejście $\pi-\pi^*$ w układzie aromatycznym *p*-aminobenzoesu, które w porównaniu z **[NA][PABA]** również uległo przesunięciu w kierunku krótszych długości fal o około 17 nm. Ten wzorec przesunięcia batrachomicznego sugeruje, że **PABA** w **[NA][PABA]** występuje głównie w postaci neutralnej (kwasowej), podczas gdy w solach **P1–P4** występuje jako deprotonowany anion.

Analiza FT-IR widm przedstawionych w aneksie wykazała, że drgania rozciągające C=O grupy amidowej pojawiły się przy 1683 cm^{-1} w **[NA][NIK]** i przesunęły się nieznacznie do około 1696 cm^{-1} produktach **N1–N4**, odzwierciedlając subtelne zmiany elektroniczne po reakcji czwartorzędowania. Zaobserwowano także, że wydłużenie łańcucha alkilowego w kationie powodowało wyraźny wzrost intensywności pasm pochodzących od drgań rozciągających C–H przy $2850\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, co było zgodne z oczekiwaniami. Dodatkowo, przemiana z postaci kwasowej (kwas nikotynowy) do postaci anionowej (nikotynian) spowodowała wzrost intensywności pasma przy $1550\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, odpowiadającego asymetrycznym drganiom rozciągającym COO, oraz przesunięcie symetrycznych drgań rozciągających COO z $1290\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$ w **[NA][NIK]** do $1370\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ w solach **N1–N4**. Stopniowy wzrost intensywności pasm rozciągania alifatycznego C–H w zakresie $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ w QASs na bazie **PABA** (**P1–P4**) był także zgodny z wydłużeniem łańcucha alkilowego. Ponadto pojawienie się dwóch wyraźnych i intensywnych pasm przy około 1530 cm^{-1} i 1370 cm^{-1} , odpowiadających odpowiednio asymetrycznym i symetrycznym drganiom rozciągającym COO^- , potwierdza obecność **PABA** w postaci anionu w tych solach, a nie jego neutralnej postaci kwasowej, co zaobserwowano w przypadku **[NA][PABA]**.

W celu uwidocznienia efektów elektronowych związanych z czwartorzędowaniem porównano widmo ^1H NMR układu **[NA][PABA]** z widmem odpowiadającego mu związku jonowego **P4** (rysunek A61 w aneksie). Porównanie to wyraźnie wskazuje na wpływ wprowadzenia łańcucha alkilowego oraz powstania dodatnio naładowanego centrum azotowego na wartości przesunięć chemicznych w obszarze aromatycznym. Sygnały odpowiadające protonom aromatycznym nikotynamidu w **[NA][PABA]**, obserwowane w zakresie około 7,5–9,1 ppm, ulegają przesunięciu w kierunku wyższych wartości chemicznych (odekranowaniu) w przypadku związku **P4**, osiągając zakres około 8,1–9,5 ppm. Zmiany te, sięgające nawet

0,6 ppm, odzwierciedlają istotne obniżenie gęstości elektronowej w pierścieniu aromatycznym, będące konsekwencją czwartorzędowania atomu azotu. Dalsze porównanie widm ^1H NMR wykazało, że wśród związków **N1–N4** sygnały z protonów aromatycznych anionu nikotynianowego pojawiły się przy niższych wartościach przesunięcia chemicznego (7,5–9,1 ppm) w porównaniu z alkiłowymi kationami **NA** (ok. 8,3–9,6 ppm). Ponadto we wszystkich widmach sygnał z protonów w grupie amidowej (CONH_2) nie był widoczny, co wynika z szybkiej wymiany proton–deuteron z deuterowanym rozpuszczalnikiem (CD_3OD). Ogólnie widma ^1H NMR związków **N1–N4** oraz **P1–P4** różniły się przede wszystkim względną intensywnością sygnałów odpowiadających grupom CH_2 w łańcuchach alkiłowych (około 1,2–1,3 ppm). Dla grup alkiłowych obserwowano typowe sygnały: tryplet przy około 0,9 ppm, odpowiadający grupie $-\text{CH}_3$, tryplet przy około 4,5 ppm, przypisany protonom $\text{N}-\text{CH}_2-$, oraz multiplet w rejonie około 2,0 ppm, pochodzący od grupy metylenowej w położeniu β względem azotu ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Analiza widm ^{13}C NMR wykazała, że sygnały atomów węgla pierścienia aromatycznego występowały w zakresie 125–172 ppm dla związków **N1–N4** oraz 115–176 ppm dla serii **P1–P4**, natomiast sygnały węgla alifatycznych obserwowano w zakresie 14–64 ppm w obu szeregach homologicznych. Uzyskane dane spektralne pozostają w pełnej zgodności z oczekiwaną strukturą badanych związków i potwierdzają skuteczną syntezę czwartorzędowych soli amoniowych (QASs) na bazie witamin z grupy B.

Zgodnie z danymi w tabeli A11 w aneksie, nie udało się określić dokładnych temperatur topnienia dla wszystkich zsyntezowanych QASs, niezależnie od długości łańcucha alkiłowego, jak i struktury anionu. Zauważono, że **N1–N4** oraz **P1–P4** wykazywały początkowy rozkład przed topnieniem, co objawiało się zmianą koloru z białego lub żółtego na brązowy podczas ogrzewania. Może to wynikać z faktu, że w niektórych solach organicznych, szczególnie charakteryzujących się silnymi oddziaływaniami elektrostatycznymi oraz uporządkowaną strukturą sieciową, energia wymagana do pokonania tych oddziaływań jest zbyt wysoka, aby możliwe było klasyczne topnienie. W takich przypadkach, po osiągnięciu zakresu temperatur topnienia, szybciej zachodzą procesy rozkładu wybranych grup funkcyjnych. W konsekwencji związki te nie wykazują wyraźnej temperatury topnienia, ponieważ, podobnie jak w przypadku wielu cieczy jonowych, ogrzewanie prowadzi częściej do degradacji chemicznej niż do przejścia fazowego.^{231,232} Teoretycznie związki **N1–N4** oraz **P1–P4** powinny wykazywać stabilność termiczną co najmniej podobną do ich analogów, a znacząca degradacja powinna wystąpić powyżej 150°C .⁷¹ Aby szczegółowo zbadać to zjawisko, wyznaczono temperatury topnienia soli potasowych **[K][NIK]** oraz **[K][PABA]**, wykorzystywanych jako prekursorzy w syntezie związków **N1–N4** oraz **P1–P4**. Stwierdzono, że temperatura topnienia **[K][PABA]** wynosi $206\text{--}208^\circ\text{C}$, natomiast w przypadku **[K][NIK]** nie zaobserwowano topnienia nawet do 300°C , co wskazuje na jego wysoką stabilność

termiczną. Oznacza to, że niższa stabilność termiczna otrzymanych par jonowych może wynikać ze specyficznych oddziaływań kation–anion w układach zawierających alkiłowane pochodne nikotynamidu w połączeniu z **NIK** lub **PABA**, prowadzących do zmian w rozkładzie gęstości elektronowej w obrębie pierścienia aromatycznego kationu, który jest relatywnie najbardziej podatny na degradację termiczną.

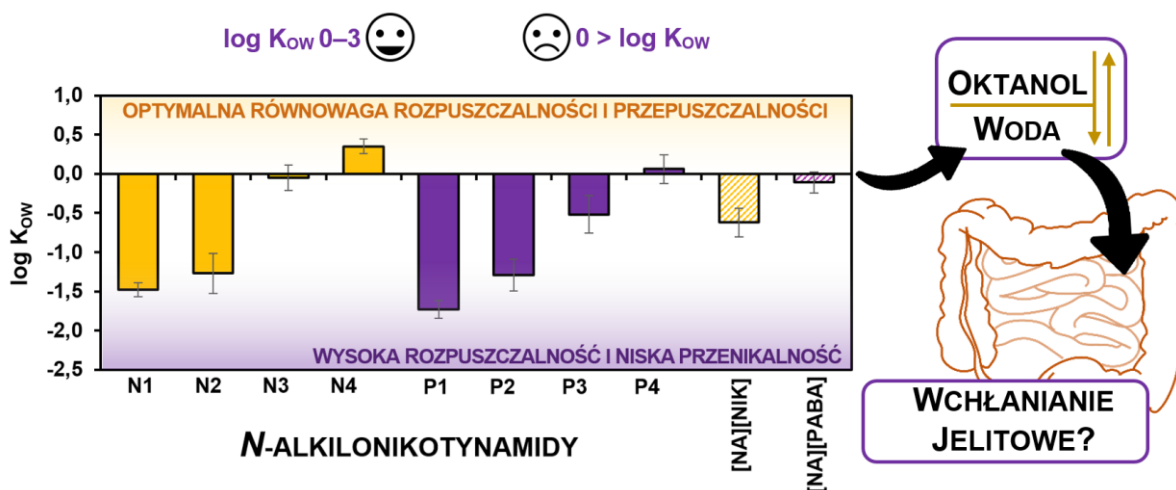
Co ciekawe, układy **[NA][NIK]** oraz **[NA][PABA]** wykazywały odmienny charakter w porównaniu z otrzymanymi czwartorzędowymi solami amoniowymi. W przypadku mieszaniny kwasu nikotynowego i nikotynamidu, zamiast ostrego punktu topnienia obserwowano jego poszerzenie, przy czym proces topnienia rozpoczynał się w temperaturze niższej niż dla składników wyjściowych (121–188 °C). Obserwacje te sugerują tworzenie mieszaniny fizycznej o ograniczonej zdolności do tworzenia układów eutektycznych, w której kwas karboksylowy i amid mogą tworzyć silne dimery stabilizowane wiązaniami wodorowymi.²³³ Zakładając, że dimery te są bardziej stabilne niż potencjalne nowe oddziaływania międzycząsteczkowe, można stwierdzić, że mieszanina nie tworzy jednorodnej fazy eutektycznej, ale raczej układ, w którym współistnieją oddzielne dimery obu związków. W tym przypadku tylko częściowe oddziaływania między składnikami, które mogą wystąpić, nie są wystarczająco silne, aby wytworzyć jednorodną fazę.²³⁴ W konsekwencji mieszanina nie wykazuje ostrej temperatury topnienia, ale ulega stopniowemu topnieniu z powodu współistnienia dwóch faz krystalicznych. Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku mieszaniny izonikotynamidu i kwasu benzoowego, gdzie odnotowano podwójną temperaturę topnienia w szerokim zakresie temperatur (w zależności od zawartości amidów).²³⁵ Interesującym jest także fakt, iż w przypadku mieszaniny **NA** z **PABA** uzyskano wyraźnie zdefiniowaną temperaturę topnienia (109–111 °C). Na podstawie podobnych wyników uzyskanych w niniejszej pracy dla kokryształu nikotynamidu i kwasu salicylowego **[NA][SAL]** można również wnioskować o tworzeniu się kokryształu, co wskazuje na stabilny układ między dwoma składnikami – **NA** i **PABA**.

Analiza zawartości wody wykazała, że w obu szeregach homologicznych, niezależnie od struktury anionu, jej procentowa zawartość malała wraz ze wzrostem długości łańcucha alkiłowego. Wskazuje to na wyraźny wpływ długości łańcucha alkiłowego na ten parametr oraz na wzrost charakteru hydrofobowego badanych związków. W przypadku **N1–N4** wartości zawartości wody wynosiły od 1,30% do 1,88%, natomiast w przypadku **P1–P4** zebrane wyniki wahały się od 0,94% do 2,16%. Najniższą zawartość wody odnotowano dla **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]**, odpowiednio 0,63% i 0,56%, co może sugerować, że brak łańcucha alkiłowego lub specyficznych oddziaływań jonowych w ich strukturach wpływa na powinowactwo do cząsteczek wody. Ponadto związki analizowane w niniejszym badaniu zostały ocenione jako niehigroskopijne w długotrwałym kontakcie z powietrzem (wilgotność 60%) w temperaturze

pokojuowej, co można uznać za dodatkową zaletę w kontekście ich przechowywania jako leków. Wyjątkiem były układy niejonowe [NA][NIK] i [NA][PABA], gdzie po 5 dniach ekspozycji zawartość wody wzrosła odpowiednio 3-krotnie i 2-krotnie (tabela A11 w aneksie). Ten zestaw wyników podkreśla korzystny wpływ nowych jonowych form API, które nie tylko mogą wykazywać zwiększoną skuteczność, ale także nie wymagają specjalistycznych warunków przechowywania.

7.2.1.2. Współczynnik podziału oktanol–woda

Jak pokazano na rysunku 26, wartości $\log K_{ow}$ zmierzone dla badanych związków mieściły się w zakresie od około -1,73 do 0,35 (dokładne wartości podano w tabeli A12 w aneksie). Zebrane dane wyraźnie wskazują, że nowe API z anionem nikotynianu (N1–N4) wykazują wyższą lipofilowość w porównaniu z solami zawierającymi *p*-aminobenzoesan (P1–P4). W efekcie wartości odnotowane dla N3 i N4 są zbliżone do optymalnego zakresu $\log K_{ow}$. W przypadku soli zawierających PABA jedynie P4 wykazuje optymalne właściwości do stosowania jako lek doustny. Co ciekawe, związki pozbawione łańcuchów alkilowych – [NA][NIK] i [NA][PABA] okazały się mniej hydrofilowe niż ich jonowe analogi zawierające krótszy podstawnik alkilowy: odpowiednio heksylowy (N1 i P1) i oktylowy (N2 i P2). Obserwacja ta sugeruje, że na charakter lipofilowy związków wpływa nie tylko długość łańcucha alkilowego, ale także charakter oddziaływań w obrębie cząsteczki.



Rysunek 26. Wartości współczynnika podziału oktanol–woda dla nikotynianów *N*-alkilonikotynamidu (N1–N4), *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilonikotynamidu (P1–P4) oraz układów [NA][NIK] i [NA][PABA].

Porównanie syntetyzowanych związków N1–N4 oraz P1–P4 z ich macierzystymi bromkami *N*-alkilonikotynamidu (3–6), przedstawione w tabeli A12 aneksie, wykazało, że w tym przypadku wymiana anionowa prowadzi do obniżenia wartości $\log K_{ow}$ ($\Delta \log K_{ow}$ wynosi od -1,28 do -0,18), co wskazuje na wzrost hydrofilowości produktów. Wynik ten jest częściowo nieoczekiwany, ponieważ w wielu układach QASs zastąpienie anionów (np. chlorkowych

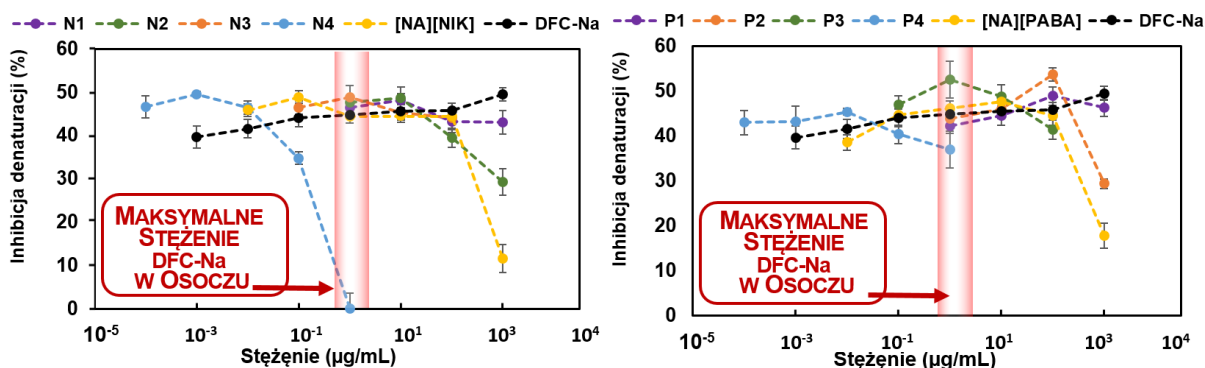
anionami organicznymi) wiąże się ze wzrostem lipofilowości. Niemniej jednak uzyskane wartości $\log K_{OW}$ dla związków **N3**, **N4** i **P4** są zbliżone do optymalnego zakresu (0–3) dla kandydatów na leki doustne lub mieszczą się w tym zakresie, co sugeruje, że te sole zachowują korzystną równowagę między przepuszczalnością błonową a rozpuszczalnością w wodzie. Co więcej, zwiększona hydrofilowość po wymianie anionowej zmniejsza ryzyko wytrącania się API w układach wodnych. Sam proces wymiany jonowej zapewnia również dodatkowe korzyści związane z preparatem: sole bromkowe miały tendencję do tworzenia lepkich lub żelowych układów nawet w niskich stężeniach, co może znacznie utrudniać powtarzalne dawkowanie i podawanie doustne. Ponadto zastąpienie obojętnego anionu bromkowego biologicznie aktywnymi przeciwjonami, takimi jak nikotynian lub *p*-aminobenzoetan, wprowadza korzystne farmakologiczne grupy funkcyjne, potencjalnie zwiększając ogólną biokompatybilność i wartość terapeutyczną.

Warto zauważyć, że wiele leków podawanych doustnie wykazuje dobre właściwości hydrofilowe, co przejawia się niskimi wartościami $\log K_{OW}$. Natomiast niektóre leki przeciwzapalne, nawet w postaci jonowej z sodem jako przeciwjonem, wykazują stosunkowo wysokie wartości $\log K_{OW}$, co wskazuje na ich charakter lipofilowy. Godnymi uwagi przykładami z tych dwóch grup są metformina, tiamina, cyprofloksacyna, ibuprofen sodowy czy diklofenak sodowy, których wartości $\log K_{OW}$ wynoszą odpowiednio: -1,43, -2,04, -1,09, 0,92 i 0,69.^{236–240} Niezaprzeczalnie $\log K_{OW}$ jest cennym parametrem, który ułatwia ocenę przepuszczalności i biodostępności różnych substancji biologicznie czynnych. Jednak może on nie w pełni odzwierciedlać złożoność farmakokinetyki określonej grupy związków, zwłaszcza gdy bierze się pod uwagę przepuszczalność leku w złożonym środowisku, jakim jest organizm ludzki. Dlatego też kompleksowa ocena uwzględniająca dodatkowe parametry, takie jak rozpuszczalność, wiązanie z białkami lub mechanizmy transportu aktywnego, jest niezbędna do dokładniejszej oceny właściwości farmakokinetycznych i potencjału terapeutycznego nowych API.

7.2.1.3. Ocena potencjału przeciwzapalnego: test denaturacji albuminy

Wyniki testu denaturacji albuminy dla produktów jonowych (**N1–N4** oraz **P1–P4**) i niejonowych odpowiedników (**[NA][NIK]** i **[NA][PABA]**) przedstawiono na rysunku 27 (dokładne wartości znajdują się w tabeli A13 w aneksie). Zebrane wyniki wskazują, że najwyższą aktywność w denaturacji albuminy jaja kurzego (53,7% i 52,6%) zaobserwowano dla związków z anionem **PABA** zawierających łańcuch oktylowy (**P2**) lub decylowy (**P3**) w kationie. Co więcej, zdecydowana większość analizowanych związków wykazała lepszą aktywność niż powszechnie stosowany lek przeciwzapalny, jakim jest sól sodowa diklofenaku (DFC-Na). Dotyczy to także zakresu odpowiadającego jej maksymalnemu stężeniu w osoczu w organizmie człowieka

(1,4–3,0 $\mu\text{g/mL}$),²⁴¹ który na rysunku 27 zaznaczono kolorem czerwonym. W tym konkretnym regionie stwierdzono, że niemal wszystkie nikotyniany (N1–N3) były skuteczniejsze w hamowaniu denaturacji albuminy w porównaniu z DFC-Na, podczas gdy wśród QASs z anionem PABA wzrost odnotowano jedynie dla soli P3. Dla porównania, związek odniesienia (DFC-Na) osiągnął podobny poziom aktywności (49,5%) tylko przy stężeniu wynoszącym aż 1000 $\mu\text{g/mL}$.



Rysunek 27. Hamowanie denaturacji albuminy jaja kurzego przez nikotyniany *N*-alkilnikotynamidu (N1–N4), *p*-aminobenzoesany *N*-alkilnikotynamidu (P1–P4), układy [NA][NIK], [NA][PABA] i diklofenak sodowy (DFC-Na).

Układy pozbawione łańcucha alkilowego, [NA][NIK] i [NA][PABA], były również skuteczne w hamowaniu denaturacji białek w szerokim zakresie stężeń. Godnym uwagi jest fakt, iż strategia QASs pozwoliła na znaczącą redukcję dawki terapeutycznej nawet o kilka rzędów wielkości. Nikotynian zawierający najdłuższy łańcuch (N4) wykazał niezwykłą aktywność na poziomie 49,6% przy stężeniu zaledwie 0,001 $\mu\text{g/mL}$. Co więcej, zaobserwowano, że zdolność hamowania denaturacji albuminy jaja przez związki N1–N4 oraz P1–P4 wzrasta wraz z wydłużaniem łańcucha alkilowego. W konsekwencji wyższe wartości aktywności osiągane są przy niższych stężeniach, natomiast przy wyższych stężeniach wszystkie związki wykazują tendencję do nasilenia procesu denaturacji. Obserwacje te sugerują, że jedynie określona długość łańcucha alkilowego może prowadzić do istotnego przesunięcia zakresu stężeń, w którym związki wykazują korzystne działanie ochronne wobec albuminy jaja. W przypadku badanych soli, najbardziej wyraźny efekt tego typu odnotowano dla pochodnych zawierających najdłuższy podstawnik dodecyłowy (N4 i P4), które wykazywały aktywność hamującą denaturację w niższych stężeniach API. Należy podkreślić, że wszystkie badane związki wykazują w określonych zakresach stężeń wyższą aktywność przeciwdenaturacyjną niż diklofenak sodowy (DFC-Na), co uzasadnia dalsze badania nad ich potencjałem jako alternatywnych związków o działaniu przeciwzapalnym.

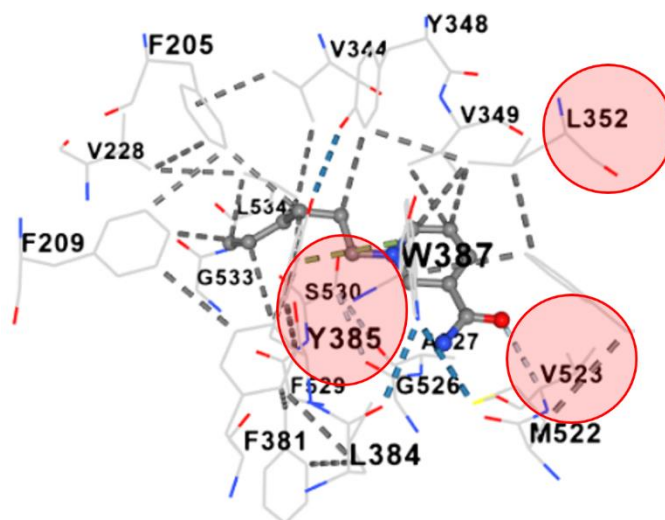
W literaturze opisano badania nad działaniem przeciwzapalnym NA w leczeniu trądziku pospolitego po podaniu doustnym, gdzie wykazano znaczną poprawę w przypadku terapii

skojarzonych zawierających nikotynamid, kwas azelainowy, cynk, pirydoksynę, miedź i kwas foliowy.²⁴² Dowiedziono także, że kwas nikotynowy może znacząco redukować stan zapalny w zmianach naczyniowych u myszy, prowadząc do 30% zmniejszenia całkowitej powierzchni zmian w porównaniu z grupą kontrolną, podkreślając w ten sposób swój potencjał jako środka terapeutycznego w chorobach naczyniowych.²⁴³ Co więcej, inne badania potwierdziły również przeciwzapalne działanie kwasu nikotynowego w ludzkich monocytach, wykazując redukcję wydzielania mediatorów prozapalnych nawet o 60%.²⁴⁴ Z kolei kokryształ otrzymany z **PABA** i ketoprofenu wykazywał znacznie lepszą skuteczność przeciwzapalną w porównaniu z samym ketoprofenem. Badania *in vitro* z wykorzystaniem metody albuminy jaja kurzego pozwoliły uzyskać efekt prawie dwukrotnie silniejszy niż w przypadku czystego leku.²⁴⁵ Różnorodność zastosowanych metod badawczych nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków, jednak uzyskane dane sugerują, że nawet prosta modyfikacja strukturalna jednej z form witaminy B może znacząco zwiększyć jej aktywność i ujawnić jej potencjał terapeutyczny w zakresie właściwości przeciwzapalnych.

7.2.1.4. Ocena potencjału przeciwzapalnego: dokowanie molekularne oparte na strukturze enzymu cyklooksygenazy-2 (COX-2)

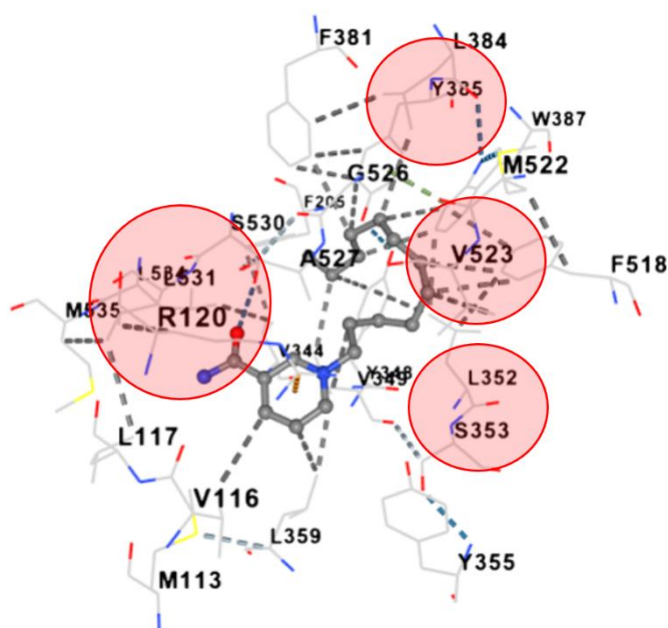
Analizę dokowania molekularnego wykorzystano do oceny potencjalnych sposobów oddziaływania badanych czwartorzędowych soli amoniowych zawierających anion nikotynianowy (**N1–N4**) oraz *p*-aminobenzoesanowy (**P1–P4**) z enzymem cyklooksygenazą-2 (COX-2). W celu umożliwienia porównania wyników do analizy włączono również układy pozbawione łańcucha alkilowego, **[NA][NIK]** oraz **[NA][PABA]**, a także lek referencyjny w postaci soli sodowej diklofenaku (DFC-Na).

Wyniki symulacji dokowania wykazały, że wszystkie analizowane ligandy preferencyjnie lokalizowały się w głównym kanale aktywnym enzymu (**C1**), obejmującym reszty katalityczne **R120**, **Y385** i **S530**, jak również reszty stabilizujące **S353**, **L352** i **V523**, które odpowiadają za prawidłową orientację oraz stabilizację inhibitorów w miejscu aktywnym COX-2 (tabela A14 w aneksie). Uzyskane wartości energii wiązania (*Vina score*) mieściły się w zakresie od -8,0 do -5,3 kcal·mol⁻¹, gdzie jako punkt odniesienia przyjęto sól sodową diklofenaku, dla której energia wiązania wyniosła -7,0 kcal·mol⁻¹ (rysunek 28). Wynik ten jest zgodny z wartościami typowymi dla klasycznych niesteroidowych leków przeciwzapalnych, co potwierdza poprawność modelowania i jednocześnie wskazuje, że niektóre z analizowanych związków mogą wykazywać porównywalne powinowactwo do COX-2.



Rysunek 28. Sól sodowa diklofenaku (DFC-Na) w kieszeni C1 wraz z oznaczonymi na czerwono głównymi pozostałościami katalitycznymi (Y385, S530) oraz resztami przyczyniającymi się do stabilizacji i selektywności (V523, L352).

Szczegółowa analiza szeregu pochodnych nikotynianu (N1–N4) wykazała stopniowy wzrost stabilności kompleksu ligand–enzym wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Pochodne zawierające krótsze łańcuchy, takie jak heksyl (N1), wykazywały powinowactwo porównywalne z diklofenakiem, natomiast wydłużenie łańcucha do dodecyłu (N4) prowadziło do poprawy energii wiązania do wartości $-7,5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (rysunek 29). Jeszcze wyraźniejszy efekt zaobserwowano w przypadku szeregu *p*-aminobenzoesanów (P1–P4), w którym najwyższe powinowactwo wykazała pochodna dodecyłowa (P4), osiągając energię wiązania $-8,0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Wynik ten wskazuje na korzystniejsze dopasowanie strukturalne tej klasy związków do kieszeni aktywnej enzymu.



Rysunek 29. Kation nikotynianu *N*-dodecylonikotynamidu (N4) w kieszeni C1 wraz z oznaczonymi na czerwono głównymi pozostałościami katalitycznymi (Y385, S530) oraz resztami przyczyniającymi się do stabilizacji i selektywności (S353, V523, L352).

Obserwowany wzrost powinowactwa wiązania wraz z wydłużaniem łańcucha alkilowego potwierdza istotną rolę hydrofobowych fragmentów strukturalnych w interakcji z COX-2. Lipofilowy charakter kanału katalitycznego sprzyja stabilizacji ligandów zawierających dłuższe łańcuchy alkilowe poprzez intensyfikację oddziaływań van der Waalsa oraz oddziaływań hydrofobowych z resztami **L352** i **V523**. Reszty te są uważane za kluczowe elementy determinujące selektywność inhibitorów dla izoformy COX-2. Dodatkowo, obecność dodatnio naładowanego centrum amoniowego może sprzyjać powstawaniu oddziaływań elektrostatycznych z resztą **R120**, która odpowiada za kotwiczenie ligandów na wejściu do aktywnego kanału enzymu.

Znaczenie fragmentu kationowego potwierdzają wyniki uzyskane dla pojedynczych anionów, które wykazywały istotnie słabsze oddziaływania z enzymem (tabela A14 w aneksie). Aniony nikotynianu i *p*-aminobenzoesu osiągnęły energie wiązania wynoszące odpowiednio około -5,3 i -5,9 kcal·mol⁻¹, podczas gdy niejonowa cząsteczka nikotynamidu wykazała jeszcze niższe powinowactwo wynoszące -5,5 kcal·mol⁻¹. Wyniki te wskazują, że sama obecność anionowego farmakoforu nie jest wystarczająca do uzyskania stabilnego kompleksu z COX-2, ale połączenie go z hydrofobowym fragmentem kationowym prowadzi do znacznego wzmocnienia oddziaływań ligand–enzym. Można założyć, że aromatyczne układy pierścieniowe obecne w strukturze ligandu dodatkowo stabilizują kompleks poprzez oddziaływania π – π z resztą **Y385**, która odgrywa rolę katalityczną w mechanizmie działania enzymu.

Uzyskane wyniki wskazują również, że charakter anionu odgrywa istotną rolę w modulacji powinowactwa ligandów do COX-2. Wyższe wartości energii wiązania obserwowane dla pochodnych z anionem *p*-aminobenzoesu mogą wynikać z ich zwiększonej zdolności do tworzenia wiązań wodorowych i oddziaływań aromatycznych, co sugeruje, że modyfikacja ugrupowania anionowego może być także skuteczną strategią optymalizacji aktywności biologicznej tej grupy związków.

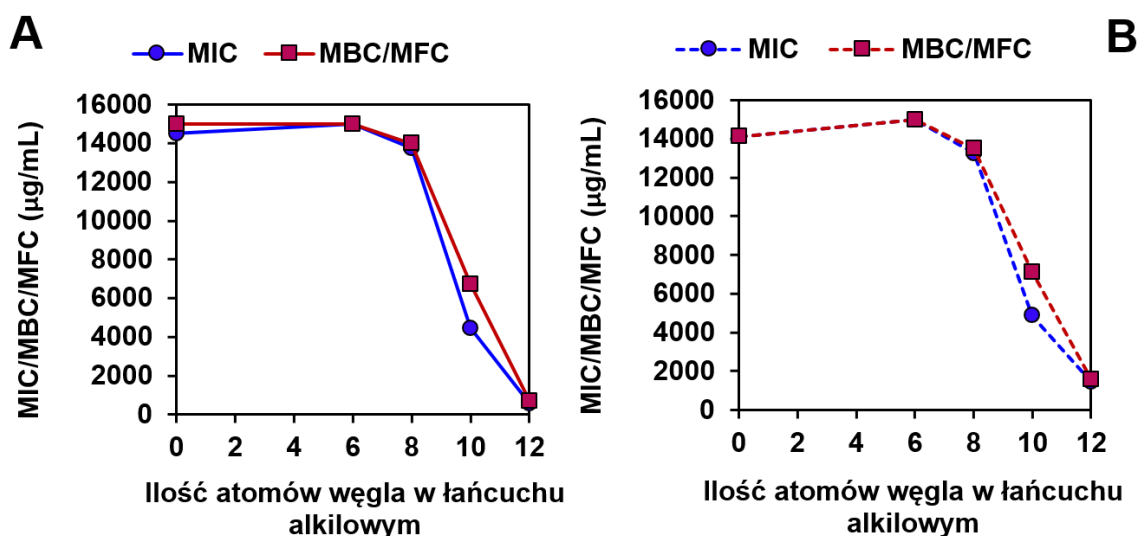
W 2025 roku pochodne nikotynamidu zawierające układ pirano-pirazolowy poddano analizie dokowania molekularnego z czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B, regulującym ekspresję szerokiej gamy genów zaangażowanych w procesy zapalne. Przeprowadzone symulacje dokowania wykazały, że analizowane ligandy osiągają wartości energii wiązania w zakresie zbliżonym do wyników otrzymanych w niniejszej pracy (od -3,95 do -9,45 kcal·mol⁻¹).²⁴⁶ Natomiast opisane w literaturze wyniki dokowania pochodnych kwasu nikotynowego wykazały, że sam kwas nikotynowy ma zdolność do prawidłowego orientowania się w miejscu aktywnym enzymu COX-2 dzięki obecności pierścienia pirydynowego i grupy karboksylowej, ale liczba i siła możliwych interakcji wiążących jest ograniczona. Rdzeń kwasu nikotynowego może stanowić użyteczny element strukturalny w projektowaniu nowych ligandów o potencjalnej

aktywności przeciwzapalnej, natomiast odpowiednia modyfikacja tego szkieletu poprzez wprowadzenie dodatkowych podstawników zwiększa zdolność związków do korzystnych oddziaływań w obrębie miejsca aktywnego celu biologicznego (w tym COX-2), co może przekładać się na wyższą aktywność przeciwzapalną.⁹¹

7.2.1.5. Ocena aktywności antybakteryjnej: wyznaczanie parametrów MIC i MBC/MFC

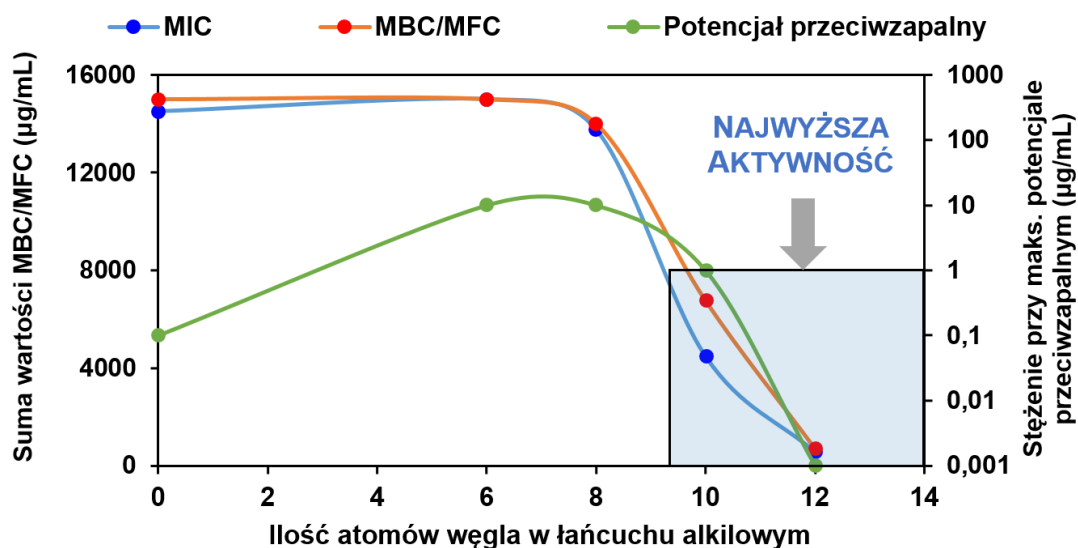
Aktywność przeciwdrobnoustrojową związków **N1–N4** i **P1–P4** oceniono wobec bakterii Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *M. catarrhalis*, *S. marcescens*, *C. jejuni*, *S. Enteritidis*, *P. vulgaris*), Gram-dodatnich (*L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. subtilis*) oraz grzybów (*C. albicans*, *R. mucilaginosa*, *C. neoformans*). Wartości MIC oraz MBC/MFC dla wszystkich wytypowanych mikroorganizmów wyznaczono metodą mikrorozcieńczeń. Jak pokazują wyniki przedstawione na rysunku 25 (oraz w tabeli A15 w aneksie), właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze badanych związków różniły się w zależności od związku i mikroorganizmu. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa badanych soli **N1–N4** oraz **P1–P4** wyraźnie wzrasta wraz z wydłużaniem łańcucha alkilowego. Zauważono, że sole **N4** i **P4** zawierające najdłuższy podstawnik dodecyłowy wykazują najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową, a ich wartości MIC wynosiły od 7,81 do 125 µg/mL wobec bakterii Gram-ujemnych, od 3,9 do 31,25 µg/mL wobec bakterii Gram-dodatnich oraz od 3,9 do 62,5 µg/mL wobec grzybów. Sole **N3** i **P3** wykazały znacznie niższą skuteczność w hamowaniu wzrostu drobnoustrojów osiągając wartości MIC od 125 do 1000 µg/mL wobec bakterii Gram-ujemnych, od 62 do 250 µg/mL wobec bakterii Gram-dodatnich, podczas gdy ich właściwości przeciwgrzybicze mieściły się w zakresie od 31,25 do 1000 µg/mL. Sole **N2** i **N4** wykazywały aktywność jedynie wobec wybranych drobnoustrojów w stężeniu 250–1000 µg/mL, podczas gdy związki **N1** i **P1** z najkrótszym podstawnikiem w zasadzie nie wykazywały aktywności przeciwdrobnoustrojowej w badanym zakresie stężeń. Zestawienie sumarycznej aktywności przeciwdrobnoustrojowej na rysunku 30 także wskazuje, że istotna aktywność przeciwdrobnoustrojowa pojawia się dopiero dla związków zawierających łańcuchy alkilowe posiadające co najmniej 10 atomów węgla. Ponadto warto odnotować, że analizowane sole odznaczały się silniejszym działaniem wobec bakterii Gram-dodatnich w porównaniu z bakteriami Gram-ujemnymi i grzybami, co często obserwuje się w przypadku wielu innych QASs. Wynika to z odmiennej budowy ściany komórkowej, która u bakterii Gram-dodatnich składa się z wielu warstw peptydoglikanu, podczas gdy szczepy Gram-ujemne mają cieńszą warstwę peptydoglikanu i błonę zewnętrzną złożoną z białek i lipopolisacharydów (LPS), co utrudnia penetrację środków przeciwbakteryjnych.²⁴⁷ Należy zauważyć, że pochodne *N*-alkilonikotynamidu z anionem salicylanowym (opisane w pkt. 7.3.1.5.) wykazywały ogólnie

niższą skuteczność bakteriobójczą wobec *S. aureus*, *C. albicans* i *P. aeruginosa* w porównaniu z analogicznymi solami z anionem nikotynianu i *p*-aminobenzoesanu. To wyraźnie dowodzi, że nie tylko długość łańcucha alkilowego w kationie, ale także struktura anionu oraz specyficzne interakcje kation–anion mogą mieć znaczący wpływ na aktywność biologiczną tego typu czwartorzędowych soli amoniowych.



Rysunek 30. Sumaryczna aktywność przeciwdrobnoustrojowa nikotynianów *N*-alkilnikotynamidu (N1–N4) i [NA][NIK] (A), *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilnikotynamidu: (P1–P4) i [NA][PABA] (B). Dla [NA][NIK] i [NA][PABA] długość łańcucha alkilowego jest równa 0.

Aby określić wpływ długości łańcucha alkilowego i rodzaju anionu na aktywność biologiczną zsyntezowanych czwartorzędowych pochodnych nikotynamidu, na rysunku 31 (oraz A62 w aneksie) porównano sumę wartości MIC lub MBC/MFC oraz stężeń odpowiadających maksymalnemu zahamowaniu denaturacji albuminy. Analiza zależności struktura–aktywność (SAR, ang. *Structure–Activity relationship*) wykazała, że długość łańcucha alkilowego ma kluczowy wpływ zarówno na właściwości przeciwdrobnoustrojowe, jak i na potencjał przeciwzapalny (określony badaniami inhibicji denaturacji albuminy). W konsekwencji, QASs z łańcuchem heksylowym (N1 i P1) wykazywały najniższą aktywność w obu testach, podczas gdy wydłużenie łańcucha do oktylu (N2 i P2) skutkowało wyraźną choć niewielką poprawą skuteczności przeciwdrobnoustrojowej. Co ciekawe, układy niejonowe, [NA][NIK] oraz [NA][PABA], pomimo ich znikomej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, wykazały stosunkowo silny potencjał przeciwzapalny. Sugeruje to, że interakcje niejonowe między cząsteczkami w tego typu API mogą sprzyjać stabilizacji struktury białek, podczas gdy obecność długiego łańcucha alkilowego, zgodnie z doniesieniami literaturowymi, zwiększa powinowactwo do błon komórkowych drobnoustrojów, a tym samym poprawia skuteczność przeciwdrobnoustrojową. W efekcie dalsze wydłużenie łańcucha do decylu (N3 i P3) oraz dodecylu (N4 i P4) doprowadziło do synergistycznego wzmocnienia obu funkcji biologicznych.



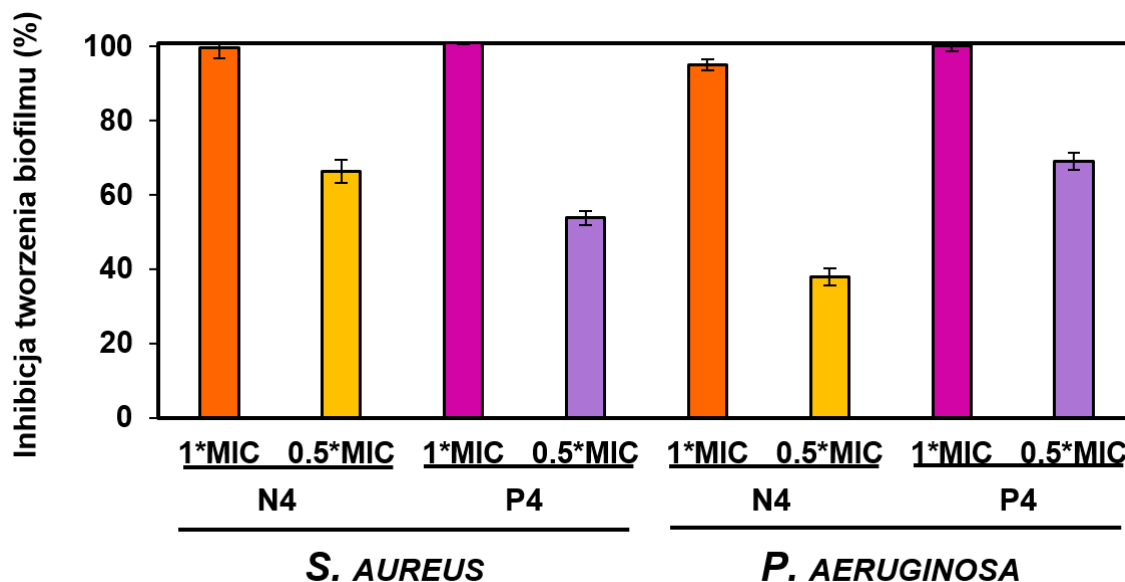
Rysunek 31. Zależność pomiędzy długością łańcucha alkilowego w nikotynianach (N1–N4; [NA][NIK]) a sumaryczną aktywnością przeciwdrobnoustrojową (MIC lub MBC/MFC) w stosunku do 15 patogennych mikroorganizmów, oraz stężeniem odpowiadającym maksymalnemu potencjałowi przeciwzapalnemu (inhibicja denaturacji albuminy). Dla [NA][NIK] długość łańcucha alkilowego jest równa 0.

Wyniki te ujawniły, że dłuższe podstawniki alkilowe nie tylko wzmacniają działanie przeciwdrobnoustrojowe, ale także zmniejszają stężenie wymagane do maksymalnego zahamowania denaturacji białek. Zaobserwowana wyższa skuteczność przy niższych dawkach jest istotnym aspektem z perspektywy bezpieczeństwa farmakologicznego. Co ciekawe, sól z anionem nikotynianowym (N4) wykazała lepszą ogólną skuteczność biologiczną w porównaniu z jej analogiem z *p*-aminobenzoesanowym (P4). Sugeruje to, że obecność pierścienia pirydynowego może ułatwiać dodatkowe oddziaływania elektrostatyczne lub π - π z biocząsteczkami, przyczyniając się do zwiększonej bioaktywności. Podsumowując, wydłużenie łańcucha alkilowego sprzyja synergistycznej poprawie zarówno właściwości przeciwdrobnoustrojowych, jak i stabilizujących białka, podczas gdy charakter przeciwnonu precyzyjnie dostraja oddziaływania molekularne i ogólną skuteczność zaprojektowanych QASs.

7.2.1.6. Właściwości antybiofilmowe

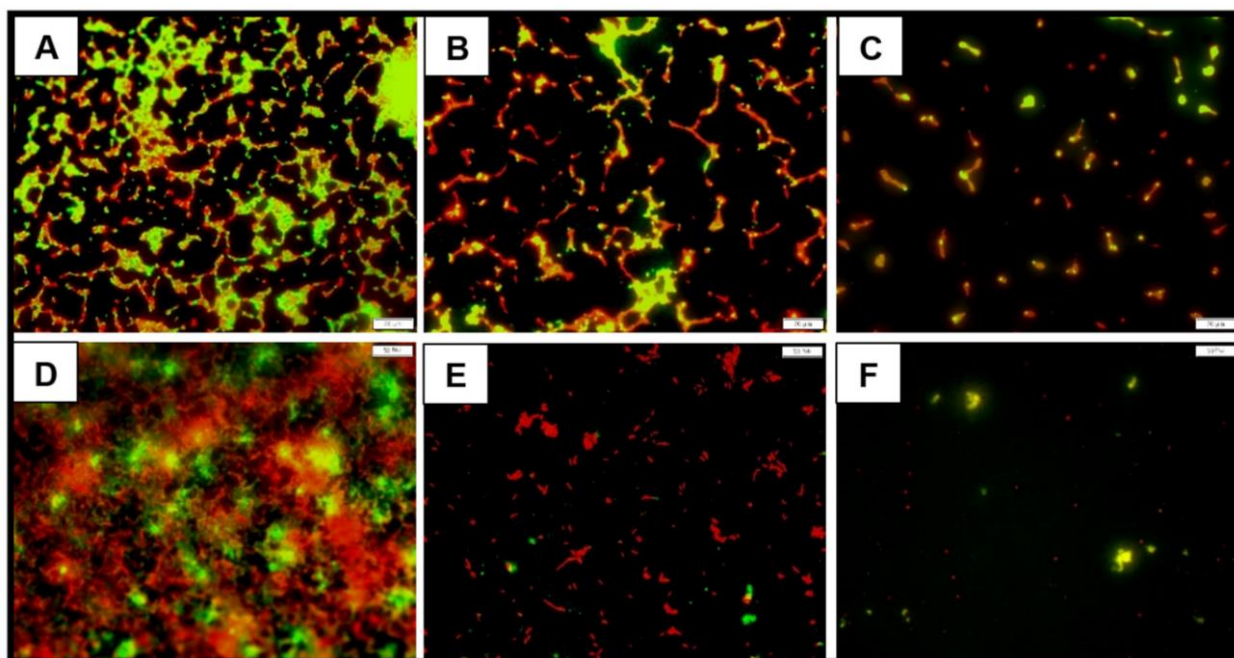
Wybrane sole o najwyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej (N4 i P4) zbadano pod kątem wpływu na tworzenie biofilmu przez bakterie *S. aureus* i *P. aeruginosa* w stężeniu odpowiadającym 0,5 i 1-krotnej wartości MIC. Wyniki zaprezentowane na rysunku 32 ujawniają, że przy niższych stężeniach analizowane związki nie wykazują pełnej skuteczności przeciwko biofilmowi - wartości hamowania jego tworzenia wahały się od ok. 40 do 70%. Niemniej jednak, przy stężeniu 1*MIC oba związki całkowicie hamują tworzenie biofilmu przez *S. aureus*, podczas gdy w przypadku *P. aeruginosa* skuteczność w niewielkim stopniu zależy od struktury

użytego anionu. Podczas gdy sól **P4** całkowicie hamowała tworzenie biofilmu, produkt **N4** charakteryzował się nieznacznie zmniejszoną skutecznością na poziomie 95%.



Rysunek 32. Inhibicja tworzenia biofilmu przez *S. aureus* i *P. aeruginosa*: dla związku **N4** – 1^*MIC = 3,9 $\mu g/mL$, 0.5^*MIC = 1,95 $\mu g/mL$; dla związku **P4** – 1^*MIC = 125,0 $\mu g/mL$, 0.5^*MIC = 62,5 $\mu g/mL$.

Do oceny wpływu wybranych soli na tworzenie biofilmu przez bakterie *S. aureus* i *P. aeruginosa* przy stężeniu 1^*MIC wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną (rysunek 33).



Rysunek 33. Wpływ **N4** i **P4** na tworzenie biofilmu *S. aureus* i *P. aeruginosa* przy stężeniu 1^*MIC . Biofilm bez dodatku badanych związków utworzony przez *S. aureus* – kontrola (**A**); biofilm utworzony przez *S. aureus* traktowany **N4** (**B**); biofilm utworzony przez *S. aureus* traktowany **P4** (**C**); biofilm bez dodatku badanych związków utworzony przez *P. aeruginosa* – kontrola (**D**); biofilm utworzony przez *P. aeruginosa* traktowany **N4** (**E**); biofilm utworzony przez *P. aeruginosa* traktowany **P4** (**F**).

W próbkach kontrolnych obserwowano intensywne barwienie, wskazujące na znaczne pokrycie powierzchni biofilmem, z przewagą komórek żywych (zielona fluorescencja). Natomiast w próbkach poddanych działaniu badanych związków widoczne były jedynie nieliczne skupiska komórek, z większym udziałem komórek martwych (czerwona fluorescencja). Uzyskane wyniki wskazują, że analizowane związki mogą skutecznie ograniczać tworzenie biofilmu, co pozostaje w zgodzie z ich obserwowaną aktywnością przeciwdrobnoustrojową.

7.2.1.7. Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego QASs

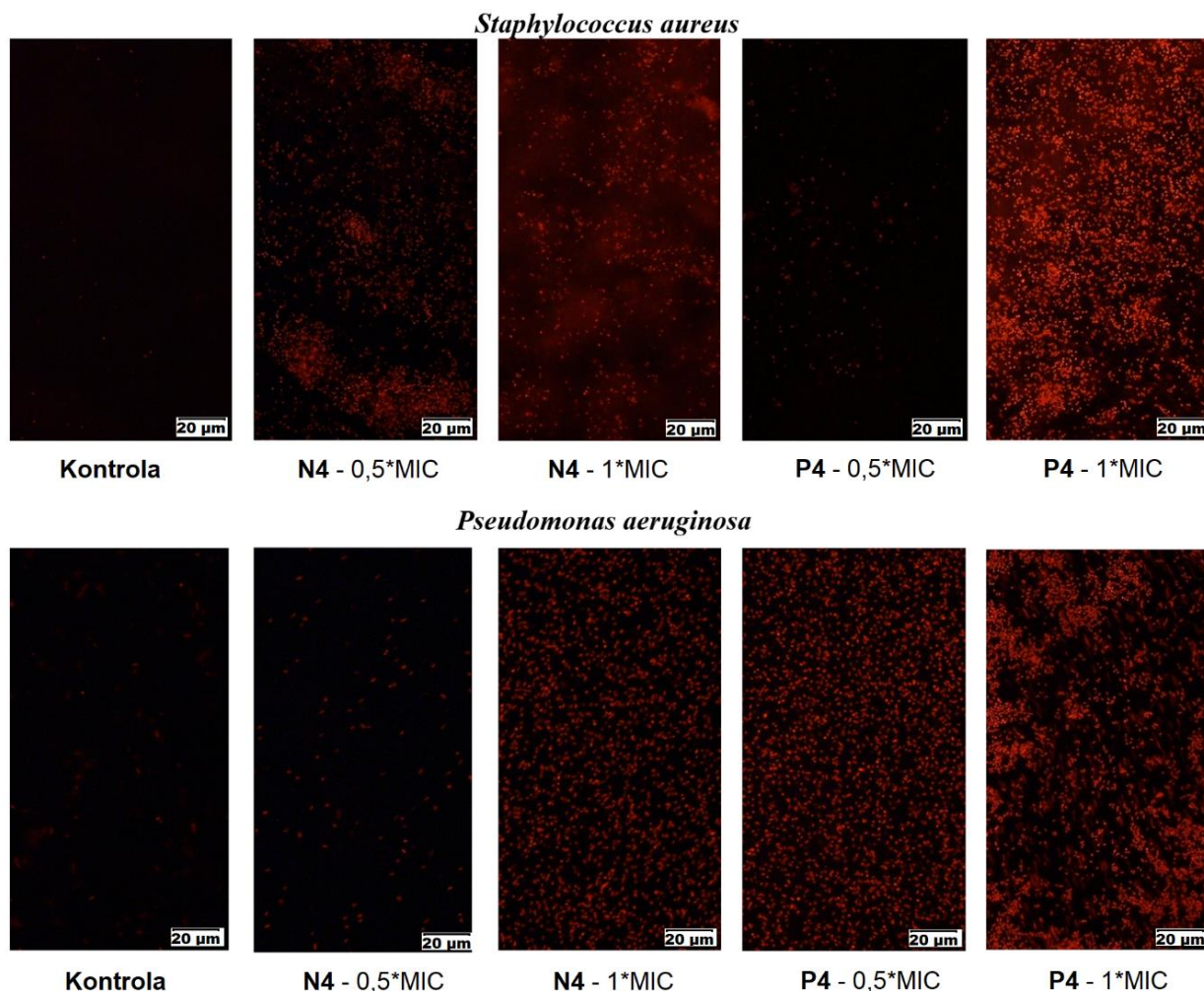
Aby wyjaśnić wpływ związków **N4** i **P4** na komórki drobnoustrojów, jako organizmy reprezentatywne wybrano *S.aureus*, *P.aeruginosa* i *C.albicans*. Komórki traktowano badanymi związkami w stężeniach odpowiadających wartości MIC oraz 1000 mM, a uwalnianie składników komórkowych oceniano po 2 godzinach inkubacji za pomocą analizy spektrofotometrycznej (tabela 4). We wszystkich przypadkach zastosowanie związków **N4** i **P4** prowadziło do wzrostu wartości OD260 nm, co wskazuje na wyciek materiału wewnątrzkomórkowego. Takie uwalnianie składników cytoplazmatycznych świadczy o poważnym i nieodwracalnym uszkodzeniu błon cytoplazmatycznych i plazmatycznych.²⁴⁸

Tabela 4. Wpływ wybranych związków na uwalnianie składników komórkowych z mikroorganizmów wskaźnikowych.

Mikroorganizm	Gęstość optyczna (A=260)				
	Kontrola	N4		P4	
		1000 µg/mL	1*MIC ^a	1000 µg/mL	1*MIC ^a
<i>S. aureus</i>	0,004±0,001	0,949±0,001	0,079±0,001	>1000	0,098±0,001
<i>P. aeruginosa</i>	0,104±0,003	0,844±0,001	0,274±0,001	>1000	0,454±0,001
<i>C. albicans</i>	0,303±0,001	>1000	0,507±0,002	>1000	0,425±0,001

^aDla *S. aureus* MIC = 3,9 µg/mL, dla *P. aeruginosa* MIC = 125 µg/mL; dla *C. albicans* MIC = 62,5 µg/mL

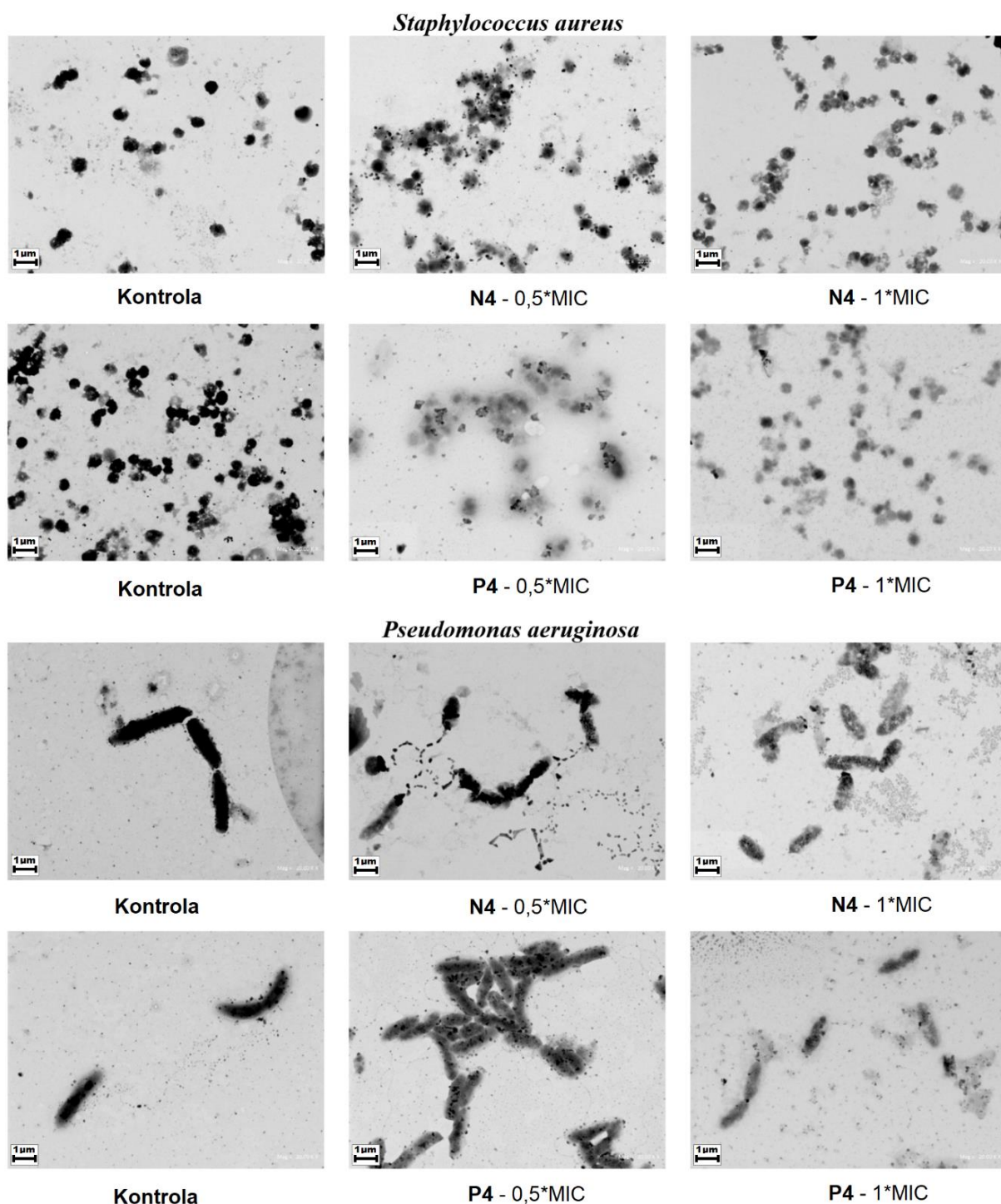
Dodatkowe obserwacje z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej (rysunek 34) wskazują na zaburzenie integralności błony komórkowej badanych bakterii. Integralność tę oceniano na podstawie barwienia jodkiem propidyny (PI), barwnikiem wiążącym DNA, który wykazuje fluorescencję po wnikięciu do komórek z uszkodzoną błoną. W konsekwencji komórki o zachowanej integralności błony pozostają niefluorescencyjne, natomiast komórki z uszkodzoną błoną wykazują czerwony sygnał fluorescencyjny.



Rysunek 34. Zdjęcia mikroskopii fluorescencyjnej ukazujące wpływ **N4** oraz **P4** na żywotność *S. aureus* i *P. aeruginosa*.

W przypadku kontroli obserwowano jedynie niewielką intensywność czerwonej fluorescencji, co sugeruje zachowaną integralność błony komórkowej. Z kolei komórki poddane działaniu związków **N4** i **P4** wykazywały wyraźny, zależny od stężenia wzrost sygnału fluorescencyjnego, co wskazuje na zwiększoną przepuszczalność błony komórkowej.

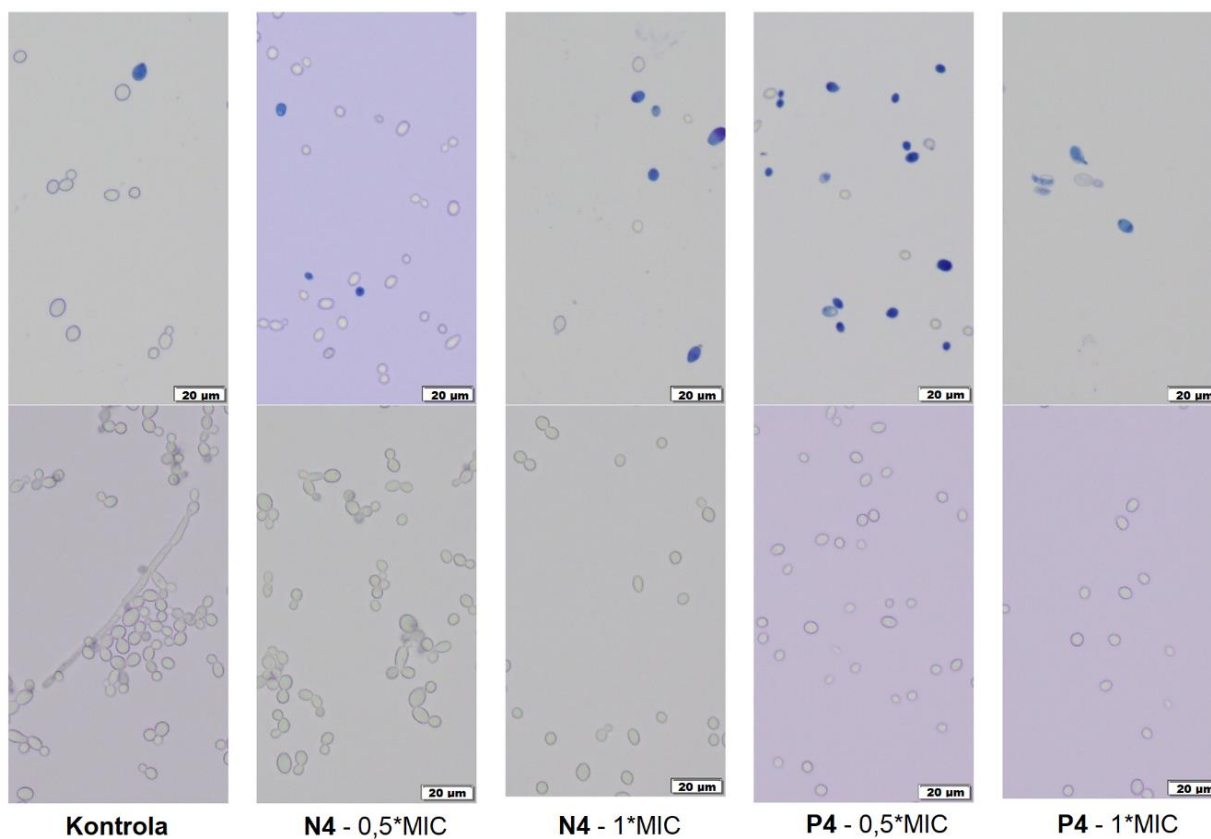
W badaniach z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego destrukcyjny wpływ badanych związków na wybrane mikroorganizmy był wyraźnie widoczny, co przedstawiono na rysunku 35. W próbkach kontrolnych *P. aeruginosa* i *S. aureus* były równomiernie wybarwione, o wyraźnej morfologii. Natomiast próbki poddane działaniu badanych związków wykazywały nieregularne wybarwienie, zniekształcenie kształtu komórek i wyciek zawartości wewnątrzkomórkowej. Ponadto stopień uszkodzeń komórkowych wzrastał proporcjonalnie do stężenia badanych związków.



Rysunek 35. Zdjęcia wykonane mikroskopem elektronowym przedstawiające morfologię i żywotność *S. aureus* oraz *P. aeruginosa* po ekspozycji na związki **N4** oraz **P4**.

W przypadku *C. albicans* zastosowano mikroskopię optyczną z wykorzystaniem błękitu metylenowego, który ulega redukcji w żywych komórkach. Na obrazach przedstawionych na rysunku 36 w próbce kontrolnej obserwowano pojedyncze komórki ulegające wybarwieniu, natomiast w wyniku obecności **N4** oraz **P4** liczba komórek barwionych była wyraźnie większa niż niebarwionych. Ponadto przy wyższych stężeniach badanych związków obserwowano zmiany morfologiczne komórek, takie jak deformacja oraz intensywniejsze wybarwienie, co może wskazywać na zaburzenia integralności komórkowej. Jednocześnie zaobserwowano

ograniczenie tworzenia struktur pseudomycelialnych, widoczne również na obrazach bez barwienia.



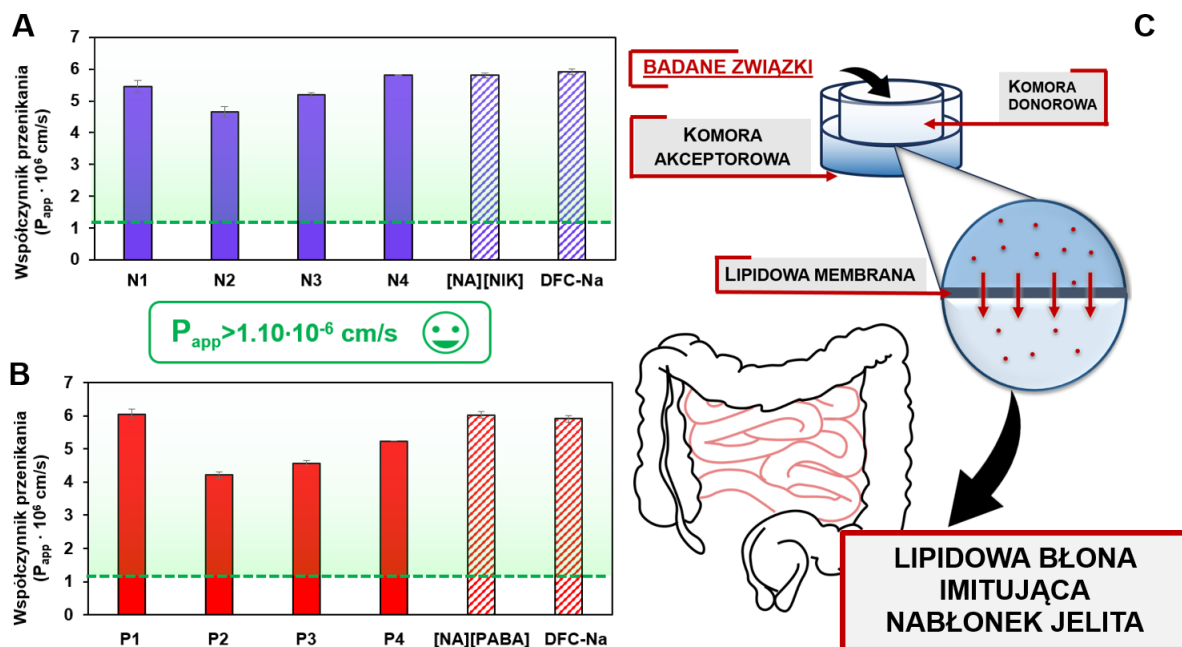
Rysunek 36. Obraz wykonany techniką mikroskopii optycznej przedstawiający morfologię i żywotność *C. albicans* po ekspozycji na związki **N4** i **P4** (górny rząd – obrazy z barwieniem, dolny rząd – obrazy bez barwienia).

Łącznie, te uzupełniające się testy konsekwentnie dowodzą, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa QASs **N4** i **P4** jest związana przede wszystkim z zaburzeniem integralności błony komórkowej drobnoustrojów, co prowadzi do wycieku składników wewnątrzkomórkowych, utraty morfologii komórkowej i ostatecznie do śmierci komórek. Zbieżność wyników spektrofotometrycznych, fluorescencyjnych i mikroskopowych sugeruje mechanizm działania związany z oddziaływaniem na błonę komórkową, charakterystyczny dla amfifilowych kationowych związków przeciwdrobnoustrojowych.

7.2.1.8. Test GIT-PAMPA

W celu oceny potencjału absorpcyjnego badanych związków wykonano test GIT-PAMPA (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). Schemat ilustrujący jego zasadę i znaczenie zaprezentowano na rysunku 40C. Współczynniki przepuszczalności określone po 6 godzinach potwierdziły wysoki potencjał przepuszczalności wszystkich analizowanych związków, ponieważ każdy z nich osiągnął wymagany próg $P_{app} > 1,10 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (rysunek 37A

i 37B oraz tabela A16 w aneksie). W przypadku nikotynianów (**N1–N4**) wartości P_{app} wahały się od $4,7 \cdot 10^{-6}$ do $5,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, przy czym **N4** wykazał najwyższą przepuszczalność w tej serii. Chociaż ogólna przepuszczalność pozostała porównywalna z referencyjnym lekiem – solą sodową diklofenaku (DFC-Na) ($P_{app} = 5,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$), widoczna była niewielka, ale wyraźna zależność od długości łańcucha alkilowego. Co ciekawe, ich niejonowy analog **[NA][NIK]** wykazał przepuszczalność ($P_{app} = 5,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) niemal identyczną jak DFC-Na, co sugeruje, że w tym przypadku natura jonowa nie poprawiła ani nie pogorszyła znacząco transportu przez błonę modelową.

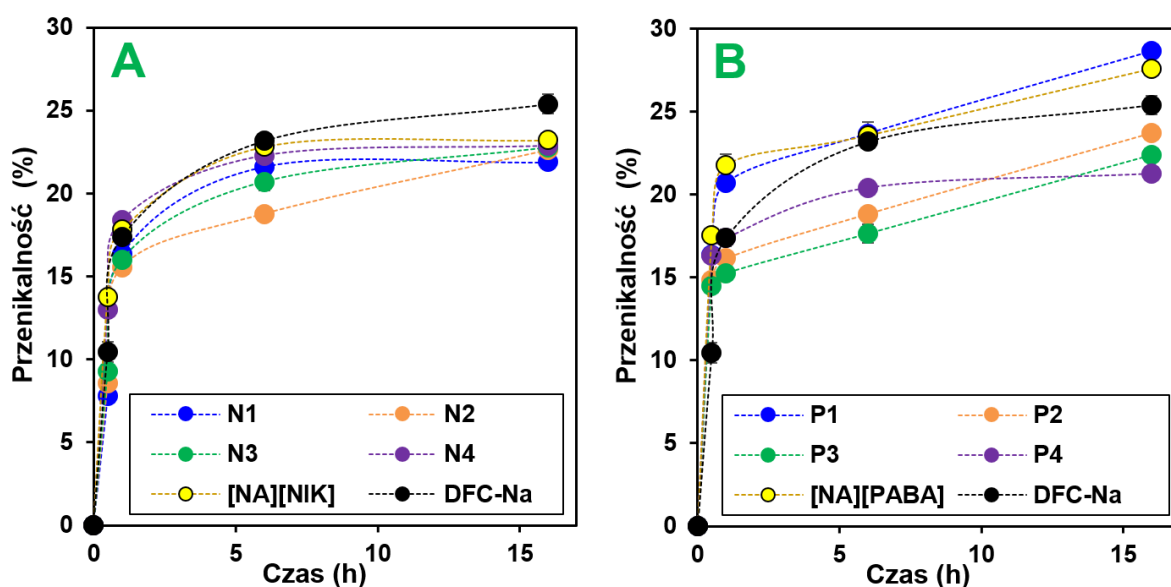


Rysunek 37. Współczynniki przepuszczalności badanych nikotynianów (**A**) i *p*-aminobenzoesanów (**B**) określone po 6 godzinach w porównaniu do DFC-Na; schemat ilustrujący zasadę i znaczenie testu PAMPA (**C**).

Z drugiej strony, *p*-aminobenzoesany (**P1–P4**) wykazywały wartości P_{app} w zakresie od $4,2 \cdot 10^{-6}$ do $6,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Należy zaznaczyć, że zarówno **P1**, jak i jego niejonowy analog **[NA][PABA]** przewyższały DFC-Na pod względem przepuszczalności, osiągając nieco wyższe wartości P_{app} , co wskazuje na korzystne zachowanie w transporcie błonowym w porównaniu z tym lekiem komercyjnym. Zaobserwowana zwiększona dyfuzja najprawdopodobniej wynika z optymalnej równowagi między polarnością a lipofilowością zapewnionej przez anion **PABA**. Wiedząc, że większość QASs, jak i ILs zazwyczaj charakteryzuje się bardzo niskim współczynnikiem przepuszczalności (P_{app} często znacznie poniżej $1 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$), testowane związki wykazują wyjątkowo wysoką przepuszczalność, znacznie przekraczającą początkowe oczekiwania. Przy wartościach P_{app} ponad 10–20 razy wyższych od typowych QASs i porównywalnych z wartościami zanotowanymi dla soli sodowej diklofenaku, cząsteczki te

stanowią grupę obiecujących kandydatów do dalszych badań *in vivo* na organizmach modelowych, takich jak szczury czy myszy.

Ocena kinetyki penetracji przy użyciu systemu PAMPA dostarcza nie tylko cennych informacji o zdolności związku do pokonywania barier biologicznych, ale także pozwala oszacować i porównać szybkość penetracji danych substancji w czasie. Uzyskane dane stanowią ważne ogniwo pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi i farmakokinetyką, wspierając wczesny wybór kandydatów o odpowiednim profilu biodostępności. Odpowiednie zmiany przenikalności w czasie dla badanych substancji i DFC-Na przedstawiono na rysunku 38 oraz w tabelach A17 i A20 w aneksie. Po 16 godzinach diklofenak sodowy (DFC-Na) wykazywał najwyższą przepuszczalność, na poziomie 25,4%, z utrzymującym się wzrostem w analizowanym zakresie czasowym. Spośród pochodnych kwasu nikotynowego najwyższe wartości odnotowano dla [NA][NIK] oraz soli N4, odpowiednio 23,2% i 22,3%, które były porównywalne z lekiem referencyjnym. Najniższą przepuszczalność w początkowej fazie zaobserwowano dla związku N2, szczególnie po 6 godzinach. Jednak jego absorpcja stopniowo wzrastała, osiągając po 16 godzinach poziom zbliżony do pozostałych związków (22,6%). Generalnie, wśród nikotynianów wartości przepuszczalności wykazywały szybki wzrost w pierwszej godzinie inkubacji, a następnie stabilizację po 6 godzinach, co może wskazywać na osiągnięcie stanu równowagi dyfuzyjnej. Różnice między wczesnymi i późnymi punktami czasowymi były istotne statystycznie ($p < 0,05$, tabela A18 w aneksie), natomiast brak istotności między okresami 6 i 16 godzin potwierdza wystąpienie *plateau*.



Rysunek 38. Kinetyka przepuszczalności w funkcji czasu dla badanych nikotynianów (A) i *p*-aminobenzoesanów (B) *N*-alkilnikotynamidu w stężeniu 1000 µg/mL.

Z drugiej strony, w przypadku większości pochodnych kwasu *p*-aminobenzoesowego zaobserwowano znaczące różnice między 6 a 16 godziną, co wskazuje na wolniejszą kinetykę

penetracji i opóźniony czas osiągnięcia stanu równowagi (rysunek 38B). Ta wolniejsza szybkość przenikania może wynikać z niższej lipofilowości, która utrudnia interakcje z modelową błoną. W tej grupie związków **[NA][PABA]** oraz pochodna z najkrótszym łańcuchem alkilowym (**P1**) wykazywały najwyższą przepuszczalność po 16 godzinach, osiągając odpowiednio 27,6% i 28,6%. Co istotne, były to jedyne układy wykazujące wyższą przepuszczalność niż lek referencyjny. Związek **P1** wykazywał wyższą przepuszczalność niż DFC-Na już w najwcześniejszym punkcie czasowym (0,5 h) i utrzymywał tę tendencję przez cały okres inkubacji. Natomiast najniższą przepuszczalność początkową zaobserwowano dla **P3** i **P4** (odpowiednio 14,5% i 16,3% po 0,5 h). Jednak wraz z upływem czasu wartości te wzrastały, osiągając 22,4% i 21,3% po 16 godzinach. Ogólnie rzecz biorąc, wszystkie pochodne kwasu *p*-aminobenzoowego wykazywały stopniowy wzrost przepuszczalności w czasie 16-godzinnej inkubacji, przy czym różnice między wczesnymi i późnymi punktami czasowymi były istotne statystycznie ($p < 0,05$, tabela A21 w aneksie).

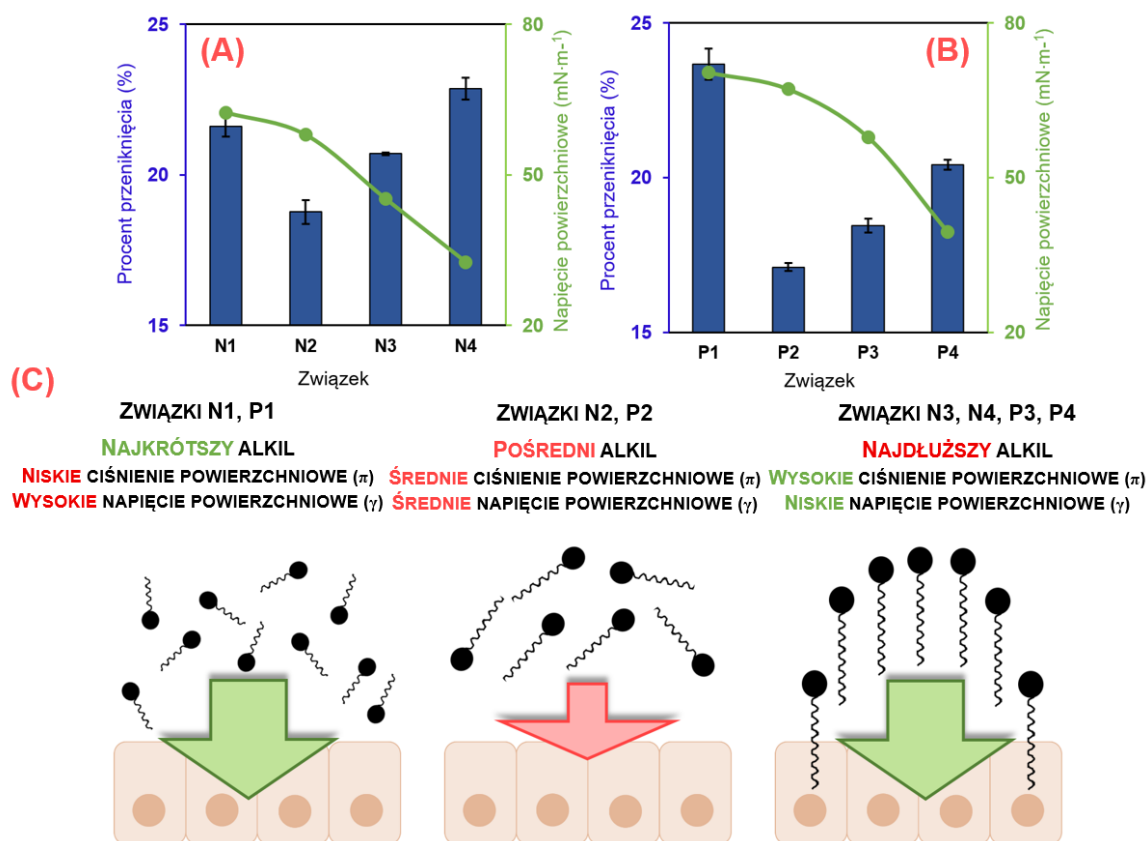
Pomimo niższych wartości współczynnika przenikania (P_{app}) obserwowanych dla serii nikotynianów (**N1–N4**) w porównaniu z odpowiadającymi im *p*-aminobenzoesanami (**P1–P4**), analiza kinetyki procesu ujawniła złożoną zależność między szybkością transportu a osiągnięciem stanu równowagi. Współczynnik przenikania, odzwierciedlający przede wszystkim początkową szybkość dyfuzji pasywnej, stanowi parametr kinetyczny opisujący transport przez membranę. Wyższe wartości P_{app} uzyskane dla pochodnych nikotynianów wskazywały na szybszą permeację w początkowym etapie eksperymentu w porównaniu z analogicznymi *p*-aminobenzoesanami. Należy jednak podkreślić, że współczynnik ten nie uwzględnia aspektu termodynamicznego procesu, związanego z osiągnięciem równowagi pomiędzy fazą donorową a akceptorową. W dłuższych czasach inkubacji *p*-aminobenzoesany wykazywały stopniowy i systematyczny wzrost permeacji, podczas gdy nikotyniany stosunkowo szybko osiągały stan *plateau*. Wskazuje to, że pomimo szybszej dyfuzji początkowej, związki zawierające anion **PABA** mogą ostatecznie osiągnąć wyższą ogólną szybkość przenikania. Dlatego w serii nikotynianów wszystkie związki, z wyjątkiem **N2**, osiągają równowagę, podczas gdy w serii *p*-aminobenzoesanów obserwuje się ciągły wzrost przenikalności. Z mechanicznego punktu widzenia można to wyjaśnić różnicami w długości łańcucha alkilowego, czynnikami sterycznymi i specyficzną interakcją między błoną a grupami funkcyjnymi obecnymi w wybranych anionach. W efekcie związki o dłuższych łańcuchach alkilowych wykazują szybszą dyfuzję początkową, szybko przenikają do fazy lipidowej i osiągają równowagę, co sprzyja szybkiemu osiągnięciu *plateau*, ale ogranicza ogólną przepuszczalność. Natomiast pochodne o krótszych łańcuchach alkilowych dyfundują początkowo wolniej, ale z czasem, z uwagi na mniejsze rozmiary cząsteczek, osiągają wyższą szybkość a tym samym wartość przenikalności.

Profile penetracji zależne od czasu analizowano przy użyciu różnych modeli kinetycznych w celu oceny ich przydatności do opisu przenikania przezskórnego wybranych QASs. Ze względu na brak wyraźnego obszaru stanu stacjonarnego i szybkie osiągnięcie *plateau*, klasyczne dopasowanie liniowe oparte na dyfuzji nie było możliwe do zastosowania dla wszystkich związków.²⁴⁹ Dlatego też zebrane dane poddano analizie przy użyciu modelu Higuchiego oraz nasyconego modelu wykładniczego (kinetyki pierwszego rzędu), przy czym niektóre modele zostały odrzucone (np. model Hixsona-Crowella, model Bakera-Lonsdale'a, model Weibulla) ze względu na to, że nie pasują do badanego układu, np. dotyczą zmiany powierzchni cząstki (rozpuszczania), zakładają macierz kulistą lub nie posiadają właściwej interpretacji fizycznej. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach A19 i A22 w aneksie. W przypadku układów zawierających *p*-aminobenzoesan (**P1–P4** i **[NA][PABA]**) model Higuchiego zapewnił znacznie lepsze dopasowanie ($R^2 = 0,88–0,99$), co sugeruje mechanizm przenikania kontrolowany dyfuzją. Natomiast związki na bazie nikotynianu (**N1**, **N3**, **N4** i **[NA][NIK]**), a także DFC-Na, zostały lepiej opisane przez model wykładniczy ($R^2 = 0,88–0,98$), co wskazuje na szybką początkową przenikalność, a następnie szybkie osiągnięcie równowagi. Ponadto, aby umożliwić porównanie ilościowe, wyznaczono początkową szybkość przenikania (v_0) i *plateau* przenikania (Q_p) (tabele A19 i A22 w aneksie). Nikotyniany (**N1–N4**) wykazywały istotnie wyższe początkowe szybkości przenikania ($10,8–17,1\% \cdot h^{-1}$) w porównaniu do ich analogów z *p*-aminobenzoesanem (**P1–P4**) ($1,6–8,2\% \cdot h^{-1}$), co wskazuje na szybszy transport błonowy. Co ważne, związki **N1** i **N2** wykazywały wyższe szybkości przenikania niż referencyjny DFC-Na ($13,8\% \cdot h^{-1}$), co sugeruje ich potencjał do efektywnego przenikania przezskórnego. Wyniki te pokazują także, że natura przeciwwjonu w czwartorzędowych solach amoniowych ma silny wpływ zarówno na kinetykę, jak i mechanizm przenikania.

Analizy przeprowadzone w ostatnich latach w systemie PAMPA dotyczące przepuszczalności cieczy jonowych na bazie gliklazydu wykazały ich wysoką zdolność do przenikania przez błony biologiczne. Uzyskane wartości współczynnika przepuszczalności wynosiły od $1,2 \cdot 10^{-6}$ do $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, spełniając kryteria stosowane dla substancji przeznaczonych do podawania doustnego.⁴⁶ Wyniki te potwierdzają potencjał gliklazydu jako związku jonowego o korzystnym profilu biodostępności, podobnym do związków badanych w niniejszym opracowaniu. Natomiast badania przepuszczalności oligosacharydów (agarobiozy i agaroheksozy) w modelu komórek ludzkich wykazały znacznie niższe wartości P_{app} , wynoszące od $0,2$ do $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.²⁵⁰ Ich ograniczona zdolność do przekraczania barier biologicznych ponownie potwierdza głęboki wpływ struktury molekularnej na procesy transportowe i motywuje do głębszego zbadania tego typu podstawowych mechanizmów.

7.2.1.9. Napiecie powierzchniowe (γ) i ciśnienie powierzchniowe (π)

Aktywność powierzchniowa soli **N1–N4** oraz **P1–P4** została oceniona poprzez pomiar napięcia powierzchniowego ich roztworów wodnych. Następnie ich właściwości powierzchniowe zostały bezpośrednio porównane z wcześniej zebranymi danymi dotyczącymi przepuszczalności. Jak ukazano na rysunku 39A i 39B oraz w tabeli A23 w aneksie, procentowa przepuszczalność QASs na z anionem nikotynianu (**N1–N4**) wynosiła od 17,1% do 23,7%. Najwyższe wartości zaobserwowano dla soli **N4** z najdłuższym łańcuchem alkiowym (22,9%). Wśród serii *p*-aminobenzoesanów (**P1–P4**) związek z najkrótszym podstawnikiem wykazywał wyższą przepuszczalność (23,7%). Co ciekawe, w obu grupach zaobserwowano wyraźny spadek przepuszczalności w przypadku QASs z łańcuchem oktylowym (**N2** i **P2**), które wykazywały najniższe wartości, wynoszące odpowiednio 18,8% i 17,1%. Spadek ten był szczególnie wyraźny w serii *p*-aminobenzoesanów, co sugeruje, że wzrost masy cząsteczkowej może ograniczać dyfuzję poprzez zmniejszenie ruchliwości cząsteczek w fazie lipidowej. Natomiast w przypadku soli anionem nikotynianu efekt ten wydaje się być częściowo kompensowany przez zwiększoną aktywność powierzchniową, która ułatwia interakcję z błoną i sprzyja pasywnej dyfuzji przez warstwę lipidową, co zobrazowano na rysunku 39C.



Rysunek 39. Korelacja między współczynnikiem przepuszczalności (po 6 godzinach) a napięciem powierzchniowym dla nikotynianów (**N1–N4**) (**A**) oraz i *p*-aminobenzoesanów (**P1–P4**) (**B**); koncepcja wyjaśniająca wpływ długości łańcucha alkiowego na przepuszczalność QASs przez błony biologiczne (**C**).

Według literatury, zwiększenie przepuszczalności błon biologicznych może być związane z wartością ciśnienia powierzchniowego środków powierzchniowo czynnych na poziomie zbliżonym do $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ lub wyższym.²⁵¹ Ze względu na różnice w długości łańcucha alkilowego, obliczone wartości ciśnienia powierzchniowego (π) dla badanych QASs mieściły się w zakresie od 1,2 do $39,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (tabela A23 w aneksie). Zebrane dane wykazały, że trzy związki zawierające 10 i 12 atomów węgla (**N3**, **N4** oraz **P4**) spełniają ten wymóg. Natomiast związki zawierające krótsze grupy alkilowe wykazywały ciśnienie powierzchniowe poniżej tego progu ($\pi = 1,2\text{--}13,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), co wskazuje na nieistotny lub minimalny wpływ na przepuszczalność przez błony biologiczne.

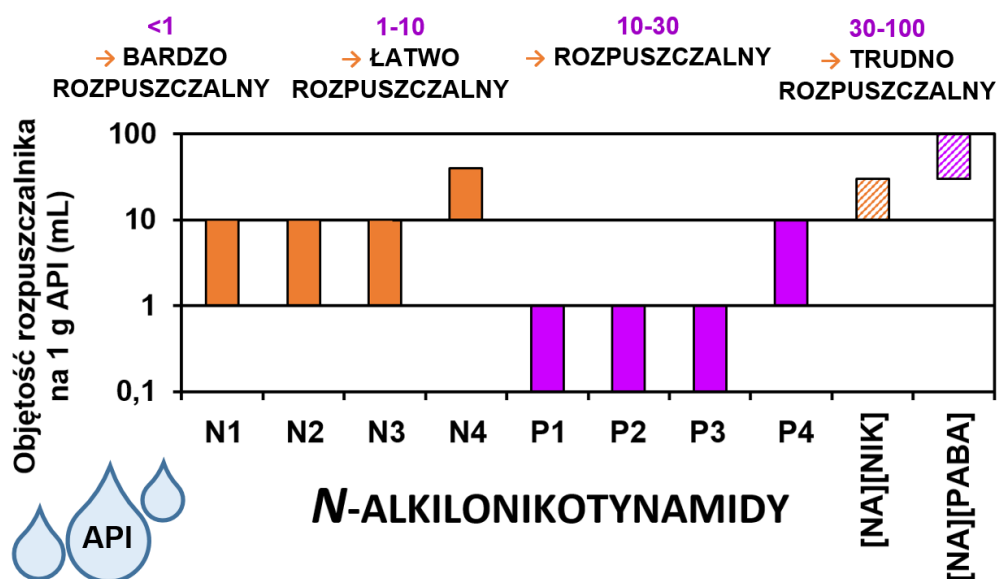
Należy również podkreślić, że odkryto korelację między masą molową a przepuszczalnością badanych QASs. Ogólnie rzecz biorąc, wzrost masy molowej wiąże się ze spadkiem przepuszczalności, co jest zgodne z klasycznym rozumieniem, że większe cząsteczki dyfundują wolniej przez błony biologiczne. Badania przepuszczalności jelitowej oligosacharydów agarozowych przeprowadzone przy użyciu modeli komórek Caco-2 wykazały zależny od czasu wzrost stężenia w osoczu, z odwrotną korelacją między poziomami w osoczu a masą cząsteczkową.^{250,252} Podobne badania wpływu masy cząsteczkowej na wchłanianie doustne cząsteczek chitozanu rozpuszczalnego w wodzie, przeprowadzone zarówno na komórkach ludzkich, jak i szczurach, potwierdziły te obserwacje, wykazując, że wzrost masy cząsteczkowej ma negatywny wpływ na wchłanianie doustne.²⁵³ Odkrycia te podkreślają, że chociaż masa cząsteczkowa generalnie ogranicza przepuszczalność związków chemicznych, właściwości powierzchniowo czynne mogą modulować tę zależność, prowadząc do zwiększonego wchłaniania w określonych warunkach. Dlatego też analizy z wykorzystaniem zsyntezowanych QASs dowiodły, że po osiągnięciu aktywności powierzchniowej przepuszczalność wzrasta pomimo rosnącej masy molowej. Zjawisko to można przypisać zdolności cząsteczek powierzchniowo czynnych do zmniejszania napięcia międzyfazowego, co ułatwia transport przez bariery nabłonkowe. Co ciekawe, w takich przypadkach wpływ aktywności powierzchniowej może przeciwdziałać ograniczeniom dyfuzji związanym z rozmiarem, prowadząc do zwiększonej przepuszczalności.

Amfifilowe QASs zyskują zdolność do lizy komórek mikrobiologicznych, dlatego też dłuższe łańcuchy alkilowe mogą być również korzystne w projektowaniu nowych antybiotyków podawanych doustnie, charakteryzujących się wystarczającą przepuszczalnością w organizmie. Jednak wszelka potencjalna toksyczność dla ludzi musi być starannie wyważona przy wyborze długości łańcucha alkilowego, aby zmaksymalizować proces dostarczania leku, jednocześnie minimalizując potencjalną cytotoksyczność. W tym kontekście projektowalność QASs nadal otwiera wszechstronne możliwości optymalizacji biodostępności, przepuszczalności błonowej

i ukierunkowanych profili farmakologicznych, co sugeruje, że nie należy ich pomijać czy lekceważyć w przyszłych badaniach nad odkrywaniem nowych leków doustnych.

7.2.1.10. Rozpuszczalność badanych soli i układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH

Wyniki pomiarów rozpuszczalności nikotynianów *N*-alkilnikotynamidu (**N1–N4**), *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilnikotynamidu (**P1–P4**) oraz układów **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]** w czystej wodzie destylowanej, uważanej za podstawową właściwość fizykochemiczną potencjalnych leków, podsumowano na rysunku 40 (oraz w tabeli A24 w aneksie). Dodatkowe dane dotyczące rozpuszczalności w symulowanym płynie żołądkowym (SGF, pH = 1,2; środowisko kwaśne imitujące warunki żołądka) oraz w buforze fosforanowym (PBS, pH = 7,4; warunki fizjologiczne), jak i klasy rozpuszczalności według Farmakopei przedstawiono w tabelach A24-A25 w aneksie.



Rysunek 40. Rozpuszczalność nikotynianów *N*-alkilnikotynamidu (**N1–N4**), *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilnikotynamidu (**P1–P4**) oraz układów **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]** w wodzie destylowanej.

Wszystkie związki o budowie jonowej (**N1–N4** i **P1–P4**), niezależnie od anionu, wykazywały najwyższą rozpuszczalność w wodzie i najniższą w SGF. Łańcuch alkilowy miał ograniczony wpływ na rozpuszczalność, a wyraźniejszy efekt zaobserwowano jedynie w przypadku pochodnej dodecylowej, dla której odnotowano obniżenie klasy rozpuszczalności o jeden stopień. Ogólnie rzecz biorąc, sole z anionem *p*-aminobenzoesanu (**P1–P4**) wykazywały lepszą rozpuszczalność we wszystkich badanych mediach, osiągając nawet kategorię „Bardzo rozpuszczalny”, stanowiącą najwyższą klasę rozpuszczalności. Co ciekawe, w porównaniu z kwasami wyjściowymi (**NIK** i **PABA**), rozpuszczalność syntetyzowanych QASs wzrosła w wodzie około 10-krotnie dla **N1–N3** i aż 1000-krotnie dla **P1–P3**.^{254,255} Jednak tak wyraźnej

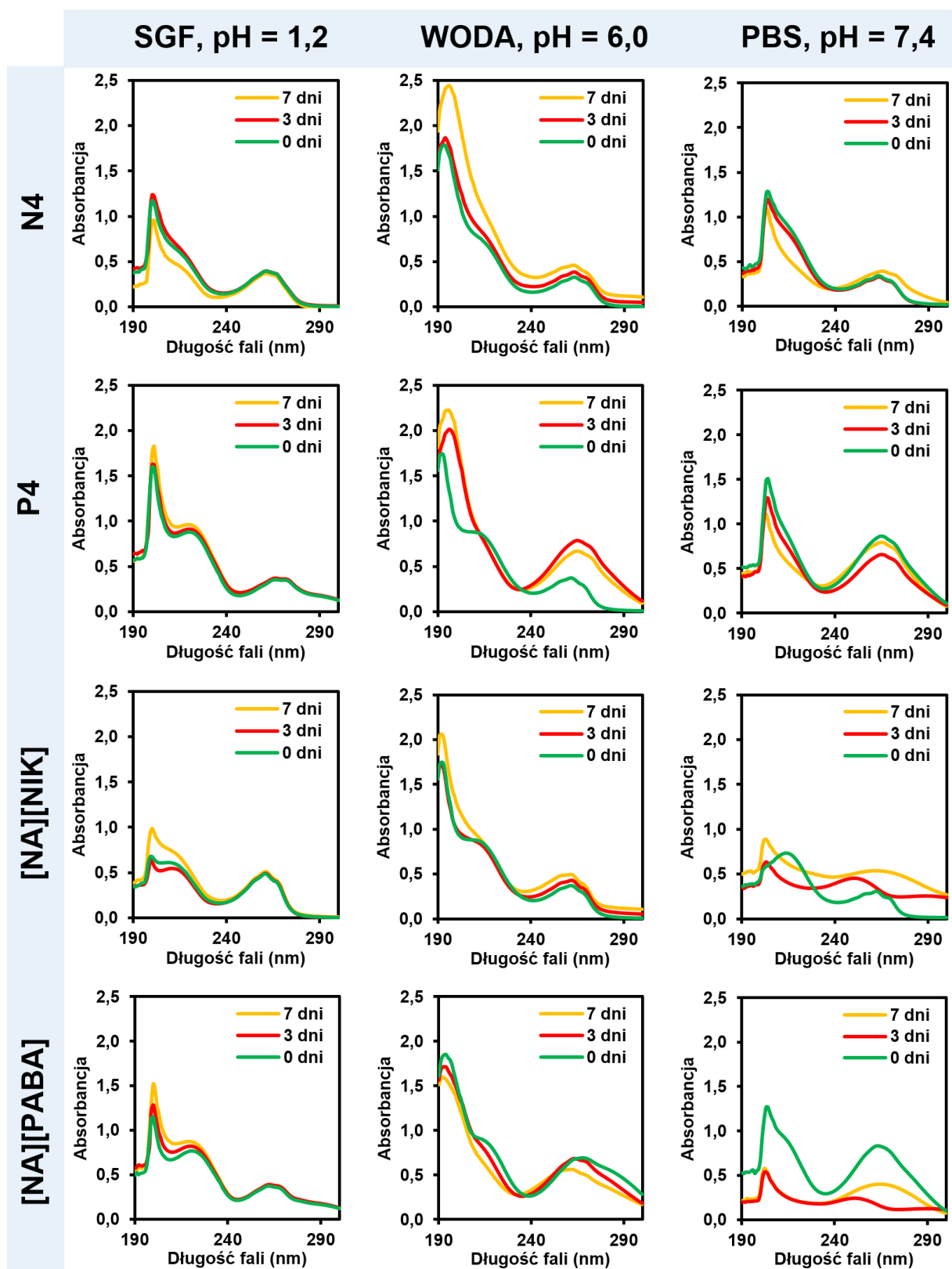
poprawy nie zaobserwowano w przypadku [NA][NIK] oraz [NA][PABA]. W efekcie niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika [NA][NIK] pozostawał jedynie „Rozpuszczalny”, podczas gdy [NA][PABA] został sklasyfikowany jako „Słabo rozpuszczalny”. Choć związki niejonowe nie zawierały łańcucha alkilowego, który zazwyczaj wiąże się ze wzrostem hydrofobowości, nie wykazywały one oczekiwanych poziomów rozpuszczalności. W związku z tym istotną zaletą QASs jest możliwość poprawy rozpuszczalności w wodzie, a tym samym potencjalnej biodostępności.

Wyniki te pokazują, że rozpuszczalności nie można przewidzieć wyłącznie na podstawie charakteru jonowego lub długości łańcucha alkilowego. Podkreślają one potrzebę głębszego zrozumienia czynników wpływających na powinowactwo do wody, wykraczających poza czystą hydrofobowość.

7.2.1.11. Stabilność badanych soli i układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH

W celu oceny stabilności syntetyzowanych QASs, zbadano zachowanie najbardziej aktywnych związków zawierających grupę dodecyłową w kationie (**N4** oraz **P4**) w różnych wartościach pH, a wyniki porównano z niejonowymi układami [NA][NIK] oraz [NA][PABA]. Wyniki przedstawione na rysunku 41 pozwalają ustalić, że badane związki były najbardziej stabilne w SGF (pH = 1,2). Zmiany w ich widmach były najmniejsze, a przy $\lambda_{\max} = 261\text{--}266\text{ nm}$ absorbancja zmieniła się jedynie o około 5% po 7 dniach. Co ciekawe, sole **N4** i **P4** były bardziej stabilne w porównaniu z analogicznymi układami niejonowymi. Świadczy to o tym, że proponowana strategia API-QAS przynosi dodatkowe korzyści z punktu widzenia stabilności nowego leku, który powinien być odpowiednio wchłaniany w organizmie, aby wykazywać działanie terapeutyczne.

Badanie przeprowadzone w wodzie dejonizowanej dało interesujące wyniki, sugerujące tendencję analogiczną do tej zaobserwowanej w SGF. Jednak ze względu na podobieństwo wartości pH spodziewano się jedynie niewielkich różnic między testami w wodzie oraz PBS. Niemniej jednak w wodzie dejonizowanej zmiany w zebranych widmach UV były bardziej wyraźne w porównaniu z SGF. W tym rozpuszczalniku sole **N4** i **P4** były mniej stabilne niż mieszaniny, co przejawiało się znacznym wzrostem absorbancji przy $\lambda_{\max}$ i w jej pobliżu. Odmienny efekt zaobserwowano natomiast w testach w PBS (pH = 7,4). Okazało się, że sole **N4** i **P4** były wielokrotnie mniej podatne na rozkład w porównaniu z [NA][NIK] i [NA][PABA], co przejawiało się znacznymi zmianami w widmach UV. W przeciwieństwie do QASs, ich początkowe sygnały zmniejszały się lub zwiększały nawet o 75% w porównaniu z początkową absorbancją przy $\lambda_{\max}$.



Rysunek 41. Stabilność nikotynianu *N*-dodecylnikotynamidu (**N4**), *p*-aminobenzoesanu *N*-dodecylnikotynamidu (**P4**), oraz układów **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]** w roztworach wodnych o różnym pH.

Ogólnie rzecz biorąc, przy wartościach pH imitujących płyny ustrojowe zmiany absorbancji przy $\lambda_{\max}$ dla QASs pozostawały w granicach 40%, podczas gdy dla **[NA][NIK]**

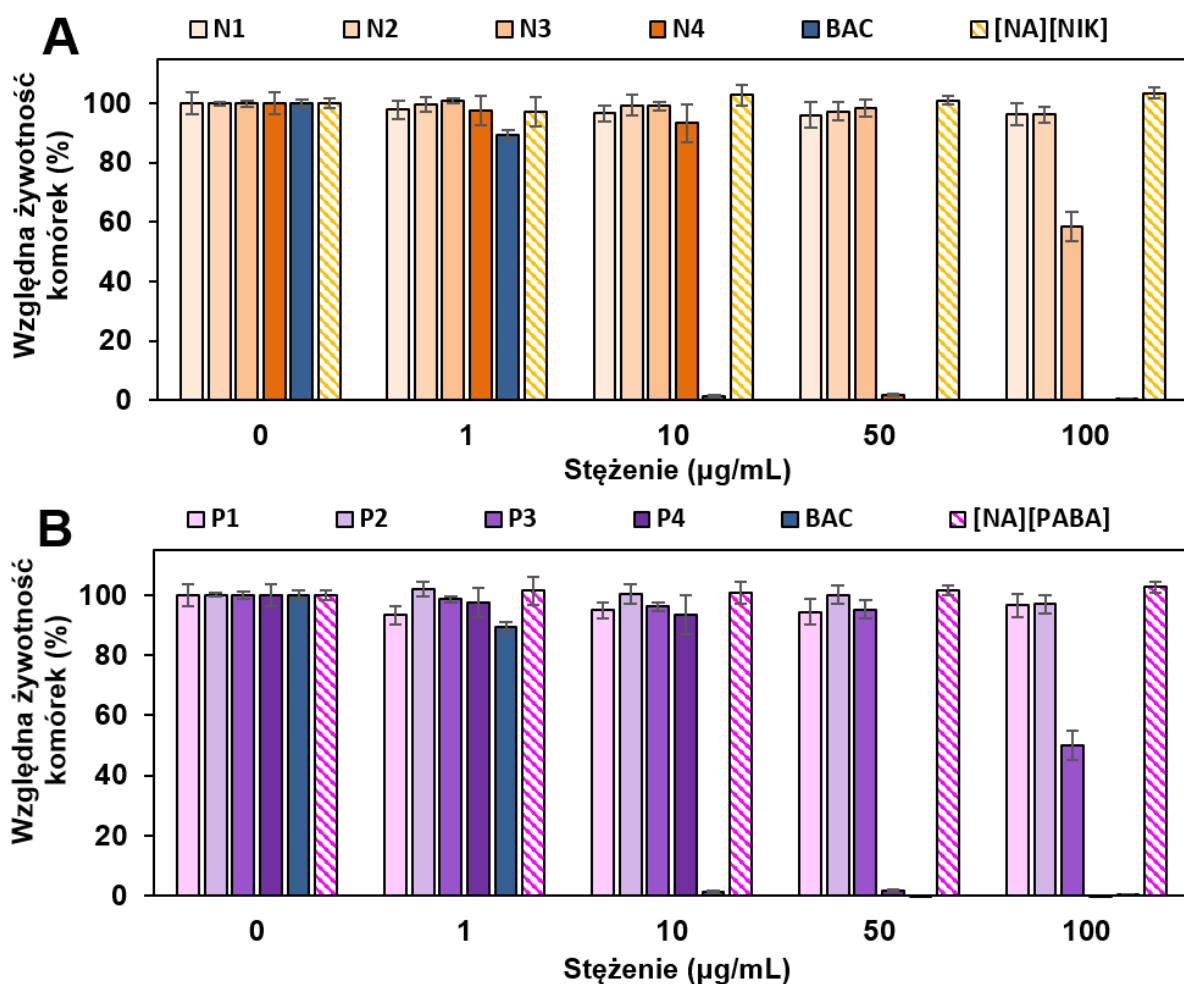
i **[NA][PABA]** różnice osiągnęły odpowiednio 75% i 52%. Wskazuje to jednoznacznie, że sole organiczne są bardziej obiecującą formą leku w porównaniu z ich niejonowymi odpowiednikami.

Dane literaturowe dotyczące stabilności DFC-Na przy pH 5, 6, 7 i 8 w temperaturze 45 °C wskazują, że lek ten wykazuje wysoką stabilność w zastosowanych warunkach badawczych. Obliczone okresy półtrwania rozkładu wynosiły od 107 do 178 dni, przy czym najbardziej stabilny roztwór uzyskano dla pH równego 5.²⁵⁶ Inne badania skupiały się na analizie szybkości hydrolizy **NA** w zakresie pH 0,4–11,3, wykazując, że szybkość jego rozkładu zależy liniowo od jego stężenia. Co ciekawe, **NA** wykazuje największą stabilność i najwolniejszy rozkład przy pH 4,5–6. W tym zakresie jego okres półtrwania w temperaturze 89,4 °C wynosił około 1000 dni.²⁵⁷ Kolejne doniesienia wykazały, że estry alkilowe kwasu nikotynowego, *N*-heksylowego i *N*-oktylowego pozostają stabilne w buforze o pH 7,4 w temperaturze 37 °C, nie wykazując oznak hydrolizy nawet po pięciu tygodniach.²⁵⁸ Jednak perfluorowany ester heksylowy kwasu nikotynowego i perfluorowany ester oktylowy kwasu nikotynowego ulegają szybkiemu rozkładowi w temperaturze 60 °C, rozpadając się w ciągu zaledwie 45 minut.²⁵⁹ QASs w niniejszym badaniu były mniej stabilne niż czysty **NA** lub niektóre jego analogi, jednak biorąc pod uwagę proponowaną drogę podania doustnego, powinny one wykazywać wystarczającą stabilność w soku żołądkowym. W połączeniu z ich wysoką aktywnością terapeutyczną i wielofunkcyjnością, która pozwala na stosowanie bardzo małych dawek, związki te przejawiają się jako obiecujące nowe API.

7.2.1.12. Określenie cytotoksyczności wobec ludzkich komórek jelitowych

Cytotoksyczność badanych związków (**N1–N4** oraz **P1–P4**, **[NA][NIK]** lub **[NA][PABA]**) oraz referencyjnego środka farmaceutycznego z grupy QASs – chlorku benzalkoniowego (BAC), oceniono przy użyciu ludzkiej linii komórek nabłonkowych jelita cienkiego HIEC-6. Uzyskane wyniki połowy stężenia hamującego (IC₅₀) przedstawiono na rysunku 42 (dokładne wartości IC₁₀, IC₅₀ i IC₉₀ podano w tabeli A26 w aneksie). Zebrane dane ujawniły wyraźne różnice w cytotoksyczności w całej serii związków, przy czym długość łańcucha alkilowego okazała się głównym czynnikiem determinującym. Stwierdzono, że związki pozbawione łańcucha alkilowego w kationie, **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]**, nie są cytotoksyczne, a wartości IC₅₀ przekraczające 5 800 µg/mL podkreślają ich wewnętrzną biokompatybilność. QASs o najkrótszych łańcuchach alkilowych (**N1** i **P1**) wywoływały porównywalne efekty w ludzkich komórkach jelitowych, z wartościami IC₅₀ oszacowanymi na poziomie około 5 200 i 6 400 µg/mL. Wskazuje to na doskonałą tolerancję komórek nabłonka jelitowego po ekspozycji na wszystkie te wymienione substancje niejonowe i jonowe. Zauważono jednak, że wydłużenie łańcucha alkilowego do ośmiu atomów węgla spowodowało silniejszy wpływ na żywotność komórek

jelitowych, o czym świadczą wartości IC_{50} wynoszące około 740–780 $\mu\text{g/mL}$ dla **N2** i **P2**. Niemniej jednak wartości te można uznać za wysokie, co wskazuje na znaczny margines bezpieczeństwa w warunkach związanych z ekspozycją jelitową po podaniu doustnym.



Rysunek 42. Względna żywotność komórek wobec nikotynianów: (**N1–N4**) i **[NA][NIK]** (**A**) oraz *p*-aminobenzoesanów: (**P1–P4**) i **[NA][PABA]** (**B**) w porównaniu z dostępnym w handlu farmaceutykiem (BAC).

W obu seriach homologicznych zaobserwowano wyraźną zależność między strukturą a aktywnością, zgodnie z którą wydłużenie łańcucha alkilowego powodowało zwiększenie cytotoksyczności. Efekt ten ma charakter logarytmiczny, a wartości $\log IC_{50}$ silnie maleją wraz z wydłużaniem się łańcucha. W rezultacie związki z łańcuchem decylowym (**N3** i **P3**) wykazywały wartości IC_{50} wynoszące odpowiednio około 150 i 100 $\mu\text{g/mL}$. Odkrycia te wskazują na zwiększone oddziaływanie z błoną komórkową, któremu towarzyszy zmniejszona żywotność komórek przy niższych stężeniach, co jest zgodne z wcześniej obserwowaną aktywnością przeciwbakteryjną. Ostatecznie pochodne z najdłuższą grupą alkilową zostały zidentyfikowane jako najbardziej cytotoksyczne, z wartościami IC_{50} wynoszącymi 20,1 $\mu\text{g/mL}$ (**N4**) i 15,0 $\mu\text{g/mL}$ (**P4**). Zebrane wyniki wskazują również, że przeciwjon miał jedynie niewielki wpływ na cytotoksyczność. W przypadku odpowiednich homologów sole z anionem **PABA** wykazywały

nieco niższe wartości IC_{50} niż analogi zawierające nikotynian, chociaż różnice te można uznać za marginalne w porównaniu z dominującym wpływem wydłużenia łańcucha alkilowego.

Warto zauważyć, że referencyjny chlorek benzalkoniowy (BAC), stosowany w wielu preparatach farmaceutycznych wymienionych w tabeli A27 (w aneksie), wykazał znaczną cytotoksyczność wobec komórek HIEC-6, z wartością IC_{50} wynoszącą 1,97 $\mu\text{g/mL}$. Należy zauważyć, że wartości IC_{50} wyznaczone dla chlorku cetylopirydyniowego (CPC) były podobne i wynosiły od 0,63 do 0,99 $\mu\text{g/mL}$ w komórkach raka wątrobowokomórkowego (HCC), podczas gdy w komórkach normalnych parametr ten wynosił 2,42–3,00 $\mu\text{g/mL}$.²⁶⁰ Co istotne, nawet najbardziej cytotoksyczne sole na bazie nikotynamidu (**N4** i **P4**) były mniej więcej o rząd wielkości mniej toksyczne niż BAC, podczas gdy analogi krótko- i średniołańcuchowe wykazywały wartości IC_{50} o kilka rzędów wielkości wyższe, co wskazuje na znacznie niższą cytotoksyczność zaprojektowanych QASs. To porównanie wskazuje na korzystniejszy profil bezpieczeństwa badanych soli w odniesieniu do klasycznych czwartorzędowych surfaktantów amoniowych. Chociaż podwyższona cytotoksyczność obserwowana dla związków **N4** i **P4** sugeruje ograniczenia w ich zastosowaniu ogólnoustrojowym (doustnym), pochodne z łańcuchem dodecyłowym nadal mogą stanowić grupę obiecujących kandydatów do zastosowań miejscowych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, analogicznie do preparatów zawierających BAC czy CPC.

7.2.1.13. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (*Artemia franciscana*)

Aby kompleksowo ocenić toksyczność nikotynianów (**N1–N4**) i *p*-aminobenzoetanów (**P1–P4**) *N*-alkilnikotynamidu oraz ich potencjalny wpływ na środowisko, przeprowadzono badania ekotoksyczności wobec słonowodnych skorupiaków z gatunku *A. franciscana*. Wyniki dla wszystkich zsyntezowanych związków przedstawiono w tabeli 5. Wyznaczone wartości EC_{50} jednoznacznie wskazują, że niemal wszystkie analizowane sole wykazują łagodny efekt toksyczny wobec badanego organizmu, co sugeruje ich stosunkowo niską szkodliwość w badanych warunkach eksperymentalnych. W badanej serii związków sól **N1**, zawierająca najkrótszy łańcuch alkilowy (heksyłowy), została sklasyfikowana jako „Stosunkowo nieszkodliwa”. Najwyższą toksyczność odnotowano natomiast dla soli **N4** z łańcuchem dodecyłowym, którą zaklasyfikowano jako „Słabo toksyczną”. Wyniki te wskazują na zależność między długością łańcucha alkilowego a wzrostem toksyczności w obrębie serii nikotynianów (**N1–N4**) wobec *A. franciscana*.

Tabela 5. Ekotoksyczność nikotynianów (**N1–N4**) i *p*-aminobenzoesanów (**P1–P4**) *N*-alkilnikotynamidu oraz układów **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]** wobec *A. franciscana*.

Związek	EC ₅₀ (mg/L)	Zakres klasy (mg/L)	Klasa ^a
N1	>1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
N2	187,7±3,7	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
N3	168,5±7,5	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
N4	97,2±5,5	10-100	Słabo toksyczny
P1	677,8±9,7	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
P2	342,9±3,1	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
P3	316,7±1,4	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
P4	123,1±4,9	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
[NA][NIK]	593,9±3,3	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
[NA][PABA]	744,4±8,3	100-1000	Praktycznie nietoksyczny

^a zgodnie ze skalą oceny toksyczności ostrej opracowaną przez Fish and Wildlife Service.

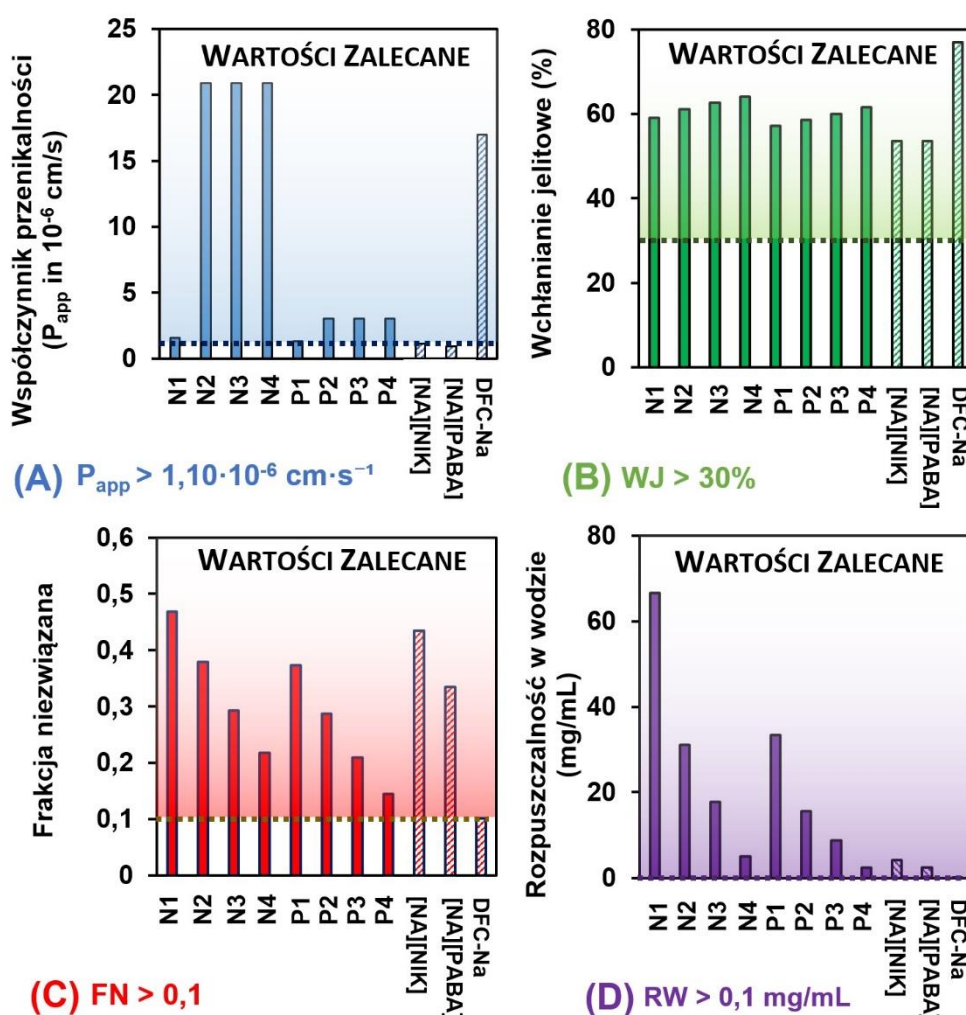
W przypadku pochodnych zawierających anion *p*-aminobenzoesanowy (**P1–P4**) nie zaobserwowano analogicznej tendencji, a wszystkie związki sklasyfikowano jako „Praktycznie nietoksyczne”. Uzyskane wyniki wskazują na istotną zaletę koncepcji API-QAS w porównaniu z układami niejonowymi, takimi jak **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]**. Wprowadzenie dłuższego łańcucha alkilowego do struktury nikotynamidu może sprzyjać zwiększeniu aktywności biologicznej przy jednoczesnym ograniczonym wpływie na toksyczność wobec modelowego organizmu wodnego.

Badania toksyczności analogicznych soli jonowych złożonych z kationów *N*-alkilnikotynamidu i anionu salicylanowego (**S1–S7**), opisane w pkt. 7.3.1.9., wykazały zbliżoną tendencję i sól z długim łańcuchem alkilowym (dodecyłowym) została także sklasyfikowana jako „Słabo toksyczna”. Ponadto kokryształ nikotynamidu i kwasu salicyłowego **[NA][SAL]**, podobnie jak **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]**, również został sklasyfikowany jako „Praktycznie nietoksyczny”, co ukazuje niewielki wpływ tych niejonowych układów na organizmy *A. franciscana*.

7.2.1.14. Predykcja ADME

W celu oceny potencjału farmakokinetycznego badanych związków przeprowadzono predykcje właściwości ADME (ang. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*), obejmujących kluczowe etapy losów substancji w organizmie. Analizie poddano parametry istotne z punktu widzenia podania doustnego, takie jak przepuszczalność, wchłanianie w jelicie ludzkim, frakcja niezwiązana oraz rozpuszczalność w wodzie. Wyniki obliczeń dla związków **N1–N4** oraz **P1–P4**, wraz z odniesieniem do soli sodowej diklofenaku (DFC-Na), przedstawiono na rysunku 43 oraz w tabeli A28 (w aneksie). Uzyskane dane pozwalają na wstępną ocenę potencjału badanych QASs jako kandydatów do doustnych form leków. Zgodnie z danymi

przedstawionymi na rysunku 46A, przepuszczalność okazała się najtrudniejszym parametrem w ocenie potencjału QASs jako leków doustnych. Sole **N3** i **N4** wykazywały wysokie współczynniki przepuszczalności (P_{app}), około $21 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, co wskazuje na ich istotnie wyższą przepuszczalność w porównaniu ze związkiem odniesienia – DFC-Na ($P_{app} = 17 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$). To wyraźnie wskazuje na wysoką zdolność niektórych QASs do pokonywania barier biologicznych i potencjalnie lepszą biodostępność niż komercyjnie dostępne leki o budowie jonowej.



Rysunek 43. Obliczone wartości przepuszczalności (A), wchłaniania w jelicie ludzkim (B), frakcji niezwiązanej (C) i rozpuszczalności w wodzie (D) dla badanych związków i DFC-Na. Strefy oznaczone kolorem wskazują minimalny próg, przy którym kandydat może zostać uznany za potencjalnie skuteczny lek.^{46,173,181–183}

Długość łańcucha alkilowego okazała się mieć istotne znaczenie, szczególnie w przypadku QASs o długości łańcucha zawierającej co najmniej 10 atomów węgla, co skutkowało wyraźnym wzrostem przepuszczalności dla obu badanych anionów. Należy jednak podkreślić, że intensywność wzrostu przepuszczalności silnie zależy od rodzaju anionu. W konsekwencji *p*-aminobenzoesany z 10 i 12 atomami węgla w ugrupowaniu alkilowym nie osiągnęły

tak wysokich wartości P_{app} (około $3 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) jak w przypadku nikotynianów. Co godne uwagi, związki o krótszych łańcuchach alkilowych (**N1**, **P1** i **P2**) wykazywały istotnie niższe wartości P_{app} , wahające się od 1,3 do $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, co służy jako wskaźnik potencjalnie ograniczonej przepuszczalności. Wartości P_{app} dla niejonowych **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]** są najniższe ($1,1$ i $0,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$), co podkreśla fakt, że jonowość związku ma również wpływ na obliczenia *in silico* dotyczące przepuszczalności. Analiza wchłaniania jelitowego (WJ), która koreluje biodostępność leku z jego potencjalną skutecznością po podaniu doustnym, ujawniła umiarkowane różnice między badanymi związkami. Jak wykazano na rysunku 43B, najwyższe wartości zaobserwowano dla związków **N3** i **N4** (61,9 i 63,0%), które miały również najwyższą przepuszczalność błonową (P_{app}), co sugeruje synergistyczny efekt cech strukturalnych, które promują zarówno przepuszczalność, jak i wchłanianie. Niższe wartości odnotowano dla związków niejonowych: **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]** (53,6%), podczas gdy DFC-Na posiadał najwyższy wskaźnik wchłaniania (77,0%), potwierdzając swoją wysoką skuteczność farmakokinetyczną. Ogólnie rzecz biorąc, WJ wzrastało wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Odwrotną tendencję zaobserwowano dla frakcji niezwiązanej (FN, rysunek 43C), która wykazywała tendencję spadkową wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Wysokie wartości FN są uważane za korzystne, ponieważ wskazują, że znaczna część związku pozostaje farmakologicznie aktywna, umożliwiając skuteczną dystrybucję i interakcję docelową, przy jednoczesnym zachowaniu akceptowalnego profilu farmakokinetycznego. Najwyższą wartość FN zaobserwowano dla **N1** (0,50), co sugeruje, że prawie połowa cząsteczek pozostaje w postaci wolnej, potencjalnie dostępnej farmakologicznie. Stosunkowo wysokie wartości osiągnięto również dla **N2** (0,42), **P1** (0,41) i **[NA][NIK]** (0,43), co może również sprzyjać szybszemu rozpoczęciu działania i większej dystrybucji w tkankach. Natomiast **N3** i **N4**, które miały najwyższą przepuszczalność, wykazały istotnie niższe wartości FN (0,34 i 0,25), co sugeruje silniejsze wiązanie z białkami osocza. Co ciekawe, jeszcze niższe wartości odnotowano dla DFC-Na (0,10), co wskazuje na zmniejszenie frakcji wolnej, a tym samym potencjalny wpływ na dostępność farmakologiczną, co może być niepokojące, biorąc pod uwagę jego powszechne zastosowanie we współczesnej farmakologii. Zaobserwowane różnice wskazują, że pomimo wysokiej przepuszczalności niektórych związków, ich skuteczność systemowa może być modulowana przez stopień wiązania z białkami. Jak przedstawiono na rysunku 46D, najwyższą rozpuszczalność w wodzie wykazała sól **N1**, sięgającą 141 mg/mL. Najniższe rozpuszczalności odnotowano jednak dla **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]**, a co zaskakujące, także dla DFC-Na, z wartościami około 4,1, 2,4 i 0,0055 mg/mL.

Ogólnie rzecz biorąc, zaobserwowane tendencje wskazują, że wydłużenie łańcucha alkilowego zwiększa przepuszczalność błony i zmniejsza rozpuszczalność w wodzie. Należy również podkreślić, że wszystkie badane związki charakteryzowały się wartościami TPSA (topologicznej powierzchni polarnej) w zakresie uważanym za korzystny dla związków o dobrej biodostępności doustnej ($\leq 140 \text{ \AA}^2$), sięgającej nawet 90% (tabela A28 w aneksie).²⁶¹ TPSA dla analizowanych substancji mieściły się w zakresie od 99,9 do 119,3 $\text{\AA}^2$, co wyraźnie wskazuje na ich umiarkowaną polarność i zdolność do skutecznego przenikania przez błony biologiczne. Ponadto umiarkowana wartość TPSA sprzyja równowadze między rozpuszczalnością w wodzie a lipofilowością, co jest istotne w przypadku podawania doustnego. W konsekwencji analizowane związki wykazują znaczny potencjał aplikacyjny, co potwierdza ich atrakcyjność jako kandydatów do dalszych badań farmakokinetycznych i farmakodynamicznych.

Fluorowane pirydyniowe ciecze jonowe funkcjonalizowane zasadami Schiffa również oceniono pod kątem ich profilu farmakokinetycznego.²⁶² W zależności od cech strukturalnych badanych związków, przewidywane wchłanianie w przewodzie pokarmowym było wysokie i w niektórych przypadkach przekraczało 85%. Ponadto wszystkie analizowane związki wykazywały właściwości zbliżone do leków oraz korzystne profile biodostępności. Analizy przepuszczalności ILs na bazie gliklazydu wykazały ich skuteczną przepuszczalność, z wartościami w zakresie od $1,21 \cdot 10^{-6}$ do $1,53 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, co jest zgodne z ustalonymi wymaganiami dla leków podawanych doustnie.⁴⁶ Ponadto, pomimo obecności licznych układów aromatycznych, imidazoliowe ciecze jonowe funkcjonalizowane benzotiazoloamidem wykazywały dobrą rozpuszczalność w wodzie i zostały sklasyfikowane jako rozpuszczalne (33,3-100 mg/mL) i umiarkowanie rozpuszczalne (10-33,3 mg/mL). Jeden związek w tej grupie wykazał również dobrą absorpcję *in silico* (81,75%) i wysoką absorpcję żołądkowo-jelitową zgodnie z przewidywaniami ADME.²⁶³ Uzyskane wyniki wskazują, że odpowiednie modyfikacje strukturalne QASs lub ILs mogą prowadzić do poprawy rozpuszczalności, wchłaniania oraz ogólnej biodostępności, co potwierdza ich potencjał jako kandydatów do doustnych form leków. Jednocześnie wykazano, że wybrane właściwości fizykochemiczne mogą być efektywnie modulowane poprzez optymalizację długości łańcucha alkilowego w kationie.

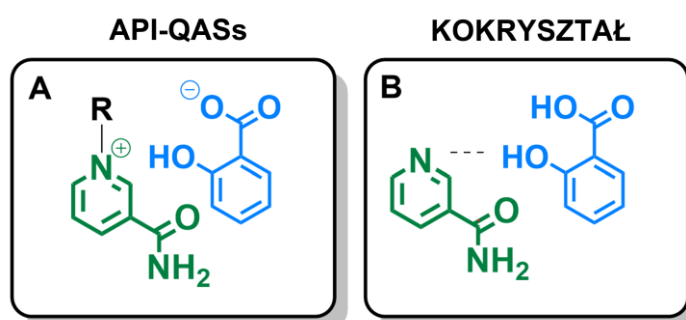
7.3. Leki do stosowania miejscowego na skórę.

7.3.1. Analiza salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1–S7)

7.3.1.1. Synteza i analiza produktów

Koncepcja opracowania nowych związków przeznaczonych do podania drogą skórną wynika z dobrze udokumentowanego zastosowania nikotynamidu oraz kwasu salicylowego

w preparatach dermatologicznych, w tym w terapii zmian trądzikowych. Choć ich połączenie **NA** i **SAL** w formie układów niejonowych jest znane, zastosowanie czwartorzędowych pochodnych nikotynamidu w połączeniu z anionem salicylanowym pozostaje dotychczas nieopisane. Dlatego w dwuetapowej syntezie, zgodnej z zasadami zielonej chemii, uzyskano szereg homologiczny salicylanów *N*-alkilonikotynamidu, w których podstawnik alkilowy (R) zmieniał się w przedziale od etylu (**S1**) do tetradecylu (**S7**) (rysunek 44). Następnie oceniono potencjał otrzymanych soli jako nowych API w porównaniu ze związkami wyjściowymi (**NA** i **SAL**) oraz uzyskanym kokryształem (**[NA][SAL]**), które odgrywają istotną rolę w farmakoterapii chorób skóry.



Rysunek 44. Formy API pochodzące z nikotynamidu i kwasu salicylowego: salicylany *N*-alkilonikotynamidu z łańcuchem etylowym (C₂H₅) (**S1**), butylowym (C₄H₉) (**S2**), heksylowym (C₆H₁₃) (**S3**), oktylowym (C₈H₁₇) (**S4**), decyłowym (C₁₀H₂₁) (**S5**), dodecyłowym (C₁₂H₂₅) (**S6**), tetradecylowym (C₁₄H₂₅) (**S7**) (A); oraz ich niejonowy odpowiednik – kokryształ **[NA][SAL]** (B).

Należy podkreślić, że sól zawierająca sześć atomów węgla w łańcuchu alkilowym, salicylan *N*-heksylonikotynamidu (**S3**), została już opisana w pracy Dobler *et al.*⁷⁴, chociaż sposób jej otrzymania nie został opisany. Synteza produktów **S1–S7** obejmowała czwartorzędowanie odpowiednim bromkiem alkilowym, a następnie reakcję wymiany jonowej przeprowadzoną w etanolu, w której anion bromkowy został zastąpiony anionem salicylanowym. Całkowita wydajność obu etapów była wysoka i dochodziła nawet do 90% (tabela A29 w aneksie). Otrzymane salicylany były białymi ciałami stałymi o temperaturze topnienia w zakresie od 84 do 118 °C. Zawartość jonów bromkowych, określona w produktach za pomocą miareczkowania metodą Mohra, wahała się w zakresie od około 3 000 do 8 500 ppm (tabela A29 w aneksie).

Struktury syntetyzowanych soli **S1–S7**, **[NA][SAL]** oraz badanych związków referencyjnych (**NA** i **SAL**) potwierdzono za pomocą różnych metod spektroskopowych, takich jak UV, FT-IR oraz spektroskopia ¹H i ¹³C NMR. Wybrane widma wraz z opisem przedstawiono w aneksie (strony 173–174 oraz 185–190, rysunki A1-A4 oraz A25–A36 w aneksie). Charakterystyczne różnice w położeniu sygnałów na widmach ¹H NMR między substratami (**NA** i **SAL**), kokryształem **[NA][SAL]** i jednym reprezentatywnym produktem z łańcuchem decyłowym (**S5**) przedstawiono na rysunku A63 w aneksie. Grafika wyraźnie ilustruje różnice w charakterystyce widm między substancją jonową a kokryształem, w którym jego składniki

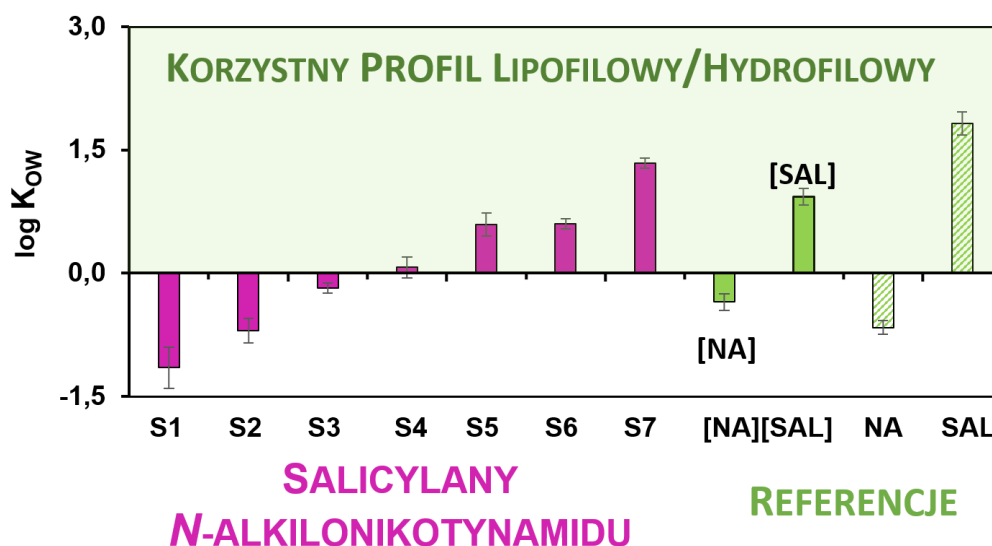
oddziałują wyłącznie poprzez wiązania wodorowe. W efekcie sygnały pochodzące od [NA][SAL] nie ulegają przesunięciu i pozostają w obszarze odpowiadającym substratom wyjściowym.

Badanie zawartości wody w uzyskanych produktach **S1–S7** wykazało, że po wysuszeniu zawierają one około 0,5–2,6% wody (tabela A29 w aneksie). Zawartość wody określona dla [NA][SAL] (około 1,1%) przekraczała wartości odnotowane dla poszczególnych substratów (0,78% dla **NA**, 0,26% dla **SAL**), co może wskazywać na obecność w nim specyficznych oddziaływań, wpływających na jego właściwości hydrofilowe. Niemniej jednak związki **S1–S7** nie wykazywały higroskopijności po wystawieniu na działanie powietrza (wilgotność 60%, temperatura pokojowa), co prowadzi do wniosku, że zawartość wilgoci nie jest wynikiem wiązania się cząsteczek wody z siecią krystaliczną otrzymanych związków.

Należy podkreślić znaczenie etanolu, który z powodzeniem zastosowano jako środowisko wymiany anionowej w procesie syntezy soli **S1–S7**. Użycie tego rozpuszczalnika zamiast powszechnie stosowanego metanolu, którego nawet niewielka ilość może okazać się toksyczna dla organizmu ludzkiego, eliminuje konieczność długotrwałego suszenia w celu jego usunięcia z produktu końcowego. Ponadto obecność pozostałości etanolu w syntetyzowanym produkcie nie stanowi żadnego zagrożenia (jak w przypadku metanolu), ponieważ etanol jest często stosowany jako środek zwiększający przenikanie w dostępnych na rynku preparatach do stosowania miejscowego.²⁶⁴

7.3.1.2. Współczynnik podziału oktanol–woda

Uzyskane wartości $\log K_{OW}$ dla produktów **S1–S7** zestawiono na rysunku 45, natomiast odpowiadające im dokładne wartości liczbowe znajdują się w tabeli A30 w aneksie. Biorąc pod uwagę wartości lipofilowości salicylanów *N*-alkilnikotynamidu, można przypuszczać, że związki zawierające najkrótsze podstawniki alkilowe (**S1–S3**) mogą wykazywać ograniczoną przydatność w preparatach do stosowania miejscowego. Ujemne wartości $\log K_{OW}$ wskazują, że są one bardziej rozpuszczalne w środowisku wodnym, dlatego po nałożeniu na skórę mogą nie być w stanie skutecznie przenikać przez lipofilną warstwę rogową naskórka. Podobną charakterystykę można również przypisać **NA**, szeroko stosowanemu składnikowi produktów do pielęgnacji skóry. Należy również zwrócić uwagę na interesujące zjawisko występujące w przypadku [NA][SAL], gdzie ze względu na brak wiązania jonowego w swojej strukturze, każdy z jego składników wykazywał różne powinowactwo do oktanolu i wody. Wśród najczęściej stosowanych miejscowych środków przeciwtętnikowych znajdują się klindamycyna, kwas azelainowy, nadtlenuk benzoilu, a także **SA**, analizowany w ramach niniejszych badań.^{265–267} Ich wartości $\log K_{OW}$ wynoszą odpowiednio 1,6, 1,4, 3,5 i 1,8, mieszcząc się w pożądanym zakresie (1–3).



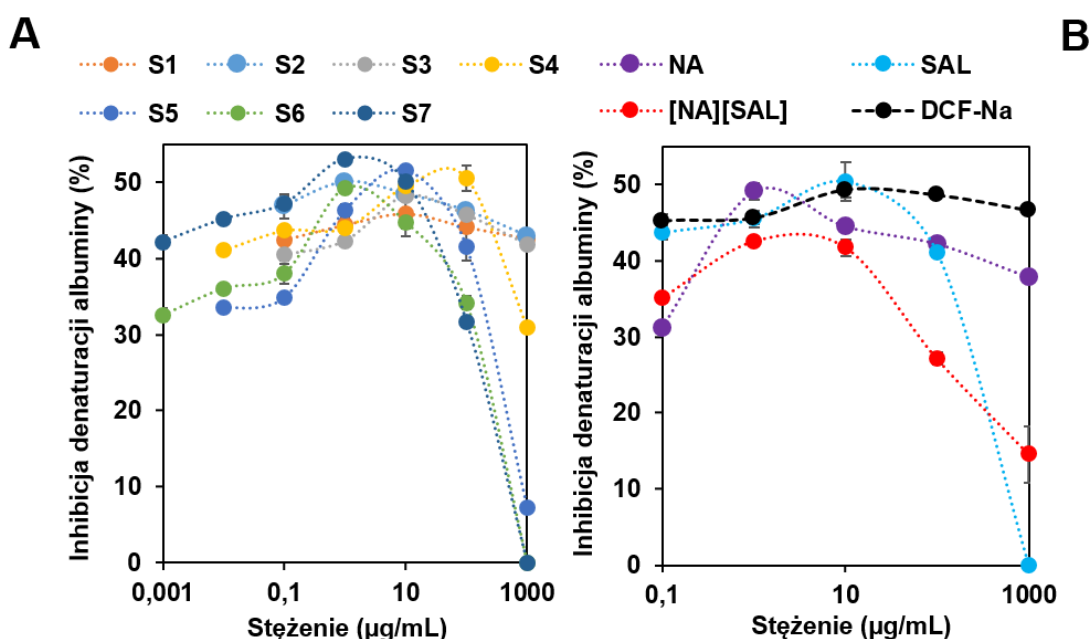
Rysunek 45. Współczynnik podziału oktanol–woda dla salicylanów *N*-alkilonikotynamidu i substancji referencyjnych.

W literaturze opisano API-ILs oparte na anionie kwasu salicylowego, dla których także przeprowadzono analizę właściwości farmaceutycznych. Współczynniki podziału między fazę wodną a lipidową, wyrażone jako $\log K_p$, były nawet około sześciokrotnie wyższe niż w przypadku odpowiadających im substratów. Dla salicylanów cetylopirydyniowego, benzalkoniowego oraz 1-etylo-3-metyloimidazoliowego wartości te wynosiły odpowiednio 4,14, 4,23 i 4,34.¹⁰³ Wyniki te nie sprzyjają optymalnemu transportowi przez bariery biologiczne i znacznie różnią się nie tylko od tych przedstawionych w niniejszych badaniach, ale również od szeroko stosowanych preparatach leczniczych czy kosmetycznych. W innym badaniu analizowano pirydyniowe ciecze jonowe zawierające różne podstawniki przy czwartorzędowym atomie azotu oraz anion bis(trifluorometylosulfonylo)imidkowy. Uzyskane wartości $\log K_{ow}$ dla tej grupy związków mieściły się w zakresie od -1,7 do 0,1. Pomimo strukturalnego podobieństwa do kationu nikotynamidu, badane ciecze jonowe wykazywały odmienny profil właściwości fizykochemicznych, co podkreśla kluczową rolę doboru par kation–anion w kształtowaniu właściwości tych układów.²⁶⁸

7.3.1.3. Ocena potencjału przeciwzapalnego: test denaturacji albuminy

Potencjał przeciwzapalny badanych substancji oceniono poprzez analizę ich zdolności do stabilizacji struktury albuminy, mierzonej zdolnością do zapobiegania jej denaturacji w warunkach podwyższonej temperatury. Wyniki ukazano na rysunku 46, a dokładne wartości zestawiono w tabeli A31 w aneksie. Analiza potencjału przeciwzapalnego badanych związków wykazała wyraźną zależność pomiędzy długością łańcucha alkilowego w kationie a zdolnością do stabilizacji struktury albuminy. Wraz z wydłużaniem łańcucha oraz wzrostem stężenia

badanych związków obserwowano spadek aktywności w hamowaniu denaturacji białka. Należy jednak podkreślić, że najwyższą skuteczność wykazała sól S7, która już w stężeniu 1 $\mu\text{g/mL}$ zahamowała denaturację albuminy w 51%. Zbliżoną zależność odnotowano także dla związków S5 i S6, osiągających maksymalne inhibicje wynoszące odpowiednio 47,3% i 47,8%, po czym następował stopniowy spadek ich skuteczności.



Rysunek 46. Inhibicja denaturacji albuminy salicylanów *N*-alkilnikotynamidu (A), jak i związków referencyjnych: NA, SAL, [NA][SAL] oraz DCF-Na (B).

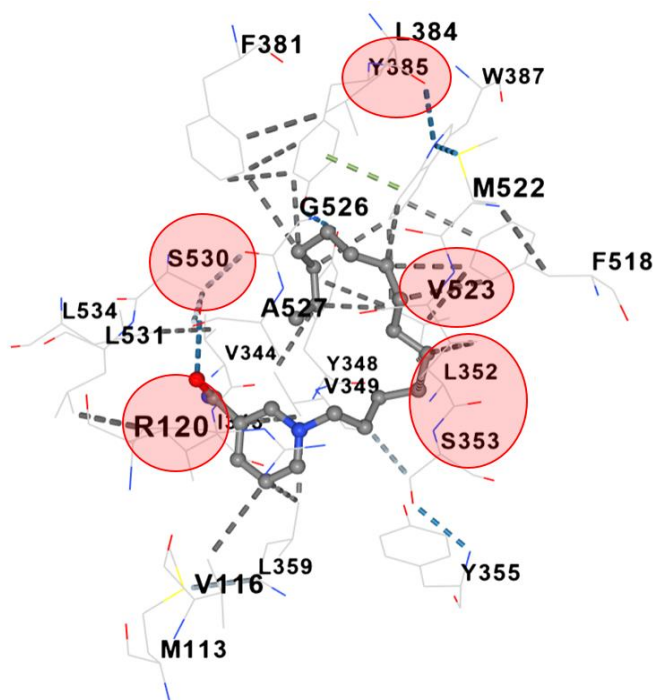
Sole o najdłuższych łańcuchach alkilowych (dodecyłowy i tetradecylowy) w maksymalnym stężeniu, utraciły zdolność do hamowania denaturacji, co sugeruje istotne ograniczenie aktywności biologicznej wraz ze wzrostem długości łańcucha. Z kolei sole S1–S4 wykazały zauważalną zależność dawka–aktywność, osiągając swoje szczytowe wartości inhibicji w najwyższych stosowanych stężeniach (46,2–48,0%), po czym efekt ten nieznacznie malał.

Zebrane dane nie całkowicie korespondują z obserwacjami opisywanymi w literaturze, gdzie zazwyczaj potencjał przeciwzapalny związków wykazuje wyraźną tendencję wzrostową wraz ze zwiększaniem stężenia. Wyciągi z kory łydygi *Aidia genipiflora*, oceniane w teście denaturacji albuminy, wykazały najwyższą aktywność przeciwzapalną w stężeniu 500 $\mu\text{g/mL}$, osiągając poziom inhibicji denaturacji albuminy równy 95%. Najniższą skuteczność odnotowano natomiast dla stężenia 3,9 $\mu\text{g/mL}$, dla którego wartość inhibicji wynosiła zaledwie 38%.²⁶⁹ Na uwagę zasługuje fakt, iż podobną zależność dawka–aktywność, występującą w przypadku krótko- i średniołańcuchowych bromków (S1–S4), zaobserwowano również w przypadku analizy właściwości przeciwzapalnych ekstraktu z kory *Ficus racemosa*.²⁷⁰ W zakresie stężeń

0,01–1000 $\mu\text{g/mL}$ jego zdolność do inhibicji denaturacji albuminy wzrosła o zaledwie kilka procent, osiągając maksymalną wartość (25%) inhibicji przy najwyższym badanym stężeniu.

7.3.1.4. Ocena potencjału przeciwwzapalnego: dokowanie molekularne oparte na strukturze enzymu cyklooksygenazy-2 (COX-2)

Symulacje dokowania molekularnego przeprowadzono w celu oceny potencjalnych interakcji między badanymi QASs zawierającymi kation *N*-alkilnikotynamidu oraz anion salicylanowy (**S1–S7**) a enzymem cyklooksygenazą-2 (COX-2). Dokowanie typu „*blind docking*” wykazało, że wszystkie analizowane ligandy zlokalizowane są w tej samej głównej kieszeni wiążącej COX-2 (*C1*), obejmującej kluczowe reszty katalityczne **R120**, **Y385** i **S530**, a także reszty stabilizujące **S353**, **L352** i **V523**, które razem tworzą funkcjonalny kanał enzymatyczny, jak ukazano na rysunku 47, a także szczegółowo w tabeli A32 w aneksie. Uzyskane wartości energii wiązania (*Vina score*) mieściły się w przedziale od $-7,9$ do $-5,4$ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, co wskazuje na podobny sposób wiązania w całej badanej serii związków. Spośród analizowanych ligandów, najwyższe powinowactwo do enzymu wykazywał kation salicylanu *N*-tetradecylokotynamidu (**S7**; rysunek 50), osiągając wartość $-7,9$ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, natomiast wysokie powinowactwo zaobserwowano również dla pochodnej dodecyłowej (**S6**), uzyskując $-7,6$ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Związki z krótszymi łańcuchami alkilowymi, takimi jak etyl (**S1**), butyl (**S2**) i heksyl (**S3**), wykazywały słabsze energie wiązań, wahające się od $-5,9$ do $-6,5$ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Rysunek 47. Kation salicylanu *N*-tetradecylokotynamidu (**S7**) w kieszeni *C1* wraz z oznaczonymi na czerwono głównymi pozostałościami katalitycznymi (**R120**, **Y385**, **S530**) oraz resztami przyczyniającymi się do stabilizacji i selektywności (**S353**, **V523**, **L352**).

Analizując uzyskane wyniki zaobserwowano wyraźną zależność między długością łańcucha alkilowego a siłą wiązania ligandu. Wydłużenie łańcucha węglowego sprzyjało zwiększonemu powinowactwu do miejsca aktywnego COX-2, co można wytłumaczyć zwiększonymi oddziaływaniami hydrofobowymi i van der Waalsa z resztami **L352** i **V523**, które odpowiadają za stabilizację kompleksu inhibitor–enzym i determinują selektywność dla izoformy COX-2. Jednocześnie dodatnio naładowana grupa amoniowa może uczestniczyć w stabilizacji elektrostatycznej w pobliżu reszty **R120**, która służy jako miejsce kotwiczenia ligandu poprzez tworzenie oddziaływań jonowych z grupami karboksylanowymi.

Zanotowano także, że anion salicylanowy i kwas salicylowy wykazują umiarkowane powinowactwo do enzymu, osiągając wartości około -5,8 do -5,9 kcal·mol⁻¹. Podobnie, nikotynamid wykazał najslabsze wiązanie (-5,4 kcal·mol⁻¹), co sugeruje, że obecność hydrofobowego łańcucha alkilowego w strukturze kationowej QASs znacząco wzmacnia stabilizację kompleksu ligand–COX-2. Wyniki te wskazują, że synergistyczna interakcja hydrofobowego łańcucha alkilowego i centrum kationowego odgrywa kluczową rolę w zwiększaniu powinowactwa wiązania analizowanych związków z enzymem COX-2.

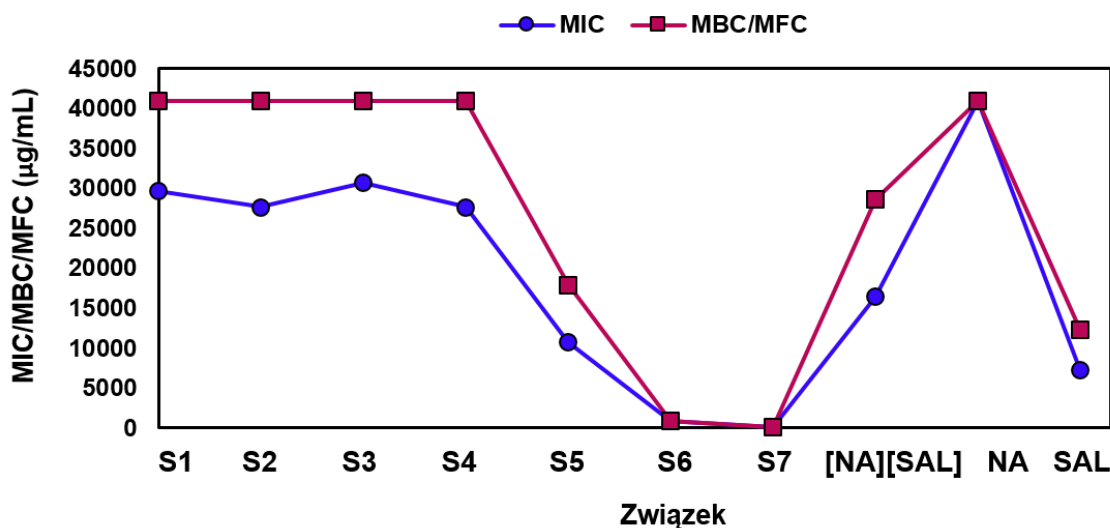
Wartości energii wiązania uzyskane w niniejszym badaniu dla badanych QASs są zgodne z wartościami raportowanymi dla klasycznych niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W badaniu wykorzystującym dokowanie molekularne i symulacje dynamiki molekularnej, diklofenak, stosowany jako związek odniesienia, osiągnął wartość energii wiązania wynoszącą -5,7 kcal·mol⁻¹ (jego wartość *Vina score* wyznaczona analogiczną metodą jak dla **S1–S7** wyniosła -7,0 kcal·mol⁻¹, tabela A14 w aneksie). Oznacza to, że niektóre związki użyte w niniejszym badaniu, a w szczególności pochodne zawierające dłuższe łańcuchy alkilowe, wykazują powinowactwo porównywalne lub nawet wyższe niż diklofenak, co sugeruje ich potencjalną aktywność biologiczną w hamowaniu COX-2.²⁷¹

Analizując literaturę dostrzeżono także, że ester fenyloetylowy kwasu salicylowego (SAPE) poddany dokowaniu molekularnemu do enzymu COX-2 wykazał korzystne wartości energii wiązania w porównaniu z ibuprofenem i indometacyną. Wartości te wynosiły odpowiednio: -109,09 dla SAPE, -92,62 dla ibuprofenu oraz -102,12 kcal·mol⁻¹ dla indometacyny.²⁷² Istotnych informacji dotyczących wpływu jonowej natury związków na stabilizację kompleksu ligand–COX-2 dostarczyły badania z udziałem 8-piperazynylokefonianowych cieczy jonowych zawierających aniony NLPZ.²⁷³ Analiza pochodnych ibuprofenu wykazała, że wolny ibuprofen (IBP) osiągnął swobodną energię wiązania wynoszącą -85,67 kcal·mol⁻¹, podczas gdy odpowiadające mu ciecze jonowe wykazywały znacznie silniejsze oddziaływania, osiągając wartości do -239,23 kcal·mol⁻¹. Analiza dokowania molekularnego wykazała, że cząsteczka IBP nie tworzyła istotnych oddziaływań

elektrostatycznych z miejscem aktywnym COX-2. Jednak w przypadku cieczy jonowych stabilizacja kompleksu ligand–enzym była możliwa dzięki dodatkowym oddziaływaniom elektrostatycznym i zwiększonej liczbie wiązań wodorowych. Należy zaznaczyć, że różnice w wartościach energii wiązania obserwowane pomiędzy niniejszymi wynikami a danymi literaturowymi wynikają z zastosowania odmiennych metodologii obliczeniowych oraz funkcji scoringowych. W niniejszej pracy wykorzystano funkcję *Vina score* (AutoDock Vina), która ma charakter względny i nie jest bezpośrednio porównywalna z wartościami energii swobodnej wiązania uzyskiwanymi przy użyciu bardziej zaawansowanych metod stosowanych w cytowanych publikacjach.

7.3.1.5. Ocena aktywności antybakteryjnej: wyznaczanie parametrów MIC i MBC/MFC

Aktywność przeciwbakteryjną badanych salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1–S7) oceniono wobec wybranych drobnoustrojów Gram-dodatnich (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. acnes*), Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*) oraz grzybów (*C. albicans*), które celowo dobrano ze względu na ich istotną rolę w patogenezie zakażeń skóry, w tym w rozwoju i utrzymywaniu zmian trądzikowych. Uzyskane wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego/grzybobójczego (MBC/MFC) przedstawiono na rysunku 48, a także w tabeli A33 w aneksie.



Rysunek 48. Sumaryczne wartości MIC, MBC i MFC wobec wybranych drobnoustrojów w zależności od badanej substancji: salicylany *N*-alkilonikotynamidu (S1–S7), [NA][SAL], NA i SAL.

Wykazano, że tylko trzy związki zawierające najdłuższe łańcuchy alkilowe (S5–S7), a także jeden ze związków referencyjnych – SAL, wykazują potencjał hamowania rozwoju szczepu *C. acnes*. Warto zauważyć, że sole o krótszych łańcuchach (S1–S4) wykazywały aktywność biologiczną jedynie wobec *S. epidermidis* i *S. aureus*. Ponadto okazało się,

że wykazują one jedynie właściwości bakteriostatyczne, a wartość MBC nie mogła zostać dla nich określona nawet przy stężeniach sięgających 0,4% (4 096 µg/mL).

Co ciekawe, kokryształ **[NA][SAL]** nie wykazywał aktywności bakteriobójczej wobec *C. acnes*, jednak wpływał na wzrost pozostałych testowanych mikroorganizmów. Zaobserwowany efekt wydaje się wynikać głównie z obecności fragmentu salicylowego, co znajduje odzwierciedlenie w ogólnie wyższych (około dwukrotnie) wartościach MIC/MBC. Nikotynamid (**NA**) natomiast nie wykazywał aktywności wobec żadnego ze szczepów w badanych stężeniach sięgających 0,4%. Uzyskane wyniki pozostają częściowo rozbieżne z doniesieniami literaturowymi, w których **NA** opisywano jako związek o umiarkowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, w tym wobec bakterii związanych z trądzikiem.^{242,274} Natomiast **SAL** jest zalecany w dawkach sięgających 2%, które według zebranych danych są wystarczające do osiągnięcia efektu terapeutycznego.

W analizowanym przypadku również stwierdzono, że wydłużenie łańcucha alkilowego w kationie prowadzi do poprawy aktywności biologicznej. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi²⁷⁵, choć również sugeruje, że w przypadku QASs istotniejszą rolę odgrywa optymalna długość łańcucha alkilowego niż sama natura zastosowanych komponentów wyjściowych (**NA** i **SAL**). Jednocześnie należy podkreślić, że wiele syntetycznych QASs charakteryzuje się wysoką toksycznością i może wykazywać działanie niepożądane wobec organizmów wyższych. Przykładowo, chlorek didecyldimetyloamoniowy jest znanym środkiem drażniącym skórę i wykazuje znaczną toksyczność. Z tego względu analogi otrzymane z surowców pochodzenia naturalnego stanowią interesującą alternatywę dla potencjalnych zastosowań farmaceutycznych.

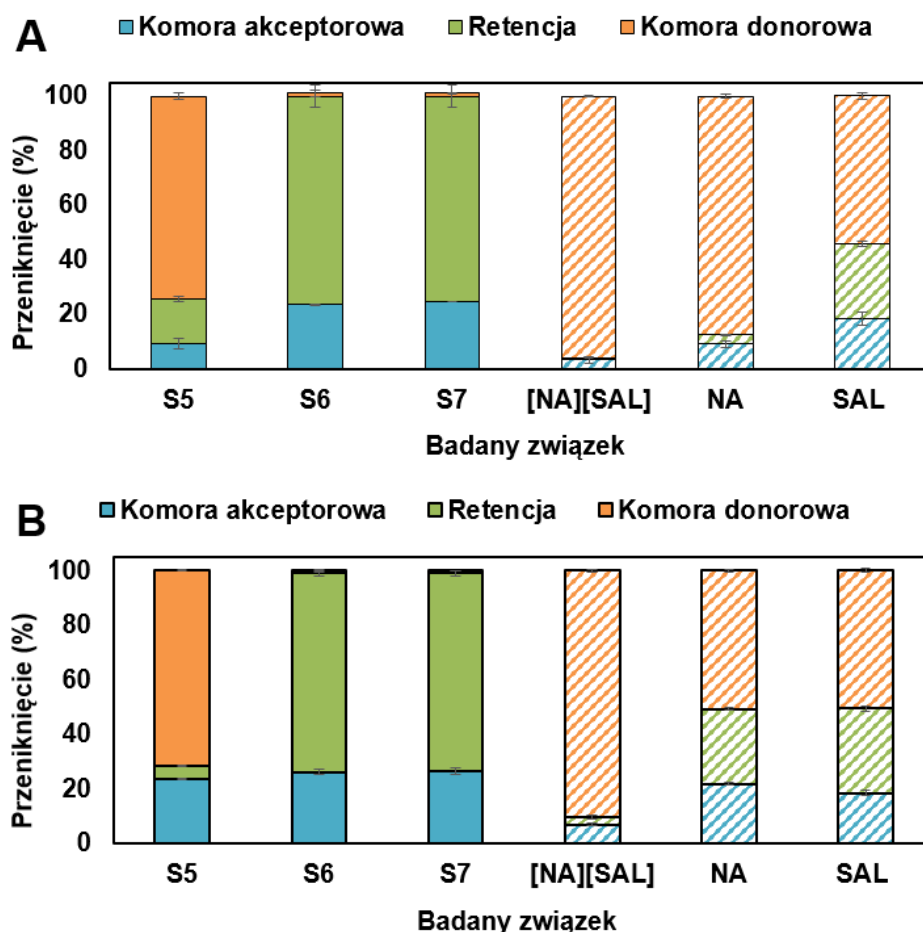
Co ciekawe, zaobserwowano, że stosunkowo prosta modyfikacja struktury API polegająca na wprowadzeniu łańcucha alkilowego do kationu może znacząco zwiększać efektywność czy zakres aktywności biologicznej w porównaniu z samym **NA** czy **SAL**. Oznacza to możliwość istotnego obniżenia dawki przy jednoczesnym zwiększeniu skuteczności działania. Ponadto wyniki aktywności biologicznej są spójne z obserwacjami dotyczącymi właściwości powierzchniowych (opisanych w pkt. 7.3.1.7.), wskazując, że wydłużenie łańcucha alkilowego korzystnie wpływa na oba te parametry. W konsekwencji związki o dłuższych łańcuchach alkilowych wykazują lepsze właściwości zwilżające, co może sprzyjać efektywniejszemu kontaktowi substancji czynnej zarówno z powierzchnią skóry, jak i błonami komórkowymi drobnoustrojów.

7.3.1.6. Ocena przenikania związków przez barierę skórną z wykorzystaniem metody SKIN-PAMPA

Przenikalność wybranych związków, a także ich stopień retencji w modelowej membranie skórnej oceniono po 6 oraz 24 godzinach inkubacji z wykorzystaniem testów SKIN-PAMPA (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). Wyniki przedstawiono na rysunku 49 (oraz tabeli A34 i A35 w aneksie) jako procent przenikniętej frakcji oraz procent retencji. Nie przedstawiono wyników dla związków **S1–S4**, ponieważ w warunkach eksperymentalnych nie wykazywały one przenikania przez modelową błonę PAMPA ani nie obserwowano ich akumulacji w jej strukturze.

Po 24 godzinach inkubacji zaobserwowano wzrost przenikania do komory akceptorowej dla większości badanych związków. Największą zmianę zaobserwowano dla związku **S5**, którego przenikanie wzrosło do 23,6%, podczas gdy retencja spadła do 4,9%, co wskazuje na efektywny transport przez membranę w dłuższym czasie inkubacji. Związki **S6** i **S7** charakteryzowały się umiarkowaną przenikalnością do komory akceptorowej (>20%) i wysoką retencją (odpowiednio 72,8% i 72,6%), co potwierdza ich tendencję do silnej akumulacji w membranie i ograniczonej przenikalności nawet po dłuższym czasie ekspozycji. W przypadku **[NA][SAL]** zaobserwowano niewielki wzrost przenikania do komory akceptorowej (6,9%), podczas gdy stężenie w komorze donorowej pozostało dominujące (90,5%) przy jednocześnie bardzo niskiej retencji na membranie (2,6%). **NA** i **SAL** wykazały umiarkowaną przepuszczalność po 24 godzinach (odpowiednio 21,8% i 18,4%), której towarzyszyła stosunkowo wysoka retencja (27,5% i 31,1%), co sugeruje częściową akumulację w błonie.

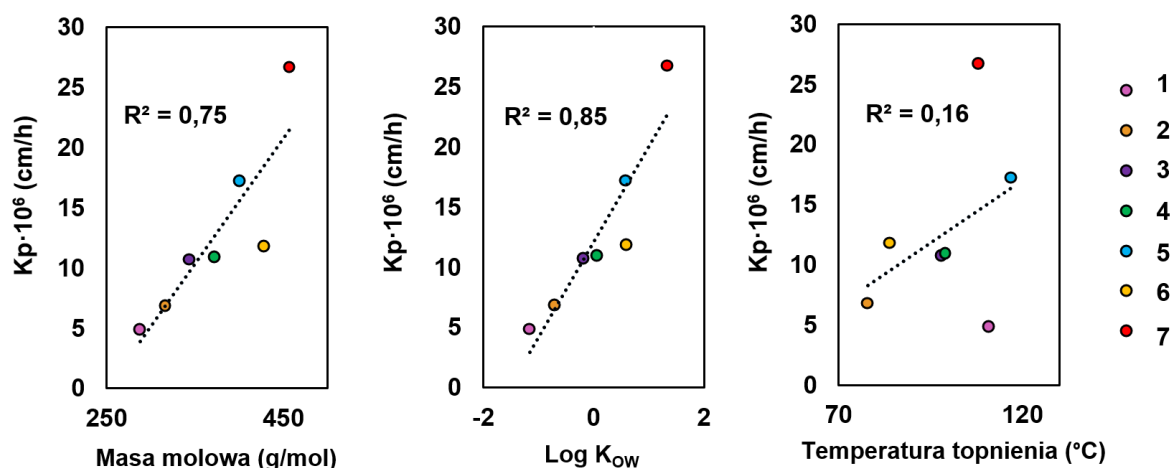
Porównanie wyników po 6 i 24 godzinach wskazuje, że wydłużenie czasu inkubacji prowadzi do zwiększenia przenikalności dla **S5**, **NA** i **SAL**, podczas gdy związki **S6** i **S7** charakteryzują się stabilnym profilem wysokiej retencji i ograniczonej przenikalności, niezależnie od czasu ekspozycji. Układ **[NA][SAL]** charakteryzuje się niską retencją i ograniczoną akumulacją w błonie, przy jednoczesnym stopniowym wzroście przenikalności w czasie. Niemniej jednak, należy nadmienić, że najwyższe wyniki przenikania substancji przez membranę w teście PAMPA osiągnięto dla zsyntezowanych QASs **S6** i **S7**. Uzyskane wyniki wskazują także, że brak obserwowanej permeacji dla wybranych związków (**S1–S4**) może wynikać z ograniczeń samego modelu PAMPA, dlatego w przyszłości celowe byłoby uzupełnienie tych badań o bardziej zaawansowane modele transportu oraz rozważenie zastosowania systemów dostarczania leków umożliwiających obejście bariery błonowej w przypadku tych nowych from API.



Rysunek 49. Procent permeacji badanych salicylanów (S5–S7) oraz związków referencyjnych: [NA][SAL], NA i SAL po 6 (A) i 24 (B) godzinach.

Aby ilościowo określić proces przenikania wykonano także obliczenia współczynnika przenikania przez skórę, wykorzystując model Potts i Guya, będący najpopularniejszym i najdokładniejszym modelem matematycznym stosowanym do badań na lekach. Zebrane dane (przedstawione w tabeli A36 w aneksie) pokazują, że wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w salicylanach *N*-alkilnikotynamidu (S1–S7) następuje odpowiedni wzrost szybkości przenikania przez skórę, co wskazuje, że wzrost hydrofobowości prowadzi do zwiększonej przepuszczalności przez błony biologiczne. Wartości te różnią się jednak znacznie od wartości uzyskanych dla związków referencyjnych: nawet kilkukrotnie w stosunku do NA lub nawet kilkusetkrotnie w porównaniu z danymi dla SAL. Biorąc pod uwagę, że dla [NA][SAL] uzyskano dwie wartości współczynnika podziału oktanol–woda, określono również dwie odrębne wartości K_p . Warto jednak zauważyć, że SAL zawarty w kokryształach znacznie zmniejszył intensywność przenikania przez warstwy skóry, różniąc się pod tym względem znacznie bardziej niż czysty NA. Warto podkreślić, że pożądany współczynnik przenikania przez skórę dla preparatów do stosowania na skórę może się różnić w zależności od konkretnego leku lub składnika aktywnego, który ma być dostarczony, a także od pożądanego efektu terapeutycznego.

Zaprezentowana na rysunku 50 korelacja parametrów fizykochemicznych z wyliczonymi wartościami wykazała, że czynnikiem najlepiej powiązanim z K_p jest współczynnik podziału oktanol–woda ($\log K_{OW}$) z korelacją na poziomie $R^2 = 0,85$. Masa molowa ma także znaczący wpływ ($R^2 = 0,75$), podczas gdy temperatura topnienia najwyraźniej nie determinuje w żaden sposób szybkości przenikania przez skórę ($R^2 = 0,16$). Dane te potwierdzają przydatność wartości $\log K_{OW}$ jako kluczowego parametru w przewidywaniu przenikania przez skórę, a jednocześnie zmniejszają znaczenie innych czynników, podczas opracowywania nowych substancji czynnych przeznaczonych do podawania drogą skórą.



Rysunek 50. Korelacja między współczynnikiem przenikania przez skórę (K_p) a masą cząsteczkową, wyznaczonym parametrem $\log K_{OW}$ i temperaturą topnienia dla salicylanów *N*-alkilnikotynamidu (S1–S7).

Badania przepuszczalności zjonizowanych pochodnych salicylanu przez skórę grzbietową świnki morskiej wykazały, że współczynnik przepuszczalności zjonizowanej formy kwasu salicyłowego ($1640 \cdot 10^{-6}$ cm/h) stanowi zaledwie około 2,0% wartości obserwowanej dla formy niezjonizowanej ($118\,000 \cdot 10^{-6}$ cm/h). Ponadto analiza przepuszczalności pochodnych tego kwasu zawierających różne podstawniki wykazała szeroki zakres wartości od 17 do $1850 \cdot 10^{-6}$ cm/h, przy czym związki z względnie hydrofilowymi podstawnikami, takimi jak grupa hydroksylowa czy nitrowa, charakteryzowały się znacznie niższymi współczynnikami przepuszczalności w porównaniu zarówno z niemodyfikowanym salicylanem, jak i z pozostałymi pochodnymi. Wyniki te sugerują, że przenikalność jonowa pochodnych salicylanów jest ściśle skorelowana z umiarkowaną hydrofobowością cząsteczki, co wskazuje na istotną rolę oddziaływań hydrofobowych w transporcie przez barierę skórną. Jednocześnie obserwowany wpływ podstawników hydrofilowych sugeruje, że przenikanie jonowe zależy zarówno od właściwości hydrofobowych, jak i hydrofilowych cząsteczki, co może odgrywać kluczową rolę w kształtowaniu biodostępności tych związków.²⁷⁶ Badania transdermalne *in vitro* z wykorzystaniem skóry wieprzowej na komorach dyfuzyjnych Franza wykazały natomiast,

że K_p kwasu salicylowego wynosiło $7430 \cdot 10^{-6}$ cm/h.²⁷⁷ Wyraźne różnice w wartościach współczynnika przenikania dla **SAL** mogą wynikać z zastosowania różnych rodzajów skóry, co podkreśla istotę warunków eksperymentalnych w badaniach przepuszczalności. Wyniki uzyskane dla membran bakteryjnych zawierających ibuprofen oraz sole estrów izopropylowych wybranych aminokwasów (L-waliny i L-leucyny) zostały szczegółowo przeanalizowane w celu oceny ich przydatności do transdermalnego podawania leków. Membrany te przetestowano w systemie dyfuzyjnym Franza z wykorzystaniem skóry wieprzowej, a uzyskane współczynniki przenikania wyniosły odpowiednio $0,326 \cdot 10^{-6}$ cm/h dla soli L-waliny i $0,264 \cdot 10^{-6}$ cm/h dla estru L-leucyny. Wyniki wskazały, że modyfikacja ta nieznacznie zmniejsza przepuszczalność skóry, zachowując jednak wartości umożliwiające skuteczne przenikanie leku przez barierę skórną.²⁷⁸

Dwie amfilowe ciecze jonowe imidazoliowe, bromek 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy (C8MIM) oraz bromek 3-dodecylo-1-metyloimidazoliowy (C12MIM), oceniono pod kątem ich wpływu na przezskórne dostarczanie substancji leczniczych. Badania przeprowadzono na modelach błon lipidowych imitujących warstwę rogową naskórka, z użyciem teofiliny (TH) oraz diklofenaku sodowego (DIC) jako modelowych substancji referencyjnych. Wykazano, że C8MIM silniej zwiększał przepuszczalność błony niż C12MIM. W przypadku TH strumień przenikania wzrósł 28-krotnie dla C8MIM i 4,4-krotnie dla C12MIM względem kontroli, natomiast dla DIC odpowiednio 225- i 132-krotnie.²⁷⁹

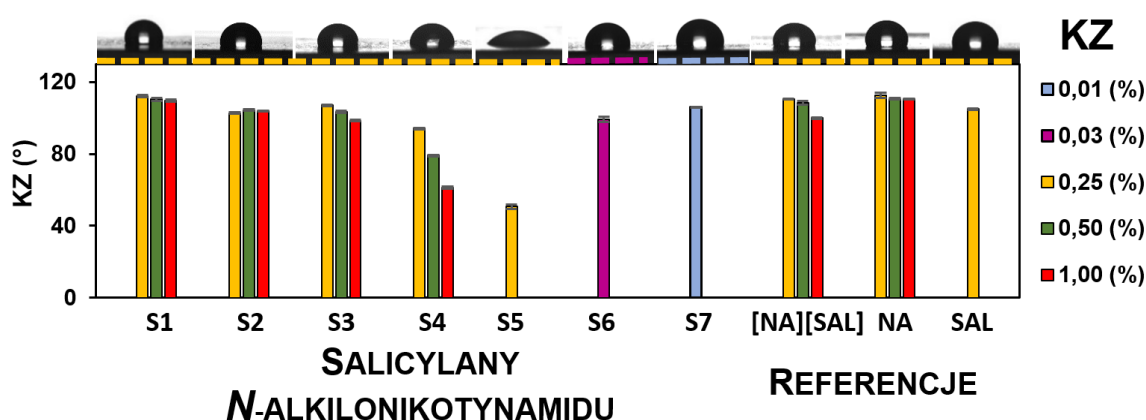
Mechanizm działania ILS jako substancji zwiększających penetrację skóry najprawdopodobniej polega na zaburzaniu uporządkowanej struktury lipidów warstwy rogowej naskórka (SC, łac. *stratum corneum*), co prowadzi do obniżenia właściwości barierowych skóry. Dokładny mechanizm wpływu QASs na strukturę warstwy rogowej naskórka (SC) pozostaje jednak nie w pełni wyjaśniony.²⁸⁰ Podobnie jak w przypadku pochodnych salicylanów, niewielkie zmiany strukturalne (np. różne kombinacje kationów i anionów) mogą istotnie wpływać na przepływ i transport przez skórę. Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami dotyczącymi modulacji przenikania związków jonowych oraz aromatycznych o zróżnicowanej hydrofilowości i lipofilowości, podkreślając znaczenie zarówno właściwości fizykochemicznych cząsteczki, jak i jej interakcji ze składnikami bariery skórnej w projektowaniu formulacji kosmetycznych i transdermalnych.

7.3.1.7. Pomiary kąta zwilżania

Dla zsyntezowanych związków (**S1–S7**) pomiary kąta zwilżania przeprowadzono z wykorzystaniem parafilmu jako modelowego podłoża, ze względu na jego hydrofobowy charakter, dobrze imitujący warunki powierzchni skóry łojotokowej, sprzyjającej rozwojowi infekcji skórnych, w tym zmian trądzikowych. Eksperymenty przeprowadzono przy stężeniach

odpowiadających typowej zawartości **NA** i **SAL** w preparatach dostępnych w handlu (0,25–1,00%).^{242,281,282} Ze względu na niską rozpuszczalność **S5**, **S6** i **S7**, badania tych soli przeprowadzono w mniejszych stężeniach wynoszących odpowiednio 0,25, 0,03 i 0,01%. Należy zaznaczyć, że stężenia dla **S6** i **S7** zostały wybrane na podstawie ich skutecznej dawki oszacowanej po analizie testów MIC/MBC.

Z danych przedstawionych na rysunku 51 (oraz w tabeli A37 w aneksie) wynika, że zarówno substancje referencyjne (**NA**, **SAL** i **[NA][SAL]**), jak i produkty **S1**, **S2** i **S3** zawierające najkrótsze łańcuchy alkilowe (od etylu do heksylu) nie wykazują aktywności powierzchniowej. W rezultacie kąt zwilżania (KZ) ich roztworów w stężeniach od 0,25 do nawet 1,00% mieści się w zakresie od 99 do 112° i jest zbliżony do kąta zwilżania czystej wody (113°).²⁸³

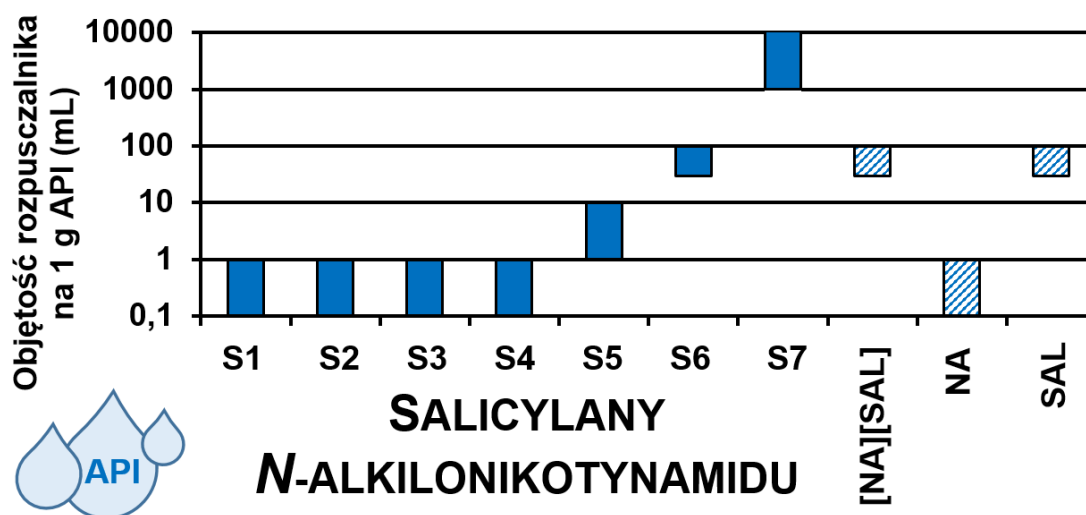


Rysunek 51. Kąt zwilżania (KZ) wodnych roztworów salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (**S1**–**S7**) i substancji referencyjnych. Kształty kropeł przedstawiono przy najniższych dostępnych stężeniach dla każdego związku.

Co ciekawe, sam **SAL** nie rozpuszczał się w stężeniach wyższych niż 0,25%, ale jego kokryształ rozpuszczał się nawet w stężeniu 1,00%, dla którego kąt zwilżania wynosił 100°. Zgodnie z oczekiwaniami, wzrost długości łańcucha alkilowego spowodował wzmocnienie charakteru amfifilowego soli, co spowodowało również wzrost ich aktywności powierzchniowej. W ten sposób wzrost stężenia dla **S4** z 0,25 do 1,00% spowodował spadek KZ z 94 do 61°. W przypadku związku **S5**, zawierającego podstawnik decylowy, najwyższą wartość KZ (51°) osiągnięto przy stężeniu 0,25%. Należy również zauważyć, że związki **S6** i **S7** w znacznie niższych stężeniach (<0,05%) wykazują lepszą zwilżalność powierzchni hydrofobowych w porównaniu z **NA** nawet przy stężeniu 1,00%. Oznacza to, że związki **S5**, **S6** i **S7** mogą znacznie poprawić powierzchnię kontaktu między lekiem a stanem zapalnym skóry, co prawdopodobnie jest istotnym czynnikiem przyspieszającym działanie terapeutyczne.

7.3.1.8. Rozpuszczalność badanych soli i układów referencyjnych w roztworach wodnych o różnym pH

Wyniki pomiarów rozpuszczalności związków (S1–S7) w PBS, uważanego za medium świetnie odwzorowujące jonowość tkanek skóry, podsumowano na rysunku 52 oraz w tabeli A38 w aneksie. Analiza rozpuszczalności badanych związków w buforze PBS wykazała wyraźną zależność od długości przyłączonego łańcucha alkilowego w kationie, przy czym efekt ten staje się szczególnie widoczny dla homologów zawierających co najmniej osiem atomów węgla. Pochodne nikotynamidu zawierające najkrótsze łańcuchy (S1–S3) oraz sól S4 charakteryzują się bardzo wysoką rozpuszczalnością, kwalifikując się do kategorii „Bardzo rozpuszczalne” i wymagając mniej niż jednej części rozpuszczalnika na część substancji. Stopniowe wydłużanie łańcucha alkilowego prowadzi do systematycznego obniżania powinowactwa do PBS, osiągając minimum dla soli S7. Obserwowany trend jednoznacznie wskazuje, iż wzrost hydrofobowości, wynikający z elongacji łańcucha alkilowego, istotnie ogranicza rozpuszczalność tego typu soli w środowisku wodnym.



Rysunek 52 Rozpuszczalność salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1–S7), [NA][SAL], NA i SAL w PBS.

Analizując substancje referencyjne, NA zachował bardzo wysoką rozpuszczalność w PBS, podczas gdy kwas salicylowy (SAL) został zaklasyfikowany jako „Słabo rozpuszczalny”. Natomiast kokryształ [NA][SAL], mimo braku charakteru jonowego, wykazywał korzystniejszy profil rozpuszczalności w porównaniu z samym SAL, poprawiając ją o jedną klasę w przyjętej skali. Sugeruje to, że specyficzne oddziaływania międzycząsteczkowe w sieci krystalicznej kokryształu mogą skutecznie modyfikować właściwości fizykochemiczne składników wyjściowych, prowadząc do mierzalnej poprawy rozpuszczalności. Uzyskane wyniki wskazują, że rozpuszczalność badanych układów nie jest determinowana wyłącznie obecnością ładunku jonowego, lecz wynika z kombinacji kilku czynników, takich jak długość łańcucha alkilowego, stopień hydrofobowości oraz charakter oddziaływań w sieci krystalicznej. W przypadku QASs

obserwuje się zależność pomiędzy korzystnym wpływem charakteru jonowego a ograniczającym wpływem wynikającym z rosnącej hydrofobowości związku wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Z kolei przykład [NA][SAL] podkreśla potencjał kokrystalizacji jako alternatywnej i efektywnej strategii poprawy rozpuszczalności substancji aktywnych, niewymagającej ich chemicznej jonizacji.

7.3.1.9. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (*Artemia franciscana*)

W tabeli 6 zestawiono dane dotyczące ekotoksyczności związków S1–S7 oraz substancji referencyjnych ([NA][SAL], NA i SAL) wobec skorupiaków słonowodnych *Artemia franciscana*, umożliwiając bezpośrednie porównanie ich toksycznego wpływu na ten organizm modelowy. Przeprowadzone badania wykazały, że te nowe jonowe formy NA i SAL nie stanowią poważnego zagrożenia dla środowiska, niezależnie od długości łańcucha alkilowego w kationie. W związku z tym produkty S1 i S2 wraz z NA zostały sklasyfikowane jako „Stosunkowo nieszkodliwe” z zakresem toksyczności powyżej 1000 mg/L. Co ciekawe, pozostałe produkty zostały uznane za „Praktycznie nietoksyczne”, z wyjątkiem produktu S6 (z łańcuchem dodecyłowym), który został oceniony jako „Słabo toksyczny” wobec *A. franciscana*. Można zatem stwierdzić, że po osiągnięciu maksymalnej toksyczności następuje efekt „cut-off” spowodowany znacznym wzrostem hydrofobowości substancji w wyniku wydłużenia łańcucha alkilowego.²¹⁶

Tabela 6. Ekotoksyczność salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1–S7), [NA][SAL], NA, and SAL wobec *A. franciscana*.

Związek	EC ₅₀ (mg/L)	Zakres klasy (mg/L)	Klasa ^a
S1	-	>1000	Stosunkowo nieszkodliwy
S2	-	>1000	Stosunkowo nieszkodliwe
S3	692,3±2,7	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
S4	360,0±1,4	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
S5	137,5±0,8	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
S6	89,1±1,5	10-100	Słabo toksyczny
S7	154,6±2,9	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
[NA][SAL]	565,2±5,2	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
NA	-	>1000	Stosunkowo nieszkodliwy
SAL	300,0 ±2,5	100-1000	Praktycznie nietoksyczny

^a zgodnie ze skalą oceny toksyczności ostrej według Fish and Wildlife Service

Warto zauważyć, że większość innych QASs została uznana jako znacznie bardziej toksyczne dla organizmów wodnych, co jest uważane za ich największą wadę w przypadku zastosowań komercyjnych. Warto zwrócić uwagę na sole z popularnymi kationami, takimi jak (2-hydroksyetylo)trimetyloamoniowy (cholina) lub 1-alkilo-3-metyloimidazoliowy, które mogą

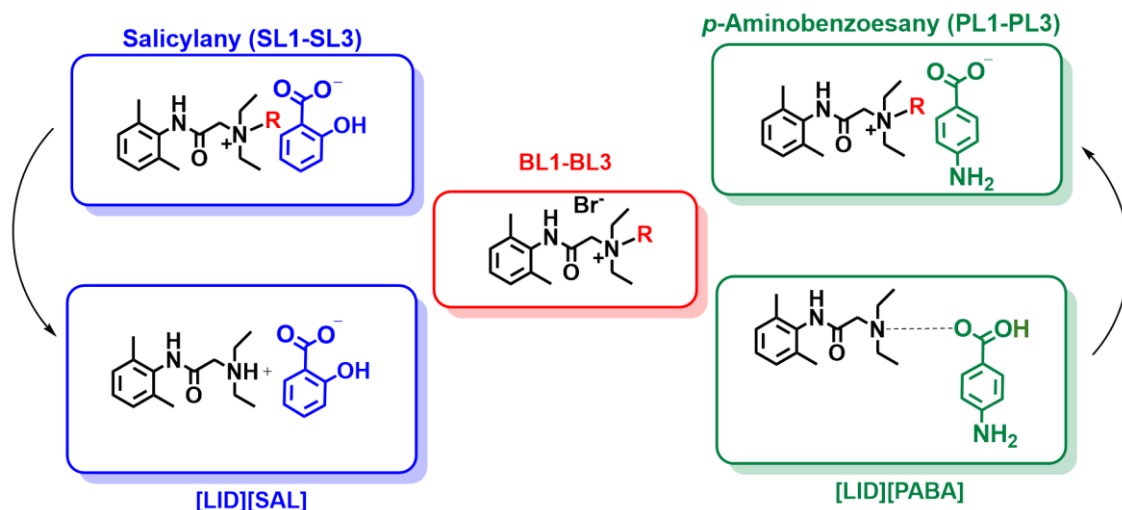
być odpowiedzialne za poziom „Umiarkowanej toksyczności” lub nawet „Wysokiej toksyczności”, z wartościami EC_{50} w zakresie 1–10 oraz 0,1–1 mg/L.^{284,285}

Badania reakcji skorupiaka słodkowodnego *Daphnia magna* na kwas salicylowy wykazały, że wyższe stężenia tego związku wywołują zaburzenia behawioralne i fizjologiczne wcześniej niż obserwowalną śmiertelność. Z kolei niższe stężenia, mieszczące się w zakresie wartości środowiskowych (do 19,50 mg/L w wodach powierzchniowych w pobliżu farm rybnych oraz 59,6 mg/L w ściekach), prowadziły do zwiększenia prędkości pływania oraz dystansu pokonywanego przez organizmy. Wyniki te sugerują, że obecność kwasu salicylowego w środowisku wodnym może istotnie modyfikować zachowanie *D. magna*, co potencjalnie wpływa na funkcjonowanie ekosystemów wodnych.²⁸⁶ Natomiast **NA** został oceniony w badaniach *in silico* za pomocą odpowiednio dobranych modeli matematycznych (QSAR) pod kątem toksyczności zgodnie z klasyfikacją GHS. Wyniki dla *D. magna* wykazały, że **NA** jest nietoksyczny dla organizmów wodnych, z EC_{50} wynoszącym 5 700 mg/L, a także nie wykazuje potencjału do bioakumulacji. Dane te pokrywają się z zebranymi wynikami badań ekotoksyczności *in vitro*, wskazując na jego bezpieczny profil środowiskowy.⁹⁰

7.3.2. Analiza salicylanów *N*-alkilolidokainy (SL1–SL3) oraz *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilolidokainy (PL1–PL3)

7.3.2.1. Synteza i analiza produktów

Synteza QASs na bazie lidokainy z anionem salicylanowym (**SL1–SL3**) oraz anionem *p*-aminobenzoesanowym (**PL1–PL3**) obejmowała dwa główne etapy: czwartorzędowanie lidokainy wybranymi linowymi 1-bromoalkanami (bromoetanem, bromooktanem oraz bromotetradekanem) w celu otrzymania bromków *N*-alkilolidokainy; oraz późniejszą wymianę anionu bromkowego na salicylan lub *p*-aminobenzoesan w celu wprowadzenia bioaktywnych przeciwjonów. Uzyskane produkty zawierały następujące podstawniki alkilowe (R): etylowy (C₂H₅) (**SL1**, **PL1**), oktylowy (C₈H₁₇) (**SL2**, **PL2**) oraz tetradecylowy (C₁₄H₂₉) (**SL3**, **PL3**). Porównawcze zestawienie otrzymanych i analizowanych w toku badań struktur związków zostało ukazane na rysunku 53.



Rysunek 53. Struktury badanych związków – alkilowych pochodnych lidokainy: bromków *N*-alkilolidokainy (**BL1–BL3**), salicylanów *N*-alkilolidokainy (**SL1–SL3**), *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilolidokainy (**PL1–PL3**), gdzie R to etyl, oktyl lub tetradecyl; oraz referencyjnych związków pozbawionych łańcucha alkilowego **[LID][SAL]** i **[LID][PABA]**.

Podczas optymalizacji etapu czwartorzędowania zaobserwowano istotne różnice w reaktywności zastosowanych bromków alkilowych. W przypadku bromku *N*-etylolidokainy (**BL1**) reakcja przeprowadzona w acetonitrylu w temperaturze 35 °C przebiegała wydajnie, choć wymagała wydłużonego czasu prowadzenia reakcji. Stosunkowo niska temperatura wrzenia bromoetanu (38 °C) pozwoliła na przeprowadzenie reakcji w łagodnych warunkach, a po kilku dniach produkt stopniowo wytrącał się z medium reakcyjnego w postaci substancji stałej, co umożliwiło jego łatwą izolację techniką filtracji próżniowej. Natomiast synteza bromków *N*-oktylo- i *N*-tetradecylolidokainy (**BL2** i **BL3**) w acetonitrylu okazała się znacznie trudniejsza. Pomimo że acetonitryl jest powszechnie uważany za jeden z najskuteczniejszych rozpuszczalników do reakcji czwartorzędowania, reakcje z długołańcuchowymi bromoalkanami przebiegały bardzo wolno i nie zaobserwowano wytrącania się produktów z mieszaniny reakcyjnej. W konsekwencji, próby izolacji produktów z jednorodnego roztworu prowadziły do bardzo niskich wydajności (poniżej 20%). Ponadto alternatywne środki alkilujące (chloroalkany) były nawet wielokrotnie mniej reaktywne niż ich analogi podstawione bromem. Próbuąc pokonać te ograniczenia, zastosowano alternatywne podejście oparte na doniesieniach literaturowych. Bazując na wcześniej opisanej procedurze bezropuszczalnikowej²⁸⁷, czwartorzędowanie przeprowadzono z użyciem dwukrotnego nadmiaru odpowiedniego bromoalkanu w warunkach bezropuszczalnikowych, w temperaturze 60 °C. Reakcja prowadzona tą metodologią umożliwia izolację pożądaných QASs z istotnie zwiększoną wydajnością, wynoszącą co najmniej 70%. Oprócz zwiększenia wydajności reakcji, podejście to znacząco zmniejszyło zużycie rozpuszczalników organicznych, które wykorzystano jedynie do przemywania otrzymanych i wyizolowanych osadów.

W drugim etapie przebadano dwie strategie zastąpienia anionu bromkowego salicylanem lub *p*-aminobenzoesanem. Pierwsza metoda polegała na wytworzeniu wodorotlenków *N*-alkilolidokainy w metanolu poprzez reakcję z wodorotlenkiem potasu, a następnie ich neutralizacji odpowiednim kwasem. Druga metoda opierała się na wymianie jonowej w środowisku wodnym, a następnie ekstrakcji dwufazowej ciecz–ciecz z chloroformem jako fazą niepolarną. Analiza porównawcza obu metod wykazała, że w przypadku salicylanów (**SL1–SL3**) podejście oparte na neutralizacji zapewniało wyższe wydajności, a także pozwala uniknąć stosowania potencjalnie toksycznego rozpuszczalnika chlorowanego (chloroformu). Co ważne, jedynie metoda oparta na neutralizacji umożliwiła uzyskanie *p*-aminobenzoesanów **PL1–PL3** z wysoką wydajnością, podczas gdy alternatywna metoda wymiany jonowej okazała się nieefektywna. Analiza spektroskopowa wykazała, że wymiana bromku z anionem *p*-aminobenzoesanowym w wodzie zachodziła tylko w bardzo ograniczonym zakresie, a widma NMR wykazały jedynie śladowe sygnały odpowiadające obecności pożądanego anionu. Niemniej jednak opracowana metodologia pozwoliła na otrzymanie zarówno salicylanów (**SL1–SL3**), jak i *p*-aminobenzoesanów (**PL1–PL3**) lidokainy z wysoką wydajnością przekraczającą 90% (Tabela 7).

Tabela 7. Zsyntezowane czwartorzędowe sole amoniowe na bazie lidokainy.

Związek	R	Anion	Postać w 25°C	Temperatura topnienia (°C)	Wydajność (%)
[LID][Cl]	---	Chlorek	Ciało stałe	73-75	---
BL1	C ₂ H ₅	Bromek	Ciało stałe	225-227	91
BL2	C ₈ H ₁₇		Ciało stałe	119-121	70
BL3	C ₁₄ H ₂₉		Ciało stałe	84-88	87
[LID][SAL]	---	Salicylan	Ciecz	---	99 ^a
SL1	C ₂ H ₅		Ciało stałe	127-130	97 ^b / 90 ^c
SL2	C ₈ H ₁₇		Maź	---	95 ^b / 92 ^c
SL3	C ₁₄ H ₂₉		Maź	---	96 ^b / 87 ^c
[LID][PABA]	---	Kwas <i>p</i> -aminobenzoesowy	Ciecz	---	99 ^a
PL1	C ₂ H ₅	<i>p</i> -Aminobenzoesan	Ciało stałe	197-199	98 ^b / --- ^{c,d}
PL2	C ₈ H ₁₇		Stan szklisty	---	96 ^b / --- ^{c,d}
PL3	C ₁₄ H ₂₉		Maź	---	94 ^b / --- ^{c,d}

^a brak etapu oczyszczania; ^b wydajność obliczona na podstawie neutralizacji kwasowo-zasadowej w metanolu; ^c wydajność oparta na wymianie jonowej i następującej po niej ekstrakcji dwufazowej; ^d wymiana jonowa zachodzi w śladowych ilościach

Zgodnie z danymi w tabeli A39 w aneksie zawartość bromków w otrzymanych produktach wahała się w przedziale od 2 431 do 5 489 ppm. Otrzymanie układów [LID][SAL] i [LID][PABA] polegało na zmieszaniu lidokainy z odpowiednimi kwasami i nie wymagało

żadnego etapu oczyszczania. W efekcie produkty te otrzymano z najwyższą wydajnością dochodzącą do 100%.

Z technologicznego punktu widzenia opracowane procedury syntezy QASs (**SL1–SL3** i **PL1–PL3**) obejmują stosunkowo łagodne warunki reakcji, bezrozpuszczalnikowy etap czwartorzędowania pochodnych długołańcuchowych oraz prostą neutralizację kwasowo-zasadową. Należy jednak zaznaczyć, że etap czwartorzędowania przebiegający stosunkowo wolno (nawet kilkudniowo) może stanowić ograniczenie z perspektywy dalszego skalowania procesu. Mimo to zaproponowane podejście eliminuje konieczność czasochłonnych etapów ekstrakcyjnych, co może być korzystne z punktu widzenia organizacji procesu oraz jego aspektów środowiskowych. W konsekwencji metoda ta stanowi obiecującą podstawę do dalszej optymalizacji w kierunku skalowalnego otrzymywania wielofunkcyjnych układów jonowych na lidokainie do zastosowań farmaceutycznych.

Jak zestawiono w tabeli 7, stan fizyczny w 25 °C oraz zakresy temperatur topnienia otrzymanych związków wyraźnie zależą zarówno od długości łańcucha alkilowego, jak i natury przeciwjonu. **[LID][Cl]** jest krystalicznym ciałem stałym o temperaturze topnienia 73–75 °C, co potwierdza dane literaturowe.²⁸⁸ **[LID][SAL]** i **[LID][PABA]** występują jako ciecze w temperaturze pokojowej, co wskazuje na powstawanie niskotopliwych układów jonowych i eutektycznych (potwierdzonych dodatkowo przeprowadzoną analizą spektralną). Czwartorzędowanie lidokainy znacząco zwiększa temperatury topnienia krótkich pochodnych alkilowych, jak zaobserwowano dla **BL1** (225–227 °C). Natomiast wydłużenie łańcucha alkilowego prowadzi do stopniowego spadku temperatur topnienia, przy czym **BL2** i **BL3** topią się odpowiednio w 119–121 °C i 84–88 °C. Wprowadzenie bioaktywnych anionów organicznych prowadzi do dalszej modyfikacji właściwości fizycznych. Wśród czwartorzędowych pochodnych lidokainy, związki zawierające najkrótszy (etylowy) łańcuch alkilowy (**SL1** i **PL1**) to krystaliczne ciała stałe o temperaturach topnienia odpowiednio 127–130°C i 197–199°C. Z kolei wydłużenie podstawnika alkilowego do oktylu czy tetradecylu znacząco zmniejsza stabilność sieci krystalicznej, prowadząc do otrzymania związków w postaci substancji mazistych (**SL2**, **SL3** i **PL3**) lub faz szklistych (**PL2**). Struktury prekursorów (**[LID][Cl]**, **BL1–BL3**), układów **[LID][SAL]** i **[LID][PABA]** oraz zsyntetyzowanych QASs **SL1–SL3** oraz **PL1–PL3** potwierdzono za pomocą szeregu technik spektroskopowych UV i FT-IR, ¹H i ¹³C NMR. Zebrane widma przedstawiono na stronach 191–202 oraz na rysunkach A37–A60 w aneksie).

Widma UV badanych związków wykazują intensywną absorpcję w zakresie poniżej 250 nm bez wyraźnie zdefiniowanego maksimum, co jest typowe dla przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ związanych z układami aromatycznymi i sprzężonymi. W zakresie dłuższych fal zaobserwowano wyraźne różnice w zależności od przeciwjonu. Formy halogenkowe (**[LID][Cl]** i **BL1–BL3**) wykazywały

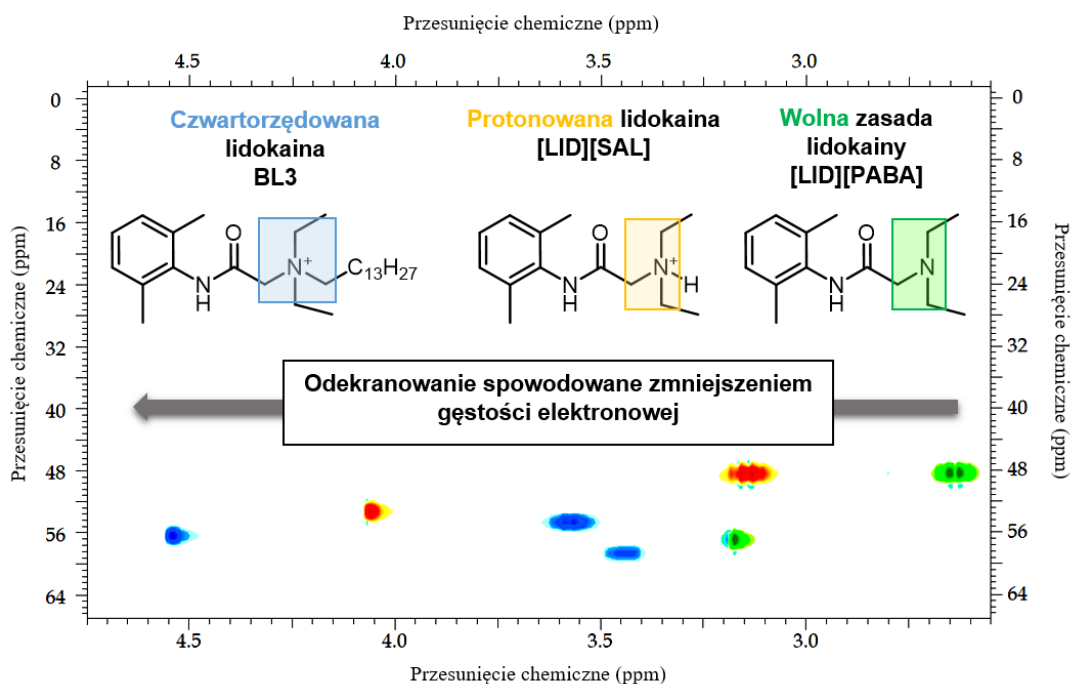
słabe maksimum absorpcji przy około 262–263 nm. Natomiast pochodne salicylanu ([**LID**][**SAL**] i **SL1–SL3**) wykazywały maksimum przesunięte batochromowo przy około 297–298 nm, podczas gdy związki zawierające anion *p*-aminobenzoesu ([**LID**][**PABA**] i **PL1–PL3**) wykazywały maksima w zakresie 273–287 nm. Ponadto w widmie [**LID**][**PABA**] obserwuje się wyraźne przesunięcie w kierunku dłuższych fal (o około 14 nm) w porównaniu z odpowiadającymi mu pochodnymi czwartorzędownymi. Zjawisko to można wiązać z różnicami w oddziaływaniach międzycząsteczkowych oraz strukturze elektronowej i może ono wskazywać na niejonowy charakter tego układu. Wyraźny wpływ przeciwjonu w otrzymanych QASs obserwuje się również w molowych współczynnikach absorpcji (ϵ). Układy zawierające **PABA** wykazują najwyższe wartości ϵ (10 000–12 500 M⁻¹ cm⁻¹), które są około 3–4 razy wyższe niż wartości obserwowane dla pochodnych salicylowych (2500–3700 M⁻¹ cm⁻¹) i prawie 30 razy wyższe niż wartości obserwowane dla form halogenkowych (360–440 M⁻¹ cm⁻¹). Wyniki te wskazują na silny wpływ anionu aromatycznego na przejścia elektronowe i ogólne właściwości absorpcyjne UV badanych układów na bazie lidokainy.

Porównanie widm FT-IR prekursorów (rysunek A64 w aneksie) ujawnia charakterystyczne cechy związane z protonowaną formą lidokainy oraz obecnością wody w jej soli chlorowodorkowej. W widmie [**LID**][**Cl**] obserwuje się dodatkowe, szerokie pasmo w zakresie 2200–2600 cm⁻¹, przypisywane oddziaływaniom charakterystycznym dla formy chlorowodorkowej, opisywanym w literaturze. Pasma to nie występuje w widmie lidokainy w postaci wolnej zasady.²⁸⁹ Ponadto szerokie pasmo w zakresie 3300–3500 cm⁻¹ można przypisać drganiom rozciągającym O–H pochodzącym z zaadsorbowanej wody. Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w pochodnych czwartorzędownych pasma w zakresie 2800–3000 cm⁻¹, odpowiadające drganiom rozciągającym C–H grup alifatycznych –CH₂– i –CH₃, stają się stopniowo bardziej intensywne. Charakterystyczne pasmo obserwowane w zakresie około 1650–1700 cm⁻¹ przypisuje się drganiom rozciągającym C=O grupy amidowej obecnej w strukturze lidokainy. Dodatkowe intensywne pasma pojawiające się w zakresie 1500–1550 cm⁻¹ i 1450–1500 cm⁻¹ są związane z drganiami rozciągającymi C=C w aromatycznych atomach oraz drganiami zginającymi N–H w ugrupowaniu amidowym, natomiast sygnały w zakresie 750–800 cm⁻¹ można przypisać drganiom zginającym C–H poza płaszczyznę podstawionego pierścienia aromatycznego.

Po zastąpieniu anionu bromkowego salicylanem lub *p*-aminobenzoesanem, ogólne profile widm pozostały w dużej mierze podobne, odzwierciedlając zachowaną strukturę lidokainy (rysunki A65 i A66 w aneksie). Jednak dla **SL1–SL3** oraz **PL1–PL3** w zakresie 1600–1650 cm⁻¹ pojawiło się dodatkowe pasmo, które można przypisać asymetrycznym drganiom rozciągającym grupy karboksylanowej (COO⁻) pochodzącym od anionów organicznych. Jednocześnie

systematyczny wzrost intensywności alifatycznych pasm rozciągających C–H ($2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego utrzymuje się dla wszystkich pochodnych. Co ciekawe, widmo układu **[LID][PABA]** wykazywało pasma przesunięte o około $20\text{--}30\text{ cm}^{-1}$ w porównaniu z pochodnymi jonowymi, co jest zgodne z brakiem rzeczywistej interakcji jonowej i potwierdza wniosek, że układ ten reprezentuje mieszaninę fizyczną, a nie dobrze zdefiniowany związek jonowy.

Analiza porównawcza widm ^1H NMR przedstawiona na rysunku A67 (w aneksie) wskazała na przeniesienie protonów w układzie lidokaina–salicylan (**[LID][SAL]**), prowadzące do utworzenia pary jonowej o cechach analogicznych do obserwowanych dla chlorowodoru lidokainy. Natomiast w przypadku układu lidokaina–*p*-aminobenzoesan (**[LID][PABA]**) nie zaobserwowano istotnych zmian widmowych w porównaniu z wolną lidokainą, co kolejny raz sugeruje, że układ ten stanowi mieszaninę fizyczną, a nie prawdziwy związek jonowy. Zebrane widma 2D HSQC $^1\text{H}\text{--}^{13}\text{C}$ NMR dla **[LID][SAL]**, **[LID][PABA]** i salicylanu *N*-tetradecylidokainy (**SL3**), przedstawione w aneksie na rysunkach A68–A70, dodatkowo potwierdzają te rozbieżności. Na rysunku 54 przedstawiono zależność położenia sygnałów grup metylenowych, zlokalizowanych w pobliżu atomu azotu, od gęstości elektronowej w uzyskanych widmach 2D HSQC. Warto zauważyć, że zmniejszenie gęstości elektronowej wokół atomu azotu powoduje odekranowanie, co skutkuje przesunięciem sygnałów w kierunku wyższej wartości przesunięcia chemicznego. Ponadto czwartorzędowa postać lidokainy (kolor niebieski) posiada dodatkowy, trzeci sygnał pochodzący z grupy metylenowej od przyłączonego łańcucha alkilowego.



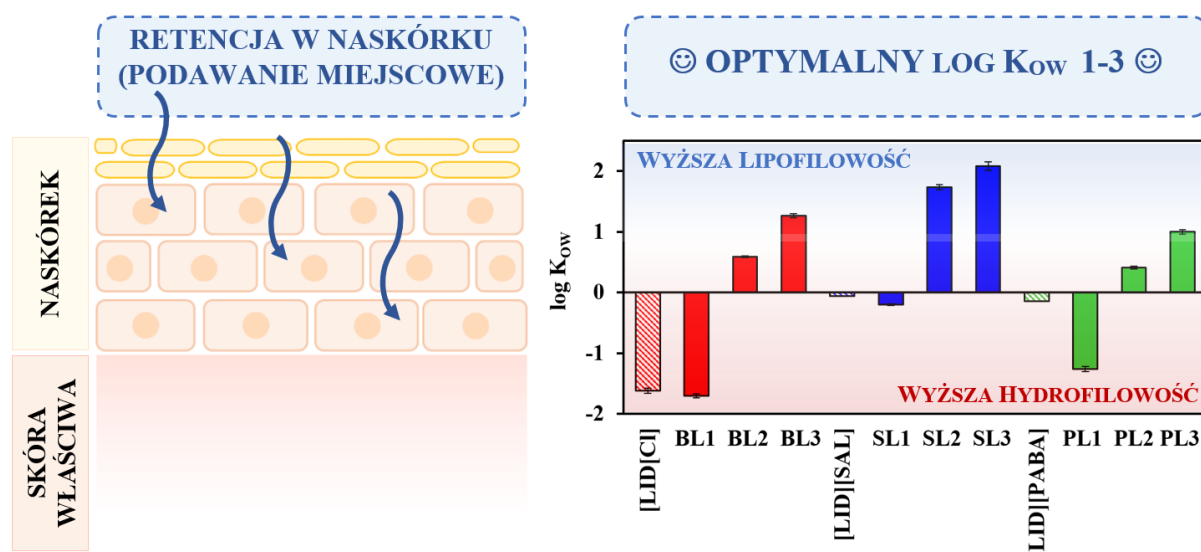
Rysunek 54. Różnice w położeniu sygnałów grup metylenowych bezpośrednio związanych z atomem azotu w widmach 2D HSQC dla badanych pochodnych lidokainy.

Ponadto na porównawczych widmach ^1H NMR dla jonowych pochodnych lidokainy (zestawionych na rysunkach A71–A73 w aneksie) można zaobserwować systematyczne zmiany intensywności sygnału przy 1,3 ppm dla soli **BL1–BL3**, **SL1–SL3** oraz **PL1–PL3** wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. W przypadku pochodnych zawierających dłuższe łańcuchy alkilowe (oktyl i tetradecyl) pojawiają się dodatkowe charakterystyczne sygnały, w tym sygnały terminalnej grupy $-\text{CH}_3$ przy około 0,9 ppm oraz sygnały metylenowe związane z fragmentem $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ przy około 1,7 i 3,4 ppm. Sygnały odpowiadające aromatycznym protonom anionów organicznych w związkach **SL1–SL3** oraz **PL1–PL3** obserwuje się w zakresie 6–8 ppm.

Zawartość wody w analizowanych związkach (tabela A39 w aneksie) określono zarówno bezpośrednio po oczyszczeniu, jak i po przechowywaniu w kontakcie z powietrzem (wilgotność 60%, temperatura pokojowa) przez okres do 7 dni, co pozwoliło na ocenę ich higroskopijności. Najwyższą zawartość wody w początkowym pomiarze po procesie suszenia (0 dni) zaobserwowano dla związku **PL2** (2,53%), który występuje jako materiał szklisty. W tym przypadku utrata płynności prawdopodobnie prowadzi do częściowego uwięzienia cząsteczek wody w nieuporządkowanej strukturze, co utrudnia ich usunięcie podczas suszenia. Natomiast najniższą początkową zawartość wody stwierdzono dla **BL1** (0,60%), a następnie dla pozostałych prekursorów (**BL2** i **BL3**), które również wykazywały stosunkowo niskie wartości (0,72–0,86%). Należy zauważyć, że stosunkowo wysoka zawartość wody w **[LID][Cl]** (7,39%) wynika z faktu, że dostępny komercyjnie związek jest sprzedawany w postaci hydratu. Wyniki wskazują również, że stan fizyczny związków odgrywa ważną rolę w zatrzymywaniu wody. **[LID][Sal]** i **[LID][PABA]**, które występują jako lepkie ciecze, zawierały zauważalnie większe ilości wody (odpowiednio 1,10% i 2,01%). W takich układach cząsteczki wody mogą zostać częściowo uwięzione w strukturze cieczy, co utrudnia ich całkowite usunięcie. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku półstałych, mazistych produktów (**SL2**, **SL3** i **PL3**), które również wykazywały stosunkowo wyższą zawartość wody w porównaniu z krystalicznymi ciałami stałymi. Natomiast pochodne **SL1** i **PL1** zawierały około 1% wody, co wskazuje, że z układów o uporządkowanej strukturze znacznie łatwiej usunąć pozostałości rozpuszczalnika niż z substancji ciekłych, jak i mazistych. Pomimo tych różnic w początkowej zawartości wody, wzrost wilgotności podczas przechowywania był generalnie bardzo niewielki dla wszystkich związków. Największe zmiany, wynoszące około 0,4% po siedmiu dniach, zaobserwowano w układach ciekłych **[LID][Sal]** i **[LID][PABA]**, podczas gdy czwartorzędowe związki **SL1–SL3** oraz **PL1–PL3** wykazywały jedynie minimalne zmiany. Wyniki te wskazują, że zsyntetyzowane jonowe pochodne lidokainy wykazują niską higroskopijność i można je przechowywać w standardowych warunkach laboratoryjnych.

7.3.2.2. Współczynnik podziału oktanol–woda

Aby zbadać równowagę między hydrofilowością a lipofilowością badanych pochodnych lidokainy i określić tym samym ich powinowactwo do środowiska wodnego w porównaniu z lipidowym wyznaczono dla nich współczynnik podziału oktanol–woda ($\log K_{OW}$). Zgodnie z danymi przedstawionymi na rysunku 55 (oraz w tabeli A40 w aneksie) zmierzone wartości $\log K_{OW}$ wahają się przedziale od -1,70 do 2,08. Zauważono, że **[LID][CI]**, **[LID][SAL]** i **[LID][PABA]** są względnie hydrofilowe, wykazując wartości $\log K_{OW}$ odpowiednio -1,62, -0,06 i -0,14. Oznacza to, że zarówno salicylan jak i *p*-aminobenzoesan lidokainy tworzyły układy o niemal zrównoważonym powinowactwie do fazy wodnej i organicznej. W przypadku QASs **SL1–SL3** oraz **PL1–PL3**, jak również ich prekursorów (**BL1–BL3**), zaobserwowano wyraźny wzrost lipofilowości wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego, co jest zgodne z ogólnymi trendami odnotowanymi dla układów amfifilowych i surfaktantów jonowych.²⁷⁵



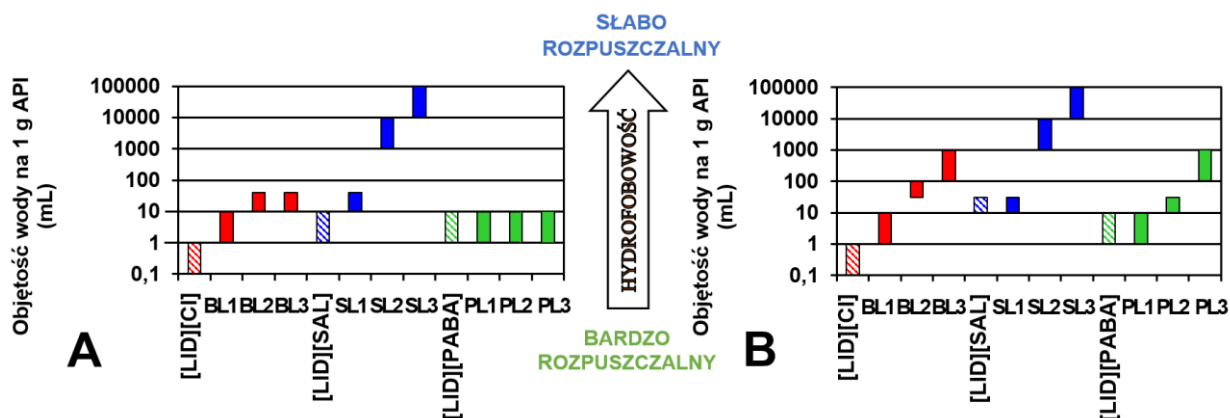
Rysunek 55. Wartości współczynnika podziału oktanol–woda pochodnych lidokainy z anionem halogenu (**[LID][CI]** i QASs **BL1–BL3**), salicylanem (**[LID][SAL]** i QASs **SL1–SL3**) oraz *p*-aminobenzoesanem (**[LID][PABA]** i QASs **PL1–PL3**).

Dla bromków **BL1–BL3** wartości $\log K_{OW}$ wzrosły zauważalnie z -1,70 do 1,26 wraz z wydłużeniem grupy alkilowej. Zauważono również, że QASs zawierające anion **PABA** (**PL1–PL3**) wykazały jedynie niewielkie zmiany w porównaniu z ich bromkowymi odpowiednikami. W efekcie związek **PL1** wykazywał nieznacznie wyższą wartość $\log K_{OW}$ (-1,26) w porównaniu z **BL1**, podczas gdy związki **PL2** i **PL3** wykazywały nieznacznie niższe wartości (odpowiednio 0,41 i 1,00) niż odpowiadające im bromki **BL2** i **BL3**. Takie zachowanie może wynikać z obecności grupy aminowej w strukturze **PABA**, która zwiększa polarność anionu i częściowo kompensuje hydrofobowy wkład łańcucha alkilowego. W przypadku salicylanów **SL1–SL3** wartości wzrosły z -0,20 do odpowiednio 1,73 i 2,08. W tym przypadku, wymiana bromku na anion salicylanowy spowodowała znaczny wzrost lipofilowości w porównaniu

z odpowiadającymi solami bromkowymi. Efekt ten jest szczególnie wyraźny w przypadku pochodnych o dłuższych łańcuchach alkilowych i częściowo można go także powiązać z aromatycznym oraz stosunkowo hydrofobowym charakterem anionu salicylanowego. Co istotne, uzyskane wartości $\log K_{OW}$ dobrze korelują z wynikami rozpuszczalności omówionymi w pkt. 7.3.2.3. Najwyższą lipofilowość zaobserwowano dla związków **SL2** i **SL3**, które wykazują wartości $\log K_{OW}$ powyżej 1,5, co wyjaśnia ich wyjątkowo niską rozpuszczalność w wodzie i PBS. Z kolei pochodne o niższych wartościach $\log K_{OW}$ wykazały znacznie lepszą rozpuszczalność w wodzie. Dla porównania, powszechnie stosowane środki znieczulające miejscowo, takie jak lidokaina i benzokaina, zazwyczaj wykazują wartości $\log K_{OW}$ w zakresie ok. 2–3, podczas gdy bardziej hydrofilowe sole znieczulające wykazują znacznie niższe wartości.²⁹⁰ Zakres lipofilowości obserwowany dla większości badanych związków mieści się zatem w obszarze uważanym za korzystny dla miejscowych systemów farmaceutycznych. Ogólnie rzecz biorąc, zebrane wyniki potwierdzają, że lipofilowość układów jonowych na bazie lidokainy można skutecznie regulować poprzez odpowiednie modyfikacje strukturalne.

7.3.2.3. Rozpuszczalność w wodzie destylowanej i PBS

Rozpuszczalność różnych form lidokainy: **[LID][Cl]** i QASs **BL1–BL3**, **[LID][SAL]** i QASs **SL1–SL3** oraz **[LID][PABA]** i QASs **PL1–PL3**, określono zarówno w wodzie destylowanej, która stanowi powszechne medium formulacyjne, jak i w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS; pH 7,4), który imituje warunki fizjologiczne płynów ustrojowych. Uzyskane wyniki sklasyfikowano zgodnie z klasami rozpuszczalności zdefiniowanymi przez Farmakopeę Stanów Zjednoczonych i Farmakopeę Brytyjską (BP).⁵⁹ Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 56 (dokładne dane znajdują się w tabeli A41 w aneksie).



Rysunek 56. Rozpuszczalność pochodnych lidokainy z halogenem (**[LID][Cl]** i QASs **BL1–BL3**), salicylanem (**[LID][SAL]** i QASs **SL1–SL3**) oraz *p*-aminobenzoesanem (**[LID][PABA]** i QASs **PL1–PL3**) w wodzie destylowanej (A) oraz PBS (B).

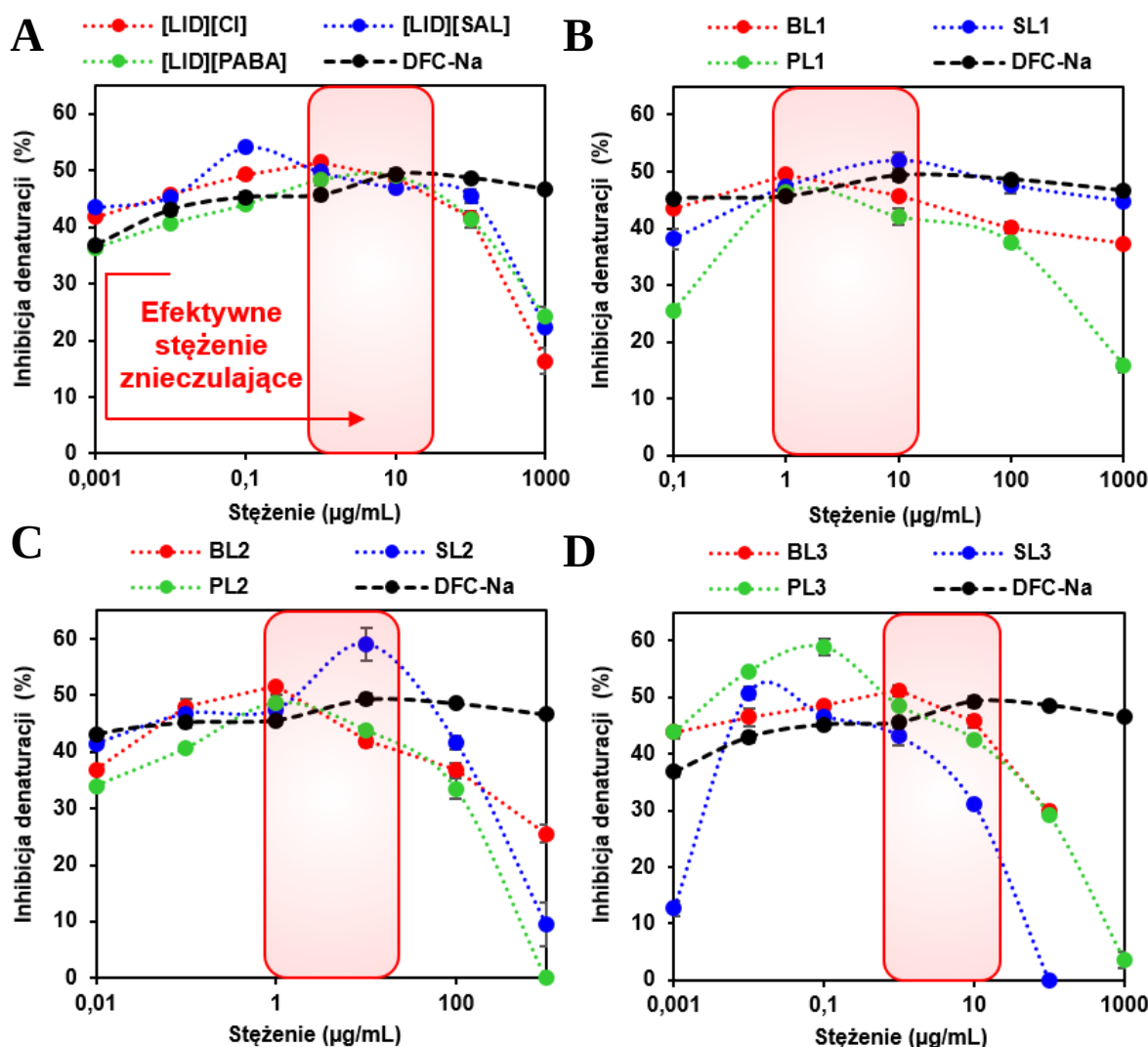
Spośród badanych układów, **[LID][CI]** wykazał najwyższą rozpuszczalność w obu mediach i sklasyfikowano go jako „Bardzo rozpuszczalny”. **[LID][SAL]** i **[LID][PABA]** były również wysoce rozpuszczalne, należąc do kategorii „Łatwo rozpuszczalnych” w wodzie, chociaż w przypadku salicylanu lidokainy zaobserwowano niewielki spadek rozpuszczalności w PBS. Ogólnie zaobserwowano wyraźny związek między długością łańcucha alkilowego a rozpuszczalnością. W przypadku prekursorów bromkowych (**BL1–BL3**) wydłużenie podstawnika alkilowego skutkowało stopniowym spadkiem rozpuszczalności w wodzie. **BL1** (z grupą etylową) pozostał „Łatwo rozpuszczalny” zarówno w wodzie, jak i PBS (1–10 mL rozpuszczalnika na 1 g substancji rozpuszczonej), podczas gdy **BL2** (zawierający łańcuch oktylowy) wykazał niższą rozpuszczalność, będąc sklasyfikowanym jako „Rozpuszczalny” w wodzie i „Trudno rozpuszczalny” w PBS. Pochodna o najdłuższym łańcuchu, **BL3** (zawierająca łańcuch tetradecylowy), wykazywała dalszy spadek rozpuszczalności, osiągając kategorię „Rozpuszczalny” lub nawet „Słabo rozpuszczalny” w zależności od medium.

Co ciekawe, QASs na bazie salicylanów (**SL1–SL3**) wykazywały wyraźny spadek rozpuszczalności wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Podczas gdy **SL1** pozostawał „Rozpuszczalny”, związki z dłuższymi alkilami (**SL2** i **SL3**) wykazywały wyjątkowo niską rozpuszczalność, zaliczając się do klasy „Bardzo słabo rozpuszczalny” i „Praktycznie nierozpuszczalny”. To zachowanie było dość nieoczekiwane, biorąc pod uwagę obecność grupy hydroksylowej w anionie salicylanu, która potencjalnie mogłaby nasilać interakcje z wodą. Z kolei pochodne zawierające anion **PABA** (**PL1–PL3**) wykazywały znacznie lepszą rozpuszczalność. **PL1** i **PL2** były „Łatwo rozpuszczalne” w wodzie, podczas gdy **PL3** nadal klasyfikowano jako „Łatwo rozpuszczalny” w wodzie, ale wykazywały zmniejszoną rozpuszczalność w PBS. Poprawa rozpuszczalności w wodzie tych pochodnych może być związana z obecnością grupy aminowej w strukturze **PABA**, która może nasilać oddziaływania wiązań wodorowych z cząsteczkami wody. Ogólnie rzecz biorąc, chociaż rozpuszczalność w PBS była sporadycznie niższa niż w wodzie destylowanej, różnica ta nie jest tak istotna w kontekście zamierzonych lokalnych zastosowań farmaceutycznych, gdzie rozpuszczanie zachodzi głównie w środowisku formulacji, a nie w krążeniu ogólnoustrojowym.²⁹¹ Uzyskane wyniki wskazują, że właściwości fizykochemiczne syntetyzowanych związków można skutecznie dostosować poprzez dostosowanie zarówno długości łańcucha alkilowego, jak i charakteru przeciwjonu, co stanowi użyteczne wskazówki do projektowania nowych QASs.

7.3.2.4. Ocena potencjału przeciwwzapalnego: test denaturacji albuminy

Potencjał przeciwwzapalny otrzymanych pochodnych lidokainy oceniono pod kątem ich zdolności do hamowania denaturacji albuminy jaja kurzego, a zebrane wyniki przedstawiono

na rysunku 57 oraz w tabeli A42 w aneksie. Powszechnie stosowany lek – **[LID][Cl]** wykazywał stabilną aktywność przeciwzapalną, osiągając maksymalnie 51,4% przy stężeniu 1 $\mu\text{g/mL}$. Chociaż jego aktywność była porównywalna z aktywnością kilku zsyntetyzowanych pochodnych lidokainy, nie przewyższała ona najaktywniejszych związków. Prekursory z anionem bromkowym (**BL1–BL3**) również wykazywały znaczną aktywność przeciwzapalną, sięgającą 51,6% (**BL2**, 1 $\mu\text{g/mL}$) i 51,2% (**BL3**, 1 $\mu\text{g/mL}$). Jednak ich profile aktywności były mniej zależne od stężenia i mniej zróżnicowane w porównaniu z odpowiadającymi im solami (**SL1–SL3**) oraz (**PL1–PL3**), co sugeruje, że modulacji właściwości biologicznych nie można osiągnąć wyłącznie poprzez zmianę długości łańcucha alkilowego bez doboru odpowiedniego przeciwnionu.



Rysunek 57. Inhibicja denaturacji albuminy przez formy lidokainy: pozbawione łańcucha alkilowego (**A**), z łańcuchem etylowym (**B**), z łańcuchem oktylowym (**C**), z łańcuchem tetradecylowym (**D**), w porównaniu z lekiem referencyjnym – solą sodową diklofenaku (DFC-Na). Na wykresach zaznaczono wartości minimalnego efektywnego stężenia lidokainy w skórze właściwej.

Zarówno protonowa ciecz jonowa otrzymana z lidokainy i kwasu salicylowego **[LID][SAL]**, jak i mieszanina **[LID][PABA]** wykazały umiarkowaną aktywność, z wartościami inhibicji w zakresie 45,0–54,0% w szerokim spektrum stężeń. Co godne uwagi, **[LID][SAL]**

osiągnął maksimum 54,1% przy stężeniu 0,1 $\mu\text{g/mL}$, co wskazuje, że obecność anionu salicylanowego pozostaje korzystna nawet w przypadku braku hydrofobowego łańcucha alkilowego. Natomiast **[LID][PABA]** wykazał nieco niższą i bardziej jednorodną aktywność (maksymalnie 49,0%), co sugeruje brak porównywalnego efektu synergistycznego. Pomimo jonowej natury, **[LID][SAL]** wykazał wyższą aktywność niż niejonowy układ **[LID][PABA]**, co wskazuje, że jonowość nie ogranicza z natury interakcji białkowych w tym modelu oraz budowa anionu jest także kluczowym czynnikiem determinującym tę właściwość.

W przypadku pochodnych zawierających aniony salicylanowe (**SL1–SL3**) i **PABA** (**PL1–PL3**) zaobserwowano wyraźną zależność aktywności biologicznej od długości łańcucha alkilowego. Związki o krótkich i średnich łańcuchach alkilowych wykazywały najwyższą aktywność, z wartościami inhibicji przekraczającymi 50,0%. Co istotne, związek **SL2** osiągnął maksymalne hamowanie denaturacji na poziomie 59,1% przy stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$, podczas gdy związek **PL3** wykazywał wyraźną aktywność już przy niskich stężeniach (58,9% przy stężeniu 0,1 $\mu\text{g/mL}$ i 54,6% przy stężeniu 0,01 $\mu\text{g/mL}$). Natomiast pochodne z najkrótszym łańcuchem alkilowym (**SL1** i **PL1**) wykazywały umiarkowaną, ale stosunkowo stabilną aktywność (około 38,0–47,0% w zakresie 0,1–100 $\mu\text{g/mL}$), co wskazuje na ich zmniejszoną wrażliwość na zmiany stosowanych stężeń. Zauważono, że dalsze wydłużanie łańcucha alkilowego nie poprawia aktywności, lecz prowadzi do jej wyraźnego spadku przy wyższych stężeniach. W efekcie **SL3** wykazał spadek wartości z 50,8% przy stężeniu 0,01 $\mu\text{g/mL}$ do całkowitego braku wykrywalnej aktywności przy stężeniu 100 $\mu\text{g/mL}$, podczas gdy aktywność **PL3** spadła do zaledwie 3,6% przy stężeniu 1000 $\mu\text{g/mL}$. Zaobserwowane różnice można wyjaśnić wyższą tendencją do agregacji pochodnych długołańcuchowych, co może utrudniać rozpuszczalność, jak i dostęp do miejsc wiązania z białkami. Charakter anionu również odgrywał znaczącą rolę w modulacji aktywności. Pochodne zawierające salicylany generalnie przewyższały swoje analogi **PABA**. Warto zauważyć, że związek **SL2** osiągnął 59,1% hamowania, podczas gdy odpowiadający mu związek **PL2** osiągnął maksymalnie 48,6% przy stężeniu 1 $\mu\text{g/mL}$. Obserwacja ta może wskazywać na synergistyczny udział anionu salicylanowego, który jako znany środek przeciwzapalny mógłby dodatkowo wpływać na stabilizację białka lub zakłócać proces denaturacji.

Diklofenak sodowy (DFC-Na), stosowany jako referencyjny lek przeciwzapalny, wykazywał wysoką i stosunkowo stałą aktywność (45,2–49,3% w zakresie stężeń 0,1–100 $\mu\text{g/mL}$). W tym kontekście szczególnie godny uwagi jest fakt, że część zsyntezowanych QASs przewyższała aktywność DFC-Na, zwłaszcza związki **SL2** (59,1%) i **PL3** przy niskich stężeniach (58,9%), co wskazuje na ich znaczny potencjał aplikacyjny. Ponadto najwyższą aktywność przeciwzapalną zaobserwowano przy niskich stężeniach ($\leq 0,1$ –10 $\mu\text{g/mL}$),

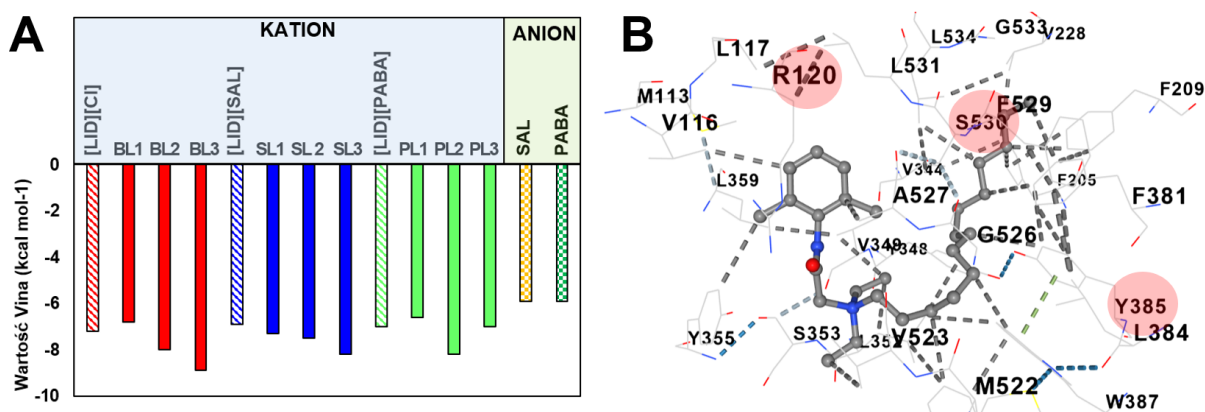
co jest istotne, biorąc pod uwagę fakt, że jedynie niewielka część miejscowo stosowanej lidokainy przenika przez skórę właściwą.

Lidokaina wywiera działanie przeciwbólowe przede wszystkim poprzez blokowanie kanałów sodowych, a badania wykazały hamowanie kanałów w zakresie odpowiadającym około 1–20 $\mu\text{g/mL}$.^{292,293} Jednak w przypadku stosowania miejscowego skuteczne stężenie w miejscu działania zależy od bariery przepuszczalności skóry i minimalne skuteczne stężenie w skórze właściwej wynosi około 12 $\mu\text{g/mL}$.²⁹⁴ Dlatego też obserwowane działanie otrzymanych QASs już w niskich stężeniach wskazuje na ich potencjalną skuteczność w zastosowaniach miejscowych. W licznych badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano również, że lidokaina może wykazywać działanie przeciwzapalne i immunomodulacyjne, co pozostaje spójne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Dodatkowo w literaturze opisano, że jej okołoperacyjne podanie dożylnie może zmniejszać nasilenie bólu pooperacyjnego oraz zapotrzebowanie na opioidy, co w konsekwencji przyczynia się do skrócenia czasu hospitalizacji.²⁹⁵

Przeprowadzone badania wskazują, że długość łańcucha alkilowego i dobór anionów to kluczowe parametry strukturalne wpływające na działanie przeciwzapalne w badanych układach. Obecność anionu salicylowego jest szczególnie korzystna, natomiast długość łańcucha hydrofobowego, w zależności od użytego stężenia, może pozytywnie lub negatywnie wpływać na skuteczność inhibicji denaturacji jaja kurzego.

7.3.2.5. Ocena potencjału przeciwzapalnego: dokowanie molekularne oparte na strukturze cyklooksygenazy-2 (COX-2)

Analizę dokowania molekularnego wykorzystano do oceny potencjalnych sposobów oddziaływania QASs z anionem salicylanowym (**SL1–SL3**) oraz *p*-aminobenzoesanowym (**PL1–PL3**) z enzymem cyklooksygenazą-2 (COX-2). W celu lepszego porównania zebranych wyników do analizy włączono również odpowiednie układy referencyjne: pochodne lidokainy z anionem halogenkowym (**[LID][Cl]** oraz **BL1–BL3**), jak i **[LID][SAL]**, **[LID][PABA]**, **SAL** oraz **PABA**. Wszystkie analizowane ligandy zostały konsekwentnie zadokowane w tej samej głównej jamie wiążącej (kieszka *C1*), obejmującej kluczowe reszty katalityczne **R120**, **Y385** i **S530**, a także reszty stabilizujące **S353**, **L352** i **V523**, które łącznie definiują architekturę miejsca aktywnego COX-2. Jak przedstawiono na rysunku 58 (a także tabeli A43 w aneksie). Uzyskane wyniki *Vina score* wahały się w przedziale od -6,6 do -8,9 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ dla kationów, co wskazuje na ich umiarkowane do silnego powinowactwo wiązania względem enzymu COX-2.



Rysunek 58. Uzyskane wartości *Vina score* dla testowanych związków (A); wizualizacja oddziaływań białko–ligand obserwowanych dla **BL3** z zaznaczonymi głównymi resztami katalitycznymi (B).

Prekursor **[LID][Cl]** wykazywał powinowactwo na poziomie $-7,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, tworząc interakcje ze wszystkimi trzema resztami katalitycznymi (**R120**, **Y385**, **S530**), co jest zgodne z jego znanym umiarkowanym potencjałem przeciwzapalnym. Analizując wyniki zaobserwowano wyraźny wzrost powinowactwa wiązania wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego w syntetyzowanych QASs. Prekursory **BL2** i **BL3** wykazały znacząco lepsze wyniki dokowania (odpowiednio $-8,0$ i $-8,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), którym towarzyszyły jednoczesne interakcje z pełnymi resztami katalitycznymi (**R120**, **Y385**, **S530**), jak i stabilizującymi (**S353**, **V523**, **L352**). Podobną tendencję zaobserwowano dla soli **SL1–SL3** oraz **PL1–PL3**. Związki **SL2**, **SL3** i **PL2** wykazywały stosunkowo silne powinowactwo wiązania (od $-7,5$ do $-8,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), przy czym sposoby wiązania obejmowały zarówno reszty katalityczne, jak i stabilizujące, co sugeruje efektywne zajęcie miejsca aktywnego COX-2. Natomiast pochodne o krótszych łańcuchach (**BL1** i **PL1**) wykazywały wyraźnie słabsze wiązanie (około $-6,7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) i oddziaływały z mniejszą liczbą reszt katalitycznych, zazwyczaj nie mając kontaktu z **Y385**, co może wskazywać na suboptymalne umiejscowienie w kanale katalitycznym. Najsilniejsze wiązanie, równe $-8,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, zaobserwowano dla **BL3**, który wykazywał wiązanie ze wszystkimi kluczowymi resztami w kieszeni *C1*, sugerując wysoce korzystną konformację wiązania (rysunek 58B). To zachowanie można przypisać wzmocnionym oddziaływaniom hydrofobowym między wydłużonym łańcuchem alkilowym a lipofilowym obszarem kanału COX-2.

Z kolei aniony salicylanowy i *p*-aminobenzoesanowy wykazywały znacznie słabsze powinowactwo wiązania ($-5,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), oddziałując jedynie częściowo z resztami katalitycznymi i nie wykazując pełnego zaangażowania w miejsce aktywne. Ta obserwacja potwierdza ich rolę wspomagającą i stwarza potencjał synergii w działaniu przeciwzapalnym dla odpowiednio dobranej pary kation–anion. Podsumowując, wyniki dokowania wskazują na analogiczny trend zależności struktura–aktywność, w którym wydłużenie łańcucha alkilowego

w QASs na bazie lidokainy prowadzi do wzrostu powinowactwa wiązania z COX-2 oraz sprzyja bardziej rozbudowanym oddziaływaniom z kluczowymi resztami katalitycznymi i stabilizującymi enzymu. Obserwacje te są zatem spójne z wnioskami sformułowanymi dla pochodnych nikotynamidu i potwierdzają ogólną tendencję, zgodnie z którą długołańcuchowe QASs mogą stanowić interesującą grupę kandydatów do dalszych badań jako potencjalne środki o aktywności przeciwzapalnej ukierunkowanej na COX-2.

7.3.2.6. Potencjał znieczulający: Potencjał znieczulający: dokowanie molekularne do kanałów sodowych (NaV1.7)

Ocena potencjalnej aktywności znieczulającej związków może być wstępnie realizowana z wykorzystaniem metod *in silico*, w tym dokowania molekularnego względem napięciозależnych kanałów jonowych odpowiedzialnych za przewodnictwo bodźców bólowych. W niniejszej pracy postanowiono wykonać takie analizy dla wybranych pochodnych lidokainy. Dokowanie molekularne ukierunkowane na napięciозależny kanał sodowy NaV1.7 przeprowadzono dla QASs z anionem salicylanowym (**SL1–SL3**) oraz *p*-aminobenzoesanowym (**PL1–PL3**). Dla porównania analizy wykonano także dla układów referencyjnych: pochodnych lidokainy z anionem halogenkowym (**[LID][Cl]** oraz **BL1–BL3**), jak i **[LID][SAL]**, **[LID][PABA]**, **SAL** oraz **PABA**. W badaniach wykorzystano strukturę białka pochodzącą z bazy Protein Data Bank (PDB ID: 7W9K). Analiza wyników wskazała na preferencyjne wiązanie ligandów w obrębie kieszeni *C1* o objętości 3508 Å³. W przypadku większości analizowanych kationowych pochodnych lidokainy zaobserwowano interakcje z kluczowymi resztami aminokwasowymi **Y1215**, **D1677**, **E1628** i **M1678**, uznawanymi za istotne dla mechanizmu blokowania kanałów sodowych. Obecność tych oddziaływań sugeruje stabilizację ligandu w miejscu odpowiedzialnym za hamowanie przewodnictwa jonów sodowych. Dodatkowo odnotowano kontakty z resztami **T319**, **N1680**, **N1686**, **P1722**, **S1724**, **S1725** oraz **V1720**, które mogą wspierać stabilność kompleksu i wpływać na selektywność wiązania w obrębie analizowanej kieszeni.

Jak pokazano w tabeli A44 w aneksie, wszystkie badane związki wykazywały porównywalne powinowactwo do kanału NaV1.7, a uzyskane wartości energii wiązania *Vina score* mieściły się w zakresie od -4,8 do -6,8 kcal·mol⁻¹, co wskazuje na umiarkowane, lecz konsekwentne oddziaływanie w całej serii. Co istotne, wszystkie ligandy lokalizowały się w tym samym regionie wiążącym (kieszeń *C1*), niemniej jednak zaobserwowano istotne różnice w profilach oddziaływań oraz głębokości penetracji ligandów w obrębie kieszeni wiążącej.

Czwartorzędowe pochodne lidokainy, w szczególności **SL1** oraz związki **SL3**, **PL1**, **PL2** i **PL3**, wykazywały interakcje z kluczowymi resztami charakterystycznymi dla kanonicznego miejsca blokowania porów, takimi jak **Y1215**, **D1677** czy **E1628**. Reszty te uczestniczą

w oddziaływaniach kation- π oraz silnym zakotwiczeniu elektrostatycznym, co sprzyja stabilizacji ligandu w centralnej części pora i może przekładać się na efektywne hamowanie kanału. Z kolei **[LID][CI]** oraz inne QASs (np. **BL1** i **SL2**) oddziaływały głównie z resztami **E1217**, **E1727** oraz innymi aminokwasami o charakterze polarnym, co sugeruje bardziej peryferyjny sposób wiązania, zlokalizowany w pobliżu płytkiego obszaru przedsionka.

Co ciekawe, najwyższe powinowactwo wiązania uzyskano dla lidokainy w układzie **[LID][PABA]** ($-6,8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$); jednak oddziaływanie to nie obejmowało głęboko położonych kluczowych reszt aromatycznych, co wskazuje, że sama energia wiązania nie musi bezpośrednio korelować z efektywną blokadą kanału. Natomiast same aniony (salicylan i *p*-aminobenzoesan) wykazywały ograniczoną zdolność do interakcji z krytycznymi resztami, stabilizując się głównie poprzez oddziaływania z aminokwasami hydrofobowymi i strukturalnymi, co potwierdza ich niewielką rolę w bezpośrednim hamowaniu kanału.

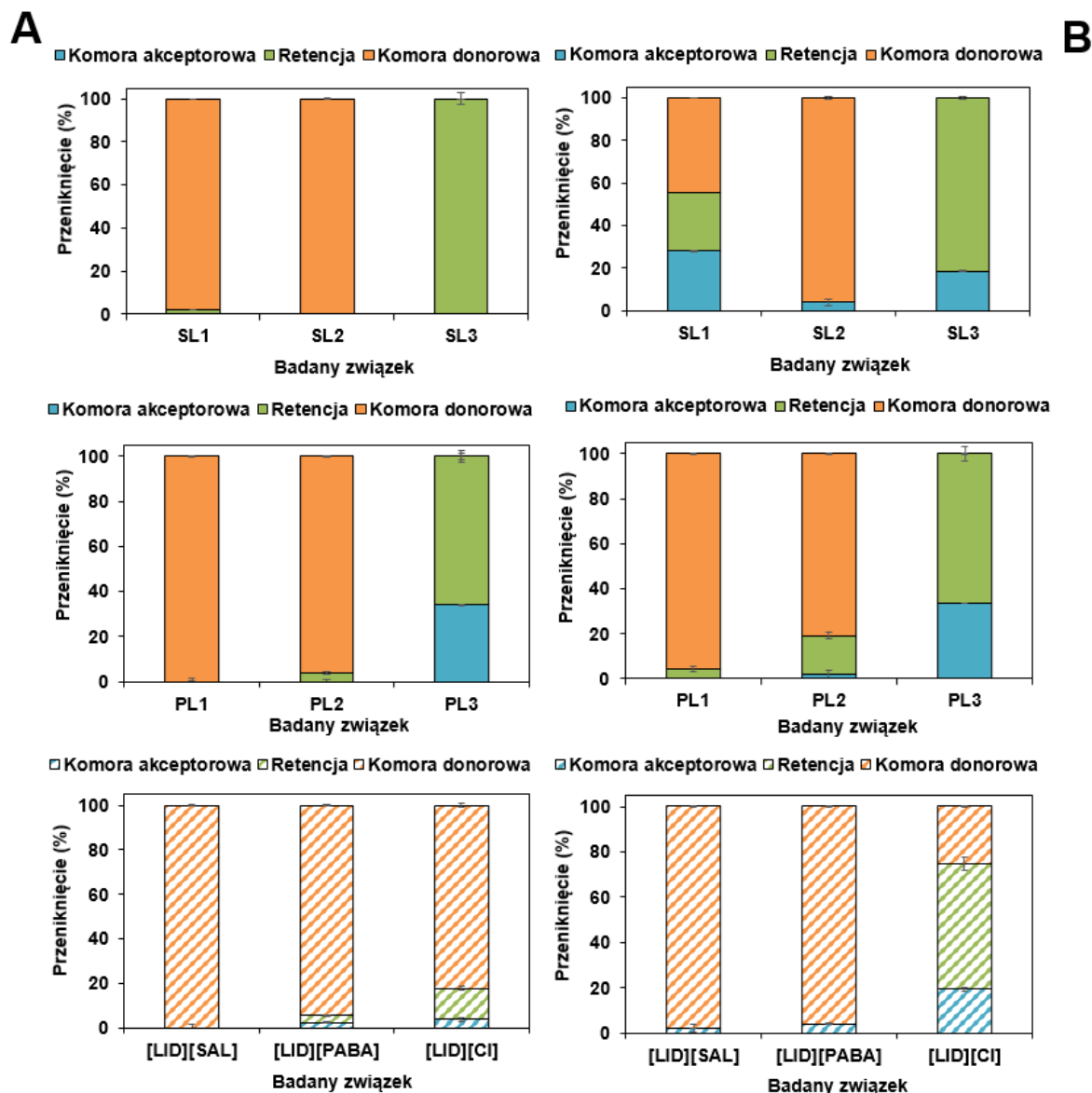
Ogólnie rzecz biorąc, uzyskane wyniki wskazują, że skuteczność wiązania z kanałem NaV1.7 zależy nie tylko od powinowactwa, ale również od zdolności ligandów do angażowania kluczowych reszt w głębokim obszarze pora, odpowiedzialnych za kotwiczenie elektrostatyczne i stabilizację oddziaływań. Wyniki te są zgodne z dobrze opisanym mechanizmem działania lidokainy i innych środków znieczulających miejscowo, polegającym na blokowaniu kanałów sodowych oraz hamowaniu przewodzenia impulsów nerwowych. Niemniej jednak dalsze badania są niezbędne do dokładnego określenia mechanizmu działania przeciwbólowego analizowanych związków.

7.3.2.7. Ocena przenikania związków przez barierę skórną z wykorzystaniem metody SKIN-PAMPA

Przenikalność przez modelową błonę pochodnych lidokainy oceniano za pomocą skórnego testu PAMPA po 6 i 24 godzinach, co pozwoliło na ocenę zarówno szybkości, jak i stopnia transportu API przez błonę modelową. Uzyskane w niniejszym badaniu profile przepuszczalności i dystrybucji lidokainy oraz jej alkilowanych pochodnych dostarczają informacji na temat ich potencjalnego zastosowania w miejscowych lub przezskórnych systemach dostarczania leków o działaniu ogólnoustrojowym. Wyniki przedstawiono na rysunku 59, a także w tabelach A45-A46 w aneksie.

QASs na bazie lidokainy wykazywały zróżnicowane właściwości w zależności zarówno od długości łańcucha alkilowego, jak i rodzaju przeciwjonu, co pozwala na rozróżnienie związków o charakterze sprzyjającym przenikaniu przezskórnemu oraz tych wykazujących tendencję do retencji w obrębie skóry i działania miejscowego. Spośród salicylanów *N*-alkilolidokainy, sól z grupą etylową (**SL1**) wykazała szybką i skuteczną penetrację, przy czym znaczną część

związku wykryto komorze akceptorowej po 24 godzinach, osiągając wartość 28,0%. Stosunkowo niska retencja wskazuje na ograniczoną akumulację w obrębie membrany, co sugeruje, że związek ten dobrze nadaje się do podawania przezskórnego, gdzie do uzyskania ogólnoustrojowych efektów terapeutycznych wymagana jest skuteczna penetracja przez skórę.



Rysunek 59. Procent przenikania badanych związków (SL1–SL3 oraz PL1–PL3) oraz związków referencyjnych: [LID][SAL], [LID][PABA] oraz [LID][Cl] po 6 (A) i 24 (B) godzinach.

Zauważono także, że wydłużenie łańcucha alkilowego radykalnie zmienia profil uwalniania. W efekcie, sól z podstawnikiem oktylowym (SL2) charakteryzowała się bardzo niską penetracją (3,9% po 24 godzinach), co wskazuje na niekorzystne właściwości zarówno w przypadku zastosowań miejscowych, jak i przezskórnych, prawdopodobnie z powodu niekorzystnego profilu lipofilowego. Natomiast pochodna z łańcuchem tetradeocyłowym (SL3) wykazała odmienny, wyraźnie specyficzny profil zachowania i po 24 godzinach nie była już wykrywalna w fazie donorowej. Co ciekawe, po 6 godzinach nie stwierdzono jej przejścia

do fazy akceptorowej, natomiast całość związku pozostawała związana z membraną (100% retencji). Taki rozkład wskazuje na silne powinowactwo do lipidowych domen błony oraz możliwość tworzenia rezerwuaru substancji w obrębie bariery skórnej. Z punktu widzenia potencjalnych zastosowań miejscowych profil ten może być korzystny, gdyż sprzyja utrzymaniu działania miejscowego przy jednoczesnym ograniczeniu ekspozycji ogólnoustrojowej.

Inny, ale równie istotny profil przenikania zaobserwowano w przypadku pochodnych lidokainy połączonych z **PABA**. Związek **PL1** wykazał znikome przenikanie zarówno po 6, jak i 24 godzinach, co wskazuje na słabą przydatność do podawania przezskórnego i ograniczoną interakcję z błoną. Pochodna z podstawnikiem oktylowym (**PL2**) wykazała jedynie minimalne przenikanie (1,9% po 24 godzinach), co ponownie sugeruje jej ograniczenia aplikacyjne. Natomiast sól **PL3** wykazała znaczący potencjał do przenikania, osiągając 33,8% w fazie donorowej po 24 godzinach, jednocześnie zachowując wysoką retencję na błonie modelowej (66,2%). Co istotne, wysoki procent przenikania, zaobserwowany już po 6 godzinach, wskazuje na stosunkowo szybki początek działania tej substancji. Połączenie efektywnego transportu przez błonę i znacznej akumulacji w jej obrębie sugeruje, że **PL3** może działać jako system hybrydowy, umożliwiając zarówno miejscowe, jak i ogólnoustrojowe dostarczanie leku. Z punktu widzenia zastosowania, profil ten jest szczególnie korzystny w przypadku formulacji wielofunkcyjnych, gdzie pożądane są zarówno natychmiastowe, jak i długotrwałe efekty terapeutyczne.

Protonowa ciecz jonowa otrzymana z lidokainy i kwasu salicylowego [**LID**][**SAL**] oraz mieszanina [**LID**][**PABA**] charakteryzowały się konsekwentnie niskim przenikaniem (około 2,0–4,0% po 24 godzinach) i nieznaczną retencją na błonie. Wyniki te wskazują, że takie systemy prawdopodobnie nie będą skuteczne ani w podawaniu przezskórnym, ani miejscowym, co podkreśla, że samo protonowanie lub mieszanie fizyczne nie wystarcza do efektywnej modulacji właściwości transportu przezskórnego. Natomiast tworzenie strukturalnie zdefiniowanych pochodnych jonowych, jak QASs czy ILs, umożliwia precyzyjne dostrojenie zachowania się leku w obrębie bariery skórnej. Powszechnie stosowany lek, chlorowodorek lidokainy ([**LID**][**Cl**]), wykazywał stopniowy wzrost przenikania w czasie, osiągając 19,6% w fazie akceptorowej po 24 godzinach. Jednocześnie znaczna część związku pozostawała zatrzymana w membranie (55,2%), podczas gdy mniejsza ilość pozostawała w fazie donorowej (25,3%). Taki profil potwierdza jego korzystne właściwości do działania miejscowego, jednocześnie wskazując jednak na możliwość częściowego przenikania ogólnoustrojowego.

Poprawę biodostępności transdermalnej lidokainy w układach jonowych i eutektycznych wykazano w także badaniach *in vivo*. Porównano w nich klasyczny chlorowodorek lidokainy z jej formą w cieczy jonowej (dokuzan lidokainy) oraz z układem głęboko eutektycznym

lidokaina–ibuprofen. Wszystkie formuły wprowadzono do kremu i aplikowano miejscowo u szczurów, monitorując stężenie lidokainy w osoczu jako miarę wchłaniania ogólnoustrojowego. Co ciekawe, układ eutektyczny zapewniał najszybsze wchłanianie oraz najwyższe stężenia w osoczu, przewyższając zarówno chlorowodorek lidokainy, jak i jej ciecz jonową.²⁹⁶ Przekształcenie słabo rozpuszczalnego w wodzie etodolaku w ciecz jonową na bazie lidokainy znacząco zwiększyło jego przepuszczalność przez skórę, prowadząc do 9,3-krotnego wzrostu względem czystego etodolaku. Co istotne, przenikanie samej lidokainy nie uległo istotnej zmianie, jednak w układzie jonowym pełniła ona rolę promotora przenikania etodolaku. Wyniki te sugerują, że układy jonowe na bazie lidokainy mogą pełnić podwójną funkcję: zarówno aktywnych substancji farmaceutycznych, jak i nośników wspomagających transdermalne dostarczanie leków.²⁹⁷

Podsumowując, wyniki badań podkreślają istotną rolę lidokainy nie tylko w zastosowaniach miejscowych, lecz także jako obiecującego kandydata do transdermalnych systemów dostarczania leków. Uzyskane dane dowodzą, że długość łańcucha alkilowego w sposób kluczowy determinuje równowagę pomiędzy przenikaniem a retencją w skórze, natomiast rodzaj przeciwjonu dodatkowo moduluje zakres oraz mechanizm transportu. Krótkołańcuchowe pochodne (łańcuch etylowy) charakteryzują się szybkim przenikaniem i ograniczoną retencją, co czyni je potencjalnie odpowiednimi do systemów o działaniu ogólnoustrojowym po podaniu przezskórnym. Z kolei pochodne długołańcuchowe (łańcuch tetradecylowy) wykazują silne powinowactwo do struktur lipidowych błony, prowadząc do całkowitej retencji w przypadku salicylanu lub jednoczesnej retencji i ograniczonego przenikania w przypadku **PABA**, co może być szczególnie korzystne w zastosowaniach miejscowych wymagających długotrwałego działania w obrębie skóry.

7.3.2.8. Ekotoksyczność wobec organizmów wodnych (*Artemia franciscana*)

W celu wstępnej oceny potencjalnego wpływu środowiskowego nowych pochodnych lidokainy przeprowadzono badania ekotoksykologiczne z wykorzystaniem słonowodnego skorupiaka *Artemia franciscana*. Dane dotyczące ekotoksyczności badanych związków z anionem salicylanowym (**SL1–SL3**) oraz *p*-aminobenzoesanowym (**PL1–PL3**) podsumowano w tabeli 8. Celem lepszego zrozumienia interakcji z wykorzystanym organizmem modelowym analizy wykonano także dla układów referencyjnych: pochodnych lidokainy z anionem halogenkowym (**[LID][Cl]** oraz **BL1–BL3**), jak i **[LID][SAL]**, **[LID][PABA]**.

Zebrane wartości EC₅₀ wskazują na generalnie bardzo niską toksyczność wszystkich badanych związków na bazie lidokainy wobec *A. franciscana*. Dla **[LID][Cl]**, **[LID][SAL]** i **[LID][PABA]**, a także większości czwartorzędowych pochodnych (**BL1**, **BL3**, **SL1**, **SL3**, **PL1**

i **PL3**) zanotowano wartości wyższe niż 1000 mg/L i dlatego zostały one sklasyfikowane jako „Stosunkowo nieszkodliwe”. Jedynie trzy związki zawierające podstawnik oktylowy (**BL2**, **SL2** i **PL2**) wykazywały nieznacznie niższe wartości EC_{50} (332,7–422,5 mg/L), co nadal lokuje je w kategorii „Praktycznie nietoksyczne”. Ten umiarkowany wzrost toksyczności ujawnił, że pośrednia długość łańcucha alkilowego może nieznacznie nasilać interakcje z błonami biologicznymi. Jednakże pochodne zawierające najdłuższy łańcuch tetradecylowy (**BL3**, **SL3** i **PL3**) ponownie wykazały bardzo niską toksyczność, co podobnie jak w przypadku pochodnych nikotynamidu może wskazywać na występowanie dobrze znanego efektu „cut-off”.

Tabela 8. Ekotoksyczność badanych związków w stosunku do organizmów *Artemia franciscana*.

Związek	EC_{50} (mg/L)	Zakres klasy (mg/L)	Klasa ^a
[LID][CI]	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
BL1	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
BL2	412,2±1,9	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
BL3	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
[LID][SAL]	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
SL1	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
SL2	332,7±3,7	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
SL3	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
[LID][PABA]	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
PL1	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy
PL2	422,5±1,7	100-1000	Praktycznie nietoksyczny
PL3	> 1000	-	Stosunkowo nieszkodliwy

^a zgodnie ze skalą oceny toksyczności ostrej według Fish and Wildlife Service

Uzyskane wyniki wskazują, że strukturalna modyfikacja lidokainy do postaci soli organicznych nie wiąże się z istotnym wzrostem ekotoksyczności wobec badanego organizmu wodnego. Zsyntezowane salicylany (**SL1–SL3**) oraz *p*-aminobenzoesany (**PL1–PL3**) *N*-alkilolidokainy są obecnie przedmiotem kontynuowanych badań, ukierunkowanych m.in. na określenie ich aktywności bakterio- i grzybobójczej oraz potencjalnej cytotoxyczności. Zebrane dane pozwolą na pełniejsze scharakteryzowanie ich profilu biologicznego i dostarczą dodatkowych informacji dotyczących ich potencjału jako związków wielofunkcyjnych. Analizy te umożliwią również ocenę ich przydatności jako potencjalnych zamienników dla wybranych substancji stosowanych obecnie w preparatach komercyjnych, w szczególności w kontekście optymalizacji skuteczności działania przy jednoczesnym zachowaniu korzystnego profilu bezpieczeństwa.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

- Niniejsza praca doktorska koncentrowała się na koncepcji projektowania bioaktywnych układów jonowych typu API-QAS, w których połączenie kationów o aktywności farmakologicznej z odpowiednio dobranymi anionami pochodzenia naturalnego umożliwia uzyskanie nowych substancji o działaniu wielofunkcyjnym.
- W toku badań zsyntezowano nieznane w literaturze czwartorzędowe sole amoniowe zbudowane z kationów *N*-alkilnikotynamidu oraz *N*-alkilolidokainy, gdzie alkil zmieniał się od etylu do tetradecylu, połączonych z anionami: nikotynianowym, salicylanowym lub *p*-aminobenzoanowym. Dla wszystkich nowych soli opracowano metodologię syntezy umożliwiającą ich wydajną syntezę przy zachowaniu wysokiej czystości, co potwierdzono szeregiem technik spektroskopowych (UV, FT-IR, ^1H i ^{13}C NMR).
- Wykazano, że transformacja substancji czynnych, takich jak nikotynamid, kwas nikotynowy, kwas *p*-aminobenzoowy, kwas salicylowy czy lidokaina w formę soli organicznych istotnie wpływa na ich właściwości fizykochemiczne, biologiczne oraz potencjał farmakologiczny.
- Kluczowym parametrem determinującym właściwości badanych układów okazała się długość łańcucha alkilowego, która w sposób kontrolowany moduluje lipofilowość, rozpuszczalność oraz transport przez bariery biologiczne. Wpływ rodzaju przeciwjonu miał charakter uzupełniający i przejawiał się w modyfikacji wybranych właściwości układów, zwykle w mniejszym stopniu niż w przypadku długości łańcucha alkilowego.
- Aktywność przeciwdrobnoustrojowa była silnie zależna od struktury produktów, przy czym związki długołańcuchowe wykazywały znacząco wyższą skuteczność wobec badanych mikroorganizmów niż układy krótkołańcuchowe.
- Dla większości otrzymanych produktów wykazano poprawę aktywności biologicznej (przeciwdrobnoustrojowej oraz przeciwzapalnej) w porównaniu do substratów wyjściowych, co wskazuje na efekt synergii pomiędzy kationem i anionem i potwierdza założoną hipotezę badawczą.
- Badania PAMPA potwierdziły możliwość projektowania układów o zróżnicowanym profilu przenikania przez bariery biologiczne, obejmującym zarówno systemy transdermalne, jak i do stosowania miejscowego. Zauważono, że długością łańcucha alkilowego można skutecznie modulować zdolność czwartorzędowych soli amoniowych do przenikania lub retencji na modelowej membranie.

- Dokowanie molekularne wykazało potencjał badanych układów do oddziaływania z białkami COX-2 oraz NaV1.7, co wskazuje na ich możliwe działanie przeciwzapalne i znieczulające. Długość łańcucha alkilowego wpływała znacząco na zdolność dopasowania do kieszeni wiążących oraz stabilność kompleksów ligand–białko, przy czym sole długołańcuchowe charakteryzowały się lepszym powinowactwem do miejsc aktywnych.
- Badania ekotoksykologiczne wykazały, że modyfikacja strukturalna zarówno nikotynamidu jak i lidokainy nie powoduje istotnego wzrostu toksyczności wobec modelowego organizmu wodnego, a uzyskane wyniki wskazują, że racjonalne projektowanie układów jonowych pozwala jednocześnie kontrolować aktywność biologiczną, biodostępność i bezpieczeństwo środowiskowe.
- Opracowane systemy stanowią uniwersalną platformę do rozwoju nowej generacji formułacji farmaceutycznych o precyzyjnie dopasowanych właściwościach funkcjonalnych. W konsekwencji podejście API-QAS można uznać za skuteczną strategię projektowania wielofunkcyjnych układów o potencjale aplikacyjnym w farmacji i biomedycynie.

BIBLIOGRAFIA

1. Kumar, V. *et al.* Active pharmaceutical ingredient (API) chemicals: a critical review of current biotechnological approaches. *Bioengineered* **13**, 4309–4327 (2022).
2. Caldwell, J. *et al.* An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicol. Pathol.* **23**, 102–114 (1995).
3. Abrantes, C. G. *et al.* An Overview of Pharmaceutical Excipients: Safe or Not Safe? *J. Pharm. Sci.* **105**, 2019–2026 (2016).
4. Hathcock, J. Dietary Supplements: How They Are Used and Regulated. *J. Nutr.* **131**, 1114S–1117S (2001).
5. Sardi, C. *et al.* Experimental Paradigm for the Assessment of the Non-pharmacological Mechanism of Action in Medical Device Classification: The Example of Glycerine as Laxative. *Front. Pharmacol.* **9**, 1410 (2018).
6. Lionetti, N. *et al.* Labeling of Cosmetic Products. *Cosmetics* **5**, 22 (2018).
7. Okereke, J. N. *et al.* Possible Health Implications Associated with Cosmetics: A Review. *Sci. J. Public Heal.* **3**, 58–63 (2015).
8. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **27**, 1–93 (2006).
9. Metwaly, A. M. *et al.* Traditional ancient Egyptian medicine: A review. *Saudi J. Biol. Sci.* **28**, 5823–5832 (2021).
10. Kleisiaris, C. F. *et al.* Health care practices in ancient Greece: The Hippocratic ideal. *J. Med. ethics Hist. Med.* **7**, 6 (2014).
11. Shephard, R. J. The Middle-Ages: Monasteries, Medical Schools and the Dawn of State Health Care. W *An Illustrated History of Health and Fitness, from Pre-History to our Post-Modern World* (ed. Shephard, R. J.) 241–346 (Springer International Publishing, Cham, 2015).
12. Emami, S. A. The History of Persian Medicine At a Glance, Emphasizing the Life and Works of Avicenna. *CABI* 1–26 (2023).
13. Masic, I. *et al.* Contribution of Arabic Medicine and Pharmacy to the Development of Health Care Protection in Bosnia and Herzegovina - the First Part. *Med. Arch. (Sarajevo, Bosnia Herzegovina)* **71**, 364–372 (2017).
14. Polak, A. M. *et al.* The discovery of medicines: drug testing on humans and the development of medical ethics before the 20th century. *Drug Discov. Today* **30**, 104418 (2025).
15. Jones, A. W. Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. *Drug Test. Anal.* **3**, 337–344 (2011).
16. Van Bronswijk, P. *et al.* The first recordings of pharmacological effects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **66**, 588–593 (2008).
17. Dey, P. *et al.* Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). W *Recent Advances in Natural Products Analysis* (eds. Sanches Silva, A. *et al.*) 505–567 (Elsevier, 2020).

18. Yapar, E. A. *et al.* An Overview On Pharmacopoeias In The World And Monograph Elaboration Techniques. *Univers. J. Pharm. Res.* **5**, (2020).
19. Demain, A. L. Antibiotics: Natural products essential to human health. *Med. Res. Rev.* **29**, 821–842 (2009).
20. Gaynes, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases.* **23**, 849–853 (2017).
21. Ferraz, R. *et al.* Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. *ChemMedChem* **6**, 975–985 (2011).
22. Shamshina, J. L. *et al.* Ionic Liquids: New Forms of Active Pharmaceutical Ingredients with Unique, Tunable Properties. *Chem. Rev.* **123**, 11894–11953 (2023).
23. Gupta, D. *et al.* Salts of Therapeutic Agents: Chemical, Physicochemical, and Biological Considerations. *Molecules.* **23**, 1719 (2018).
24. Egorova, K. S. *et al.* Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chem. Rev.* **117**, 7132–7189 (2017).
25. Handa, M. *et al.* Active pharmaceutical ingredients (APIs) in ionic liquids: An effective approach for API physiochemical parameter optimization. *Drug Discov. Today* **27**, 2415–2424 (2022).
26. Pastore, M. N. *et al.* Transdermal patches: history, development and pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2179–2209 (2015).
27. Hoffman, A. Pharmacodynamic aspects of sustained release preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **33**, 185–199 (1998).
28. Bozzuto, G. *et al.* A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 975–999 (2015).
29. Bah, M. G. *et al.* J. Fabrication and application of complex microcapsules: a review. *Soft Matter* **16**, 570–590 (2020).
30. Stoimenovski, J. *et al.* Crystalline vs. Ionic Liquid Salt Forms of Active Pharmaceutical Ingredients: A Position Paper. *Pharm. Res.* **27**, 521–526 (2010).
31. Bharate, S. S. Modulation of biopharmaceutical properties of acidic drugs using cationic counterions: A critical analysis of FDA-approved pharmaceutical salts. *Int. J. Pharm.* **607**, 120993 (2021).
32. Serajuddin, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 603–616 (2007).
33. Olejniczak, A. *et al.* Unraveling the Potential of Vitamin B₃-Derived Salts with a Salicylate Anion as Dermal Active Agents for Acne Treatment. *Mol. Pharm.* **21**, 4634–4647 (2024).
34. Wu, X. *et al.* Ionic liquids revolutionizing drug delivery: Recent advances and emerging opportunities. *J. Control. Release* **388**, 114355 (2025).
35. Kula, N. *et al.* The effectiveness of newly synthesized quaternary ammonium salts differing in chain length and type of counterion against priority human pathogens. *Sci. Rep.* **12**, 21799 (2022).
36. Arnold, W. A. *et al.* Quaternary Ammonium Compounds: A Chemical Class of Emerging

- Concern. *Environ. Sci. Technol.* **57**, 7645–7665 (2023).
37. Vereshchagin, A. N. *et al.* Quaternary Ammonium Compounds (QACs) and Ionic Liquids (ILs) as Biocides: From Simple Antiseptics to Tunable Antimicrobials. *International Journal of Molecular Sciences*. **22**, 6793 (2021).
 38. Obłąk, E. *et al.* Biological activity of quaternary ammonium salts and resistance of microorganisms to these compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 22 (2021).
 39. Boyce, J. M. Quaternary ammonium disinfectants and antiseptics: tolerance, resistance and potential impact on antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **12**, 32 (2023).
 40. Bureš, F. Quaternary Ammonium Compounds: Simple in Structure, Complex in Application. *Top. Curr. Chem.* **377**, 14 (2019).
 41. Stachowiak, W. *et al.* Mono- and Dicationic Quaternary Ammonium Salts from Glycine Betaine: Are They Less Ecotoxic Than Currently Applied Commercial Cationic Surfactants? *ACS Sustain. Chem. Eng.* **12**, 18187–18199 (2024).
 42. Nadagouda, M. N. *et al.* Antimicrobial activity of quaternary ammonium salts: structure-activity relationship. *Med. Chem. Res.* **31**, 1663–1678 (2022).
 43. Wysocki, M. *et al.* Rethinking the Esterquats: Synthesis, Stability, Ecotoxicity and Applications of Esterquats Incorporating Analogs of Betaine or Choline as the Cation in Their Structure. *International Journal of Molecular Sciences*. **25**, 5761 (2024).
 44. Gilbert, P. *et al.* Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 703–715 (2005).
 45. Zhang, Y. *et al.* Ionic liquids in transdermal drug delivery system: Current applications and future perspectives. *Chinese Chem. Lett.* **34**, 107631 (2023).
 46. Zhou, B. *et al.* Development of a gliclazide ionic liquid and its mesoporous silica particles: an effective formulation strategy to improve oral absorption properties. *RSC Adv.* **12**, 1062–1076 (2022).
 47. Beaven, E. *et al.* Potentials of ionic liquids to overcome physical and biological barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **204**, 115157 (2024).
 48. Świątek, E. *et al.* Novel Naproxen Salts with Increased Skin Permeability. *Pharmaceutics*. **13**, 2110 (2021).
 49. Klebeko, J. *et al.* Cations of amino acid alkyl esters conjugated with an anion from the group of NSAIDs – As tunable pharmaceutical active ionic liquids. *J. Mol. Liq.* **384**, 122200 (2023).
 50. Mason, D. *et al.* A Crystal Packing - Melting Point Correlation for Quaternary Ammonium Salts. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A. Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **242**, 179–191 (1994).
 51. Wang, D. *et al.* Designing halogen-free metal–phenolic imidazolium poly(ionic liquids) with multi-functional antibacterial, anti-inflammatory and cell proliferation properties for infected wounds. *RSC Med. Chem.* **16**, 6031–6040 (2025).
 52. Nikfarjam, N. *et al.* Antimicrobial Ionic Liquid-Based Materials for Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **31**, 2104148 (2021).

53. Romero-Antolín, J. A. *et al.* Anti-inflammatory and antibacterial hydrogel based on a polymerizable ionic liquid. *Acta Biomater.* **196**, 78–92 (2025).
54. Roy, R. *et al.* Effects of cationic head group structure on cytotoxicity and mitochondrial actions of amphiphilic ionic liquids. *Food Chem. Toxicol.* **183**, 114202 (2024).
55. Mohan, M. K. *et al.* Synthesis and Antibacterial Properties of Novel Quaternary Ammonium Lignins. *ACS Omega* **9**, 39134–39145 (2024).
56. King, A. *et al.* High Antimicrobial Effectiveness with Low Hemolytic and Cytotoxic Activity for PEG/Quaternary Copolyoxetanes. *Biomacromolecules* **15**, 456–467 (2014).
57. Ting, M. *et al.* Study on the properties and in vitro transdermal delivery and cytotoxicity of drug-active ionic liquids with matrine as the cation. *RSC Adv.* **15**, 14632–14642 (2025).
58. Amidon, G. L. *et al.* A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm. Res.* **12**, 413–420 (1995).
59. Savjani, K. T. *et al.* Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, 195727 (2012).
60. Brown, M. B. *et al.* Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Deliv.* **13**, 175–187 (2006).
61. Md Moshikur, R. *et al.* Biocompatible ionic liquids and their applications in pharmaceuticals. *Green Chem.* **22**, 8116–8139 (2020).
62. Ferraz, R. *et al.* Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. *ChemMedChem* **6**, 975–985 (2011).
63. Nowicki, J. *et al.* API-ILs Ionic Adducts: Solubility and Surface Activity Properties—En Route to New Paradigm in Drug Development. *ChemMedChem* **20**, e202500404 (2025).
64. Carrera, G. V. S. M. *et al.* Highly water soluble room temperature superionic liquids of APIs. *New J. Chem.* **41**, 6986–6990 (2017).
65. Di, L. *et al.* Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 402–408 (2003).
66. Hough, W. L. *et al.* The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New J. Chem.* **31**, 1429–1436 (2007).
67. Reddy, G. K. K. *et al.* Alkylimidazolium Ionic Liquids as Antifungal Alternatives: Antibiofilm Activity Against *Candida albicans* and Underlying Mechanism of Action. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).
68. Ferraz, R. *et al.* Antibacterial activity of Ionic Liquids based on ampicillin against resistant bacteria. *RSC Adv.* **4**, 4301–4307 (2014).
69. Zhang, Z. *et al.* Antibacterial, anti-inflammatory and wet-adhesive poly(ionic liquid)-based oral patch for the treatment of oral ulcers with bacterial infection. *Acta Biomater.* **166**, 254–265 (2023).
70. Alexander, H. *et al.* The role of bacterial skin infections in atopic dermatitis: expert statement and review from the International Eczema Council Skin Infection Group. *Br. J. Dermatol.* **182**, 1331–1342 (2020).

71. Stachowiak, W. *et al.* Sustainable Design of New Ionic Forms of Vitamin B₃ and Their Utilization as Plant Protection Agents. *J. Agric. Food Chem.* **70**, 8222–8232 (2022).
72. Dang, T. *et al.* Synthesis and characterization of pyridoxine, nicotine and nicotinamide salts of dithiophosphoric acids as antibacterial agents against resistant wound infection. *Bioorg. Med. Chem.* **27**, 100–109 (2019).
73. Lappas, M. *et al.* The anti-inflammatory and antioxidative effects of nicotinamide, a vitamin B₃ derivative, are elicited by FoxO3 in human gestational tissues: implications for preterm birth. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 1195–1201 (2011).
74. Dobler, D. *et al.* Salicylate-Based Ionic Liquids as Innovative Ingredients in Dermal Formulations. *J. Pharm. Sci.* **111**, 1414–1420 (2022).
75. Tot, A. *et al.* Influence of side-chain length on antifungal efficacy of N-alkyl nicotinamide-based compounds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **29**, 71742–71751 (2022).
76. Bahar, E. *et al.* Lidocaine: A Local Anesthetic, Its Adverse Effects and Management. *Medicina*. **57**, 782 (2021).
77. Golzari, S. E. G. *et al.* Lidocaine and Pain Management in the Emergency Department: A Review Article. *Anesthesiol. Pain Med.* **4**, e15444 (2014).
78. Silva, A. *et al.* A Review of the Lidocaine in the Perioperative Period. *Journal of Personalized Medicine*. **13**, 1699 (2023).
79. Bezerra, M. M. *et al.* A brief history behind the most used local anesthetics. *Tetrahedron* **76**, 131628 (2020).
80. Klasfauseweh, T. *et al.* Low potency inhibition of NaV1.7 by externally applied QX-314 via a depolarizing shift in the voltage-dependence of activation. *Eur. J. Pharmacol.* **925**, 175013 (2022).
81. Mitolo-Chieppa, D. *et al.* Comparative evaluation of the effects of lidocaine (lignocaine) hydrochloride and salicylate on nervous and Purkinje fibres. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 68–70 (1985).
82. Wang, G. K. *et al.* Quaternary Ammonium Derivative of Lidocaine as a Long-acting Local Anesthetic. *Anesthesiology* **83**, (1995).
83. Zotova, J. *et al.* Green Synthesis of Lidocaine Ionic Liquids and Salts: Mechanisms of Formation and Interactions in the Crystalline and Supercooled States. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **8**, 18266–18276 (2020).
84. Pascual, J. M. *et al.* Delimiting the Binding Site for Quaternary Ammonium Lidocaine Derivatives in the Acetylcholine Receptor Channel. *J. Gen. Physiol.* **112**, 611–621 (1998).
85. Panić, J. *et al.* Physicochemical and structural properties of lidocaine-based ionic liquids with anti-inflammatory anions. *RSC Adv.* **10**, 14089–14098 (2020).
86. Bica, K. *et al.* Confused ionic liquid ions—a “liquification” and dosage strategy for pharmaceutically active salts. *Chem. Commun.* **46**, 1215–1217 (2010).
87. Mozhdehbakhsh Mofrad, Y. *et al.* An extensive review of Janus particle applications: Focusing on medical diagnostics and therapeutic. *Next Mater.* **9**, 101322 (2025).
88. Tang, L. *et al.* Janus particles self-assembled from a small organic atypical asymmetric

- gemini surfactant. *Chem. Commun.* **53**, 8675–8678 (2017).
89. Smith, D. J. *et al.* Molecular Dynamics Simulation Study of the Association of Lidocainium Docusate and Its Derivatives in Aqueous Solution. *Mol. Pharm.* **12**, 1893–1901 (2015).
 90. Nowacka, A. *et al.* Comprehensive Ecotoxicity Studies on Quaternary Ammonium Salts Synthesized from Vitamin B₃ Supported by QSAR Calculations. *Plants*. **12**, 914 (2023).
 91. Ahmed, E. M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new nicotinic acid derivatives as potential anti-inflammatory agents with enhanced gastric safety profile. *Bioorg. Chem.* **144**, 107136 (2024).
 92. Sarkar, R. *et al.* Chemical Peels in Treatment of Melasma. *Dermatol. Clin.* **42**, 21–32 (2024).
 93. Gerlero, P. *et al.* Treatment of Warts in Children: An Update. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Ed.* **107**, 551–558 (2016).
 94. Clay, M. D. *et al.* Detection of Salicylic Acid in Willow Bark: An Addition to a Classic Series of Experiments in the Introductory Organic Chemistry Laboratory. *J. Chem. Educ.* **89**, 1068–1070 (2012).
 95. Haroon, F. *et al.* Novel Para-Aminobenzoic Acid Analogs and Their Potential Therapeutic Applications. *Biomedicines*. **11**, 2686 (2023).
 96. Munteanu, C. *et al.* The immunomodulatory effects of vitamins in cancer. *Front. Immunol.* **15**, (2024).
 97. Hasan, E. *et al.* An efficient synthesis of O- and N- alkyl derivatives of 4-aminobenzoic acid and evaluation of their anticancer properties. *Nat. Prod. Res.* **38**, 2220–2230 (2024).
 98. Akberova, S. I. New Biological Properties of p-Aminobenzoic Acid. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* **29**, 390–393 (2002).
 99. Kluczyk, A. *et al.* Drug evolution: p-aminobenzoic acid as a building block. *Curr. Med. Chem.* **9**, 1871–1892 (2002).
 100. Kukawka, R. *et al.* New Chlormequat-Based Ionic Liquids as Plant Resistance Inducers. *Molecules*. **30**, 4203 (2025).
 101. Peng, Y. *et al.* Design, synthesis, and bioactivity evaluation of PABA-based five- and six-membered heterocyclic Schiff base quaternary ammonium chitosan derivatives. *Carbohydr. Polym.* **367**, 124015 (2025).
 102. Jovanović-Šanta, S. *et al.* Anticancer and antimicrobial properties of imidazolium based ionic liquids with salicylate anion. *J. Serbian Chem. Soc.* **85**, 291–303 (2020).
 103. Pinto, P. C. A. G. *et al.* Active pharmaceutical ingredients based on salicylate ionic liquids: insights into the evaluation of pharmaceutical profiles. *New J. Chem.* **37**, 4095–4102 (2013).
 104. Sharma, N. *et al.* Physiochemical Investigations of Surface Active Ionic Liquids Containing Salicylate Moiety; Enhanced Pharmacological Behaviour and Permeability. *ChemistrySelect* **10**, e03149 (2025).
 105. Sangeeta, Sarkar, A. *et al.* Procaine and salicylate-based ionic liquid: synthesis, in silico, in vitro, biophysical and biological studies. *Ionics*. **31**, 3093–3104 (2025).
 106. Chovatiya, R. *et al.* Stress, Inflammation, and Defense of Homeostasis. *Mol. Cell* **54**, 281–

- 288 (2014).
107. Murdoch, J. R. *et al.* Chronic inflammation and asthma. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **690**, 24–39 (2010).
 108. Ricciotti, E. *et al.* Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 986–1000 (2011).
 109. Burian, M. *et al.* COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol. Ther.* **107**, 139–154 (2005).
 110. Sokołowska, P. *et al.* PPAR γ , NF- κ B and the UPR pathway as new molecular targets in the anti-inflammatory actions of NSAIDs: Novel applications in cancers and central nervous system diseases? *Adv. Clin. Exp. Med.* **33**, 1007–1022 (2024).
 111. Barnes, P. J. Anti-inflammatory Actions of Glucocorticoids: Molecular Mechanisms. *Clin. Sci.* **94**, 557–572 (1998).
 112. Bindu, S. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem. Pharmacol.* **180**, 114147 (2020).
 113. Chan, F. K. L. *et al.* Combination of a cyclo-oxygenase-2 inhibitor and a proton-pump inhibitor for prevention of recurrent ulcer bleeding in patients at very high risk: a double-blind, randomised trial. *Lancet.* **369**, 1621–1626 (2007).
 114. Drapińska, P. *et al.* Sustained-Release Oral Delivery of NSAIDs and Acetaminophen: Advances and Recent Formulation Strategies—A Systematic Review. *Pharmaceutics.* **17**, 1264 (2025).
 115. Sisignano, M. *et al.* Topical Analgesics: Pharmacology and Clinical Applications. *Anesthesiology* **143**, 1371–1381 (2025).
 116. Shi, C. *et al.* Multidisciplinary Guidelines for the Rational Use of Topical Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs for Musculoskeletal Pain (2022). *J. Clin. Med.* **12**, 1544 (2023).
 117. Tubsrinuan, K. *et al.* Efficacy of NSAID Transdermal Patch for Postoperative Management in Total Knee Arthroplasty. *J. Clin. Med.* **14**, 8098 (2025).
 118. Wojcieszak, M. *et al.* Quaternary ammonium salts based on caprylic acid as antimicrobial and surface-active agents. *RSC Adv.* **13**, 34782–34797 (2023).
 119. Di Martino, P. Antimicrobial agents and microbial ecology. *AIMS Microbiol.* **8**, 1–4 (2022).
 120. Singh, S. P. *et al.* Mechanisms of action by antimicrobial agents: A review. *McGill J. Med.* **19**, (2021).
 121. Dafale, N. A. *et al.* Selection of appropriate analytical tools to determine the potency and bioactivity of antibiotics and antibiotic resistance. *J. Pharm. Anal.* **6**, 207–213 (2016).
 122. Lou, J. *et al.* Advances in Oral Drug Delivery Systems: Challenges and Opportunities. *Pharmaceutics.* **15**, 484 (2023).
 123. Fasinu, P. *et al.* Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. *Biopharm. Drug Dispos.* **32**, 185–209 (2011).
 124. Jaroszewski, J. *et al.* Bidirectional Interaction between Tetracyclines and Gut Microbiome. *Antibiotics.* **12**, 1438 (2023).

125. Novelli, A. *et al.* Pharmacological properties of oral antibiotics for the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *J. Chemother.* **29**, 10–18 (2017).
126. Levison, M. E. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **23**, 791–815 (2009).
127. Pea, F. *et al.* Bench-to-bedside review: Appropriate antibiotic therapy in severe sepsis and septic shock – does the dose matter? *Crit. Care* **13**, 214 (2009).
128. Islam, N. *et al.* Inhaled antibiotics: A promising drug delivery strategies for efficient treatment of lower respiratory tract infections (LRTIs) associated with antibiotic resistant biofilm-dwelling and intracellular bacterial pathogens. *Respir. Med.* **227**, (2024).
129. Williamson, D. A. *et al.* Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 827–860 (2017).
130. Bandyopadhyay, D. Topical Antibacterials in Dermatology. *Indian J. Dermatol.* **66**, 117–125 (2021).
131. Drago, L. Topical Antibiotic Therapy in the Ocular Environment: The Benefits of Using Moxifloxacin Eyedrops. *Microorganisms.* **12**, 649 (2024).
132. Kwaśniewska, D. *et al.* Biological Activity of Quaternary Ammonium Salts and Their Derivatives. *Pathogens.* **9**, 459 (2020).
133. Nunes, B. *et al.* Efficacy of Novel Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts Differing in Cation Type and Alkyl Chain Length against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences.* **25**, 504 (2024).
134. Pernak, J. *et al.* M.ethyl-3-dimethylaminopyridinium chlorides. *J. Surfactants Deterg.* **6**, 119–123 (2003).
135. Ahmed, N. *et al.* Nanomedicine in the Fight Against Multidrug-Resistant Infections: A Review on Emerging Strategies and Translational Prospects. *Int. J. Nanomedicine* **20**, 12331–12362 (2025).
136. Desai, A. *et al.* A one health nanotechnology approach to address antimicrobial resistance: state-of-the-art and strategic outlook. *Mater. Adv.* **6**, 6612–6647 (2025).
137. Safaran, N. *et al.* Advances in polymeric and non-polymeric nanocarriers for the magnified delivery of levofloxacin against bacterial infection. *J. Nanoparticle Res.* **26**, 190 (2024).
138. Anselmo, A. C. *et al.* An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *J. Control. Release* **190**, 15–28 (2014).
139. Jain, K. K. An Overview of Drug Delivery Systems. W Drug Delivery Systems (ed. Jain, K. K.) 1–54 (Springer New York, New York, NY, 2020).
140. Ramadon, D. *et al.* Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Deliv. Transl. Res.* **12**, 758–791 (2022).
141. Alkilani, A. Z. *et al.* Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics.* **7**, 438–470 (2015).
142. Vaseem, R. S. *et al.* Transdermal Drug Delivery Systems: A Focused Review of the Physical Methods of Permeation Enhancement. *Adv Pharm Bull* **14**, 67–85 (2024).

143. Zhao, L. *et al.* Topical drug delivery strategies for enhancing drug effectiveness by skin barriers, drug delivery systems and individualized dosing. *Front. Pharmacol.* **14**, (2024).
144. Ouyang, J. *et al.* Oral drug delivery platforms for biomedical applications. *Mater. Today* **62**, 296–326 (2023).
145. Bashiardes, S. *et al.* Orally Administered Drugs and Their Complicated Relationship with Our Gastrointestinal Tract. *Microorganisms*. **12**, 242 (2024).
146. Vedadghavami, A. *et al.* Overcoming negatively charged tissue barriers: Drug delivery using cationic peptides and proteins. *Nano Today* **34**, (2020).
147. Leal, J. *et al.* Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **532**, 555–572 (2017).
148. Ulluwishewa, D. *et al.* Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components^{1,2}. *J. Nutr.* **141**, 769–776 (2011).
149. Snoeck, V. *et al.* The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* **7**, 997–1004 (2005).
150. Proctor, W. R. *et al.* Why Does the Intestine Lack Basolateral Efflux Transporters for Cationic Compounds? A Provocative Hypothesis. *J. Pharm. Sci.* **105**, 484–496 (2016).
151. Heinen, C. A. *et al.* Ion Pairing with Bile Salts Modulates Intestinal Permeability and Contributes to Food–Drug Interaction of BCS Class III Compound Trosipium Chloride. *Mol. Pharm.* **10**, 3989–3996 (2013).
152. Song, I. S. *et al.* Transport of organic cationic drugs: Effect of ion-pair formation with bile salts on the biliary excretion and pharmacokinetics. *Pharmacol. Ther.* **138**, 142–154 (2013).
153. Chen, X. *et al.* Self-Microemulsifying Drug Delivery System to Enhance Oral Bioavailability of Berberine Hydrochloride in Rats. *Pharmaceutics*. **16**, 1116 (2024).
154. Groothuis, F. A. *et al.* Influence of in Vitro Assay Setup on the Apparent Cytotoxic Potency of Benzalkonium Chlorides. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 1103–1114 (2019).
155. García, M. T. *et al.* Arginine-Derived Cationic Surfactants Containing Phenylalanine and Tryptophan: Evaluation of Antifungal Activity, Biofilm Eradication, Cytotoxicity, and Ecotoxicity. *J. Xenobiotics*. **15**, 140 (2025).
156. Crnčević, D. *et al.* A dual antibacterial action of soft quaternary ammonium compounds: bacteriostatic effects, membrane integrity, and reduced in vitro and in vivo toxicity. *RSC Adv.* **15**, 1490–1506 (2025).
157. Szymczak-Pajor, I. *et al.* Cytotoxicity and Genotoxicity of Resin-Based Dental Composites Modified with Quaternary Ammonium Salts. *J. Funct. Biomater.* **16**, 459 (2025).
158. Crasta, A. *et al.* Transdermal drug delivery system: A comprehensive review of innovative strategies, applications, and regulatory perspectives. *OpenNano* **24**, 100245 (2025).
159. Wong, W. F. *et al.* Recent Advancement of Medical Patch for Transdermal Drug Delivery. *Medicina*. **59**, 778 (2023).
160. Jiao, Q. *et al.* Skin homeostasis: Mechanism and influencing factors. *J. Cosmet. Dermatol.* **23**, 1518–1526 (2024).
161. Lefèvre-Utile, A. *et al.* Five Functional Aspects of the Epidermal Barrier. *Int. J. Mol. Sci.*

- 22, 11676 (2021).
162. Brito, S. *et al.* Skin Structure, Physiology, and Pathology in Topical and Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*. **16**, 1403 (2024).
 163. Bos, J. D. *et al.* The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* **9**, 165–169 (2000).
 164. Safta, D. A. *et al.* SLNs and NLCs for Skin Applications: Enhancing the Bioavailability of Natural Bioactives. *Pharmaceutics*. **16**, 1270 (2024).
 165. Secci, D. *et al.* Biomaterials for Improving Skin Penetration in Treatment of Skin Cancer. *J. Funct. Biomater.* **17**, 39 (2026).
 166. Souto, E. B. *et al.* Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. *Heliyon* **8**, (2022).
 167. Navti, P. D. *et al.* Ionic Liquids Assisted Topical Drug Delivery for Permeation Enhancement: Formulation Strategies, Biomedical Applications, and Toxicological Perspective. *AAPS PharmSciTech* **23**, 161 (2022).
 168. Roberts, M. S. *et al.* Factors Affecting the Formation of a Skin Reservoir for Topically Applied Solutes. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **17**, 3–16 (2003).
 169. Lu, Y. *et al.* Ionic liquids: Emerging chemical permeation enhancers. *MedComm – Biomater. Appl.* **3**, e81 (2024).
 170. Deutschle, T. *et al.* In vitro genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. *Toxicol. Vitro.* **20**, 1472–1477 (2006).
 171. Reddy, M. B. *et al.* Does Epidermal Turnover Reduce Percutaneous Penetration? *Pharm. Res.* **17**, 1414–1419 (2000).
 172. Daina, A. *et al.* SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **7**, 42717 (2017).
 173. Pires, D. E. V. *et al.* pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.* **58**, 4066–4072 (2015).
 174. Sun, D. *et al.* Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharm. Sin. B* **12**, 3049–3062 (2022).
 175. Shaker, B. *et al.* In silico methods and tools for drug discovery. *Comput. Biol. Med.* **137**, 104851 (2021).
 176. Gini, G. QSAR Methods. W *In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity* (ed. Benfenati, E.) 1–26 (Springer US, New York, NY, 2022).
 177. Anand, S. S. *et al.* Computational Toxicology. W Wexler, P. (ed.) *Encyclopedia of Toxicology* (2nd ed.) 656–660 (Elsevier, New York, 2005).
 178. Ancuceanu, R. *et al.* In Silico ADME Methods Used in the Evaluation of Natural Products. *Pharmaceutics*. **17**, 1002 (2025).
 179. Hou, T. *et al.* ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification. *J. Chem. Inf. Model.* **47**, 208–218 (2007).
 180. Kamiya, Y. *et al.* Determination and prediction of permeability across intestinal epithelial

- cell monolayer of a diverse range of industrial chemicals/drugs for estimation of oral absorption as a putative marker of hepatotoxicity. *Toxicol. Reports* **7**, 149–154 (2020).
181. Di, L. An update on the importance of plasma protein binding in drug discovery and development. *Expert Opin. Drug Discov.* **16**, 1453–1465 (2021).
 182. Treyer, A. *et al.* A Cell-Free Approach Based on Phospholipid Characterization for Determination of the Cell Specific Unbound Drug Fraction ($f_{u,cell}$). *Pharm. Res.* **36**, 178 (2019).
 183. van der Merwe, J. *et al.* The Role of Functional Excipients in Solid Oral Dosage Forms to Overcome Poor Drug Dissolution and Bioavailability. *Pharmaceutics*. **12**, 393 (2020).
 184. Veber, D. F. *et al.* Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **45**, 2615–2623 (2002).
 185. Agu, P. C. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Sci. Rep.* **13**, 13398 (2023).
 186. Pinzi, L. *et al.* Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4331 (2019).
 187. Meng, X.-Y. *et al.* Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* **7**, 146–157 (2011).
 188. Flamandita, D. *et al.* Molecular Docking Study of Anti-Inflammatory Biomarkers in Sulawesi Propolis as Potent Inhibitors of Cyclooxygenase-2. In *2019 IEEE International Conference on Innovative Research and Development (ICIRD)* 1–4 (2019).
 189. Harman, C. A. *et al.* Structural Basis of Enantioselective Inhibition of Cyclooxygenase- $_1$ by $-\alpha$ -Substituted Indomethacin Ethanolamides *. *J. Biol. Chem.* **282**, 28096–28105 (2007).
 190. Rouzer, C. A. *et al.* Structural and Chemical Biology of the Interaction of Cyclooxygenase with Substrates and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Chem. Rev.* **120**, 7592–7641 (2020).
 191. Kurumbail, R. G. *et al.* Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**, 644–648 (1996).
 192. Rouzer, C. A. *et al.* Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res.* **50**, S29–S34 (2009).
 193. Smith, W. L. *et al.* Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 145–182 (2000).
 194. Garavito, R. M. *et al.* The Structure of Mammalian Cyclooxygenases. *Annu. Rev. Biophys.* **32**, 183–206 (2003).
 195. Oakes, V. *et al.* Capturing the Molecular Mechanism of Anesthetic Action by Simulation Methods. *Chem. Rev.* **119**, 5998–6014 (2019).
 196. Manzur-Villalobos, I. *et al.* In silico study of local anesthetics analogues on sodium channel Nav 1.7 a pharmacological target on inflamed dental pulp. *Informatics Med. Unlocked.* **34**, 101117 (2022).
 197. Li, W. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and molecular docking of ropivacaine analogs as local anesthetic agents. *Med. Chem. Res.* **27**, 954–965 (2018).

198. Adewole, A. H. *et al.* Discovery of Nav1.7 Inhibitors through the Screening of Marine Natural Product Extracts. *J. Nat. Prod.* **88**, 2635–2644 (2025).
199. Absalom, N. L. *et al.* Pore Structure of the Cys-loop Ligand-gated Ion Channels. *Neurochem. Res.* **34**, 1805–1815 (2009).
200. Nys, M. *et al.* Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 1042–1053 (2013).
201. Mohanty, M. *et al.* Molecular docking in organic, inorganic, and hybrid systems: a tutorial review. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **154**, 683–707 (2023).
202. Zampelli, S. *et al.* Environmental Pollution from Pharmaceuticals. *Life.* **15**, 1341 (2025).
203. Hejna, M. *et al.* Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review on Eco-Toxicology and the Remediation Potential of Algae. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **19**, 7717 (2022).
204. Küster, A. *et al.* Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, 20130587 (2014).
205. Gworek, B. *et al.* Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review. *Water, Air, Soil Pollut.* **232**, 145 (2021).
206. Barnwal, S. K. *et al.* Antibiotic resistance patterns of environmental bacteria from sewage water in Vellore, India: isolation, virulence analysis, and characterization. *Front. Microbiol.* **Volume 16**, (2025).
207. Cedergreen, N. *et al.* Can Toxicokinetic and Toxicodynamic Modeling Be Used to Understand and Predict Synergistic Interactions between Chemicals? *Environ. Sci. Technol.* **51**, 14379–14389 (2017).
208. Arumugam, A. *et al.* Pharmaceuticals as emerging pollutants: Implications for water resource management in Malaysia. *Emerg. Contam.* **11**, 100470 (2025).
209. Pawłowska, B. *et al.* Drugs in the environment - Impact on plants: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **111**, 104557 (2024).
210. Przedpeńska, L. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs as emerging water and food contaminants: review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology.* **24**, 571–605 (2025).
211. Ruhí, A. *et al.* Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. *Sci. Total Environ.* **540**, 250–259 (2016).
212. Okuthe, G. E. *et al.* Effects of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Chemicals on Reproductive Biology of Aquatic Fauna: Penguins as Sentinel Species. *Journal of Xenobiotics.* **15**, 110 (2025).
213. Chmiel, T. *et al.* The impact of lipophilicity on environmental processes, drug delivery and bioavailability of food components. *Microchem. J.* **146**, 393–406 (2019).
214. Souza, C. R. de *et al.* Ecotoxicological studies of direct and indirect genotoxicity with *Artemia*: an integrative review. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* **59**, 305–320 (2024).
215. Rajabi, S. *et al.* *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU J. Pharm. Sci.* **23**, 20 (2015).

216. Homa, J. *et al.* Ecotoxicity studies reveal that organic cations in dicamba-derived ionic liquids can pose a greater environmental risk than the herbicide itself. *Sci. Total Environ.* **922**, 171062 (2024).
217. Anastas, P. *et al.* Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **29**, 301–312 (2010).
218. Chaiya, P. *et al.* In vitro anti-inflammatory activity using thermally inhibiting protein denaturation of egg albumin and antimicrobial activities of some organic solvents. *Mater. Today Proc.* **65**, 2290–2295 (2022).
219. Somrani, M. *et al.* Garlic, Onion, and Cinnamon Essential Oil Anti-Biofilms' Effect against *Listeria monocytogenes*. *Foods*. **9**, 567 (2020).
220. Paul, S. *et al.* *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Control* **22**, 725–731 (2011).
221. Zhang, J. *et al.* Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *J. Food Sci. Technol.* **56**, 2611–2620 (2019).
222. Sugano, K. *et al.* High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J. Biomol. Screen.* **6**, 189–196 (2001).
223. Ollila, O. H. S. *et al.* Interfacial Tension and Surface Pressure of High Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein, and Related Lipid Droplets. *Biophys. J.* **103**, 1236–1244 (2012).
224. Liu, Y. *et al.* CB-Dock2: improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. *Nucleic Acids Res.* **50**, W159–W164 (2022).
225. Prat, D. *et al.* CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. *Green Chem.* **18**, 288–296 (2016).
226. Mullard, A. Re-assessing the rule of 5, two decades on. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 777 (2018).
227. Coelho-Silva, J. *et al.* Clinical and forensic toxicology of bromism and bromoderma: mechanisms, diagnosis, and treatment. *Toxicol. Mech. Methods* **35**, 943–968 (2025).
228. Couling, D. J. *et al.* Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling. *Green Chem.* **8**, 82–90 (2006).
229. Kulacki, K. J. *et al.* Toxicity of imidazolium ionic liquids to freshwater algae. *Green Chem.* **10**, 104–110 (2008).
230. Brooke, D. *et al.* Kinetics of alkaline hydrolysis of N1-methylnicotinamide cation. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 4964–4972 (1968).
231. Trohalaki, S. *et al.* Prediction of Melting Points for Ionic Liquids. *QSAR Comb. Sci.* **24**, 485–490 (2005).
232. Niemczak, M. *et al.* Iodosulfuron-Methyl-Based Herbicidal Ionic Liquids Comprising Alkyl Betainate Cation as Novel Active Ingredients with Reduced Environmental Impact

- and Excellent Efficacy. *J. Agric. Food Chem.* **68**, 13661–13671 (2020).
233. Tzeli, D. *et al.* Theoretical study of free and encapsulated carboxylic acid and amide dimers. *Int. J. Quantum Chem.* **113**, 734–739 (2013).
 234. Tzeli, D. *et al.* Theoretical Study of Hydrogen Bonding in Homodimers and Heterodimers of Amide, Boronic Acid, and Carboxylic Acid, Free and in Encapsulation Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16977–16985 (2011).
 235. Buanz, A. *et al.* Thermal Behavior of Benzoic Acid/Isonicotinamide Binary Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **15**, 3249–3256 (2015).
 236. Cárdenas-Youngs, G.-M. *et al.* Dissociation Constants and Octanol–Water Partition Equilibria for Several Fluoroquinolones. *J. Chem. Eng. Data* **60**, 3327–3332 (2015).
 237. Ingram, T. *et al.* Modelling of pH dependent n-octanol/water partition coefficients of ionizable pharmaceuticals. *Fluid Phase Equilib.* **305**, 197–203 (2011).
 238. Chitnis, S. D. *et al.* Population pharmacokinetic modeling and noncompartmental analysis demonstrated bioequivalence between metformin component of metformin/vildagliptin fixed-dose combination products and metformin immediate-release tablet sourced from various countries. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **5**, 40–51 (2016).
 239. Sarveiya, V. *et al.* Ion-pairs of ibuprofen: increased membrane diffusion. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 717–724 (2004).
 240. Kumar, A. *et al.* Cytotoxicity and bioavailability assessment from micellar system based Thiamine-Phospholipid complexes. *J. Mol. Liq.* **407**, 125177 (2024).
 241. Willis, J. V *et al.* The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **16**, 405–410 (1979).
 242. Walocko, F. M. *et al.* The role of nicotinamide in acne treatment. *Dermatol. Ther.* **30**, e12481 (2017).
 243. Holzhäuser, E. *et al.* Nicotinic acid has anti-atherogenic and anti-inflammatory properties on advanced atherosclerotic lesions independent of its lipid-modifying capabilities. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **57**, 447–454 (2011).
 244. Digby, J. E. *et al.* Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in human monocytes are mediated by GPR109A dependent mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 669–676 (2012).
 245. Bhatia, M. *et al.* Development of ketoprofen-p-aminobenzoic acid co-crystal: formulation, characterization, optimization, and evaluation. *Med. Chem. Res.* **30**, 2090–2102 (2021).
 246. Rizk, H. F. *et al.* Newly synthesized pyranopyrazole nicotinamides derivatives as potent anti-inflammatory agents: In-silico, in-vitro, and in-vivo studies. *Bioorg. Chem.* **167**, 109205 (2025).
 247. Brycki, B. *et al.* Gemini Alkyldeoxy-D-Glucitolammonium Salts as Modern Surfactants and Microbiocides: Synthesis, Antimicrobial and Surface Activity, Biodegradation. *PLoS One* **9**, e84936 (2014).
 248. Cox *et al.* Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 355–358 (1998).

249. Askarizadeh, M. *et al.* Kinetic Modeling to Explain the Release of Medicine from Drug Delivery Systems. *ChemBioEng Rev.* **10**, 1006–1049 (2023).
250. Shirai, I. *et al.* Intestinal permeability of agaro-oligosaccharides: Transport across Caco-2 cell monolayers and pharmacokinetics in rats. *Front. Nutr.* **9**, (2022).
251. Xia, W. J. *et al.* Mechanistic Studies on Surfactant-Induced Membrane Permeability Enhancement. *Pharm. Res.* **17**, 612–618 (2000).
252. Pye, C. R. *et al.* Nonclassical Size Dependence of Permeation Defines Bounds for Passive Adsorption of Large Drug Molecules. *J. Med. Chem.* **60**, 1665–1672 (2017).
253. Chae, S. Y. *et al.* Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. *J. Control. Release* **102**, 383–394 (2005).
254. Abraham, M. H. *et al.* On the solubility of nicotinic acid and isonicotinic acid in water and organic solvents. *J. Chem. Thermodyn.* **61**, 74–78 (2013).
255. Turner, T. D. *et al.* The influence of solution environment on the nucleation kinetics and crystallisability of para-aminobenzoic acid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 27507–27520 (2016).
256. Chadha, R. *et al.* Kinetics of degradation of diclofenac sodium in aqueous solution determined by a calorimetric method. *Pharmazie* **58**, 631–635 (2003).
257. Finholt, P. *et al.* Rate Studies on the Hydrolysis of Niacinamide. *J. Pharm. Sci.* **51**, 655–661 (1962).
258. Gia Nghi Wernly-Chung, *et al.* Structure-reactivity relationships in the chemical hydrolysis of prodrug esters of nicotinic acid. *Int. J. Pharm.* **63**, 129–134 (1990).
259. Hsu, C.-H. *et al.* Chemical Stability of Esters of Nicotinic Acid Intended for Pulmonary Administration by Liquid Ventilation. *Pharm. Res.* **20**, 918–925 (2003).
260. Cai, K. *et al.* Cetylpyridinium chloride inhibits hepatocellular carcinoma growth and metastasis through regulating epithelial-mesenchymal transition and apoptosis. *PLoS One* **19**, e0310391 (2024).
261. Palm, K. *et al.* Polar Molecular Surface Properties Predict the Intestinal Absorption of Drugs in Humans. *Pharm. Res.* **14**, 568–571 (1997).
262. Rezki, N. *et al.* Identification of new pyridinium ionic liquids tagged with Schiff bases: Design, synthesis, in silico ADMET predictions and biological evaluations. *J. Mol. Liq.* **264**, 367–374 (2018).
263. Al-blewi, F. *et al.* A Profile of the In Vitro Anti-Tumor Activity and In Silico ADME Predictions of Novel Benzothiazole Amide-Functionalized Imidazolium Ionic Liquids. *International Journal of Molecular Sciences.* **20**, 2865 (2019).
264. Verma, D. D. *et al.* Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. *J. Control. Release* **97**, 55–66 (2004).
265. Hsieh, P.-W. *et al.* The co-drug of conjugated hydroquinone and azelaic acid to enhance topical skin targeting and decrease penetration through the skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **81**, 369–378 (2012).
266. Brammann, C. *et al.* An update on formulation strategies of benzoyl peroxide in efficient

- acne therapy with special focus on minimizing undesired effects. *Int. J. Pharm.* **578**, 119074 (2020).
267. Czopek, A. *et al.* The Lipophilicity Estimation of Selected Dermatological Drugs Using Micellar Electrokinetic Chromatography Method. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **38**, 1435–1438 (2015).
 268. Deng, Y. *et al.* Relevant parameters for assessing the environmental impact of some pyridinium, ammonium and pyrrolidinium based ionic liquids. *Chemosphere* **89**, 327–333 (2012).
 269. Anokwah, D. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant potential of the stem bark extract and some constituents of *Aidia genipiflora* (DC.) dandy (rubiacaceae). *Heliyon* **8**, (2022).
 270. Dharmadeva, S. *et al.* In vitro anti-inflammatory activity of *Ficus racemosa* L. bark using albumin denaturation method. *Ayu* **39**, 239–242 (2018).
 271. Abdollahi, F. *et al.* In-silico identification of COX-2 inhibitory phytochemicals from traditional medicinal plants: molecular docking, dynamics, and safety predictions. *Silico Pharmacol.* **13**, 133 (2025).
 272. Das, A. J. *et al.* Synthesis of salicylic acid phenylethyl ester (SAPE) and its implication in immunomodulatory and anticancer roles. *Sci. Rep.* **12**, 8735 (2022).
 273. Soltani Rad, M. N. *et al.* Design, synthesis, analgesic, antibacterial and docking studies of novel 8-piperazinylcaffeine carboxylate ionic liquids. *RSC Adv.* **14**, 28669–28683 (2024).
 274. Lin, Y. *et al.* Nicotinamide could reduce growth and cariogenic virulence of *Streptococcus mutans*. *J. Oral Microbiol.* **14**, 2056291 (2022).
 275. Feder-Kubis, J. *et al.* Imidazolium room-temperature ionic liquids with alkoxymethyl substituent: A quest for improved microbiological selectivity. *Chem. Eng. J.* **442**, 136062 (2022).
 276. Kamal, M. A. H. M. *et al.* Permeability of ionized salicylate derivatives through guinea pig dorsal skin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **53**, 441–443 (2005).
 277. Zyburtowicz-Ćwiartka, K. *et al.* Impact of Electromagnetic Field on the Physicochemical Properties, Permeability, and Accumulation of Salicylic Acid. *Applied Sciences*. **15**, 7606 (2025).
 278. Ossowicz-Rupniewska, P. *et al.* Transdermal Delivery Systems for Ibuprofen and Ibuprofen Modified with Amino Acids Alkyl Esters Based on Bacterial Cellulose. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6252 (2021).
 279. Paraskevopoulos, G. *et al.* Effects of imidazolium ionic liquids on skin barrier lipids – Perspectives for drug delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **659**, 449–462 (2024).
 280. Furuishi, T. *et al.* The Development and Characterization of Novel Ionic Liquids Based on Mono- and Dicarboxylates with Meglumine for Drug Solubilizers and Skin Permeation Enhancers. *Pharmaceutics*. **16**, 322 (2024).
 281. Rolfe, H. M. A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *J. Cosmet. Dermatol.* **13**, 324–328 (2014).

282. Akhavan, A. *et al.* Topical Acne Drugs. *Am. J. Clin. Dermatol.* **4**, 473–492 (2003).
283. Kamusewitz, H. *et al.* The relation between Young's equilibrium contact angle and the hysteresis on rough paraffin wax surfaces. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **156**, 271–279 (1999).
284. Gouveia, W. *et al.* Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere* **104**, 51–56 (2014).
285. Sakamoto, M. *et al.* Effect of Ionic Liquids on the Hatching of *Artemia salina* Cysts. *Aust. J. Chem.* **71**, 492–496 (2018).
286. Szabelak, A. *et al.* Behavioral and physiological responses of *Daphnia magna* to salicylic acid. *Chemosphere* **270**, 128660 (2021).
287. Goodman Johnston, R., Barnes, W., Haining Grant, R., Smith, F. R. & Young Samuel, W. New quaternary salts. (1961).
288. Gupta, G. *et al.* Specific Heat Capacity Estimations for Biologically and Medicinally Important Compounds: Lidocaine Hydrochloride, Clove Oil and β -Piperine Using the DSC Technique. *Curr. Phys. Chem.* **11**, 27–34 (2021).
289. Abu-Huwaij, R. *et al.* Mucoadhesive Dosage form of Lidocaine Hydrochloride: I. Mucoadhesive and Physicochemical Characterization. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **33**, 855–864 (2007).
290. Grouls, R. J. E. *et al.* Partition coefficients (n-octanol/water) of N-butyl-p-aminobenzoate and other local anesthetics measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **694**, 421–425 (1997).
291. Daryab, M. *et al.* Preparation and Characterization of Lidocaine-Loaded, Microemulsion-Based Topical Gels. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **21**, e123787 (2022).
292. Bennett, P. B. *et al.* On the Molecular Nature of the Lidocaine Receptor of Cardiac Na⁺ Channels. *Circ. Res.* **77**, 584–592 (1995).
293. Amir, R. *et al.* The Role of Sodium Channels in Chronic Inflammatory and Neuropathic Pain. *J. Pain* **7**, S1–S29 (2006).
294. Jia, S. *et al.* Cutaneous permeation kinetics and pharmacodynamics of topical lidocaine gel in rat. *Acta Pharm. Sin.* **38**, 631–633 (2003).
295. Fernández-Martínez, A. *et al.* Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Intravenous Lidocaine in Surgery: A Narrative Review. *Journal of Clinical Medicine*. **14**, 3883 (2025).
296. Berton, P. *et al.* Transdermal Bioavailability in Rats of Lidocaine in the Forms of Ionic Liquids, Salts, and Deep Eutectic. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, 498–503 (2017).
297. Miwa, Y. *et al.* Lidocaine self-sacrificially improves the skin permeation of the acidic and poorly water-soluble drug etodolac via its transformation into an ionic liquid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **102**, 92–100 (2016).

STRESZCZENIE

W ramach niniejszej pracy zaprojektowano, zsyntetyzowano i kompleksowo scharakteryzowano nowe grupy bioaktywnych układów jonowych, zawierających w swojej strukturze jony występujące w przyrodzie, oparte zarówno na pochodnych nikotynamidu, jak i lidokainy. Układy te obejmowały czwartorzędowe sole amoniowe (QASs) z przeciwjonami o zróżnicowanym charakterze strukturalnym (halogenek, salicylan, *p*-aminobenzoesan i nikotynian). Opracowane procedury syntezy charakteryzowały się wysoką wydajnością, a struktury otrzymanych związków potwierdzono metodami spektroskopowymi.

Nowe modyfikacje strukturalne nikotynamidu oraz lidokainy udowadniają możliwość szerokiego dostosowania kluczowych parametrów fizykochemicznych, takich jak lipofilowość, rozpuszczalność, zdolność agregacji oraz transport przez bariery biologiczne. W przypadku pochodnych lidokainy wartości współczynnika podziału oktanol–woda ($\log K_{OW}$) wahały się w szerokim zakresie od -1,70 do 2,08, przy czym długość łańcucha alkilowego konsekwentnie zwiększała lipofilowość związku, a rodzaj przeciwjonu znacząco modulował skalę tego efektu. Największy wzrost lipofilowości zaobserwowano w przypadku pochodnych salicylanowych (SL2–SL3), podczas gdy układy na bazie **PABA** zachowały bardziej zrównoważony profil hydrofilowo–lipofilowy. Podobne zależności wykazano również w przypadku szeregów homologicznych z kationem *N*-alkilonikotynamidu, gdzie odpowiedni dobór struktury anionu umożliwiał kontrolę transportu i właściwości biologicznych.

Badania aktywności biologicznej potwierdziły, że synteza układów o budowie jonowej nie tylko pozwala zachować aktywność farmakologiczną prekursorów, ale może również znacząco ją zwiększyć poprzez synergię kationów i anionów. W modelu hamowania denaturacji albuminy, wybrane pochodne lidokainy, a w szczególności te zawierające anion salicylanowy, osiągnęły aktywność przeciwzapalną przewyższającą działanie leku referencyjnego (diklofenaku sodowego), osiągając inhibicję sięgającą 59,1%. Wykazano również wyraźną zależność między strukturą a aktywnością, wskazującą, że optymalna aktywność biologiczna występuje w układach o pośredniej lipofilowości, podczas gdy nadmierne hydrofobowe wydłużanie łańcucha sprzyja agregacji i tym samym zmniejsza skuteczność związków.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa syntetyzowanych układów jonowych była silnie zależna od długości łańcucha alkilowego i rodzaju anionu, ujawniając wyraźny związek między strukturą a aktywnością. Zarówno w serii pochodnych nikotynamidu z anionem nikotynianowym (N1–N4), *p*-aminobenzoesanowym (P1–P4), jak i salicylanowym (S1–S7), związki pozbawione długiego hydrofobowego łańcucha alkilowego wykazywały znikomą aktywność (wartości MIC typowo $\geq 1\,000 - 4\,096$ mg/L), podczas gdy wydłużenie łańcucha prowadziło do znaczącego

wzrostu skuteczności. Wśród pochodnych nikotynamidu najwyższą aktywność uzyskano dla najbardziej lipofilowych pochodnych, **N4** i **P4**, które były szczególnie skuteczne wobec bakterii Gram-dodatnich. Dla *S. aureus* ich wartości MIC dochodziły do 3,9 mg/L, dla *B. subtilis* również do 3,9 mg/L (**N4**), a dla *M. luteus* do 15,6 mg/L. W przypadku bakterii Gram-ujemnych ich aktywność była niższa, ale nadal istotna – na przykład dla *M. catarrhalis* wartość MIC wyniosła 7,8 mg/L, a w przypadku *E. coli* 31,5 mg/L. W przypadku grzybów szczególnie istotną skuteczność wykazano wobec *C. neoformans*, gdzie wartość MIC dla **P4** osiągnęła poziom 3,9 mg/L, wyraźnie przewyższając związki referencyjne **[NA][NIK]** i **[NA][PABA]**, które pozostały praktycznie nieaktywne (> 1 000 mg/L). Podobną tendencję zaobserwowano w serii salicylanów, gdzie najbardziej aktywny związek, **S7** (o najdłuższym łańcuchu alkilowym), wykazał bardzo wysoką skuteczność w zwalczaniu patogenów skórnych i oportunistycznych. Wartość MIC/MBC równe 0,5 mg/L uzyskano dla bakterii *S. aureus*, 4,0 mg/L dla *C. acnes*, 4,0 mg/L dla *S. epidermidis*, 16 mg/L dla *C. albicans* i 64 mg/L dla *P. aeruginosa*. Aktywność **S7** była zatem wielokrotnie wyższa niż aktywność samego kwasu salicylowego lub nikotynamidu, które wykazywały słabą lub zerową aktywność. Związek **S6** również wykazał znaczącą aktywność (np. MIC = 8 mg/L wobec *S. aureus*), ale istotnie niższą niż **S7**, co potwierdza kluczową rolę optymalnej hydrofobowości czwartorzędowej soli amoniowej pod kątem właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

Badania rozpuszczalności w wodzie i PBS potwierdziły, że zarówno długość łańcucha alkilowego, jak i charakter przeciwjonu determinują profil właściwości fizykochemicznych otrzymanych związków. Bardziej polarne związki krótkołańcuchowe zachowały wysoką rozpuszczalność, podczas gdy pochodne długołańcuchowe, zwłaszcza pochodne salicylanowe, wykazywały szybki spadek rozpuszczalności wraz ze wzrostem hydrofobowości spowodowanym wydłużaniem łańcucha.

Badania dokowania molekularnego z COX-2 wykazały, że nowe pochodne mogą skutecznie oddziaływać z miejscem aktywnym enzymu odpowiedzialnego za procesy zapalne. Wszystkie ligandy zlokalizowane były w głównej kieszeni wiążącej, a energie wiązania (*Vina score*) dla kationów wahały się od -6,6 do -8,9 kcal·mol⁻¹. Bromek *N*-tetradecylolidokainy (**BL3**) wykazał najwyższe powinowactwo do enzymu, z uwagi na fakt, że jego struktura umożliwia pełne wykorzystanie oddziaływań hydrofobowych i kontakt ze wszystkimi kluczowymi resztami katalitycznymi (**R120**, **Y385**, **S530**). Wyniki te potwierdziły zależność między strukturą a aktywnością QASs i wykazały, że wydłużenie łańcucha alkilowego może zwiększyć ich potencjał przeciwzapalny poprzez lepsze dopasowanie do kanału enzymatycznego.

Dokowanie z kanałem sodowym NaV1.7 wykazało, że pomimo stosunkowo podobnych energii wiązania (od -4,8 do -6,8 kcal·mol⁻¹), potencjał znieczulający jest determinowany nie tylko

przez samą energię wiązania, ale również przez charakter interakcji z kluczowymi resztami odpowiedzialnymi za blokowanie przewodzenia. Wybrane pochodne, szczególnie **SL1** i **PL1–PL3**, wykazywały interakcje z resztami **Y1215**, **D1677** i **E1628**, co sugeruje zachowanie lub potencjalne wzmocnienie miejscowych właściwości znieczulających. Wyniki te wskazują, że odpowiedni dobór par kation–anion umożliwia projektowanie związków łączących działanie znieczulające i przeciwzapalne.

Badania SKIN-PAMPA wykazały, że nowe pochodne nikotynamidu, jak i lidokainy można zaprojektować jako systemy o zróżnicowanych profilach transportu przezskórnego. Krótkołańcuchowy **SL1** wykazał skuteczną permeację przez modelową membranę (44,3% po 24 godzinach), co czyni go obiecującym kandydatem do systemów transdermalnych. **SL3** z kolei wykazał całkowitą retencję w membranie już po 6 godzinach (100%), co wskazuje na jego wyjątkowy potencjał jako lek miejscowy, natomiast **PL2** łączy umiarkowaną retencję ze znaczną permeacją (80,8%). Uzyskane wyniki jednoznacznie dowodzą, że długość łańcucha alkilowego i typ przeciwjonu są narzędziami do precyzyjnego modulowania stopnia przenikania leku przez barierę skórną.

Istotnym elementem pracy była także ocena bezpieczeństwa środowiskowego zsyntezowanych produktów. Badania ekotoksyczności wobec organizmów *Artemia franciscana* wykazały, że większość nowych pochodnych pozostaje względnie nieszkodliwa ($EC_{50} > 1\ 000\text{ mg/L}$), a nawet związki o nieznacznie wyższej toksyczności (**BL2**, **SL2**, **PL2**) pozostają w kategorii „Praktycznie nietoksycznych”. Wyniki te wskazują, że racjonalne projektowanie układów jonowych może prowadzić do poprawy właściwości farmaceutycznych bez istotnego zwiększania ryzyka środowiskowego.

Finalnie uzyskane wyniki potwierdzają, że projektowanie układów jonowych typu API-QAS stanowi skuteczną strategię racjonalnego modulowania ich właściwości farmaceutycznych i biologicznych. Zarówno w przypadku serii nikotynamidu, jak i lidokainy wykazano, że ukierunkowany dobór kationu i anionu umożliwił opracowanie nowej platformy przeznaczonej do rozwoju wielofunkcyjnych formuł farmaceutycznych, znajdujących zastosowanie w lekach doustnych, miejscowych oraz transdermalnych.

ABSTRACT

In this work, new groups of bioactive ionic systems, containing naturally occurring ions in their structure, based on both nicotinamide and lidocaine derivatives were designed, synthesized, and comprehensively characterized. These systems included quaternary ammonium salts (QASs) with counterions of diverse structural character (halide, salicylate, *p*-aminobenzoate, and nicotinate). The developed synthetic procedures were characterized by high yield, and the structures of the resulting compounds were confirmed by spectroscopic methods.

The new structural modifications of nicotinamide and lidocaine demonstrated the possibility of broad tuning of key physicochemical parameters, such as lipophilicity, solubility, aggregation capacity, and transport across biological barriers. For lidocaine derivatives, the octanol–water partition coefficient ($\log K_{OW}$) values ranged widely from -1.70 to 2.08, with the alkyl chain length consistently increasing the compound's lipophilicity, and the type of counterion significantly modulating the magnitude of this effect. The greatest increase in lipophilicity was observed for salicylate derivatives (**SL2–SL3**), while **PABA** systems maintained a more balanced hydrophilic–lipophilic profile. Similar relationships were also demonstrated for homologous series with the *N*-alkylnicotinamide cation, where appropriate selection of the anion structure enabled control of transport and biological properties. Biological activity studies confirmed that the synthesis of ionic systems not only preserves the pharmacological activity of the precursors but can also significantly enhance it through cation–anion synergy. In the albumin denaturation inhibition model, selected lidocaine derivatives, particularly those containing the salicylate anion, demonstrated anti-inflammatory activity exceeding that of the reference drug (diclofenac sodium), achieving inhibition of up to 59.1%. A clear structure–activity relationship was also demonstrated, indicating that optimal biological activity occurs in systems with intermediate lipophilicity, while excessive hydrophobic chain extension promotes aggregation and thus reduces the efficacy of the compounds.

The antimicrobial activity of the synthesized ionic systems was strongly dependent on the alkyl chain length and the type of anion, revealing a clear structure–activity relationship. In nicotinamide derivative series with nicotinate (**N1–N4**), *p*-aminobenzoate (**P1–P4**) and salicylate (**S1–S7**) anion, compounds lacking the long hydrophobic alkyl chain showed negligible activity (MIC values typically $\geq 1,000$ – $4,096$ mg/L), while chain extension led to a significant increase in efficacy. Among the nicotinamide derivatives, the highest activity was obtained for the most lipophilic derivatives, **N4** and **P4**, which were particularly effective against Gram-positive bacteria. For *S. aureus*, their MIC values reached up to 3.9 mg/L, for *B. subtilis* also up to 3.9 mg/L (**N4**), and for *M. luteus* up to 15.6 mg/L. In the case of Gram-negative bacteria, their activity was lower but still significant – for example,

for *M. catarrhalis*, the MIC value was 7.8 mg/L, and for *E. coli* 31.5 mg/L. In the case of fungi, particularly significant efficacy was demonstrated against *C. neoformans*, where the MIC for **P4** reached 3.9 mg/L, clearly exceeding the reference compounds **[NA][NIK]** and **[NA][PABA]**, which remained practically inactive (>1,000 mg/L). A similar trend was observed in the salicylate series, where the most active compound, **S7** (with the longest alkyl chain), demonstrated very high efficacy in combating skin and opportunistic pathogens. MIC/MBC values of 0.5 mg/L were obtained for *S. aureus*, 4.0 mg/L for *C. acnes*, 4.0 mg/L for *S. epidermidis*, 16 mg/L for *C. albicans*, and 64 mg/L for *P. aeruginosa*. The activity of **S7** was therefore many times higher than that of salicylic acid or nicotinamide alone, which showed weak or no activity. Compound **S6** also demonstrated notable activity (e.g., MIC against *S. aureus* = 8 mg/L), but significantly lower than **S7**, confirming the crucial role of optimal hydrophobicity of the quaternary ammonium salt in antimicrobial properties.

Solubility studies in water and PBS confirmed that both the alkyl chain length and the nature of the counterion determine the physicochemical profile of the obtained compounds. The more polar short-chain compounds retained high solubility, while the long-chain derivatives, especially the salicylate derivatives, exhibited a rapid decrease in solubility with increasing hydrophobicity due to chain extension.

Molecular docking studies with COX-2 demonstrated that the new derivatives can effectively interact with the active site of the enzyme responsible for inflammatory processes. All ligands were located in the main binding pocket, and the interaction energies (*Vina scores*) for cations ranged from -6.6 to -8.9 kcal·mol⁻¹. *N*-tetradecyllidocaine bromide (**BL3**) demonstrated the highest affinity for the enzyme, due to its structure enabling full utilization of hydrophobic interactions and contact with all key catalytic residues (**R120**, **Y385**, **S530**). These results confirmed the structure–activity relationship of QASs and showed that extending the alkyl chain may increase their anti-inflammatory potential by better fitting to the enzymatic channel.

Docking with the sodium channel NaV1.7 revealed that despite relatively similar binding energies (ranging from -4.8 to -6.8 kcal·mol⁻¹), the anesthetic potential is determined not only by the binding energy itself but also by the nature of interactions with key residues responsible for conduction blocking. Selected derivatives, particularly **SL1** and **PL1–PL3**, exhibited interactions with residues **Y1215**, **D1677**, and **E1628**, suggesting preservation or potential enhancement of local anesthetic properties. These results indicate that appropriate selection of cation–anion pairs enables the design of compounds combining anesthetic and anti-inflammatory effects.

SKIN-PAMPA studies demonstrated that novel nicotinamide and lidocaine derivatives can be designed as systems with differentiated transdermal transport profiles. Short-chain salt

(**SL1**) demonstrated efficient permeation through a model membrane (44.3% after 24 hours), making it a promising candidate for transdermal delivery systems. Compound **SL3**, on the other hand, demonstrated complete membrane retention after just 6 hours (100%), indicating its exceptional potential as a topical drug, while **PL2** combines moderate retention with significant permeation (80.8%). The obtained results clearly indicate that the alkyl chain length and counterion type are tools for precisely modulating the rate of drug penetration through the skin barrier.

An important element of this work was also the assessment of the environmental safety of the synthesized products. Ecotoxicity studies on *Artemia franciscana* organisms showed that most of the new derivatives remain relatively harmless ($EC_{50} > 1,000$ mg/L), and even compounds with slightly higher toxicity (**BL2**, **SL2**, **PL2**) remain in the "Practically non-toxic" category. These results indicate that rational design of ionic systems can lead to improved pharmaceutical properties without significantly increasing environmental risk.

Gathered data confirm that designing ionic systems is an effective strategy for rationally modulating their pharmaceutical and biological properties. For both the nicotinamide and lidocaine series, it was demonstrated that the targeted selection of the cation and anion enabled the development of a new platform for the development of multifunctional pharmaceutical formulations for oral, topical and transdermal drug applications.

ANEKS

Wykaz odczynników stosowanych w pracy doktorskiej

Tabela A1. Czynniki alkilujące wykorzystane podczas realizacji pracy doktorskiej.

Nazwa	Producent	Czystość	Numer CAS
1-Bromoetan	Sigma-Aldrich	99,0%	74-96-4
1-Bromobutan	Sigma-Aldrich	99,0%	109-65-9
1-Bromoheksan	Sigma-Aldrich	99,0%	111-25-1
1-Bromooktan	Sigma-Aldrich	99,0%	111-83-1
1-Bromodekan	Sigma-Aldrich	98,0%	112-29-8
1-Bromododekan	Sigma-Aldrich	97,0%	143-15-7
1-Bromotetradekan	Sigma-Aldrich	97,0%	112-71-0

Tabela A2. Amidy, kwasy i wodorotlenki wykorzystane podczas realizacji pracy doktorskiej.

Nazwa	Producent	Czystość	Numer CAS
Nikotynamid	Sigma-Aldrich	98,0%	98-92-0
Lidokaina	Sigma-Aldrich	98,0%	137-58-6
Kwas nikotynowy	Sigma-Aldrich	98,0%	59-67-6
Kwas p-aminobenzoowy	Sigma-Aldrich	99,0%	150-13-0
Kwas salicylowy	Sigma-Aldrich	99,0%	69-72-7
Wodorotlenek potasu	Avantor	99,0%	1310-58-3

Tabela A3. Rozpuszczalniki wykorzystane podczas realizacji pracy doktorskiej.

Nazwa	Producent	Czystość	Numer CAS
Metanol	Avantor	99,8%	67-56-1
Etanol	Avantor	96,0%	64-17-5
Acetonitryl	Avantor	99,0%	75-05-8
Aceton	Avantor	99,0%	67-64-1
n-Propanol	Avantor	99,5%	71-23-8
Octan etylu	Avantor	99,0%	141-78-6
n-Oktanol	Sigma-Aldrich	99,0%	111-87-5
n-Heksan	Sigma-Aldrich	95,0%	110-54-3
Chloroform	Sigma-Aldrich	99,8%	67-66-3
Woda	ZTCh	<0,1µS	7732-18-5

Tabela A4. Odczynniki wykorzystywane w badaniach ekotoksyczności.

Nazwa	Producent	Czystość	Numer CAS
Chlorek sodu	Sigma-Aldrich	99,5%	7647-14-5
Chlorek potasu	Sigma-Aldrich	99,0%	7447-40-7
Chlorek wapnia dwuwodny	Sigma-Aldrich	99,0%	10035-04-8
Chlorek magnezu sześciowodny	Sigma-Aldrich	99,9%	7791-18-6
Siarczan magnezu siedmiowodny	Sigma-Aldrich	99,0%	10034-99-8
Wodorowęglan sodu	Sigma-Aldrich	95,0%	144-55-8
Kwas borowy	Sigma-Aldrich	99,5%	10043-35-3

Tabela A5. Materiały wykorzystywane do badań aktywności antybakteryjnej.

Nazwa	Producent	Czystość	Numer CAS
Bulion tioglikolanowy z rezasuryną	bioMerieux	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Pożywka płynna Sabourauda	Sigma-Aldrich	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Bulion Muellera-Hinton	Oxoid	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Agar tryptozowo-sojowy	bioMerieux	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Agar Columbia	Thermo Scientific	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Agar Sabourauda z dekstrozą	Sigma-Aldrich	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Jodek propidyny	Sigma-Aldrich	94,0%	25535-16-4
Płytki 96-dolkowe	Sigma-Aldrich	Nie dotyczy	Nie dotyczy

Tabela A6. Materiały wykorzystywane do badań potencjału przeciwwzapalnego – testu denaturacji albuminy.

Nazwa	Producent	Czystość	Numer CAS
Sproszkowana albumina białka jaja kurzego	Sigma-Aldrich	95,0%	9006-59-1
Sól sodowa diklofenaku	Sigma-Aldrich	98,0%	15307-79-6
PBS (tabletki)	Sigma-Aldrich	Nie dotyczy	Nie dotyczy

Tabela A7. Materiały wykorzystywane do badań stabilności w mediach o różnych pH.

Nazwa	Producent	Czystość	Numer CAS
PBS – tabletki (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>, sól fizjologiczna buforowana fosforanem)	Sigma-Aldrich	Nie dotyczy	Nie dotyczy
SGF (ang. <i>Simulated Gastric Fluid</i>, modelowy sok żołądkowy):			
Chlorek sodu	Sigma-Aldrich	99,5%	7647-14-5
HCl	Sigma-Aldrich	31,5-35,5%	7647-01-0
Woda	ZTCh	<0,1 μS	7732-18-5

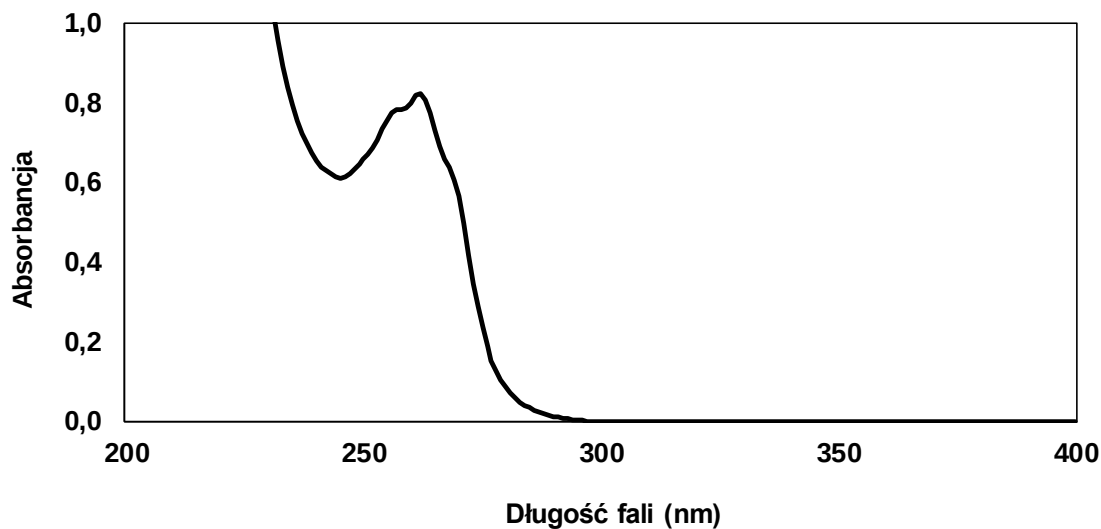
Tabela A8. Materiały wykorzystywane do testów PAMPA.

Nazwa	Producent	Czystość	Numer CAS
Lecytyna sojowa	Sigma-Aldrich	94,0%	8002-43-5
<i>n</i>-Dodekan	Sigma-Aldrich	99,0%	112-40-3
Sól sodowa diklofenaku	Sigma-Aldrich	98,0%	15307-79-6
PBS (tabletki)	Sigma-Aldrich	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Mirystynian izopropylu (IPM)	Sigma-Aldrich	98,0%	110-27-0
Olej silikonowy	Sigma-Aldrich	99,0%	63148-62-9
Płytki Transwell® 12-dolkowe (o wielkości porów 0,4 μm)	Sigma-Aldrich	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Woda	ZTCh	<0,1 μS	7732-18-5

Opis widm UV, FT-IR, ^1H NMR i ^{13}C NMR

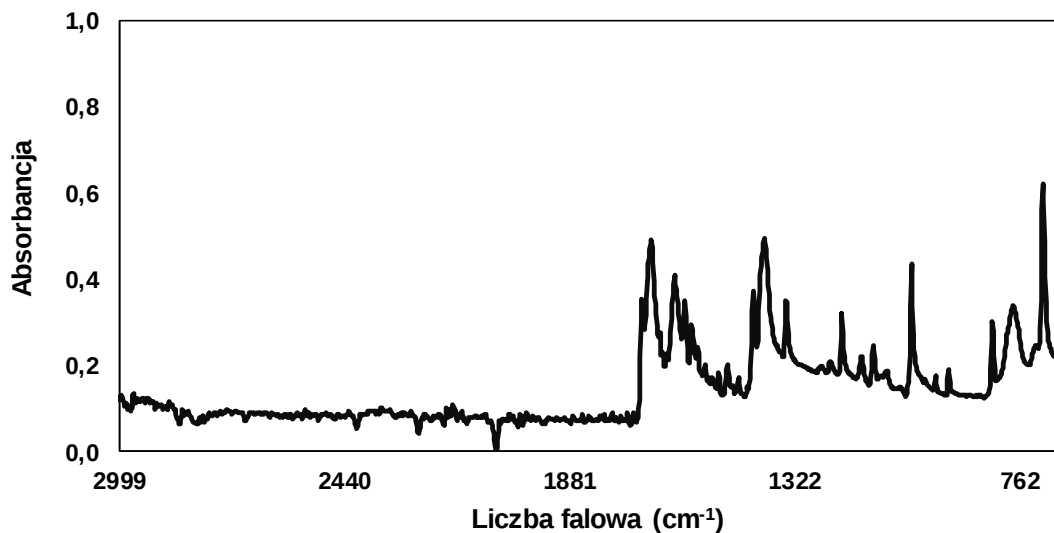
Nikotynamid (NA):

λ_{max} (metanol) = 262 nm; $\varepsilon = 3,02 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



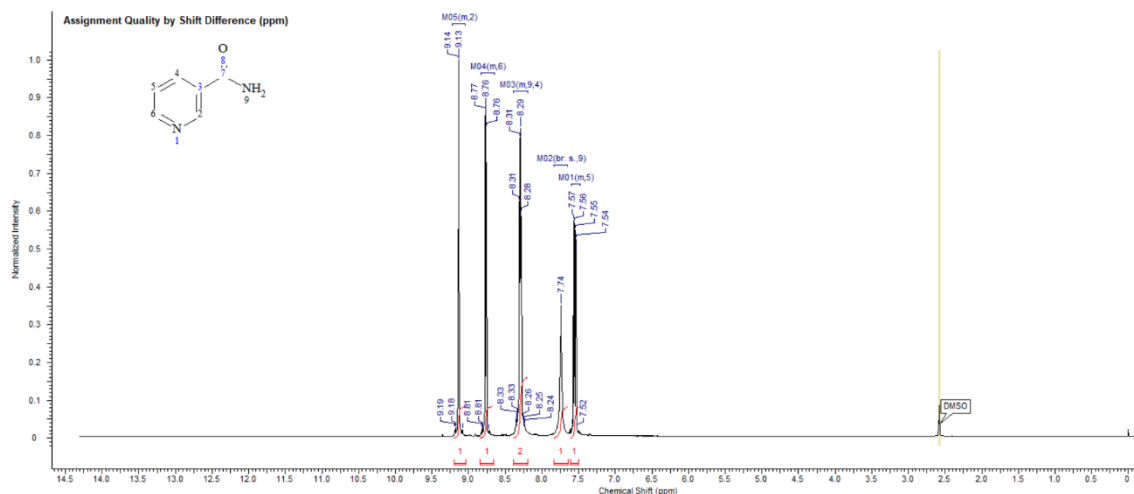
Rysunek A1. Widmo UV nikotynamidu (NA).

$IR \nu_{\text{max}} [\text{cm}^{-1}] = 1678, 1618, 1424, 1389, 1342, 1204, 1126, 1031, 830, 781, 703$.

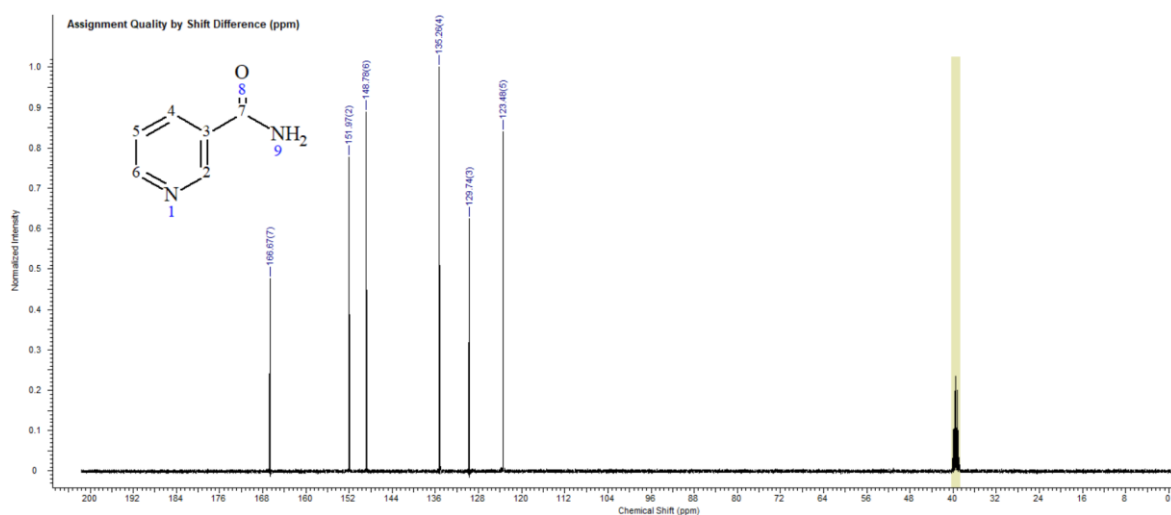


Rysunek A2. Widmo FT-IR nikotynamidu (NA).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 7,48 - 7,59 (m, 1 H); 7,74 (br, s, 1 H); 8,19 - 8,39 (m, 2 H); 8,65 - 8,83 (m, 1 H); 9,05 - 9,22 (m, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 123,48; 129,74; 135,26; 148,78; 151,97; 166,67.



Rysunek A3. Widmo ^1H NMR nikotynamidu (NA).



Rysunek A4. Widmo ^{13}C NMR nikotynamidu (NA).

Bromek *N*-etylonikotynamidu (1)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 204 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 265 nm; $\epsilon_1 = 1,17 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 4,35 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 1704, 1658, 1459, 1403, 1148, 803, 675. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 1,45 - 1,62 (m, 3 H); 4,66 - 4,77 (m, 2 H); 8,13 (s, 1 H); 8,20 - 8,29 (m, 1 H); 8,58 - 8,72 (m, 1 H); 8,94 (dt, $J=8,16, 1,33$ Hz, 1 H); 9,33 (d, $J=6,07$ Hz, 1 H); 9,61 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 16,25; 56,73; 127,89; 133,54; 143,56; 144,47; 146,26; 162,89.

Bromek *N*-butylonikotynamidu (2)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 204 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 265 nm; $\epsilon_1 = 1,21 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 3,68 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 1701, 1655, 1459, 1403, 1148, 803, 672. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,86 - 1,01 (m, 3 H); 1,25 - 1,44 (m, 2 H); 1,90 - 2,08 (m, 2 H); 4,74 - 4,87 (t, 2 H); 8,24 (s, 1 H); 8,31 - 8,40 (m, 1 H); 8,75 (s, 1 H); 9,02 - 9,12 (m, 1 H); 9,42 - 9,51 (m, 1 H); 9,75 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,37; 18,77; 32,57; 60,79; 127,91; 133,59; 143,64; 144,59; 146,46; 162,83.

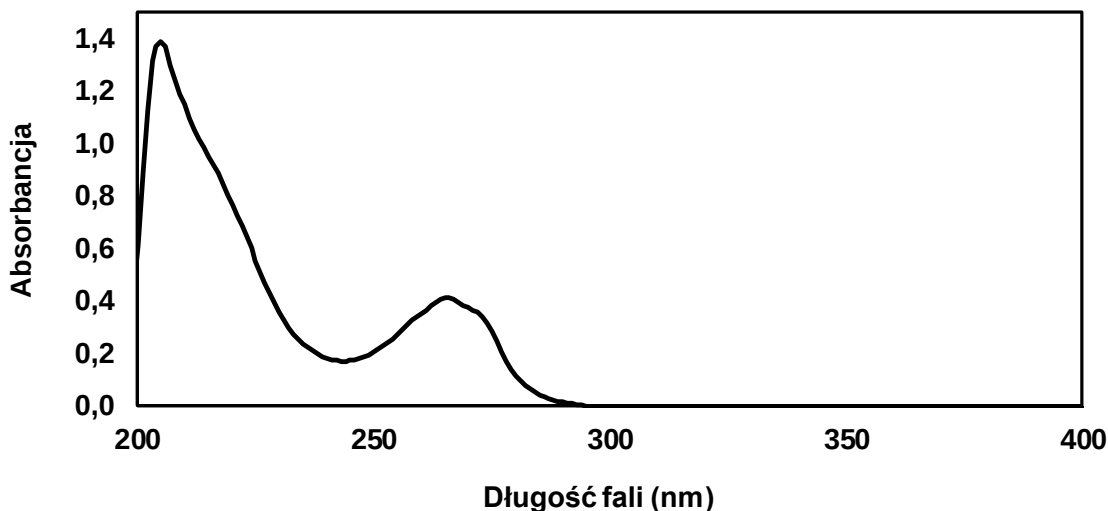
Bromek *N*-heksylonikotynamidu (3)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 204 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 265 nm; $\epsilon_1 = 1,43 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 4,14 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2943, 2863, 1701, 1655, 1459, 1403, 1148, 803, 673. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,76 - 0,95 (m, 3 H); 1,16 - 1,42 (m, 6 H); 1,92 - 2,09 (m, 2 H); 4,71 - 4,85 (t, 2 H); 8,23 (s, 1 H); 8,31 - 8,40 (m, 1 H); 8,72 - 8,80 (m, 1 H); 9,03 - 9,11 (m, 1 H); 9,45 (d, $J=6,07$ Hz, 1 H);

9,74 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,80; 21,82; 25,02; 30,54; 30,59; 60,97; 127,88; 133,58; 143,59; 144,60; 146,43; 162,79.

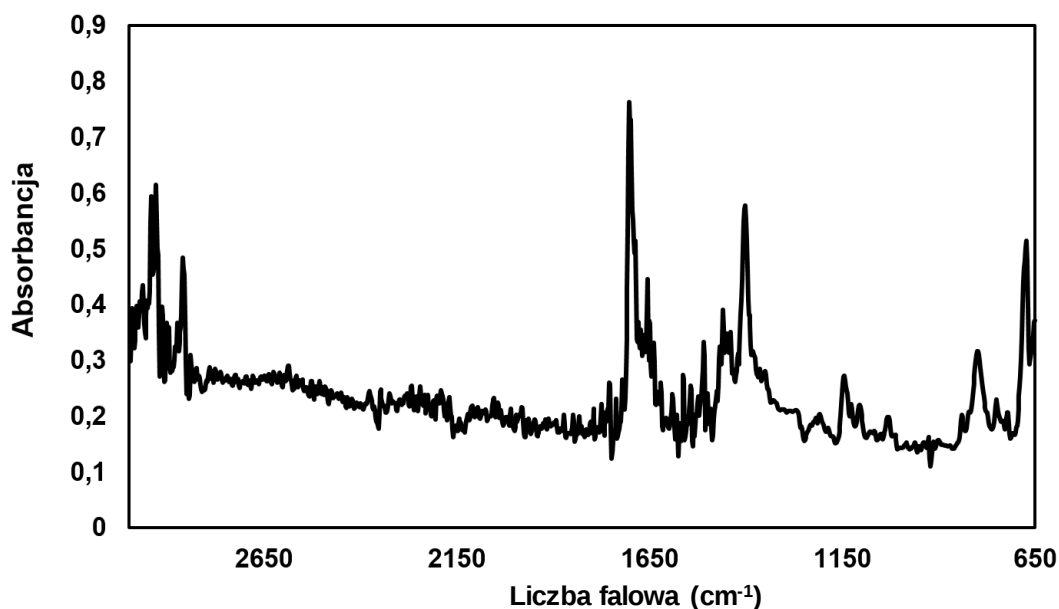
Bromek *N*-oktylonikotynamidu (4)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 204 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 265 nm; $\epsilon_1 = 1,31 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 3,89 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



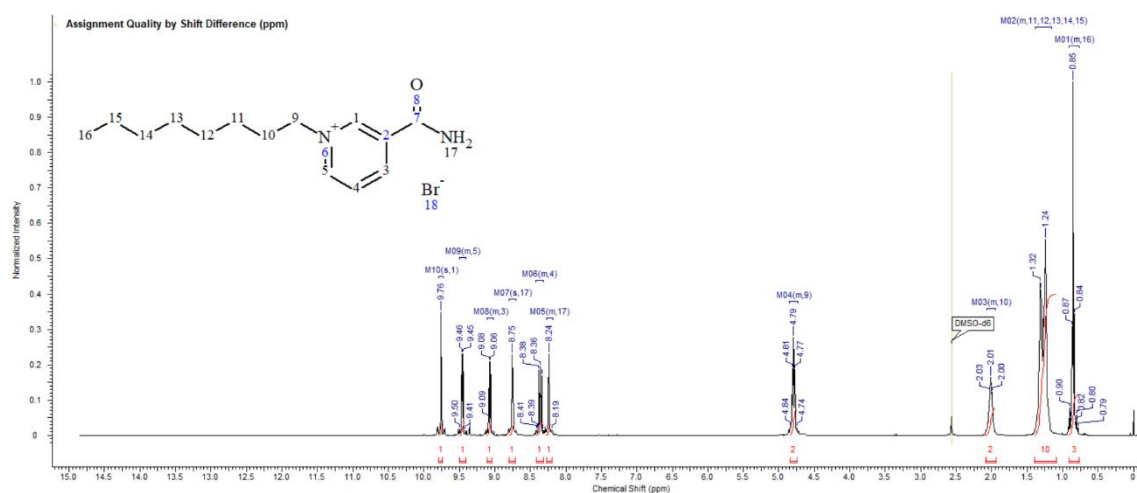
Rysunek A5. Widmo UV bromku *N*-oktylonikotynamidu (4).

IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2941, 2895, 1701, 1655, 1459, 1403, 1148, 803, 672.

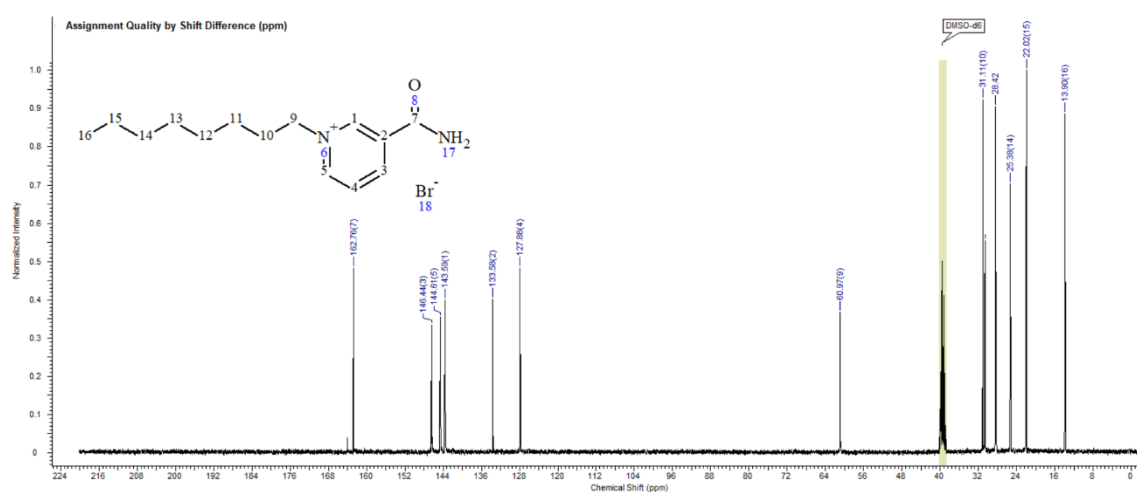


Rysunek A6. Widmo FT-IR bromku *N*-oktylonikotynamidu (4).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,77 - 0,91 (m, 3 H); 1,15 - 1,39 (m, 10 H); 1,95 - 2,07 (m, 2 H); 4,73 - 4,85 (t, 2 H); 8,18 - 8,27 (m, 1 H); 8,32 - 8,42 (m, 1 H); 8,75 (s, 1 H); 9,02 - 9,11 (m, 1 H); 9,40 - 9,50 (m, 1 H); 9,76 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,90; 22,02; 25,38; 28,36; 28,42; 30,67; 31,11; 60,97; 127,88; 133,58; 143,59; 144,61; 146,44; 162,76.



Rysunek A7. Widmo ^1H NMR bromku *N*-oktylonikotynamidu (4).



Rysunek A8. Widmo ^{13}C NMR bromku *N*-oktylonikotynamidu (4).

Bromek *N*-decylo-nikotynamidu (5)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 204 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 265 nm; $\epsilon_1 = 1,69 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 3,85 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2943, 2863, 1701, 1655, 1459, 1403, 1148, 803, 673. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,80 - 0,91 (m, 3 H); 1,16 - 1,37 (m, 14 H); 1,99 (br, s, 2 H); 4,74 (t, $J=7,46$ Hz, 2 H) 8,22 (s, 1 H) 8,33 (dd, $J=8,04$, 6,22 Hz, 1 H) 8,71 (s, 1 H) 9,03 (d, $J=8,13$ Hz, 1 H) 9,39 (d, $J=6,14$ Hz, 1 H) 9,69 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,93; 22,08; 25,38; 28,65; 30,66; 31,25; 60,98; 127,85; 133,63; 143,48; 144,68; 146,41; 162,76.

Bromek *N*-dodecylo-nikotynamidu (6)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 204 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 265 nm; $\epsilon_1 = 1,76 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 3,78 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2943, 2863, 1701, 1655, 1459, 1401, 1148, 805, 672. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,78 - 0,93 (m, 3 H); 1,13 - 1,36 (m, 18 H); 1,99 (d, $J=6,45$ Hz, 2 H); 4,73 (t, $J=7,50$ Hz, 2 H); 8,22 (s, 1 H); 8,32 (dd, $J=7,97$, 6,07 Hz, 1 H); 8,69 (s, 1 H); 9,02 (dt, $J=8,21$, 1,30 Hz, 1 H); 9,36 (d, $J=6,07$ Hz, 1 H); 9,67 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,93; 22,08; 25,40; 28,42; 28,71; 28,79; 28,93; 29,00; 29,01; 30,67; 31,28; 61,02; 127,86; 133,67; 143,48; 144,67; 146,40; 162,77.

Bromek *N*-tetradecylo-nikotynamidu (7)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 204 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 265 nm; $\epsilon_1 = 1,73 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 3,77 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2946, 2868, 1701, 1655, 1459, 1401, 1148, 804, 676. ^1H NMR (400 MHz,

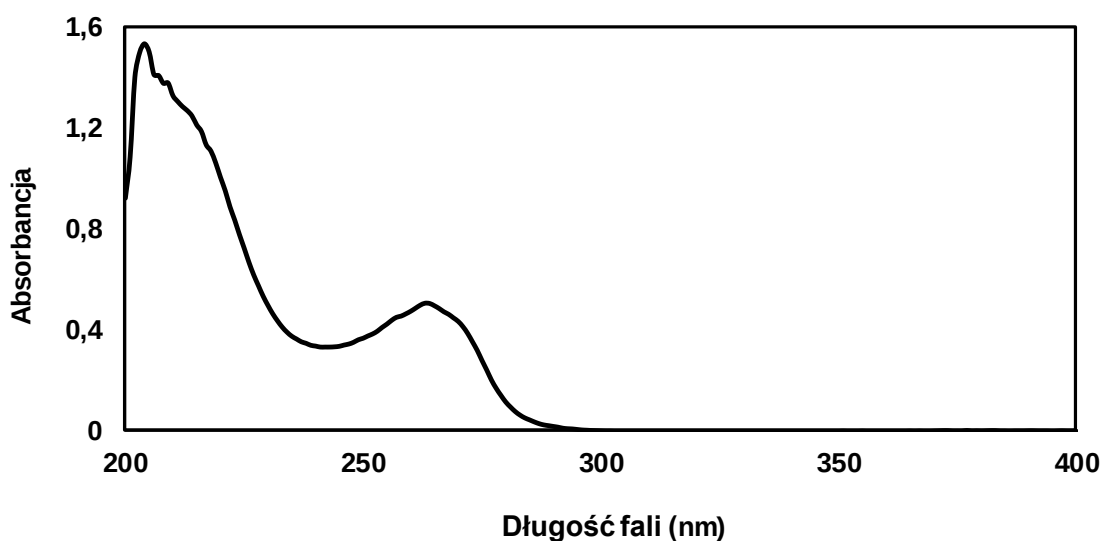
DMSO-*d*₆ δ ppm = 0,86 (t, *J*=6,55 Hz, 3 H) 1,07 - 1,51 (m, 22 H) 1,98 (br, s, 2 H) 4,73 (t, *J*=7,38 Hz, 2 H) 8,22 (br, s, 1 H) 8,28 - 8,40 (m, 1 H) 8,69 (br, s, 1 H) 9,02 (d, *J*=7,96 Hz, 1 H) 9,36 (d, *J*=5,81 Hz, 1 H) 9,66 (br, s, 1 H). **¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆)** δ ppm = 13,92; 22,08; 25,39; 29,01; 31,28; 61,01; 127,84; 133,65; 143,40; 144,70; 146,39; 162,76.

Nikotynian *N*-heksylonikotynamidu (N1)

$\lambda_{\max 1}$ (metanol) = 200 nm; $\lambda_{\max 2}$ (metanol) = 263 nm; $\epsilon_1 = 1.62 \cdot 10^4$ dm³mol⁻¹cm⁻¹; $\epsilon_2 = 4.66 \cdot 10^3$ dm³mol⁻¹cm⁻¹. **IR $\nu_{\max}$ [cm⁻¹]** = 2928, 2861, 1696, 1588, 1549, 1509, 1452, 1401, 1377, 1193, 1146, 1088, 1021, 838, 792, 756, 702, 669. **¹H NMR (401 MHz, metanol-*d*₄)** δ ppm = 0,79 - 0,95 (m, 3 H); 1,23 - 1,46 (m, 6 H); 1,97 - 2,14 (m, 2 H); 4,66 - 4,82 (m, 2 H); 7,47 (ddd, *J*=7,89, 4,93, 0,87 Hz, 1 H); 8,26 (dd, *J*=8,03, 6,20 Hz, 1 H); 8,31 - 8,37 (m, 1 H); 8,58 (dd, *J*=4,92, 1,73 Hz, 1 H); 9,04 (dt, *J*=8,21, 1,41 Hz, 1 H); 9,07 (dd, *J*=2,10, 0,91 Hz, 1 H); 9,24 (dt, *J*=6,09, 1,20 Hz, 1 H); 9,61 (s, 1 H). **¹³C NMR (100 MHz, metanol-*d*₄)** δ ppm = 14,41; 23,53; 26,97; 32,35; 32,53; 63,63; 124,81; 129,53; 134,83; 135,94; 138,83; 145,25; 146,10; 147,81; 151,23; 151,34; 165,30; 172,14.

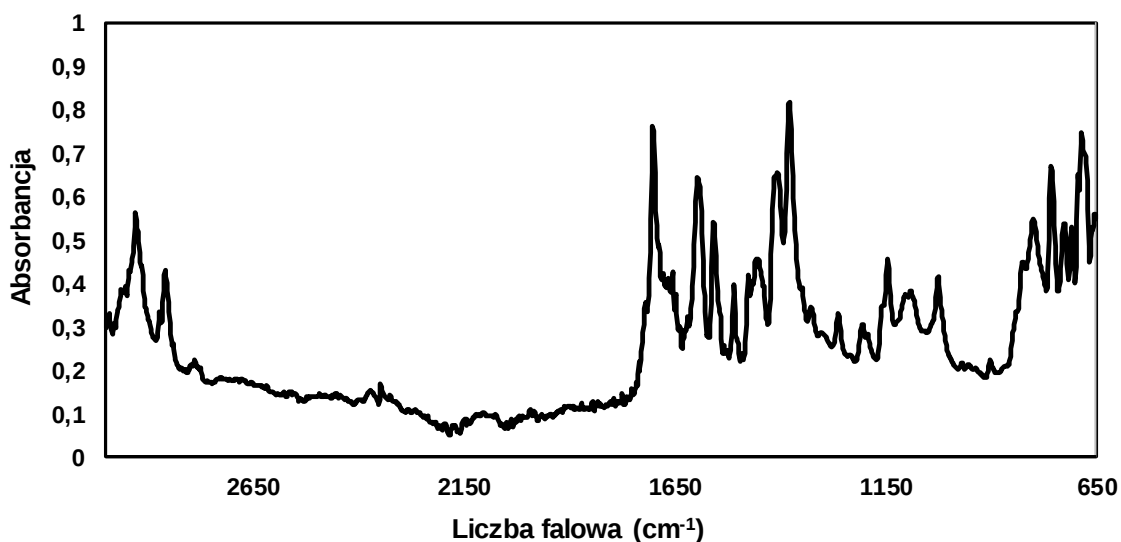
Nikotynian *N*-oktylonikotynamidu (N2)

$\lambda_{\max 1}$ (metanol) = 204 nm; $\lambda_{\max 2}$ (metanol) = 263 nm; $\epsilon_1 = 4.39 \cdot 10^4$ dm³mol⁻¹cm⁻¹; $\epsilon_2 = 1.44 \cdot 10^4$ dm³mol⁻¹cm⁻¹.



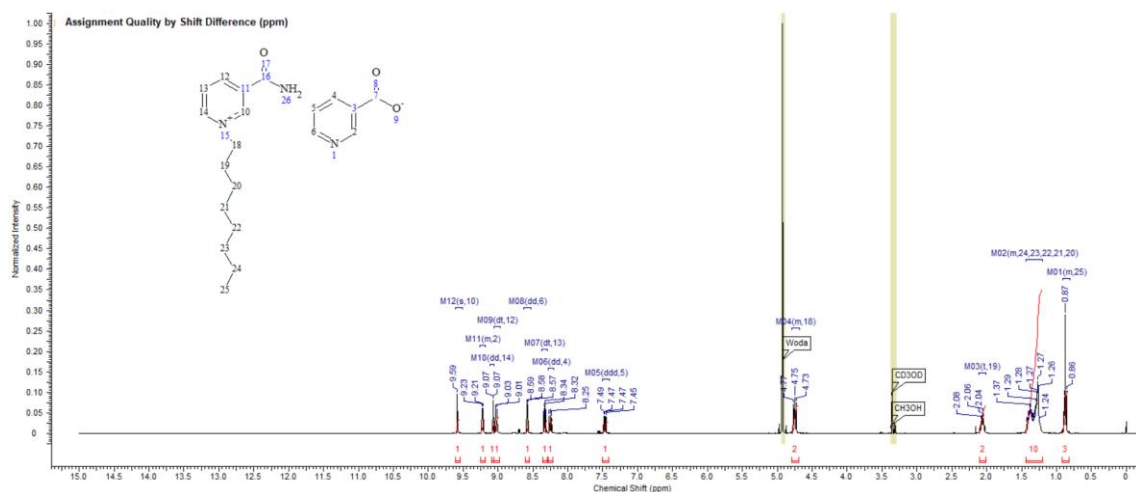
Rysunek A9. Widmo UV nikotynianu *N*-oktylonikotynamidu (N2).

IR $\nu_{\max}$ [cm⁻¹] = 2928, 2861, 1696, 1588, 1549, 1509, 1452, 1401, 1377, 1263, 1204, 1193, 1144, 1088, 1027, 801, 756, 727, 684.

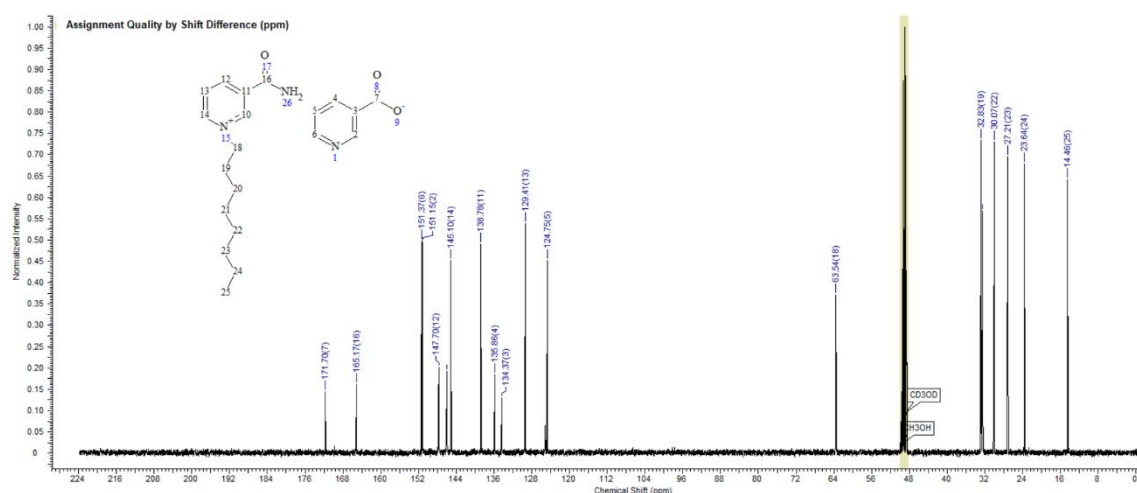


Rysunek A10. Widmo FT-IR nikotynianu *N*-oktylonikotynamidu (N2).

^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 0,81 - 0,91 (m, 3 H); 1,20 - 1,44 (m, 10 H); 2,06 (t, $J=7,31$ Hz, 2 H); 4,69 - 4,79 (m, 2 H); 7,47 (ddd, $J=7,92$; 4,91; 0,82 Hz, 1 H); 8,25 (dd, $J=8,08$; 6,15 Hz, 1 H); 8,33 (dt, $J=7,84$; 1,89 Hz, 1 H); 8,58 (dd, $J=4,89$; 1,69 Hz, 1 H); 9,02 (dt, $J=8,13$; 1,45 Hz, 1 H); 9,07 (dd, $J=2,13$; 0,87 Hz, 1 H); 9,18 - 9,26 (m, 1 H); 9,59 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 14,50; 23,71; 27,21; 30,12; 30,37; 30,48; 30,57; 32,50; 33,00; 63,53; 124,76; 129,41; 134,32; 135,84; 138,80; 145,09; 146,01; 147,70; 151,15; 151,37; 165,17; 171,69.



Rysunek A11. Widmo ^1H NMR nikotynianu *N*-oktylonikotynamidu (N2).



Rysunek A12. Widmo ^{13}C NMR nikotynianu *N*-oktylonikotynamidu (N2).

Nikotynian *N*-decylonikotynamidu (N3)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 202 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 263 nm; $\epsilon_1 = 3,33 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 1,05 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2928, 2861, 1696, 1588, 1549, 1509, 1452, 1401, 1377, 1263, 1202, 1144, 1090, 1025, 825, 756, 723, 684. ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 0,79 - 0,95 (m, 3 H); 1,19 - 1,45 (m, 14 H); 2,00 - 2,14 (m, 2 H); 4,65 - 4,79 (m, 2 H); 7,47 (m, $J=7,90$; 4,90; 0,70 Hz, 1 H); 8,25 (dd, $J=7,93$; 6,23 Hz, 1 H); 8,29 - 8,37 (m, 1 H); 8,58 (dd, $J=4,91$; 1,61 Hz, 1 H); 9,02 (dd, $J=8,17$; 1,18 Hz, 1 H); 9,06 - 9,10 (m, 1 H); 9,22 (d, $J=6,04$ Hz, 1 H); 9,58 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 14,50; 23,71; 27,21; 30,12; 30,37; 30,48; 30,57; 32,50; 33,00; 63,53; 124,76; 129,41; 134,32; 135,84; 138,80; 145,09; 146,01; 147,70; 151,15; 151,37; 165,17; 171,69.

Nikotynian *N*-dodecylonikotynamidu (N4)

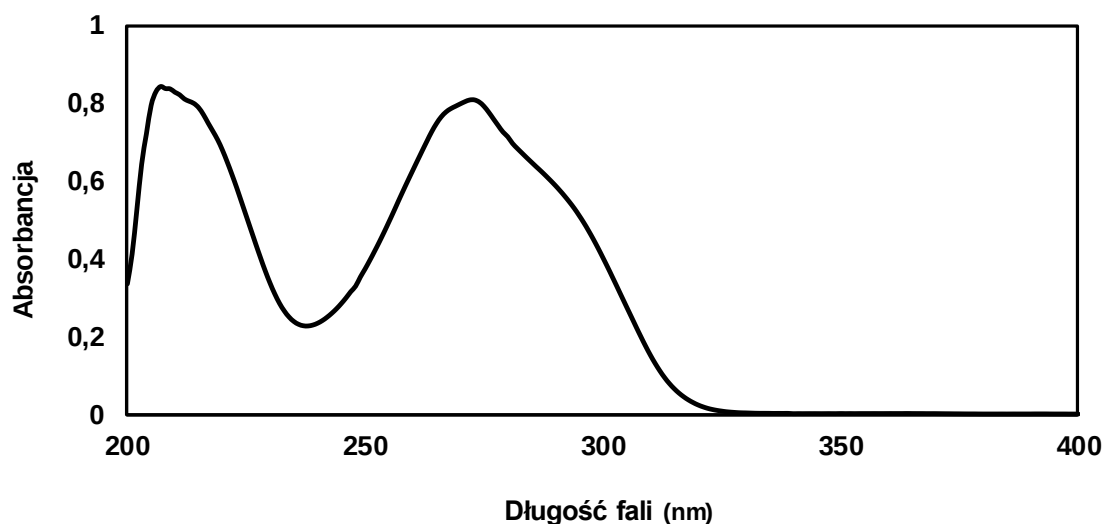
$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 205 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 263 nm; $\epsilon_1 = 2,67 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 9,02 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2928, 2861, 1696, 1588, 1549, 1509, 1452, 1401, 1377, 1263, 1202, 1146, 1086, 1021, 840, 801, 756, 704, 684. ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 0,84 - 0,97 (m, 3 H); 1,24 - 1,47 (m, 18 H); 2,09 (t, $J=7,32$ Hz, 2 H); 4,70 - 4,82 (m, 2 H); 7,48 (m, $J=7,90$; 4,90; 0,90 Hz, 1 H); 8,26 (dd, $J=8,03$; 6,14 Hz, 1 H); 8,35 (dt, $J=7,91$; 1,90 Hz, 1 H); 8,59 (dd, $J=4,91$; 1,70 Hz, 1 H); 9,04 (dt, $J=8,17$; 1,44 Hz, 1 H); 9,09 (dd, $J=2,12$; 0,90 Hz, 1 H); 9,24 (dt, $J=6,09$; 1,20 Hz, 1 H); 9,59 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 14,50; 23,74; 27,23; 30,14; 30,46; 30,49; 30,62; 30,73; 32,51; 33,06; 63,56; 124,71; 129,42; 134,63; 135,86; 138,77; 145,11; 146,01; 147,71; 151,17; 151,27; 165,19; 171,97.

p-Aminobenzoesan *N*-heksylonikotynamidu (P1)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 207 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 273 nm; $\epsilon_1 = 1,56 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 1,48 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2926, 1655, 1631, 1601, 1586, 1532, 1467, 1407, 1366, 1304, 1157, 1131, 1027, 855, 794, 732, 704, 685. ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 0,79 - 0,98 (m, 3 H); 1,20 - 1,43 (m, 6 H); 1,98 (quin, $J=7,58$ Hz, 2 H); 4,54 - 4,72 (m, 2 H); 6,52 - 6,66 (m, 2 H); 7,59 - 7,80 (m, 2 H); 8,13 (dd, $J=7,99$; 6,15 Hz, 1 H); 8,95 (dt, $J=8,28$; 1,43 Hz, 1 H); 9,07 (dt, $J=6,10$; 1,26 Hz, 1 H); 9,50 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 14,33; 23,46; 26,87; 32,26; 32,41; 63,52; 114,64; 127,41; 129,35; 132,03; 135,75; 145,04; 145,84; 147,52; 151,70; 165,23; 175,85.

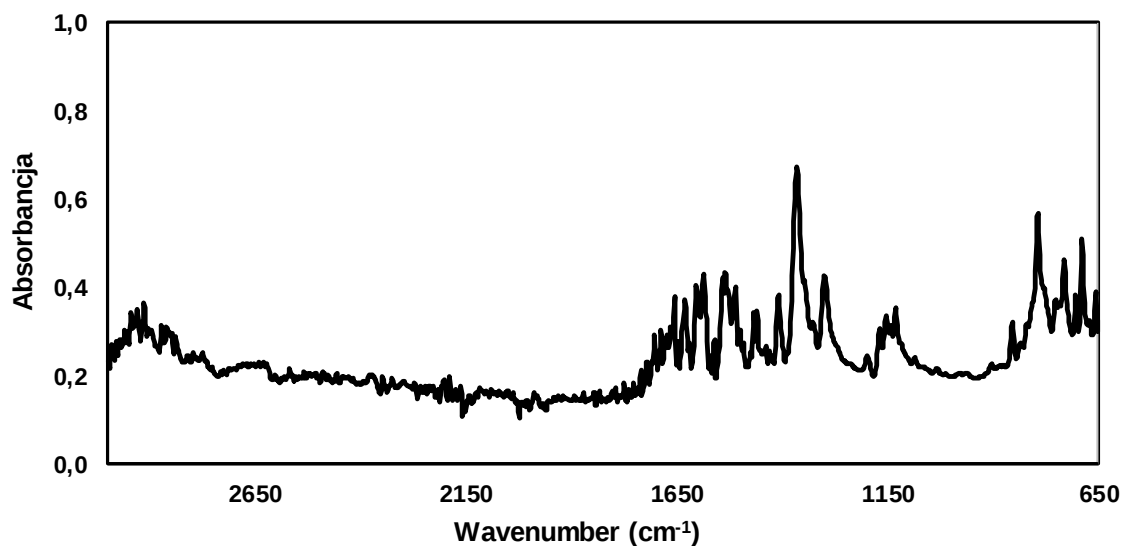
***p*-Aminobenzoesan *N*-oktylonikotynamidu (P2)**

$\lambda_{\max 1}$ (methanol) = 207 nm; $\lambda_{\max 2}$ (methanol) = 273 nm; $\epsilon_1 = 1,57 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 1,50 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



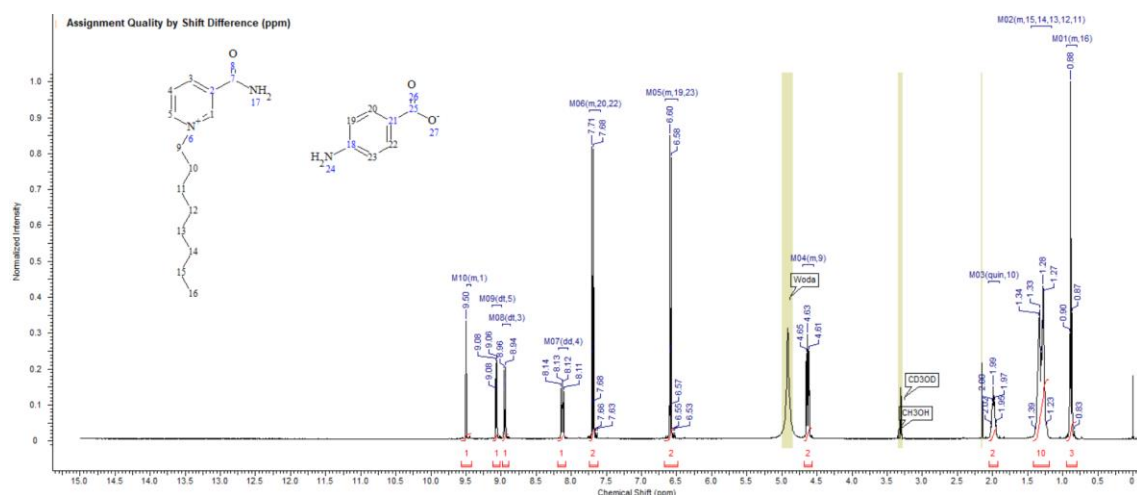
Rysunek A13. Widmo UV nikotynianu *N*-oktylonikotynamidu (P2).

$IR \nu_{\max} [\text{cm}^{-1}] = 2926, 1655, 1631, 1601, 1586, 1532, 1467, 1407, 1366, 1304, 1157, 1027, 855, 794, 732, 704, 685.$

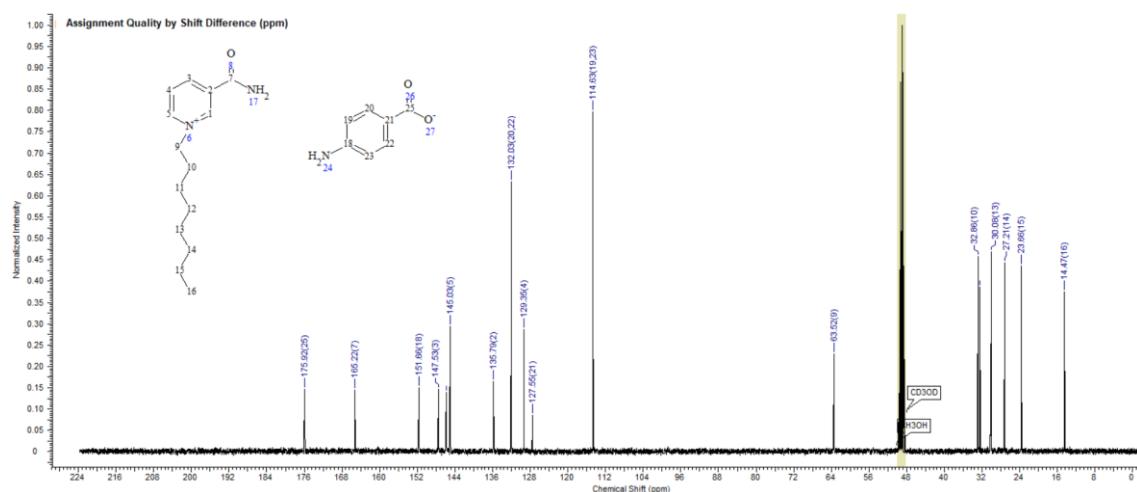


Rysunek A14. Widmo FT-IR nikotynianu *N*-oktylonikotynamidu (P2).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, methanol- d_4) δ ppm = 0,79 - 0,95 (m, 3 H); 1,16 - 1,46 (m, 10 H); 1,99 (quin, $J=7,46$ Hz, 2 H); 4,55 - 4,70 (m, 2 H); 6,48 - 6,67 (m, 2 H); 7,59 - 7,75 (m, 2 H); 8,13 (dd, $J=8,04$; 6,10 Hz, 1 H); 8,95 (dt, $J=8,18$; 1,48 Hz, 1 H); 9,07 (dt, $J=6,10$; 1,21 Hz, 1 H); 9,44 - 9,49 (m, 1 H).
 $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, methanol- d_4) δ ppm = 14,47; 23,66; 27,21; 30,08; 30,17; 32,47; 32,86; 63,52; 114,63; 127,55; 129,35; 132,03; 135,79; 145,03; 145,86; 147,53; 151,66; 165,22; 175,92.



Rysunek A15. Widmo ^1H NMR *p*-aminobenzoesanu *N*-oktylonikotynamidu (P2).



Rysunek A16. Widmo ^{13}C NMR *p*-aminobenzoesanu *N*-oktylonikotynamidu (A2).

p-Aminobenzoesan *N*-decylonikotynamidu (P3)

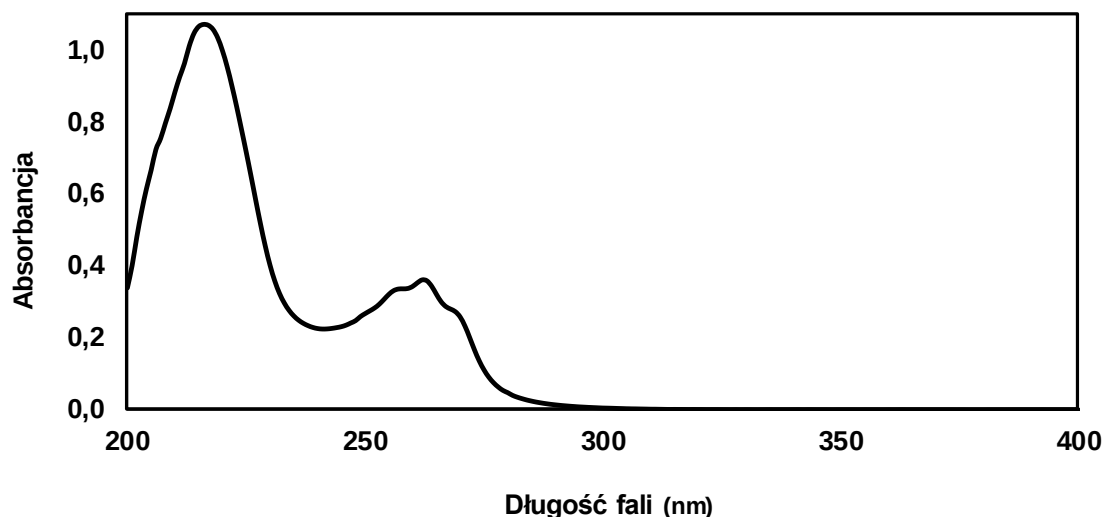
$\lambda_{\text{max}1}$ (methanol) = 206 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (methanol) = 273 nm; $\epsilon_1 = 1,66 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 1,61 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2924, 1655, 1631, 1601, 1586, 1532, 1467, 1407, 1366, 1304, 1157, 1027, 855, 794, 732, 704, 685. ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 0,79 - 0,96 (m, 3 H); 1,03 - 1,57 (m, 14 H); 1,99 (quin, $J=7,46$ Hz, 2 H); 4,53 - 4,70 (m, 2 H); 6,47 - 6,67 (m, 2 H); 7,55 - 7,79 (m, 2 H); 8,13 (dd, $J=8,04$; 6,20 Hz, 1 H); 8,95 (dt, $J=8,18$; 1,43 Hz, 1 H); 9,07 (dt, $J=6,10$; 1,21 Hz, 1 H); 9,49 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 14,95; 24,18; 27,66; 30,57; 30,85; 30,95; 31,04; 32,92; 33,48; 63,98; 115,09; 127,99; 129,80; 132,48; 136,25; 145,48; 146,32; 147,99; 152,11; 165,66; 176,38.

p-Aminobenzoesan *N*-dodecylonikotynamidu (P4)

$\lambda_{\text{max}1}$ (methanol) = 208 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (methanol) = 273 nm; $\epsilon_1 \text{ max} = 1,79 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 1,76 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2930, 2853, 1655, 1631, 1601, 1586, 1532, 1467, 1407, 1366, 1304, 1157, 1027, 855, 794, 732, 704, 685. ^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 0,78 - 0,97 (m, 3 H); 1,15 - 1,44 (m, 18 H); 1,86 - 2,08 (m, 2 H); 4,54 - 4,70 (m, 2 H); 6,48 - 6,64 (m, 2 H); 7,56 - 7,76 (m, 2 H); 8,12 (dd, $J=8,04$; 6,10 Hz, 1 H); 8,94 (dt, $J=8,13$; 1,45 Hz, 1 H); 9,02 - 9,13 (m, 1 H) 9,49 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 14,97; 24,20; 27,67; 30,59; 30,92; 30,96; 31,09; 31,19; 32,93; 33,52; 63,98; 115,09; 128,03; 129,81; 132,48; 136,25; 145,49; 146,32; 147,98; 152,09; 165,66; 176,38.

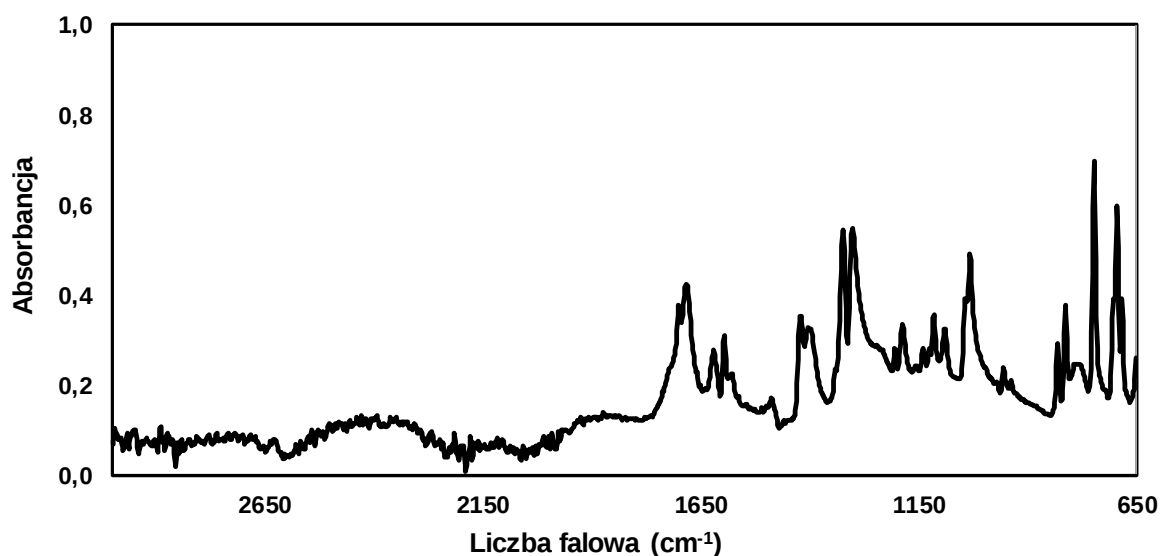
Mieszanina nikotynamidu i kwasu nikotynowego ([NA][NIK])

$\lambda_{\max 1}(\text{metanol}) = 216 \text{ nm}$; $\lambda_{\max 2}(\text{metanol}) = 262 \text{ nm}$; $\varepsilon_1 = 1,31 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_2 = 4,43 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



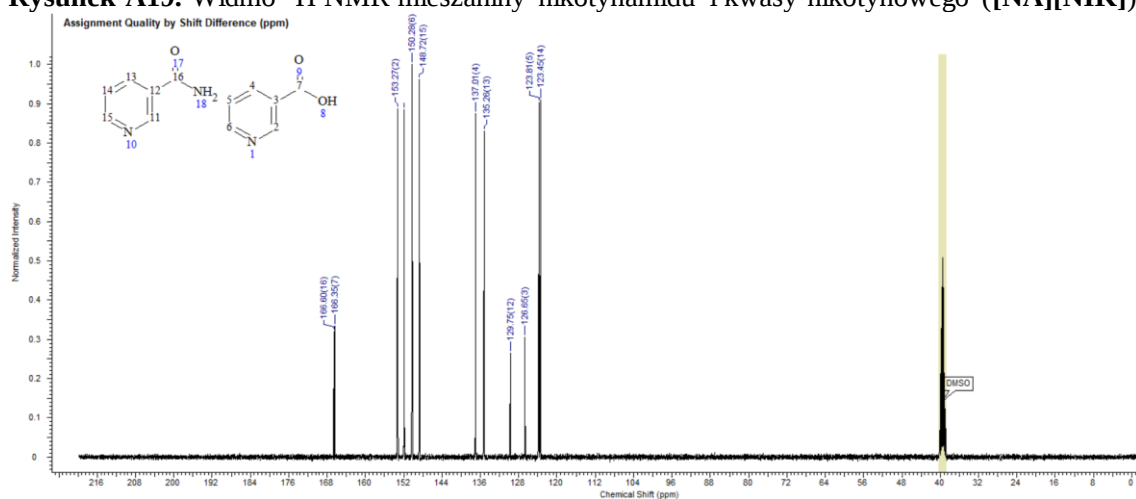
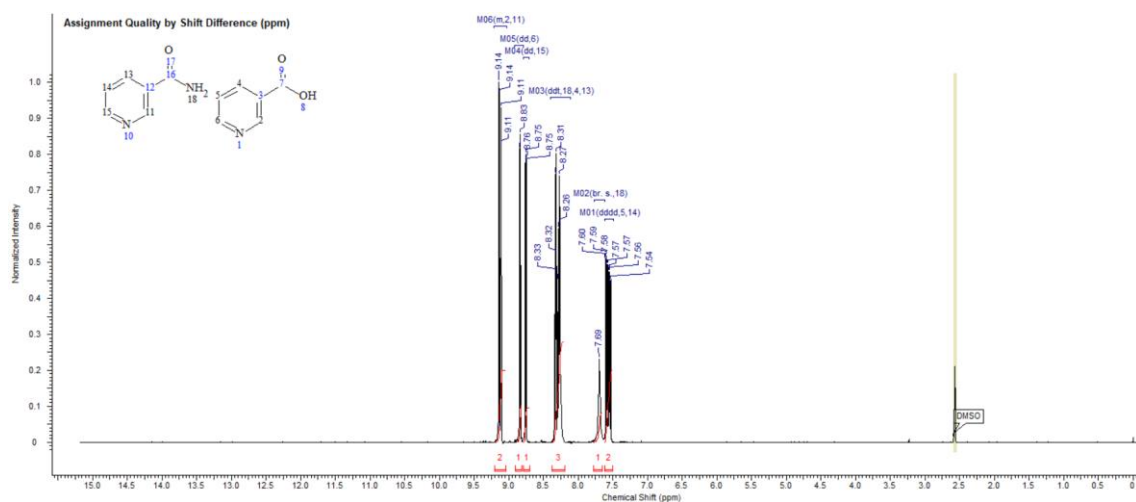
Rysunek A17. Widmo UV mieszaniny nikotynamidu i kwasu nikotynowego ([NA][NIK]).

$IR \nu_{\max} [\text{cm}^{-1}] = 1683, 1623, 1597, 1595, 1487, 1422, 1403, 1321, 1301, 1185, 1116, 1092, 1030, 956, 831, 812, 747, 693$.



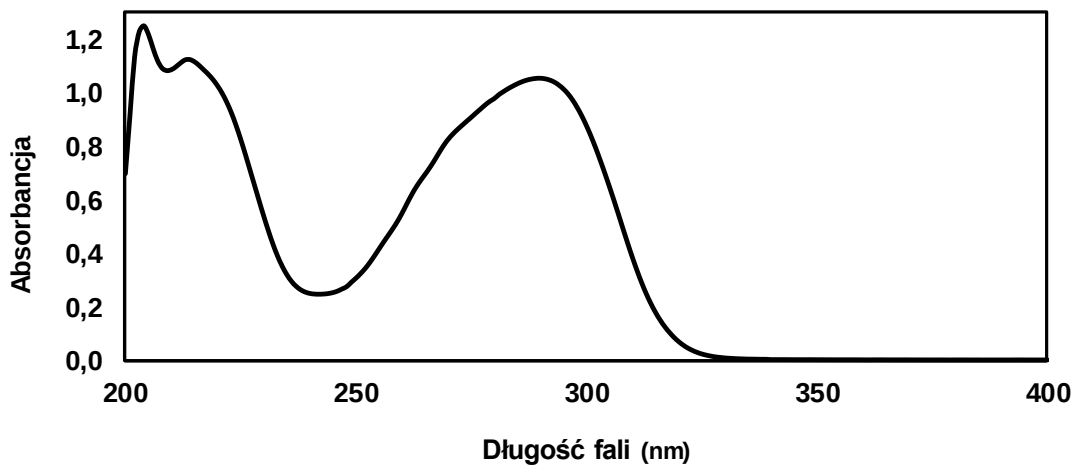
Rysunek A18. Widmo FT-IR mieszaniny nikotynamidu i kwasu nikotynowego ([NA][NIK]).

$^1\text{H NMR}$ (401 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 7,56 (m, $J=16,56$; 7,93; 4,86; 0,79 Hz, 2 H); 7,69 (br, s, 1 H); 8,30 (ddt, $J=18,64$; 7,93; 1,98; 1,98 Hz, 3 H); 8,75 (dd, $J=4,76$; 1,78 Hz, 1 H); 8,84 (dd, $J=4,76$; 1,78 Hz, 1 H); 9,03 - 9,21 (m, 2 H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 123,45; 123,81; 126,65; 129,75; 135,26; 137,01; 148,72; 150,28; 151,90; 153,27; 166,35; 166,60.



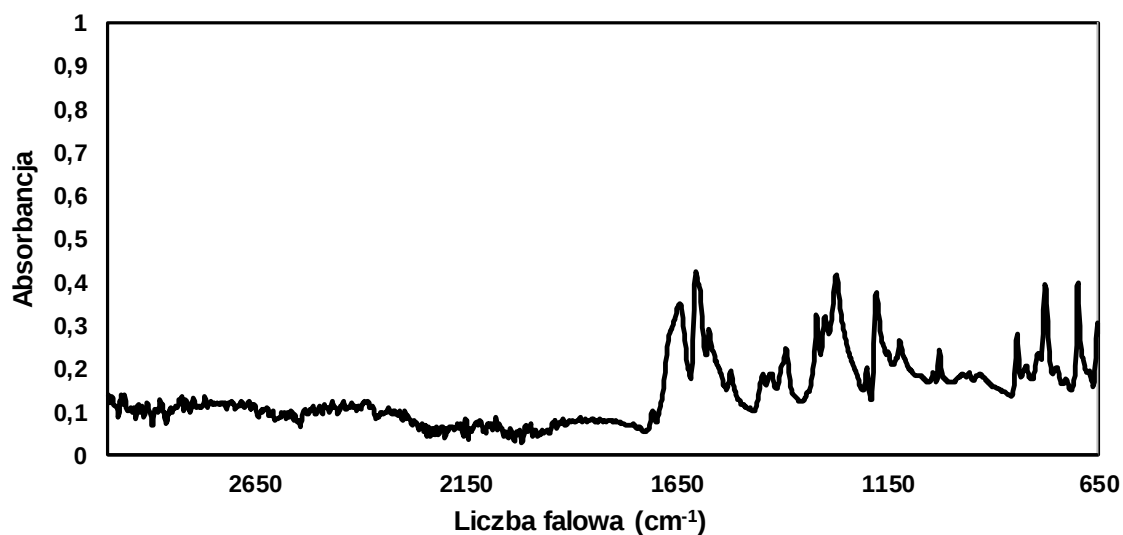
Rysunek A20. Widmo ^{13}C NMR mieszaniny nikotynamidu i kwasy nikotynowego ([NA][NIK]).

Kokryształ nikotynamidu i kwasu *p*-aminobenzoowego ([NA][PABA])

$$\lambda_{\max 1}(\text{metanol}) = 204 \text{ nm}; \lambda_{\max 2}(\text{metanol}) = 214 \text{ nm}; \lambda_{\max 3}(\text{metanol}) = 290 \text{ nm}; \varepsilon_1 = 2,27 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \varepsilon_2 = 2,02 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \varepsilon_3 = 1,91 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$


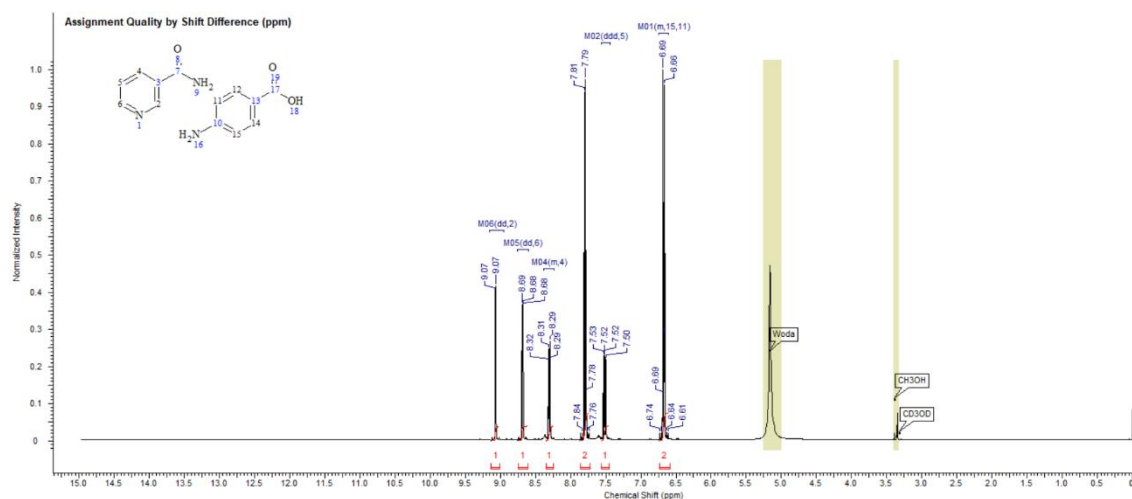
Rysunek A21. Widmo UV kokryształu nikotynamidu i kwasu *p*-aminobenzoowego ([NA][PABA]).

$$\text{IR } \nu_{\max} [\text{cm}^{-1}] = 1644, 1603, 1521, 1446, 1390, 1317, 1273, 1178, 1122, 1027, 842, 775, 697.$$

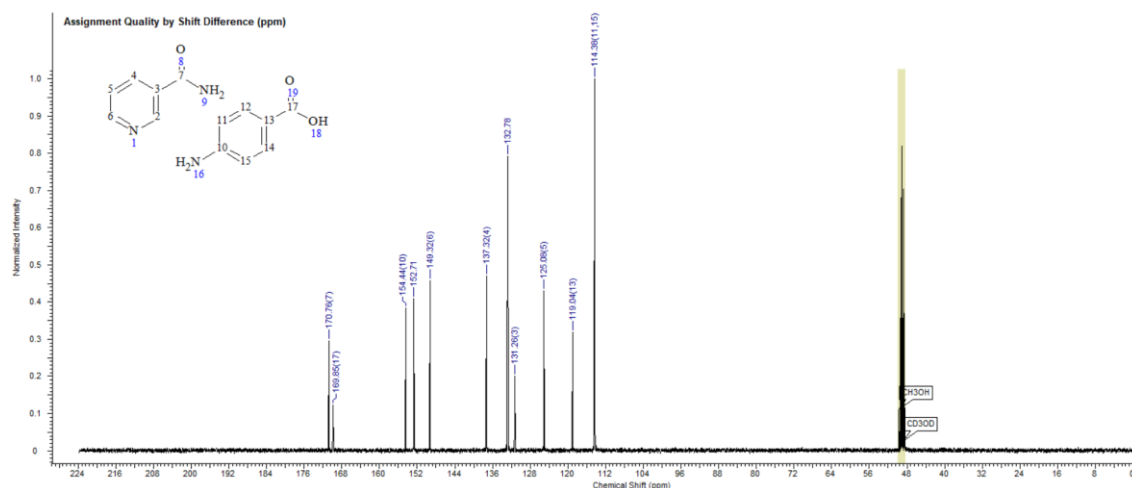


Rysunek A22. Widmo FT-IR kokryształu nikotynamidu i kwasu *p*-aminobenzoesowego ([NA][PABA]).

^1H NMR (400 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 6,61 - 6,74 (m, 2 H); 7,52 (ddd, $J=7,97$; 4,94; 0,88 Hz, 1 H); 7,72 - 7,85 (m, 2 H); 8,23 - 8,38 (m, 1 H); 8,69 (dd, $J=4,94$; 1,61 Hz, 1 H); 9,07 (dd, $J=2,25$; 0,88 Hz, 1 H).
 ^{13}C NMR (100 MHz, metanol- d_4) δ ppm = 114,38; 119,04; 125,06; 125,08; 131,26; 131,28; 132,77; 132,78; 132,79; 137,32; 149,31; 149,32; 152,69; 152,71; 154,44; 169,85; 170,76.



Rysunek A23. Widmo ^1H NMR kokryształu nikotynamidu i kwasu *p*-aminobenzoesowego ([NA][PABA]).



Rysunek A24. Widmo ^{13}C NMR kokryształu nikotynamidu i kwasu *p*-aminobenzoesowego ([NA][PABA]).

Salicylan *N*-etylonikotynamidu (S1)

$\lambda_{\max 1}$ (metanol) = 267 nm; $\lambda_{\max 2}$ (metanol) = 297 nm; $\varepsilon_1 = 3,90 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_2 = 3,89 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR $\nu_{\max} [\text{cm}^{-1}] = 1706, 1626, 1590, 1484, 1460, 1387, 1329, 1255, 1139, 1029, 857, 761, 702$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 1,55 (t, $J=7,29$ Hz, 3 H); 4,72 (q, $J=7,29$ Hz, 2 H); 6,52 - 6,73 (m, 2 H); 7,14 (ddd, $J=8,13$; 7,15; 1,96 Hz, 1 H); 7,61-7,75 (m, 1 H); 8,16 - 8,31 (m, 2 H); 8,95 - 9,08 (m, 2 H); 9,30 (dt, $J=6,03$; 1,12 Hz, 1 H); 9,69 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 16,20; 56,81; 115,81; 116,15; 120,35; 127,88; 130,00; 131,49; 133,93; 143,59; 144,59; 146,24; 162,66; 162,95; 171,90.

Salicylan *N*-bytylonikotynamidu (S2)

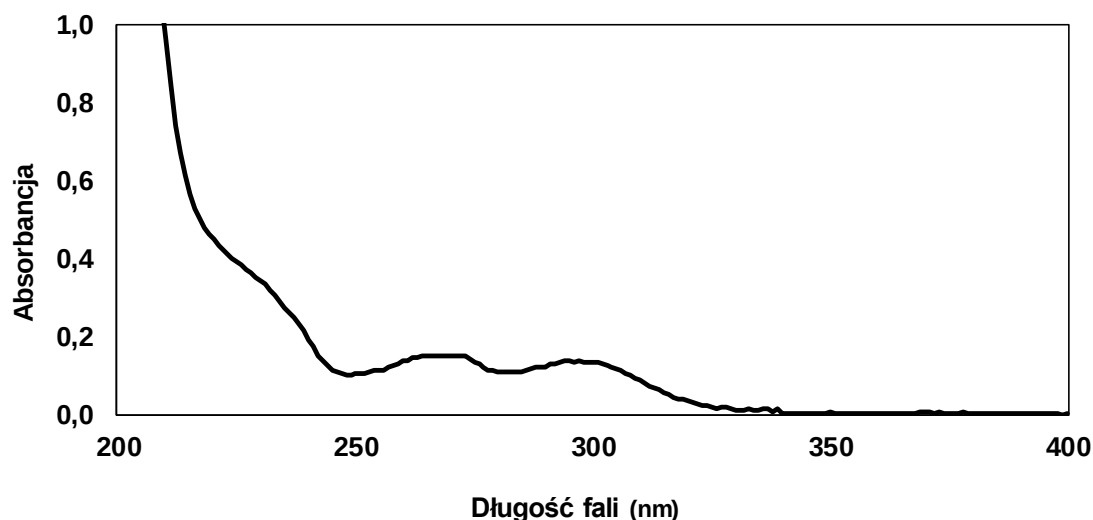
$\lambda_{\max 1}$ (metanol) = 267 nm; $\lambda_{\max 2}$ (metanol) = 297 nm; $\varepsilon_1 = 3,98 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_2 = 4,00 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR $\nu_{\max} [\text{cm}^{-1}] = 1701, 1626, 1590, 1484, 1460, 1387, 1329, 1255, 1139, 1030, 857, 761, 702$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,84 - 0,94 (m, 3 H); 1,30 (sxt, $J=7,47$ Hz, 2 H); 1,85 - 1,99 (m, 2 H); 4,69 (t, $J=7,54$ Hz, 2 H); 6,57 - 6,71 (m, 2 H); 7,19 (ddd, $J=8,13$; 7,14; 1,92 Hz, 1 H); 7,66 - 7,75 (m, 1 H); 8,17 - 8,24 (m, 1 H); 8,25 - 8,33 (m, 1 H); 8,90 (s, 1 H); 9,00 (dt, $J=8,25$, 1,38 Hz, 1 H); 9,28 (dt, $J=6,12$; 1,14 Hz, 1 H); 9,66 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,27; 18,77; 32,61; 60,90; 115,91; 116,36; 119,45; 127,84; 129,95; 131,87; 133,90; 143,50; 144,70; 146,38; 162,52; 162,81; 171,73.

Salicylan *N*-heksylonikotynamidu (S3)

$\lambda_{\max 1}$ (metanol) = 267 nm; $\lambda_{\max 2}$ (metanol) = 297 nm; $\varepsilon_1 = 3,99 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_2 = 4,07 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR $\nu_{\max} [\text{cm}^{-1}] = 2925, 2856, 1703, 1626, 1590, 1484, 1460, 1387, 1329, 1255, 1139, 1029, 857, 761, 702$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,71 - 0,93 (m, 3 H); 1,13 - 1,35 (m, 6 H); 1,83 - 2,01 (m, 2 H); 4,68 (t, $J=7,62$ Hz, 2 H); 6,58 - 6,72 (m, 2 H); 7,10 - 7,24 (m, 1 H); 7,63 - 7,75 (m, 1 H); 8,13 - 8,26 (m, 1 H); 8,24 - 8,36 (m, 1 H); 8,93 - 9,09 (m, 2 H); 9,30 (dt, $J=6,07$; 1,12 Hz, 1 H); 9,72 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,75; 21,80; 25,07; 30,52; 30,69; 61,11; 115,84; 116,23; 119,84; 127,84; 129,95; 131,66; 133,92; 143,58; 144,71; 146,39; 162,57; 162,82; 171,82.

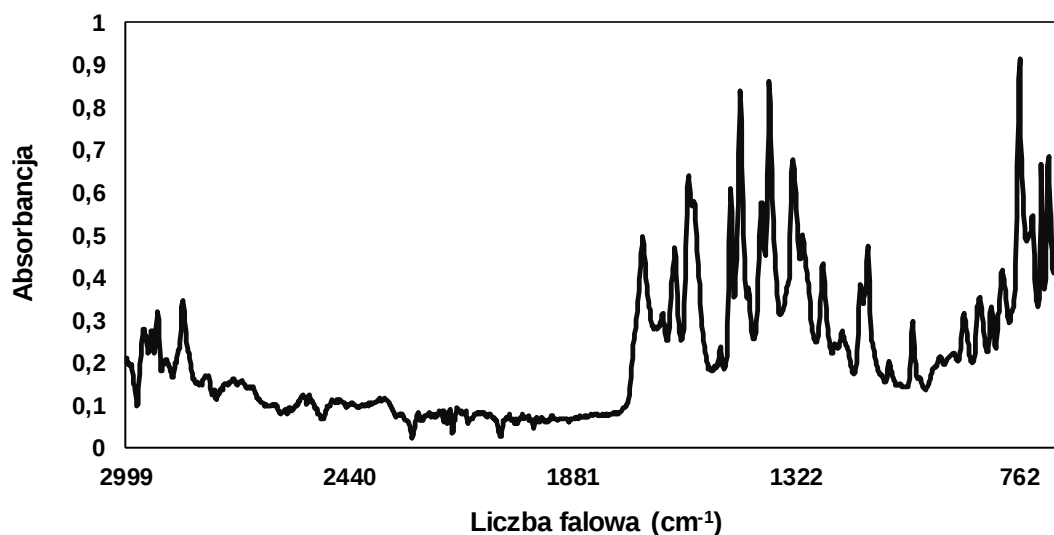
Salicylan *N*-oktylonikotynamidu (S4)

$\lambda_{\max 1}$ (metanol) = 267 nm; $\lambda_{\max 2}$ (metanol) = 297 nm; $\varepsilon_1 = 4,53 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_2 = 4,14 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



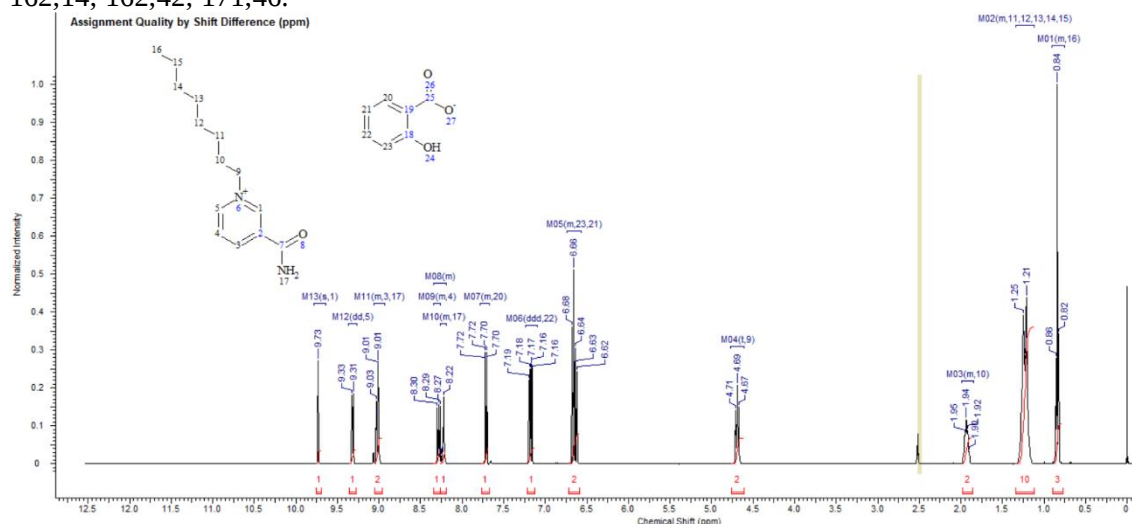
Rysunek A25. Widmo UV salicylanu *N*-oktylonikotynamidu (S4).

IR $\nu_{\max} [\text{cm}^{-1}] = 2923, 2856, 1706, 1626, 1590, 1484, 1460, 1387, 1329, 1255, 1139, 1029, 857, 761, 702$.

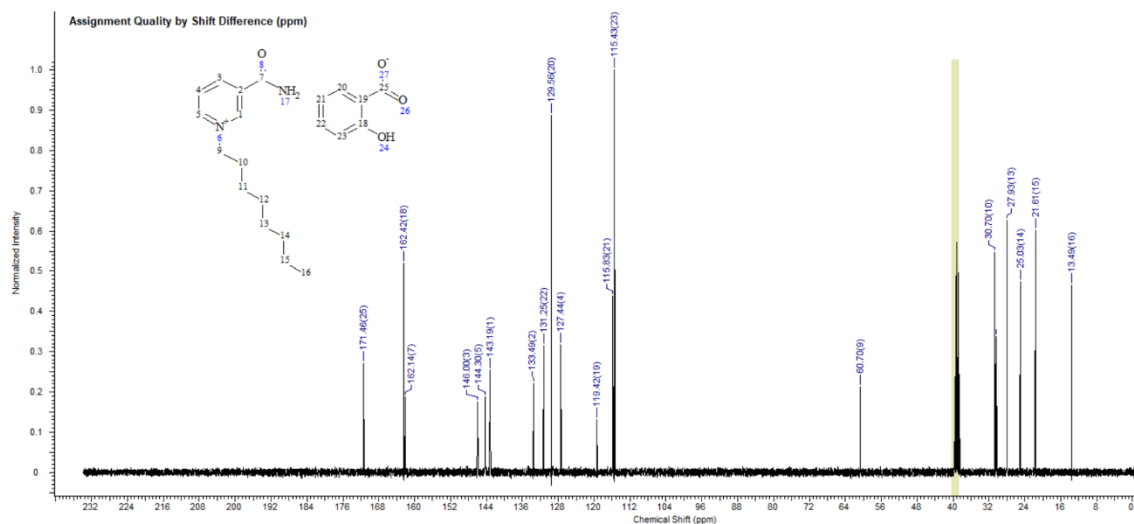


Rysunek A26. Widmo FT-IR salicylanu *N*-oktylonikotynamidu (S4).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 0,76 - 0,90 (m, 3 H); 1,12 - 1,35 (m, 10 H); 1,84 - 1,99 (m, 2 H); 4,69 (t, $J=7,62$ Hz, 2 H); 6,57 - 6,74 (m, 2 H); 7,18 (ddd, $J=8,14$; 7,13; 1,88 Hz, 1 H); 7,67 - 7,78 (m, 1 H); 8,19 - 8,26 (m, 1 H); 8,19 - 8,34 (m, 2 H); 8,26 - 8,34 (m, 1 H); 8,93 - 9,06 (m, 2 H); 9,32 (dd, $J=6,04$; 1,14 Hz, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 13,49; 21,61; 25,03; 27,93; 28,00; 30,35; 30,70; 60,70; 115,43; 115,83; 119,42; 127,44; 129,56; 131,25; 133,49; 143,19; 144,30; 146,00; 162,14; 162,42; 171,46.



Rysunek A27. Widmo ^1H NMR salicylanu *N*-oktylonikotynamidu (S4).



Rysunek A28. Widmo ^{13}C NMR salicylanu *N*-oktylonikotynamidu (S4).

Salicylan *N*-decylnikotynamidu (S5)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 267 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 297 nm; $\epsilon_1 = 4,59 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 4,21 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2924, 2856, 1703, 1626, 1588, 1484, 1460, 1387, 1329, 1256, 1139, 1029, 857, 761, 707. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,74 - 0,99 (m, 3 H); 1,10 - 1,46 (m, 14 H); 1,92 (d, $J=6,46$ Hz, 2 H); 4,69 (t, $J=7,61$ Hz, 2 H); 6,50 - 6,76 (m, 2 H); 7,14 (ddd, $J=8,08$, 7,14, 1,89 Hz, 1 H); 7,57 - 7,75 (m, 1 H); 8,21 (s, 1 H); 8,27 - 8,35 (m, 1 H); 8,97 - 9,06 (m, 2 H); 9,32 (d, $J=6,06$ Hz, 1 H); 9,74 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,89; 22,04; 25,41; 28,36; 28,60; 28,73; 28,82; 30,74; 31,22; 61,09; 115,71; 115,92; 120,38; 127,82; 129,91; 131,27; 133,90; 143,58; 144,70; 146,39; 162,71; 162,79; 171,75.

Salicylan *N*-dodecylonikotynamidu (S6)

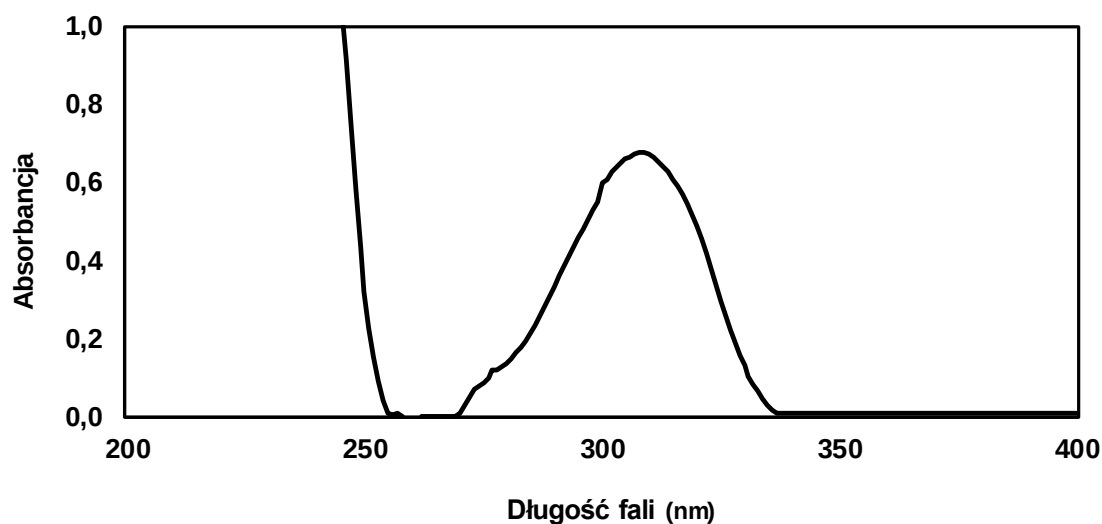
$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 267 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 297 nm; $\epsilon_1 = 4,58 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 4,25 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2921, 2855, 1703, 1628, 1590, 1484, 1463, 1387, 1329, 1255, 1139, 1030, 857, 761, 702. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,78 - 0,91 (m, 3 H); 1,12 - 1,34 (m, 18 H); 1,93 (t, $J=6,61$ Hz, 2 H); 4,68 (t, $J=7,57$ Hz, 2 H); 6,57 - 6,74 (m, 2 H); 7,19 (ddd, $J=8,14$, 7,13, 1,88 Hz, 1 H); 7,72 (dd, $J=7,62$, 1,84 Hz, 1 H); 8,13 - 8,24 (m, 1 H); 8,24 - 8,37 (m, 1 H); 8,92 - 9,05 (m, 2 H); 9,30 (d, $J=6,13$ Hz, 1 H); 9,72 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,92; 22,09; 25,45; 28,41; 28,71; 28,78; 28,91; 29,00; 30,78; 31,29; 61,13; 115,89; 116,36; 119,53; 127,85; 129,99; 131,81; 133,91; 143,57; 144,73; 146,41; 162,50; 162,82; 171,88.

Salicylan *N*-tetradecylonikotynamidu (S7)

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 267 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 297 nm; $\epsilon_1 = 4,68 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_2 = 4,2 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 2926, 2858, 1703, 1626, 1590, 1484, 1460, 1387, 1329, 1255, 1139, 1029, 857, 761, 701. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,73 - 0,97 (m, 3 H); 1,07 - 1,37 (m, 22 H); 1,90 (d, $J=6,73$ Hz, 2 H); 4,67 (t, $J=7,64$ Hz, 2 H); 6,46 - 6,68 (m, 2 H); 7,12 (ddd, $J=8,13$, 7,15, 1,96 Hz, 1 H); 7,68 (dd, $J=7,64$, 1,89 Hz, 1 H); 8,19 (s, 1 H); 8,26 (dd, $J=8,06$, 6,10 Hz, 1 H); 8,93 - 9,09 (m, 2 H); 9,29 (d, $J=6,03$ Hz, 1 H); 9,62 - 9,89 (m, 1 H); 9,72 (s, 1 H); 9,75 - 9,92 (m, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 13,90; 22,05; 25,45; 28,49; 28,76; 28,77; 28,90; 29,05; 30,72; 31,21; 61,13; 115,89; 116,36; 119,52; 127,85; 129,90; 131,80; 133,91; 143,57; 144,80; 146,40; 162,50; 162,82; 171,84.

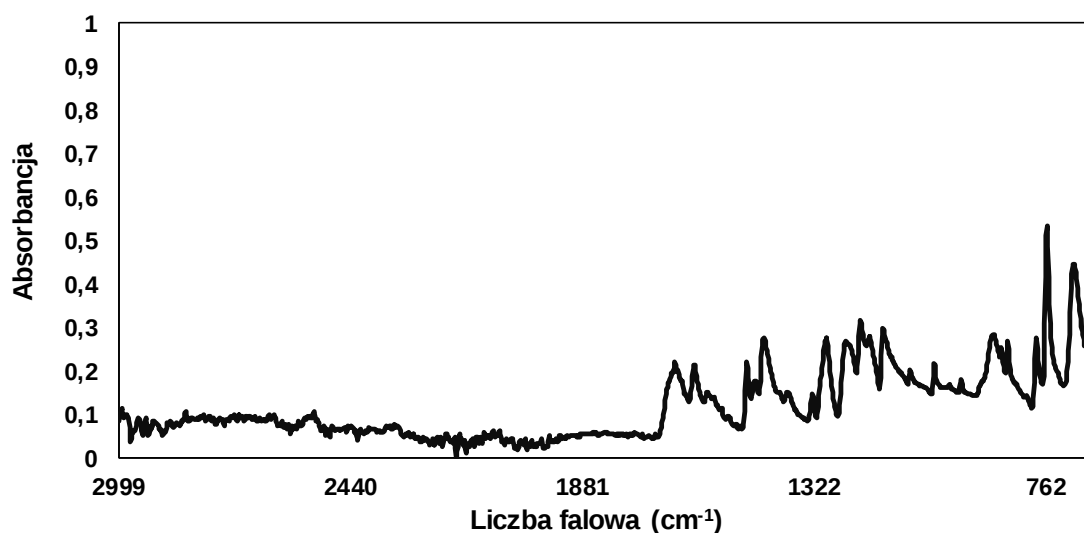
Kwas salicylowy (SAL)

λ_{max} (metanol) = 308 nm; $\epsilon = 4,81 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



Rysunek A29. Widmo UV kwasu salicylowego (SAL).

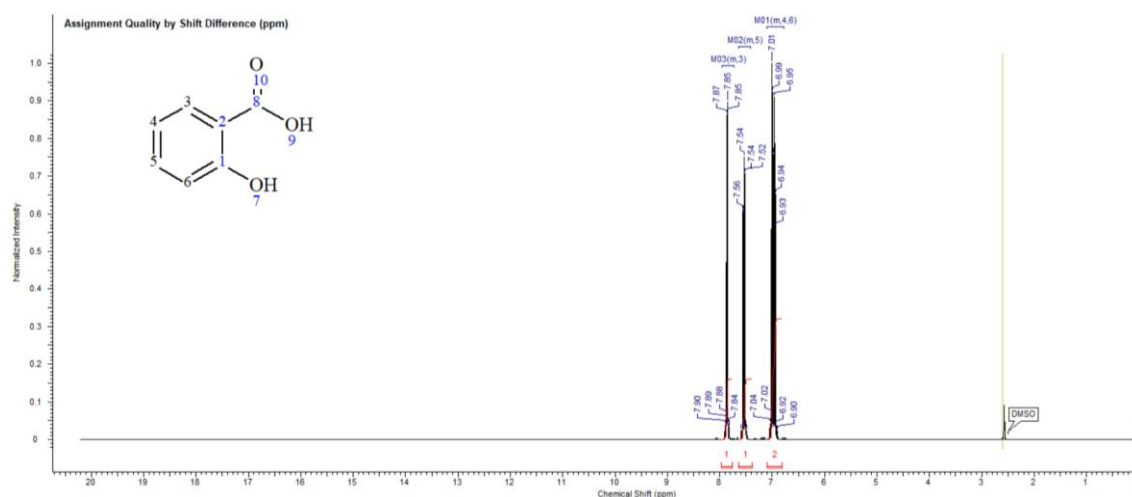
$IR \nu_{max} [cm^{-1}] = 1657, 1605, 1482, 1445, 1292, 1208, 1150, 893, 785, 757, 692.$



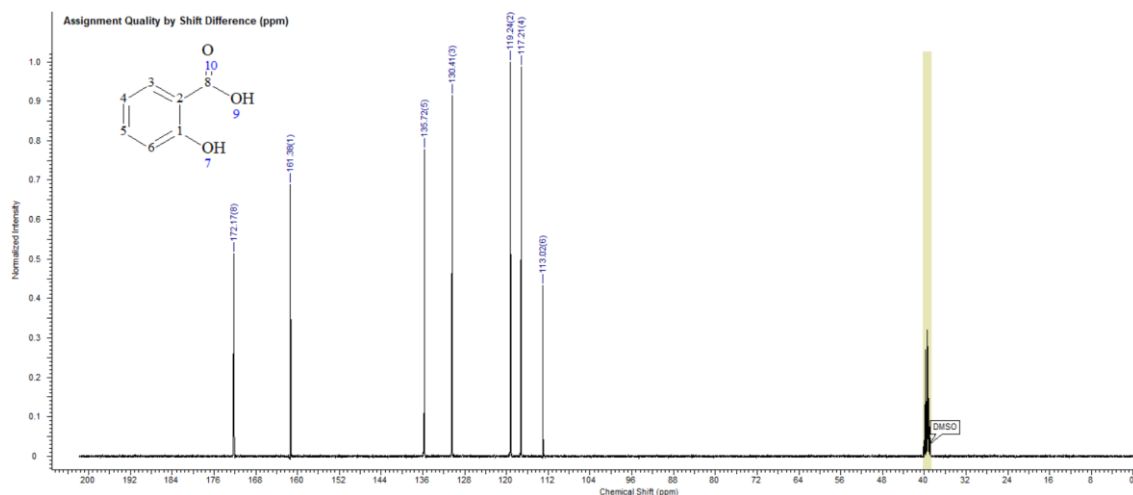
Rysunek A30. Widmo FT-IR kwasu salicylowego (SAL).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 6,79 - 7,09 (m, 2 H); 7,41 - 7,63 (m, 1 H); 7,74 - 7,96 (m, 1 H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 113,02; 117,21; 119,24; 130,41; 135,72; 161,38; 172,17.



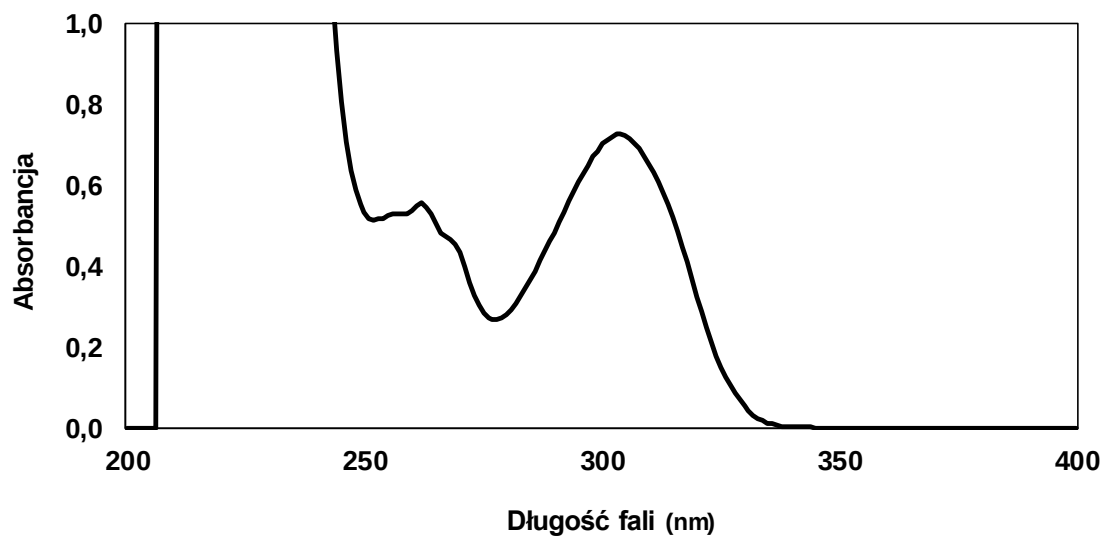
Rysunek A31. Widmo 1H NMR kwasu salicylowego (SAL).



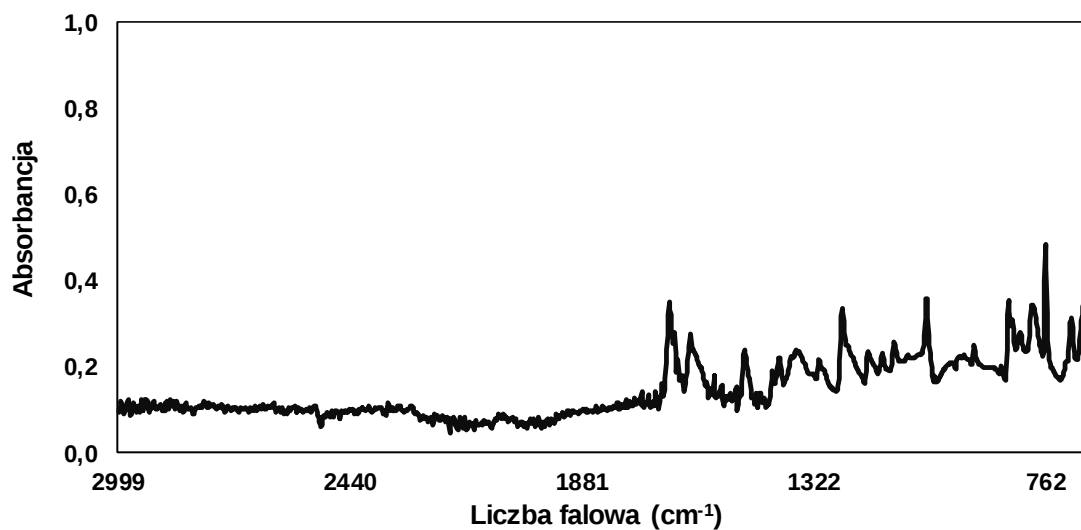
Rysunek A32. Widmo ^{13}C NMR kwasu salicylowego (SAL).

Kokryształ nikotynamidu i kwasu salicylowego ([NA][SAL])

$\lambda_{\text{max}1}$ (metanol) = 262 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ (metanol) = 304 nm; $\varepsilon_1 = 2,90 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_2 = 4,15 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

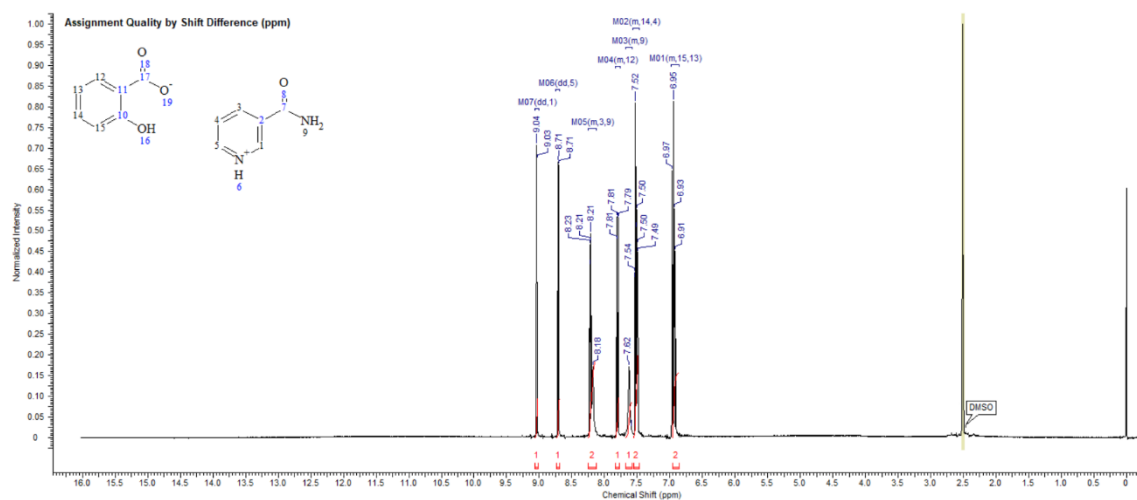


Rysunek A33. Widmo UV kokryształu nikotynamidu i kwasu salicylowego ([NA][SAL]).

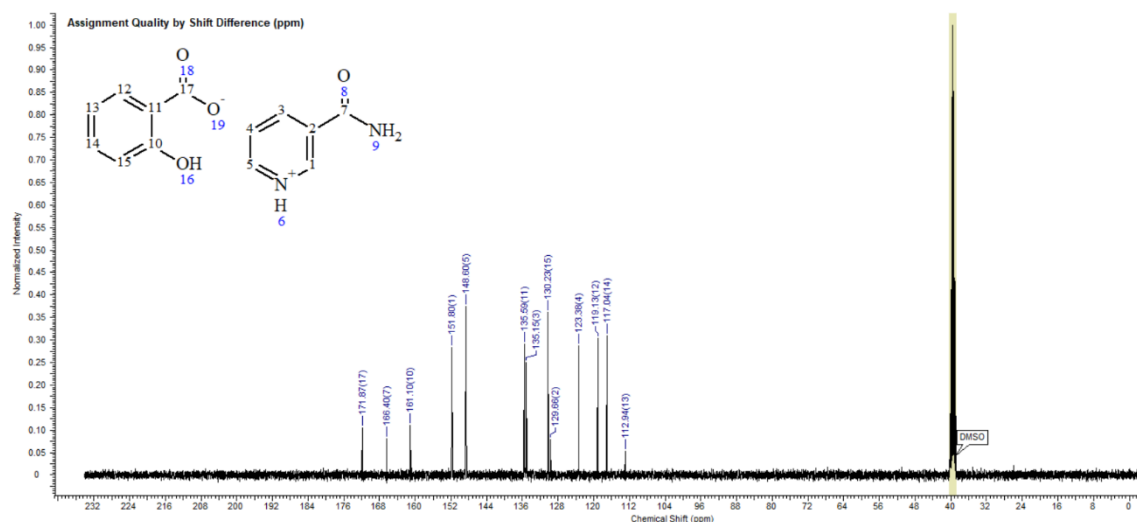


Rysunek A34. Widmo FT-IR kokryształu nikotynamidu i kwasu salicylowego ([NA][SAL]).

**^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm = 6,86 - 6,98 (m, 1 H); 7,46 - 7,56 (m, 1 H); 7,58 - 7,67 (m, 1 H); 7,76 - 7,83 (m, 1 H); 8,12 - 8,25 (m, 1 H) 8,71 (dd, $J=4,84$; 1,69 Hz, 1 H); 9,04 (dd, $J=2,32$; 0,84 Hz, 1 H).
 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm = 112,94; 117,04; 119,13; 123,38; 129,66; 130,23; 135,15; 135,59; 148,60; 151,80; 161,10; 166,40; 171,87.**



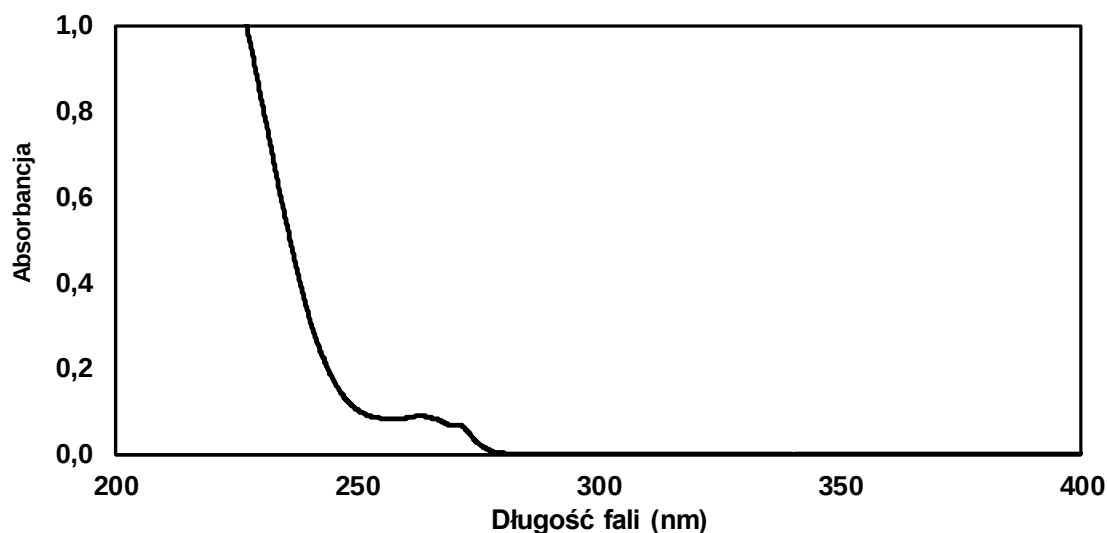
Rysunek A35. Widmo ^1H NMR kokryształu nikotynamidu i kwasu salicylowego ([NA][SAL]).



Rysunek A36. Widmo ^{13}C NMR kokryształu nikotynamidu i kwasu salicylowego ([NA][SAL]).

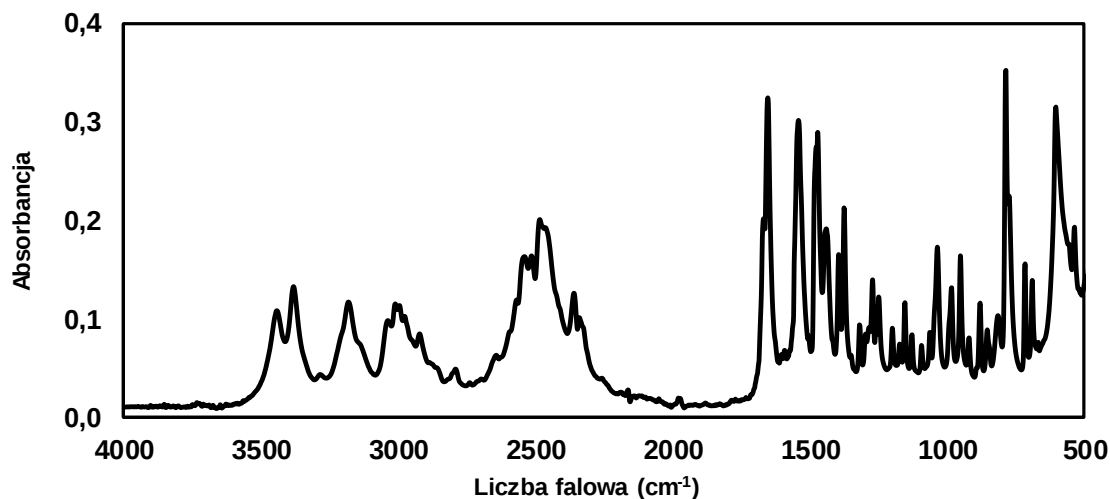
Chlorowodorek lidokainy ([LID][Cl])

$\lambda_{\max}(\text{metanol}) = 263 \text{ nm}$; $\varepsilon = 360,5 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$



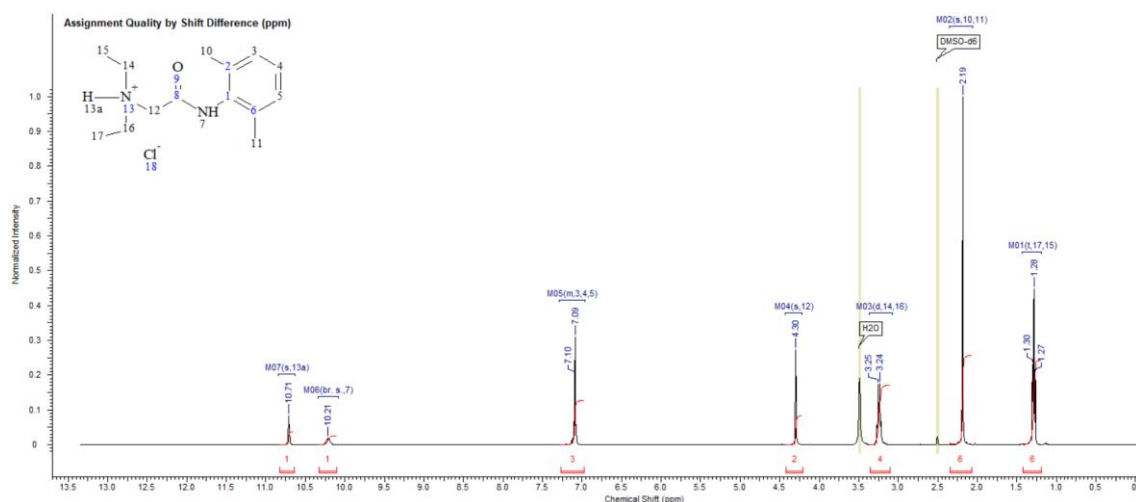
Rysunek A37. Widmo UV chlorowodoru lidokainy ([LID][Cl]).

$IR \nu_{\max} [\text{cm}^{-1}] = 3436, 3378, 3176, 3000, 2918, 2786, 2532, 2512, 2478, 2358, 1652, 1540, 1472, 1438, 1394, 1373, 1272, 1154, 1034, 986, 950, 882, 788, 716, 692, 606, 538.$

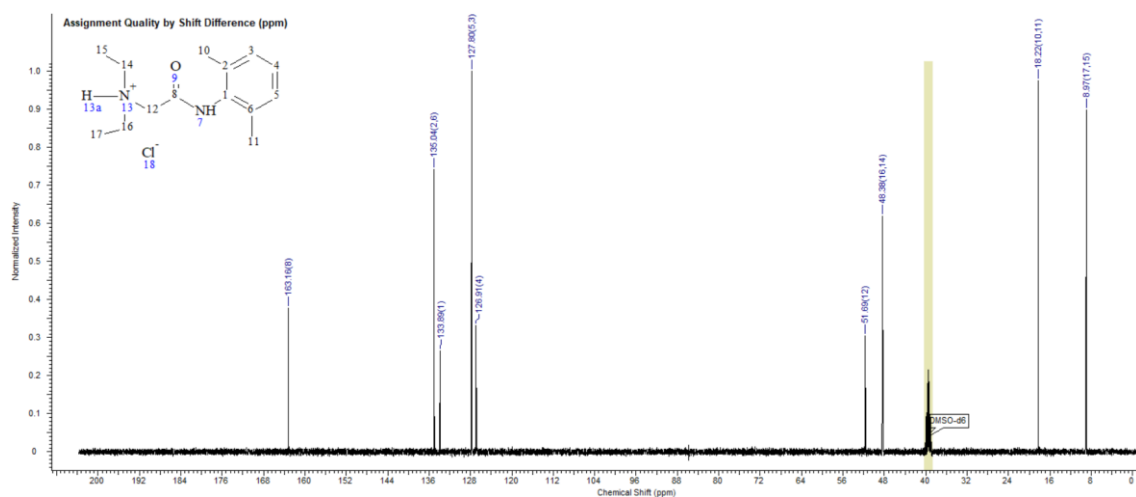


Rysunek A38. Widmo FT-IR chlorowodoru lidokainy ([LID][Cl]).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm = 1,28 (t, $J=7,25$ Hz, 6 H); 2,19 (s, 6 H); 3,24 (d, $J=7,17$ Hz, 4 H); 4,30 (s, 2 H); 6,96 - 7,29 (m, 3 H); 10,21 (br s, 1 H); 10,71 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm = 8,97; 18,22; 48,38; 51,69; 126,91; 127,80; 133,89; 135,04; 163,16.



Rysunek A39. Widmo ^1H NMR chlorowodorku lidokainy ([LID][Cl]).



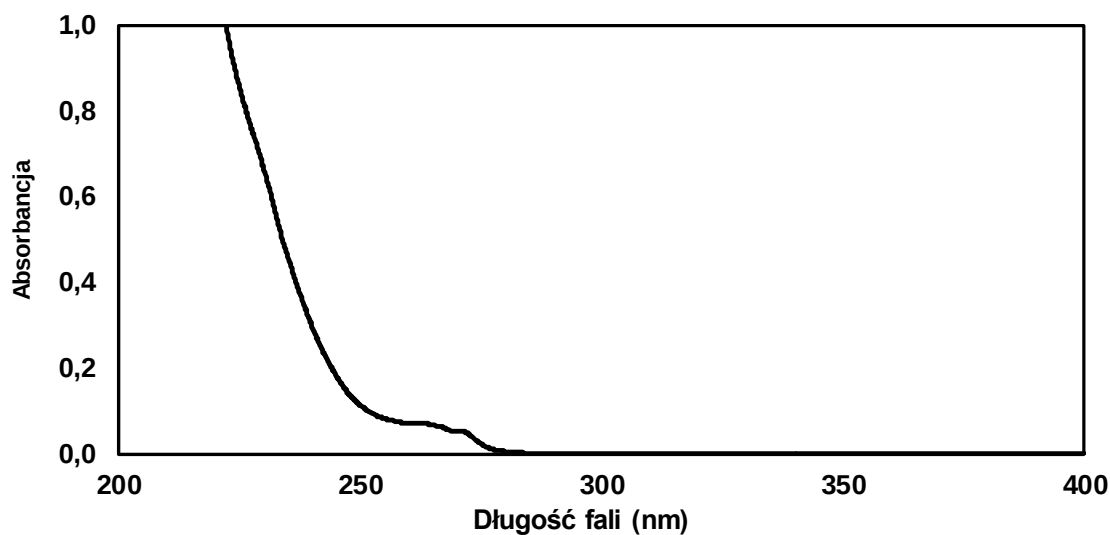
Rysunek A40. Widmo ^{13}C NMR chlorowodorku lidokainy ([LID][Cl]).

Bromek *N*-etylolidokainy (BL1)

λ_{max} (metanol) = 262 nm; ϵ = 431,5 $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 3130, 3104, 2980, 2944, 2934, 2766, 1676, 1536, 1466, 1430, 1372, 1244, 1238, 1158, 1048, 1014, 988, 956, 898, 782, 730, 704, 608, 536. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 1,29 (t, J =7,18 Hz, 9 H); 2,19 (s, 4 H); 3,49 - 3,58 (m, 6 H); 4,51 (s, 4 H); 6,64 (d, J =15,89 Hz, 2 H); 7,10 (d, J =1,65 Hz, 3 H); 7,18 (s, 1 H); 7,72 (d, J =9,54 Hz, 2 H); 10,89 (s, 2 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 7,59; 18,20; 54,03; 55,81; 127,17; 127,91; 133,44; 135,05; 161,95.

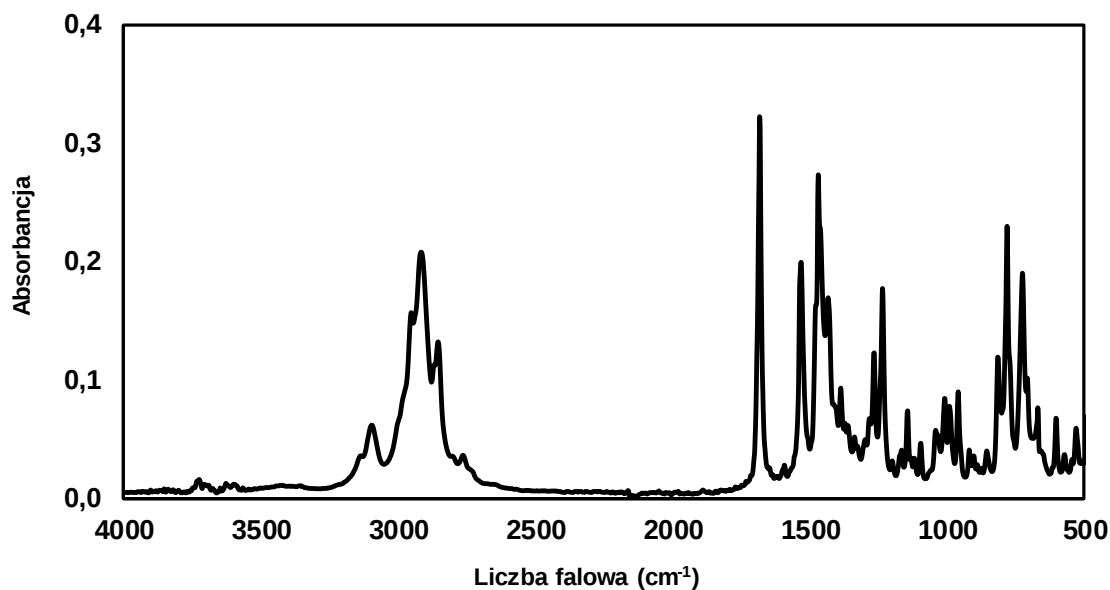
Bromek *N*-oktylolidokainy (BL2)

λ_{max} (metanol) = 262 nm; ϵ = 442,4 $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



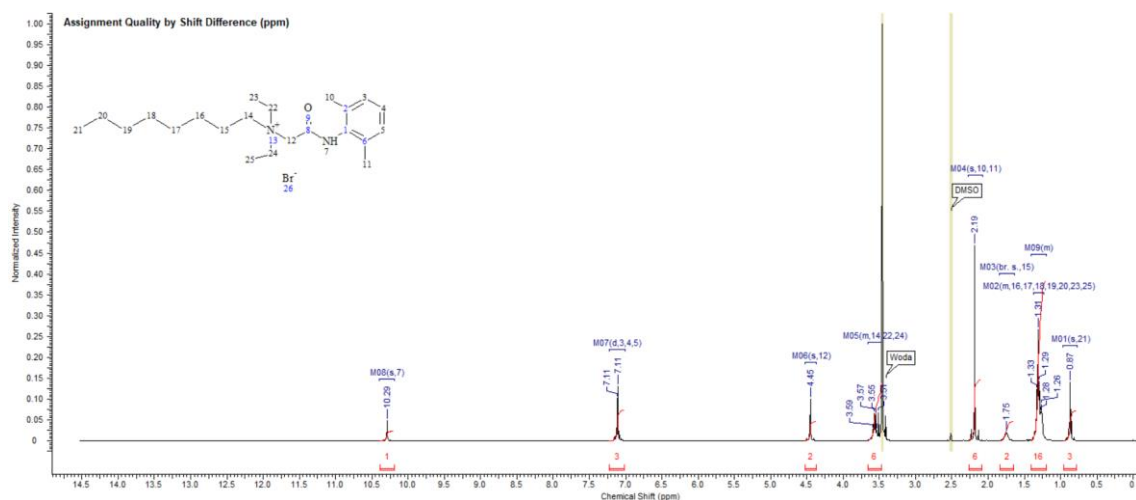
Rysunek A41. Widmo UV bromku *N*-oktylolidokainy (BL2).

IR $\nu_{\max}$ [cm^{-1}] = 3088, 2910, 2852, 2756, 1682, 1536, 1470, 1430, 1386, 1242, 1234, 1146, 1032, 1012, 988, 960, 814, 782, 726, 688, 604, 528.

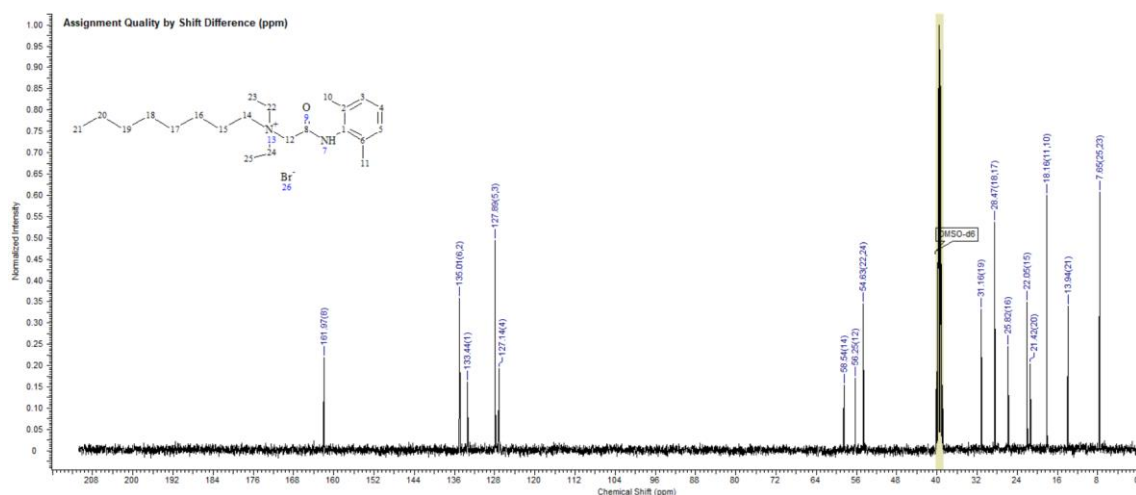


Rysunek A42. Widmo FT-IR bromku *N*-oktylolidokainy (BL2).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,87 (s, 3 H); 1,20 - 1,41 (m, 16 H); 1,23 - 1,37 (m, 14 H); 1,75 (br, s, 2 H); 2,19 (s, 6 H); 3,47 - 3,66 (m, 5 H); 4,45 (s, 2 H); 7,11 (d, $J=2,64$ Hz, 3 H); 10,29 (s, 1 H).
 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 7,65; 13,94; 18,16; 21,42; 22,05; 25,82; 28,47; 31,16; 54,63; 56,25; 58,54; 127,14; 127,89; 133,44; 135,01; 161,97.



Rysunek A43. Widmo ^1H NMR bromku *N*-oktylolidokaininy (B2).



Rysunek A44. Widmo ^{13}C NMR bromku *N*-oktylolidokaininy (B2).

Bromek *N*-tetracylolidokaininy (BL3)

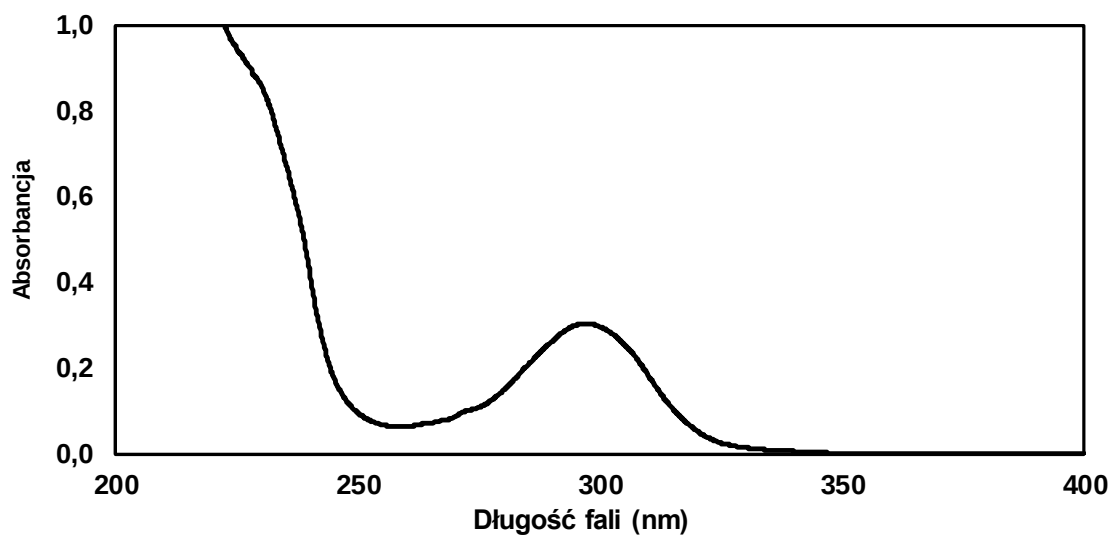
λ_{max} (metanol) = 262 nm; $\epsilon = 442,4 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 3088, 2922, 2850, 2760, 1680, 1532, 1466, 1432, 1374, 1266, 1240, 1166, 1030, 1004, 960, 784, 724, 648, 606, 522. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 0,86 (s, 3 H); 1,23 - 1,39 (m, 28 H); 1,75 (br, s, 2 H); 2,19 (s, 6 H); 3,57 (br, s, 6 H); 4,47 (s, 2 H); 7,10 (d, $J=3,21$ Hz, 3 H); 10,32 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 7,65; 13,91; 18,17; 21,43; 22,11; 25,83; 28,53; 28,74; 28,84; 28,95; 29,05; 29,08; 31,32; 54,62; 56,26; 58,55; 127,08; 127,84; 133,45; 134,98; 161,95.

Salicylan *N*-etylolidokaininy (SL1)

λ_{max} (metanol) = 297 nm; $\epsilon = 3,04 \cdot 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 3160, 2992, 1678, 1630, 1568, 1536, 1476, 1456, 1390, 1328, 1298, 1250, 1138, 1140, 1026, 1012, 942, 856, 804, 782, 768, 706, 666, 610, 540. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 1,29 (t, $J=7,18$ Hz, 9 H); 2,19 (s, 4 H); 3,49 - 3,58 (m, 6 H); 4,51 (s, 4 H); 6,64 (d, $J=15,89$ Hz, 2 H); 7,10 (d, $J=1,65$ Hz, 3 H); 7,18 (s, 1 H); 7,72 (d, $J=9,54$ Hz, 2 H); 10,89 (s, 2 H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 7,50; 18,15; 53,98; 55,81; 115,93; 116,52; 120,20; 127,11; 127,97; 130,18; 131,79; 133,85; 135,11; 162,25; 162,45; 172,21.

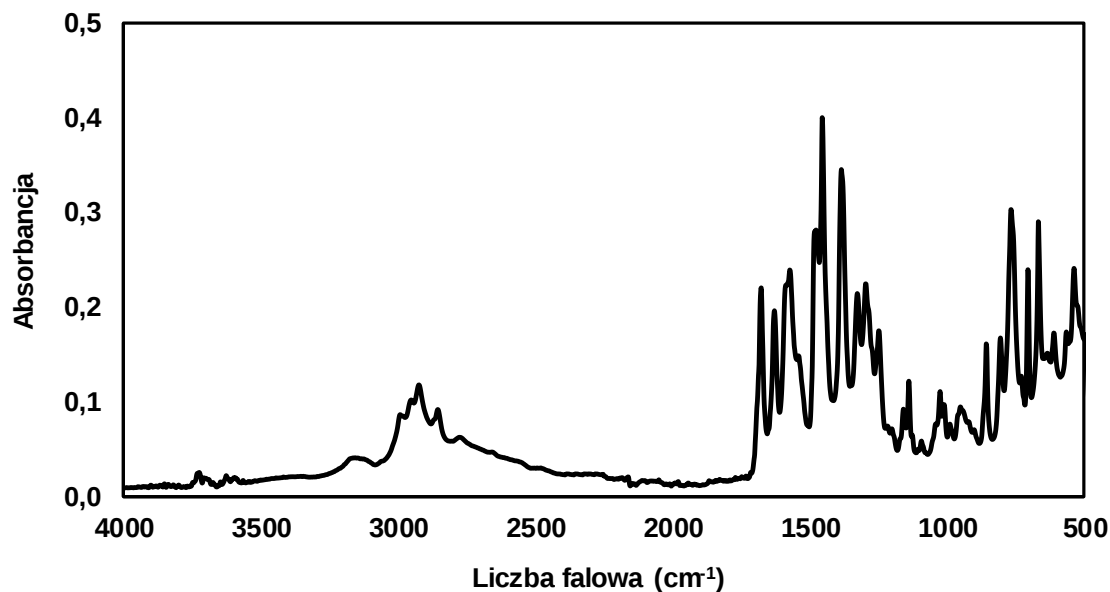
Salicylan *N*-oktylolidokaininy (SL2)

λ_{max} (metanol) = 297 nm; $\epsilon = 2,74 \cdot 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



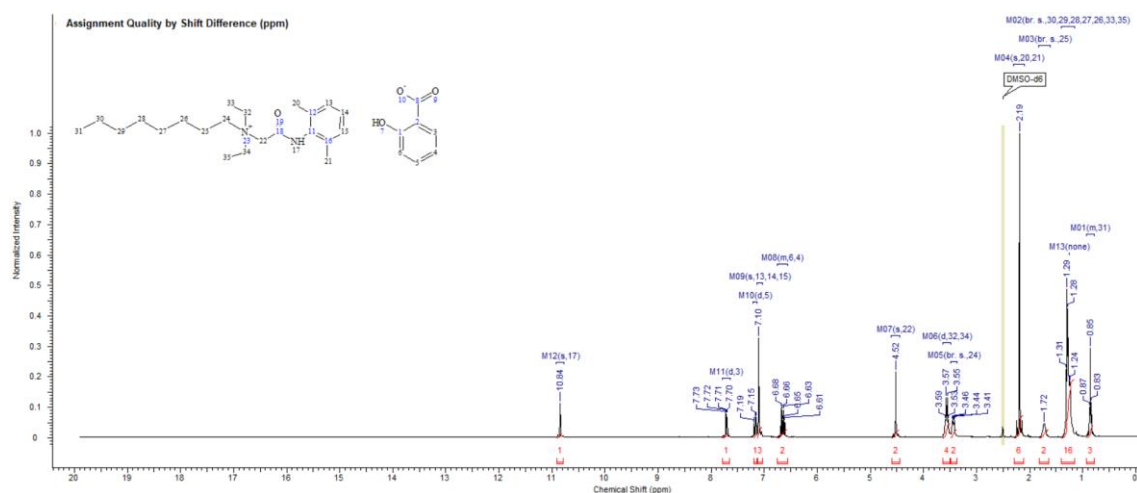
Rysunek A45. Widmo UV salicylanu *N*-oktylolidokainy (SL2).

$IR \nu_{max} [cm^{-1}] = 3174, 2974, 2918, 2864, 1678, 1632, 1572, 1462, 1456, 1382, 1324, 1294, 1252, 1140, 1144, 1026, 940, 856, 804, 768, 706, 668, 608, 536.$

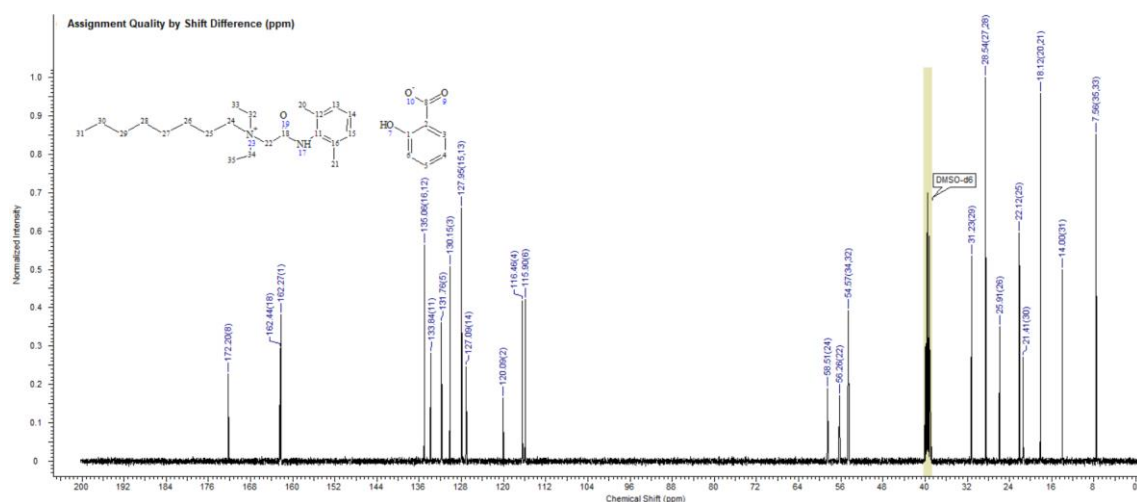


Rysunek A46. Widmo FT-IR salicylanu *N*-oktylolidokainy (SL2).

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm = 0,78 - 0,93 (m, 3 H); 1,29 (br, s, 16 H); 1,25 (none, 1 H); 1,72 (br, s, 2 H); 2,19 (s, 6 H); 3,43 (br, s, 2 H); 3,56 (d, $J=7,76$ Hz, 4 H); 4,52 (s, 2 H); 6,56 - 6,76 (m, 2 H); 7,10 (s, 3 H); 7,18 (d, $J=15,26$ Hz, 1 H); 7,71 (d, $J=7,76$ Hz, 1 H); 10,84 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm = 7,56; 14,00; 18,12; 21,41; 22,12; 25,91; 28,54; 31,23; 54,57; 56,26; 58,51; 115,90; 116,46; 120,09; 127,09; 127,95; 130,15; 131,76; 133,84; 135,06; 162,27; 162,44; 172,20.



Rysunek A47. Widmo ^1H NMR salicylanu *N*-oktylolidokainy (SL2).



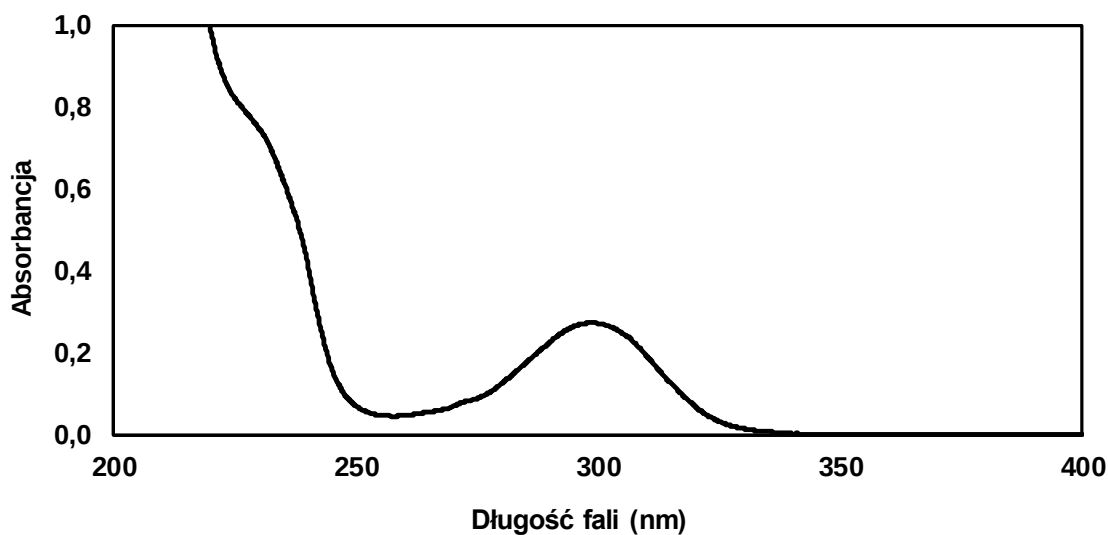
Rysunek A48. Widmo ^{13}C NMR salicylanu *N*-oktylolidokainy (SL2).

Salicylan *N*-tetradecylolidokainy (SL3)

λ_{max} (metanol) = 297 nm; $\varepsilon = 2,57 \cdot 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 3140, 2924, 2850, 1682, 1624, 1584, 1480, 1456, 1382, 1316, 1288, 1244, 1138, 1030, 860, 768, 758, 706, 668, 608, 630, 534. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,78 - 0,91 (m, 3 H); 1,12 - 1,35 (m, 28 H); 1,71 (br, s, 2 H); 2,10 - 2,24 (m, 6 H); 3,42 (br, s, 2 H); 3,55 (d, $J=6,81$ Hz, 4 H); 4,52 (br, s, 2 H); 6,55 - 6,70 (m, 2 H); 7,08 (br, s, 3 H); 7,13 (d, $J=8,17$ Hz, 1 H); 7,68 (d, $J=7,59$ Hz, 1 H); 10,86 (br, s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 7,44; 13,83; 17,98; 21,28; 22,04; 25,77; 28,43; 28,66; 28,73; 28,86; 28,94; 28,97; 29,01; 31,25; 54,45; 56,16; 58,41; 115,74; 116,16; 119,92; 126,86; 127,76; 129,97; 131,51; 133,74; 134,89; 162,12; 162,42; 171,93.

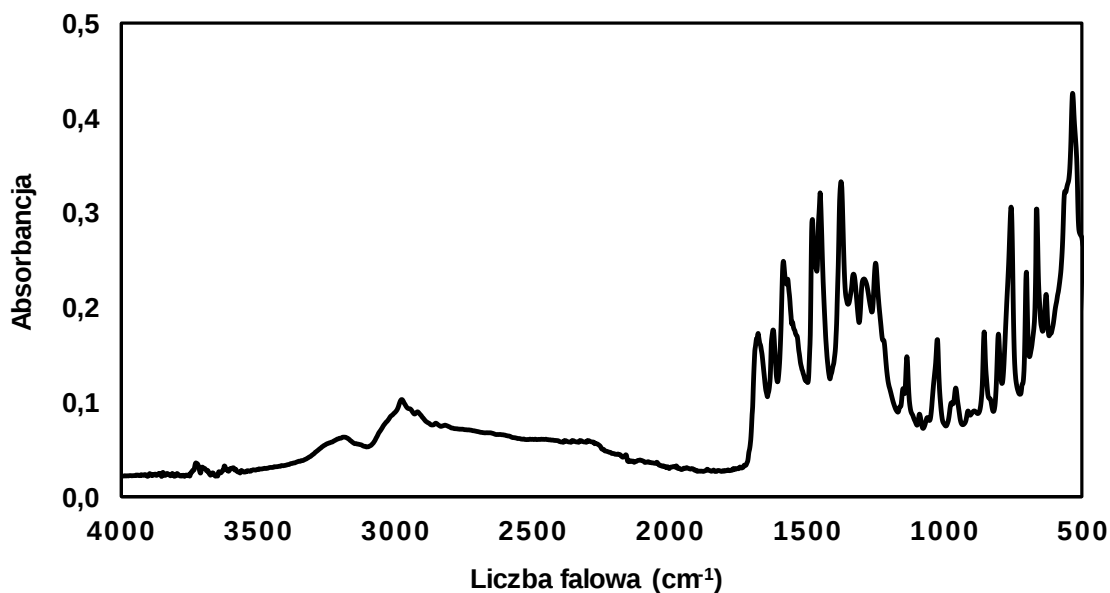
Salicylan lidokainy ([LID][SAL])

λ_{max} (metanol) = 298 nm; $\varepsilon = 3,72 \cdot 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$



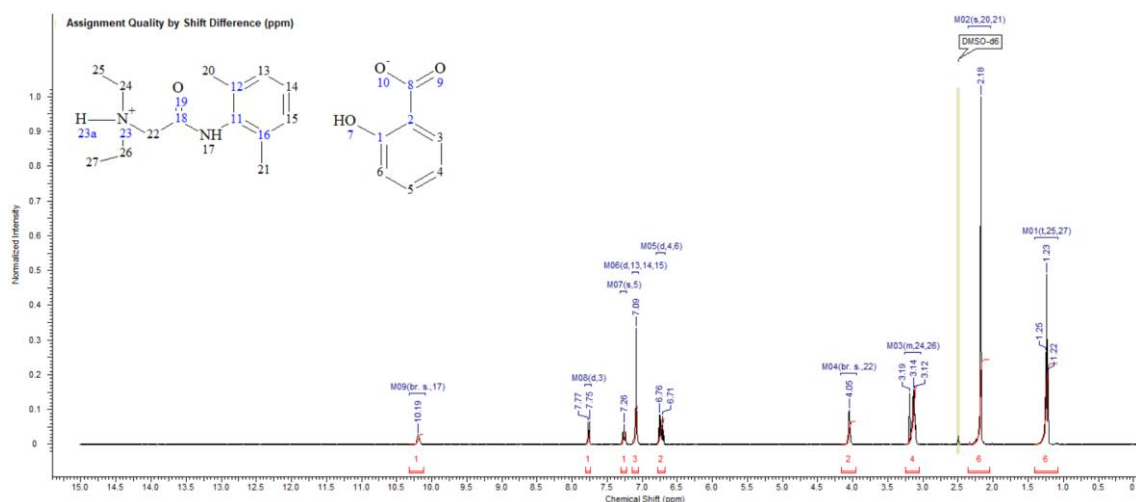
Rysunek A49. Widmo UV salicylanu lidokainy ([LID][SAL]).

IR $\nu_{\max}$ [cm⁻¹] = 3172, 2970, 1678, 1624, 1588, 1486, 1456, 1382, 1328, 1296, 1256, 1140, 1030, 962, 856, 782, 760, 706, 668, 630, 538.

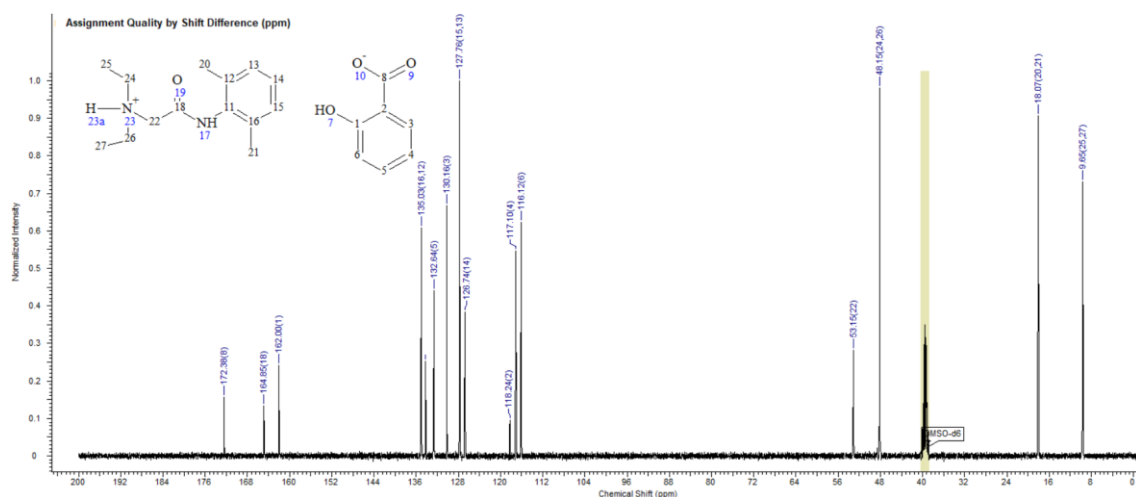


Rysunek A50. Widmo FT-IR salicylanu lidokainy ([LID][SAL]).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm = 1,23 (t, *J*=7,25 Hz, 6 H); 2,18 (s, 6 H); 3,03 - 3,26 (m, 4 H); 4,05 (br, s, 2 H); 6,74 (d, *J*=18,93 Hz, 2 H); 7,09 (d, *J*=0,79 Hz, 3 H); 7,26 (s, 1 H); 7,76 (d, *J*=7,69 Hz, 1 H); 10,19 (br, s, 1 H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm = 9,65; 18,07; 48,15; 53,15; 116,12; 117,10; 118,24; 126,74; 127,76; 130,16; 132,64; 134,20; 135,03; 162,00; 164,85; 172,38.



Rysunek A51. Widmo ^1H NMR salicylanu lidokainy ([LID][SAL]).



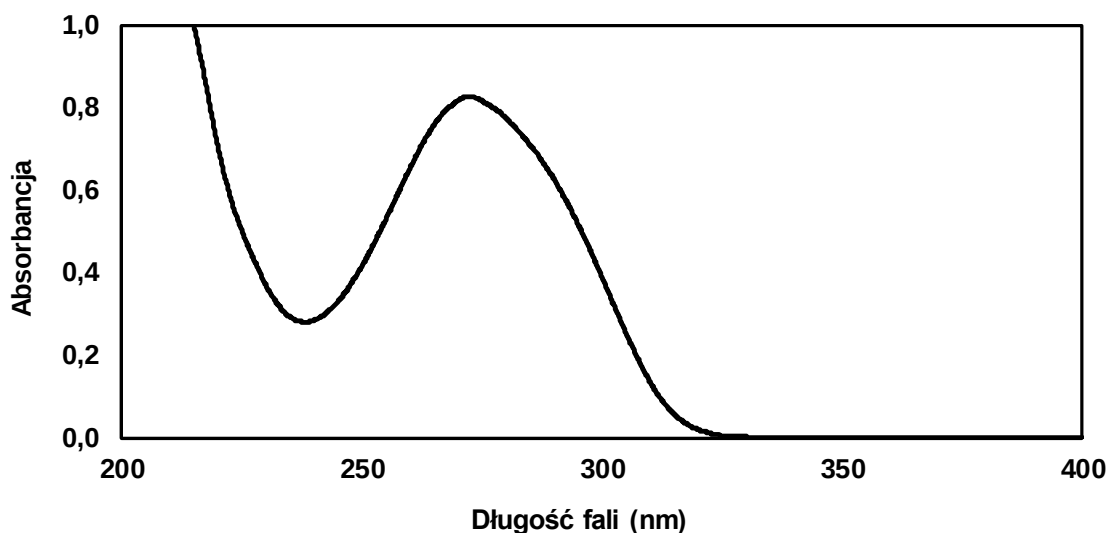
Rysunek A52. Widmo ^{13}C NMR salicylanu lidokainy ([LID][SAL]).

p-Aminobenzoesan *N*-etylolidokainy (PL1)

λ_{max} (metanol) = 273 nm; $\epsilon = 10,25 \cdot 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 3324, 3166, 3108, 2974, 2926, 1676, 1606, 1582, 1532, 1474, 1362, 1312, 1172, 1098, 1032, 1010, 982, 954, 858, 790, 712, 670, 618, 538. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm = 1,30 (t, $J=7,27$ Hz, 9 H); 2,18 (s, 6 H); 3,46 (q, $J=7,27$ Hz, 6 H); 4,19 (s, 2 H); 6,70 - 6,83 (m, 2 H); 7,10 - 7,27 (m, 3 H); 7,68 - 7,83 (m, 2 H). ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ ppm = 9,73; 20,07; 57,19; 58,29; 117,66; 128,95; 131,08; 131,21; 133,66; 134,79; 138,46; 152,51; 166,12; 177,84.

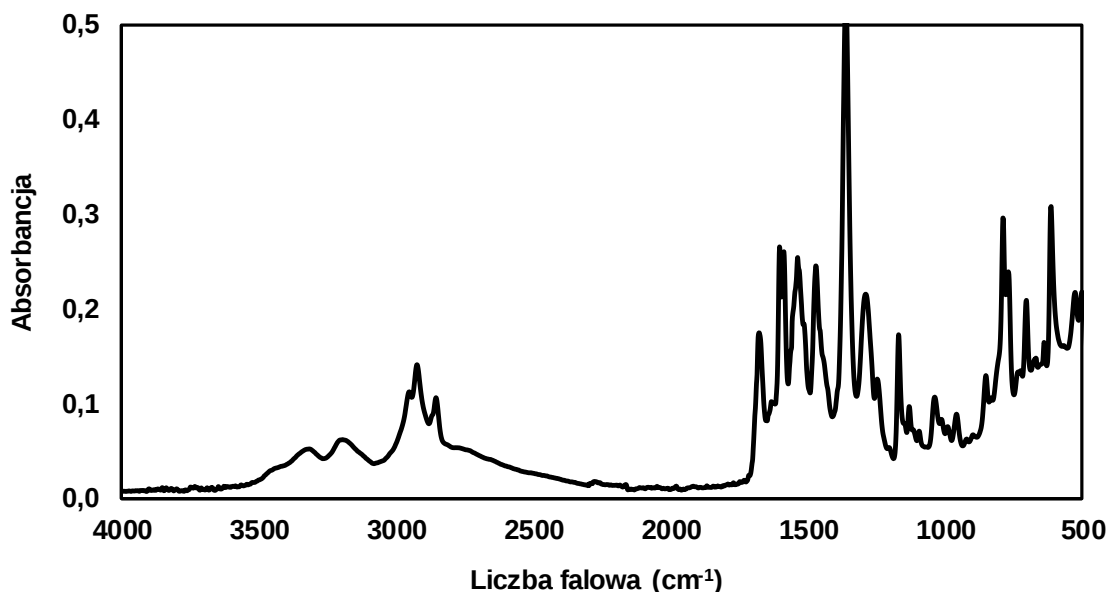
p-Aminobenzoesan *N*-oktylolidokainy (PL2)

λ_{max} (metanol) = 273 nm; $\epsilon = 11,95 \cdot 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$



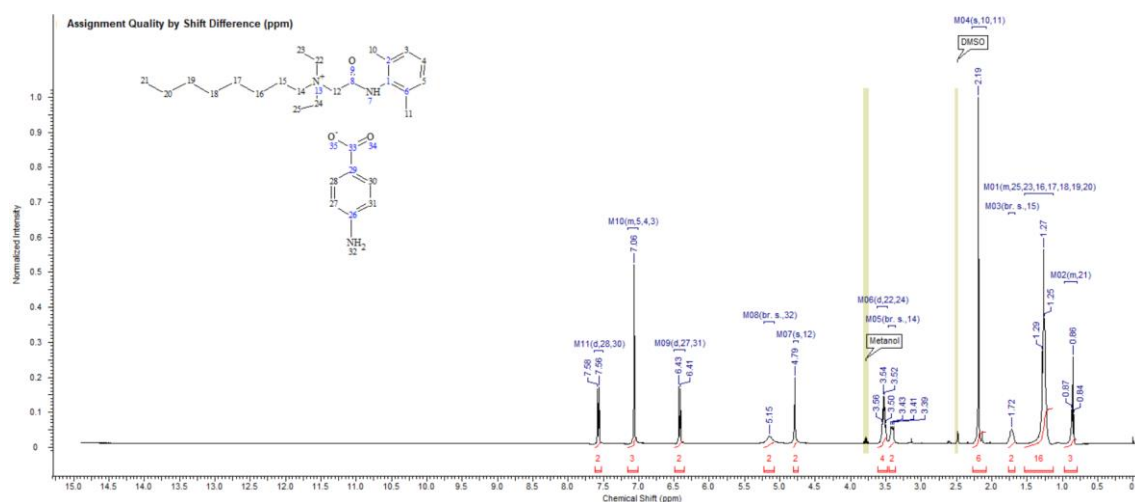
Rysunek A53. Widmo UV *p*-aminobenzoesu *N*-oktyloidokainy (PL2).

IR $\nu_{\max}$ [cm^{-1}] = 3312, 3168, 2922, 2854, 1674, 1602, 1590, 1540, 1474, 1358, 1296, 1168, 1034, 954, 848, 788, 706, 612, 524

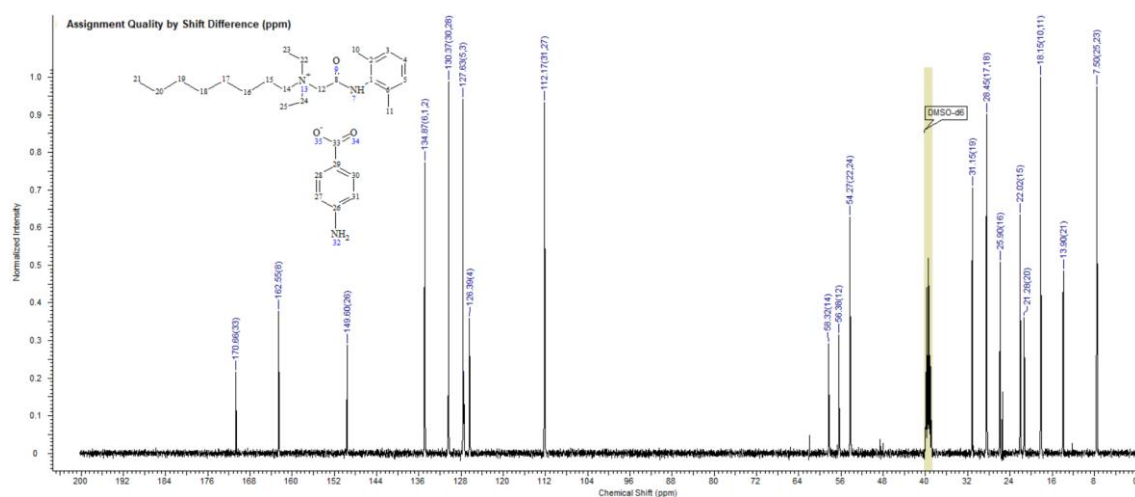


Rysunek A54. Widmo FT-IR *p*-aminobenzoesu *N*-oktyloidokainy (PL2).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 0,79 - 0,98 (m, 3 H); 1,13 - 1,54 (m, 16 H); 1,72 (br, s, 2 H); 2,19 (s, 7 H); 3,41 (br, s, 2 H); 3,53 (d, $J=7,20$ Hz, 4 H); 4,79 (s, 2 H); 5,15 (br, s, 2 H); 6,42 (d, $J=8,56$ Hz, 2 H); 7,01 - 7,16 (m, 3 H); 7,57 (d, $J=8,37$ Hz, 2 H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm = 7,50; 13,90; 18,15; 21,28; 22,02; 25,90; 28,45; 31,15; 54,27; 56,38; 58,32; 112,17; 126,39; 127,47; 127,63; 130,37; 134,87; 149,60; 162,55; 170,66.



Rysunek A55. Widmo ^1H NMR *p*-aminobenzoesu lidokainy (PL2).



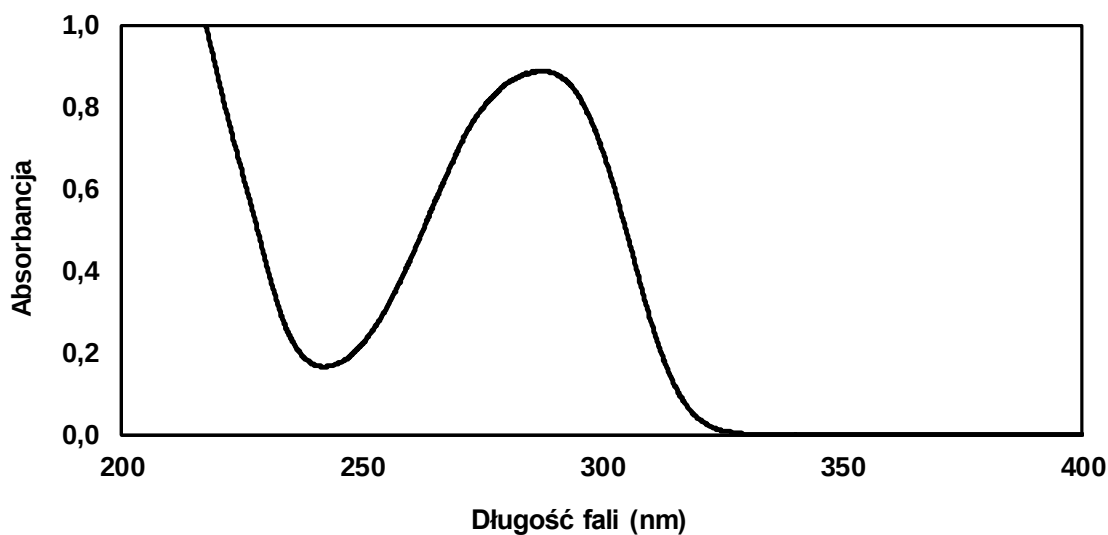
Rysunek A56. Widmo ^{13}C NMR *p*-aminobenzoesu lidokainy (PL2).

p-Aminobenzoic acid *N*-tetradecylidocaine (PL3)

λ_{max} (metanol) = 274 nm; $\epsilon = 11,14 \cdot 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. IR ν_{max} [cm^{-1}] = 3302, 3180, 2922, 2850, 1680, 1606, 1592, 1530, 1466, 1364, 1292, 1170, 1030, 962, 846, 790, 704, 616, 526. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 0,75 - 0,93 (m, 3 H); 1,18 - 1,36 (m, 28 H); 1,72 (br, s, 2 H); 2,19 (s, 6 H); 3,40 (br, s, 2 H); 3,54 (br, s, 4 H); 4,79 (s, 2 H); 6,43 (d, $J=8,56$ Hz, 2 H); 7,06 (s, 3 H); 7,57 (d, $J=8,56$ Hz, 2 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 7,47; 13,86; 18,13; 21,27; 22,07; 25,89; 28,46; 28,71; 28,80; 28,91; 29,00; 29,01; 29,04; 29,06; 31,29; 54,26; 56,34; 58,31; 112,17; 126,36; 127,53; 127,59; 130,41; 134,83; 134,86; 149,80; 162,52; 170,38.

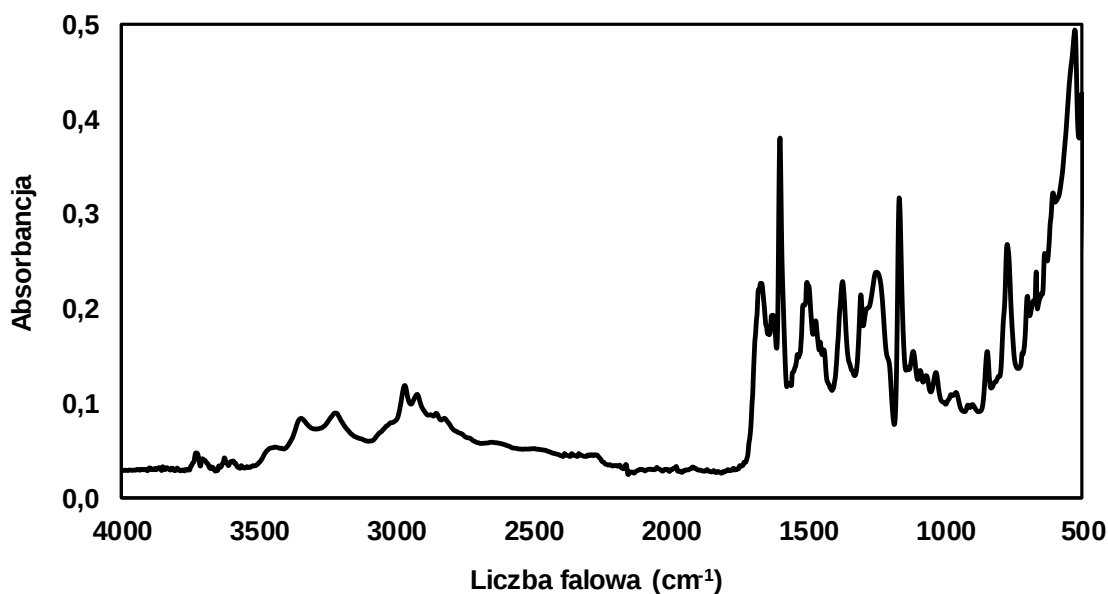
Mieszanka lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoowego ([LID][PABA])

λ_{max} (metanol) = 287 nm; $\epsilon = 12,58 \cdot 10^3 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$



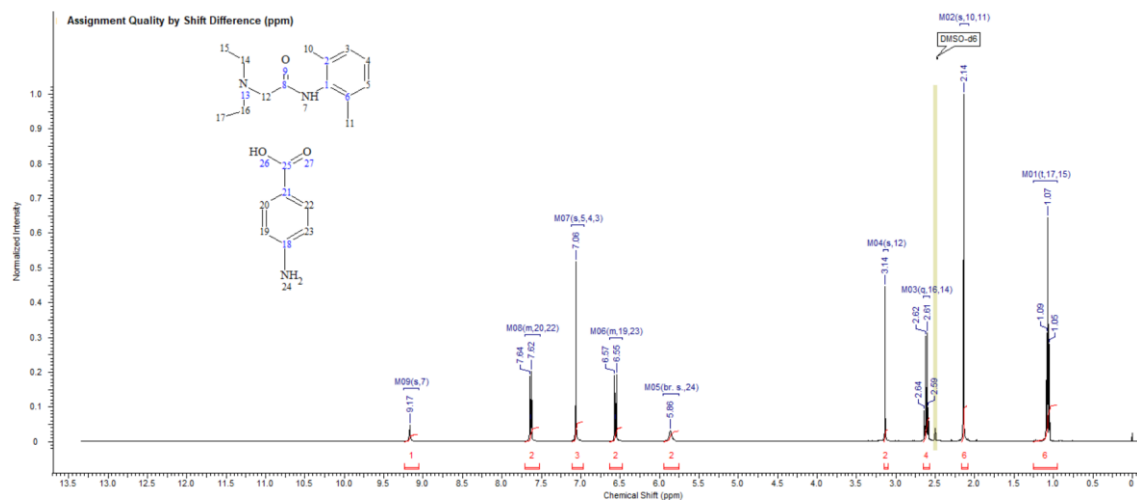
Rysunek A57. Widmo UV mieszaniny lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoesowego ([LID][PABA]).

$IR \nu_{max} [cm^{-1}] = 3450, 3328, 3202, 2962, 2916, 2844, 1676, 1622, 1602, 1506, 1378, 1306, 1238, 1168, 1110, 1028, 954, 848, 776, 680, 668, 588, 532.$

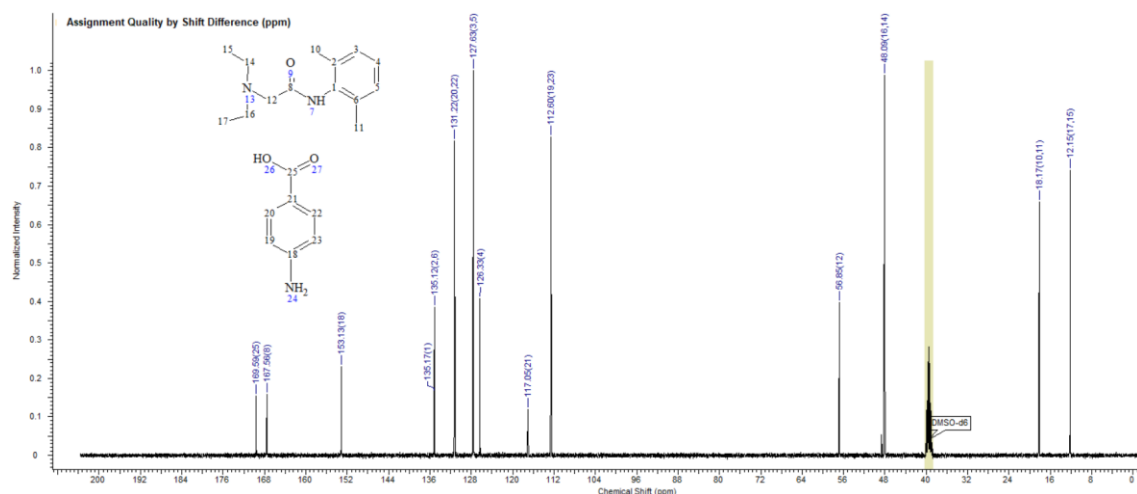


Rysunek A58. Widmo FT-IR mieszaniny lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoesowego ([LID][PABA]).

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 1,07 (t, $J=7,08$ Hz, 6 H); 2,14 (s, 6 H); 2,61 (q, $J=7,17$ Hz, 4 H); 3,14 (s, 2 H); 5,86 (br, s, 2 H); 6,47 - 6,63 (m, 2 H); 7,06 (s, 3 H); 7,52 - 7,71 (m, 2 H); 9,17 (s, 1 H).
 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ ppm = 12,15; 18,17; 48,09; 56,85; 112,60; 117,05; 126,33; 127,63; 131,22; 135,12; 135,17; 153,13; 167,56; 169,59.



Rysunek A59. Widmo ^1H NMR mieszaniny lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoowego ([LID][PABA]).



Rysunek A60. Widmo ^{13}C NMR mieszaniny lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoowego ([LID][PABA]).

Tabela A9. Wydajności reakcji, zawartość wody oraz temperatura topnienia bromków *N*-alkilnikotynamidu (1-7).

Związek	Wydajność (%)	Zawartość wody (%)	Temperatura topnienia (°C)
1	90	1,200	rozpad w 146
2	85	0,752	152-153
3	86	0,639	172-174
4	88	0,518	184-186
5	78	1,189	rozpad w 205
6	82	0,948	rozpad w 207
7	87	1,694	rozpad w 206

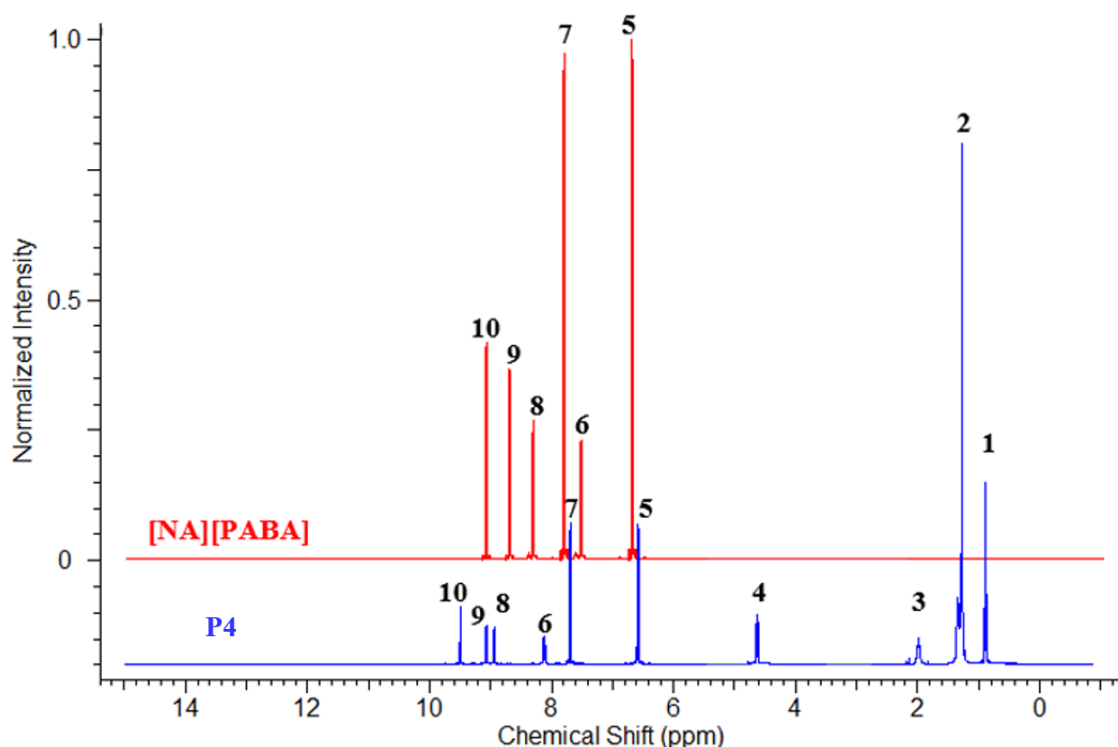
Tabela A10. Wartości współczynnika podziału oktanol–woda (log K_{ow}) bromków *N*-alkilonikotynamidu i odpowiadające im odchylenie standardowe (SD).

Związek	log K _{ow}	SD
1	-2,16	0,15
2	-1,28	0,11
3	-0,45	0,15
4	-0,09	0,05
5	0,13	0,09
6	0,88	0,15
7	1,29	0,10

Tabela A11. Zsyntezowane związki wraz z wydajnościami ich otrzymywania, temperaturą topnienia i zawartością wody.

Związek	Wydajność (%)	Postać w 25°C	Temp. topnienia (°C)	Początek rozkładu ^b (°C)	Zawartość wody (% w/w)				Zawartość bromków (ppm)
					0 dzień	1 dzień	2 dzień	5 dzień	
N1	90 ^a	Białe krystaliczne ciało stałe	-	88	1,88	1,26	1,01	0,79	3 498
N2	91 ^a	Białe krystaliczne ciało stałe	-	81	1,38	0,77	0,76	0,71	2 345
N3	95 ^a	Białe krystaliczne ciało stałe	-	99	1,56	0,86	0,84	0,84	4 876
N4	94 ^a	Białe krystaliczne ciało stałe	-	100	1,30	0,87	0,88	0,96	5 245
P1	88 ^a	Żółte krystaliczne ciało stałe	-	104	2,16	1,27	1,09	0,90	8 223
P2	86 ^a	Żółte krystaliczne ciało stałe	-	113	0,53	1,02	0,80	0,81	8 997
P3	83 ^a	Żółte krystaliczne ciało stałe	-	128	0,96	1,18	1,05	0,78	8 553
P4	86 ^a	Żółte krystaliczne ciało stałe	-	131	0,94	1,04	0,86	0,65	7 891
[NA][NIK]	98	Stała mieszanina heterogeniczna	121-188	-	0,63	2,55	2,59	2,56	-
[NA][PABA]	98	Białe krystaliczne ciało stałe	109-111	-	0,56	1,61	1,67	1,65	-

^a po dwóch etapach reakcji; ^b Początek intensywnej zmiany koloru wskazującej na rozkład



Rysunek A61. Różnice w widmach ^1H NMR pomiędzy wybranym produktem i jego niejonowym odpowiednikiem pozbawionym łańcucha alkilowego (**P4** i **[NA][PABA]**).

Komentarz: Porównanie widm ^1H NMR kokryształu **[NA][PABA]** i związku jonowego **P4** uwypukla elektronowe efekty czwartorzędowania. Wprowadzenie łańcucha alkilowego i utworzenie dodatnio naładowanego azotu znacząco zmienia gęstość elektronową w pierścieniach aromatycznych, prowadząc do obserwowalnych zmian przesunięcia chemicznego. W widmach ^1H NMR *p*-aminobenzoesanu *N*-dodecylnikotynamidu (**P4**) i kokryształu nikotynamidu i kwasu *p*-aminobenzoesowego (**[NA][PABA]**) można zaobserwować dziesięć sygnałów, przy czym sygnały 5–10 można uznać za komplementarne. Należy zauważyć, że pojawienie się sygnałów z łańcucha alkilowego (1–4) w zakresie od 0,89 do 4,63 ppm spowodowało znaczące zmiany w położeniu innych przesunięć chemicznych związku **P4**. Sygnał 6, pochodzący z pierścienia aromatycznego nikotynamidu, wykazywał jedną z największych zmian wartości przesunięcia chemicznego równą 0,6 ppm (8,1 ppm dla **P4** i 7,5 dla **[NA][PABA]**). Sygnały 7 i 5, reprezentujące protony z pierścienia aromatycznego kwasu *p*-aminobenzoesowego/anionu, różniły się tylko o 0,1 ppm odpowiednio dla obu sygnałów 5 i 7. Sygnały 8, 9 i 10 ilustrują konsekwencje wprowadzenia łańcucha alkilowego do struktury nikotynamidu przy atomie azotu, co prowadzi do utworzenia kationu. Powstawanie dodatnio naładowanego azotu znacząco zmienia gęstość elektronową w pierścieniu aromatycznym. W efekcie zaobserwowano znaczące przesunięcia sygnałów: 8 o około 0,6 ppm, 9 o około 0,4 ppm oraz 10 o około 0,4 ppm.

Tabela A12. Współczynnik podziału oktanol–woda (log K_{ow}) dla analizowanych związków i odpowiadające mu odchylenie standardowe (SD).

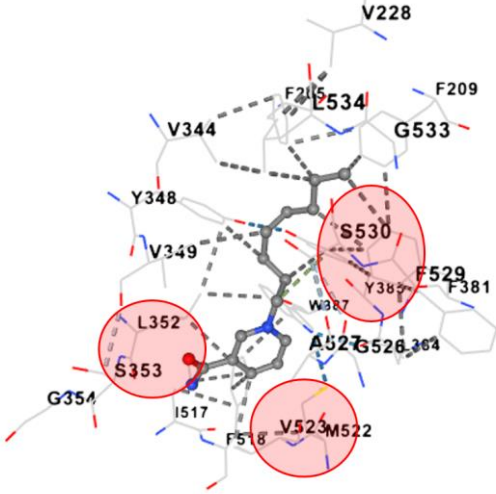
Związek	log K _{ow}	SD	Różnica lipofilowości po wymianie jonowej ^a (Δlog K _{ow})
Bromek N-heksylonikotynamidu (3)	-0,45	0,15	---
Bromek N-oktylonikotynamidu (4)	-0,09	0,05	---
Bromek N-decylo-nikotynamidu (5)	0,13	0,09	---
Bromek N-dodecylo-nikotynamidu (6)	0,88	0,15	---
N1	-1,48	0,09	-1,03
N2	-1,27	0,26	-1,18
N3	-0,05	0,17	-0,18
N4	0,35	0,09	-0,53
P1	-1,73	0,11	-1,28
P2	-1,29	0,20	-1,20
P3	-0,52	0,24	-0,65
P4	0,06	0,18	-0,82
[NA][NIK]	-0,62	0,18	---
[NA][PABA]	-0,11	0,13	---

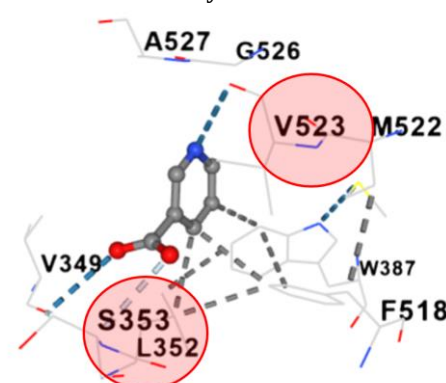
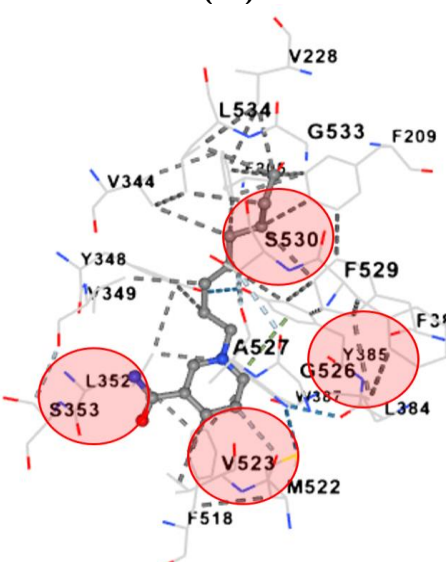
^a wyrażone jako różnica między log K_{ow} produktu a log K_{ow} odpowiedniego substratu

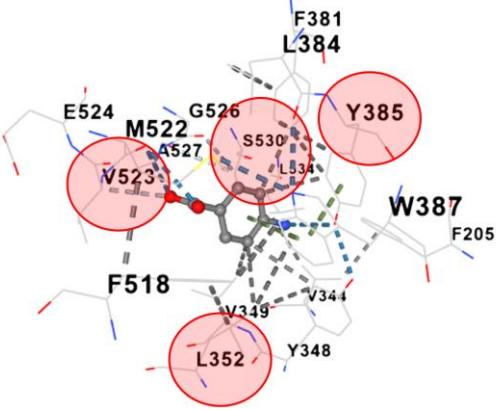
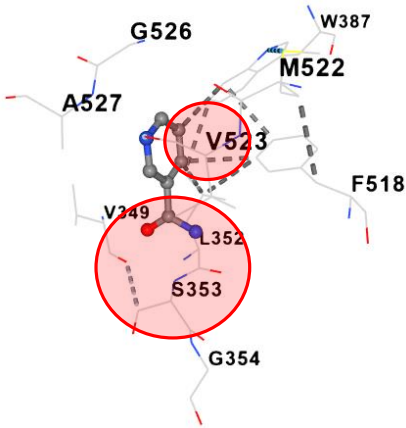
Tabela A13. Inhibicja denaturacji albuminy: potencjał przeciwzapalny związków przygotowanych i związku odniesienia (diklofenaku sodowego (DFC-Na)).

Związek	Stężenie		Inhibicja denaturacji (%)	Związek	Stężenie		Inhibicja denaturacji (%)
	(μg/mL)	μM			(μg/mL)	μM	
N1	1	3,0	46,5±0,5	P1	1	2,9	42,3±1,6
	10	30	48,1±1,7		10	29	44,5±2,1
	100	304	43,3±2,7		100	291	48,9±2,0
	1000	3036	43,1±2,7		1000	2912	46,3±1,9
N2	1	2,8	47,6±1,2	P2	1	2,7	43,9±1,5
	10	28	48,7±2,5		10	27	45,9±1,3
	100	280	39,5±2,2		100	269	53,7±1,5
	1000	2797	29,4±3,0		1000	2692	29,3±1,1
N3	0,1	0,26	46,5±1,6	P3	0,1	0,25	46,9±2,1
	1	2,6	48,9±2,6		1	2,5	52,6±4,2
	10	26	45,3±1,8		10	25	48,8±2,6
	100	259	44,1±1,3		100	250	41,4±2,1
N4	0,0001	0,00024	46,6±2,5	P4	0,0001	0,00023	43,0±2,7
	0,001	0,0024	49,6±0,6		0,001	0,0023	43,2±3,4
	0,01	0,024	46,5±1,6		0,01	0,023	45,4±0,7
	0,1	0,24	34,8±1,4		0,1	0,23	40,4±2,0
[NA][NIK]	1	2,4	0,00±3,7	[NA][PABA]	1	2,3	36,9±4,1
	0,01	0,041	45,9±1,4		0,01	0,039	38,6±1,8
	0,1	0,41	48,9±1,4		0,1	0,39	44,7±1,3
	1	4,1	44,5±1,6		1	3,9	46,2±1,7
DFC-Na	10	41	44,5±1,5		10	39	47,6±1,2
	100	408	44,4±3,0		100	386	44,6±2,2
	1000	4078	11,6±3,2		1000	3857	17,8±2,7
	0,001	0,003	39,6±2,5				
DFC-Na	0,01	0,031	41,6±2,2				
	0,1	0,31	44,1±2,0				
	1	3,1	44,8±0,1				
	10	31	45,6±1,7				
DFC-Na	100	314	45,9±1,7				
	1000	3143	49,5±1,5				

Tabela A14. Dokowanie molekularne typu blind do enzymu COX-2, przedstawiające główne kieszenie wiążące, wartości *Vina score* oraz lokalizację kluczowych reszt katalitycznych.

Dokowanie molekularne typu blind (kluczowe reszty katalityczne zaznaczono na czerwono)	Vina score	Objętość kieszeni (Å³)	Środek (x. y. z)	Pole dokowania (x. y. z)
DFC-Na Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,0	5150	24, 17, 50	28, 31, 21
Kation nikotynianu N-heksylonikotynamidu (N1) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,0	5150	24, 17, 50	28, 31, 21
Kation nikotynianu N-oktylonikotynamidu (N2)  Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,4	5150	24, 17, 50	28, 31, 21
Kation nikotynianu N-decylo-nikotynamidu (N3) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,4	5150	24, 17, 50	23, 31, 23
Kation nikotynianu N-dodecylo-nikotynamidu (N3) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,5	5150	24, 17, 50	24, 31, 24

Anion nikotynianu w N1-N4  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,3	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kation <i>p</i>-aminobenzoesanu <i>N</i>-heksylonikotynamidu (P1) Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,0	5150	24, 17, 50	28, 31, 21
Kation <i>p</i>-aminobenzoesanu <i>N</i>-oktylonikotynamidu (P2)  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,2	5150	24, 17, 50	28, 31, 21
Kation <i>p</i>-aminobenzoesanu <i>N</i>-decylonikotynamidu (P3) Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,5	5150	24, 17, 50	23, 31, 23

Kation <i>p</i>-aminobenzoesu <i>N</i>-dodecyłonikotynamidu (P4) Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-8,0	5150	24, 17, 50	24, 31, 24
Kation <i>p</i>-aminobenzoesu <i>N</i>-dodecyłonikotynamidu (P4) Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-8,0	5150	24, 17, 50	24, 31, 24
Anion <i>p</i>-aminobenzoesu w P1-P4  Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,9	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Niejonowe ugrupowanie nikotynamidu w [NA][NIK] i [NA][PABA]  Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,5	5150	24, 17, 50	28, 31, 25

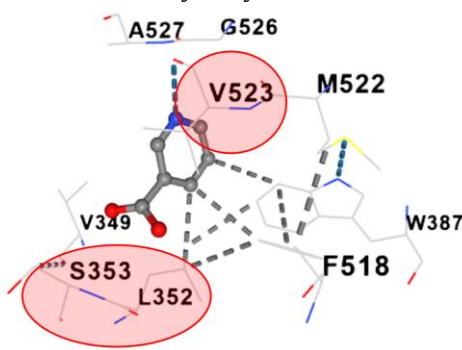
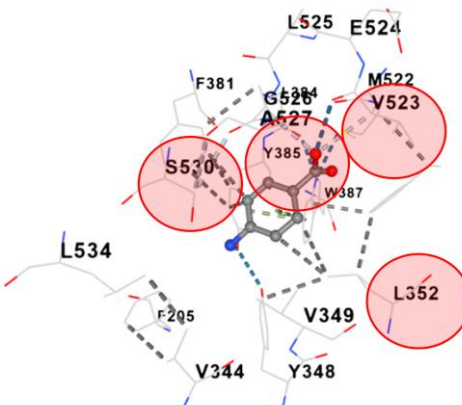
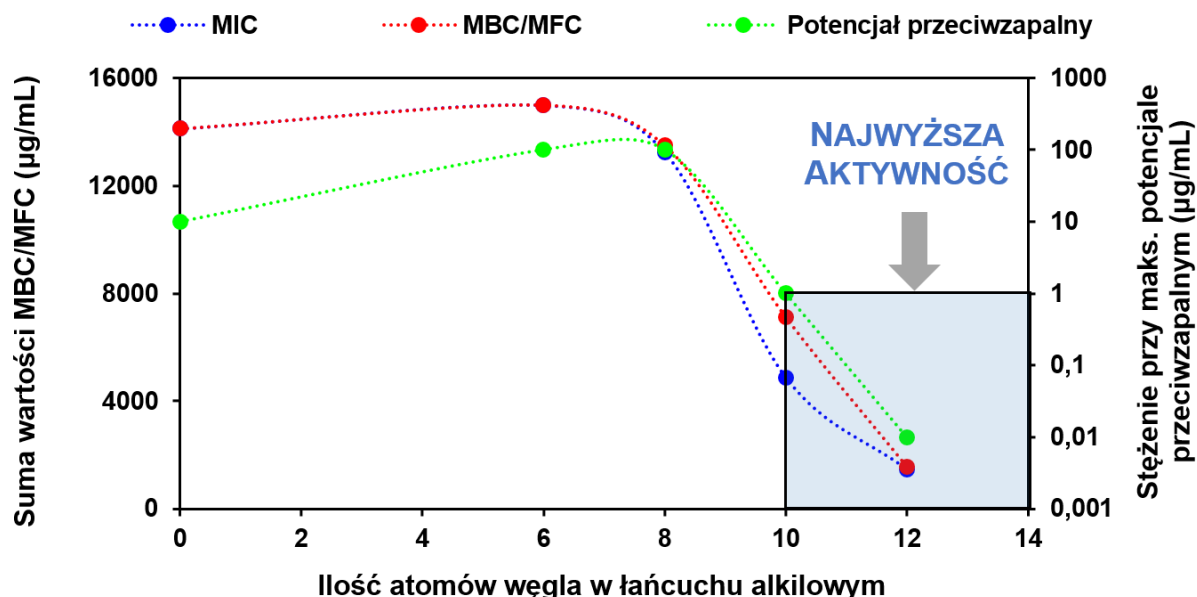
Kwas nikotynowy w [NA][NIK]  Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,3	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kwas p-aminobenzoesowy w [NA][PABA]  Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-6,0	5150	24, 17, 50	28, 31, 25

Tabela A15. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nikotynianów *N*-alkilnikotynamidu (**N1-N4**), *p*-aminobenzoesanów *N*-alkilnikotynamidu (**P1-P4**), [NA][NIK], [NA][PABA], obliczona jako MIC i MBC/MFC.

Organizmy	MIC/ MBC/ MFC [mg/L]	Analizowane związki									
		N1	N2	N3	N4	P1	P2	P3	P4	[NA][NIK]	[NA][PABA]
Bakterie Gram-ujemne											
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	MIC	>1000	>1000	500	125	>1000	500	125	>1000	>1000	>1000
	MBC	>1000	>1000	500	125	>1000	500	125	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC	>1000	1000	250	31.5	>1000	1000	250	62.5	>1000	>1000
	MBC	>1000	1000	250	31.5	>1000	1000	500	62.5	>1000	>1000
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	MIC	>1000	1000	125	7.81	>1000	1000	250	7.81	>1000	>1000
	MBC	>1000	1000	125	15.63	>1000	1000	500	15.63	>1000	>1000
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	MIC	>1000	1000	250	15.63	>1000	>1000	250	15.63	>1000	1000
	MBC	>1000	>1000	250	31.25	>1000	>1000	250	15.63	>1000	>1000
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	MIC	>1000	>1000	250	15.63	>1000	>1000	250	15.63	>1000	>1000
	MBC	>1000	>1000	250	31.25	>1000	>1000	500	15.63	>1000	>1000
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	MIC	>1000	>1000	250	15.63	>1000	>1000	250	15.63	500	>1000
	MBC	>1000	>1000	250	31.25	>1000	>1000	500	31.25	1000	>1000
<i>P. vulgaris</i> ATCC 49132	MIC	>1000	>1000	1000	125	>1000	>1000	1000	125	>1000	>1000
	MBC	>1000	>1000	1000	125	>1000	>1000	1000	125	>1000	>1000
Bakterie Gram-dodatnie											
<i>L.monocytogenes</i> ATCC 19111	MIC	>1000	1000	250	31.25	>1000	>1000	250	31.25	>1000	>1000
	MBC	>1000	>1000	>1000	31.25	>1000	>1000	>1000	31.25	>1000	>1000
<i>M. luteus</i> ATCC 4698	MIC	>1000	>1000	250	31.25	>1000	>1000	250	15.63	>1000	1000
	MBC	>1000	>1000	1000	62.5	>1000	>1000	500	31.25	>1000	1000
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	MIC	>1000	>1000	250	15.63	>1000	1000	250	15.63	>1000	>1000
	MBC	>1000	>1000	250	62.5	>1000	>1000	500	31.25	>1000	>1000
<i>S. aureus</i> ATCC 33862	MIC	>1000	500	62.5	3.9	>1000	500	62.5	3.9	1000	1000
	MBC	>1000	500	62.5	7.81	>1000	500	62.5	3.9	>1000	>1000
<i>B. subtilis</i> DSM 4451	MIC	>1000	>1000	250	3.9	>1000	>1000	125	15.63	>1000	1000
	MBC	>1000	>1000	1000	7.81	>1000	>1000	125	15.63	>1000	1000
Fungi											
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	MIC	>1000	>1000	500	62.5	>1000	>1000	1000	62.5	>1000	>1000
	MFC	>1000	>1000	500	62.5	>1000	>1000	1000	125	>1000	>1000
<i>R. mucilaginosa</i> PUEB	MIC	>1000	>1000	250	62.5	>1000	1000	500	62.5	>1000	125
	MFC	>1000	>1000	250	62.5	>1000	1000	500	62.5	>1000	125
<i>C. neoformans</i> ATCC 14116	MIC	>1000	250	31.25	7.81	1000	250	62.5	3.9	>1000	1000
	MFC	>1000	500	62.5	7.81	1000	500	62.5	3.9	>1000	1000



Rysunek A62. Zależność pomiędzy długością łańcucha alkilowego w *p*-aminobenzoesanach (P1–P4; [NA][PABA]) a sumaryczną aktywnością przeciwdrobnoustrojową (MIC lub MBC/MFC) wobec 15 patogennych mikroorganizmów, oraz stężeniem odpowiadającym maksymalnemu potencjałowi przeciwzapalnemu (inhibicji denaturacji albuminy). Dla [NA][PABA] długość łańcucha alkilowego jest równa 0.

Tabela A16. Współczynniki przepuszczalności określone po 6 godzinach dla testowanych QAS N1–N4 i P1–P4, [NA][NIK], [NA][PABA] i DFC-Na.

Związek	Współczynnik przepuszczalności (P_{app} w 10^{-6} cm/s)
N1	5,46±0,19
N2	4,66±0,16
N3	5,20±0,05
N4	5,82±0,01
P1	6,05±0,15
P2	4,21±0,10
P3	4,57±0,08
P4	5,23±0,01
[NA][NIK]	5,80±0,08
[NA][PABA]	6,02±0,10
DFC-Na	5,91±0,10

Tabela A17. Procent przenikania określony po 0,5, 1, 6 i 16 godzinach dla N1–N4, [NA][NIK] i DFC-Na.

Związek	Procent przenikania (%)			
	Czas (h)			
	0.5	1	6	16
N1	7,8±0,23 a*	16,3±0,07 a	21,6±0,68 a	21,9±0,42 a
N2	8,6±0,15 a	15,5±0,06 a	18,8±0,40 a	22,6±0,18 ab
N3	9,3±0,11 a	16,0±0,26 a	20,7±0,55 a	22,8±0,13 ab
N4	13,0±0,26 b	18,4±0,23 b	22,26±0,36 ab	22,9±0,42 ab
[NA][NIK]	13,8±0,29 b	17,8±0,68 ab	22,8±0,26 b	23,2±0,19 b
DFC-Na	10,5±0,61 ab	17,37±0,5 ab	23,17±0,31 b	25,39±0,58 c

* Te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

Tabela A18. Analiza statystyczna porównująca różnice pomiędzy określonymi przedziałami czasu dla **N1–N4**, **[NA][NIK]** i **DFC-Na**.

Związek	Czas (h)		
	0,5 vs 1	1 vs 6	6 vs 16
N1	***	**	SN
N2	***	**	SN
N3	***	**	SN
N4	***	**	SN
[NA][NIK]	***	**	SN
DFC-Na	***	**	*

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, SN – statystycznie nieistotne

Tabela A19. Dopasowanie danych dotyczących przenikania do modeli Higuchiego i kinetyki pierwszego rzędu oraz odpowiadających im parametrów przenikania (v_0 i Q_p) dla **N1–N4**, **[NA][NIK]** i **DFC-Na**.

Związek	Model Higuchi Q = k·t ^{1/2}		Model kinetyki pierwszego rzędu ln(1-Q/Q _{max})=-k·t		Prędkość początkowa v ₀ (%·h ⁻¹)	Plateau Q _p (%)
	y= a·x+b	R ²	y= a·x+b	R ²		
N1	y = 3,5584x + 9,6450	0,6665	y = 0,7042x + 0,2315	0,9772	17,1	21,7
N2	y = 3,5642x + 9,1008	0,8200	y = 0,331x - 0,3497	0,5737	14,0	20,7
N3	y = 3,5196x + 10,0025	0,7890	y = 0,3504x + 0,3775	0,8803	13,5	21,7
N4	y = 2,5495x + 13,9318	0,7237	y = 0,5379x + 0,5231	0,9162	10,8	22,6
[NA][NIK]	y = 2,6252x + 14,0482	0,7814	y = 0,6152x + 0,4533	0,9579	8,2	23,0
DFC-Na	y = 3,9765x + 10,9918	0,8121	y = 0,3586x + 0,3578	0,9022	13,8	24,3

Q - procent przenikania (%), $Q_{\max}$ - procent przenikania (%) po 16 h; k - stała przenikania; $v_0 = (Q_{1h} - Q_{0,5h}) / (t_{1h} - t_{0,5h})$; $Q_p = (Q_{6h} + Q_{16h}) / 2$

Tabela A20. Procent przenikania określony po 0,5, 1, 6 i 16 godzinach dla **P1–P4**, **[NA][PABA]** i **DFC-Na**.

Związek	Procent przenikania (%)			
	Czas (h)			
	0,5	1	6	16
P1	16.4±0.63 a*	20.7±0.60 a	23.7±0.50 a	28.6±0.17 a
P2	14.8±0.38 b	16.1±0.03 ab	18.0±0.73 a	23.7±0.35 a
P3	14.5±0.50 b	14.5±0.30 ab	18.5±0.91 b	22.4±0.05 b
P4	16.3±0.60 bc	17.4±0.34 ab	20.4±0.33 c	21.3±0.07 b
[NA][PABA]	17.5±0.87 bc	22.18±0.21 bc	23.6±0.36 c	27.6±0.32 c
DFC-Na	10.5±0.61 b	17.37±0.5 b	23.17±0.31 c	25.39±0.58 c

* Te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

Tabela A21. Analiza statystyczna porównująca różnice pomiędzy określonymi przedziałami czasu dla **P1–P4**, **[NA][PABA]** i **DFC-Na**.

Związek	Czas (h)		
	0,5 vs 1	1 vs 6	6 vs 16
P1	**	**	***
P2	*	**	***
P3	SN	**	***
P4	SN	**	*
[NA][PABA]	**	*	***
DFC-Na	***	**	*

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, SN – statystycznie nieistotne

Tabela A22. Dopasowanie danych dotyczących przenikania do modeli Higuchiego i kinetyki pierwszego rzędu oraz odpowiadających im parametrów przenikania (v_0 and Q_p) dla **P1–P4**, **[NA][PABA]** i **DFC-Na**.

Związek	Model Higuchi $Q = k \cdot t^{1/2}$	R^2	Model kinetyki pierwszego rzędu $\ln(1-Q/Q_{\max}) = -k \cdot t$	R^2	Prędkość początkowa v_0 (%·h ⁻¹)	Plateau Q_p (%)
	$y = a \cdot x + b$		$y = a \cdot x + b$			
P1	$y = 3,2803x + 15,6573$	0,9288	$y = 0,1354x + 0,9558$	0,8338	8,6	26,2
P2	$y = 2,5783x + 13,1239$	0,9858	$y = 0,2127x + 0,5719$	0,6307	2,6	21,3
P3	$y = 2,3364x + 12,6724$	0,9798	$y = 0,1797x + 0,5886$	0,5613	1,6	20,0
P4	$y = 1,5014x + 15,7759$	0,9122	$y = 0,1715x + 0,6116$	0,5209	2,2	20,8
[NA][PABA]	$y = 2,5850x + 17,3441$	0,8825	$y = 0,2235x + 0,7042$	0,5502	8,5	25,6
DFC-Na	$y = 3,9765x + 10,9918$	0,8121	$y = 0,3586x + 0,3578$	0,9022	13,8	24,3

Q - procent przenikania (%), $Q_{\max}$ - procent przenikania (%) po 16 h; k - stała przenikania; $v_0 = (Q_{1h} - Q_{0.5h})/(t_{1h} - t_{0.5h})$; $Q_p = (Q_{6h} + Q_{16h})/2$

Tabela A23. Napięcie powierzchniowe i ciśnienie powierzchniowe badanych związków.

Związek	Napięcie powierzchniowe (mN·m ⁻¹)	Ciśnienie powierzchniowe (mN·m ⁻¹)
N1	62,40 ± 0,17	9,2
N2	57,96 ± 0,05	13,64
N3	45,17 ± 0,11	26,43
N4	32,58 ± 0,06	39,02
P1	70,39 ± 0,22	1,21
P2	67,16 ± 0,09	4,44
P3	57,83 ± 0,06	13,77
P4	39,44 ± 0,06	32,16
PBS	71,60 ± 0,82	-
Woda	72,71 ± 0,05	-

Tabela A24. Rozpuszczalność badanych związków w różnym pH.

Związek	Część rozpuszczalnika wymagana na część substancji rozpuszczonej (mL)		
	SGF (pH = 1,2)	Woda (pH = 6,0)	PBS (pH = 7,4)
N1	1-10	1-10	1-10
N2	10-30	1-10	1-10
N3	10-30	1-10	1-10
N4	30-100	10-30	10-30
P1	1-10	>1	1-10
P2	1-10	>1	1-10
P3	1-10	>1	1-10
P4	1-10	1-10	10-30
[NA][NIK]	10-30	10-30	10-30
[NA][PABA]	30-100	30-100	30-100

Tabela A25. Klasy rozpuszczalności według Farmakopei.

Część rozpuszczalnika wymagana na część substancji rozpuszczonej	Klasy rozpuszczalności
>1	Bardzo rozpuszczalny
1-10	Łatwo rozpuszczalny
10-30	Rozpuszczalny
30-100	Trudno rozpuszczalny
100-1000	Słabo rozpuszczalny
1000-10000	Bardzo słabo rozpuszczalny
>10000	Praktycznie nierozpuszczalny

Tabela A26. Ocena żywotności komórek po 24-godzinnej ekspozycji na analizowane związki oraz chlorek benzalkoniowy (BAC) z wykorzystaniem testu MTT.

Związek	IC₁₀ (µg/mL)		IC₅₀ (µg/mL)		IC₉₀ (µg/mL)	
	Średnia	± SD	Średnia	± SD	Średnia	± SD
N1	> 100	---	> 100	---	> 100	---
N2	> 100	---	> 100	---	> 100	---
N3	45,89	5,45 d	> 100	---	> 100	---
N4	12,33	0,86 c	20,14	0,51c	32,93	0,66 c
P1	> 100	---	> 100	---	> 100	---
P2	> 100	---	> 100	---	> 100	---
P3	65,72	1,68 e	> 100	---	> 100	---
P4	9,13	0,35 b	15,02	0,84 b	24,75	2,14 b
[NA][NIK]	> 100	---	> 100	---	> 100	---
[NA][PABA]	> 100	---	> 100	---	> 100	---
BAC	0,98	0,08 a	1,97	0,09 a	9,12	0,03 a

* Te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy ($p < 0,05$).

Tabela A27. Wykaz leków zawierających w swoim składzie długłańcuchowe czwartorzędowe sole amoniowe dopuszczone do obrotu w krajach europejskich i USA.

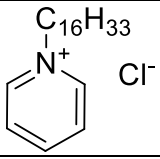
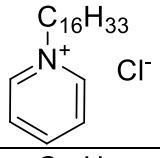
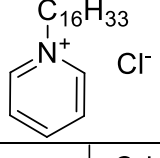
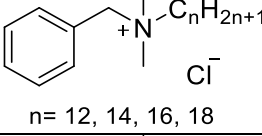
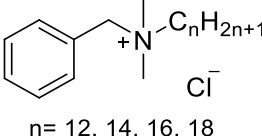
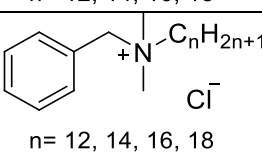
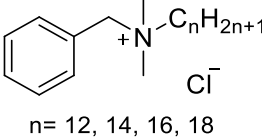
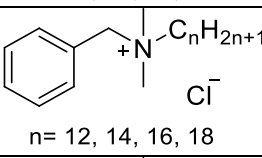
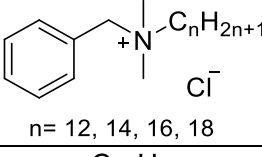
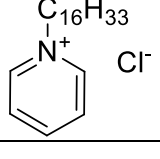
Europa			
Nazwa leku	Przeznaczenie leku	QAS	Struktura
Halset	Pastyłki do ssania. Stosowane profilaktycznie i leczniczo w łagodnych i umiarkowanych stanach zapalnych jamy ustnej i gardła.	Chlorek cetylopirydyniowy (CPC)	
Menthosept	Pastyłki do ssania. Stosowane do dezynfekcji jamy ustnej, dziąseł i gardła w przebiegu stanów zapalnych o podłożu bakteryjnym i grzybiczym.	Chlorek cetylopirydyniowy (CPC)	
Envil Gardlo	Aerozol do jamy ustnej. Wskazany w stanach zapalnych gardła i jamy ustnej.	Chlorek cetylopirydyniowy (CPC)	
Septolete	Pastyłki do ssania. Stosowane w leczeniu stanów zapalnych jamy ustnej i gardła.	Chlorek benzalkoniowy (BAC)	 n= 12, 14, 16, 18
Oftensin	Stosowany w leczeniu jaskry i nadciśnienia ocznego.	Chlorek benzalkoniowy (BAC)	 n= 12, 14, 16, 18
Oflodinex	Antybiotyk w postaci kropli do oczu.	Chlorek benzalkoniowy (BAC)	 n= 12, 14, 16, 18
USA			
Nazwa leku	Przeznaczenie leku	QAS	Struktura
Bactine	Stosowany w leczeniu drobnych ran i oparzeń.	Chlorek benzalkoniowy (BAC)	 n= 12, 14, 16, 18
Orajel	Łagodzi ból spowodowany podrażnieniem lub urazem jamy ustnej.	Chlorek benzalkoniowy (BAC)	 n= 12, 14, 16, 18
NasoClenz	Środek antyseptyczny do nosa, stosowany w celu zmniejszenia ryzyka infekcji dróg oddechowych.	Chlorek benzalkoniowy (BAC)	 n= 12, 14, 16, 18
Cepacol	Pomaga złagodzić kaszel, ból gardła, owrzodzenia jamy ustnej i afty.	Chlorek cetylopirydyniowy (CPC)	

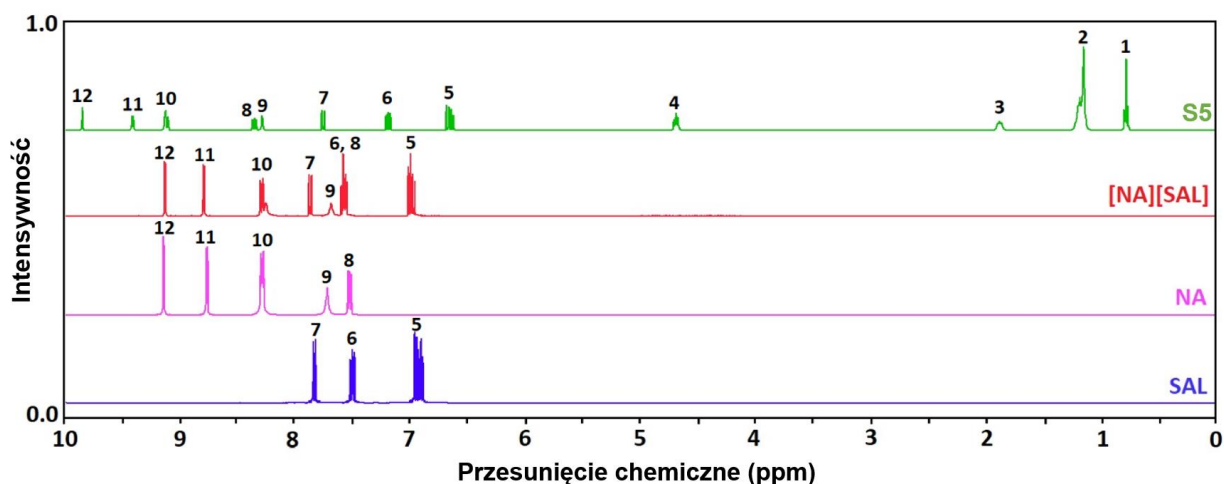
Tabela A28. Obliczenia *in silico* dotyczące kluczowych parametrów farmakokinetycznych QASs, [NA][NIK], [NA][PABA] i DFC-Na.

Związek	Przepuszczalność przez monowarstwę komórek Caco-2 (P_{app} w 10^{-6} cm/s)	Wchłanianie jelitowe (%)	Frakcja niezwiązana	Rozpuszczalność w wodzie (mg/mL)	TPSA ($\text{\AA}^2$)
N1	1,55	59,0	0,469	66,6	100
N2	20,89	61,1	0,379	31,1	
N3	20,89	62,6	0,293	17,8	
N4	20,89	64,1	0,218	5,0	
P1	1,29	57,2	0,373	33,4	113,1
P2	3,02	58,6	0,287	15,5	
P3	3,02	60,0	0,209	8,8	
P4	3,02	61,5	0,145	2,5	
[NA][NIK]	1,10	53,6	0,434	40,8	106,2
[NA][PABA]	0,90	53,6	0,335	2,39	119,3
DFC-Na	16,98	77,0	0,101	0,01	52,2

Tabela A29. Temperatura topnienia oraz wydajność salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1–S7).

Związek	Wydajność (%)	Temperatura topnienia ($^{\circ}\text{C}$)	Zawartość wody (%)	Zawartość bromków (ppm)
S1	90 ^a	111-112	2,203	6 842
S2	85 ^a	78-80	2,582	8 491
S3	86 ^a	98-99	0,539	4 570
S4	88 ^a	99-100	0,808	3 263
S5	78 ^a	117-118	0,812	2 905
S6	82 ^a	84-86	0,663	7 536
S7	87 ^a	108-109	1,694	8 249
[NA][SAL]	99	140-142	0,259	-
NA	-	128-130	1,124	-
SAL	-	160-161	0,779	-

^a po dwóch etapach reakcji



Rysunek A63. Porównanie widm ^1H NMR salicylanu *N*-decylonikotynamidu (**S5**) i substancji referencyjnych: kokryształu nikotynamidu i kwasu salicylowego (**[NA][SAL]**), nikotynamidu (**NA**) i kwasu salicylowego (**SAL**).

Komentarz: W widmach ^1H NMR salicylanu *N*-decylonikotynamidu (**S5**) i substancji odniesienia: salicylanu nikotynamidu (**[NA][SAL]**), nikotynamidu (**NA**) i kwasu salicylowego (**SAL**) możemy zauważyć, że sygnały w widmie związku **S5** przesuwają się względem substratów, co potwierdza jego jonową naturę i brak wiązań jonowych w strukturze kokryształu. Należy zwrócić uwagę na pojawienie się sygnałów z łańcucha alkilowego (1–4) w zakresie od 0,8 do 4,7 ppm, co powoduje istotne zmiany wartości przesunięcia chemicznego związku. Sygnały w **NA** (8–12) występują w zakresie od 7,5 do 9,7 ppm, ze znaczącymi przesunięciami w stosunku do salicylanu *N*-decylonikotynamidu w kierunku wyższych wartości przesunięć chemicznych, dochodzącymi do 0,7 ppm. Sygnały dla **SAL** (5–7) pojawiają się w zakresie 6,6–7,7 ppm i przesuwają się w kierunku niższych wartości w produkcie **S5**. Na widmie ^1H NMR **[NA][SAL]** nie obserwuje się istotnych zmian w położeniu ani charakterze sygnałów w porównaniu z widmami jego indywidualnych składników. Oznacza to, że oddziaływania pomiędzy komponentami mają charakter wyłącznie wiązań wodorowych i nie dochodzi do przeniesienia protonu.

Tabela A30. Współczynnik podziału oktanol–woda ($\log K_{ow}$) wyznaczony dla analizowanych związków oraz odpowiadające mu odchylenie standardowe (SD).

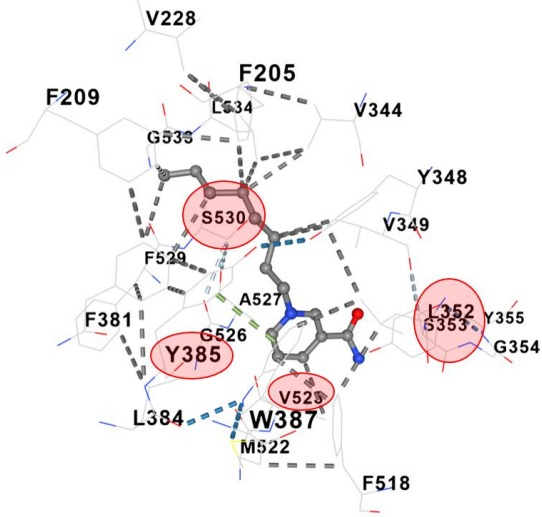
Związek	$\log K_{ow}$	SD
S1	-1,15	0,25
S2	-0,70	0,15
S3	-0,18	0,06
S4	0,07	0,13
S5	0,59	0,14
S6	0,60	0,06
S7	1,34	0,06
[NA][SAL]	-0,35/0,93 ^a	0,10/0,10
NA	-0,66	0,08
SAL	1,82	0,14

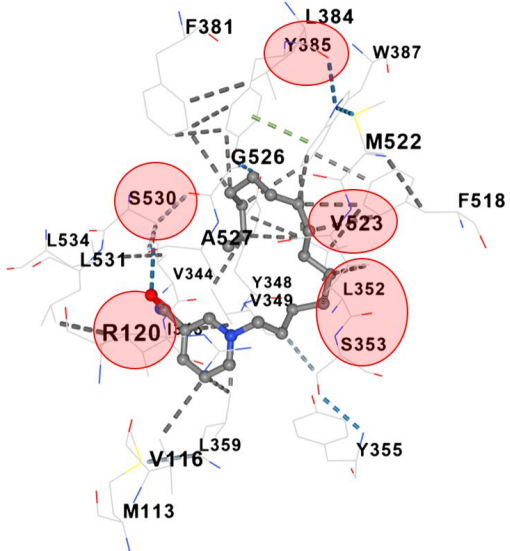
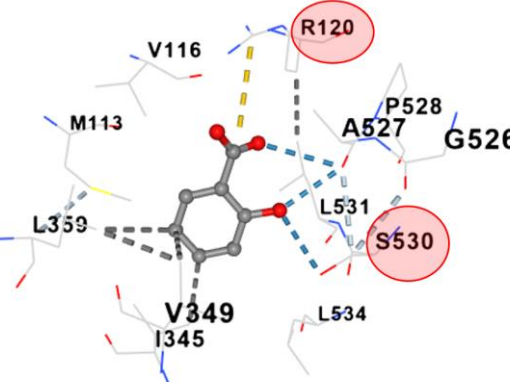
^a wartości podane osobno dla części nikotynamidu (**NA**) i oddzielnie dla części kwasu salicylowego (**SAL**).

Tabela A31. Inhibicja denaturacji albuminy: potencjał przeciwzapalny otrzymanych związków i substancji odniesienia (diklofenaku sodowego (DFC-Na)).

Związek	Stężenie (μg/mL)	Inhibicja denaturacji (%)	Związek	Stężenie (μg/mL)	Inhibicja denaturacji (%)
S1	0,1	42,4±0,7	NA	0,1	31,2±0,8
	1	44,4±0,3		1	49,1±1,1
	10	45,9±1,2		10	44,5±0,6
	100	44,1±1,1		100	42,2±0,2
	1000	42,6±2,9		1000	37,8±0,5
S2	0,1	46,9±0,7	SAL	0,1	43,7±0,9
	1	50,1±0,4		1	45,5±1,1
	10	48,5±1,6		10	50,4±2,6
	100	46,3±0,7		100	41,1±0,2
	1000	43,0±0,9		1000	0,0±0,0
S3	0,1	40,5±0,2	[NA][SAL]	0,1	35,1±0,6
	1	42,3±0,9		1	42,5±0,5
	10	48,2±0,7		10	41,7±1,1
	100	45,7±0,1		100	27,1±0,8
	1000	41,8±0,4		1000	14,6±3,7
S4	0,01	41,1±0,1			
	0,1	43,7±0,3			
	1	44,0±0,5			
	10	49,5±0,1			
	100	50,6±1,7			
S5	1000	31,0±0,4			
	0,001	31,4±0,3			
	0,01	33,5±0,8			
	0,1	34,8±0,6			
	1	46,3±0,3			
	10	51,6±0,9			
	100	41,5±0,6			
S6	1000	7,2±1,8			
	0,001	32,6±0,1			
	0,01	36,1±0,8			
	0,1	38,0±1,3			
	1	49,3±0,5			
	10	44,8±0,9			
	100	34,2±0,9			
S7	1000	0,0±0,0			
	0,001	42,2±0,9			
	0,01	45,2±0,2			
	0,1	47,2±0,9			
	1	53,1±0,1			
	10	50,1±1,0			
	100	31,7±0,6			
DFC-Na	1000	0,0±0,0			
	0,001	39,6±2,5			
	0,01	41,6±2,2			
	0,1	44,1±2,0			
	1	44,8±0,1			
	10	45,6±1,7			
	100	45,9±1,7			
	1000	49,5±1,5			

Tabela A32. Dokowanie molekularne typu blind do enzymu COX-2, przedstawiające główne kieszenie wiążące, wartości *Vina score* oraz lokalizację kluczowych reszt katalitycznych dla salicylanów *N*-alkilnikotynamidu i związków referencyjnych.

Dokowanie molekularne typu blind (kluczowe reszty katalityczne zaznaczono na czerwono)	Vina score	Objętość kieszeni (Å ³)	Środek (x. y. z)	Pole dokowania (x. y. z)
Kation salicylanu <i>N</i>-etylnikotynamidu (S1) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,9	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kation salicylanu <i>N</i>-butylnikotynamidu (S2) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-6,5	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kation salicylanu <i>N</i>-heksylnikotynamidu (S3) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-6,5	5150	24, 17, 50	28, 31, 20
Kation salicylanu <i>N</i>-oktylnikotynamidu (S4)  Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,0	5150	24, 17, 50	28, 31, 22
Kation salicylanu <i>N</i>-decylnikotynamidu (S5) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-6,8	5150	24, 17, 50	28, 31, 22
Kation salicylanu <i>N</i>-dodecylnikotynamidu (S6) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,6	5150	24, 17, 50	27, 27, 27

Kation salicylanu <i>N</i>-tetradecylonikotynamidu (S7)  Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałość katalityczna S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,9	5150	24, 17, 50	28, 28, 28
Anion salicylanowy w S1-S7  Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałość katalityczna S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,9	5150	24, 17, 50	28, 31, 25

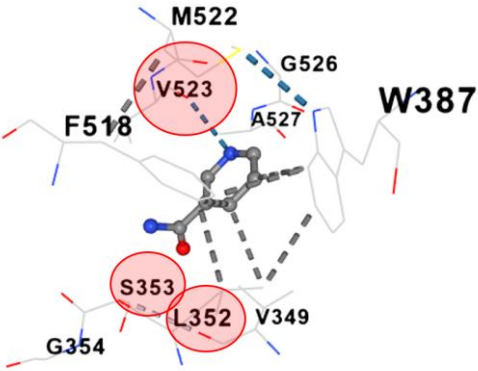
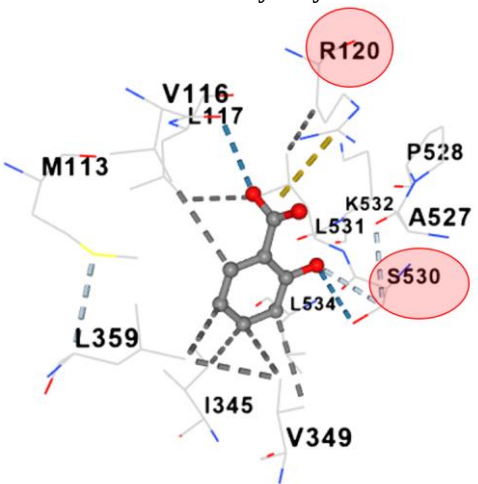
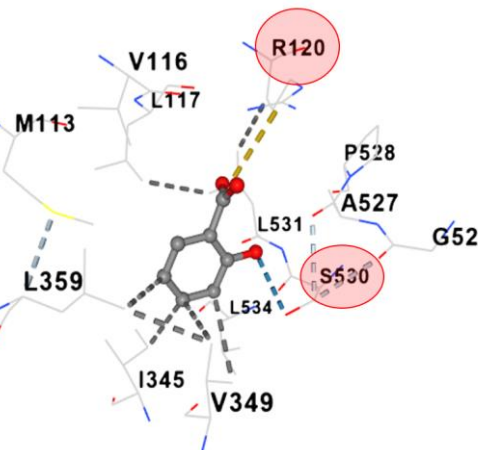
Nikotynamid  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,4	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kwas salicylowy  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,9	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kwas salicylowy w [NA][SAL]  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,8	5150	24, 17, 50	28, 31, 25

Tabela A33. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1–S7) i substancji odniesienia: [NA][SAL], NA i SAL, obliczona jako MIC i MBC/MFC.

Związek	Mikroorganizm									
	<i>C. acnes</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>C. albicans</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC ^a	MBC ^a	MIC ^a	MBC ^a	MIC ^a	MFC ^a	MIC ^a	MBC ^a	MIC ^a	MBC ^a
S1	— ^b	— ^b	4096	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	1024	— ^b
S2	— ^b	— ^b	2048	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	1024	— ^b
S3	— ^b	— ^b	4096	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	2048	— ^b
S4	— ^b	— ^b	2048	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	1024	— ^b
S5	1024	1024	256	256	— ^b	— ^b	1024	— ^b	256	256
S6	64	64	256	256	256	256	256	256	8	8
S7	4	4	4	4	16	16	64	64	0,5	0,5
[NA][SAL]	— ^b	— ^b	2048	2048	2048	— ^b	2048	— ^b	2048	2048
NA	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b
SAL	1024	4096	1024	1024	2048	2048	2048	4096	1024	1024

^a w mg/L; ^b MIC/MBC/MFC poza zasięgiem badania

Tabela A34. Ilość badanych związków (S5–S7) wraz z substancjami referencyjnymi w teście SKIN-PAMPA określona po 6 godzinach.

Związek	Ilość związku [%]		
	Komora akceptorowa	Komora donorowa	Retencja
S5	9,2±0,1 c*	74,3±2,0 c	16,5±1,0 c
S6	23,5±1,3 a	1,0±0,1 e	76,5±4,0 a
S7	24,6±0,1 a	1,0±0,1 e	74,4±4,1 a
[NA][SAL]	3,2±0,2 d	95,6±1,3 d	1,2±0,2 e
NA	9,2±0,8 c	87,5±1,2 b	3,3±0,2 d
SAL	18,3±1,2 b	54,0±2,4 a	27,7±0,9 b

*Te same litery oznaczają brak różnic statystycznych

Tabela A35. Ilość badanych związków (S5–S7) wraz z substancjami referencyjnymi w teście SKIN-PAMPA określona po 24 godzinach.

Związek	Ilość związku [%]		
	Komora akceptorowa	Komora donorowa	Retencja
S5	23,6±0,3 b*	71,5±1,7 c	4,9±0,2 c
S6	26,2±0,4 a	1,0±0,1 a	72,8±0,9 a
S7	26,4±0,1 a	1,0±0,1 a	72,6±1,1 a
[NA][SAL]	6,9±0,4 d	90,5±0,8 b	2,6±0,6 c
NA	21,8±0,5 b	50,7±0,5 d	27,5±0,6 b
SAL	18,4±0,8 c	50,5±1,7 d	31,1±0,9 b

*Te same litery oznaczają brak różnic statystycznych

Tabela A36. Współczynniki przepuszczalności skóry dla salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1–S7) i substancji odniesienia.

Związek	Kp (cm/h)
	Potts i Guy (·10 ⁶)
S1	4,84
S2	6,81
S3	10,7
S4	10,9
S5	17,2
S6	11,8
S7	26,7
[NA][SAL] – NA	26,5
[NA][SAL] – SAL	215
NA	111
SAL	5 120

^a wartości podane oddzielnie dla nikotynamidu (NA) – powyżej i dla kwasu salicylowego (SAL) – poniżej

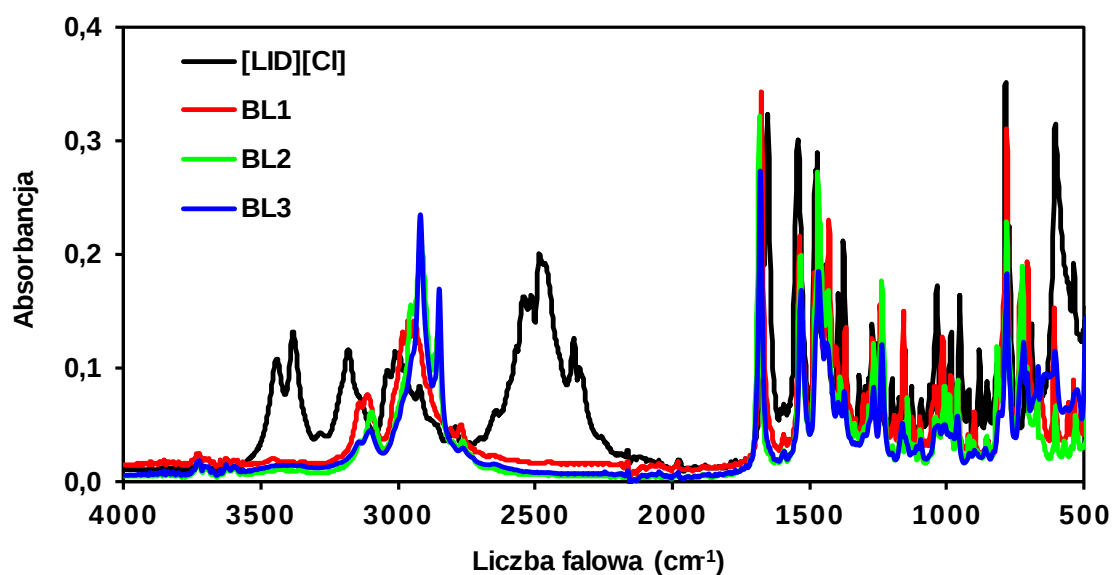
Tabela A37. Kąt zwilżenia (°) salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1-S7) i substancji odniesienia w wybranych stężeniach.

Związek	Stężenie [%]				
	0,01	0,03	0,25	0,50	1,00
S1	-	-	112,1	110,3	109,7
S2	-	-	102,7	104,3	103,9
S3	-	-	107,0	103,4	98,51
S4	-	-	94,1	79,0	61,2
S5	-	-	50,7	- ^a	- ^a
S6	-	99,3 ^b	-	-	-
S7	106,1 ^b	-	-	-	-
[NA][SAL]	-	-	110,5	108,3	99,9
NA	-	-	112,7	110,7	110,6
SAL	-	-	104,9	- ^a	- ^a

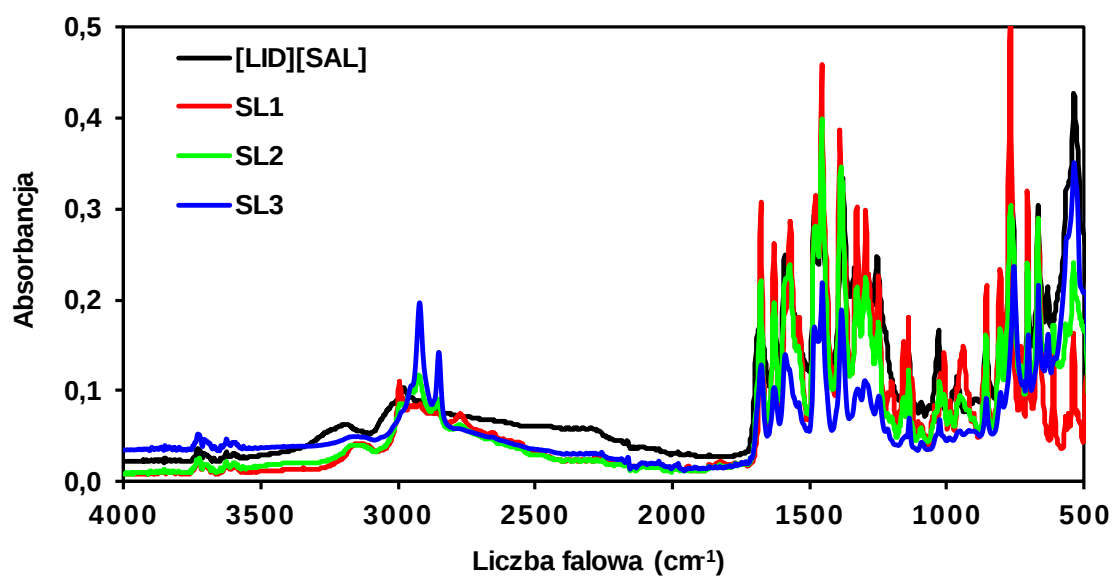
^a ze względu na ograniczoną rozpuszczalność substancji w wodzie nie było możliwe przeprowadzenie testu; ^b stężenia dla S6 i S7 wybrano na podstawie ich skutecznej dawki oszacowanej po analizie testów MIC/MBC/MFC

Tabela A38. Rozpuszczalność w PBS mierzona dla salicylanów *N*-alkilonikotynamidu (S1-S7) oraz substancji odniesienia.

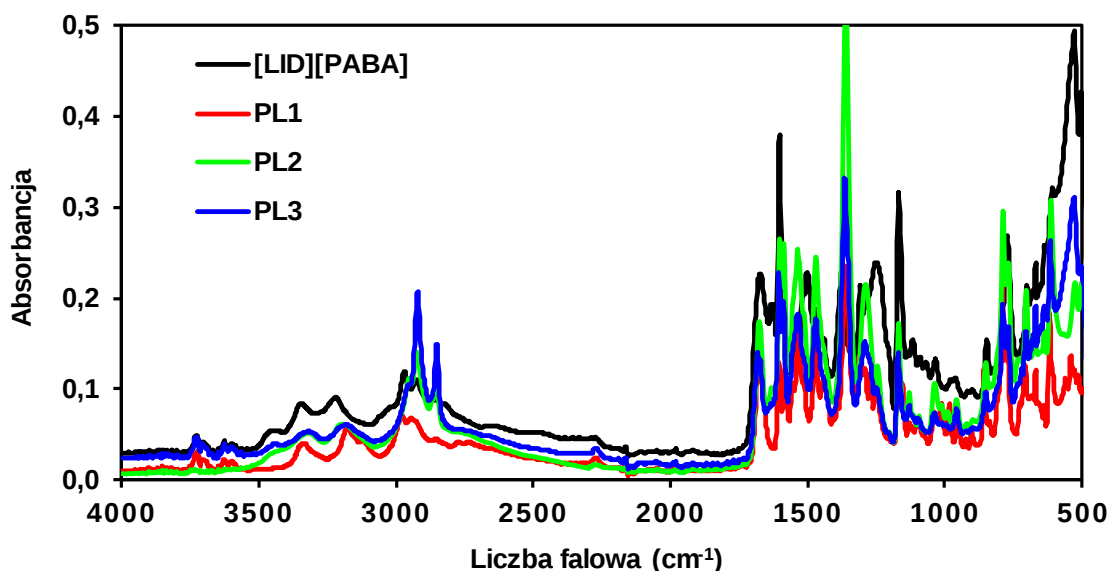
Związek	PBS [mL]	Klasa rozpuszczalności
S1	<1	Bardzo rozpuszczalny
S2	<1	Bardzo rozpuszczalny
S3	<1	Bardzo rozpuszczalny
S4	10-30	Rozpuszczalny
S5	100-1000	Słabo rozpuszczalny
S6	1000-10 000	Bardzo słabo rozpuszczalny
S7	1000-10 000	Bardzo słabo rozpuszczalny
[NA][SAL]	30-100	Słabo rozpuszczalny
NA	<1	Bardzo rozpuszczalny
SAL	100-1000	Słabo rozpuszczalny



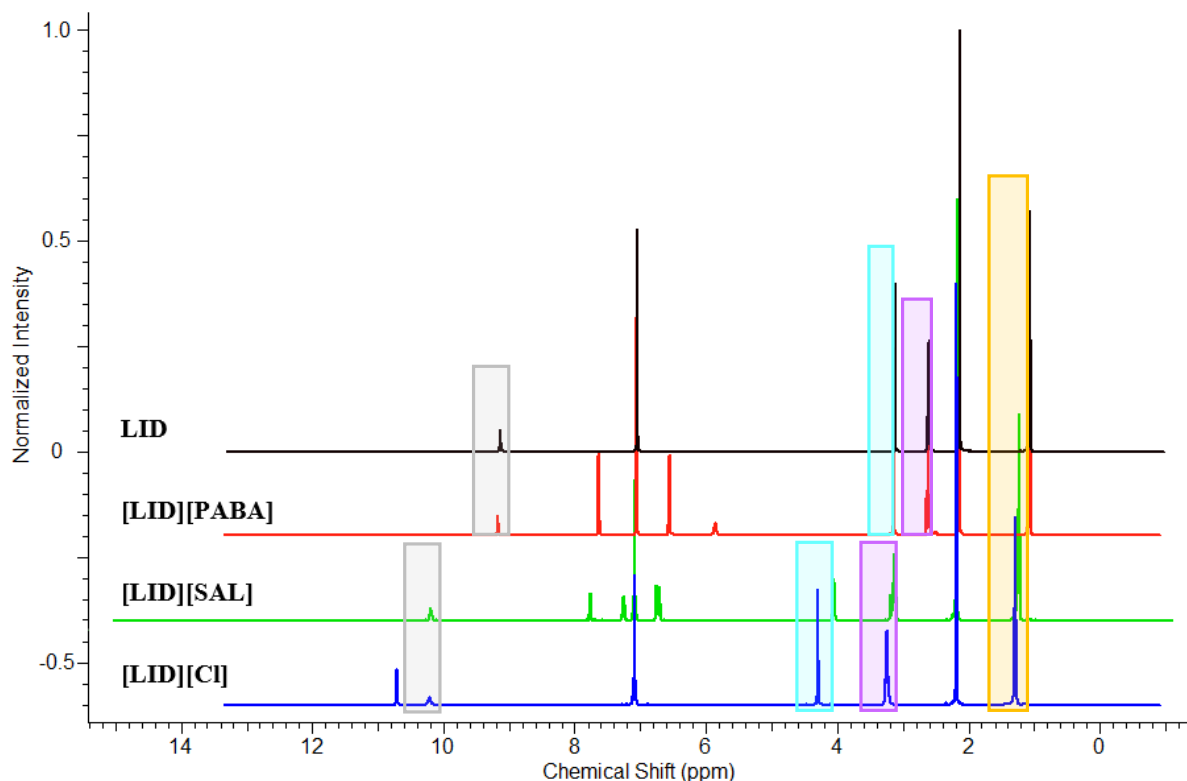
Rysunek A64. Porównanie widm FT-IR chlorowodoru lidokainy ([LID][Cl]) i czwartorzędowych bromków lidokainy (BL1–BL3).



Rysunek A65. Porównanie widm FT-IR protonowej cieczy jonowej ([LID][SAL]) i czwartorzędowych salicylanów lidokainy (SL–SL3).



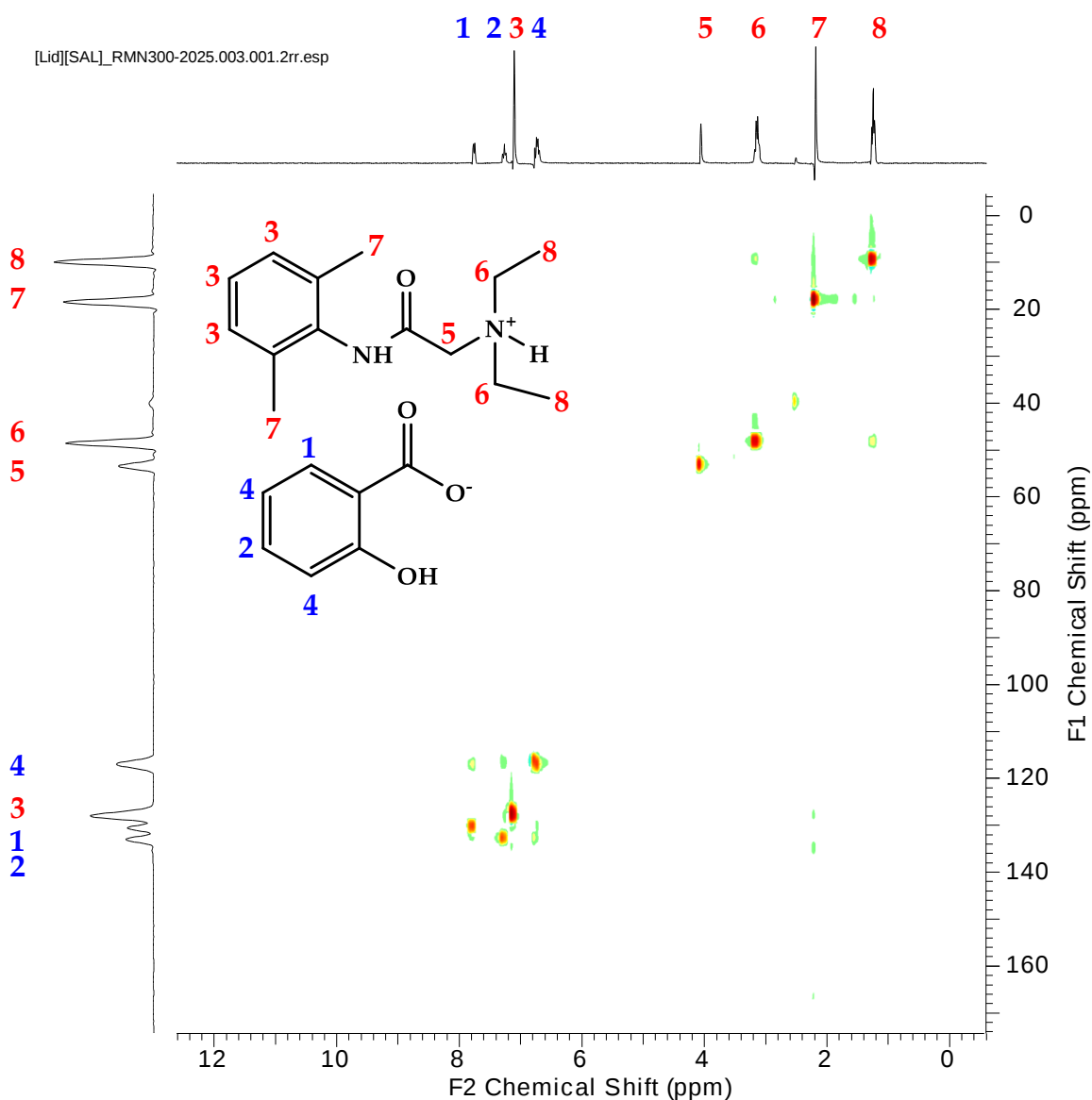
Rysunek A66. Porównanie widm FT-IR mieszaniny eutektycznej ([LID][PABA]) i czwartorzędowych *p*-aminobenzoesanów lidokainy (PL1–PL3).



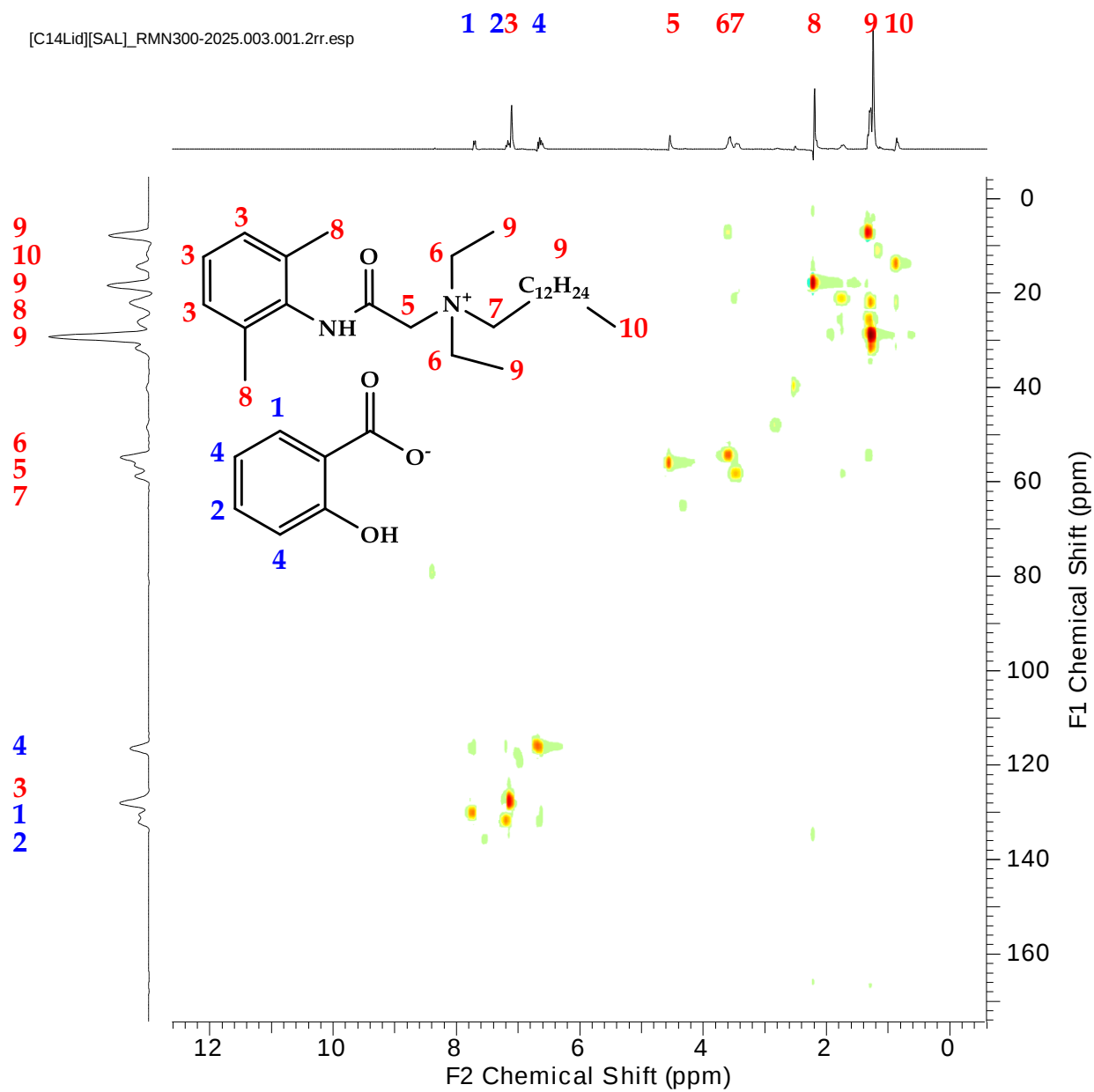
Rysunek A67. Różnice w widmach ^1H NMR pomiędzy lidokainą (LID), chlorowodorkiem lidokainy ([LID][Cl]) a układami uzyskanymi w wyniku zmieszania lidokainy z odpowiednimi kwasami: [LID][SAL] i [LID][PABA]. Z widm usunięto sygnały rozpuszczalników.

Komentarz: Porównanie widm ^1H NMR układu [LID][PABA] i czystej lidokainy (LID), w których nie występują wiązania jonowe, ujawniło brak różnic w położeniach sygnałów pochodzących od poszczególnych atomów wodoru. W analizowanych widmach sygnały pochodzące od protonów w grupie metylowej (**strefa pomarańczowa**: $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) oraz metylenowej (**strefa fioletowa**: $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) obserwowano przy tych samych wartościach przesunięcia chemicznego w zakresie

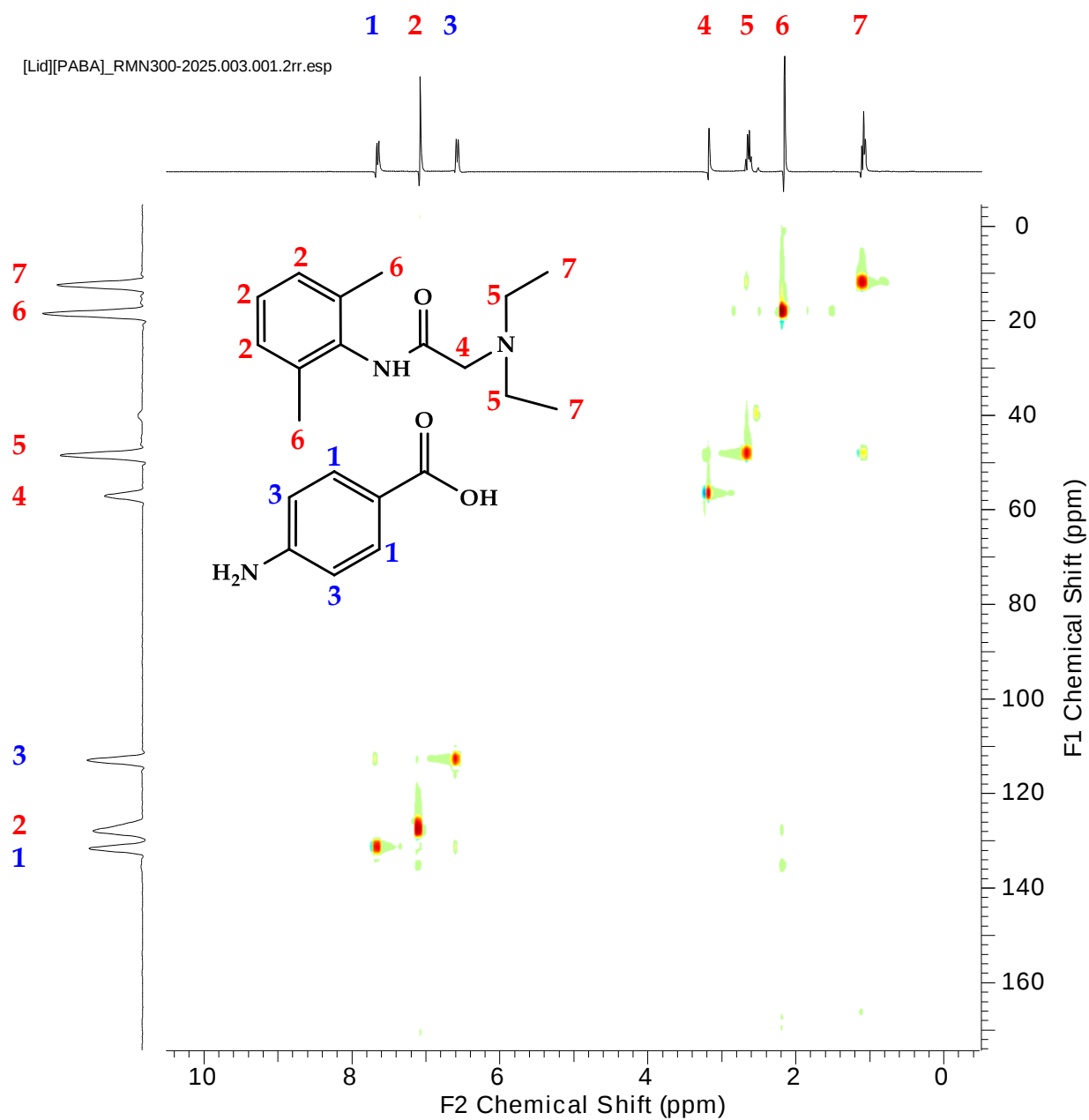
1-3 ppm. Analogicznie, tę samą lokalizację protonów z drugiej grupy metylenowej (**strefa cyjanowa**: N-CH₂-CO) przy około 3 ppm i amidowej (**strefa szara**: NH-CO) przy około 9 ppm można uznać za komplementarne. Dane te dowodzą, że [LID][PABA] występuje w postaci niesprotonowanej mieszaniny eutektycznej. Natomiast, widmo [LID][SAL] jest znacznie bardziej podobne do widma chlorowodoru lidokainy [LID][Cl], co wskazuje na jego naturę jonową. W konsekwencji sygnały pochodzące od protonów w grupach metylowej (**strefa pomarańczowa**: -N-CH₂-CH₃) i metylenowej (**strefa fioletowa**: -N-CH₂-CH₃) zaobserwowano przy nieco większych wartościach przesunięcia chemicznego (odpowiednio ok. 1,3 i 3,3 ppm). Protony od drugiej grupy metylenowej (**strefa cyjanowa**: N-CH₂-CO) występowały przy zauważalnie większej wartości przesunięcia chemicznego (ok. 4 ppm). Ponadto protonowanie lidokainy powodowało przesunięcie sygnału pochodzącego od protonu z grupy amidowej (**strefa szara**: NH-CO) o około 1 ppm, który pojawił się przy około 10 ppm.



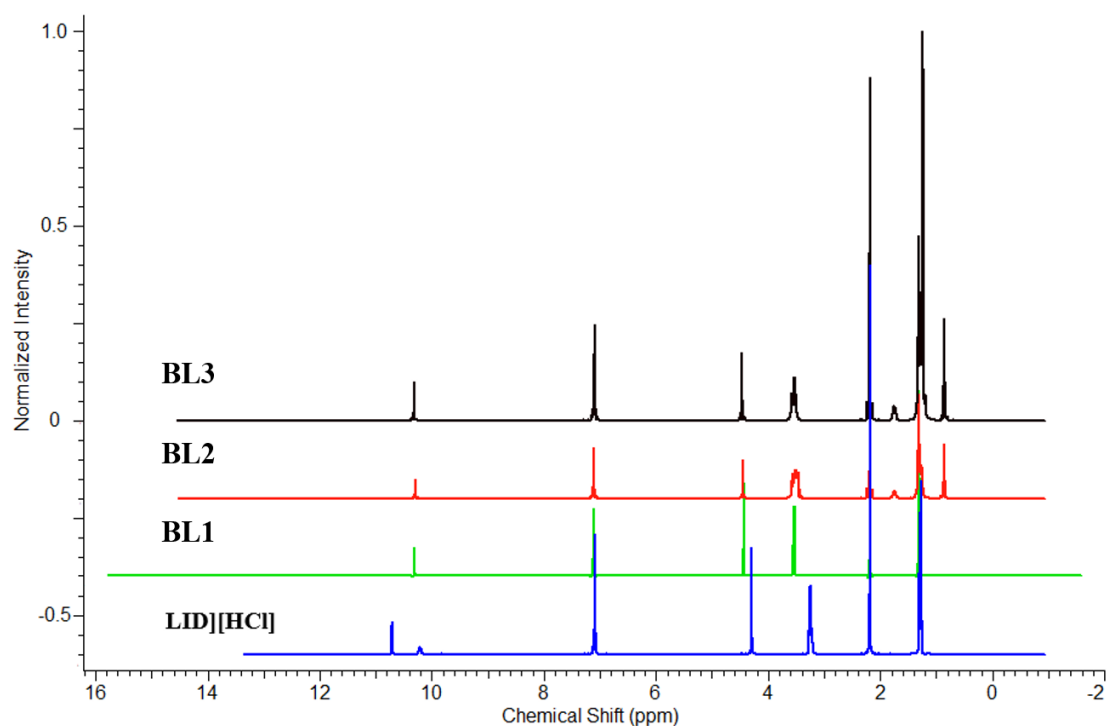
Rysunek A68. Widmo 2D HSQC ¹H-¹³C NMR salicylanu lidokainy ([LID][SAL]).



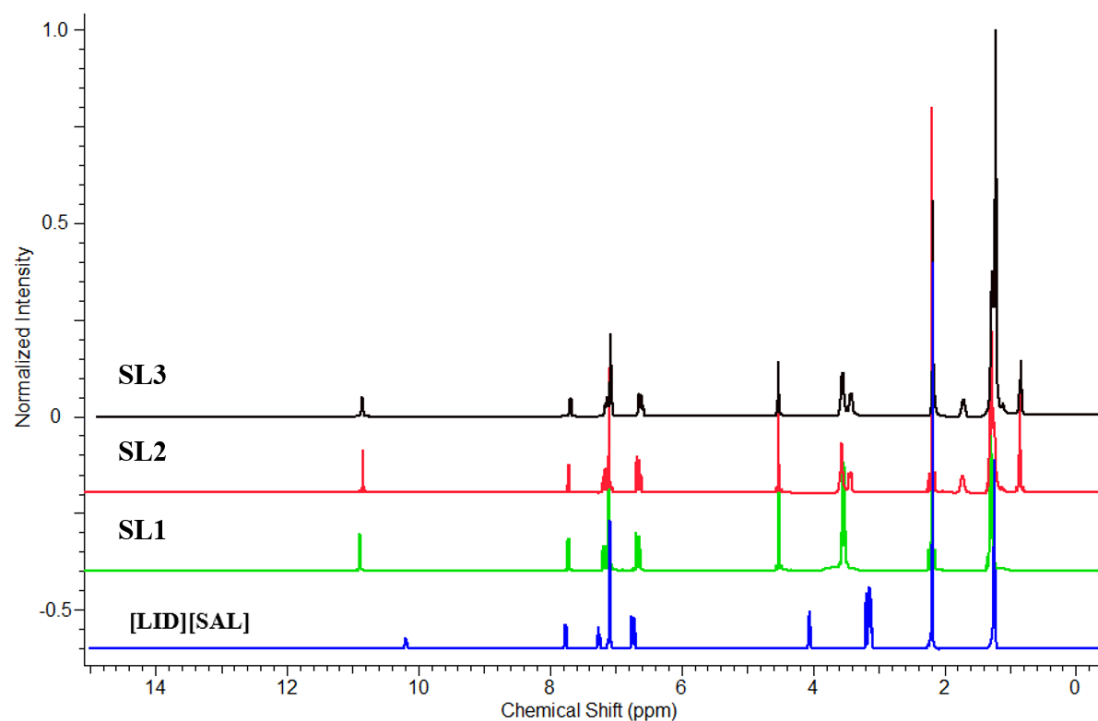
Rysunek A69. Widmo 2D HSQC ^1H - ^{13}C NMR salicylanu *N*-tetradecylolidokainy (SL3).



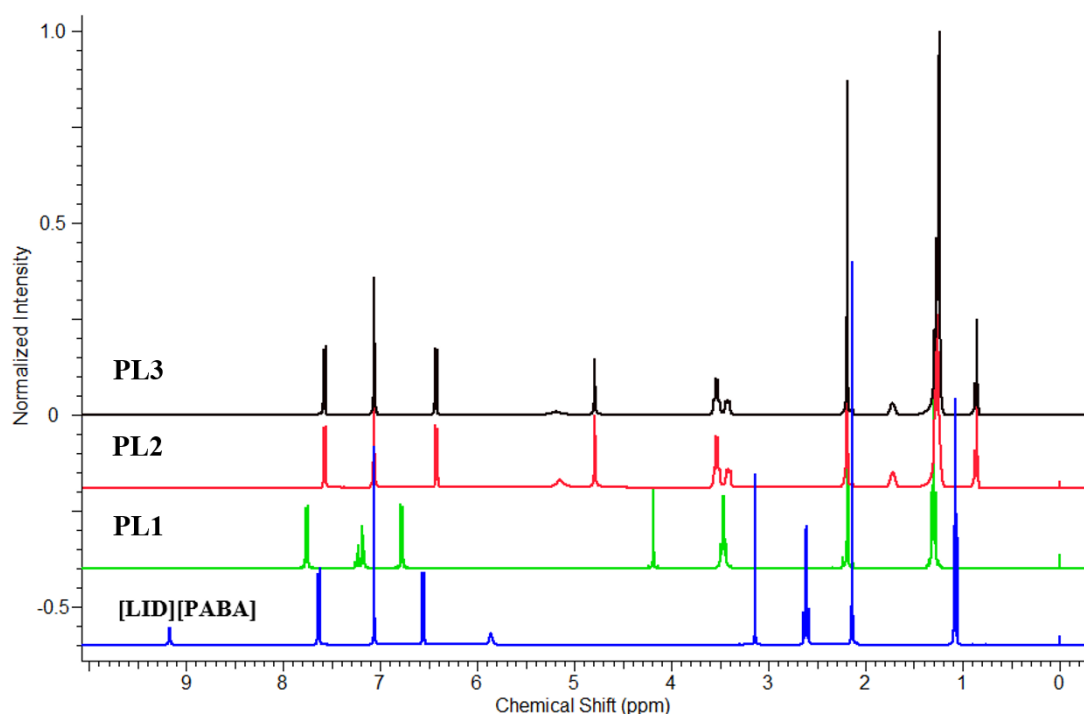
Rysunek A70. Widmo 2D HSQC ¹H-¹³C NMR mieszaniny lidokainy i kwasu *p*-aminobenzoesowego ([LID][PABA]).



Rysunek A71. Porównanie widm ^1H NMR chlorowodoru lidokainy ([LID][Cl]) i czwartorzędowych bromków lidokainy (BL1–BL3). Z widm usunięto sygnały rozpuszczalników.



Rysunek A72. Porównanie widm ^1H NMR protonowej cieczy jonowej ([LID][SAL]) i czwartorzędowych salicylanów lidokainy (SL–SL3). Z widm usunięto sygnały rozpuszczalników.



Rysunek A73. Porównanie widm ^1H NMR mieszaniny eutektycznej ([LID][PABA]) i czwartorzędowych *p*-aminobenzoesanów lidokainy (PL1–PL3). Sygnały rozpuszczalników zostały usunięte z widm.

Komentarz: Związek **PL2** został przeanalizowany w D_2O jako rozpuszczalniku, co wykazało znaczne przesunięcia w położeniu poszczególnych sygnałów (w szczególności protonów w grupie metylenowej ($\text{CO}-\text{CH}_2-\text{N}$), a także protonów w pierścieniach aromatycznych) w porównaniu z $\text{DMSO}-d_6$.

Tabela A39. Zawartość wody oraz bromków w otrzymanych pochodnych lidokainy.

Związek	Zawartość wody (% w/w)					Zawartość bromków (ppm)
	0 dni ^a	1 dzień ^a	2 dni ^a	3 dni ^a	7 dni ^a	
[LID][Cl]	7,39	7,40	7,41	7,43	7,48	-
BL1	0,60	0,66	0,73	0,81	0,95	-
BL2	0,72	0,79	0,79	0,86	0,91	-
BL3	0,86	0,87	0,88	0,90	0,96	-
[LID][SAL]	1,10	1,10	1,13	1,18	1,48	-
SL1	0,73	0,73	0,75	0,78	0,80	3 568 ^b /2 431 ^c
SL2	1,57	1,57	1,71	1,74	1,92	4 985 ^b /3 398 ^c
SL3	1,11	1,12	1,12	1,13	1,13	4 288 ^b /2 999 ^c
[LID][PABA]	2,01	2,03	2,04	2,10	2,40	-
PL1	0,93	0,93	0,94	0,98	1,03	5 489 ^b /-
PL2	2,53	2,59	2,59	2,64	2,68	4 976 ^b /-
PL3	1,26	1,26	1,27	1,27	1,28	5 489 ^b /-

^a po przechowywaniu w otoczeniu powietrza (25 °C; 60% wilgotności względnej); ^b wartość dla reakcji zobojętniania; ^c wartość dla reakcji wymiany anionu

Tabela A40. Wartości współczynnika podziału oktanol–woda (log K_{ow}) dla otrzymanych związków i odpowiadające im odchylenie standardowe (SD).

Związek	log K _{ow}	SD
[LID][Cl]	-1,62	0,04
BL1	-1,70	0,03
BL2	0,59	0,01
BL3	1,26	0,03
[LID][SAL]	-0,06	0,01
SL1	-0,20	0,01
SL2	1,73	0,04
SL3	2,08	0,07
[LID][PABA]	-0,14	0,01
PL1	-1,26	0,04
PL2	0,41	0,03
PL3	1,00	0,04

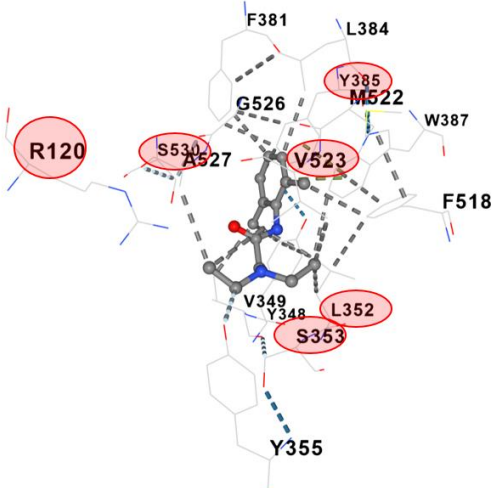
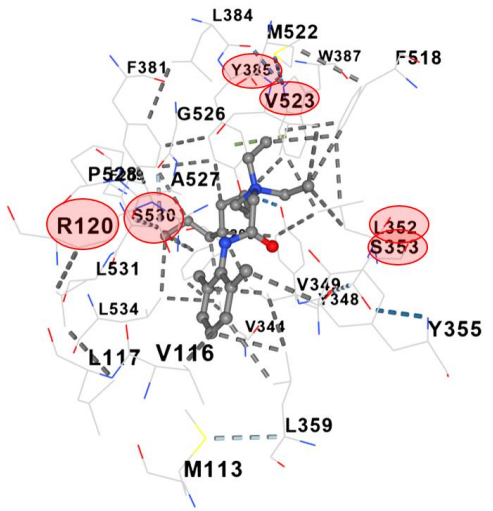
Tabela A41. Rozpuszczalność badanych związków.

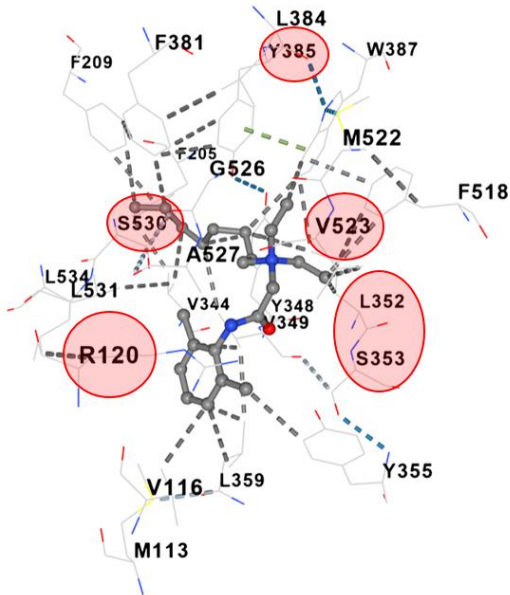
Związek	Część rozpuszczalnika (mL) wymagana na 1 g substancji rozpuszczonej	
	Woda (pH = 6,0)	PBS (pH = 7,4)
[LID][Cl]	0,1 -1	0,1 -1
BL1	1-10	1-10
BL2	10-30	30-100
BL3	10-30	100-1000
[LID][SAL]	1-10	10-30
SL1	10-30	10-30
SL2	1000-10000	1000-10000
SL3	>10000	>10000
[LID][PABA]	1-10	1-10
PL1	1-10	1-10
PL2	1-10	10-30
PL3	1-10	100-1000

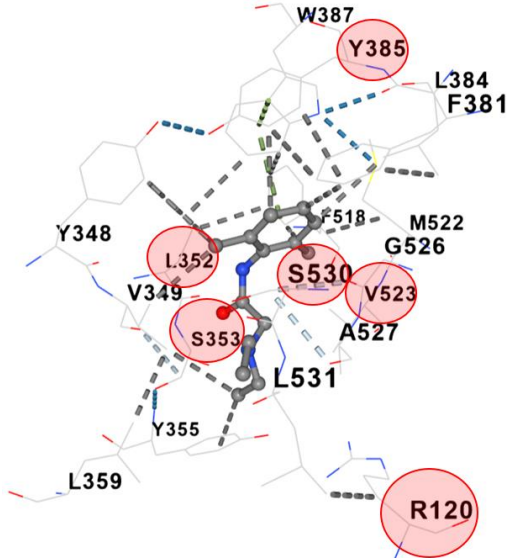
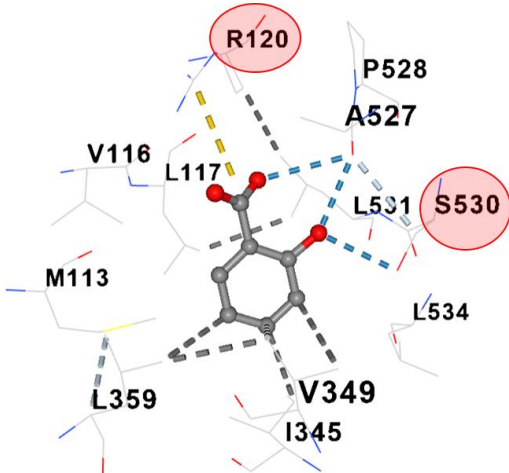
Tabela A42. Działanie przeciwzapalne zastosowanych związków i związku odniesienia: diklofenaku sodowego (DFC-Na).

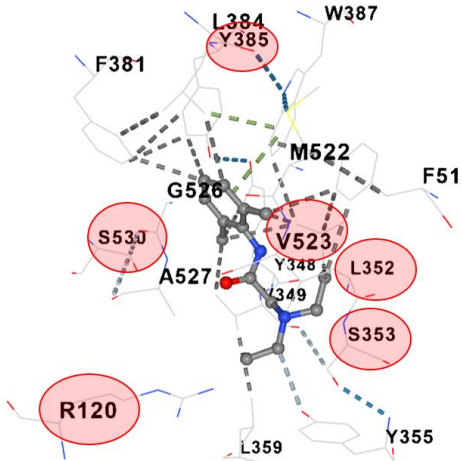
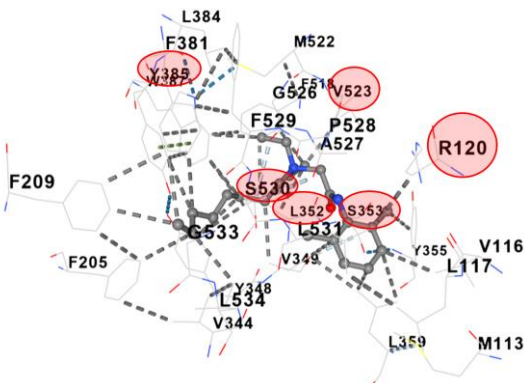
Związek	Stężenie [μg/mL]	Procent inhibicji [%]	Związek	Stężenie [μg/mL]	Procent inhibicji [%]
SL1	0,1	38,2±1,8	PL1	0,1	25,5±0,7
	1	47,3±1,3		1	46,3±0,4
	10	51,9±1,4		10	42,0±1,4
	100	47,6±1,4		100	37,5±0,8
	1000	44,8±0,8		1000	15,9±1,2
SL2	0,01	41,4±0,7	PL2	0,01	34,0±0,5
	0,1	46,7±0,9		0,1	40,6±0,3
	1	47,4±0,6		1	48,6±1,6
	10	59,1±2,9		10	45,2±1,3
	100	41,7±1,2		100	33,5±1,8
SL3	1000	9,5±3,9	PL3	1000	0,0±0
	0,001	12,7±1,3		0,001	43,8±1,2
	0,01	50,8±1,0		0,01	54,6±0,3
	0,1	46,6±0,7		0,1	58,9±1,4
	1	43,1±1,5		1	48,5±0,2
[LID][SAL]	10	31,1±0,8	[LID][PABA]	10	42,5±0,6
	100	0,0±0		100	29,2±0,6
	1000	brak *		1000	3,6±1,4
	0,001	43,4±0,3		0,001	36,4±0,9
	0,01	45,3±0,5		0,01	40,7±0,2
[LID][PABA]	0,1	54,1±0,1	[LID][CI]	0,1	44,0±0,6
	1	49,7±0,9		1	48,3±0,9
	10	46,9±0,8		10	49,0±0,2
	100	45,5±1,2		100	41,4±1,4
	1000	22,3±0,8		1000	24,2±1,7
BL1	0,1	43,5±0,2	* brak rozpuszczalności		
	1	49,4±0,8			
	10	45,7±0,7			
	100	40,1±1,0			
	1000	37,3±0,4			
BL2	0,01	36,9±0,3	BL3	0,01	43,8±0,7
	0,1	48,0±1,4		0,1	46,5±1,6
	1	51,6±0,2		0,1	48,6±0,6
	10	41,9±0,9		1	51,2±0,9
	100	36,9±1		10	45,8±1,1
BL3	1000	25,5±1,6	DFC-Na	100	29,9±1
	0,001	43,8±0,7		0,001	41,8±0,2
	0,01	46,5±1,6		0,01	45,8±0,3
	0,1	48,6±0,6		0,1	49,3±0,6
	1	51,2±0,9		1	51,4±0,2
[LID][CI]	10	45,8±1,1	DFC-Na	10	48,7±0,4
	100	29,9±1		100	41,7±0,7
	0,001	41,8±0,2		1000	16,3±2,3
	0,01	45,8±0,3		0,001	36,8±0,8
	0,1	49,3±0,6		0,01	43,0±0,9
DFC-Na	1	51,4±0,2		0,1	45,2±0,9
	10	48,7±0,4		1	45,6±0,8
	100	41,7±0,7		10	49,3±1,0
	1000	16,3±2,3		100	48,6±0,1
	0,001	36,8±0,8		1000	46,6±0,3

Tabela A43. Dokowanie molekularne typu blind do enzymu COX-2, przedstawiające główne kieszenie wiążące, wartości *Vina score* oraz lokalizację kluczowych reszt katalitycznych dla pochodnych lidokainy i związków referencyjnych.

Dokowanie molekularne typu blind (kluczowe reszty katalityczne zaznaczono na czerwono)	Vina score	Objętość kieszeni (Å ³)	Środek (x. y. z)	Pole dokowania (x. y. z)
Kation w chlorowodorku lidokainy [LID][Cl]  Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,2	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kation w bromku N-etylidokainy (BL1) Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-6,8	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kation w bromku N-oktylidokainy (BL2)  Kieszeń C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-8,0	5150	24, 17, 50	28, 31, 25

Kation w bromku <i>N</i>-tetradecylolidokainy (BL3) Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałość katalityczna S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-8,9	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kation w salicylanie <i>N</i>-etylolidokainy (SL1) Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałość katalityczna S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,3	5150	24, 17, 50	28, 31, 20
Kation w salicylanie <i>N</i>-oktylolidokainy (SL2)  Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałość katalityczna S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,5	5150	24, 17, 50	28, 31, 22
Kation w salicylanie <i>N</i>-tetradecylolidokainy (SL3) Kieszkań C1: R120, Y385, S530 - Główna pozostałość katalityczna S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-8,2	5150	24, 17, 50	25, 31, 25

Lidokaina w [LID][SAL]  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-6,9	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Anion salicylowy w QAS SL1-SL3 i [LID][SAL]  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,9	5150	24, 17, 50	28, 31, 25

Lidokaina w [LID][PABA]  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,0	5150	24, 17, 50	28, 31, 20
Kation w <i>p</i>-aminobenzoesanie <i>N</i>-etylolidokainy (PL1) Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-6,6	5150	24, 17, 50	28, 31, 20
Kation w <i>p</i>-aminobenzoesanie <i>N</i>-oktylolidokainy (PL2)  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-8,2	5150	24, 17, 50	26, 26, 26
Kation w <i>p</i>-aminobenzoesanie <i>N</i>-tetrade cylidokainy (PL3) Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-7,0	5150	24, 17, 50	26, 26, 26

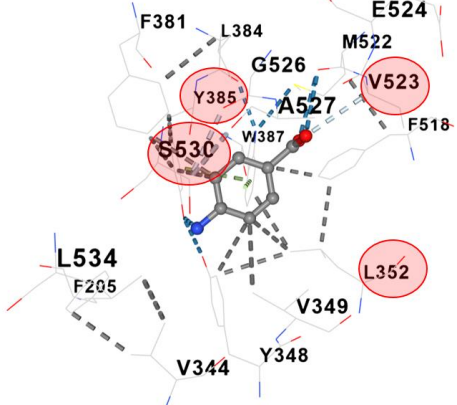
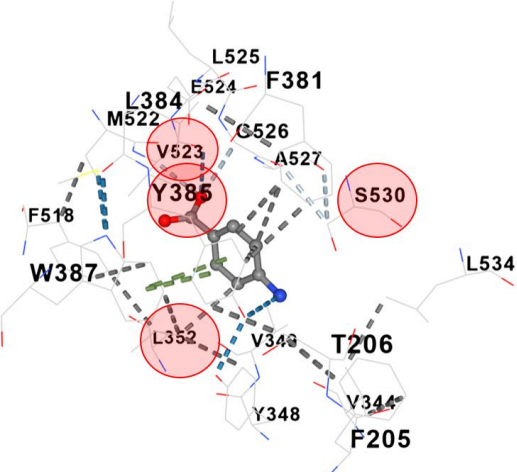
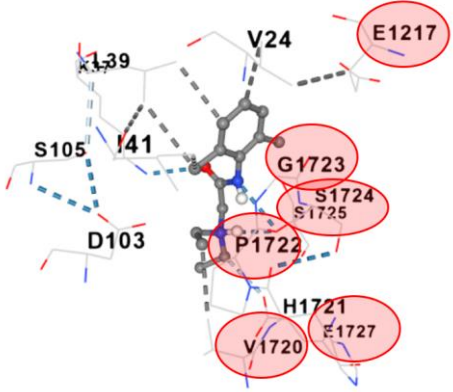
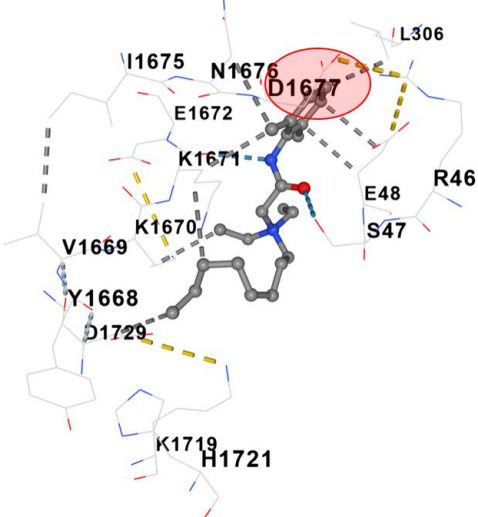
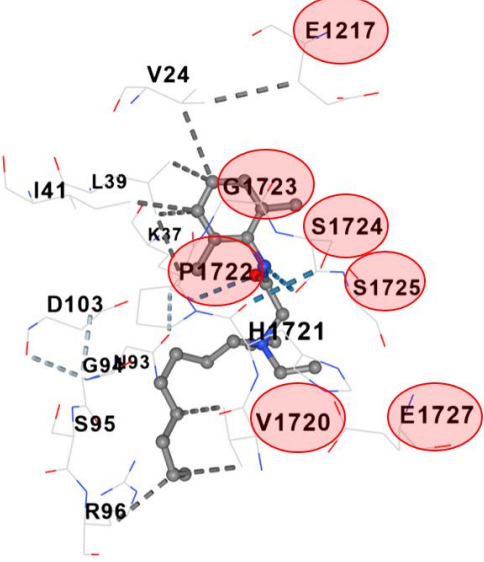
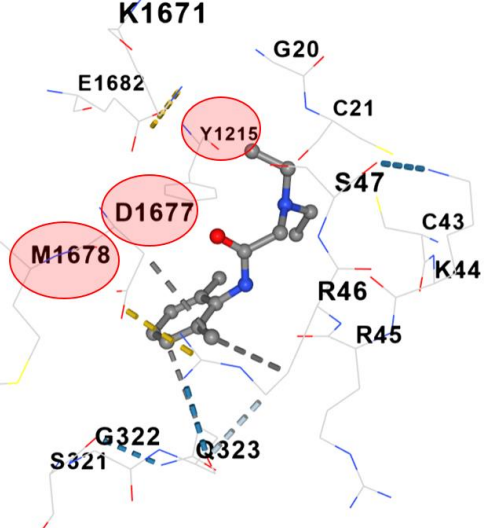
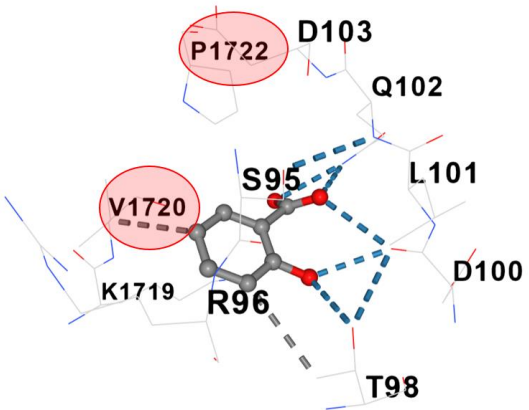
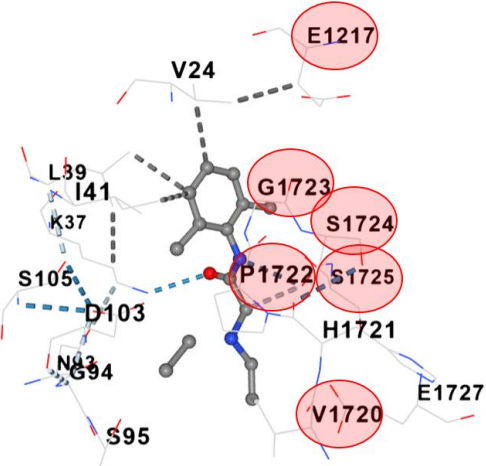
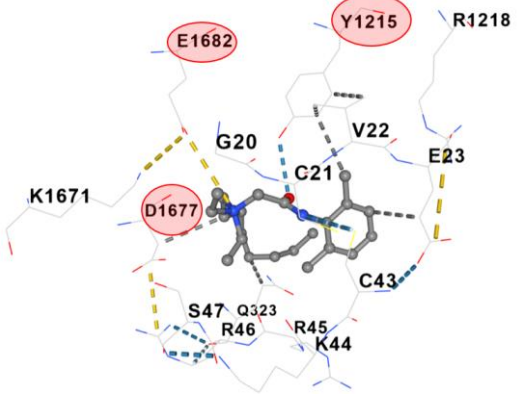
Anion <i>p</i>-aminobenzoesowyw QAS PL1-PL3  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-5,9	5150	24, 17, 50	28, 31, 25
Kwas <i>p</i>-aminobenzoesowy  Kieszon C1: R120, Y385, S530 - Główne pozostałości katalityczne S353, V523, L352 - Przyczynia się do stabilizacji i selektywności	-6,0	5150	24, 17, 50	28, 31, 25

Tabela A44. Dokowanie molekularne do kanałów sodowych NaV1.7, przedstawiające główne kieszenie wiążące, wartości *Vina score* oraz lokalizację kluczowych reszt katalitycznych dla pochodnych lidokainy i związków referencyjnych.

Dokowanie molekularne typu blind (kluczowe reszty katalityczne zaznaczono na czerwono)	Wynik Vina	Objętość kieszeni (Å ³)	Środek (x. y. z)	Pole dokowania (x. y. z)
Kation w chlorowodorku lidokainy [LID][Cl]  Kieszeń C1: E1727, E1217, G1723, S1724, P1722, S1725	-5,5	3508	205, 194, 241	26, 35, 20
Kation w bromku N-etylolidokainy (BL1) Kieszeń C1: E1727, E1217, G1723, S1724, P1722, S1725	-5,4	3508	205, 194, 241	26, 35, 20
Kation w bromku N-oktylolidokainy (BL2)  Kieszeń C1: D1677	-5,1	3508	205, 194, 241	23, 35, 23
Kation w bromku N-tetradecyloolidokainy (BL3) Kieszeń C1: E1217	-5,4	3508	205, 194, 241	27, 35, 27
Kation w salicylanie N-etylolidokainy (SL1) Kieszeń C1: Y1215, D1677, E1628, M1678, T319, N1686, N1680	-5,1	3508	205, 194, 241	26, 35, 20

Kation w salicylanie <i>N</i>-oktylolidokainy (SL2)  Kieszon C1: E1727, E1217, G1723, S1724, P1722, S1725, V1720	-5,2	3508	205, 194, 241	22, 35, 22
Kation w salicylanie <i>N</i>-tetradecylolidokainy (SL3) Kieszon C1: Y1215, D1677, E1628, M1678, T319	-4,8	3508	205, 194, 241	27, 35, 27
Lidokaina w [LID][SAL]  Kieszon C1: Y1215, D1677, M1678	-4,9	3508	205, 194, 241	26, 35, 20

Anion salicylowy w QAS SL1-SL3 i [LID][SAL]  Kieszkań C1: P1722, V1720	-4,9	3508	205, 194, 241	26, 35, 22
Lidokaina w [LID][PABA]  Kieszkań C1: E1217, G1723, S1724, P1722, S1725, V1720	-6,8	3508	205, 194, 241	26, 35, 20
Kation w <i>p</i>-aminobenzoesanie <i>N</i>-etylolidokainy (PL1) Kieszkań C1: Y1215, D1677, E1628, N1680	-5,2	3508	205, 194, 241	26, 35, 20
Kation w <i>p</i>-aminobenzoesanie <i>N</i>-oktylolidokainy (PL2)  Kieszkań C1: Y1215, D1677, E1628	-5,3	3508	205, 194, 241	22, 35, 22
Kation w <i>p</i>-aminobenzoesanie <i>N</i>-tetradecyloidokainy (PL3)	-5,0	3508	205, 194, 241	24, 35, 24

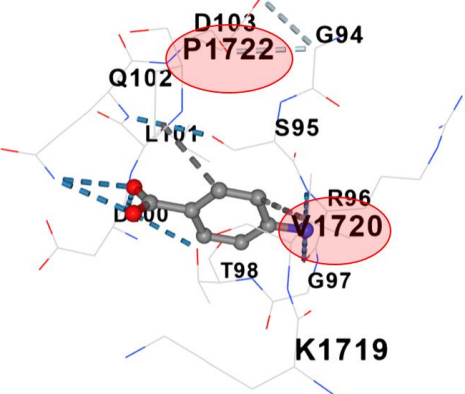
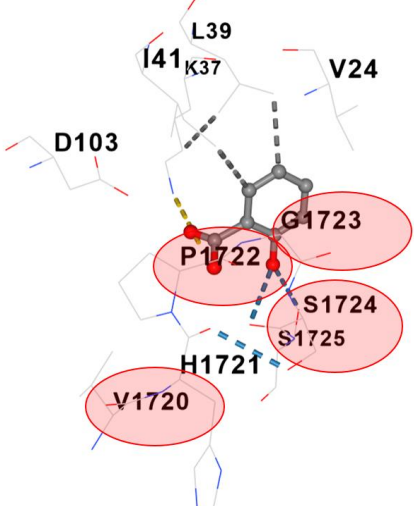
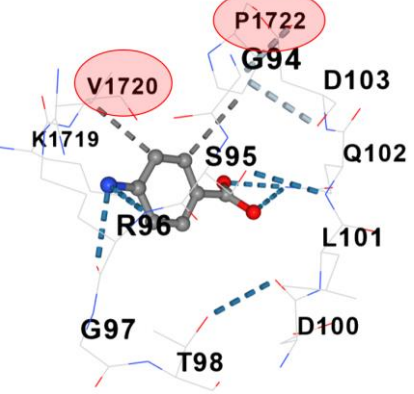
Kieszon C1: Y1215, D1677				
Anion <i>p</i>-aminobenzoesowyw QAS PL1-PL3  Kieszon C1: P1722, V1720	-4,9	3508	205, 194, 241	26, 35, 17
Kwas salicylowy  Kieszon C1: G1723, S1724, P1722, S1725, V1720	-5,0	3508	205, 194, 241	26, 35, 22
Kwas <i>p</i>-aminobenzoesowy  Kieszon C1: P1722, V1720	-5,1	3508	205, 194, 241	26, 35, 17

Tabela A45. Ilość badanych pochodnych lidokainy wraz z substancjami referencyjnymi w teście PAMPA określona po 6 godzinach.

Związek	Ilość związku [%]		
	Komora akceptorowa	Komora donorowa	Retencja
[LID]CI]	3, 9±0,9 b*	82,1±0,8 d	14,0±1,0 c
SL1	0,0±0,1 d	97,9±0,1 ab	2,1±0,1 e
SL2	0,0±0,2 d	100,0±2,5 a	0,0±0,1 f
SL3	0,0±0,1 d	0,0±0,1 e	100,0±2,8 a
[LID][SAL]	0,0±0,1 d	100,0±1,5 a	0,0±0,1 f
PL1	0,0±0,3 d	100,0±1,8 a	0,0±0,1 f
PL2	0,0±0,2 d	96±0,9 b	4,0±5 d
PL3	34,1±1,4 a	0,0±0,2 e	65,9±2,4 b
[LID][PABA]	2,6±0,2 c	94,2±0,4 c	3,2±0,3 d

* te same litery oznaczają brak różnic statystycznych

Tabela A46. Ilość badanych pochodnych lidokainy wraz z substancjami referencyjnymi w teście PAMPA określona po 24 godzinach.

Związek	Ilość związku [%]		
	Komora akceptorowa	Komora donorowa	Retencja
[LID]CI]	19,6±0,5 c*	25,3±0,8 d	55,2±3,0 c
SL1	28,0±0,2 b	44,3±0,1 c	27,7±1,1 d
SL2	3,9±0,6 d	96,2±1,6 a	0,0±0,1 g
SL3	18,6±0,5 c	0,0±0,1 e	81,4±2,7 a
[LID][SAL]	2,3±0,1 d	97,7±1,6 a	0,0±0,1 g
PL1	0,0±0,1 e	95,8±0,3 a	4,2±1,1 f
PL2	1,9±0,1 d	80,8±2,0 b	17,3±1,3 e
PL3	33,8±0,4 a	0,0±0,1 e	66,2±3,2 b
[LID][PABA]	4,2±0,4 d	95,8±0,1 a	0,0±0,1 g

* te same litery oznaczają brak różnic statystycznych

Publikacje

1. A. Olejniczak, W. Stachowiak, T. Rzemieniecki, M. Niemczak, *Adjustment of the Structure of the Simplest Amino Acid Present in Nature-Glycine, toward More Environmentally Friendly Ionic Forms of Phenoxypropionate-Based Herbicides*, International Journal of Molecular Science, 24, 2, 1360, (2023).
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms24021360>
2. A. Nowacka, A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Comprehensive Ecotoxicity Studies on Quaternary Ammonium Salts Synthesized from Vitamin B₃ Supported by QSAR Calculations*, Plants, 12, 914, (2023).
<http://dx.doi.org/10.3390/plants12040914>
3. M. Niemczak, T. Rzemieniecki, D. K. Kaczmarek, A. Olejniczak, W. Stachowiak, *Does the method of combining individual components affect the structure of heteroconjugated oligomeric ionic liquids?*, Journal of Molecular Liquids, 393, 123608-1-123608-7, (2024).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123608>
4. J. Homa, W. Stachowiak, A. Olejniczak, Ł. Chrzanowski, M. Niemczak, *Ecotoxicity studies reveal that organic cations in dicamba-derived ionic liquids can pose a greater environmental risk than the herbicide itself*, Science of The Total Environment, 922, 171062-1 - 171062-13 (2024).
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171062>
5. M. Wysocki, W. Stachowiak, M. Smolibowski, A. Olejniczak, M. Niemczak, J. L. Shamshina, *Rethinking the Esterquats: Synthesis, Stability, Ecotoxicity and Applications of Esterquats Incorporating Analogs of Betaine or Choline as the Cation in Their Structure*, International Journal of Molecular Sciences, 25, 11, 5761 (2024).
<https://doi.org/10.3390/ijms25115761>
6. A. Olejniczak, W. Stachowiak, D. Ziental, J. Długaszewska, T. Rzemieniecki, M. Wysokowski, T. Jesionowski, M. Niemczak, *Unraveling the Potential of Vitamin B₃-Derived Salts with a Salicylate Anion as Dermal Active Agents for Acne Treatment*, Molecular Pharmaceutics, 21, 9, 4634–4647, (2024).
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.4c00543>
7. W. Stachowiak, A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, M. Smolibowski, M. Wysokowski, T. Jesionowski, A. Mezzetta, L. Guazzelli, M. Niemczak, *Mono- and Dicationic Quaternary Ammonium Salts from Glycine Betaine: Are They Less Ecotoxic Than Currently Applied*

- Commercial Cationic Surfactants?*, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 12, 50, 18187–18199 (2024).
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c07208>
8. A. Olejniczak, M. Niemczak, D. Gwiazdowska, K. Juś, A. Mezzetta, L. Guazzelli, D. K. Kaczmarek, *From Plant Material to Environmentally Friendly Plant Growth Stimulators: Betaine-Based Ionic Liquids*, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 13, 42, 17825–17836 (2025).
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5c04882>
 9. A. Olejniczak, M. G. Freire, M. Niemczak, *Structure–Permeability Relationships of Vitamin-B-Based Quaternary Ammonium Salts for Oral Drug Development*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, numer w nadaniu.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2026.115100>
 10. W. Stachowiak, D. K. Kaczmarek, M. Grzanka, T. Rzemieniecki, A. Olejniczak, Ł. Sobiech, M. Niemczak, *Evaluation of Quaternary Ammonium Salts Derived from Glycine Betaine as New Herbicidal Agents*, Pest Management Science – publikacja w recenzji
 11. A. Olejniczak, D. Gwiazdowska, K. Juś, A. Olejnik, M. G. Freire M. Niemczak, *Quaternary ammonium salts derived from Vitamin B as multifunctional (anti-inflammatory and antimicrobial) therapeutic agents*, Journal of Drug Delivery Science and Technology – publikacja w recenzji
 12. M. Niemczak, A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, Ł. Ławniczak, D. Tavares, M. Oliveira, M. C. Neves, M. G. Freire, *Lidocaine-Based Quaternary Ammonium Salts with Salicylate and p-Aminobenzoate Anions as Multifunctional and Sustainable Local Drugs* – publikacja w przygotowaniu

Monografie

1. A. Olejniczak, W. Stachowiak, D. K. Kaczmarek, M. Niemczak, *Synteza i właściwości cieczy jonowych z kationem alkilodimetyloglicyny i anionem 4-chloro-2-metylofenoksyoctanowym*, Postępy w technologii i inżynierii chemicznej. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2022, s. 111-120.
2. W. Stachowiak, A. Olejniczak, D. Kaczmarek, M. Wojcieszak, M. Niemczak, *Estrokwaty amoniowe zbudowane z surowców pochodzenia naturalnego – synteza, analiza spektralna i właściwości*, Postępy w technologii i inżynierii chemicznej. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2022, s. 148-163.

3. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, T. Rzemieniecki, T. Klejdysz, „*Słodkie ciecze jonowe*” z kationem alkilodimetyloglicyny i anionem acesulfamu jako substancje hamujące żerowanie owadów magazynowych, *Postępy w technologii i inżynierii chemicznej*. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2023, s. 92-102.
4. P. Jarzyna, A. Olejniczak, W. Stachowiak, T. Rzemieniecki, M. Niemczak, *Synteza czwartorzędowych soli amoniowych z kationem karnityny zawierających w swojej strukturze wiązanie estrowe*, *Postępy w technologii i inżynierii chemicznej*. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2023, s. 103-116.
5. W. Stachowiak, A. Olejniczak, M. Niemczak, T. Rzemieniecki, *Ciecze jonowe z kationem typu alkilobetainy i anionem 3,6-dichloropikolinianowym – synteza i charakterystyka*, *Postępy w technologii i inżynierii chemicznej*. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2023, s. 156-166.
6. A. Olejniczak, M. Wojcieszak, M. Niemczak, Damian K. Kaczmarek, *Bisamoniowe ciecze jonowe z anionem indolilo-3-maślanowym jako stymulatory wzrostu roślin*, *Postępy w technologii i inżynierii chemicznej*. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2023, s. 24-25.
7. P. Frąckowiak, A. Olejniczak, M. Wysokowski, D. K. Kaczmarek, T. Rzemieniecki, M. Niemczak, *Synteza i charakterystyka cieczy jonowych z anionem farmaceutycznym*, *Postępy w technologii i inżynierii chemicznej*. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2024, s. 56-71.
8. T. Rzemieniecki, A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, M. Niemczak, *Aktywne biologicznie estrokwaty z kationem pochodzącym od L-karnityny*, *Postępy w technologii i inżynierii chemicznej*. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2024, s. 99-111.
9. T. Rzemieniecki, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Ekotoksyczność estrów betainy glicynowej – ocena predykcyjna in silico oraz eksperymentalna*, *Postępy w technologii i inżynierii chemicznej*. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo

Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2025, s. 85-98.

10. M. Niemczak, A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, *Synteza i charakterystyka nowych estrokwatów bisamoniowych otrzymanych z betainy karnitynowej*, Postępy w technologii i inżynierii chemicznej. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2025, s. 39-50.
11. A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, M. Niemczak, *Analiza fizykochemiczna i ekotoksyczność komercyjnych surfaktantów jonowych w porównaniu z surfaktantem betainowym*, Postępy w technologii i inżynierii chemicznej. red Z. Lendzion-Bieluń, D. Moszyński – Szczecin, Polska, Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, 2025, s. 65-84.

Uzyskane patenty krajowe

1. A. Olejniczak, M. Niemczak, W. Stachowiak, *Kompozycja ukorzeniacza roślin jednoliściennych oraz zastosowanie bromków betainianów alkilowych jako ukorzeniacze roślin jednoliściennych*, **PL245148** (12.07.2022)
2. A. Olejniczak, M. Niemczak, W. Stachowiak, *Kompozycja ukorzeniacza roślin jednoliściennych oraz zastosowanie soli bis- amoniowych jako ukorzeniacze roślin jednoliściennych*, **PL245149** (12.07.2022)
3. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, M. Wysocki, *Nowe czwartorzędowe bromki amoniowe z kationem 2-(4-chloro-2-metylofenoksyacetyloksyalkoksy)-2-oksoetylo-N,N,N-trimetyloamoniowym, sposób ich otrzymywania i zastosowanie jako herbicydy*, **PL246758** (03.03.2025)
4. A. Olejniczak, W. Stachowiak, T. Rzemieniecki, D. Kaczmarek, A. Jacek, M. Niemczak, *Sposób otrzymywania czwartorzędowych soli amoniowych z kationem 3-karbamoilo-1-alkilopirydyniowym i anionem salicylanowym*, **PL246761** (03.03.2025)
5. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, M. Wysocki, G. Dudczak, *Nowe czwartorzędowe sole amoniowe z kationem pochodzącym od lidokainy i anionem 2-pirośluzanowym, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako środki bakteriostatyczne i bakteriobójcze*, **PL246762** (03.03.2025)
6. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, P. Jarzyna, A. Hałas, *Nowe ciecze jonowe z kationem 2-(4-chloro-2-metylofenoksyacetyloksyalkoksy)-2-oksoetylo-N,N,N-trimetyloamoniowym i anionem 4-chloro-2-metylofenoksyoctanowym, sposób ich otrzymywania i zastosowanie jako herbicydy*, **PL247038** (25.04.2025)

7. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, P. Jarzyna, M. Karmasz, *Nowe ciecze jonowe z kationem 2-(4-chloro-2-metylofenoksyacetyloksyalkoksy)-2-oksoetylo-N,N,N-trimetyloamoniowym i anionem 3,6-dichloro-2-metoksybenzoesanowym oraz sposób ich otrzymywania i zastosowanie jako herbicydy*, **PL247037** (25.04.2025)
8. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, M. Karmasz, A. Hałas, *Nowe amoniowe ciecze jonowe z kationem 2-(4-chloro-2-metylofenoksyacetyloksyalkoksy)-2-oksoetylo-N,N,N-trimetyloamoniowym i anionem 2,4-dichlorofenoksyoctanowym, sposób ich otrzymywania i zastosowanie jako herbicydy*, **PL247039** (25.04.2025)
9. M. Niemczak, T. Rzemieniecki, A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Smolibowski, J. Gajewska, *Nowe ciecze jonowe z kationem betainianu alkilu i anionem florasulamu, sposób ich otrzymywania i zastosowanie jako herbicydy*, **PL247282** (06.06.2025)
10. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, *Nowe czwartorzędowe bromki bis-amoniowe z kationem alkilo-1,ω-bis(trimetylo(karboksymetylo)amoniowym) i anionami bromkowymi sposób otrzymywania oraz zastosowanie*, **PL247335** (13.06.2025)
11. T. Rzemieniecki, D. Kaczmarek, W. Stachowiak, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Czwartorzędowe sole amoniowe z kationem 1-alkilochininy oraz anionem 4-chloro-2-metylofenoksyoctanowym, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako algicydy* - **PL248343** (16.09.2025)
12. T. Rzemieniecki, D. Kaczmarek, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Sposób otrzymywania czwartorzędowych soli amoniowych z kationem 1-alkilochininy oraz anionem 4-chloro-2-metylofenoksyoctanowym*, **PL248344** (16.09.2025)
13. A. Olejniczak, P. Jarzyna, M. Niemczak, *Zastosowanie soli amoniowych zawierających kation L-karnitynianu alkilu oraz anion gentyzynianowy jako ukorzeniace roślin dwuliściennych oraz kompozycja ukorzeniacza roślin dwuliściennych*, **PL248638** (05.01.2026)
14. A. Olejniczak, P. Frąckowiak, M. Wysokowski, M. Niemczak, T. Jesionowski, *Zastosowanie dibromków alkileno-1,ω-bis((3-karboksy-2-hydroksypropylo)trimetyloamoniowych) jako ukorzeniace roślin kapustowatych oraz kompozycja ukorzeniacza roślin kapustowatych*, **PL248639** (05.01.2026)
15. A. Olejniczak, P. Frąckowiak, M. Wysokowski, M. Niemczak, T. Jesionowski, *Zastosowanie dibromków alkileno-1,ω-bis((3-karboksy-2-hydroksypropylo)-trimetyloamoniowych) jako stymulatory wzrostu roślin kapustowatych oraz kompozycja stymulatora roślin kapustowatych*, **PL248640** (05.01.2026)
16. T. Rzemieniecki, A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Czwartorzędowe sole amoniowe zawierające anion 2-furanokarboksylanowy i kation będący alkilową pochodną*

Zgłoszenia patentowe krajowe

1. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, M. Wysocki, *Sposób wydzielania z mieszaniny poreakcyjnej 4-chloro-2-metylofenoksyoctanów n-bromoalkilowych techniką chromatografii typu Flash*, **P.442918** (23.11.2022)
2. M. Niemczak, A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, *Nowe asymetryczne dikationowe ciecze jonowe, zawierające kation butylo-1-tributylofosfoniowo-4-tributyloamoniowy lub oktylo-1-tributylofosfoniowo-8-tributyloamoniowy oraz sposób ich otrzymywania*, **P.443203** (20.12.2022)
3. T. Rzemieniecki, A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Nowe czwartorzędowe sole amoniowe zawierające anion pochodzący od kwasu nikotynowego oraz kation N-alkilnikotynamidowy oraz sposób ich otrzymywania*, **P.444847** (10.05.2023)
4. A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, K. Kanikowska, M. Niemczak, *Nowe czwartorzędowe sole z kationem bis-amoniowym pochodzącym od L- karnityny i anionami bromkowymi oraz sposób ich otrzymywania i zastosowanie jako środki antyelektrostatyczne*, **P.447661** (31.01.2024)
5. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, J. Grudzień, M. Smukała, *Nowa czwartorzędowa pochodna lidokainy z anionem aceklofenaku o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym*, **P.447660** (31.01.2024)
6. A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Nowe czwartorzędowe sole amoniowe zawierające kation L-karnitynianu alkilu oraz anion gentyzynianowy, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako nowe formy antyoksydantów*, **P.447659** (31.01.2024)
7. T. Rzemieniecki, D. Kaczmarek, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Sposób otrzymywania czwartorzędowych soli amoniowych z kationem 1-alkilochininy oraz anionem 4-chloro-2-metylofenoksyoctanowym*, **P.448211** (06.04.2024)
8. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Czwartorzędowe sole amoniowe z kationem 3-karbamoilo-1-alkilopirydyniowym i anionem (R)-migdałanowym, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako substancje o aktywności przeciwbakteryjnej*, **P.450543** (12.12.2024)
9. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Czwartorzędowe sole amoniowe z kationem 3-karbamoilo-1-alkilopirydyniowym i anionem (S)-migdałanowym, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako substancje o aktywności przeciwbakteryjnej*, **P.450544** (12.12.2024)
10. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Czwartorzędowe sole amoniowe zawierające kation 3-karbamoilo-1-alkilopirydyniowy i anion 4-aminobenzoesanowy, sposób ich otrzymywania i zastosowanie jako środki bakteriobójcze*, **P.450542** (12.12.2024)

11. A. Olejniczak, M. Niemczak, D. K. Kaczmarek, *Czwartorzędowe sole amoniowe zawierające kation N-alkilobetainy oraz anion indolo-3-maślanowy, sposób ich otrzymywania i zastosowanie jako stymulatory wzrostu roślin*, **P.450542** (12.12.2024)
12. W. Stachowiak, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Funkcjonalizowane estry kwasu 2-furanokarboksylowego, sposób ich otrzymywania oraz zastosowania jako czynniki alkilujące*, **P.450535** (11.12.2024)
13. W. Stachowiak, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Funkcjonalizowane esterquaty 2-(furanokarboksylalkiloksy)-2-oksoetylo-N,N,N-trimetyloamoniowe, sposób ich otrzymania oraz zastosowanie jako środki antybakteryjne*, **P.450541** (11.12.2024)
14. W. Stachowiak, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Funkcjonalizowane esterquaty L-karnityny i kwasu 2-furanokarboksylowego, sposób ich otrzymania oraz zastosowanie jako substancje antyseptyczne*, **P.450540** (11.12.2024)
15. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych zawierających anion nikotynianowy oraz kation N-alkilonikotynamidowy jako substancje przeciwzapalne o polepszonej przenikalności*, **P.452425** (20.06.2025)
16. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Zastosowanie czwartorzędowych soli amoniowych zawierających kation 1-alkilo-3-karbamoilopirydyniowy i anion 4-aminobenzoesanowy jako substancje przeciwzapalne o polepszonej przenikalności*, **P.452424** (20.06.2025)
17. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Sposób określania właściwości przeciwzapalnych czwartorzędowych soli amoniowych zawierających kation 3-karbamoilo-1-alkilopirydyniowy i anion 4-aminobenzoesanowy z użyciem albuminy jaja kurzego*, **P.452423** (20.06.2025)
18. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Sposób określania właściwości przeciwzapalnych czwartorzędowych soli amoniowych zawierających anion pochodzący od kwasu nikotynowego oraz kation N-alkilonikotynamidowy z użyciem albuminy jaja kurzego*, **P.452422** (20.06.2025)
19. A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, M. Niemczak, *Nowe czwartorzędowe sole bis-amoniowe z kationem alkilo-1,ω-bis(trimetylo(karboksymetylo)amoniowym) i anionami pelargonianowymi, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako środki myjące*, **P.453327** (24.09.2025)
20. A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, M. Niemczak, *Nowe czwartorzędowe sole bis-amoniowe z kationem alkilo-1,ω-bis(trimetylo(karboksymetylo)amoniowym) i anionami piroglutaminianowymi, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako środki piorące*, **P.453328** (24.09.2025)
21. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Nowe czwartorzędowe sole amoniowe z kationem N-alkilolidokainy i anionem p-aminobenzoesanowym, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako algicydy*, **P.455042** (12.03.2026)

22. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Nowe czwartorzędowe sole amoniowe z kationem N-alkilolidokainy i anionem migdalanowym, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako ukorzeniacze roślin dwuliściennych*, **P.455041** (12.03.2026)
23. A. Olejniczak, M. Niemczak, *Nowe czwartorzędowe sole amoniowe z kationem N-alkilolidokainy i anionem salicylanowym, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako środki antyelektrostatyczne*, **P.455040** (12.03.2026)

Wystąpienia ustne na konferencjach krajowych i zagranicznych

1. W. Stachowiak, A. Olejniczak, A. Nowacka, M. Niemczak, *Synteza i analiza ekotoksyczności czwartorzędowych soli amoniowych otrzymanych z witaminy B₃ z użyciem modeli QSAR*, Konferencja Naukowa PUTChemikon, Poznań (6.05.2023)
2. T. Rzemieniecki, W. Stachowiak, D. K. Kaczmarek, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Udoskonalanie efektywności procesu otrzymywania przyjaznych dla środowiska surfaktantów kationowych pochodzących od betainy glicynowej*, VIII Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (16.05.23)
3. W. Stachowiak, A. Olejniczak, A. Nowacka, M. Niemczak, *Synteza i analiza ekotoksyczności czwartorzędowych soli amoniowych otrzymanych z witaminy B₃ - porównanie wyników obliczonych z użyciem modeli QSAR z wynikami eksperymentalnymi*, VIII Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (16.05.23)
4. A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Nowe estrokwaty betainy glicynowej – synteza i charakterystyka*, 2024, II Ogólnopolska Konferencja Naukowa PUTChemikon, Poznań (18.05.2024); **komunikat ustny wygłoszony osobiście**
5. A. Olejniczak, M. Niemczak, *New lidocaine derivatives showing antimicrobial activity as new APIs with low environmental impact*, 2024, 2nd REUNICE Workshop on Multifunctional Materials and Sustainability, Katania, Włochy (3-5.07.2024); **komunikat ustny wygłoszony osobiście**
6. M. Niemczak, T. Rzemieniecki, D. K. Kaczmarek, W. Stachowiak, A. Olejniczak, *Creative management of waste from production of sugar - glycine betaine as the future for the agrochemicals and surfactants market*, 2nd REUNICE Workshop on Multifunctional Materials and Sustainability, Katania, Włochy (3-5.07.2024)
7. A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, T. Rzemieniecki, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Glycine Betaine Alkyl Esters as Promising Agrochemicals for Controlling Growth of Common Weeds*, The 105th CSJ Annual Meeting, Osaka, Japonia (26-29.03.2025); **komunikat ustny wygłoszony osobiście**

8. M. Niemczak, T. Rzemieniecki, D. K. Kaczmarek, W. Stachowiak, A. Olejniczak, *Glycine betaine: a by-product of sugar production process as a promising feedstock for development of novel multifunctional biologically active compounds*, The 105th CSJ Annual Meeting, Osaka, Japonia (26-29.03.2025)
9. T. Rzemieniecki, D. K. Kaczmarek, W. Stachowiak, A. Olejniczak, Michał Niemczak, *From optimized synthesis to controlled degradation – alkyl esters of glycine betaine as low-cost and environmentally friendly alternatives of conventional disinfectants*, The 105th CSJ Annual Meeting, Osaka, Japonia (26-29.03.2025)
10. W. Stachowiak, A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, D. K. Kaczmarek, M. Niemczak, *Esterquats synthesized by O-alkylation of glycine betaine as eco-friendly disinfecting and cleaning agents*, The 105th CSJ Annual Meeting, Osaka, Japonia (26-29.03.2025)
11. A. Olejniczak, D. Gwiazdowska, K. Juś, M. Niemczak, *Potencjał nowych pochodnych witamin z grupy B w leczeniu infekcji i stanów zapalnych*, V Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań (21-22.11.2025) **komunikat ustny wygłoszony osobiście**
12. A. Olejniczak, D. Gwiazdowska, K. Juś, M. Niemczak, *Nowe jonowe i niejonowe pochodne witamin z grupy B o aktywności przeciwzapalnej – analiza przenikalności w teście PAMPA*, XI Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin, 12.05.2026; **Komunikat ustny wygłoszony osobiście i nagrodzony III miejscem**

Wystąpienia posterowe na konferencjach krajowych i zagranicznych

1. A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Estrokwaty betainy glicynowej – właściwości i zastosowanie jako regulatory wzrostu roślin*, V Ogólnopolska Konferencja „Biotechnologia Niejedno Ma Imię”, Poznań (26-27.11.2022); **poster nagrodzony I miejscem**
2. M. Niemczak, A. Olejniczak, W. Stachowiak, *Synteza i charakterystyka estryfikowanych pochodnych betainy zawierających aktywny herbicydowo anion jodosulfuronu metylu*, IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań (03.12.2022)
3. A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Charakterystyka soli amoniowych zawierających w kationie wiązanie estrowe*, IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań (03.12.2022)
4. A. Olejniczak, W. Stachowiak, T. Rzemieniecki, M. Niemczak, *Adjustment of the Structure of the Simplest Amino Acid Present in Nature-Glycine, toward More Environmentally*

- Friendly Ionic Forms of Phenoxypropionate-Based Herbicides*, #RSCPoster Twitter Conference, Wielka Brytania (01-02.03.2023)
5. A. Hałas, A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Properties of Esterified Forms of Betaine Containing Herbicide in the Cation*, #RSCPoster Twitter Conference, Wielka Brytania (01-02.03.2023)
 6. P. Jarzyna, M. Karmasz, M. Niemczak, A. Olejniczak, W. Stachowiak, *Toxicity of Esterified Forms of Carnitine*, 2023 #RSCPoster Twitter Conference, Wielka Brytania (01-02.03.2023)
 7. M. Karmasz, P. Jarzyna, M. Niemczak, A. Olejniczak, W. Stachowiak, *Synthesis and Physicochemical Properties of Esterified Forms of Carnitine*, #RSCPoster Twitter Conference, Wielka Brytania (01-02.03.2023)
 8. A. Olejniczak, W. Stachowiak, T. Rzemieniecki, M. Niemczak, *Modyfikowanie struktury glicyny – najprostszego aminokwasu, w celu uzyskania jonowych form herbicydów*, Konferencja Naukowa PUTChemikon, Poznań (6.05.2023)
 9. A. Olejniczak, W. Stachowiak, T. Rzemieniecki, D. K. Kaczmarek, M. Niemczak, *Synteza i charakterystyka nowych estrokwatów betainy glicynowej*, VIII Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (16.05.23)
 10. A. Olejniczak, M. Wojcieszak, M. Niemczak, D. K. Kaczmarek, *Bis-amoniowe ciecze jonowe z anionem indolilo-3-maślanowym jako stymulatory wzrostu roślin*, VIII Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (16.05.23)
 11. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, T. Rzemieniecki, T. Klejdysz, *„Słodkie ciecze jonowe” z kationem alkilodimetyloglicyny i anionem acesulfamu jako substancje hamujące żerowanie owadów magazynowych*, VIII Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (16.05.23)
 12. A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Quaternary lidocaine derivatives as new APIs showing antimicrobial activity*, 1st International Student Conference on Industrial Pharmacy, Poznań (7-8.12.23)
 13. A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Lidocaine derivatives as new APIs showing antimicrobial activity with low environmental impact*, 2024 #RSCPoster Twitter Conference, Wielka Brytania (05-06.03.2023)
 14. M. Niemczak, W. Stachowiak, A. Olejniczak, D. K. Kaczmarek, Tomasz Rzemieniecki, *Badania nad toksycznością czwartorzędowych soli amoniowych otrzymanych z betainy glicynowej wobec organizmów wodnych*, IX Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (14.05.24)

15. T. Rzemieniecki, D. K. Kaczmarek, A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Spektroskopia 1H NMR jako użyteczna technika określania składu podwójnych cieczy jonowych*, IX Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (14.05.24)
16. W. Stachowiak, A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, D. K. Kaczmarek, M. Wysokowski, T. Jesionowski, A. Mezzetta, L. Guazzelli, M. Niemczak, *Esterquaty otrzymywane z betainy glicynowej jako przyjazne środowisku surfaktanty*, IX Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (14.05.24)
17. A. Olejniczak, T. Rzemieniecki, M. Niemczak, *Betaina glicynowa jako ekologiczny regulator wzrostu roślin: ocena fitotoksyczności jej pochodnych*, X Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin, 13.05.2025
18. D. K. Kaczmarek, A. Olejniczak, M. Niemczak, *Ciecze jonowe jako stymulatory wzrostu roślin*, V Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań, 21-22.11.2025

Nagrody i wyróżnienia

1. Stypendium Santander Universidades - Nagroda Santander dla doktorantów Politechniki Poznańskiej za ich indywidualne osiągnięcia naukowe, artystyczne, sportowe i społeczne (20.12.2023)
2. Wystąpienie wyróżnione I miejscem w kategorii poster - A. Olejniczak, W. Stachowiak, M. Niemczak, *Estrokwaty betainy glicynowej – właściwości i zastosowanie jako regulatory wzrostu roślin*, V Ogólnopolska Konferencja „Biotechnologia Niejedno Ma Imię”, Poznań (26-27.11.2022)
3. Wystąpienie wyróżnione III miejscem w kategorii komunikat ustny - A. Olejniczak, D. Gwiazdowska, K. Juś, M. Niemczak, *Nowe jonowe i niejonowe pochodne witamin z grupy B o aktywności przeciwzapalnej – analiza przenikalności w teście PAMPA*, XI Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (12.05.2026)
4. Zakwalifikowanie się do finału konkursu „EUREKA! DGP – Odkrywamy polskie wynalazki” organizowanego przez „Dziennik Gazeta Prawna”. Zaprezentowany patent został zaprezentowany w gronie finalistów, a osiągnięcie zostało dodatkowo upublicznione w formie wywiadu
5. Wywiad w inauguracyjnym numerze czasopisma pracowników i studentów Politechniki Poznańskiej pt. „Żeby wygrać, trzeba patentować” - „Głos Politechniki” (wrzesień/październik - Rok XXXII NR 3 (227), ISSN 1233-5444)

Udział w grantach badawczych

1. LIDER XIII (LIDER13/0029/2022) - pod kierunkiem dr hab. inż. Michała Niemczaka, prof. PP pt. „Wykorzystanie betainy glicynowej, odpadu w procesie przerobu buraka cukrowego, jako surowca do produkcji przyjaznych dla środowiska środków myjąco-dezynfekujących jak i preparatów chwastobójczych”, (03.2024-02.2025); **rola w projekcie: wykonawca** (badanie ekotoksyczności oraz analiza dotycząca zmiany skali produkcji)
2. Grant PhD Boost dla doktorantów Szkoły Doktorskiej Politechniki Poznańskiej, realizowany ze środków subwencji w ramach budżetu centralnego pt. „Ocena biodostępności nowych form substancji aktywnych farmaceutycznie, pochodzenia naturalnego o działaniu przeciwzapalnym”, (03.2025-11.2025; 0912/SPHD/2521); **rola w projekcie: kierujący pracą**
3. Uczelniana subwencja badawcza:
 - Czwartorzędowe sole amoniowe oraz ciecze jonowe – synteza, właściwości fizykochemiczne i toksyczność (2023; 0912/SBAD/2309); rola w projekcie: **wykonawca**
 - Od syntezy do zastosowania – czwartorzędowe sole amoniowe i ciecze jonowe (2024; 0912/SBAD/2409); rola w projekcie: **wykonawca**
 - Czwartorzędowe sole amoniowe na bazie substancji występujących w środowisku (2025; 0912/SBAD/2504); rola w projekcie: **wykonawca**
 - Czwartorzędowe sole organiczne o potencjale aplikacyjnym - synteza i charakterystyka (2025, 0912/SBAD/2509); rola w projekcie: **wykonawca**
 - Czwartorzędowe sole amoniowe na bazie substancji aktywnych farmakologicznie - synteza i właściwości (2026; 0912/SBAD/2604); rola w projekcie: **wykonawca**
 - Czwartorzędowe sole amoniowe i głęboko eutektyczne rozpuszczalniki (2026; 0912/SBAD/2609); rola w projekcie: **wykonawca**

Krótkoterminowe mobilności akademickie

1. REUNICE Doctoral Summer School on Sustainable Science, Katania, Włochy, 1-5.07.2023

Stáže

1. PozLab sp. z o.o. Research and Development Center (Selvita), Złotniki Grzybowe, 13.05.2024-12.08.2024