



WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

mgr farm. Michał Abendrot

**Związki kompleksowe cynku z aminokwasami jako składniki
aktywne preparatów dermatologicznych**

Rozprawa doktorska
w oparciu o cykl publikacji naukowych

Praca wykonana w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor:

dr hab. n. farm. Urszula Kalinowska-Lis, prof. UM

Łódź 2021

Spis treści

Spis treści	2
Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej	3
Wykaz skrótów	4
Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej	5
Cele naukowe pracy.....	8
Część doświadczalna.....	9
Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja.....	13
Podsumowanie osiągniętych wyników.....	29
Perspektywy i plany na przyszłość.....	31
Streszczenie	32
Summary.....	33
Podziękowania	35
Piśmiennictwo	36
Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej [P1-P3]	41
Oświadczenia kandydata ubiegającego się o nadanie stopnia doktora	116
Oświadczenia współautorów	117
Całkowity dorobek naukowy	129

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

Poniżej zamieszczono zestawienie publikacji naukowych stanowiących podstawę pracy doktorskiej mgr farm. Michała Abendrot zatytułowanej „Związki kompleksowe cynku z aminokwasami jako składniki aktywne preparatów dermatologicznych”.

Dla publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej sumaryczny IF (ISI Journal Citation Reports) cyklu zgodny z rokiem publikacji jest równy **9,304**, zaś punktacja MNiSW wynosi **260** punktów MNiSW.

- **Publikacja I [P1]:**
Abendrot, M.; Płuciennik, E.; Felczak, A.; Zawadzka, K.; Piątczak, E.; Nowaczyk, P.; Kalinowska-Lis, U. Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 1641. <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>
IF = 4.556 ; 140 pkt MNiSW
- **Publikacja II [P2]:**
Abendrot M, Chęcińska L, Kusz J, et al. Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity. Molecules. 2020;25(4):951. Published 2020 Feb 20. doi:10.3390/molecules25040951
IF = 3.267 ; 100 pkt MNiSW
- **Publikacja III [P3]:**
Abendrot M, Kalinowska-Lis U: Zinc-containing compounds for personal care applications. Int J Cosmet Sci. 2018 Aug;40(4):319-327. doi: 10.1111/ics.12463
IF = 1.481 ; 20 pkt MNiSW

Wykaz skrótów

Skrót	Rozwinięcie skrótu
1BR.3.N	linia komórkowa prawidłowych fibroblastów skóry ludzkiej
AA	aminokwas (<i>ang. amino acid</i>)
CLSI	Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (<i>ang. Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
IC ₅₀	stężenie badanego związku, które hamuje wzrost komórek o 50%
ISO	Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (<i>ang. International Organization for Standardization</i>)
MFC	minimalne stężenie grzybobójcze (<i>ang. Minimum Fungicidal Concentration</i>)
MIC	minimalne stężenie hamujące (<i>ang. Minimum Inhibitory Concentration</i>)
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy (<i>ang. Nuclear Magnetic Resonance</i>)
preparat A	preparat dermatologiczny z substancją aktywną, ZnGly 0,66%
preparat B	preparat dermatologiczny z substancją aktywną, ZnHis 1,27%
preparat C	preparat dermatologiczny bez substancji aktywnej, placebo
Ph. Eur. 10.0	Farmakopea Europejska, wersja 10.0 (<i>ang. European Pharmacopoeia 10.0</i>)
SCCS	Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów (<i>ang. Scientific Committee on Consumer Safety</i>)
XRD	Rentgenografia strukturalna (<i>ang. X-ray Diffraction</i>)
ZnGlu	związek kompleksowy cynku(II) z kwasem L-glutaminowym; kompleks (1)
ZnGly	związek kompleksowy cynku(II) z kwasem glicyną; kompleks (2)
ZnHis	związek kompleksowy cynku(II) z kwasem L-histydyną; kompleks (3)
ZnPro	związek kompleksowy cynku(II) z kwasem L-proliną; kompleks (4)
ZnMet	związek kompleksowy cynku(II) z kwasem L-metioniną; kompleks (5)
ZnTrp	związek kompleksowy cynku(II) z kwasem L-tryptofanem; kompleks (6)
ZnPCA	2-pirolidyno-5-karboksylan cynku(II)

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Preparaty dermatologiczne są stosowane w rozmaitych schorzeniach skórnych. Stosowanie miejscowe wiąże się z szeregiem zalet, takich jak uzyskanie wysokiego stężenia w miejscu podania, uniknięcie reakcji ogólnoustrojowych czy interakcji z innymi lekami. Wśród preparatów stosowanych zewnętrznie wyróżnić możemy produkty lecznicze, wyroby medyczne oraz produkty kosmetyczne, które stosowane są w zależności od nasilenia zmian skórnych. Biorąc pod uwagę powszechność stosowania produktów kosmetycznych, stanowią one niejednokrotnie podstawę pielęgnacji podczas niejednej złożonej terapii skóry [1,2,3]. Nie inaczej jest w przypadku trądziku, gdzie stosowanie miejscowe preparatów w obrębie zmian skórnych jest powszechną praktyką [4].

Niezależnie od rodzaju preparatu dermatologicznego, każdy z nich składa się ze składników aktywnych oraz substancji pomocniczych. Farmaceuci i kosmetolodzy nieustannie prowadzą badania nad poszukiwaniem coraz to nowych, lepszych substancji aktywnych. Nowe składniki często zastępują starsze pochodne stanowiąc zazwyczaj bardziej bezpieczną i skuteczną alternatywę. Potrzeba ta jest szczególnie zauważalna w przypadku leczenia dermatoz, które dotyczą znaczny odsetek danej populacji.

Dane epidemiologiczne wskazują, że trądzik pospolity (ang. *acne vulgaris*, AV) dotyka 90-95% nastolatków i może występować we wszystkich grupach wiekowych [5]. Za jeden z czynników etiologicznych trądziku pospolitego uznaje się kolonizację przewodu wyprowadzającego łój przez beztlenowe bakterie Gram-dodatnie, *Cutibacterium acnes* [6]. Z tego względu, to właśnie na zwalczanie tych drobnoustrojów ukierunkowane są różnorodne substancje aktywne preparatów przeciwtrądzikowych [7,8,9]. W przebiegu trądziku pospolitego, stosowanie antybiotykoterapii miejscowej czy uogólnionej stanowi nierzadko leczenie pierwszego wyboru [10], niezależnie jednak od rodzaju antybiotyku (limecyklina, doksycyklina, erytromycyna, tetracyklina-HCl) stosowanie każdego z nich obarczone jest ryzykiem wzrostu antybiooporności [11]. Co istotne, najnowsze doniesienia potwierdziły wykrycie bakterii *C. acnes* opornych na znane dotychczas antybiotyki, które mogą przekazywać geny antybiooporności, co stwarza ryzyko powstania antybioopornych szczepów innych bakterii [12]. Zważywszy na to, że nadużywanie antybiotyków jeszcze bardziej eskaluje problem antybiooporności [7,13,14], coraz częściej szuka się alternatywnych substancji o aktywności przeciwbakteryjnej. Inne substancje lecznicze stosowane w trądziku cechują poważne działania niepożądane ogólnoustrojowe (izotretynoina) i miejscowe, takie jak podrażnienie skóry przypadku nadtlenku benzoilu i kwasu azelainowego [11].

Pochodne cynku stanowią atrakcyjną grupę substancji aktywnych do leczenia trądziku pospolitego głównie ze względu na ich działanie sebastatyczne, przeciwzapalne, antyoksydacyjne oraz przeciwdrobnoustrojowe [15,16]. Z tego powodu substancje takie jak: ZnO [17,18], ZnSO₄ [15,19,20], ZnPCA [21], glukonian cynku [15,22] znalazły zastosowanie w terapii trądziku pospolitego.

Pomimo długiej historii stosowania, mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania pochodnych cynku nie został jeszcze dokładnie poznany i stanowi wciąż przedmiot intensywnych badań [23,24]. Aktywność przeciwbakteryjna pochodnych cynku jest zależna od zdolności uwalniania jonów Zn²⁺ [25]. Na siłę działania przeciwbakteryjnego wpływa zarówno stężenie wolnych jonów cynkowych, jak i czas ich kontaktu z drobnoustrojami, co wykazano na przykładzie ZnO [18].

Nieorganiczne sole cynku, takie jak ZnSO₄ czy ZnCl₂, łatwo dysocjujące i zapewniające duże stężenie aktywnych jonów cynku, jeszcze do niedawna były w powszechnym użyciu. Obecnie sole te są rzadko

stosowane w preparatach aplikowanych na skórę, z uwagi na ich wysoki potencjał drażniący [26]. Coraz częściej wykorzystywane są połączenia cynku z pochodnymi organicznymi, np. glukonian cynku i piroolidynokarboksylan cynku (ZnPCA), które uznaje się za bezpieczniejsze. Pochodna ZnPCA stosowana miejscowo, oprócz właściwości przeciwbakteryjnych wykazuje także działanie ściągające [21]. W randomizowanym badaniu klinicznym wykazano znaczącą redukcję objawów trądziku po zastosowaniu preparatu zawierającego 0,1% ZnPCA z kompleksem oligosacharydów pozyskanym z alg morskich [27].

Glukonian cynku został przebadany klinicznie w trądziku oraz innych zapalnych chorobach skóry przy podaniu doustnym i miejscowym [15,22,28,29]. Potwierdzono dla niego także brak właściwości fotouczulających [29]. Pierwotnie, badania wskazały, że glukonian cynku wzmacnia działanie niektórych antybiotyków stosowanych przeciw *C. acnes* [22]. Późniejsze dane wykazały, że działanie przeciwbakteryjne pochodnych cynku wobec tych bakterii może nawet przekraczać skuteczność stosowanych antybiotyków [30].

Wśród szerokiej grupy pochodnych cynku [31], zwraca się szczególną uwagę na związki kompleksowe cynku z aminokwasami. Dla niektórych pochodnych pozytywnie oceniono możliwość ich podania w formie doustnej, jak w przypadku ZnGly [32,33], ZnMet [34] oraz kompleksów ZnHis [35]. Z tego względu wybrane kompleksy cynku z aminokwasami znalazły zastosowanie w żywieniu ludzi [36,37] i zwierząt [38,39,40]. Chociaż bezpieczeństwo ich stosowania przy podaniu doustnym zostało ocenione pozytywnie [41], użycie tych pochodnych w preparatach aplikowanych na skórę jest wciąż rzadkie. Na chwilę obecną stosowanie tej grupy związków w preparatach dermatologicznych skupia się głównie na działaniu antyoksydacyjnym (Zinc Glycinate) czy kondycjonującym (Zinc Glutamate) [31,42,43]. Co istotne, do tej pory aktywność przeciwdrobnoustrojowa dla żadnego z tych związków nigdy nie była zbadana.

Działanie związków cynku nie ogranicza się tylko do działania przeciwdrobnoustrojowego i przeciwtrądzikowego. Oprócz wspomnianych powyżej właściwości w literaturze jest szereg doniesień na temat aktywności: promieniochronych, antypigmentacyjnych, przeciwmarszczkowych, przeciwwonnych, oczyszczających oraz stabilizujących dla różnych pochodnych cynku [31]. Ze względu na przeciwbakteryjny, przeciwtrądzikowy, przeciwzapalny, antyoksydacyjny i antypigmentacyjny profil działania związków cynku powinien on przełożyć się na korzystne działanie na skórę trądzikową [31].

Do realizacji niniejszej pracy doktorskiej, wybrano właśnie kompleksy cynku z ligandami stanowiącymi cząsteczki aminokwasów. Cynk, będąc inkorporowanym w organizmie w strukturę ponad 3000 białek, często tworzy układy koordynacyjne o ważnym znaczeniu biologicznym łącząc się z resztami aminokwasowymi [44]. Jako, że bezpieczeństwo aminokwasów w produktach kosmetycznych zostało ocenione pozytywnie [45], spekuluje się, że w połączeniu z cynkiem mogą one stanowić pochodne o lepszej tolerancji skórnej niż stosowane obecnie pochodne cynku. Co ciekawe, dla tych ligandów, potwierdzono zdolność do zwiększania rozpuszczalności pochodnych cynku w wodzie, dlatego przewiduje się, że mogą one stanowić obiecujące składniki dla preparatów pozbawionych fazy tłuszczowej [46]. Dodatkowo do podjęcia badań nad związkami kompleksowymi z aminokwasami zachęca poznana aktywność przeciwdrobnoustrojowa połączeń koordynacyjnych aminokwasów z innymi jonami metali, tj.: miedzi(II) [47,48,49,50,51] kobaltu(II) [48,49,50,51], niklu(II) [49,50], żelaza(III) [48], manganu(II) [50] i kadmu(II) [50].

Zainteresowanie tematyką pochodnych cynkowych było także związane ze znaczeniem tego biopierwiastka w lecznictwie. Kation cynkowy jest kofaktorem ponad 1000 reakcji enzymatycznych, biorąc udział we wzroście i różnicowaniu komórek rozmaitych tkanek organizmu człowieka [52]. Nieoceniona jest również jego rola przy regulowaniu odporności, prewencji chorób sercowo-

naczyniowych i nowotworów, leczeniu ran, wspomaganiu procesu widzenia, przebiegu procesu krzepnięcia krwi czy prawidłowym neuroprzeobrażaniu [53,54]. Cynk zajmuje również istotne miejsce w leczeniu patologii skórnych oraz utrzymaniu skóry w dobrej kondycji [55,56,57].

Osadzając własne badania w obszernym kontekście literaturowym, założono, że badania nad połączeniami cynku z aminokwasami przyczynią się do stworzenia nowej grupy związków o lepszym profilu dermatologicznym niż obecnie stosowane składniki aktywne o działaniu przeciwtrądzikowym. Badania te będą wymagały udowodnienia działania przeciwbakteryjnego związków wobec *C. acnes*, bakterii wywołujących trądzik; wykluczenia toksycznego działania związków na komórki skóry (keratynocyty i fibroblasty) oraz potwierdzenia stabilności, czystości mikrobiologicznej i skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej preparatów dermatologicznych przygotowanych na bazie kompleksów cynku z wybranymi aminokwasami.

Cele naukowe pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie nowych preparatów o działaniu przeciwtędzikowym zawierających jako składniki aktywne związki z grupy kompleksów cynku z aminokwasami. Cel ten realizowano w oparciu o zaprezentowane poniżej badania.

1. Opracowanie metod syntezy 6 związków kompleksowych cynku (**1-6**) o ogólnym wzorze $[Zn(AA)_2]$, zawierających wybrane aminokwasy (AA: L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met i L-Trp) jako wyłączne ligandy.
2. Charakterystyka strukturalna otrzymanych związków kompleksowych z zastosowaniem spektroskopii protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (1H NMR), analizy rentgenowskiej monokryształów (XRD) oraz analizy pierwiastkowej (C, H, N).
3. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków kompleksowych cynku z aminokwasami (**1-6**) na wybranych szczepach:
 - 3.1. bakterii Gram-dodatnich tlenowych (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 i *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) oraz Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25992 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853),
 - 3.2. bakterii Gram-dodatnich, beztlenowych *Cutibacterium acnes* (ATCC 6919), które są uznawane za istotny czynnik patogenyzy trądziku pospolitego,
 - 3.3. grzybów z grupy drożdżaków (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsylosis*) i grzybów strzępkowych (*Aspergillus flavus* ATCC 200 9643 i *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305).
4. Badania cytotoksyczności w warunkach *in vitro* dla związków kompleksowych cynku z aminokwasami (**1-6**) na ludzkich komórkach skóry:
 - 4.1. prawidłowych fibroblastach (linia komórkowa 1BR.3.N),
 - 4.2. keratynocyty (linia komórek naskórka).
5. Wytypowanie dwóch związków wiodących ZnGly (**2**) i ZnHis (**3**), największej aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepu *C. acnes* i jednocześnie najniższym potencjale cytotoksycznym wobec komórek skóry.
6. Opracowanie oryginalnych receptur preparatów dermatologicznych (**A-C**):
 - 6.1. Preparat **A** z udziałem substancji aktywnej ZnGly (**2**),
 - 6.2. Preparat **B** z udziałem substancji aktywnej ZnHis (**3**),
 - 6.3. Preparat **C** pozbawiony substancji aktywnej - placebo.
7. Przeprowadzenie niezbędnych badań dla przygotowanych produktów dermatologicznych (**A-C**):
 - 7.1. ocen stabilności każdego z preparatów w oparciu o cotygodniowe pomiary parametrów fizykochemicznych (pH, gęstość, lepkość) wraz z oceną organoleptyczną, w okresie 6 tygodni,
 - 7.2. ocena czystości mikrobiologicznej względem odpowiednich norm PN-EN ISO dla produktów kosmetycznych,
 - 7.3. ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej zgodnie z kryteriami Ph. Eur. 10.0.

Część doświadczalna

1. Metodyka badań.

1.1. Synteza związków kompleksowych cynku(II) z aminokwasami (1-6) [P2].

Syntezy kompleksów cynku z aminokwasami (1-6) zostały przeprowadzone w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Syntezy prowadzono z wykorzystaniem dwóch prostych metod, których wybór podyktowany był właściwościami reagentów.

Kompleksy cynku z L-Glu, Gly, L-His i L-Pro (1-4), dobrze rozpuszczalne w wodzie, otrzymywano w wyniku reakcji wodorotlenku cynku z odpowiednim aminokwasem w stosunku molowym 1:2. Wodorotlenek cynku przygotowano wcześniej w reakcji wodorotlenku sodu z chlorkiem cynku.

Do zawiesiny wodorotlenku cynku w wodzie dodawano wodne roztwory odpowiednich aminokwasów, całość mieszano i ogrzewano w temp. 50°C, aż do rozpuszczenia zawiesiny wodorotlenku. Proces kontynuowano przez około dwie godziny. Ewentualne niewielkie ilości stałych pozostałości odsączano i odrzucano, zaś klarowne roztwory zatężano na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem do ok. 1/3 objętości i pozostawiano do powolnego odparowania na powietrzu. Po jednej lub kilku dobach wytrącały się białe krystaliczne osady kompleksów, które sączono, przemywano bezwodnym eterem dietylowym i suszono na powietrzu.

Kompleksy cynku z L-Met i L-Trp (5-6), nierozpuszczalne w wodzie, otrzymano w wyniku reakcji chlorku cynku z solą sodową odpowiedniego aminokwasu [(AA)Na] w stosunku molowym 1:2. Proces ten poprzedzono przygotowaniem soli aminokwasów poprzez połączenie odpowiedniego aminokwasu z roztworem wodorotlenku sodu.

Trudnorozpuszczalne w wodzie produkty syntezy wytrącały się z mieszaniny reakcyjnej natychmiast po połączeniu reagentów: $ZnCl_2$ i [(AA)Na]. Ich mieszanie kontynuowano jeszcze ok. 60 minut w temperaturze pokojowej. Następnie otrzymane białe osady związków odsączono, przemyto zimną wodą oraz eterem dietylowym i suszono na powietrzu.

1.2. Charakterystyka strukturalna uzyskanych kompleksów cynku(II) z aminokwasami (1-6) [P2].

Analizy składu i struktury związków były prowadzone z użyciem następujących metod analitycznych: protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (1H NMR), analizy pierwiastkowej (EA) oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów (XRD).

Widma 1H NMR rejestrowano na spektrometrze Bruker Avance III (600 MHz) z użyciem D_2O lub $DMSO-d_6$ jako rozpuszczalnika, w Pracowni Spektroskopii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Analizy elementarne na obecność C, H i N przeprowadzono za pomocą analizatora Perkin-Elmer 2400 w Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Badania strukturalne przeprowadzono z użyciem rentgenowskiej analizy monokryształów. Badania przeprowadzono w ramach współpracy z Instytutem Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Chorzowie oraz Wydziałem Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Dane dyfrakcyjne zostały zebrane na mikroogniskującym dyfraktometrze SuperNova z detektorem Atlas (dla kompleksów 3, 4, 5) i dyfraktometrze Xcalibur z detektorem Sapphire (dla kompleksu 2) przy użyciu promieniowania $MoK\alpha$ ($CuK\alpha$ było wyjątkowo używane dla kompleksu 5) i zastosowaniu ω -skanowania. Pomiary przeprowadzono w niskiej temperaturze 100(2) K. Dane dyfrakcyjne skorygowano o absorpcję.

Wszystkie struktury rozwiązano za pomocą oprogramowania SHELXT i udokładniono za pomocą programu SHELXL-2018/3. Do analizy struktury i prezentacji wyników wykorzystano programy krystalograficzne MERCURY i PLATON.

1.3. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej kompleksów cynku (1-6) [P1-P2].

Oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in vitro* otrzymanych związków kompleksowych cynku dokonano we współpracy z zespołem Prof. dr hab. Katarzyny Lisowskiej w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

1.3.1. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej kompleksów cynku (1-6) wobec wybranych szczepów bakterii tlenowych [P2].

Do oceny aktywności przeciwbakteryjnej kompleksów cynku (1-6) w stosunku do szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) i Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25992 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) zastosowano metodę mikrorozcieńczeń zgodną z normami CLSI (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) nr M07-18. Jako substancji referencyjnej użyto ZnPCA (pirolidynokarboksylan cynku). Wyniki badań przedstawiono jako krzywe wzrostu bakterii (% kontroli biotycznych) w obecności kompleksów cynku oraz wyznaczono ich wartości MIC (minimalnego stężenia hamującego).

1.3.2. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej kompleksów cynku (1-6) wobec bakterii beztlenowych *Cutibacterium acnes* [P1].

Aktywność przeciwbakteryjną kompleksów cynku (1-6) wobec bakterii *C. acnes* zbadano stosując metodę mikrorozcieńczeń dla bakterii beztlenowych zgodnie z normami CLSI nr M11 (Wydanie 9). Minimalne stężenie hamujące (MIC), określono jako najniższe stężenie kompleksów cynku, przy którym nie zaobserwowano wzrostu *C. acnes*. Jako substancji referencyjnej użyto ZnPCA.

1.3.3. Ocena aktywności przeciwgrzybiczej kompleksów cynku (1-6) [P1].

Dokonano oceny aktywności przeciwgrzybiczej kompleksów cynku (1-6) wobec wybranych szczepów drożdży (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsylosis*) i grzybów strzępkowych (*Aspergillus flavus* ATCC 9643 i *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305) metodą mikrorozcieńczeń zgodnie z wytycznymi CLSI nr M27 (Wydanie 4) dla drożdży i M38 (Wydanie 3) dla grzybów strzępkowych. Podjęto próbę wyznaczenia wartości minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC).

1.4. Badania cytotoksyczności kompleksowych cynku (1-6) wobec prawidłowych komórek skóry [P1].

Ocena toksyczności kompleksów cynku (1-6) w stosunku do ludzkich prawidłowych linii komórkowych skóry: fibroblastów (1BR.3.N) oraz keratynocytów (linia komórek naskórka), została przeprowadzona za pomocą testu żywotności komórek Presto Blue. Jako substancji referencyjnych użyto ZnPCA oraz $ZnCl_2$. Wyznaczono wartości IC_{50} (stężenie badanego związku hamujące wzrost

komórek o 50%) dla badanych związków.. Badania przeprowadzono w ramach współpracy z Zakładem Zakład Kancerogenezy Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

1.5. Przygotowanie oryginalnych preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Wszystkie preparaty zostały przygotowany w temperaturze pokojowej. Iota-karagen (2,00 g) dokładnie rozprowadzono w wodzie (70,00 ml), do utworzenia żelu. Dodano substancję konserwującą: mieszaninę fenoksyetanol: etyloheksylogliceryna (9: 1) (1,00 g). Mieszaninę homogenizowano (7 000 obr./min, 1 minuta / 100,00 g). Dodano i zmieszano odpowiedni kompleks cynku (0,66 g ZnGly (**2**) lub 1,27 g ZnHis (**3**)). Podczas mieszania dodano wodny 2,50% roztwór kwasu cytrynowego (tj. 14,76 g dla preparatu (**A**), 22,75 g dla preparatu (**B**) lub 0,52 g dla preparatu (**C**)) w celu uzyskania wartości pH pomiędzy 5,00 - 5,50. Otrzymane żele następnie homogenizowano (7 000 obr / min, 2 minuty / 100,00 g) i przechowywano przez siedem dni do zaniku pęcherzyków powietrza.

1.5.1. Badania fizykochemiczne dla preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Stabilność przygotowanych preparatów określano badając ich parametry fizykochemiczne, w tym wartość pH, gęstość i lepkość, raz w tygodniu przez okres sześć tygodni. Pomiary pH przeprowadzano z użyciem metody pomiaru bezpośredniego wykalibrowanym pH-metrem Seven Compact meter, Mettler-Toledo. Pomiary gęstości wykonywano z użyciem wykalibrowanego piknometru metalowego (model P1, POL-ZAF). Lepkość oceniano przy pomocy wiskozymetru rotacyjnego (model R ViscoLead ONE, Fungilab). Dokonywano oceny organoleptycznej: zapachu, wyglądu i barwy preparatu. Badania wykonano w laboratorium firmy ACC Chemicals w Piasecznie.

1.5.2. Badania mikrobiologiczne dla preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Badania mikrobiologiczne obejmujące czystość mikrobiologiczną według norm PN-EN ISO oraz test ochrony przeciwdrobnoustrojowej w oparciu o metodologię Ph. Eur. 10.0, zostały przeprowadzone na mocy współpracy z laboratorium dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji we Wrocławiu.

1.5.2.1. Ocena czystości mikrobiologicznej preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Czystość mikrobiologiczna wszystkich preparatów została oceniona według obowiązujących dla produktów kosmetycznych norm ISO obejmujących: limity czystości mikrobiologicznej (PN-EN ISO 21149:2017-07 oraz PN-EN ISO 16212:2017-08), oznaczanie liczby drożdży i pleśni (PN-EN ISO 16212:2017-08), jak również obecność drobnoustrojów alarmowych (PN-EN ISO 22717:2016-01, PN-EN ISO 21150:2016-01, PN-EN ISO 22718:2016-01 i PN-EN ISO 18416:2016-01) obejmujących zarówno bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), jak i drożdże (*Candida albicans*). Protokoły z badań dla poszczególnych preparatów (**A-C**) stanowią załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S1–S3).

1.5.2.2. Test konserwacji dla preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Ocenę skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej preparatów wykonano zgodnie Farmakopeą Europejską 10.0 przez 28 dni dla każdego szczepu mikroorganizmu oddzielnie. Zgodnie z zapisami Ph. Eur. 10.0, referencyjne szczepy testowe stanowiły odpowiednio: bakterie

(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739) oraz grzyby (*Candida albicans* ATCC 10231 oraz *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404). Wyniki przedstawiono jako logarytmiczny wskaźnik redukcji liczby mikroorganizmów i porównywano z kryteriami określonymi Ph. Eur. 10.0, (Tabela 1). Protokoły z badań dla poszczególnych preparatów (A-C) stanowią załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S4–S6).

Badany typ mikroorganizmu	Kryterium	Logarytm redukcji drobnoustrojów testowych			
		2 dzień	7 dzień	14 dzień	28 dzień
Bakterie	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
Grzyby	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

NI - brak wzrostu liczby żywych mikroorganizmów w porównaniu z poprzednim odczytem.

Tabela 1. Kryteria akceptacji zgodne z zapisami Ph. Eur. 10.0.

2. Ocena statystyczna wyników.

Opracowaniu statystycznemu poddano wyniki badań cytotoksyczności i badań fizykochemicznych preparatów dermatologicznych. Wszystkie wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym (SD). Istotność statystyczną określono za pomocą testu HSD Tukeya (dla porównania parametrów fizykochemicznych) lub testu Kruskala-Wallisa (dla porównania cytotoksyczności). Różnice między średnimi uznawano za istotne przy $p \leq 0,05$. Wszystkie analizy statystyczne wykonano przy użyciu programu Statistica (STATSoft, Polska, wersja 13.1, 2016).

Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja

1. Synteza i charakterystyka strukturalna kompleksów cynku(II) z wybranymi aminokwasami (1-6) [P2].

Przeprowadzono syntezy kompleksów cynku(II) z aminokwasami (1-6) o wzorze ogólnym $[Zn(AA)_2]$, gdzie AA stanowiły odpowiednie aminokwasy: L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met oraz L-Trp. Otrzymane związki, zgodnie z zamierzeniami, nie posiadały w składzie cząsteczkowym innych ligandów niż aminokwasy oraz były pozbawione nieorganicznych przeciwjonów, np. Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , które mogłyby stanowić potencjalny czynnik drażniący skórę. W zależności od rozpuszczalności reagentów w wodzie opracowano dwie metody syntezy związków kompleksowych cynku: dla pochodnych o wysokiej rozpuszczalności w wodzie (Metoda 1, kompleksy 1-4) oraz niskiej rozpuszczalności w wodzie (Metoda 2, kompleksy 5-6). Opracowanie dwóch odrębnych metod syntezy pozwoliło na łatwe wyizolowanie produktu głównego reakcji z mieszaniny reakcyjnej i oddzielenie produktów ubocznych reakcji (NaCl).

Metoda 1. Synteza kompleksów cynku(II) polegała na reakcji wodnej zawiesiny wodorotlenku cynku z wodnym roztworem odpowiedniego aminokwasu (L-Glu, Gly, L-His, L-Pro) w stosunku molowym 1:2. (Schemat 1).

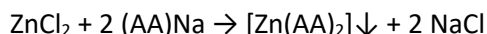


Schemat 1. Synteza kompleksów cynku(II) (1-4) dobrze rozpuszczalnych w wodzie.

Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C przez około dwie godziny. Zawiesina wodorotlenku cynku połączona z roztworem odpowiedniego aminokwasu ulegała rozpuszczeniu w ciągu kilku minut po rozpoczęciu procesu. Produkty reakcji (1-4), które były bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie, izolowano z mieszaniny reakcyjnej poprzez częściowe zatężanie roztworów na wyparce i pozostawienie ich do powolnej krystalizacji.

Niezbędny do powyższej syntezy wodorotlenek cynku wytrącono w reakcji wodorotlenku sodu z chlorkiem cynku, w stosunku molowym 2:1.

Metoda 2. Synteza polegała na reakcji chlorku cynku z solą sodową danego aminokwasu w środowisku wodnym w stosunku molowym 1:2 (Schemat 2). Metoda ta służy do otrzymywania kompleksów cynku(II) o niskiej rozpuszczalności w wodzie (5-6).



Schemat 2. Synteza kompleksów cynku(II) (5-6) trudno rozpuszczalnych w wodzie.

Wytrącony w wyniku reakcji trudnorozpuszczalny osad kompleksu cynku odsączano i przemywano wodą, oddzielając go w łatwy sposób od produktu ubocznego - chlorku sodu, dobrze rozpuszczalnego w wodzie. Związek kompleksowy suszono na powietrzu.

Główny proces poprzedzono reakcją odpowiedniego aminokwasu (L-Met lub L-Trp) z 1M roztworem NaOH w celu uzyskania jego soli sodowej. Obydwa procesy prowadzono w temperaturze pokojowej.

Spośród otrzymanych kompleksów cynku związek (**5**), ZnMet, był możliwy do otrzymania za pomocą obydwu metod. Chociaż produkty reakcji były identyczne, to wydajność reakcji przeprowadzonej zgodnie z metodą 2 była wyższa.

Jakkolwiek w literaturze można znaleźć przykłady syntez kompleksów cynku(II) z aminokwasami [58,59,60], to jednak związki te najczęściej zawierały w strukturze cząsteczkowej, obok aminokwasów, także inne ligandy i/lub nieorganiczne aniony, np. siarczanowe, octanowe, chlorkowe. Kompleksy cynku(II) otrzymane w ramach mojej pracy doktorskiej nie posiadają żadnych anionów nieorganicznych, co niewątpliwie jest ich dużym atutem pod kątem dalszych aplikacji skórnych, gdyż obecność przeciwjonów nieorganicznych obniża tolerancję skórą, co może powodować jej podrażnienie [61].

Opisano syntezę kompleksu cynku z proliną (**4**), jednak metoda syntezy tego związku polegająca na reakcji octanu cynku i proliny w obecności trietyloaminy w środowisku metanolowym, znacznie różniła się od zastosowanej w publikacji [P2]. Celem tej syntezy było wykorzystanie otrzymanego związku cynku jako katalizatora do różnych przemian w chemii organicznej [58].

Metoda otrzymywania kompleksu cynku(II) z metioniną (**5**) [62], z wodorotlenku cynku i aminokwasu, stanowiła dla mnie źródło inspiracji do syntez dobrze rozpuszczalnych w wodzie kompleksów cynku z aminokwasami. Co ciekawe, autorzy pracy [62] zgodnie z tą metodą otrzymali kompleks, który bardzo trudno rozpuszcza się w wodzie.

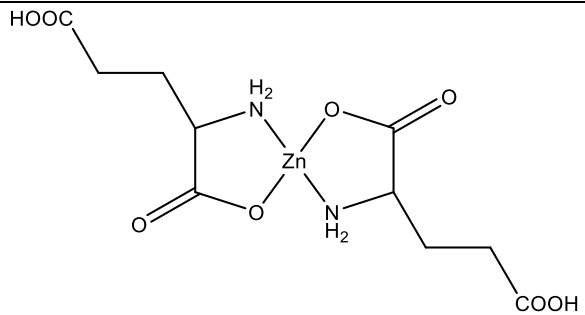
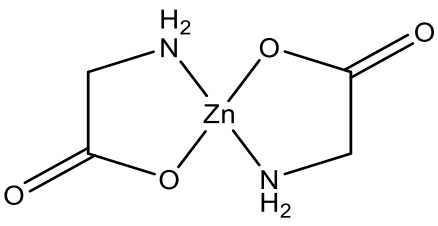
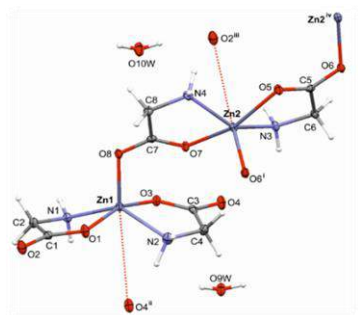
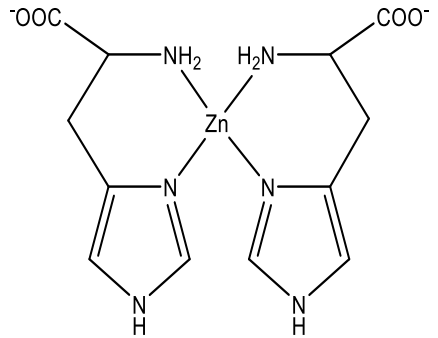
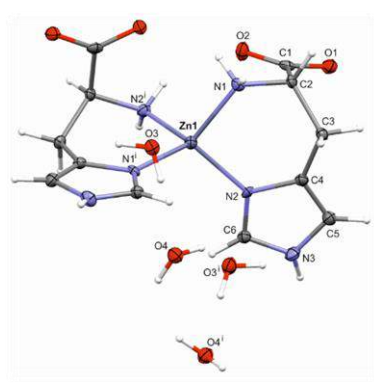
Co prawda w literaturze wzmiankowane są kompleksy cynku(II) z glicyną, jednak ich struktura jest znacząco różna od struktury kompleksu (**2**). Różnice te związane są z rodzajem soli cynku użytej jako substratu do syntezy oraz pH reakcji, a co za tym idzie występowaniem glicyny w formie jonu obojnego lub w formie anionowej. Opisywane kompleksy z glicyną, o wzorach ogólnych $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ [59] oraz $[\text{Zn}(\text{Gly})_2\text{I}_2]$ [63], nie tworzą chelatów oraz są posiadają w zewnętrznej lub wewnętrznej sferze koordynacyjnej nieorganiczne aniony (SO_4^{2-} lub I^-), w przeciwieństwie do kompleksu cynku (**2**) (Schemat 3) [P2]. W opisanych kompleksach cynku(II) glicyna jest ligandem jednofunkcyjnym (monodentnym) z powodu sprotonowanej grupy aminowej, czyli kationu $-\text{NH}_3^+$, który nie dysponuje wolną parą elektronową zdolną do utworzenia wiązania z jonem cynku [59,63].

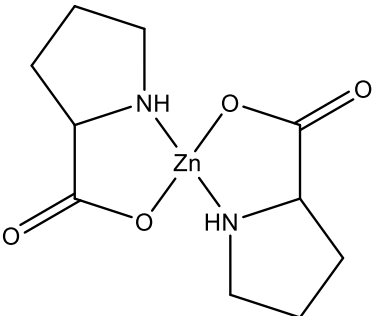
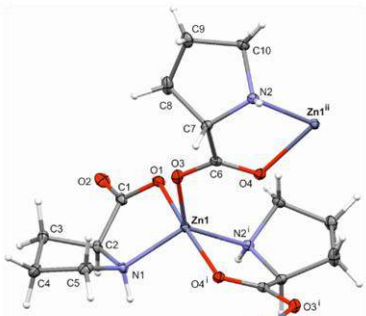
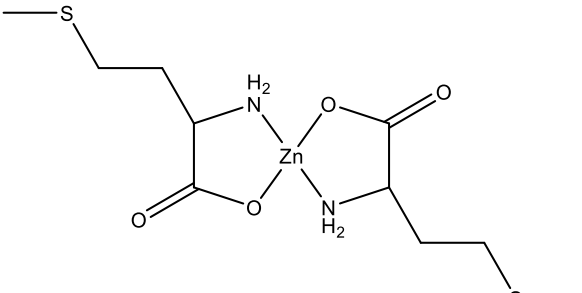
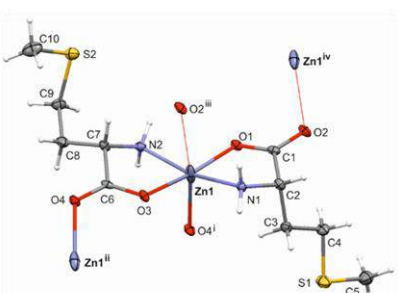
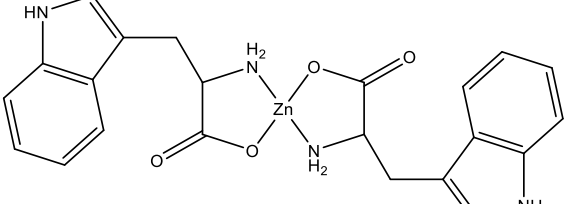
Otrzymane kompleksy cynku(II) z aminokwasami (**1-6**) scharakteryzowano pod względem strukturalnym za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) oraz za pomocą analizy pierwiastkowej na obecność C, H, N. Dodatkowo, dla czterech kompleksów (**2-5**) udało się otrzymać odpowiednie do rentgenowskich badań strukturalnych monokryształy związków [P2].

Widma ^1H NMR kompleksów cynku(II) z aminokwasami oraz wolnych ligandów- aminokwasów zarejestrowano w D_2O (**1-5**) lub DMSO (**6**). Największe różnice w wartościach przesunięć chemicznych sygnałów poszczególnych grup protonów dla kompleksów i odpowiadających im ligandów obserwuje się najczęściej dla protonów znajdujących się w sąsiedztwie miejsca koordynacji. Im mniejsza odległość dzieli dany proton lub grupę protonów od wiązania koordynacyjnego, tym wyższe różnice wartości przesunięć chemicznych danego protonu/-ów w związku kompleksowym w stosunku do odpowiedniego protonu/-ów w cząsteczce wolnego liganda [64]. Wynika to z faktu zmiany gęstości elektronowej wokół tych protonów na skutek utworzenia wiązań z atomem centralnym. I tak, największe różnice w wartościach przesunięć chemicznych, większe od 0,1 ppm, wynoszące: 0,12; 0,30; 0,14; 0,12; 0,20 i 0,11 ppm, zanotowano odpowiednio dla następujących protonów: CH_2 (γ) (**1**), CH_2 (**2**), CH ($5'$) (**4**), CH (2) (**4**), CH (α) (**5**) i CH_2 (β) (**6**). W widmach ^1H NMR, zarówno kompleksów jak i ligandów, nie obserwuje się sygnałów protonów, które uległy wymianie na deuter w zastosowanym

rozpuszczalniku D₂O, a mianowicie sygnałów protonów grupy aminowej, karboksylowej oraz protonów związanych z heterocyklicznym atomem azotu. W takich przypadkach, dane o budowie cząsteczkowej związków, uzyskane na podstawie analizy widm, są nieco uboższe i zawężają się do protonów szkieletu węglowego. Szczegółowe dane wynikające z analizy widm ¹H NMR kompleksów (**1-6**) i odpowiednich ligandów znajdują się w publikacji [P2].

W celu jednoznacznego potwierdzenia struktury kompleksów dokonuje się analizy rentgenostrukturalnej monokryształów związków. Podjęto zatem próby otrzymania monokryształów dla wszystkich kompleksów cynku, które ostatecznie zakończyły się to sukcesem dla czterech związków (**2-5**) [P2]. Struktury krystaliczne kompleksów (**2-5**) wraz ze wzorami strukturalnymi kompleksów (**1-6**) zamieszczono na Schemacie 3.

Kompleks cynku z kwasem glutaminowym, ZnGlu, (1)	
	Nie uzyskano odpowiedniego monokryształu do badań
Kompleks cynku z glicyną, ZnGly, (2)	
	
Kompleks cynku z histydyną, ZnHis, (3)	
	
Kompleks cynku z proliną, ZnPro, (4)	

	
Kompleks cynku z metioniną, ZnMet, (5)	
	
Kompleks cynku z tryptofanem, ZnTrp, (6)	
	Nie uzyskano odpowiedniego monokryształu do badań

Schemat 3. Wzory strukturalne oraz struktury krystaliczne kompleksów (1-6).

Rentgenowskie analizy strukturalne kryształów pokazały, że związki cynku z glicyną (2), proliną (4) i metioniną (5) tworzą pięciocłonowe pierścienie chelatu, zaś kompleks cynku z histydyną (3) sześciocłonowe pierścienie chelatu. Przypuszcza się, że pozostałe kompleksy cynku, z kwasem glutaminowym (1) oraz tryptofanem (6), dla których nie uzyskano odpowiednich do badań monokryształów, także będą formowały chelaty pięciocłonowe (Schemat 3). Wskazuje na to budowa aminokwasów, będących ligandami wielofunkcyjnymi, tzw. kleszczowymi. Didentne (dwukleszczowe) ligandy wiążą się z jonem cynku za pomocą dwóch atomów donorowych, tj. atomu azotu grupy aminowej oraz atomu tlenu grupy karboksylowej, dysponującymi wolnymi parami elektronowymi [P2]. Zatem we wszystkich kompleksach, poza kompleksem z histydyną, występuje tzw. „glycine-like” model koordynacji (Schemat 4).



Schemat 4. Model koordynacji „glycine-like” [65].

W kompleksie z histydyną (**3**) możliwość występowania takiego modelu koordynacji jest również wysoce prawdopodobna i często spotykana w literaturze, jak w przypadku kompleksów miedzi(II) z histydyną [66,67]. Jednakże, jak pokazały badania strukturalne kryształu kompleksu cynku(II) z histydyną (**3**), tworzy on sześciocząłowe pierścienie chelatowe, poprzez utworzenie wiązań koordynacyjnych za pomocą wolnych par elektronowych atomu azotu grupy aminowej oraz atomu azotu pierścienia imidazolu. Atom tlenu grupy karboksylowej nie jest w tym przypadku zaangażowany w formowanie wiązania koordynacyjnego z jonem centralnym [P2]. Ponadto, cząsteczka histydyny może być także ligandem trójkleszczowym, koordynując do jonu centralnego jednocześnie za pomocą atomu azotu grupy -NH₂, atomu azotu imidazolu oraz atomu tlenu grupy -COOH, jak zaproponowano dla kompleksu [ZnH(GSH)(L-His)(H₂O)] [68].

Tożsamość oraz czystość uzyskanych związków kompleksowych cynku(II) (**1-6**) potwierdzono wykonując analizy elementarne na obecność C, H i N. Wyniki tych analiz pozostawały w zgodności z wynikami rentgenowskich analiz strukturalnych kompleksów. Jak pokazują nasze analizy składu kompleksów i ich analizy strukturalne, niejednokrotnie związki kompleksowe krystalizowały z wbudowaniem cząsteczek wody w sieć krystaliczną związku, np.: jak miało to miejsce dla kompleksu cynku z glicyną czy histydyną [P2].

2. Badania aktywności przeciwbakteryjnej kompleksów cynku (1-6) [P1, P2].

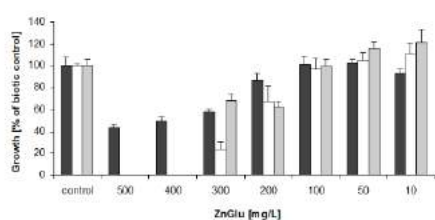
Oceniono aktywność przeciwbakteryjną kompleksów cynku (**1-6**) w stosunku do wybranych szczepów bakterii tlenowych Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) oraz Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25992 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) [P2], a także wobec szczepu bakterii Gram-dodatnich beztlenowych *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 [P1]. Wybrane szczepy bakteryjne odpowiadają za występowanie infekcji skórnych i układowych (oddechowych, moczowych). *S. aureus* jest składnikiem naturalnej mikroflory skóry człowieka, ale w pewnych warunkach może nadmiernie kolonizować skórę i tkanki miękkie, powodując zakażenia, wypryski skórne czy nasilenie zmian atopowego zapalenia skóry [69]. Dwa kolejne drobnoustroje, *S. epidermidis* i *S. pyogenes* są z kolei często izolowanymi patogenami ze zmian skórnych i ran [70]. Bakterie Gram-ujemne *E. coli* wywołują zapalenie opon mózgowych czy infekcje przewodu pokarmowego, natomiast *P. aeruginosa* mogą powodować ciężkich infekcji skóry i tkanek miękkich [71,72]. Beztlenowe bakterie *C. acnes* są natomiast uznawane za jeden z głównych czynników patogenetycznych trądziku pospolitego [73].

W przeprowadzonych badaniach substancję odnośnikową stanowił ZnPCA, który obecnie stosowany jest miejscowo jako składnik przeciwtrądzikowy [74]. Wartości minimalnego stężenia hamującego – MIC [mg/l] wyznaczono tylko dla szczepów bakterii *S. epidermidis*, *S. pyogenes* oraz *C. acnes* (Tabela 2). Dla pozostałych szczepów, w szczególności Gram-ujemnych, wartości MIC nie udało się wyznaczyć. Dla wszystkich badanych szczepów bakterii podano zależność ich wzrostu (%) od stężenia zastosowanego związku cynku odpowiednio dla szczepów Gram-dodatnich (Schemat 5) oraz Gram-ujemnych (Schemat 6) [P2].

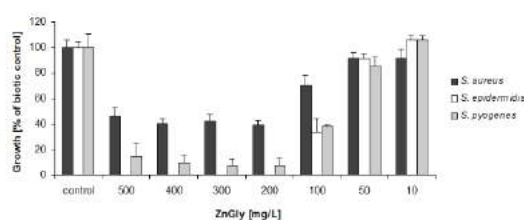
Minimalne stężenie hamujące (MIC) dla bakterii Gram-dodatnich, [mg/L]				
Badany związek	Bakterie tlenowe			Bakterie beztlenowe
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>
ZnGlu (1)	400	400	ND*	250
ZnGly (2)	200	ND*	ND*	100
ZnHis (3)	300	ND*	ND*	125
ZnPro (4)	300	500	ND*	250
ZnMet (5)	100	200	ND*	125
ZnTrp (6)	200	300	ND*	175
ZnPCA	200	300	ND*	175

ND*- nie ustalono wartości MIC w badanym zakresie stężeń.

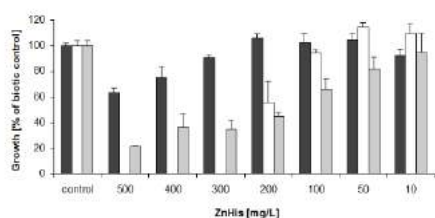
Tabela 2. Wartości minimalnego stężenia hamującego, MIC, dla związków cynku [P2].



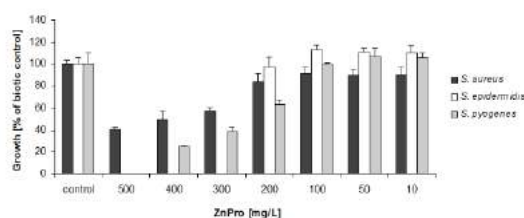
(1)



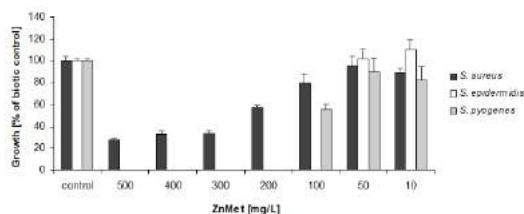
(2)



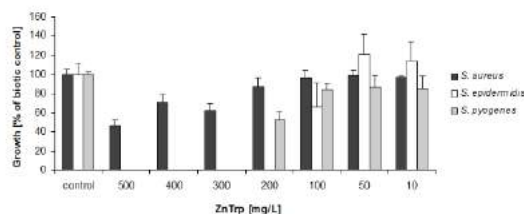
(3)



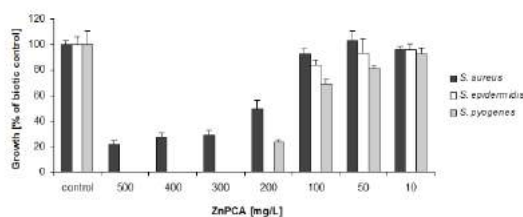
(4)



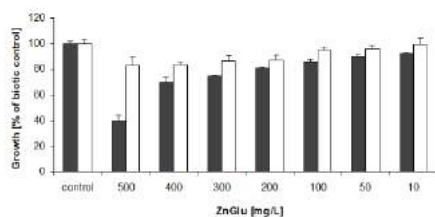
(5)



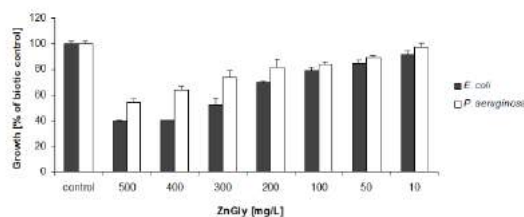
(6)



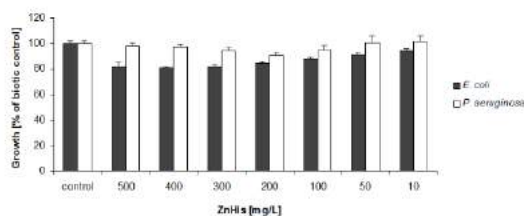
Schemat 5. Wzrost wybranych bakterii Gram-dodatnich w obecności związków cynku [P2].



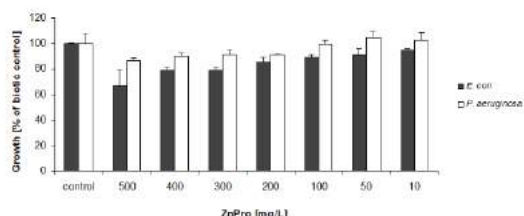
(1)



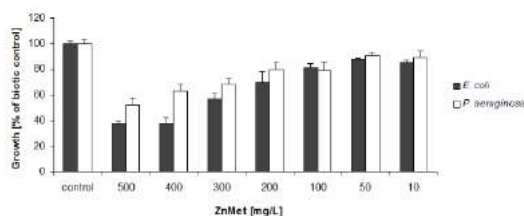
(2)



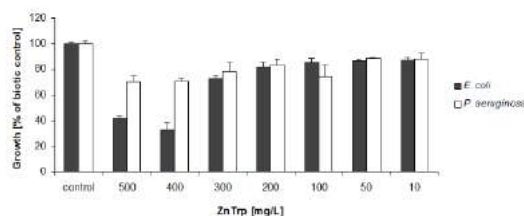
(3)



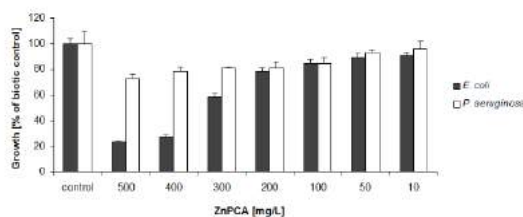
(4)



(5)



(6)



Schemat 6. Wzrost wybranych bakterii Gram-ujemnych w obecności związków cynku [P2].

Uzyskane wyniki wskazują, że kompleks ZnMet (5) posiada wyższą aktywność niż substancja referencyjna- ZnPCA. Wyznaczone wartości MIC, wynoszące 100 mg/l wobec *S. epidermidis* oraz 200 mg/l wobec *S. pyogenes*, były mniejsze niż ich odpowiednie wartości MIC dla ZnPCA (200 mg/l oraz 300 mg/l). Kompleks (5) wykazał także lepszą aktywność niż ZnPCA wobec *E. coli*. Jednakże związek (5) jest trudnorozpuszczalny w wodzie, zatem nie będzie on przedmiotem naszego zainteresowania pod kątem wyboru substancji aktywnej dla żelowych preparatów dermatologicznych, podobnie jak drugi

trudnorozpuszczalny kompleks ZnTrp (**6**), którego aktywność w stosunku do *S. epidermidis* oraz *S. pyogenes* jest identyczna jak substancji referencyjnej ZnPCA [P2].

Wyznaczone wartości MIC dla pozostałych związków (**1-4**), w stosunku do *S. epidermidis* i *S. pyogenes*, były wyższe niż dla substancji referencyjnej, z wyjątkiem wartości MIC dla związku ZnGly (**2**) wobec *S. epidermidis* wynoszącej 200 mg/l, podobnie jak dla ZnPCA. Ponadto, związek (**2**) przy stężeniu 200 mg/l, hamował w 60% i 90% wzrost odpowiednio *S. aureus* i *S. pyogenes*. Analogiczne wartości hamowania wzrostu tych bakterii przez ZnPCA były słabsze i wynosiły 50% i 75%. Dodatkowo, kompleks (**2**) wykazał silniejszą niż ZnPCA aktywność przeciwbakteryjną wobec *P. aeruginosa* [P2]. Z tych powodów, a szczególne z powodu wysokiej aktywności w stosunku do beztlenowych bakterii *C. acnes*, kompleks ZnGly (**2**) oraz kompleks ZnHis (**3**) będą przedmiotem naszego dalszego zainteresowania [P1].

Szczepy beztlenowych bakterii Gram-dodatnich, *C. acnes*, pełnią istotną rolę przy powstawaniu zmian trądzikowych [18], dlatego wybór substancji aktywnych do przygotowania preparatów przeciwtrądzikowych był w największej mierze uzależniony od zdolności hamowania wzrostu właśnie tych bakterii. Wyznaczono minimalne stężenia hamujące dla kompleksów ZnGly (**2**), ZnHis (**3**) i ZnMet (**5**) wynoszące odpowiednio 100, 125 i 125 mg/l. Wartości te były niższe od wartości MIC dla związku referencyjnego równej 175 mg/l. Zatem związki te charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną w stosunku do *C. acnes*, a w szczególności kompleks ZnGly (**2**), którego aktywność była prawie dwukrotnie silniejsza niż ZnPCA [P1]. Spośród otrzymanych związków cynku rozpuszczalnych w wodzie, o wysokiej aktywności wobec *C. acnes*, największym zainteresowaniem jako potencjalne składniki aktywne preparatów przeciwtrądzikowych będą cieszyły się kompleksy cynku z glicyną (**2**) i histydyną (**3**).

Pomimo istnienia kilkunastu substancji aktywnych stosowanych w terapii trądziku [7,8,9], wobec rosnącej antybiotykooporności bakterii *C. acnes*, poszukiwanie nowych, skutecznych pochodnych o łagodniejszym profilu dermatologicznym jest ciągle aktualną potrzebą, dlatego uzyskane wyniki stworzyły podstawę do dalszych badań. W ostatnim czasie prowadzi się liczne badania nad nowymi związkami o aktywności przeciwtrądzikowej do stosowania miejscowego [75, 76, 77], jednak wykorzystanie kompleksów cynku z aminokwasami do tej pory było badane jedynie w formie doustnej w połączeniu z antyoksydantami, jak witamina C i E [78]. Miejscowa terapia przeciw *C. acnes* z użyciem kompleksów cynku z aminokwasami nie była do tej pory prowadzona.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec rozmaitych drobnoustrojów została opisana dla licznych kompleksów metali przejściowych z aminokwasami: miedzi(II) [47,48,49,50,51] kobaltu(II) [48,49,50,51], niklu(II) [49,50], żelaza(III) [48], manganu(II) [50], kadmu(II) [50]. O ile w literaturze można znaleźć dane dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej mieszanych kompleksów cynku z aminokwasami i innymi ligandami [79,80], to nasze badania potencjału przeciwbakteryjnego [P1-P2] przyczyniły się do wypełnienia luki wiedzy dostarczając informacje dla kompleksów zawierających jedynie ligandy aminokwasowe.

3. Badania aktywności przeciwgrzybiczej kompleksów cynku (1-6) [P1].

Zbadano aktywność przeciwgrzybiczą związków cynku wobec drożdżaków (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsylosis*) i grzybów strzępkowych (*Aspergillus flavus* ATCC 9643 i *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305) w zakresie stężeń od 0 do 500 mg/l. Nie wyznaczono wartości minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC) dla badanych szczepów w badanym zakresie stężeń.

4. Badania aktywności cytotoksycznej związków kompleksowych kompleksów cynku (1-6) [P1].

Związki kompleksowe cynku (1-6) zostały zsyntezowane z myślą o ich zastosowaniu zewnętrznym, dlatego ich charakterystykę strukturalną i badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej uzupełniono o ocenę potencjalnego działania toksycznego na komórki skóry.

W warunkach *in vitro* oceniano aktywność cytotoksyczną kompleksów cynku (1-6) w odniesieniu do dwóch rodzajów prawidłowych komórek skóry ludzkiej: fibroblastów (linia komórkowa 1BR.3.N) oraz keratynocytów (linia komórek naskórka). Z uwagi na warstwową budowę skóry ludzkiej, oprócz komórek zewnętrznej warstwy skóry (keratynocytów) do badań włączono komórki występujące w głębszych warstwach skóry - fibroblasty występujące w skórze właściwej. Zbadaną aktywność cytotoksyczną wyrażono za pomocą wartości IC_{50} [μM], która określa stężenie związku cynku powodujące zahamowanie wzrostu komórek o 50%, w stosunku do wzrostu komórek kontrolnych (Tabela 3). Krzywe przeżywalności komórek skóry w zależności od stężenia zastosowanych związków cynku przedstawiono odpowiednio na schematach, odpowiednio dla fibroblastów (Schemat 7) i keratynocytów (Schemat 8).

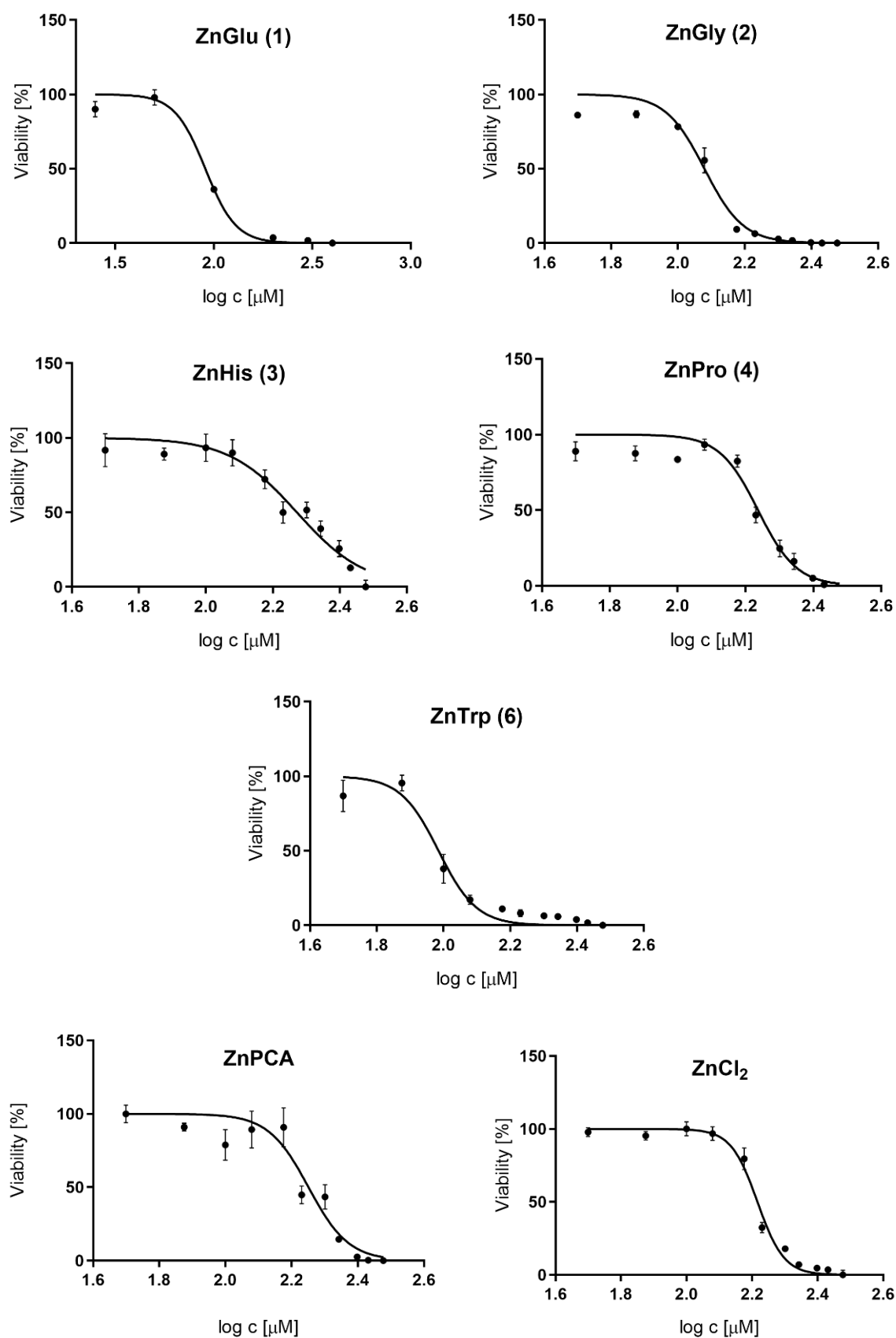
Wartości IC_{50} [μM] (średnia $\pm$ SD)		
Badany związek	Rodzaj badanych komórek skóry	
	Fibroblasty	Keratynocyty
ZnGlu (1)	87.38 $\pm$ 6.01 c*	231.17 $\pm$ 15.94 d
ZnGly (2)	119.85 $\pm$ 4.61 b	138.20 $\pm$ 8.11 be
ZnHis (3)	171.48 $\pm$ 17.02 a	102.00 $\pm$ 3.76 ac
ZnPro (4)	172.20 $\pm$ 4.00 a	157.20 $\pm$ 8.19 b
ZnMet (5)	-	-
ZnTrp (6)	94.88 $\pm$ 8.41 c	85.66 $\pm$ 14.28 c
ZnPCA**	171.73 $\pm$ 9.69 a	102.50 $\pm$ 2.07 ac
ZnCl ₂ **	162.65 $\pm$ 4.10 a	126.97 $\pm$ 4.32 ae

- nie wykryto z powodu zbyt małej rozpuszczalności w pożywce hodowlanej.

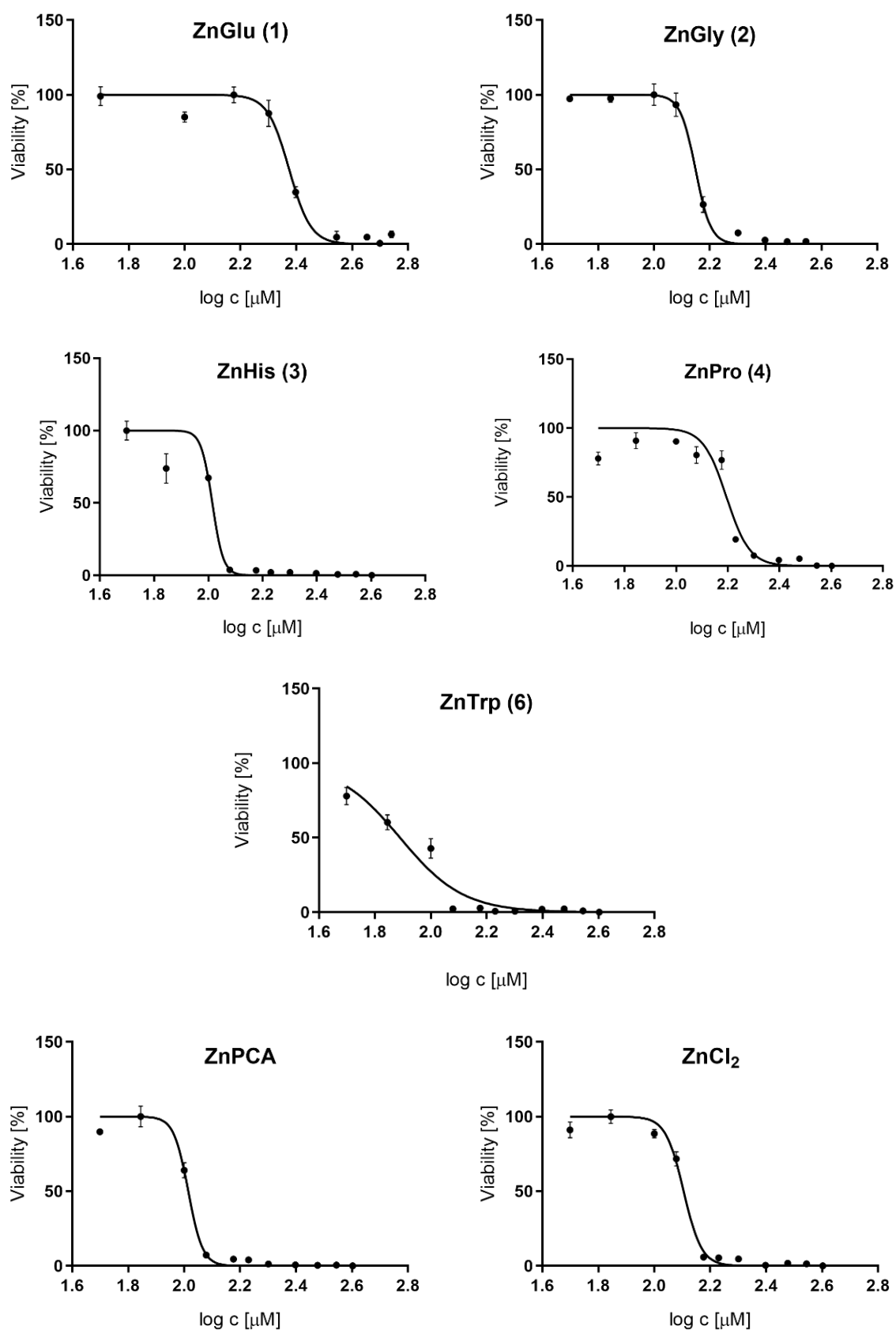
*Średnie oznaczone tą samą literą w każdej kolumnie nie różnią się istotnie pod względem statystycznym (test Kal-Wallisa Krusa-138; $p \leq 0,05$).

** substancje odnośnikowe (referencyjne).

Tabela 3. Wartości IC_{50} (średnia $\pm$ SD) dla kompleksów cynku ludzkich fibroblastów i keratynocytów [P1].



Schemat 7. Krzywe przeżywalności fibroblastów pod dodaniu kompleksów cynku (1-6) i związków referencyjnych [P1].



Schemat 8. Krzywe przeżywalności keratynocytów po dodaniu kompleksów cynku (1-6) i związków referencyjnych [P1].

Wartości IC_{50} dla kompleksów cynku wobec fibroblastów ludzkiej skóry wahały się od 87,38 do 172,20 (μM). Kompleksy ZnHis (3) i ZnPro (4) były najmniej cytotoksyczne, z podobnymi wartościami IC_{50} w stosunku do ZnPCA (171,73 μM). Wartości IC_{50} kompleksów (1), (2) i (6) były niższe niż w obu kontrolach. Toksyczność komórkowa kompleksów (1) i (6) była około 2 razy wyższa niż obu substancji referencyjnych [P1].

Wartości IC_{50} dla kompleksów cynku wobec keratynocytów mieściły się w zakresie od 85,66 do 231,17 (μM). Toksyczność kompleksów ZnGlu (1), ZnGly (2) i ZnPro (4) była znacznie niższa niż w obu kontrolach (231,17; 138,20 i 157,20 vs. 102,50 dla ZnPCA i 126,97 μM dla $ZnCl_2$). Kompleks z histydyną (3) wykazał identyczną cytotoksyczność jak związek odniesienia ZnPCA (102,50 μM). Najwyższy potencjał cytotoksyczny zanotowano dla związku (6) [P1].

Wśród badanych kompleksów cynku (1-6), tylko niektóre z nich są stosowane i to w ograniczonym zakresie [26], co może być podyktowane brakiem danych na temat ich toksyczności wobec komórek skóry. Do tej pory dokonano analizy porównawczej związku cynku z histydyną z nieorganiczną solą cynku ($ZnSO_4$) wobec prawidłowych ludzkich keratynocytów, gdzie wykazano niższą cytotoksyczność dla pochodnej organicznej [61]. Z punktu widzenia rozwoju nowych produktów, badania cytotoksyczności na odpowiednich liniach komórkowych są szczególnie istotne pod kątem oceny ich tolerancji w miejscu podania [81]. Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów (SCCS) zaznacza, że niektóre pochodne cynku, takie jak: glukonian cynku i $ZnSO_4$, cechuje wysoki potencjał cytotoksyczny [26]. W świetle naszych badań kompleksy (2-4) stanowią obiecujące substancje pod względem bezpieczeństwa aplikacji skórnej.

5. Opracowanie i badania preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Wytypowanie substancji aktywnych spośród kompleksów cynku (1-6) do przygotowania preparatów dermatologicznych było podyktowane wysoką aktywnością przeciwbakteryjną związków wobec beztlenowych szczepów *C. anes* oraz niską cytotoksycznością wobec komórek skóry.

W grupie substancji o najwyższej aktywności przeciw *C. anes* znalazły się kompleksy z glicyną (2), histydyną (3) oraz metioniną (5). Ponieważ planowano przygotowanie preparatów dermatologicznych o dużej zawartości wody oraz pozbawionych fazy tłuszczowej, istotnym parametrem była dobra rozpuszczalność substancji aktywnej w wodzie. I właśnie z powodu niskiej rozpuszczalności w wodzie kompleksu (5), związek ten wyeliminowano z dalszych badań.

Analiza aktywności cytotoksycznej wobec komórek skóry pozwoliła wyłonić kompleksy z glicyną (2), histydyną (3) oraz proliną (4) jako pochodne o największym bezpieczeństwie zarówno dla keratynocytów, jak i fibroblastów skóry ludzkiej. Zważywszy jednak na niską aktywność kompleksu ZnPro (4) wobec bakterii *C. anes*, kompleks ten nie został wybrany do dalszych etapów badań.

Ostatecznie, po uwzględnieniu wyników badań *in vitro*: cytotoksyczności na obu typach komórek skóry oraz wyników badań aktywności przeciwbakteryjnej wobec *C. anes*, wytypowano do dalszych badań dwa związki o optymalnych właściwościach. Były nimi kompleksy cynku z glicyną (2) i z histydyną (3). Z udziałem związków: ZnGly (2) i ZnHis (3), jako substancji aktywnych, przystąpiono do opracowania oryginalnych receptury preparatów dermatologicznych, które następnie poddano badaniom stabilności i mikrobiologicznym.

5.1. Opracowanie oryginalnych receptury preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Opracowano oryginalne receptury preparatów w formie żelu. Wśród trzech stworzonych preparatów wyróżniono: dwa zawierające substancje aktywne [preparat A z udziałem 0,66% ZnGly (2) i preparat B zawierający 1,27% ZnHis (3)] oraz trzeci preparat placebo C (bez substancji czynnej). Preparaty (A) i (B) miały zawierać taki sam ekwiwalent molowy cynku, jaki zawarty jest w 1% ZnPCA. I tak, w 1 molu 1% ZnPCA jest 0,2022 g cynku, stąd zawartości procentowe związków ZnGly (2) i ZnHis (3) w preparatach wynoszą odpowiednio 0,66% i 1,27%. Składy poszczególnych preparatów (A-C)

zamieszczono w tabeli (Tabela 4). Wyznaczone stężenia kompleksów cynku (2) i (3) w preparatach przewyższają wartości MIC dla poszczególnych substancji aktywnych w stosunku do *C. acnes*, co zapewnia efektywność preparatów przeciw bakteriom *C. acnes* po aplikacji skórnej [P1].

Składnik	Oznaczenie preparatu		
	A	B	C
woda demineralizowana	do 100,00 g	do 100,00 g	do 100,00 g
lota-karagen	2,00 g	2,00 g	2,00 g
fenoksyetanol : etyloheksylogliceryna (9:1)	1,00 g	1,00 g	1,00 g
ZnGly (2)	0,66 g	NA*	NA*
ZnHis (3)	NA*	1,27 g	NA*
2,50% roztwór kwasu cytrynowego	14,76 g	22,75 g	0,52 g

NA* - nie dotyczy.

Tabela 4. Skład ilościowo-jakościowy opracowanych preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Składy preparatów w formie żelu oraz stężenia poszczególnych substancji dobrano z myślą o ich przyszłej aplikacji na skórę trądzikową. Koncepcja preparatów była wzorowana na połączeniu ZnPCA z oligosacharydami pozyskanymi z alg morskich, dla którego wykazano skuteczność przeciwtrądzikową w warunkach klinicznych [27].

Ze względu na obecność stanu zapalnego i wysokiej wrażliwości skóry trądzikowej [22], w formułacjach (A-C) unikano składników o wysokim potencjalnie uczulającym. Dla wszystkich preparatów wybrano odpowiedni układ konserwujący (1% Euxyl PE 9010: fenoksyetanol (PE) i etyloheksyloglicerynę (EHG) w stosunku masowym 9:1). Konserwant ten cechuje niski potencjał uczulający i jednocześnie wysokie bezpieczeństwo nawet wobec skóry wrażliwej [82,83,84]. Mając na uwadze na fakt, że cera trądzikowa cechuje się wzmożonym wydzielaniem sebum [85], zdecydowano się na opracowanie formuł pozbawionych fazy tłuszczowej. Jako substancji żelotwórczej użyto lota-karagenu, który jest mieszaniną liniowych sulfonowanych polisacharydów ekstrahowanych z wodorostów morskich klasy *Rhodophyceae* [86]. Ten naturalny zagęstnik tworzy ochronną powłokę na skórze i posiada właściwości przeciwzapalne [87], co powinno przynieść dodatkowe korzyści przy terapii skóry trądzikowej.

Z powodu wzrostu pH skóry w przebiegu trądziku [88] oraz konieczności zapewnienia optymalnego pH preparatu z zastosowanym układem konserwującym założono, że pH formułacji (A-C) powinno się mieścić w przedziale 5,00-5,50, co umożliwi przywrócenie skórze odpowiedniego pH oraz zapewni pożądaną aktywność przeciwdrobnoustrojową przez układ konserwujący [89].

5.2. Badania fizykochemiczne preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Przeprowadzono ocenę stabilności fizykochemicznej wszystkich opracowanych preparatów oceniając takie parametry jak: pH, gęstość i lepkość z częstotliwością raz w tygodniu, przez okres 6 tygodni. Zarówno przechowywanie preparatów, jak i pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej. Każdy z pomiarów został powtórzony 3-krotnie.

W ciągu całego cyklu pomiarów fizykochemicznych nie zaobserwowano znaczących odchyleń wartości żadnego z ocenianych parametrów. Dla preparatów nie zaobserwowano żadnych cech niestabilności, takich jak zmiana koloru, zapachu, wytrącenie osadu. Preparaty uznano za stabilne w temperaturze pokojowej przez okres co najmniej 6 tygodni. Zestawienie zakresów wartości

poszczególnych parametrów fizykochemicznych z całego 6-tygodniowego badania zamieszczono w tabeli (Tabela 5).

Badana formuła	kolor, zapach	pH	gęstość [g/cm ³]	lepkość [cP]
A	żółtawy, bez zapachu	5,23 - 5,36	1,0031 - 1,0047	75610 - 83426
B	żółtawy, bez zapachu	5,31 - 5,41	0,9785 - 0,9929	149703 - 160466
C	żółtawy, bez zapachu	5,23 - 5,36	1,0105 - 1,0137	957,7 - 1104,7

Tabela 5. Zestawienie zakresów wartości poszczególnych parametrów fizykochemicznych dla preparatów dermatologicznych (A-C).

Poszczególne preparaty posiadały bardzo podobne wartości odpowiednich parametrów fizykochemicznych, z wyjątkiem lepkości. We wszystkich preparatach zastosowano ten sam typ substancji żelującej (2,00% Iota-karagen), jednak zaobserwowano wyraźny wzrost lepkości dla preparatów (A) i (B) zawierających kompleksy (2) i (3), jako substancje aktywne. Lepkość preparatu placebo (C) ($\eta = 957,7 - 1104,7$) była znacznie niższa niż dla preparatów (A) i (B), dla których mieściła się odpowiednio w zakresach 75610 - 83426 i 149703 - 160466 [cP].

Uzyskane różnice lepkości sugerują, że wprowadzenie odpowiednich kompleksów cynku(II) do formuł (A) i (B) prowadziło do znacznego wzrostu lepkości. Warto zaznaczyć, że preparaty (A) i (B) zawierające substancje aktywne (2) i (3) zawierały równomolową ilość cynku odpowiadającą 0,2022 g cynku, jednak w poszczególnych kompleksach metal ten był związany z różnymi ligandami odpowiednio glicyną (2) oraz histydyną (3). Na podstawie tych obserwacji można wnioskować, że na wzrost lepkości preparatów (A) i (B) w stosunku do preparatu (C) miały wpływ dwa czynniki: obecność kompleksu metalu i rodzaj związanych z nim ligandów.

W literaturze istnieją doniesienia o wzroście lepkości żelu karagenowego w obecności niektórych jonów metali (Y^{3+} i Pb^{2+}) na skutek tworzenia dodatkowych wiązań (kowalencyjnych i jonowych) między jonami metali a cząsteczkami karagenów [90]. Wykazano, że obecność jonów dwuwartościowych (Ca^{2+}) pozwala utworzyć dodatkowe wiązania pomiędzy nimi a długimi, liniowymi łańcuchami sulfonowanych polisacharydów dzięki czemu żel zawierający Iota-karagen uzyskuje trójwymiarową strukturę z jednoczesnym wzrostem lepkości [91]. Na podstawie uzyskanych wyników, przypuszcza się, że podobnego rodzaju oddziaływania mogły również powstać po dodaniu związków kompleksowych cynku (2) i (3). Preparat (B), zawierający 1,27% ZnHis, charakteryzował się około 2-krotnie większą lepkością niż preparat (A), zawierający 0,66% ZnGly. W każdym z preparatów zawartość jonów cynku była identyczna, zatem na wzrost lepkości preparatów musi wpływać nie tylko obecność jonów cynku, lecz przede wszystkim obecność odpowiednich ligandów. Nie wykluczone, że to właśnie obecność w cząsteczce ligandów ugrupowań, $-NH_2$ i $-NH-$ w pierścieniu imidazolowym, zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych z uwodnionym karagenem odpowiada za wyższą lepkość preparatu (B). Jest to jednak zagadnienie złożone, które wymaga dalszych badań.

5.3. Badania mikrobiologiczne preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Badania mikrobiologiczne opracowanych preparatów składały się z badań czystości mikrobiologicznej oraz badań ochrony przeciwdrobnoustrojowej. Badania te są wymagane dla każdego nowego produktu kosmetycznego. Wyjątek od tej reguły stanowią produkty o tzw. o niskim ryzyku mikrobiologicznym, które nie stwarzają sprzyjających warunków do rozwoju drobnoustrojów, np. silnie

kwasowe lub zasadowe pH, preparaty o niskiej zawartości wody czy te oparte na rozpuszczalnikach organicznych [92].

5.3.1. Ocena czystości mikrobiologicznej preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Badania czystości mikrobiologicznej zostały przeprowadzone dla preparatów (A-C) według obowiązujących dla produktów kosmetycznych norm ISO. Wykaz obowiązujących norm ISO zamieszczono części dotyczącej zastosowanej metodologii (1.5.2.1. Ocena czystości mikrobiologicznej preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].).

Chociaż produkty kosmetyczne nie muszą być jałowe, to spełnianie kryterium czystości mikrobiologicznej jest bardzo istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa stosowania preparatu [93]. Pomimo istnienia norm determinujących czystość mikrobiologiczną, wykazano, że wiele produktów kosmetycznych obecnych na rynku jest zakażonych różnymi drobnoustrojami, wliczając w to patogeny [94].

Opracowane preparaty (A-C) spełniły kryteria czystości mikrobiologicznej przewidziane dla produktów kosmetycznych zgodnie z obowiązującym standardem ISO. Limity czystości mikrobiologicznej nie zostały przekroczone. Potwierdzono, że testowane preparaty były pozbawione kluczowych patogenów skóry takich jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Potwierdzenie czystości mikrobiologicznej preparatów pozwoliło na przystąpienie do wykonania testu skuteczności ochrony przeciwdrobnoustrojowej [P1].

Protokoły z badań dla poszczególnych preparatów (A-C) stanowią załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S1–S3).

5.3.2. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej preparatów dermatologicznych (A-C) [P1].

Dla opracowanych preparatów przeprowadzono testy konserwacji, tzw. *challenge tests*. Badane preparaty wykazały skuteczność ochrony przeciwdrobnoustrojowej na najwyższym poziomie, spełniając zalecane kryteria skuteczności (kryteria A) dla preparatów do stosowania na skórę zgodnie z normą Ph. Eur. 10.0 [P1]. Dane literaturowe wskazują, że zapewnienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego dla preparatów jest niezbędne [95]. Testy ochrony przeciwdrobnoustrojowej powinny być wykonane przed udostępnieniem preparatu do stosowania, aby wykluczyć ryzyko wtórnego zakażenia drobnoustrojami [96]. Dzięki potwierdzeniu skuteczności właściwości konserwujących poszczególnych preparatów, potwierdzono zdolność ochrony preparatu przed zakażeniem podczas użytkowania i przechowywania.

W badaniach typu *challenge test* nie wykazano różnic pomiędzy poszczególnymi preparatami (A-C), gdyż już po pierwszym odczycie redukcja liczby drobnoustrojów dla bakterii ($T_{2\text{ dni}}$) oraz grzybów ($T_{14\text{ dni}}$) była na najwyższym poziomie. Wynika to z silnego działania przeciwdrobnoustrojowego zastosowanej mieszaniny konserwującej, obejmującej PE i EHG w stosunku wagowym 9:1 [P1]. Działanie przeciwdrobnoustrojowe fenoksyetanolu jest bardzo dobrze udokumentowane [82], dlatego jest on powszechnie stosowany jako konserwant w stężeniu do 1,00% [97]. Sama aktywność przeciwdrobnoustrojowa EHG jest dość niska, jednak wykazano jej zdolność do wzmacniania działania przeciwdrobnoustrojowego typowych konserwantów, jak PE, metyloizotiazolinon (MIT) czy parabeny [98]. Wykorzystując synergistyczne działanie obydwu składników, PE i EHG, zastosowany układ konserwujący zapewnił maksymalny stopień ochrony przed szczepami drobnoustrojów testowych. Zgodnie ze z normą Ph. Eur. 10.0, przy spełnieniu kryterium A, nie są wymagane dodatkowe środki zabezpieczające produkt przed zakażeniem drobnoustrojami.

Chociaż działanie przeciwdrobnoustrojowe pochodnych cynku jest dobrze opisane [15,16,74], to aby odpowiedzieć na pytanie, czy związki kompleksowe cynku z aminokwasami (1-6) mogą wzmacniać działanie tradycyjnych konserwantów, potrzebne byłyby dalsze badania. Zastosowanie niższego

stężenia tradycyjnej mieszaniny konserwującej w połączeniu z opisywanymi pochodnymi cynku (**1-6**) pozwoliłoby ocenić siłę działania przeciwdrobnoustrojowego takiego układu. A w przypadku pozytywnych rezultatów kolejnym etapem mogłoby być testowanie w tym kierunku samych kompleksów cynku (**1-6**).

Protokoły z badań dla poszczególnych preparatów (**A-C**) stanowią załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S4–S6).

Podsumowanie osiągniętych wyników

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono syntezę, charakterystykę strukturalną, badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz cytotoksyczności wobec linii komórkowych skóry dla kompleksów cynku(II) z wybranymi aminokwasami.

Spośród przebadanych kompleksów cynku(II) wytypowano dwa związki, które posłużyły jako składniki aktywne do przygotowania przeciwtwardzikowych preparatów dermatologicznych. Potwierdzono stabilność fizykochemiczną, czystość mikrobiologiczną oraz skuteczność przeciwdrobnoustrojową zastosowanego układu konserwującego. Szczegółowe rezultaty badań podano poniżej.

Część I: dotyczy badań kompleksów cynku (II) z aminokwasami (1-6):

- ❖ Zsyntetyzowano serię kompleksów cynku(II) o wzorze ogólnym $[Zn(AA)_2]$ z następującymi aminokwasami (AA: L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met i L-Trp.) [P2];
- ❖ Syntezy związków kompleksowych cynku(II) z wybranymi aminokwasami $[Zn(AA)_2]$ zaprojektowano w taki sposób, aby produkty nie zawierały nieorganicznych przeciwjonów (anionów typu Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}), mogących stanowić potencjalny czynnik drażniący skórę [P2];
- ❖ Opracowano dwie efektywne metody syntezy dla powyższych kompleksów; pierwsza pozwalająca na otrzymanie i dogodne wyizolowanie z mieszaniny reakcyjnej kompleksów o wysokiej rozpuszczalności w wodzie, druga dla kompleksów o bardzo niskiej rozpuszczalności w wodzie [P2];
- ❖ Zaproponowano budowę cząsteczkową kompleksów cynku(II) bazując na wynikach spektroskopii protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (1H NMR), rentgenowskich analiz strukturalnych monokryształów (XRD) oraz analiz pierwiastkowych (EA) na obecność C, H i N [P2];
- ❖ Ustalono struktury krystaliczne czterech kompleksów cynku(II), z glicyną (**2**), histydyną (**3**), prolina (**4**) oraz metioniną (**5**), za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów [P2];
- ❖ Określono aktywność przeciwbakteryjną *in vitro* kompleksów cynku(II) w stosunku do wybranych tlenowych szczepach bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 oraz *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) i Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25992 oraz *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) i porównano z aktywnością związku referencyjnego ZnPCA (2-pirolidyno-5-karboksylanu cynku) [P2];
- ❖ Wykazano, że kompleksy cynku(II) z glicyną (**2**) oraz z metioniną (**5**) cechuje wyższa aktywność przeciwbakteryjna niż substancji referencyjnej ZnPCA. Aktywność pozostałych kompleksów była niższa [(**1**) i (**4**)] lub porównywalna [(**3**) i (**6**)] do aktywności ZnPCA [P2];
- ❖ Oceniono cytotoksyczność kompleksów cynku(II) na ludzkich komórkach skóry: fibroblastach (linia komórkowa 1BR.3.N) i keratynocytach (linia komórek naskórka) i porównano z aktywnością substancji referencyjnych: $ZnCl_2$ oraz ZnPCA [P1];
- ❖ Wobec keratynocytów kompleksy (**1**, **2**, **4**) mają niższą toksyczność niż substancje referencyjne, zaś kompleks (**3**) wykazuje taką samą toksyczność jak ZnPCA [P1];
- ❖ Wykazano, że kompleksy (**3**) i (**4**) cechowała prawie identyczna toksyczność wobec fibroblastów skóry w porównaniu z odnośnikami [P1];
- ❖ Określono aktywność przeciwbakteryjną *in vitro* kompleksów cynku (**1-6**) wobec beztlenowych szczepów bakterii *C. acnes* [P1];

- ❖ Wykazano, że kompleksy z glicyną (**2**), z histydyną (**3**) oraz z metioniną (**5**) najsilniej hamują wzrost *C. acnes*. Wartość MIC dla związku (**2**) była około dwukrotnie wyższa niż wartość MIC odnośnika ZnPCA [P1];
- ❖ Wykazano brak aktywności przeciwgrzybiczej *in vitro* kompleksów cynku wobec drożdżaków (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsylosis*) i grzybów strzępkowych (*Aspergillus flavus* ATCC 9643 i *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305) [P1].

Część II: dotyczy badań preparatów dermatologicznych (A-C):

- ❖ Do przygotowania preparatów dermatologicznych wytypowano dwa kompleksy cynku(II): z glicyną ZnGly (**2**) oraz z histydyną ZnHis (**3**), czyli związki dobrze rozpuszczalne w wodzie o najwyższej aktywności przeciwbakteryjnej wobec *C. acnes* oraz niskiej toksyczności wobec fibroblastów skóry i keratynocytów [P1];
- ❖ Opracowano trzy oryginalne formułacje dermatologiczne o konsystencji żelu (z kompleksem ZnGly (**A**); z kompleksem ZnHis (**B**), placebo (**C**)) [P1];
- ❖ Potwierdzono stabilność fizykochemiczną preparatów dermatologicznych w temperaturze pokojowej dowodząc stałości analizowanych parametrach fizykochemicznych (pH, gęstość, lepkość) w okresie 6-tygodni [P1];
- ❖ Potwierdzono czystość mikrobiologiczną wszystkich preparatów zgodnie z obowiązującymi normami PN-EN ISO dla produktów kosmetycznych [P1];
- ❖ Udowodniono najwyższą skuteczność zastosowanej ochrony przeciwdrobnoustrojowej układu konserwującego (kryterium A) dla wszystkich formułacji zgodnie z wymaganiami Farmakopei Europejskiej 10.0 [P1];
- ❖ Wykluczono istnienie negatywnych interakcji substancji aktywnych (**2**) i (**3**) z zastosowanym układem konserwującym (mieszanina Phenoxyethanol i Ethylhexylglycerin w stosunku wagowym 9:1) [P1].

Perspektywy i plany na przyszłość

Opisane powyżej wyniki badań stanowią wstęp do większego zainteresowania kompleksami cynku z aminokwasami w preparatach przeciwtrądzikowych. Do uzyskania pełnej charakterystyki aktywności przeciwtrądzikowej zasadne byłoby przeprowadzenie badań *in vivo* z udziałem probantów różnym nasileniu trądziku pospolitego. Cennym byłoby także sprawdzenie czy siła działania tych związków może zostać porównana do stosowanych obecnie antybiotyków. Porównanie takie mogłoby przyczynić się do ograniczenia nadużywania antybiotykoterapii w terapii trądziku, pozostawiając użycie antybiotyków jedynie w razie zdecydowanej konieczności. Jako, że przygotowane preparaty dermatologiczne (**A-C**) miały formę żelu o wysokiej zawartości wody, ciekawym kierunkiem byłoby sprawdzenie stabilności fizykochemicznej również innych form preparatów, na przykład w postaci emulsyjnej oraz serum lipidowego.

Jak już wspomniano w rozdziale „5.3.2. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej preparatów dermatologicznych (**A-C**)”, cennym wydaje się także sprawdzenie, czy pochodne te mogłyby znaleźć zastosowanie jako substancje wspomagające działanie tradycyjnych konserwantów. Koncepcja stworzenia mieszanin omawianych kompleksów z innymi substancjami wzmacniającymi działanie konserwujące, nie będącymi jednak typowymi konserwantami, również może być ciekawym pomysłem.

Nie mniej interesującym wydaje się przebadanie kompleksów cynku pod kątem innych rodzajów aktywności, np. w kierunku działania antyoksydacyjnego, przeciwnowotworowego, przeciwzmarszczkowego czy zmniejszającego zmiany hiperpigmentacyjne skóry.

Streszczenie

Trądzik pospolity występuje nawet u 95% nastolatków i często wymaga wdrożenia antybiotykoterapii ogólnoustrojowej lub miejscowej. W obliczu nieustannie rosnącej antybiooporności bakterii uznawanych za powstawanie trądziku pospolitego (*Cutibacterium acnes*) poszukiwanie nowych substancji aktywnych o działaniu przeciwbakteryjnym staje się kwestią priorytetową. W terapii trądziku wykorzystywane są doustne substancje lecznicze, m.in. antybiotyki (limecyklina, doksycyklina, erytromycyna, tetracyklina-HCl) i retinoidy (izotretynoina), których stosowanie wiąże się z wystąpieniem ogólnoustrojowym działań niepożądanych. Z uwagi na wysoki stopień wrażliwości skóry w przebiegu trądziku, substancje stosowane miejscowo mogą wywoływać podrażnienia skóry, jak w przypadku nadtlenu benzoilu i kwasu azelainowego.

Moje zainteresowanie związkami cynku wynikało z dużego znaczenia, jakie spełniają one w produktach kosmetycznych stanowiących podstawę pielęgnacji cery trądzikowej. Niektóre ze związków cynku posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Pomimo, że związki kompleksowe cynku wykazują niższą toksyczność wobec komórek skóry niż aktualnie stosowane pochodne, to ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa nie była zbadana. Na chwilę obecną, substancje te wykorzystane są jako składniki suplementów diety u ludzi, w żywieniu zwierząt czy jako katalizatory reakcji chemicznych. Co istotne, dotychczas nie badano ich aktywności przeciwbakteryjnej. W świetle tych danych, celem niniejszej pracy doktorskiej stało się poszukiwanie nowych składników aktywnych preparatów dermatologicznych o niższej cytotoksyczności wobec komórek skóry oraz wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej wobec bakterii *C. acnes*. Do swoich badań wybrałem otrzymanie nowej grupy pochodnych z puli związków cynku, którymi są związki kompleksowe cynku z aminokwasami.

Zsyntetyzowano serię związków kompleksowych cynku z wybranymi aminokwasami (L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met i L-Trp) o ogólnym wzorze $Zn(AA)_2$. Związki kompleksowe nie zawierały nieorganicznych anionów, które mogłyby stanowić potencjalny czynnik drażniący skórę. W zależności od rozpuszczalności reagentów w wodzie, opracowano dwie metody syntez: dla kompleksów dobrze rozpuszczalnych w wodzie (ZnGlu, ZnGly, ZnHis, ZnPro) oraz dla kompleksów trudnorozpuszczalnych w wodzie (ZnMet, ZnTrp).

Wszystkie otrzymane związki kompleksowych cynku(II) scharakteryzowano pod względem strukturalnym z użyciem spektroskopii protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (1H NMR) oraz analizy elementarnej na obecność C, H i N. Budowę cząsteczek kompleksów (ZnGly, ZnHis, ZnPro, ZnMet) potwierdzono analizą rentgenostrukturalną uzyskanych monokryształów.

Oceniono aktywność przeciwbakteryjną otrzymanych związków kompleksowych cynku w stosunku do wybranych szczepów bakterii Gram-dodatnich tlenowych (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) i beztlenowych (*Cutibacterium acnes* ATCC 6919), Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25992, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) w porównaniu do substancji referencyjnej, ZnPCA, stosowanej w dermatologii jako środek przeciwbakteryjny. Dla wszystkich badanych szczepów bakterii wyznaczono zależność ich wzrostu od stężenia zastosowanego związku cynku. Dla niektórych szczepów wyznaczono dodatkowo wartości minimalnego stężenia hamującego – MIC. Aktywność przeciwbakteryjna kompleksów ZnMet i ZnGly była wyższa niż związku referencyjnego wobec Gram-dodatnich tlenowych szczepów bakterii, zaś wobec beztlenowych szczepów *C. acnes* kompleksy ZnGly, ZnHis oraz ZnMet wykazały silniejsze działanie przeciwbakteryjne niż ZnPCA.

W toku dalszej analizy biologicznej oceniono aktywność cytotoksyczną kompleksów cynku w odniesieniu do dwóch rodzajów prawidłowych komórek skóry ludzkiej: fibroblastów (linia komórkowa 1BR.3.N) oraz keratynocytów (linia komórek naskórka) wobec dwóch substancji odnośnikowych ZnCl_2 oraz ZnPCA. Trzy kompleksy (ZnGlu, ZnGly, ZnPro) wykazały niższą toksyczność wobec keratynocytów niż substancje odnośnikowe. W przypadku fibroblastów skóry tylko kompleks ZnHis okazał się być mniej toksyczny niż substancje odnośnikowe.

Kierując się najniższą toksycznością wobec komórek skóry oraz najwyższą aktywnością przeciwbakteryjną wobec beztlenowych szczepów *C. acnes*, wyselekcjonowano dwa kompleksy (ZnGly) i (ZnHis) o optymalnych właściwościach. Z udziałem tych związków opracowano oryginalne receptury preparatów dermatologicznych, w których stężenia substancji aktywnych wynosiły: ZnGly 0,66% dla ZnGly i 1,27% dla ZnHis. Zastosowane ilości substancje aktywnych - (ZnGly) i (ZnHis) - zawierały identyczny ekwiwalent molowy jonów Zn^{2+} jaki jest w 1% ZnPCA. Dla tych preparatów oraz preparatu placebo potwierdzono czystość mikrobiologiczną zgodnie z obowiązującymi normami ISO dla produktów kosmetycznych. Kolejno zbadano stabilność preparatów prowadząc pomiary parametrów fizykochemicznych (pH, gęstości i lepkości) przez 6 tygodni. W następnym etapie badań wykazano najwyższą skuteczność zastosowanej ochrony przeciwdrobnoustrojowej preparatów zgodnie z wymaganiami Farmakopei Europejskiej 10.0. Nie wykazano także negatywnych interakcji substancji aktywnych (ZnGly) i (ZnHis) z wybranym układem konserwującym (mieszanina fenoksyetanol i etyloheksylogliceryna w stosunku wagowym 9:1).

Podsumowując, przeprowadzone badania pokazują, że związki kompleksowe cynku z aminokwasami, w szczególności związki ZnGly i ZnHis, mogłyby być wykorzystane jako nowe składniki aktywne preparatów dermatologicznych w terapii trądziku pospolitego.

Summary

Acne vulgaris affects up to 95% of adolescents and often requires the implementation of systemic or local antibiotic therapy. In view of the constantly growing antibiotic resistance of the bacterial acne-trigger (*Cutibacterium acnes*), the search for new active substances with antibacterial properties becomes the priority. The oral treatment of acne is based on the use of antibiotics (limecycline, doxycycline, erythromycin, tetracycline-HCl) and retinoids (isotretinoin), the utilization of which is associated with the occurrence of systemic side effects. Moreover, due to the high degree of skin sensitivity in acne, the topical substances may cause the skin irritation, as in the case of benzoyl peroxide and azelaic acid.

My interest in zinc compounds resulted from the great importance they play in cosmetic products constituting the basis of acne skin care. Some of the zinc compounds have antimicrobial properties. Although zinc complexes show lower toxicity to skin cells than the currently used derivatives, their antimicrobial activity has not been investigated. At present, these substances are used as ingredients in dietary supplements in humans, in animal nutrition or as catalysts for some chemical reactions. Importantly, their antibacterial activity has not been studied so far. In the light of these data, the aim of this doctoral thesis was to search for new active ingredients of dermatological preparations with lower cytotoxicity against skin cells and high antibacterial activity against *C. acnes* bacteria. For my research, I chose to obtain a new group of derivatives from the pool of zinc compounds, which are complex compounds of zinc with amino acids.

A series of zinc complex compounds with a few selected amino acids (L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met and L-Trp) with the general formula $\text{Zn}(\text{AA})_2$ was synthesized. The complex compounds did not contain any inorganic anions that could be a potential skin irritant. Depending on the solubility of the reagents in water, two methods of synthesis have been developed: the first for the complexes that are highly soluble in water (ZnGlu, ZnGly, ZnHis, ZnPro) and the second for those that are difficult to dissolve in water (ZnMet, ZnTrp).

All obtained zinc(II) complex compounds were structurally characterized using the proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy and elemental analysis for the presence of C, H and N. The structure of the complex particles (ZnGly, ZnHis, ZnPro, ZnMet) was confirmed by X-ray structure analysis of the obtained single crystals.

The antibacterial activity of the obtained zinc complex compounds against the selected strains of aerobic Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) and anaerobic (*Cutibacterium acnes* ATCC 6919) and Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25992, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) compared to the reference substance, ZnPCA, used in dermatology as an antimicrobial agent. For all tested bacterial strains, the dependence of their growth on the concentration of the zinc compound used was determined. For some strains, the values of the minimum inhibitory concentration - MIC were additionally determined. The antimicrobial activity of the ZnMet and ZnGly complexes was higher than for the reference compound against Gram-positive aerobic bacterial strains, and against anaerobic strains of *C. acnes*, the ZnGly, ZnHis and ZnMet complexes showed stronger antibacterial activity than ZnPCA.

In the course of further biological analysis, the cytotoxic activity of zinc complexes was assessed against two types of normal human skin cells: fibroblasts (1BR.3.N cell line) and keratinocytes (epidermal cell line) against two reference substances ZnCl_2 and ZnPCA. The three complexes (ZnGlu, ZnGly, ZnPro) showed lower toxicity to keratinocytes than both reference substances. In the case of skin fibroblasts, only the ZnHis complex was shown to be less toxic than the reference substances.

Considering the lowest toxicity towards skin cells and the highest antibacterial activity against anaerobic strains of *C. acnes*, two complexes, namely (ZnGly) and (ZnHis) with optimal properties were selected. With the use of these compounds, the original dermatological preparations were developed, in which the concentrations of active substances were as follow: ZnGly 0.66% for ZnGly and 1.27% for ZnHis. The amount of active substances used - (ZnGly) and (ZnHis) - constituted the same molar equivalent of Zn^{2+} ions as present in 1% ZnPCA. For these two and the placebo preparations, the microbiological purity was confirmed in accordance with the current ISO standards for cosmetic products. The stability of these preparations was tested in turn by measuring a few physicochemical parameters (including pH, density and viscosity) for 6 weeks. In the next stage of the research, the highest effectiveness of the applied preservative system of each preparation was demonstrated, in accordance with the requirements of the European Pharmacopoeia 10.0. There were also no negative interactions of the active substances (ZnGly) and (ZnHis) with the selected preservative system (a mixture of Phenoxyethanol and Ethylhexylglycerin in a weight ratio of 9:1).

Summing up, the conducted research shows that zinc complexes with amino acids, in particular ZnGly and ZnHis compounds, could be used as the new active ingredients of dermatological preparations in the treatment of acne vulgaris.

Podziękowania

Składam najserdeczniejsze podziękowania Pani dr hab. n. farm. Urszuli Annie Kalinowskiej-Lis, prof. UM, będącej Promotorem niniejszej rozprawy doktorskiej za nieocenioną pomoc w przygotowaniu badań, cenne uwagi merytoryczne oraz chęć współpracy i życzliwość w trakcie realizacji poszczególnych etapów pracy.

Dziękuję bardzo Pani prof. dr hab. n. farm. Elżbiecie Budzisz za życzliwość, otwarcie na współpracę i motywowanie do przeprowadzania kolejnych etapów pracy.

Dziękuję również wszystkim współautorom za zaangażowanie, okazaną pomoc i cenne uwagi, które przyczyniły się niewątpliwie do podniesienia wartości merytorycznej niniejszej pracy.

Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu Chemii Surowców Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za pomoc, życzliwość i przyjazną atmosferę pracy.

Serdecznie podziękowania składam również mojej rodzinie i moim przyjaciołom, a w szczególności Tomkowi, Martynie i Damianowi za wsparcie, motywację oraz wyrozumiałość. Niezmiennie się cieszę, że byliście ze mną przez cały ten czas.

Wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy serdecznie dziękuję.

Niniejszą rozprawę doktorską dedykuję swojej matce, która jako nauczyciel chemii zaszczerpiła we mnie zainteresowanie tą niesamowitą dziedziną wiedzy.

Piśmiennictwo

- ¹ Conforti, C.; Giuffrida, R.; Fadda, S.; Fai, A.; Romita, P.; Zalaudek, I.; Dianzani, C. Topical dermocosmetics and acne vulgaris. *Dermatol Ther.* 2020, Oct 20, e14436
- ² Hon, K. L., Kung, J., Ng, W., & Leung, T. F. (2018). Emollient treatment of atopic dermatitis: latest evidence and clinical considerations. *Drugs in context*, 7, 212530. <https://doi.org/10.7573/dic.212530>
- ³ Torsekar, R., & Gautam, M. M. (2017). Topical Therapies in Psoriasis. *Indian dermatology online journal*, 8(4), 235–245. <https://doi.org/10.4103/2229-5178.209622>
- ⁴ Kraft, J., & Freiman, A. (2011). Management of acne. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 183(7), E430–E435. <https://doi.org/10.1503/cmaj.090374>
- ⁵ Gupta, M., Mahajan, V. K., Mehta, K. S., & Chauhan, P. S. (2014). Zinc therapy in dermatology: a review. *Dermatology research and practice*, 2014, 709152. <https://doi.org/10.1155/2014/709152>
- ⁶ Biegaj M. Trądzik powszechnie i jego leczenie. *Kosmetologia Estetyczna*, 2, 2017, 155-158.
- ⁷ Zaenglein, A. L., Pathy, A. L., Schlosser, B. J., Alikhan, A., Baldwin, H. E., Berson, D. S., Bowe, W. P., Graber, E. M., Harper, J. C., Kang, S., Keri, J. E., Leyden, J. J., Reynolds, R. V., Silverberg, N. B., Stein Gold, L. F., Tollefson, M. M., Weiss, J. S., Dolan, N. C., Sagan, A. A., Stern, M., ... Bhushan, R. (2016). Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(5), 945–73.e33. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.12.037>
- ⁸ Adler, B. L., Kornmehl, H., & Armstrong, A. W. (2017). Antibiotic Resistance in Acne Treatment. *JAMA dermatology*, 153(8), 810–811. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2017.1297>
- ⁹ Juliano, C., Marchetti, M., Pisu, M. L., & Usai, M. (2018). In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oils from Sardinian Flora against Cutibacterium (Formerly Propionibacterium) acnes and Its Enhancement by Chitosan. *Scientia pharmaceutica*, 86(3), E40. <https://doi.org/10.3390/scipharm86030040>
- ¹⁰ Baldwin H. (2020). Oral Antibiotic Treatment Options for Acne Vulgaris. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 13(9), 26–32.
- ¹¹ Szepietowski, J., Kapińska-Mrowiecka, M., Kaszuba, A., Langner, A., Placek, W., & Wolska, H. et al. (2014). Stanowisko grupy eksperckiej Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego w sprawie konsensusu „Trądzik zwyczajny: patogeniza i leczenie”. *Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny*, 101(1), 73-73. <https://doi.org/10.5114/dr.2014.41075>
- ¹² Alkhawaja, E., Hammadi, S., Abdelmalek, M. et al. Antibiotic resistant Cutibacterium acnes among acne patients in Jordan: a cross sectional study. *BMC Dermatol* 20, 17 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12895-020-00108-9>
- ¹³ Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- ¹⁴ Antibiotic resistance: using a cultural contexts of health approach to address a global health crisis. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- ¹⁵ Cervantes, J., Eber, A. E., Perper, M., Nascimento, V. M., Nouri, K., & Keri, J. E. (2018). The role of zinc in the treatment of acne: A review of the literature. *Dermatologic therapy*, 31(1), 10.1111/dth.12576. <https://doi.org/10.1111/dth.12576>
- ¹⁶ Yee, B. E., Richards, P., Sui, J. Y., & Marsch, A. F. (2020). Serum zinc levels and efficacy of zinc treatment in acne vulgaris: A systematic review and meta-analysis. *Dermatologic therapy*, 33(6), e14252. <https://doi.org/10.1111/dth.14252>
- ¹⁷ Bae, J. Y., & Park, S. N. (2016). Evaluation of anti-microbial activities of ZnO, citric acid and a mixture of both against Propionibacterium acnes. *International journal of cosmetic science*, 38(6), 550–557.
- ¹⁸ Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D. and Bolzinger, M.-A. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 457, 263–274 (2014).
- ¹⁹ Stéphan, F., & Revuz, J. (2004). Sels de zinc en dermatologie [Zinc salts in dermatology]. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 131(5), 455–460. [https://doi.org/10.1016/s0151-9638\(04\)93639-3](https://doi.org/10.1016/s0151-9638(04)93639-3)
- ²⁰ Sharquie, K. E., Noaimi, A. A., & Al-Salih, M. M. (2008). Topical therapy of acne vulgaris using 2% tea lotion in comparison with 5% zinc sulphate solution. *Saudi medical journal*, 29(12), 1757–1761.
- ²¹ Frydrych, A., Arc, J. and Kasiura, K. Zinc a critical importance element in cosmetology. *J. Appl. Cosmetol.* 22, 1–13 (2004).

- ²² Dreno, B., Foulc, P., Reynaud, A., Moyse, D., Habert, H., & Richet, H. (2005). Effect of zinc gluconate on propionibacterium acnes resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: in vitro and in vivo study. *European journal of dermatology : EJD*, 15(3), 152–155.
- ²³ Almarwani, B., Phambu, N., Hamada, Y. Z., & Sunda-Meya, A. (2020). Interactions of an Anionic Antimicrobial Peptide with Zinc(II): Application to Bacterial Mimetic Membranes. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 36(48), 14554–14562. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02306>
- ²⁴ Kumar, A., Kubota, Y., Chernov, M., & Kasuya, H. (2020). Potential role of zinc supplementation in prophylaxis and treatment of COVID-19. *Medical hypotheses*, 144, 109848. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109848>
- ²⁵ Gharpure, S., & Ankamwar, B. (2020). Synthesis and Antimicrobial Properties of Zinc Oxide Nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 20(10), 5977–5996. <https://doi.org/10.1166/jnn.2020.18707>
- ²⁶ Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) - Final opinion on water-soluble zinc salts used in oral hygiene products. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018;99:249-250. doi:10.1016/j.yrtph.2018.09.007
- ²⁷ Capitanio, B., Sinagra, J. L., Weller, R. B., Brown, C., & Berardesca, E. (2012). Randomized controlled study of a cosmetic treatment for mild acne. *Clinical and Experimental Dermatology*, 37, 346–349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2011.04317.x>
- ²⁸ Poiraud, C., Quereux, G., Knol, A. C., Zuliani, T., Allix, R., Khammari, A., & Dreno, B. (2012). Human β -defensin-2 and psoriasin, two new innate immunity targets of zinc gluconate. *European journal of dermatology : EJD*, 22(5), 634–639. <https://doi.org/10.1684/ejd.2012.1800>
- ²⁹ Duteil, L., Queille-Roussel, C., & Ortonne, J. P. (2005). Evaluation du potentiel photosensibilisant du gluconate de zinc [Assessment of the photosensitization potential of zinc gluconate]. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 132(3), 219–224. [https://doi.org/10.1016/s0151-9638\(05\)79250-4](https://doi.org/10.1016/s0151-9638(05)79250-4)
- ³⁰ Sardana K, Chugh S, Garg VK. The role of zinc in acne and prevention of resistance have we missed the base effect. *Int J Dermatol*. 2014;53(1)125-127. doi:10.1111/ijd.12264
- ³¹ Abendrot M, Kalinowska-Lis U. Zinc-containing compounds for personal care applications. *Int J Cosmet Sci*. 2018;40(4):319-327. doi:10.1111/ics.12463
- ³² Schlegel, P., & Windisch, W. (2006). Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with Zn labelled rats. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 90(5-6), 216–222. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00583.x>
- ³³ Yue, M., Fang, S. L., Zhuo, Z., Li, D. D., & Feng, J. (2015). Zinc glycine chelate absorption characteristics in Sprague Dawley rat. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 99(3), 457–464. <https://doi.org/10.1111/jpn.12255>
- ³⁴ Chien, X.X., Zafra-Stone, S., Bagchi, M. and Bagchi, D. Bioavailability, antioxidant and immune-enhancing properties of zinc methionine. *BioFactors* 27, 231–244 (2006).
- ³⁵ Schölmerich, J., Freudemann, A., Köttgen, E., Wietholtz, H., Steiert, B., Löhle, E., Häussinger, D., & Gerok, W. (1987). Bioavailability of zinc from zinc-histidine complexes. I. Comparison with zinc sulfate in healthy men. *The American journal of clinical nutrition*, 45(6), 1480–1486. <https://doi.org/10.1093/ajcn/45.6.1480>
- ³⁶ EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2014. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. *EFSA Journal* 12, 3844 (2014).
- ³⁷ Bampidis, V.; Azimonti, G.; Bastos, M.L.; Christensen, H.; Dusemund, B.; Kouba, M.; Kos Durjava, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Marcon, F.; Mayo, B.; Pechová, A.; Petkova, M.; Sanz, Y.; Villa, R.E.; Woutersen, R.; Cubadda, F.; Flachowsky, G.; Mantovani, A.; López-Gálvez, G.; Ramos, F. Safety and efficacy of zinc chelates of lysine and glutamic acid as feed additive for all animal species. *EFSA J.*, 2019, 17(7), 5782.
- ³⁸ Cui, H., Zhang, T. T., Nie, H., Wang, Z. C., Zhang, X. L., Shi, B., Yang, F. H., & Gao, X. H. (2017). Effects of sources and concentrations of zinc on growth performance, nutrient digestibility, and fur quality of growing-furring female mink (*Mustela vison*). *Journal of animal science*, 95(12), 5420–5429. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1810>
- ³⁹ Jarosz, L., Marek, A., Gradzki, Z., Kwiecien, M., Zylinska, B., & Kaczmarek, B. (2017). Effect of feed supplementation with zinc glycine chelate and zinc sulfate on cytokine and immunoglobulin gene expression profiles in chicken intestinal tissue. *Poultry science*, 96(12), 4224–4235. <https://doi.org/10.3382/ps/pex253>
- ⁴⁰ Chen, N. N., Liu, B., Xiong, P. W., Guo, Y., He, J. N., Hou, C. C., Ma, L. X., & Yu, D. Y. (2018). Safety evaluation of zinc methionine in laying hens: Effects on laying performance, clinical blood parameters, organ development, and histopathology. *Poultry science*, 97(4), 1120–1126. <https://doi.org/10.3382/ps/pex400>
- ⁴¹ Aguilar, F.; Autrup, H.; Barlow, S.; Castle, L.; Crebelli, R.; Dekant, W.; Engel, K.-H.; Gontard, N.; Gott, D.; Grilli, S.; et al. Opinion on certain bisglycinates as sources of copper, zinc, calcium, magnesium and glycinate nicotinate as source of chromium in foods intended for the general population (including food supplements) and foods for particular nutritional uses. *EFSA J.* 2008, 718, 1–26.

- ⁴² Masaki H. (2012). *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 132(3), 261–269. <https://doi.org/10.1248/yakushi.132.261>
- ⁴³ Safety Assessment of Zinc Salts as Used in Cosmetics. *Cosmetic Ingredient Review*. (2017). October 12.
- ⁴⁴ Krężel, A., & Maret, W. (2016). The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 611, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.010>
- ⁴⁵ Burnett, C. L., Heldreth, B., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Jr, Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., & Andersen, F. A. (2013). Safety assessment of α -amino acids as used in cosmetics. *International journal of toxicology*, 32(6 Suppl), 41S–64S. <https://doi.org/10.1177/1091581813507090>
- ⁴⁶ Sobel, S.; Theophall, G. The complexation of aqueous metal ions relevant to biological applications. 2. Evaluation of simultaneous equilibria of poorly soluble zinc salts with select amino acids. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 2010, 22, 201–205
- ⁴⁷ Mofokeng, T.P.; Moloto, M.J.; Shumbula, P.M.; Nyamukamba, P.; Mubiayi, P.K.; Takaidza, S.; Marais, L. Antimicrobial Activity of Amino Acid-Capped Zinc and Copper Sulphide Nanoparticles. *J. Nanotechnol.* 2018, 2018, 1–9.
- ⁴⁸ Hadjer, F.; Tahar, B.; Eddine, A.D.; Sofiane, D. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Some Transition Metal Complexes with Non-natural Amino Acids Used as Ligand. *J. Mater. Environ. Sci.* 2018, 7, 2153–2157
- ⁴⁹ Lakshmi, S.S.; Geetha, K. Synthesis, characterization and biological studies of tridentate amino acid (L-tryptophan) Schi_ base transition metal complexes. *J. Chem. Pharm. Res.* 2016, 8, 668–674.
- ⁵⁰ Aiyelabola, T.O.; Isabirye, D.A.; Akinkunmi, E.O.; Ogunkunle, O.A.; Ojo, I.A.O. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activities of Coordination Compounds of Aspartic Acid. *J. Chem.* 2016, 2016, 8.
- ⁵¹ Stanila, A.; Braicu, C.; Stanila, S. Antibacterial Activity of Copper and Cobalt Amino Acids Complexes. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 2011, 39, 124–129.
- ⁵² Glutsch, V., Hamm, H., & Goebeler, M. (2019). Zinc and skin: an update. *Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 17(6), 589–596. <https://doi.org/10.1111/ddg.13811>
- ⁵³ Izabela, M. Wiechuła, D. Importance of zinc for the human body in the aspect of zinc supplementation. *Annales Academiae Medicae Silesiensis.* 2017. 71. 314-325. [10.18794/aams/63507](https://doi.org/10.18794/aams/63507).
- ⁵⁴ Chasapis, C. T., Loutsidou, A. C., Spiliopoulou, C. A., & Stefanidou, M. E. (2012). Zinc and human health: an update. *Archives of toxicology*, 86(4), 521–534. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0775-1>
- ⁵⁵ Bae, Y. S., Hill, N. D., Bibi, Y., Dreier, J., & Cohen, A. D. (2010). Innovative uses for zinc in dermatology. *Dermatologic clinics*, 28(3), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.det.2010.03.006>
- ⁵⁶ Bibi Nitzan, Y., & Cohen, A. D. (2006). Zinc in skin pathology and care. *The Journal of dermatological treatment*, 17(4), 205–210. <https://doi.org/10.1080/09546630600791434>
- ⁵⁷ Brocard, A., & Dréno, B. (2011). Innate immunity: a crucial target for zinc in the treatment of inflammatory dermatosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 25(10), 1146–1152. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03934.x>
- ⁵⁸ Poddar, R., Jain, A., & Kidwai, M. (2017). Bis[(l)prolinato-N,O]Zn: A water-soluble and recycle catalyst for various organic transformations. *Journal of advanced research*, 8(3), 245–270. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.12.005>
- ⁵⁹ Fortes, A.D., Howard, C.M., Wood, I.G. and Gutmann, M.J. Glycine zinc sulfate pentahydrate: redetermination at 10 K from time-off light neutron Laue diffraction. *Acta Cryst. E72*, 1438–1445 (2016).
- ⁶⁰ Reddy, P.R., Radhika, M. & Manjula, P. Synthesis and characterization of mixed ligand complexes of Zn(II) and Co(II) with amino acids: Relevance to zinc binding sites in zinc fingers. *J Chem Sci* **117**, 239–246 (2005). <https://doi.org/10.1007/BF02709293>
- ⁶¹ Deters, A.; Schnetz, E.; Schmidt, M.; Hensel, A. Effects of zinc histidine and zinc sulfate on natural human keratinocytes. *Forsch. Komplementarmed. Klass. Naturheilkd.* 2003, 10, 19–25.
- ⁶² Wilson, R.B.; de Meester, P.; Hodgson, D.J. Structural characterization of bis(L-methionato)zinc(II), Zn(L-met)2. *Inorg. Chem.* 1977, 16, 1498–1502
- ⁶³ Tepavitcharov, S., Havlicek, D., Matulkova, I. et al. New zinc-glycine-iodide complexes as a product of equilibrium and non-equilibrium crystallization in the Gly–ZnI2–H2O system. *J. Mol. Struct.* 1120, 42–49 (2016).
- ⁶⁴ H. Günther, *Spektroskopie magnetischen rezonansu jądrowego*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1983, 114-117
- ⁶⁵ Bregier-Jarzebowska R. (2014). Stability and Solution Structure of Binary and Ternary Cu(II) Complexes with L-Glutamic Acid and Diamines as Well as Adducts in Metal-Free Systems in Aqueous Solution. *Journal of solution chemistry*, 43(12), 2144–2162. <https://doi.org/10.1007/s10953-014-0269-x>

- ⁶⁶ Venelinov, T., Arpadjan, S., Karadjova, I., Beattie, J. (2006). Properties of the copper(II)-histidine complex obtained after dialysis of human plasma with histidine. *Acta pharmaceutica* (Zagreb, Croatia), 56(1), 105–112.
- ⁶⁷ Tripathi, I.P.; Kamal, A. Synthesis, Characterization of Some Complexes of Copper (II) with L-Asparagine, L-Histidine, L-Lysine. *AJADD*, 2015, 3, 1, 095-103.
- ⁶⁸ Krężel, A.; Wójcik, J.; Maciejczyk, M.; Bal W. May GSH and L-His contribute to intracellular binding of zinc? Thermodynamic and solution structural study of a ternary complex. *Chemical communications*, 704-705.
- ⁶⁹ Kuraitis, B.D.; Williams, L. Decolonization of *Staphylococcus aureus* in Healthcare: A Dermatology Perspective. *J. Healthc. Eng.* 2018, 2382050
- ⁷⁰ Akiyama, C.H.; Morizane, S.; Yamasaki, O.; Oono, T.; Iwatsuki, K. Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J. Dermatol. Sci.* **2003**, 32, 193–199.
- ⁷¹ Bhavsar, Sejal & Krilov, Leonard. (2015). *Escherichia coli* Infections. *Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics*. 36. 167-71. 10.1542/pir.36-4-167.
- ⁷² Wu, D.D.C.; Chan, W.W.; Metelitsa, A.I.; Fiorillo, L.; Lin, A.N. *Pseudomonas* skin infection: Clinical features, epidemiology, and management. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2011**, 12, 157–169.
- ⁷³ Dréno, B., Pécastaings, S., Corvec, S., Veraldi, S., Khammari, A., & Roques, C. (2018). *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 32 Suppl 2, 5–14. <https://doi.org/10.1111/jdv.15043>
- ⁷⁴ Frydrych, A., Arc, J. and Kasiura, K. Zinc a critical importance element in cosmetology. *J. Appl. Cosmetol.* 22, 1–13 (2004).
- ⁷⁵ Mustarichie, R.; Sulistiyaningsih, S.; Runadi, D. Antibacterial activity test of extracts and fractions of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* causing acne. *Int. J. Microbiol.* **2020**, 1, 1–9.
- ⁷⁶ Ardhany, S. D., Putra, C. D., & Novaryati, S. (2021). Modification of Anti-acne Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) Cream to *Propionibacterium acnes*. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 12(1), 94–98. https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_107_20.
- ⁷⁷ Hariyadi, D. M., Isnaeni, I., Sudarma, S., Suciati, S., & Rosita, N. (2020). Peel-off emulgel mask of *Cocos nucifera* L. Extract using gelling agent carbomer 940 as antiacne against *Propionibacterium acnes* ATCC 11827. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 11(4), 220–225. https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_51_20
- ⁷⁸ Sardana K, Garg VK. An observational study of methionine-bound zinc with antioxidants for mild to moderate acne vulgaris. *Dermatol Ther.* 2010;23(4)411-418. doi10.1111/j.1529-8019.2010.01342.x
- ⁷⁹ Premrata, S.; Verma, G. Seth, Synthesis and Antibacterial Activity of Zn(II) Complexes with 2-substituted Benzothiazoles and Amino Acids. *J. Chem. Pharm. Res.* 2012, 4, 1327–1331.
- ⁸⁰ Sharma, C.S.; Ramani, J.; Bhalodia, J.; Patel, N.; Thakkar, K.; Patel, R. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Some Transition Metal Complexes (Mn, Co, Zn, Ni) With L-Proline and Kojic Acid. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2011, 2, 374–382
- ⁸¹ Bácskay, Ildikó & Nemes, Dániel & Fenyvesi, Ferenc & Varadi, Judit & Vasvári, Gábor & Fehér, Pálma & Vecsernyés, Miklós & Ujhelyi, Zoltán. (2018). Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical Development. 10.5772/intechopen.72539.
- ⁸² Dréno, B., Zuberbier, T., Gelmetti, C., Gontijo, G. and Marinovich, M. (2019), Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 33: 15-24. <https://doi.org/10.1111/jdv.15944>
- ⁸³ Stausbøl-Grøn, B., & Andersen, K. E. (2007). Allergic contact dermatitis to ethylhexylglycerin in a cream. *Contact dermatitis*, 57(3), 193–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01103.x>
- ⁸⁴ Linsen G, Goossens A. Allergic contact dermatitis from ethylhexylglycerin. *Contact Dermatitis* 2002 47 169
- ⁸⁵ Makrantonaki, E., Ganceviciene, R., & Zouboulis, C. (2011). An update on the role of the sebaceous gland in the pathogenesis of acne. *Dermato-endocrinology*, 3(1), 41–49. <https://doi.org/10.4161/derm.3.1.13900>
- ⁸⁶ Lal SN, O'Connor CJ, Eyres L. Application of emulsifiers/stabilizers in dairy products of high rheology. *Adv Colloid Interface Sci.* 2006;123-126:433-437. doi:10.1016/j.cis.2006.05.009
- ⁸⁷ Pereira L. Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals, Algotharaphy, and Thalassotherapy. *Cosmetics*. 2018; 5(4):68. <https://doi.org/10.3390/cosmetics5040068>
- ⁸⁸ Prakash, C., Bhargava, P., Tiwari, S., Majumdar, B., & Bhargava, R. K. (2017). Skin Surface pH in Acne Vulgaris: Insights from an Observational Study and Review of the Literature. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 10(7), 33–39.

-
- ⁸⁹ Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., & Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International journal of cosmetic science*, 28(5), 359–370. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x>
- ⁹⁰ Khotimchenko YS, Khozhaenko EV, Khotimchenko MY, Kolenchenko EA, Kovalev VV. Carrageenans as a new source of drugs with metal binding properties. *Mar Drugs*. 2010;8(4):1106-1121. Published 2010 Apr 1. doi:10.3390/md8041106
- ⁹¹ Popescu, C.; Iordan, M.; Boscornea, C. Structure and properties of carragenan. The Annals Of "Valahia" University Of Târgoviște. 2007.
- ⁹² Decyzja Wykonawcza Komisji z dnia 25 listopada 2013 r. w sprawie wytycznych dotyczących załącznika I do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych. Dostęp online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX%3A32013D0674>
- ⁹³ Chamikara, P. (2020). Isolation, Identification and Characterization of Microorganisms from Different Cosmetic Samples.
- ⁹⁴ Michalek, I., John, S. and Caetano dos Santos, F. (2019), Microbiological contamination of cosmetic products – observations from Europe, 2005–2018. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 33: 2151-2157.
- ⁹⁵ Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I., & Barreiro, M. F. (2018). Cosmetics Preservation A Review on Present Strategies. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(7), 1571. <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>
- ⁹⁶ Kim, H. W., Seok, Y. S., Cho, T. J., & Rhee, M. S. (2020). Risk factors influencing contamination of customized cosmetics made on-the-spot: Evidence from the national pilot project for public health. *Scientific reports*, 10(1), 1561. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57978-9>
- ⁹⁷ Lilienblum, W. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) - Final version of the opinion on Phenoxyethanol in cosmetic products. *Regulatory toxicology and pharmacology RTP*, 2016, 82, 156. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.11.007>
- ⁹⁸ Johnson, Wilbur & Bergfeld, Wilma & Belsito, Donald & Hill, Ronald & Klaassen, Curtis & Liebler, Daniel & Marks, James & Shank, Ronald & Slaga, Thomas & Snyder, Paul. (2013). Safety Assessment of Alkyl Glyceryl Ethers as Used in Cosmetics. *International journal of toxicology*. 32. 5S-21S. [10.1177/1091581813497766](https://doi.org/10.1177/1091581813497766).

Kopie publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej [P1-P3]



Article

Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations

Michał Abendrot ¹, Elżbieta Pluciennik ², Aleksandra Felczak ³, Katarzyna Zawadzka ³, Ewelina Piątczak ⁴, Piotr Nowaczyk ⁵ and Urszula Kalinowska-Lis ^{1,*}

¹ Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Łódź, Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, Poland; michal.abendrot@gmail.com

² Department of Molecular Carcinogenesis, Medical University of Łódź, Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź, Poland; elzbieta.pluciennik@umed.lodz.pl

³ Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, 12/16 Banacha Street, 90-237 Łódź, Poland; aleksandra.felczak@biol.uni.lodz.pl (A.F.); katarzyna.zawadzka@biol.uni.lodz.pl (K.Z.)

⁴ Department of Biology and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Medical University of Łódź, Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, Poland; ewelina.piatczak@umed.lodz.pl

⁵ Department of Health Sciences, University of Opole, Katowicka 68, 45-069 Opole, Poland; piotr.nowaczyk@uni.opole.pl

* Correspondence: urszula.kalinowska-lis@umed.lodz.pl



Citation: Abendrot, M.; Pluciennik, E.; Felczak, A.; Zawadzka, K.; Piątczak, E.; Nowaczyk, P.; Kalinowska-Lis, U. Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1641. <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>

Academic Editor: Diego Tesoro

Received: 4 January 2021

Accepted: 1 February 2021

Published: 6 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Zinc compounds have a number of beneficial properties for the skin, including antimicrobial, sebostatic and demulcent activities. The aim of the study was to develop new anti-acne preparations containing zinc–amino acid complexes as active ingredients. Firstly, the cytotoxicity of the zinc complexes was evaluated against human skin fibroblasts (1BR.3.N cell line) and human epidermal keratinocyte cell lines, and their antimicrobial activity was determined against *Cutibacterium acnes*. Then, zinc complexes of glycine and histidine were selected to create original gel formulations. The stability (by measuring pH, density and viscosity), microbiological purity (referring to PN-EN ISO standards) and efficacy of the preservative system (according to Ph. Eur. 10 methodology) for the preparations were evaluated. Skin tolerance was determined in a group of 25 healthy volunteers by the patch test. The preparations containing zinc(II) complexes with glycine and histidine as active substances can be topically used in the treatment of acne skin due to their high antibacterial activity against *C. acnes* and low cytotoxicity for the skin cells. Dermatological recipes have been appropriately composed; no irritation or allergy was observed, and the preparations showed high microbiological purity and physicochemical stability.

Keywords: zinc(II) complexes; amino acids; acne; cytotoxicity; antibacterial activity; skin tolerance

1. Introduction

Zinc acts as cofactor for over 1000 biochemical reactions impacting the growth, differentiation and development of cells in different tissues [1]. It is an essential microelement and its proper skin content plays a key role in the prevention of many skin diseases [2]. Zinc-containing compounds are hence often used as active substances in dermatological products [3]. Most zinc-containing substances are exploited for their antimicrobial and anti-acne potential as they may represent effective safer alternatives for current treatments with systemic adverse effects [4,5]. Several mechanisms have been proposed for the effects of zinc in acne-affected skin, with the most significant being antimicrobial activity against *C. acnes* and lipase inhibition, reduction in sebum production [6], anti-inflammatory effects [6,7] and 5 α -reductase inhibition [8].

Acne vulgaris is defined as an inflammation of the pilosebaceous units (hair follicles and sebaceous glands), manifested by the overproduction of sebum, keratinization disturbance, excessive multiplication of skin microflora and, finally, the formation of blackheads,

inflammatory pimples, papules and scars. The pathogenesis of acne vulgaris is extremely complex and has not been fully described; however, it is believed that this disease is caused by the excessive production of androgen hormones, follicular hyperkeratinization and the colonization of hair follicles by bacteria, including strains of *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* [9,10].

C. acnes is a Gram-positive, anaerobic, polymorphic microorganism which is associated with the pathogenesis of acne vulgaris; it hence constitutes the typical target of antibiotic therapy. Antibiotic therapy of acne involves the use of drugs from the macrolide group, mainly erythromycin and clindamycin. However, the misuse of antibiotics, often combined with their prolonged use, has resulted in the evolution of bacterial resistance to traditional drugs. Such cases have already been noted in many countries of the European Union [10,11]. Therefore, it is essential to search for alternative substances that can be effective in acne treatment. The effect of zinc on acne has been well described since the first clinical trials on oral administration of zinc sulphate were conducted in 1977 [4]. Nowadays however, it is known that organic derivatives of zinc possess better bioavailability and tolerability than typical inorganic zinc salts [12–14]. Interestingly, it was shown that zinc absorption is increased by the addition of amino acids [15] and chelating peptides forming metal coordination complexes [16]. Moreover, zinc ions were found to reduce antibiotic resistance [17] and increase their topical absorption rate (as for erythromycin) [6]. In addition, the effects of zinc compounds in acne might exceed those for some antibiotic therapies [18]. Taking into account the growing antibiotic resistance problem [19,20], there is a need to identify new non-antibiotic solutions for acne treatment. Therefore, we have recently synthesized and fully characterized a number of new zinc complexes with amino acids and evaluated their antibacterial activity against a few selected pathogens [21].

When treating acne, it is essential to choose the correct cosmetic products as they constitute the essential foundation for everyday skin management [22]. The maximal concentration of zinc permitted in a cosmetic product in the EU is 1% [23]. Although various zinc amino acid salts can be used in cosmetic products, only zinc aspartate, zinc cysteinate, zinc glutamate and zinc glycinate have been included in the latest Cosmetic Ingredient Review (CIR) and in the cosmetic product EC Regulations [23,24]. Currently, a couple of these complexes have become an interest of animal feed [25,26] and the food industry [27,28], but their application in skin-applied products is scarce [24]. Although some reports suggest that such complexes might offer benefits against acne if taken orally [29], there are insufficient data regarding the efficacy and skin safety to consolidate their further use.

To fill this knowledge gap, the aim of this study was to carry out more extensive research to determine the potential application of selected zinc–amino acid complexes in dermatological products. Six zinc complexes of amino acids have been synthesized and characterized: ZnGlu (1), ZnGly (2), ZnHis (3), ZnPro (4), ZnMet (5) and ZnTrp (6) [21]. The present study evaluated their cytotoxicity against human skin fibroblasts (1BR.3.N cell line) and human epidermal keratinocytes (Neonatal, Millipore, co. SCCE020), as well as their antimicrobial activity against *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (formerly *Propionibacterium acnes*). The two zinc complexes with the best parameters, ZnGly (2) and ZnHis (3), were selected and used to prepare stable gel formulas containing 0.2% zinc (i.e., 0.66% zinc glycine and 1.27% zinc histidine) and a non-zinc containing gel (placebo). The prepared gel preparations underwent six cycles of weekly physicochemical measurements of pH, density and viscosity, microbiological purity testing based on PN-EN ISO standards for cosmetic products, and efficacy of antimicrobial preservation (challenge test according to European Pharmacopoeia 10.0). Finally, to assess skin tolerance, all products were patch tested on healthy volunteers following the Jadassohn–Bloch method (modified by Rudzki) [30]. Therefore, this paper provides more detailed data for novel zinc complexes, substantiating their utilization in products for the management of acne-prone skin.

2. Results and Discussion

2.1. Evaluation of the Effect of Zinc Compounds on Keratinocyte and Fibroblast Viability

Novel substances must be subjected to a skin cytotoxicity evaluation before they can be used in a final product formula.

To assess the safety of their external use as active ingredients in dermatological preparations, the cytotoxicity of the zinc complexes, i.e., ZnGlu (1), ZnGly (2), ZnHis (3), ZnPro (4) and ZnTrp (6), was tested *in vitro* against human skin fibroblasts (1BR.3.N cell lines) and human epidermal keratinocytes, neonatal cells. ZnPCA (zinc 2-pirrolidone 5-carboxylate) and ZnCl_2 were used as reference compounds. ZnMet (5) was not evaluated due to insufficient solubility. The normalized dose-response curves for analyzed zinc complexes and reference compounds for fibroblasts and keratinocytes are shown in Figures 1 and 2, respectively.

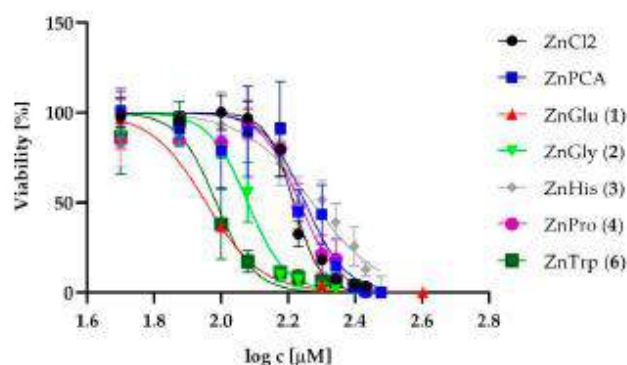


Figure 1. The normalized dose-response curves for the analyzed zinc complexes and reference compounds against fibroblasts.

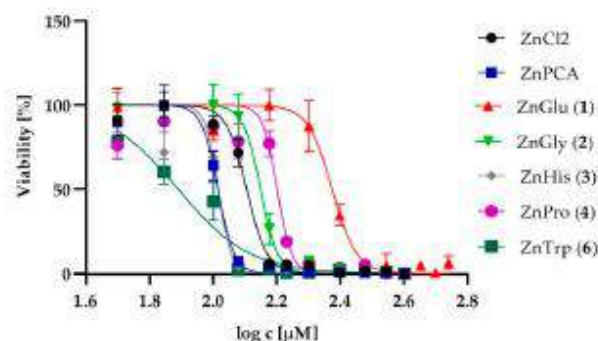


Figure 2. The normalized dose-response curves for the analyzed zinc complexes and reference compounds against keratinocytes.

The IC_{50} values for the zinc complexes against human skin fibroblasts ranged from 87.38 to 172.20 (μM) (Table 1). The complexes ZnHis (3) and ZnPro (4) were the least cytotoxic, with the IC_{50} values at the similar levels without statistical differences (at $p \leq 0.05$) as the reference compound ZnPCA (171.73 μM). The IC_{50} values of complexes (1), (2) and (6) were significantly lower (at $p \leq 0.05$) than both controls. The most cytotoxic towards fibroblasts were the complexes ZnGlu (1) and ZnTrp (6): their cytotoxicity was about twice that of the reference compounds.

Table 1. The IC_{50} values (mean $\pm$ SD) for all analyzed zinc complexes for human fibroblasts and keratinocytes. The IC_{50} was calculated using the Hill Equation after the viable cell number was normalized relative to untreated cells.

Analyzed Complexes	IC_{50} Values (Mean $\pm$ SD)	
	Fibroblasts	Keratinocytes
ZnGlu (1)	87.38 $\pm$ 6.01 ^{a*}	231.17 $\pm$ 15.94 ^d
ZnGly (2)	119.85 $\pm$ 4.61 ^b	138.20 $\pm$ 8.11 ^{bc}
ZnHis (3)	171.48 $\pm$ 17.02 ^a	102.00 $\pm$ 3.76 ^{ac}
ZnPro (4)	172.20 $\pm$ 4.00 ^a	157.20 $\pm$ 8.19 ^b
ZnMet (5)	-	-
ZnTrp (6)	94.88 $\pm$ 8.41 ^c	85.66 $\pm$ 14.28 ^c
ZnPCA **	171.73 $\pm$ 9.69 ^a	102.50 $\pm$ 2.07 ^{ac}
ZnCl ₂ **	162.65 $\pm$ 4.10 ^a	126.97 $\pm$ 4.32 ^{ac}

- not detected because of too little solubility in culture medium; * means signed with the same letter within each column are not significantly different (Kruskal-Wallis test; $p \leq 0.05$); ** reference compounds (ZnPCA: zinc 2-pyrrolidone 5-carboxylate).

Different sensitivity of human epidermal keratinocytes to the zinc complexes was observed (Table 1, Figure 2). The IC_{50} values of the complexes ZnGlu (1), ZnGly (2) and ZnPro (4) were significantly higher than both controls. However, the highest cytotoxic effect among all analyzed complexes was demonstrated by ZnTrp (6), but without statistical differences (at $p \leq 0.05$) between the cytotoxicity of ZnHis (3) and ZnPCA. ZnHis (3) demonstrated equal cytotoxicity to the reference compound ZnPCA (102.50 μ M).

Considering the cytotoxic activity of the complexes against skin cells, fibroblasts and keratinocytes, it could be concluded that the most favorable cytotoxicity profile was shown by the ZnPro (4), ZnHis (3) and ZnGly (2) complexes.

Previous studies have demonstrated that a concentration of ZnCl₂ equal to 100 μ M was not only non-toxic to HaCaT keratinocytes, but also increased cell proliferation and induced significant changes in the mRNA expression of NOTCH1, IL8 and cyclooxygenase-2 [31]. ZnCl₂ was used as a reference substance in the present study; it demonstrated an IC_{50} value of 127 μ M neonatal human epidermal keratinocytes.

ZnO nanoparticles (ZnO NP) demonstrated higher toxicity against keratinocytes than the equivalent concentration of ZnSO₄. In addition, zinc chelators such as bovine serum albumin (BSA) and EDTA mitigated overall zinc toxicity [32]. In turn, the zinc histidine complex demonstrated significantly lower cytotoxic potential than ZnSO₄ against normal human keratinocytes (NHK). Both derivatives exert stimulatory effects on natural NHK proliferation and differentiation; however, the zinc histidine derivative demonstrated a significantly greater proliferation enhancement effect than the inorganic salt, whereas zinc sulphate displayed a more pronounced influence on differentiation [13].

The toxicity of ZnCl₂ against fibroblasts is well characterized, but only in a murine model: it exerts substantial toxicity against L929 fibroblast cultures, with an IC_{50} value of 0.928 μ M [33]. Our present toxicity data indicate significantly lower toxicity against human skin fibroblasts, with an IC_{50} value of 162.65 μ M.

Concerning the other metal complexes of amino acid derivatives, the toxicity of copper(II) complex with 5-hydroxytryptophan was tested on a few cell types, including a non-malignant human lung fibroblast (MRC-5) cell line, and showed no toxic effects at concentrations up to 100 μ M [34].

2.2. Antimicrobial Activity against the Anaerobic Strain *Cutibacterium acnes* ATCC 6919

Zinc complexes have been previously demonstrated to have antibacterial activity against certain Gram-positive strains, namely *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, and two Gram-negative bacteria, viz. *Escherichia coli* ATCC 25992 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 [21]. The present paper examines the activity of these complexes against a strain of *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, an anaerobic bacterium.

Acne vulgaris, one of the most commonly diagnosed dermatological disorders, is a chronic disease that affects people of all ages, particularly teenagers. Although it is not a life-threatening disorder, it is a considerable therapeutic and psychological problem [4].

The present study determined the anti-acne properties of six newly-synthesized zinc complexes (1–6). The obtained results are presented in Table 2.

Table 2. Antimicrobial activity against *C. acnes* of zinc complexes of amino acids (1–6).

Compound	MIC Value [mg/L]
ZnGlu (1)	250
ZnGly (2)	100
ZnHis (3)	125
ZnPro (4)	250
ZnMet (5)	125
ZnTrp (6)	175
ZnPCA *	175

* reference compound (zinc 2-pyrrolidone 5-carboxylate).

The anti-acne properties of the studied complexes were compared with those of ZnPCA, a compound commonly used in the treatment of various skin lesions. The highest antibacterial activity was expressed by the complexes ZnGly (2), ZnHis (3) and ZnMet (5), with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 100, 125 and 125 mg/L, respectively. Interestingly, ZnGly (2) demonstrated almost twice the antibacterial activity of ZnPCA and showed good antimicrobial activity toward *S. epidermidis* [21]. It may therefore prove to be an effective weapon against the growth in drug resistance among cutaneous bacteria, and represent an alternative for conventional drug therapies.

Various compounds, such as essential oils and antimicrobial peptides originating from plants, as well as some retinoids, may show activity against *C. acnes* [10,11,35]. Miazga-Karska et al. [11] showed that the low molecular weight burdock peptide Br-p inhibited the growth of *C. acnes* at concentrations lower than 63 mg/L, depending on the strain tested. The peptide was also found to limit the growth of *S. aureus* and *S. epidermidis* at 250 and 500 mg/L, respectively. Additionally, Mustarichie et al. [36] revealed that the extract of cassava leaves exhibited antimicrobial activity against both *C. acnes* and *S. epidermidis*. The published data also indicate that non-antibiotic substances could reduce the numbers of *C. acnes*. Isotretinoin, which is a non-antimicrobial retinoid, can effectively reduce the multiplication of *C. acnes* [37].

There are a few mechanisms that explain the bactericidal activity of zinc compounds; however, different zinc derivatives could exert various modes of action. The mechanisms of action for ZnO NPs include: direct contact killing, the production of reactive oxygen species (ROS) and Zn²⁺ ions release. These effects can lead to the destruction of the bacterial membrane, disturbance of the respiration process of the cell, enzyme denaturation, and the inhibition of DNA replication, causing leakage of the cell content and its death [38,39]. The antibacterial mechanism for the majority of zinc derivatives seems to be dependent on the level of Zn(II) ions released. Achieving Zn²⁺ concentrations above 10^{−4} M was shown to have a toxic effect on prokaryotes by increasing the cell membrane permeability in a dose-dependent manner, as for zinc oxide and zinc gluconate [40]. On the other hand, some aspects of the antimicrobial effect of zinc complexes were explained by Overton's concept of cell permeability, according to which the lipid cell membrane favors the passage of lipophilic substances [41]. The activity of Zn(II) complexes of Schiff base derivatives was elucidated based on chelation theory. This study showed that the polarity of Zn²⁺ was reduced by the chelation of Schiff bases that enhanced the lipophilicity of the zinc complexes. As a result, zinc chelate complexes can better penetrate the lipid membrane of microorganisms than corresponding free ligands [41–43].

2.3. Assessment of Antifungal Activity of Zinc Complexes (1–6)

Antifungal properties have been determined for both yeast (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsylosis* ATCC 22019) and microscopic filamentous fungi (*Aspergillus flavus* ATCC 9643, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305). Zinc–amino acid complexes were tested in a concentration range of 0 to 500 mg/L. The conducted analyses showed that the addition of the mentioned complexes did not affect the growth or morphology of the tested strains. Therefore, no minimum fungicidal concentration (MFC) values were determined for the synthesized complexes.

2.4. Preparation of Gel Formulations: ZnGly Gel (A), ZnHis Gel (B) and Placebo Gel

The percentage concentration of ZnGly (2) in gel formulation (A) was 0.66%, while that of ZnHis (3) in (B) was 1.27% [44]. These formulations contained the same molar equivalent of zinc ions as in the 1% ZnPCA (PCA—pyrrolidone carboxylic acid). Thus, in one mole of 1% ZnPCA there is 0.2022 g of zinc ions. A more detailed composition of gel preparations is presented in Table 7 (Section 3. Materials and Methods). In addition to the active substances ZnGly (2) and ZnHis (3), the preparations contained the following ingredients: iota-carrageenan, which was used as a gelling agent; a mixture of phenoxyethanol: ethylhexylglycerin (9: 1 w/w) acting as a preservative of the preparations; and citric acid to adjust the pH of the preparations to the value 5.0–5.5.

It is established that the pH value on the skin's surface ranges from 5.0 to 6.0 [45]. In addition, acne vulgaris patients tend to demonstrate higher facial skin pH values than age- and sex-matched controls without acne (5.09 ± 0.39 vs. 6.35 ± 1.30) [46]. Regarding our gel preparations, ZnGly gel (A) was pH 5.30 ± 0.05 , ZnHis gel (B) was pH 5.30 ± 0.05 and placebo gel was pH 5.36 ± 0.04 .

2.5. Stability Assessment of Gel Formulations: ZnGly Gel (A), ZnHis Gel (B) and Placebo Gel

The stability of the prepared gel formulations was determined by testing their physicochemical parameters, including pH value, density and viscosity, once a week for six weeks. Additionally, organoleptic tests were performed to assess the physical appearance of the preparations, i.e., their color and odor. More detailed results are given in Table 3A–C with calculated standard deviations ($n = 3$) from the physicochemical evaluations.

Only slight changes in the measured parameters—pH, density and viscosity values—were observed ($p \leq 0.05$), so they can be omitted in all products. All evaluated preparations (ZnGly gel (A), ZnHis gel (B) and the placebo gel) therefore appeared to remain stable at room temperature for at least six weeks. Additionally, no changes in color and odor were observed after six weeks of testing for any preparation.

2.6. Microbiological Tests of Gel Formulations: ZnGly Gel (A), ZnHis Gel (B) and Placebo Gel

Microbiological tests are required during the development of a dermatological preparation [23]: it has to fulfil the appropriate microbiological purity criteria, and the formula should prevent microbial growth during storage and use. As the antimicrobial efficacy may be influenced by the other constituents and not only the active substances, this test must be performed for every preparation separately. Additionally, the other antimicrobial properties of the examined active substances may be established as for anti-acne preparations.

The microbiological purity test was performed according to the PN-EN ISO standards for cosmetic products. The efficacy of antimicrobial preservation was confirmed according to the European Pharmacopoeia 10.0 (Ph. Eur. 10.0).

Table 3. (A) Physicochemical evaluations of Zn-Glycine gel formulation; (B) Physicochemical evaluations of Zn-Histidine gel formulation; (C) Physicochemical evaluations of placebo gel formulation.

(A)				
ZnGlyGel				
Stability Testing Week	Color, Odor	pH *	Density * [g/cm ³]	Viscosity * [cP], (R4, 2 RPM)
0	slightly yellowish, no odor	5.35 ± 0.01 **	-	-
1	no changes	5.35 ± 0.01 ^a	1.0046 ± 0.0001 ^d	79,478 ± 1376 ^{a,b}
2	no changes	5.34 ± 0.01 ^a	1.0045 ± 0.0001 ^a	82,332 ± 1094 ^b
3	no changes	5.27 ± 0.02 ^{b,c}	1.0044 ± 0.0001 ^a	77,658 ± 1323 ^a
4	no changes	5.26 ± 0.02 ^b	1.0032 ± 0.0001 ^b	77,233 ± 1276 ^a
5	no changes	5.30 ± 0.01 ^c	1.0044 ± 0.0001 ^a	76,964 ± 1354 ^a
6	no changes	5.25 ± 0.02 ^b	1.0042 ± 0.0001 ^c	77,796 ± 1083 ^a
(B)				
ZnHisGel				
Stability Testing Week	Color, Odor	pH *	Density * [g/cm ³]	Viscosity * [cP], (R5, 2 RPM)
0	slightly yellowish, no odor	5.35 ± 0.02 **	-	-
1	no changes	5.36 ± 0.01 ^a	0.9788 ± 0.0001 ^a	157,724 ± 2742 ^a
2	no changes	5.35 ± 0.01 ^a	0.9836 ± 0.0001 ^b	154,249 ± 2866 ^a
3	no changes	5.35 ± 0.01 ^a	0.9786 ± 0.0001 ^c	152,138 ± 2435 ^a
4	no changes	5.33 ± 0.02 ^a	0.9894 ± 0.0001 ^d	154,403 ± 2009 ^a
5	no changes	5.40 ± 0.01 ^b	0.9928 ± 0.0001 ^e	153,519 ± 2289 ^a
6	no changes	5.40 ± 0.01 ^b	0.9872 ± 0.0001 ^f	155,302 ± 2162 ^a
(C)				
Placebo Gel				
Stability Testing Week	Color, Odor	pH *	Density * [g/cm ³]	Viscosity * [cP], (R2, 30 RPM)
0	slightly yellowish, no odor	5.31 ± 0.02 **	-	-
1	no changes	5.35 ± 0.01 ^b	1.0136 ± 0.0001 ^a	971.7 ± 14 ^a
2	no changes	5.32 ± 0.01 ^b	1.0136 ± 0.0001 ^a	1034.6 ± 13 ^{b,c}
3	no changes	5.25 ± 0.02 ^c	1.0136 ± 0.0001 ^a	1089.7 ± 15 ^d
4	no changes	5.27 ± 0.02 ^c	1.0118 ± 0.0001 ^b	1051.2 ± 12 ^c
5	no changes	5.30 ± 0.02 ^a	1.0116 ± 0.0001 ^b	979.6 ± 12 ^a
6	no changes	5.29 ± 0.02 ^{a,c}	1.0106 ± 0.0001 ^c	995.2 ± 11 ^a

* Values expressed as mean ± SD of triplicate measurements (n = 3). ** Means indicated with the same letter within each column are not statistically different (Tukey's test; $p \leq 0.05$).

2.6.1. Microbiological Purity Test

All three preparations complied with ISO microbiological purity standards. The tested preparations were deprived from the key skin pathogens *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The numbers of aerobic mesophilic microorganisms, yeast and molds were within established ISO limits (Table 4). The detailed results are given in the Supplementary Materials (Test reports S1–S3) for each tested preparation.

The microbiological purity test is a basic step which plays an essential role in assessing the quality of each product type; it is therefore frequently utilized, for example, as part of the product stability testing process. Although cosmetic products are not expected to be fully aseptic, the presence of any microorganisms should be established, as well as their number [47]. Furthermore, the microbiological purity of each batch of product should be established before it is launched onto the market [48]. This procedure also ensures that the results of further tests would not be disrupted when developing the product. If the microbiological purity standard of a sample preparation is confirmed, further antimicrobial protection tests and dermatological examinations can be performed to gain additional information about the product. In our study, the examined preparations

fulfilled all seven microbiological purity criteria according to the established ISO standards for cosmetic products.

Table 4. Microbiological purity test of gel formulations.

Parameter	PN-EN ISO Requirements	ZnGly Gel (A)	ZnHis Gel (B)	Placebo Gel
Enumeration of aerobic mesophilic microorganisms	1×10^3 CFU/1 g/1 mL	$<1 \times 10^1$ CFU/1 g/1 mL	$<1 \times 10^1$ CFU/1 g/1 mL	$<1 \times 10^1$ CFU/1 g/1 mL
Enumeration of yeast and mold	1×10^3 CFU/1 g/1 mL	$<1 \times 10^1$ CFU/1 g/1 mL	$<1 \times 10^1$ CFU/1 g/1 mL	$<1 \times 10^1$ CFU/1 g/1 mL
Detection of mold spores	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL
Detection of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL
Detection of <i>Escherichia coli</i>	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL
Detection of <i>Staphylococcus aureus</i>	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL
Detection of <i>Candida albicans</i>	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL	Absence in 1 g/1 mL

2.6.2. Test for Efficacy of Antimicrobial Preservation (Challenge Test)

All tested preparations demonstrated effective antimicrobial preservation: the recommended efficacy protection criteria (A criteria) for cutaneous application preparations were in line with Ph. Eur. 10.0 standards (Tables 5 and 6). No differences were observed between the three preparations, viz. ZnGly gel (A), ZnHis gel (B) and placebo gel, regarding the log reduction in any tested time period for any microbial strain type. Detailed results are presented in the Supplementary Materials (Test reports S4–S6).

Table 5. The European Pharmacopoeia 10.0 criteria for efficacy of antimicrobial preservation.

Ph. Eur. 10.0. Requirements (Logarithm of Reduction in Time T_x)								
Microorganisms	Bacteria *				Fungi **			
Sampling Time	T_2	T_7	T_{14}	T_{28}	T_2	T_7	T_{14}	T_{28}
Criterion A	≥ 2	≥ 3	-	≥ 3 i NI	-	-	≥ 2	≥ 2 NI
Criterion B	-	-	≥ 3	≥ 3 i NI	-	-	≥ 1	≥ 1 i NI

T_x —time of performing measurements where "x" refers to the number of days; NI—the number of viable microorganisms does not increase compared to the previous reading; * *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739; ** *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Table 6. The obtained results from the efficacy of antimicrobial preservation test.

Ph. Eur. 10.0. Requirements	Final Sample Results		
	ZnGly Gel (A)	ZnHis Gel (B)	Placebo Gel
Criterion A	+	+	+
Criterion B	N/A	N/A	N/A

—meets criterion A according to Table 5; N/A—not applicable.

Antimicrobial activity must be evaluated for products that may demonstrate microbial growth during use or storage. This is particularly important for multiple use products, unless they possess self-preserving properties [49]. The vast majority of cosmetics are not single-use products, so antimicrobial activity efficacy must be determined to ensure consumer safety [50]. Such tests must be performed for each product separately to account for the addition of any further active or auxiliary substances. In the present study, the challenge test was performed according to the European Pharmacopoeia standard (Ph. Eur. 10.0), as this is a well-known international standard.

Separate tests were performed for each product, viz. ZnGly gel (A), ZnHis gel (B) and placebo gel, and all tested preparations demonstrated the highest possible level of antimicrobial preservation according to the Ph. Eur. 10.0 standard. As the preservative system, we used a 1% mixture of Phenoxyethanol (PE) with Ethylhexylglycerin (EHG) (9:1 *w/w*); although the used PE concentration was almost the maximal permitted by Regulation (EC) No. 1223/2009, Annex V, entry 29, the maximal concentration of EHG allowed in cosmetic products is not established [23]. We observed that the zinc-containing active substances (0.66% ZnGly and 1.27% ZnHis) did not influence the antimicrobial properties of the used preservative system: neither zinc complex appeared to interact negatively with the preservative system, nor did they demonstrate any additional antimicrobial enhancing properties. The preservative system in the examined preparations was so effective that maximal logarithmic microbial reduction was observed two days after microbial inoculation.

2.7. Dermatological Test (Patch Test) of Gel Formulations: ZnGly Gel (A), ZnHis Gel (B) and Placebo Gel

None of the tested products showed any irritating or allergenic properties, as indicated by a patch test conducted on a group of 25 healthy volunteers with a history of allergy. The detailed results for each examined product are presented in the Supplementary Materials (Test reports S7–S9).

Patch testing is recognized as a standard procedure for the assessment of irritant and sensitizing properties of a product [51]. Although the zinc bisglycinate complex is commonly used in dietary supplements and animal feed, its use in skin-applied products remains scarce [28].

Experiments conducted on animals indicate that some water-soluble zinc salts, especially aqueous solutions of inorganic zinc salts (1% ZnCl₂ and 1% ZnSO₄), may be skin irritants [52]. Furthermore, the Cosmetic Ingredient Review (CIR) underlines that any additional data concerning the safety of zinc salts utilized in cosmetic products would be favorable [24]. Our results provide new data showing that the gel preparations containing 0.66% ZnGly (2) and 1.27% ZnHis (3) demonstrate no irritating effects against the skin of patients with a history of allergy.

Although zinc derivatives are frequently used in a wide range of products, including cosmetics and pharmaceuticals, only a few cases of zinc salt allergy have been reported [52]. In addition, only a few positive results have been recorded of patch testing for zinc pyrithione [53,54]. Therefore, our present findings may provide the first such evidence that the amino acid-based complexes zinc-glycinate and zinc-histidine do not demonstrate skin sensitizing properties.

3. Materials and Methods

3.1. Materials and Reagents

The zinc(II) complexes of amino acids (1–6) were prepared according to a previously described procedure [21]. ZnPCA was purchased from Ajinomoto OmniChem and ZnCl₂ from Merck (Darmstadt, Germany). Carrageenan (Satiagel™ VPC 508 P) was delivered from Univar Solutions (Warsaw, Poland). The preservative mixture (Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, 9:1 *w/w*) was purchased from Schülke & Mayr (Norderstedt, Germany). Citric acid monohydrate was delivered by Brenntag (Kędzierzyn-Koźle, Poland). The water used for each sample preparation was demineralized and obtained by reverse osmosis.

3.2. Evaluation of the Effect of Zinc Compounds on Keratinocytes and Fibroblast Viability

The cytotoxicity test was conducted on a 1BR.3.N cell line (human skin fibroblasts, ECACC, co. 90020508) and human epidermal keratinocytes, neonatal (Millipore, co. SCCE020) purchased from Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Germany).

The 1BR.3.N cells were seeded 24 h before the experiments into 96-well plates at 10⁴ cells/well density, in EMEM (EBSS) culture medium supplemented with 2 mM glu-

tamine, 1% nonessential amino acids (NEAA), 10% fetal bovine serum (FBS), and 1% antibiotic-antimycotic.

The same procedure was conducted for keratinocytes in EpiGRO™ human epidermal keratinocyte complete media with 6 mM L-glutamine, 0.405 EpiFactor P, 1.0 µM epinephrine, 0.5 ng/mL rh TGF-α, 100 ng/mL hydrocortisone hemisuccinate, 5 µg/mL rh insulin and apo-transferrin.

The cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in a humidified incubator. Next, the medium was changed into a starvation medium for the 1BR.3.N cell line (EpiGRO™ human epidermal keratinocyte complete media kit for keratinocytes) with a variable final concentration of five analyzed complexes (ZnGlu (1), ZnGly (2), ZnHis (3), ZnPro (4), ZnTrp (6)) and two controls, ZnPCA and ZnCl₂.

Stock solution for complex (6) was prepared in DMSO, and the remaining zinc compounds were dissolved in water. Zn(II) complex of methionine (5) was not detected because of insufficient solubility in DMSO and water. Final dilutions of the complexes were made in cell culture medium. Vehicle controls (both for 0.1% DMSO and water) were made, but no differences were observed with the untreated cells. After 24 h of incubation, the cytotoxicity was evaluated using the Presto Blue cell viability assay on a VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, London, UK). IC₅₀ values were calculated using the GraphPad Prism 5.01 software tool (CDO-Group Sp. z o.o., Warsaw, Poland).

3.3. Evaluation of the Antibacterial Activity of Zinc Complexes (1–6)

The antimicrobial potential of zinc complexes against the anaerobic strain *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 was tested by the microdilution method in Brucella broth supplemented with hemin, vitamin K1 and laked horse blood according to the CLSI document M11 (9th Edition) for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicrobial activity testing assays were conducted in 96-well cell culture plates in anaerobic conditions. The antimicrobial properties of zinc complexes were tested up to 500 mg/L. A bacterial inoculum prepared in reduced supplemented Brucella broth was added to each well to achieve a final density of 1×10^6 CFU/mL. The bacterial suspension and dilutions of the tested compounds were combined in equal volumes to achieve the expected concentrations of zinc amino acid complexes. Samples as well as adequate abiotic and biotic controls were incubated for 48 h at 37 °C after being placed in 96-well cell culture plates in anaerobic jars, in which anaerobic conditions were formed using Anoxomat Mark II CTS (Mart Microbiology B.V., Drachten, the Netherlands). The minimum inhibitory concentration (MIC), expressed in mg/L, was determined as the lowest concentration of zinc amino acid complexes at which no growth of *C. acnes* was observed. Next, the Brucella agar plates were inoculated with 200 µL of *C. acnes* suspension taken from the wells in which no bacterial growth was observed. The Brucella agar plates were incubated for 48 h at 37 °C after placing the plates in anaerobic jars, in which anaerobic conditions were created.

3.4. Assessment of Antifungal Properties of Zinc Complexes (1–6)

The antifungal potential of zinc amino acid complexes was tested by the microdilution method in RPMI 1640 medium without bicarbonate, with glutamine and phenol red as a pH indicator according to CLSI guidelines M27 (4th Edition) and M38 (3th Edition) for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast and filamentous fungi, respectively. Assessment of antifungal activity was conducted on *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *A. flavus* ATCC 9643 and *A. fumigatus* ATCC 204305 in 96-well cell culture plates. The antifungal activity of zinc amino acid complexes against yeast and filamentous fungi was assessed up to 500 mg/L. Final densities of yeast cells and fungi spores in each well were 2.5×10^3 CFU/mL and 2.5×10^4 CFU/mL, respectively. Samples containing zinc amino acid complexes as well as adequate biotic and abiotic controls were incubated for 48 h at 37 °C. After incubation, the minimum fungicidal concentration (MFC) was

determined as the lowest concentration of the tested compounds that completely inhibited the growth of microorganisms.

3.5. Preparation of Gel Formulations: ZnGly Gel (A), ZnHis Gel (B) and Placebo Gel

The detailed composition of each prepared gel formulation is depicted in Table 7. The percentage concentrations of the active substances, i.e., ZnGly (2) and ZnHis (3), in gel formulations were 0.66% and 1.27%, respectively.

Table 7. Detailed composition of gel formulations.

Components	ZnGly Gel (A)	ZnHis Gel (B)	Placebo Gel
Demineralized water	to 100 g	to 100 g	to 100 g
Iota-Carrageenan	2 g	2 g	2 g
Phenoxyethanol			
Ethylhexylglycerin (9:1)	1 g	1 g	1 g
ZnGly (2)	0.66 g	N/A	N/A
ZnHis (3)	N/A	1.27 g	N/A
2.5% Citric Acid	14.76 g	22.75 g	0.52 g

N/A—not added.

Each formula was prepared at room temperature. The carrageenan (2.0 g) was spread thoroughly into the water (70 mL) until the gel was formed. The mixture of phenoxyethanol: ethylhexylglycerin (9:1) (1.0 g) was added. The mixture was homogenized (7 000 RPM, 1 min/100 g). The proper zinc complex (0.66 g of ZnGly (2) and 1.27 g of ZnHis (3)) was added and mixed. While stirring, aqueous 2.5% citric acid solution (i.e., 0.52 g for placebo gel, 14.76 g for ZnGly gel (A) and 22.75 g for ZnHis gel (B)) was added to achieve a pH value between 5.0 and 5.5. The obtained gels were then homogenized (7 000 RPM, 2 min/100 g) and stored for seven days till the air bubbles disappeared.

3.6. Stability Assessment of Gel Formulations: ZnGly Gel (A), ZnHis Gel (B) and Placebo Gel

In order to assess the stability of prepared gel formulations, i.e., ZnGly gel (A), ZnHis gel (B) and placebo gel, their three physicochemical parameters, including pH, density and viscosity, were evaluated every week for six weeks. All samples were stored at room temperature (23.8 ± 0.6 °C).

3.6.1. pH Testing

The pH values of the prepared formulations were determined using a calibrated Digital pH meter (Seven Compact meter, Mettler-Toledo, Warsaw, Poland) with the pH value accuracy (± 0.01). The measurement process was performed directly as all examined products were water-based gel formulas. Every measurement of pH of each formulation was triplicated and mean values were noted.

3.6.2. Viscosity Measurements

The viscosity measurements of prepared gel formulas were performed using the Rotational Viscometer (model R ViscoLead ONE, Fungilab, Barcelona, Spain). Depending on the gel formula, various types of spindle and its rotation speed were determined and then utilized. The following set of spindles and rotation speeds (revolutions per minute, RPM) was established: “R2, 30 RPM” for placebo gel, “R4, 2 RPM” for Zinc Glycinate gel and “R5, 2 RPM” for Zinc Histidine gel. Every viscosity measurement of each formulation was triplicated and mean values were noted. Considering the gels were airlocked immediately after their preparation, the first measurement was performed after one week. All measured values in centipoise [cP] are depicted in Table 3A–C.

3.6.3. Density Measurements

The density measurements for the gel preparations were performed using the calibrated metal pycnometer (P1 model, POL-ZAF, Wrocław, Poland, $V = 49.969 \text{ cm}^3$). Every measured density value of each formulation was triplicated and the mean values were noted. The gels were airlocked immediately after their preparation and the first measurement was performed after one week. All measured values in g/cm^3 are depicted in Table 3A–C.

3.7. Microbiological Tests of Gel Formulations: ZnGly Gel (A), ZnHis Gel (B) and Placebo Gel

3.7.1. Microbiological Purity Test

Detection of the presence of microorganisms in the cosmetic product, and their quantification, was performed in accordance with the current applicable ISO standards:

1. PN-EN ISO 21149:2017-07 Cosmetics. Microbiology. Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria.
2. PN-EN ISO 16212:2017-08 Cosmetics. Microbiology. Enumeration of yeasts and molds.
3. PN-EN ISO 18415:2017-07 Cosmetics. Microbiology. Detection of mold spores.
4. PN-EN ISO 22717:2016-01 Cosmetics. Microbiology. Detection of *Pseudomonas aeruginosa*.
5. PN-EN ISO 21150:2016-01 Cosmetics. Microbiology. Detection of *Escherichia coli*.
6. PN-EN ISO 22718:2016-01 Cosmetics. Microbiology. Detection of *Staphylococcus aureus*.
7. PN-EN ISO 18416:2016-01 Cosmetics. Microbiology. Detection of *Candida albicans*.

The research procedure included three separate phases: detection of the presence of the aforementioned microorganisms (1) and determination of the number of microorganisms (2 and 3):

1. Preparation of the suspension and preliminary multiplication on non-selective propagation broth—the decimal dilution suspension (the mixture of 1 g/mL sample and 9 mL Eugon LT100 broth) was mixed well and incubated under aerobic conditions. Preliminary multiplication on non-selective propagation broth was performed at a temperature range of $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ for at least 20 h for aerobic mesophilic bacteria, or at least 20 h but not more than 72 h for *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*.
2. Cultivation and isolation on a selective agar medium (or non-selective in the case of aerobic mesophilic bacteria)—the samples were incubated aerobically at $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ for 24–48 h (*C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) or 48–72 h (aerobic mesophilic bacteria, molds and yeasts) on medium TSA (aerobic mesophilic bacteria), SDA with chloramphenicol (*C. albicans*), MacConkey agar (*E. coli*), medium with cetrimide (*P. aeruginosa*), and Baird-Parker agar (*S. aureus*). For the determination of the number of microorganisms, after the incubation step, the colonies grown on the plate were counted and the number of microorganisms was determined (CFU/1 g (mL)).
3. Identification tests—performed using RapID biochemical identification tests (Remel, England), using conventional and chromogenic substrates to identify species of bacteria and fungi.

3.7.2. Test for Efficacy of Antimicrobial Preservation (Challenge Test)

The effectiveness of antimicrobial protection was determined in accordance with the European Pharmacopoeia 10.0 (Ph. Eur. 10.0). The preparation demonstrates appropriate preservative properties if there is a significant decrease, or no increase, in the number of viable microbial cells in the inoculated preparation under the test conditions, after the specified time and at the specified temperature.

• Test Microorganisms

With the reference to Ph. Eur. 10.0., the preservation efficacy test of the dermal product was performed with inoculation of the preparation with the standardized following microorganisms: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Each microbial strain was tested on the preparation separately.

- Preparation of Inoculum

Each inoculum was prepared from a fresh culture of the aforementioned microorganisms. The individual cultures were incubated at the appropriate temperature for the appropriate time according to the indications of Ph. Eur. 10.0. The obtained microorganism suspensions had the following densities: for bacteria— 10^7 – 10^8 CFU/mL, *C. albicans*— 10^6 – 10^7 CFU/mL, *A. brasiliensis*— 10^6 – 10^7 CFU/mL.

- Method Description

The study began with an assessment of the effectiveness of the neutralizer, followed by an evaluation of the preservation efficiency of the preparation intended for cutaneous application.

The study was performed separately for each test sample and test microorganism. The test sample (20 g) was infected with the strain (0.2 mL) and stored at room temperature (20–25 °C). The detailed concentrations utilized for each strain, complying with the Ph. Eur. 10.0. criteria, are presented in the Supplementary Materials (Test reports S4–S6). At specified time intervals (Table 5), 1 g of sample was taken into 9 mL of neutralizer, thoroughly mixed and incubated (bacteria and *C. albicans*— 32.5 ± 2.5 °C for 48–72 h, *A. brasiliensis* 22.5 ± 2.5 °C for 3–5 days). After the incubation period, the grown colonies were counted; the degree of log reduction was then determined and compared to the Ph. Eur. 10.0. criteria (Table 5—acceptance criteria).

In the antimicrobial preservation efficiency test, the number of surviving microorganisms was determined at specified time intervals over a 28-day period. For each microbial strain, the log reduction index was calculated as the number of viable microorganisms against the value obtained for the inoculum; this value was compared with the criteria defined by Ph. Eur. 10.0. Detailed information of the criteria A and B is described in Table 5. The detailed results of each strain reduction over time, as indicated by the Ph. Eur. 10.0. criteria, are presented in the Supplementary Materials (Test reports S4–S6).

- Acceptance Criteria

The criteria for the evaluation of antimicrobial activity are presented in Table 5 (Section 2.6.2) and refer to the log reduction in each microorganism type.

The Ph. Eur. 10.0 expresses criteria A as recommended antimicrobial protection efficacy, implicating no additional preservatives are required. However, the antimicrobial protection efficacy level “B” might be accepted only in justified cases: for instance, if the A criterion cannot be achieved due to a significant risk of adverse reactions caused by the additional amounts of preservatives.

3.8. Dermatological Test (Patch Test) of Gel Formulations: ZnGly Gel (A), ZnHis Gel (B) and Placebo Gel

The examination was conducted according to the Jadassohn–Bloch method (modified by Rudzki) on a group of 25 healthy volunteers with a history of skin allergy [30]. All testing was performed under the supervision of a dermatologist. The main inclusion criteria were healthy females and males aged 18–65 years; phenotype: I–IV in the Fitzpatrick scale, caucasian skin type. The volunteers gave their voluntary consent to participate in the study. Their skin at the test site was normal, without any signs of irritation, allergy or any other pathological changes.

The tested product was applied to filter paper in Finn Chambers. The whole patch was then applied to the arm skin of a volunteer and removed after 48 h. The first reading was performed 15–20 min after patch removal, and subsequently after 72 h.

The test result was interpreted according to the scale recommended by the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) [51].

3.9. Statistical Analysis

Each experiment was performed in triplicate and repeated at least three times. All data are presented as means $\pm$ standard deviation (SD). The statistical significance was

determined using Tukey's HSD test (for comparison of physicochemical parameters) or the Kruskal–Wallis test (for comparison of cytotoxicity). Differences between means were considered significant at $p \leq 0.05$. All the statistical analyses were calculated using Statistica software (STATSoft, Cracow, Poland, version 13.1, 2016).

4. Conclusions

Among the studied zinc complexes with amino acids, two of them, i.e., Zn complexes with glycine (2) and histidine (3), may constitute new active components of anti-acne preparations for topical treatment. The compounds ZnGly (2) and ZnHis (3) were selected because of their low in vitro cytotoxic potential for skin cells, both keratinocytes and fibroblasts, and high activity against *Cutibacterium acnes*.

The developed formulations: ZnGly gel (A) and ZnHis gel (B), based on the selected zinc complexes, were proven to be physicochemically stable and demonstrated high microbiological purity, with a well-selected preservative system and without any irritation or allergies in people with sensitive skin.

Therefore, the tested preparations (A) and (B) appear to have great potential for patients with symptoms of acne vulgaris. However, before they can be introduced to the market, further in vivo application studies with patients are needed to confirm their anti-acne effects.

In the next step of the research, it would be interesting to verify whether the active substances could play additional preservative roles in the preparations. This stage would require the preparation of new formulations without a preservative system and their further detailed testing. Obtaining preparations with such a simplified composition would be valuable, especially in terms of their use in the treatment of allergic skin prone to irritation.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1641/s1>, Test report S1: microbiological purity test for ZnGly gel (A), Test report S2: microbiological purity test for ZnHis gel (B), Test report S3: microbiological purity test for placebo gel, Test report S4: challenge test for ZnGly gel (A), Test report S5: challenge test for ZnHis gel (B), Test report S6: challenge test for placebo gel, Test report S7: dermatological test (Patch test) for ZnGly gel (A), Test report S8: dermatological test (Patch test) for ZnHis gel (B), Test report S9: dermatological test (Patch test) for placebo gel.

Author Contributions: Conceptualization, M.A. and U.K.-L.; methodology, A.F., K.Z., M.A., P.N., E.P. (Elżbieta Płuciennik); software, E.P. (Ewelina Piątczak), E.P. (Elżbieta Płuciennik) and M.A.; validation, M.A., P.N., A.F., K.Z. and E.P. (Elżbieta Płuciennik); formal analysis, E.P. (Ewelina Piątczak), E.P. (Elżbieta Płuciennik) and M.A.; investigation, M.A., P.N., A.F., K.Z. and E.P. (Elżbieta Płuciennik) and U.K.-L.; data curation, M.A., P.N., A.F., E.P. (Ewelina Piątczak), and E.P. (Elżbieta Płuciennik); writing—original draft preparation, M.A., U.K.-L., A.F. and E.P. (Elżbieta Płuciennik); writing—review and editing, M.A. and U.K.-L.; visualization, E.P. (Elżbieta Płuciennik) and M.A.; supervision, U.K.-L.; project administration, U.K.-L.; funding acquisition, U.K.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Medical University of Lodz (grants No. 503/3-066-02/503-31-001 and No. 503/3-066-02/503-90-000).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study due to the fact that the conducted dermatological tests (Patch tests) were performed under the supervision of a dermatologist doctor. All volunteers were selected by the dermatologist on the basis of inclusion and exclusion criteria (please see "Test reports S7–S9" in the Supplementary Materials).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained by a dermatologist doctor from all volunteers involved in the dermatologist test (Patch test) (please see "Test reports S7–S9" in the Supplementary Materials).

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Glutsch, V.; Hamm, H.; Goebeler, M. Zinc and skin an update. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2019**, *17*, 589–596. [CrossRef] [PubMed]
- Nitzan, Y.B.; Cohen, A.D. Zinc in skin pathology and care. *J. Dermatolog. Treat.* **2006**, *17*, 205–210. [CrossRef]
- Abendrot, M.; Kalinowska-Lis, U. Zinc-containing compounds for personal care applications. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2018**, *40*, 319–327. [CrossRef] [PubMed]
- Cervantes, J.; Eber, A.E.; Perper, M.; Nascimento, V.M.; Nouri, K.; Ker, J.E. The role of zinc in the treatment of acne: A review of the literature. *Dermatol. Ther.* **2018**, *31*. [CrossRef] [PubMed]
- Plum, L.M.; Rink, L.; Haase, H. The essential toxin: Impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2010**, *7*, 1342–1365. [CrossRef]
- Gupta, M.; Mahajan, V.K.; Mehta, K.S.; Chauhan, P.S. Zinc therapy in dermatology: A review. *Dermatol. Res. Pract.* **2014**, *2014*, 709152. [CrossRef] [PubMed]
- Brocard, A.; Dréno, B. Innate immunity a crucial target for zinc in the treatment of inflammatory dermatosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **2011**, *25*, 1146–1152. [CrossRef] [PubMed]
- Azzouni, F.; Godoy, A.; Li, Y.; Mohler, J. The 5 alpha-reductase isozyme family: A review of basic biology and their role in human diseases. *Adv. Urol.* **2012**, *2012*, 530121. [CrossRef]
- Bolla, B.S.; Erdei, L.; Urbán, E.; Burián, K.; Kemény, L.; Szabó, K. *Cutibacterium acnes* regulates the epidermal barrier properties of HPV-KER human immortalized keratinocyte cultures. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12815. [CrossRef]
- Juliano, C.; Marchetti, M.; Pisu, M.L.; Usai, M. In vitro antimicrobial activity of essential oils from sardinian flora against *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* and its enhancement by chitosan. *Sci. Pharm.* **2018**, *86*, 40. [CrossRef]
- Miazga-Karska, M.; Michalak, K.; Ginalska, G. Anti-Acne Action of Peptides Isolated from Burdock Root—Preliminary Studies and Pilot Testing. *Molecules* **2020**, *25*, 2027. [CrossRef] [PubMed]
- Schlegel, P.; Windisch, W. Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with 65Zn labelled rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2006**, *90*, 216–222. [CrossRef]
- Deters, A.; Schmetz, E.; Schmidt, M.; Hensel, A. Effects of zinc histidine and zinc sulfate on natural human keratinocytes. *Forsch. Komplementarmed. Klass. Naturheilkd.* **2003**, *10*, 19–25. [CrossRef] [PubMed]
- Schölmerich, J.; Freudemann, A.; Köttgen, E.; Wietholtz, H.; Steiert, B.; Löhle, E.; Häussinger, D.; Gerok, W. Bioavailability of zinc from zinc-histidine complexes. I. Comparison with zinc sulfate in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **1987**, *45*, 1480–1486. [CrossRef]
- Sobel, S.; Theophyll, G. The complexation of aqueous metal ions relevant to biological applications. 2. Evaluation of simultaneous equilibria of poorly soluble zinc salts with select amino acids. *Chem. Speciat. Biotechnol.* **2010**, *22*, 201–205. [CrossRef]
- Udechukwu, M.C.; Collins, S.A.; Udenigwe, C.C. Prospects of enhancing dietary zinc bioavailability with food-derived zinc-chelating peptides. *Food Funct.* **2016**, *7*, 4137–4144. [CrossRef]
- Dreno, B.; Foulc, P.; Reynaud, A.; Moysé, D.; Habert, H.; Richet, H. Effect of zinc gluconate on *Propionibacterium acnes* resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: In vitro and in vivo study. *Eur. J. Dermatol.* **2005**, *15*, 152–155.
- Sardana, K.; Chugh, S.; Garg, V.K. The role of zinc in acne and prevention of resistance have we missed the base effect. *Int. J. Dermatol.* **2014**, *53*, 125–127. [CrossRef]
- Ventola, C.L. The antibiotic resistance crisis: Part I: Causes and threats. *Pharm. Ther.* **2015**, *40*, 277–283.
- Adler, B.L.; Kornmehl, H.; Armstrong, A.W. Antibiotic resistance in acne treatment. *JAMA Dermatol.* **2017**, *153*, 810–811. [CrossRef]
- Abendrot, M.; Chęćirska, L.; Kusz, J.; Lisowska, K.; Zawadzka, K.; Felczak, A.; Kalinowska-Lis, U. Zinc(II) complexes with amino acids for potential use in dermatology: Synthesis, crystal structures, and antibacterial activity. *Molecules* **2020**, *25*, 951. [CrossRef]
- Conforti, C.; Giuffrida, R.; Fadda, S.; Fai, A.; Romita, P.; Zalaudek, I.; Dianzani, C. Topical dermocosmetics and acne vulgaris. *Dermatol. Ther.* **2020**, e14436. [CrossRef]
- Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex:32009R1223> (accessed on 21 October 2020).
- Safety Assessment of Zinc Salts as Used in Cosmetics; Cosmetic Ingredient Review: Washington, DC, USA, 2017.
- Kwiecień, M.; Winarska-Mieczan, A.; Mileczarek, A.; Tomaszewska, E.; Matras, J. Effects of zinc glycine chelate on growth performance, carcass characteristics, bone quality, and mineral content in bone of broiler chicken. *Livest. Sci.* **2016**, *191*, 43–50. [CrossRef]
- Chen, N.N.; Liu, B.; Xiong, P.W.; Guo, Y.; He, J.N.; Hou, C.C.; Ma, L.X.; Yu, D.Y. Safety evaluation of zinc methionine in laying hens: Effects on laying performance, clinical blood parameters, organ development, and histopathology. *Poult. Sci.* **2018**, *97*, 1120–1126. [CrossRef] [PubMed]
- Bampidis, V.; Azimonti, G.; Bastos, M.L.; Christensen, H.; Dusemund, B.; Kouba, M.; Kos Durjava, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Marcon, E.; et al. Safety and efficacy of zinc chelates of lysine and glutamic acid as feed additive for all animal species. *EFSA J.* **2019**, *17*, 5782.
- Aguilar, F.; Autrup, H.; Barlow, S.; Castle, L.; Crebelli, R.; Dekant, W.; Engel, K.H.; Gontard, N.; Gott, D.; Grilli, S.; et al. Opinion on certain bisglycinates as sources of copper, zinc, calcium, magnesium and glycinate nicotinate as source of chromium in foods intended for the general population (including food supplements) and foods for particular nutritional uses. *EFSA J.* **2008**, *7*, 1–26.

29. Sardana, K.; Garg, V.K. An observational study of methionine-bound zinc with antioxidants for mild to moderate acne vulgaris. *Dermatol. Ther.* **2010**, *23*, 411–418. [\[CrossRef\]](#)
30. Rudzki, E.; Grzywa, Z. Contact sensitivity in atopic dermatitis. *Contact Derm.* **1975**, *1*, 285–287. [\[CrossRef\]](#)
31. Emri, E.; Miko, E.; Bai, P.; Boros, G.; Nagy, G.; Rózsá, D.; Juhász, T.; Hegedűs, C.; Horvay, I.; Remenyik, E.; et al. Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes. *Metallomics* **2015**, *7*, 499–507. [\[CrossRef\]](#)
32. Amy, M.; Holmes, L.M.; Roberts, M.S. Disposition and measured toxicity of zinc oxide nanoparticles and zinc ions against keratinocytes in cell culture and viable human epidermis. *Nanotoxicology* **2020**, *14*, 263–274.
33. Croaker, A.; King, G.J.; Pyne, J.H.; Anoopkumar-Dukie, S.; Liu, L. A review of black salve: Cancer specificity, cure, and cosmesis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2017**, *2017*, 9184034. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Martínez-Medina, J.J.; Naso, L.G.; Pérez, A.L.; Rizzi, A.; Okulik, N.B.; Valcarcel, M.; Salado, C.; Ferrer, E.G.; Williams, P.A.M. Synthesis, characterization, theoretical studies and biological (antioxidant, anticancer, toxicity and neuroprotective) determinations of a copper(II) complex with 5-hydroxytryptophan. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *111*, 414–426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Sharma, R.; Lall, N. Antibacterial, antioxidant activities and cytotoxicity of plants against *Propionibacterium acnes*. *S. Afr. J. Sci.* **2014**, *110*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
36. Mustarichie, R.; Sulistyaningsih, S.; Runadi, D. Antibacterial activity test of extracts and fractions of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* causing acne. *Int. J. Microbiol.* **2020**, *1*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
37. Ryan-Kewley, A.E.; Williams, D.R.; Hepburn, N.; Dixon, R.A. Non-antibiotic isotretinoin treatment differentially controls *Propionibacterium acnes* on skin of acne patients. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1381. [\[CrossRef\]](#)
38. Lallo da Silva, B.; Abuqafy, M.P.; Berbel Manaia, E.; Oshiro Junior, J.A.; Chiari-André, B.G.; Pietro, R.; Chiavacci, L.A. Relationship Between Structure and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 9395–9410. [\[CrossRef\]](#)
39. Li, Y.; Liao, C.; Tjong, S.C. Recent Advances in Zinc Oxide Nanostructures with Antimicrobial Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8836. [\[CrossRef\]](#)
40. Pasquet, J.; Chevalier, Y.; Pelletier, J.; Couval, E.; Bouvier, D.; Bolzinger, M.A. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Aspects* **2014**, *457*, 263–274. [\[CrossRef\]](#)
41. Joseyphus, R.S.; Nair, M.S. Antibacterial and Antifungal Studies on Some Schiff Base Complexes of Zinc(II). *Mycobiology* **2008**, *36*, 93–98. [\[CrossRef\]](#)
42. Nazirkar, B.; Mandewale, M.; Yamgar, R. Synthesis, characterization and antibacterial activity of Cu(II) and Zn(II) complexes of 5-aminobenzofuran-2- carboxylate Schiff base ligands. *J. Taibah Univ. Sci.* **2019**, *13*, 440–449. [\[CrossRef\]](#)
43. Yamgar, R.S.; Nivid, Y.; Nalawade, S.; Mandewale, M.; Atram, R.G.; Sawant, S.S. Novel Zinc(II) Complexes of Heterocyclic Ligands as Antimicrobial Agents: Synthesis, Characterisation, and Antimicrobial Studies. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2014**, *2014*. [\[CrossRef\]](#)
44. Andrade, J.P.; Wagemaker, T.A.L.; Mercurio, D.G.; Campos, P. Benefits of a dermocosmetic formulation with vitamins B3 and a B6 derivative combined with zinc-PCA for mild inflammatory acne and acne-prone skin. *JBPR* **2018**, *15*, 214–223. [\[CrossRef\]](#)
45. Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2006**, *28*, 359–370. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Prakash, C.; Bhargava, P.; Tiwari, S.; Majumdar, B.; Bhargava, R.K. Skin surface pH in acne vulgaris: Insights from an observational study and review of the literature. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2017**, *10*, 33–39. [\[PubMed\]](#)
47. Michalek, I.M.; John, S.M.; Caetano Dos Santos, F.L. Microbiological contamination of cosmetic products—Observations from Europe, 2005–2018. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **2019**, *33*, 2151–2157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. The Scientific Committee on Consumers Safety, Directorate-General for Health and Consumer Protection of the European Commission; The SSCS's Notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation, 10th revision; SCCS: Brussels, Belgium, 2018.
49. Varvaresou, A.; Papageorgiou, S.; Tsiarivas, E.; Prototapa, E.; Kintziou, H.; Kefala, V.; Demetzos, C. Self-preserving cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2009**, *31*, 163–175. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Halla, N.; Fernandes, L.P.; Heleno, S.A.; Costa, P.; Boucherit-Otmani, Z.; Boucherit, K.; Rodrigues, A.E.; Ferreira, I.; Barreiro, M.F. Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules* **2018**, *23*, 1571. [\[CrossRef\]](#)
51. Johansen, J.D.; Aalto-Korte, K.; Agner, T.; Andersen, K.E.; Birch, A.; Bruze, M.; Cannavó, A.; Giménez-Arnu, A.; Gonçalo, M.; Goossens, A.; et al. European Society of Contact Dermatitis guideline for diagnostic patch testing—Recommendations on best practice. *Contact Derm.* **2015**, *73*, 195–221. [\[CrossRef\]](#)
52. Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS). Final opinion on water-soluble zinc salts used in oral hygiene products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *99*, 249–250. [\[CrossRef\]](#)
53. Brandrup, E.; Menne, T. Zinc pyrithione (Zinc Omadine) allergy. *Contact Derm.* **1985**, *12*, 50. [\[CrossRef\]](#)
54. Gonzalez Perez, R.; Aguirre, A.; Raton, J.A.; Eizaguirre, X.; Diaz-Perez, J.L. Positive patch tests to zinc pyrithione. *Contact Derm.* **1995**, *32*, 118–119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

dr Nowaczyk
Centrum Badań i Innowacji

dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307 e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

rev. 01

revised 2/2000, to LAB-08.00 (2, rev. 00)

BAĐANJE MIKROBIOLOGIČNE / KOSMETYKI / MICROBIOLOGICAL TEST / COSMETICS

Złocieniodawca: Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych
Customer: Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1
91-151 Łódź

Nazwa próbki: **zel ŻDD-Zn-Gly_2.5%_1_10.06.20**
Name of sample: **zel ŻDD-Zn-Gly_2.5%_1_10.06.20**

Numer zlecenia: 0014 - Z / 09 / 20

Metoda pobrania próbki (5): Nie podano rev.: (N)

Próbka pobrane przez: Klienta
Sample collected by: Customer

Postępowanie z próbką wg: LAB-05.00.00 rev.: 01

Stan i ilość próbek: Bez zastrzeżeń
Sample evaluation & quantity: Correct

Data przyjęcia próbek: 02.09.2020

Numer próbki: 0057 - P / 09 / 20
Sample No.:

Data rozpoczęcia badania: 02.09.2020
Date of analysis start:

Numer analizy : 0054 - MK / A / 09 / 20
Analysis No.:

Data zakończenie badania: 08.09.2020
Date of of analysis end:

Wyniki badania odnoszą się wyłącznie do badanego obiektu / Results are connected only with samples which were analysed

Lp. No.	Parametr Parameter	Metoda Method	Kryterium Requirements	(B)	Wynik Result [Microbiological]	U (U)
1.	Ogólna liczba drobnoustrojów ścisłych Enumeration of aerobic mesophilic microorganisms	PN-EN ISO 21149:2017-07	1×10^3 CFU / 1g/ml (3)	(A)	$< 1 \times 10^1$ CFU / 1g/ml	NIA
2.	Ogólna liczba pleśni i drożdży Enumeration of yeast and mould	PN-EN ISO 18212:2017-08	1×10^3 CFU / 1g/ml (3)	(A)	$< 1 \times 10^1$ CFU / 1g/ml	NIA
3.	Obecność zarodków pleśni Detection of mold spores	PN-EN ISO 18415:2017-07	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	NIA
4.	Obecność <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Detection of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PN-EN ISO 22717:2018-01	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	NIA
5.	Obecność <i>Escherichia coli</i> Detection of <i>Escherichia coli</i>	PN-EN ISO 21150:2018-01	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	NIA
6.	Obecność <i>Staphylococcus aureus</i> Detection of <i>Staphylococcus aureus</i>	PN-EN ISO 22718:2018-01	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	NIA
7.	Obecność <i>Candida albicans</i> Detection of <i>Candida albicans</i>	PN-EN ISO 18416:2018-01	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	NIA

TABLE 1

- 1) - wyniki próby niezmienności (N); 2) - wyniki próby zmienności (N); 3) - niepełności nie podaje się
- 2) - wyniki z niepełnościami rozszerzonymi - współczynnik rozszerzenia $\alpha=0$; poziom ufności 90% nie obejmuje niepełności w obszarze pobierania próbek;
- 3) - zgodnie z ewentualnymi wymaganiami Klienta
- 4) - badania podstawowe
- 5) - badania/pobór próbek oznaczenia symbolami (N) - badania/pobór próbek planowane do sfinalizacji w 2020 roku; symbolami (N) - badania/pobór próbek nieplanowane do sfinalizacji w 2020 roku.
- N/A - nie dotyczy

Legend

- (1) - result is below the range of method (9), for the result below the range of method (4) uncertainty is not given
(2) - result with expanded uncertainty - the coverage factor $k=2$, confidence level 95% does not include unevaluated in the sample;
(3) - according to Internal Customer requirements
(4) - sub-contracted test
(5) - parameter (A) method / sampling planned for accreditation in 2006; parameter (B) - method / sampling not planned for accreditation in 2006
(6) - U - Uncertainty of measurement
not - not

Ocena zgodności z wymaganiami / Conformity of assessment with the requirements :

Backers próbnok: tel 200_Zn-Gly_2.5%_1_10.06.20
 Tested sample:

odpowiedzią
comply

IMAGEM DO JOGADOR

COMMENTS TO THE RESULT

References

COMMENTS: No comments

Autorenkennlinie:

Authorized:

מכתב 99 מ 98

dr. Nouamouti: 003

Kierownik Pracowni Mikrobiologii i Fizyko-Chemii (kwalifikowany podpis elektroniczny) *

Microbiological & Physical-Chemical Laboratory Manager (qualified electronic engineer)

[illegible][illegible]

Notwithstanding to whomsoever the above information is disclosed, the undersigned hereby warrants that the information is true and correct to the best of his or her knowledge and belief, and that the information is not misleading, incomplete or otherwise deficient in any material respect. The undersigned further warrants that the information is not confidential or otherwise subject to any restriction on disclosure, and that the information is not the property of any third party. The undersigned further warrants that the information is not the subject of any pending or threatened litigation, and that the information is not the subject of any other legal proceeding. The undersigned further warrants that the information is not the subject of any other legal proceeding. The undersigned further warrants that the information is not the subject of any other legal proceeding.

Podsumowanie z badania zostało skrócone w jednym egzemplarzu.

Original nr 1 : Klient

Koolle eestvedajate nr 1 : ArchWorm

Test Report prepared in single copy

Original copy No. # : Custom

Duplicate of copy No. 1: Archive

58

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S1–S3).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Zmigródzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307 e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr : 0053 - MK / A / 09 / 20 rev. 01
Test report, no : 0053 - MK / A / 09 / 20 rev. 01

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.02, rev. 03)

BADANIE MIKROBIOLOGICZNE / KOSMETYKI / MICROBIOLOGICAL TEST / COSMETICS

Zlecająca: Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych
Customer: Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1
91-151 Łódź

Nazwa próbki: zsi ZDD_2.5%_1_10.06.20
Name of sample: Sample of:

Numer zlecenia: 0014 - Z / 09 / 20
Protocol-order No.:

Próbka pobrana przez: Klienta
Sample collected by: Customer

Stan i ilość próbki: Bez zastrzeżeń
Sample evaluation & quantity: Correct

Numer próbki: 0056 - P / 09 / 20
Sample No.:

Numer analizy: 0053 - MK / A / 09 / 20
Analysis No.:

Metoda pobrania próbki (5): Nie podano
Method of sampling (5): Not given rev.: (N)

Postępowanie z próbką wg: LAB-05.00.00 rev.: 01
Handling of sample acc to:

Data przyjęcia próbki: 02.09.2020
Date of receiving sample:

Data rozpoczęcia badania: 02.09.2020
Date of analysis start:

Data zakończenia badania: 08.09.2020
Date of analysis end:

Wyniki badania odnoszą się wyłącznie do badanego obiektu / Results are connected only with samples which were analysed

Lp. No.	Parametr Parameter	Metoda Method	Kryteria Requirements	(B)	Wynik Result [Jednostka/Unit]	U (C)
1.	Ogólna liczba drobnoustrojów śluzowych Enumeration of aerobic mesophilic microorganisms	PN-EN ISO 21149:2017-07	1 x 10 ³ CFU / 1g/ml (3)	(A)	< 1 x 10 ³ CFU / 1g/ml	N/A
2.	Ogólna liczba pleśni i drożdży Enumeration of yeast and mould	PN-EN ISO 18212:2017-08	1 x 10 ³ CFU / 1g/ml (3)	(A)	< 1 x 10 ³ CFU / 1g/ml	N/A
3.	Obecność zarodków pleśni Detection of mold spores	PN-EN ISO 18415:2017-07	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	N/A
4.	Obecność <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Detection of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PN-EN ISO 22717:2018-01	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	N/A
5.	Obecność <i>Escherichia coli</i> Detection of <i>Escherichia coli</i>	PN-EN ISO 21150:2018-01	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	N/A
6.	Obecność <i>Staphylococcus aureus</i> Detection of <i>Staphylococcus aureus</i>	PN-EN ISO 22718:2018-01	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	N/A
7.	Obecność <i>Candida albicans</i> Detection of <i>Candida albicans</i>	PN-EN ISO 18416:2018-01	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml (3)	(A)	Nieobecne w 1g/ml Absence in 1g/ml	N/A

Legenda:

- (1) - wynik poniżej zakresu metody (1), dla wyniku poniżej zakresu metody (1) niepewność nie podaje się
(2) - wynik z niepewnością rozszerzoną - współczynnik rozszerzenia k=2, poziom ufności 95% nie obejmuje niepewności w obszarze pobierania próbek;
(3) - zgodnie z wewnętrzny wymaganiami Klienta
(4) - badanie podstawowe
(5) - badanie/pobór próbek zamierzony zgodnie z (A) - badanie/pobór próbek planowane do akredytacji w 2020 roku; symbol (N) - badanie/pobór próbek nieplanowane do akredytacji w 2020 roku;
(B) - U - niepewność pomiaru
N/A - nie dotyczy

Legenda:

- (1) - result is below the range of method (1), for the result below the range of method (1) uncertainty is not given
(2) - result with expanded uncertainty - the coverage factor k=2, confidence level 95% data not include uncertainties in the sample;
(3) - according to internal Customer requirements
(4) - sub-confirmed test
(5) - parameter (A) method / sampling planned for accreditation in 2020; parameter (N) - method / sampling not planned for accreditation in 2020
(B) - U - Uncertainty of measurement
N/A - not applicable

Ocena zgodności z wymaganiami / Conformity of assessment with the requirements :

Badana próbka: zsi ZDD_2.5%_1_10.06.20
Tested sample: odpowiadają
comply wymaganiom określonym przez Klienta oraz PN-EN ISO 17516:2014-01, PN-EN ISO 17518:2016-01.

UWAGI DO WYNIKU: Ocena zgodności. Zaświadczenie decyzji nr 3 "zaświadczenie przez Klienta". Uwzględnienie kryteriów akceptacji wynikających z normy PN-EN ISO 17516:2014-01, bez uwzględnienia niepewności pomiaru.
COMMENTS TO THE RESULT: Conformity assessment. Decision rule no. 3 "principle indicated by the client". Taking into account the acceptance criteria resulting from the PN-EN ISO 17516:2014-01 standard, without taking into account the measurement uncertainty.

REMARKS:
No comments

Autoryzował :

08.09.2020

dr Nowaczyk: 003



Kierownik Pracowni Mikrobiologii i Fizyko-Chemii (kwalifikowany podpis elektroniczny) *

Microbiological & Physico-Chemical Laboratory Manager (qualified electronic signature) *

- (*) Bezpieczny podpis elektroniczny wygenerowany przy pomocy certyfikatu kwalifikowanego jest równoważny pod względem skutku prawnego z podpisem własnoręcznym. Oryginalne sprawozdanie z badań są wydawane w formie elektronicznej z rozszerzeniem ".sig.pdf" lub ".sig.pdf". W związku z tym wszystkie wydruki, o ile nie są opatrzone za zgodności z oryginałem, są kopiami.
(*) Secure electronic signature generated by a qualified certificate is equivalent in terms of legal consequences to handwritten signature. The original test report is issued in electronic form with the extension ".sig.pdf" or ".sig.pdf". Therefore, all prints, if not confirmed as being true to the original, are copies.

Badanie wykonano w Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. zgodnie z procedurą opisaną w dokumentacji wewnętrznej. Wyniki badań są zgodne z przyjętymi międzynarodowymi standardami. Wyniki badań są zgodne z wymaganiami określonymi w normach PN-EN ISO 17516:2014-01, PN-EN ISO 17518:2016-01, bez uwzględnienia niepewności pomiaru.
The test was performed in the Center of Research and Innovation Sp. z o.o. Sp.K. according to the procedure described in the internal documentation. The test results are in accordance with generally accepted international standards. The test results are in accordance with the requirements specified in the standards PN-EN ISO 17516:2014-01, PN-EN ISO 17518:2016-01, without taking into account the measurement uncertainty.

Wzrostki i kolonie mikroorganizmów zostały zidentyfikowane przy użyciu testu reakcji łąkowej (LOR) i testu reakcji łąkowej (LOR) w celu potwierdzenia identyfikacji. Wyniki badań są zgodne z przyjętymi międzynarodowymi standardami. Wyniki badań są zgodne z wymaganiami określonymi w normach PN-EN ISO 17516:2014-01, PN-EN ISO 17518:2016-01, bez uwzględnienia niepewności pomiaru.
The growth and colonies of microorganisms were identified using the LOR test and the LOR test in order to confirm the identification. The test results are in accordance with generally accepted international standards. The test results are in accordance with the requirements specified in the standards PN-EN ISO 17516:2014-01, PN-EN ISO 17518:2016-01, without taking into account the measurement uncertainty.

Sprawozdanie z badania zostało sporządzone w jednym egzemplarzu.
Test Report prepared in single copy.

Original nr 1: Klient
Original copy No. 1: Customer

Kopia egzemplarza nr 1: Archiwum
Duplicate of copy No. 1: Archive

Strona 1 z 1

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S4–S6).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 508 387 307 e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :

Test report, no : 0002 - MB / A / 09 / 20 rev. 02

(zgodnie z / acc. to: LAB-05.00.03, rev. 02)

TEST KONSERWACJI / COSMETYKI / CHALLENGE TEST / COSMETICS

Zlecająca: Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych

Customer: Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Muszyńskiego 1

91-151 Łódź

Nazwa próbki:

Name of sample: żel ŻDO_Zn-Gly_2.5%_1_10.06.20

Metoda badawcza:

Test Method: Ph. Eur. 10.0, <5.1.3>

Numer zlecenia:

0014 - Z / 09 / 20

Metoda pobrania próbki (5): Nie podano

Method of sampling (5): Not given rev.: (N)

Próbka pobrana przez: Klienta

Sample collected by: Customer

Postępowanie z próbką wg: LAB-05.00.00

Handling of sample acc to: rev.: 01

Stan i ilość próbki: Bez zastrzeżeń

Sample evaluation & quantity: Correct

Data przyjęcia próbki: 02.09.2020

Date of receiving sample:

Numer próbki: 0057 - P / 09 / 20

Sample No.:

Data rozpoczęcia badania: 02.09.2020

Date of analysis start:

Numer analizy: 0002 - MB / A / 09 / 20

Analysis No.:

Data zakończenie badania: 12.10.2020

Date of analysis end:

Układ konserwujący: Euzyl PE 9010 1%

Preservation System: Zinc Gly Complex 0.66%

Wyniki badania odnoszą się wyłącznie do badanego obiektu / Results are connected only with samples which were analysed

Neutralizator: Bulion Eugon LT 100, skład: panewalny hydroizat łazynny 15g, papainowy hydroizat maszki olejowej 5g, chlorek sodu 4g, L-cystyna 0.7g, siarczan (IV) sodu 0.2g
Neutralizer: Broth Eugon LT 100: composition: pancreatin casein hydrolyzate 15g, papain soybean papay hydrolyzate 5g, sodium chloride 4g, L-cysteine 0.7g, sodium sulfate (IV) 0.2g

Pożytki mikrobiologiczne: bakterie - Tryptic soy agar (TSA); drożdże i pleśnie - Sabouraud Oxidase Agar medium (SOA);
Media:

Warunki inkubacji: 22,5 ± 2,5° C; 3-5 days (bakterie)

Incubation conditions: 22,5 ± 2,5° C; 3-5 days (yeast & molds)

Wielkość próbki: 20g (19,5-20,4 g) próbki dla każdego szerepu referencyjnego, 22,5 ± 2,5° C, 28 dni

Sample size: 20g (19,5-20,4 g) samples for each reference strain, 22,5 ± 2,5° C, 28 days

Kalibrowana zawiesina: 0,2 ml kalibrowanej zawiesiny, stężenie końcowe w próbce: 1,0 × 10⁵ - 1,0 × 10⁶ CFU/g

Calibrated suspension: 0.2 ml of calibrated suspension, final concentration in the sample: 1.0 × 10⁵ - 1.0 × 10⁶ CFU/g

L.p. No.	Parametr	szczep strain	Nvt [CFU/g]	Nvm [CFU/g]	Nvt ± 0,5 Nvm	Kontrola Nr Control Nr	N [CFU/ml]	No [CFU/ml]	(3)
1.	Wykazywanie skuteczności neutralizacji Demonstration of neutralizer effectiveness Nvt - liczba jk w mieszaninie neutralizatora i badanej próbki No. of CFU in the mixture with neutralizer and tested sample Nvm - liczba jk mieszaninie bez badanej próbki No. of CFU in the mixture without tested sample Nvt ± 0,5 Nvm Inokulum / Inoculum N - pożytkowa liczba drobnoustrojów initial number of microorganisms No - liczba drobnoustrojów po czasie To number of microorganisms after time To No=N/100	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	5,2 × 10 ⁵	5,6 × 10 ⁵	± 0,5	5,2 × 10 ⁵	5,3 × 10 ⁵	5,3 × 10 ⁵	(N)
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	4,0 × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁵	± 0,5	3,9 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3,8 × 10 ⁵	4,0 × 10 ⁵	± 0,5	3,7 × 10 ⁵	3,7 × 10 ⁵	3,7 × 10 ⁵	
		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3,4 × 10 ⁵	3,7 × 10 ⁵	± 0,5	3,0 × 10 ⁵	3,2 × 10 ⁵	3,2 × 10 ⁵	
		<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	4,3 × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁵	± 0,5	4,0 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	

WYNIKI / RESULTS

L.p. No.	Parametr	szczep strain	Logarytm redukcji w czasie Tx [Rt] / Logarithm of reduction in time Tx [Rt]								(3)
			T2	kryterium criterion	T7	kryterium criterion	T14	kryterium criterion	T28	kryterium criterion	
2.	Test konserwacji Challenge test Rt = lg No - lg Nx No - liczba drobnoustrojów w czasie To No. of CFU at time To Nx - liczba drobnoustrojów w czasie Tx No. of CFU at time Tx Nt - liczba drobnoustrojów nie zwiększająca się w czasie T7, T14, T28 dni No. of CFU does not increase at time T7, T14, T28 days Rt = 0 gdy / when lg No = lg Nx (zwiększenie populacji względem wyjściowego stężenia) / (an increase in population relative to the initial count)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	4,25	≥ 2	4,25	≥ 3	4,25 NI	×	4,25 NI	≥ 3 I NI	(N)
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	4,14	≥ 2	4,14	≥ 3	4,14 NI	×	4,14 NI	≥ 3 I NI	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4,09	≥ 3	4,09	≥ 3	4,09 NI	×	4,09 NI	≥ 3 I NI	
		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	×	×	×	×	4,03	≥ 2	4,03 NI	≥ 2 I NI	
		<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	×	×	×	×	4,44	≥ 2	4,44 NI	≥ 2 I NI	

Zgodnie z Ph. Eur. 10.0, tab. 5.1.3-2 preparaty do użyciu, preparaty do nosa, preparaty do stosowania na skórę i preparaty do inhalacji
According to the EP 10.0, tab. 5.1.3-2 for ear preparations, nasal preparations, preparations for cutaneous application and preparations for inhalation

mikroorganizmy / microorganisms	Bakterie / Bacteria				C. albicans				A. brasiliensis	
	T2	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28	T28
czas pobrania próbki / sampling time	×	×	brak	≥ 3 I NI	brak	×	≥ 3 I NI	×	×	≥ 3 I NI
kryterium A / Criterion A	×	×	brak	≥ 3 I NI	brak	×	≥ 3 I NI	×	×	≥ 3 I NI
kryterium B / Criterion B	brak	brak	×	≥ 3 I NI	brak	×	≥ 3 I NI	×	×	≥ 3 I NI

Legenda:

(1) - zgodnie z wymaganiami wyszukanymi: Klienta

(2) - badanie podstawowe

(3) - badanie/pobór próbki oznaczony symbolem (A) - badanie/pobór próbki planowane do akredytacji w 2020 roku; symbolem (N) - badanie/pobór próbki nieplanowane do akredytacji w 2020 roku

N/A - nie dotyczy

Legenda:

(1) - according to Internal Customer requirements

(2) - sub-controlled test

(3) - parameter (A) method / sampling planned for accreditation in 2020; parameter (N) - method / sampling not planned for accreditation in 2020

N/A - not applicable

Strona / Page: 1 z 2 of 2

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S4–S6).

UWAGA: Uzupełnienie do Sprawozdania z badań nr: 0002 - MB / A / 09 / 20, rev. 01. Zmiana tabeli wyników dostosowana do wymagań dla produktów przeznaczonych do stosowania na skórze.
 COMMENTS: Supplement to the Test Report no. 0002 - MB / A / 09 / 20, rev. 01. Modification of the table adapted to the requirements for products intended to be applied to the skin.

Autoryzował : Authorized :	27.10.2020 data / date	drNowaczyk: 003 Nr pracownika / Employee no.	 kod QR / QR code	Kierownik Pracowni Mikrobiologii i Fizyko-Chemii (kwalifikowany podpis elektroniczny)* Microbiological & Physico-Chemical Laboratory Manager (qualified electronic signature)*
---	----------------------------------	--	---	---

UWAGA : Bezpieczny podpis elektroniczny weryfikowany przy pomocy certyfikatu kwalifikowanego jest równoważny pod względem skutków prawnych z podpisem własnoręcznym. Oryginalne sprawozdanie z badań są wydawane w formie elektronicznej z rozszerzeniem **""-sig.pdf"** lub **""_signed.pdf"**. W związku z tym wszystkie wydruki, o ile nie są potwierdzone za zgodność z oryginałem, są kopiami.
COMMENTS : Secure electronic signature verified by a qualified certificate is equivalent in terms of legal consequences handwritten signature. The original test report is issued in electronic form with the extension **""-sig.pdf"** lub **""_signed.pdf"**. Therefore, all prints, if not confirmed as being true to the original, are copies.

Badania wykonywane w Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. są przeprowadzane zgodnie ze standardowymi metodami badawczymi. Uzyskane wyniki są zgodne z przyjętymi międzynarodowymi standardami, chyba że zostały ustalone inne szczególne wymagania, stwierdzone na piśmie przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. oraz Klienta, przed rozpoczęciem badania. Wyniki badań udzielane są wyłącznie do konkretnych próbek, w konkretnych warunkach i przy użyciu metod badawczych (przetwórczości) zgodnych z wymaganiami. Stwierdzenie Klienta jest odpowiedzialne za jakość produktu i opakowania jest reprodukowana w sposób odczytany dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. Nie ponosi odpowiedzialności za powstanie wątpliwości, interpretacji i uogólnień wykonanie przez Klienta z wydanych przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. sprawozdanie z badań. Niepewne Sprawozdanie z badań jest odczytany Klienta. Wszelkie uwagi zgłoszone dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. sprawozdanie z badań nie może być powołane na świadectwo. Wyniki badań.

Testing at dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. is performed according to standard test procedures. Recorded test results are accurate to generally accepted international standards, unless specific requirements have been agreed to in writing by dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. and Customer prior to the test commencing. Our reports apply only to the specific samples tested, under stated conditions and using test methods and routines agreed in advance with our customers. It is the manufacturer's responsibility to ensure that additional production units of product and package are manufactured consistently. dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. shall have no liability for any misinterpretation, interpretation or generalisation drawn by the Customer or others from dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. This report is the confidential property of dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. and its Customer. Extracts from the test report shall not be reproduced, except in full, and not without prior written approval of dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K.

Sprawozdanie z badania zostało sporządzone w jednym egzemplarzu. Test Report prepared in single copy.	Original nr 1 : Klient (Original copy No. 1 : Customer)	Kopia egzemplarza nr 1 : Copy of copy No. 1 :	Archiwum Archive
--	--	--	-----------------------------------

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S4–S6).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Zmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 303 e-mail: biuro@dmnowaczyk.com
www.drnnowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :

Test report, no : 0003 - MB / A / 09 / 20 rev. 03

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.03)

TEST KONSERWACJI / KOSMETYKI / CHALLENGE TEST / COSMETICS

Zlecająca : Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych
Customer: Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1
91-151 Łódź

Nazwa próbki: *Próbki: Sample of:* *bei ZDD_Zn-His_2.5%_1_16.07.20*

Numer zlecenia: 0014 - Z / 09 / 20
Protocol-order No.:

Próbka pobrana przez: Klienta
Sample collected by: Customer

Stan i ilość próbek: Bez zastrzeżeń
Sample evaluation & quantity: Correct

Numer próbki: 0058 - P / 09 / 20
Sample No.:

Numer analizy: 0003 - MB / A / 09 / 20
Analysis No.:

Układ konserwujący: Euxyl PE 9010 1%
Preservation System: Zinc Histidine Complex 1.27%

Metoda badawcza: Ph. Eur. 10.0, <5.1.3>
Test Method:

Metoda pobrania próbek (5): Nie podano
Method of sampling (5): Not given rev.: (N)

Postępowanie z próbką wg: LAB-05.00.00 rev.: 01
Handling of sample acc to:

Data przyjęcia próbki: 02.09.2020
Date of receiving sample:

Data rozpoczęcia badania: 02.09.2020
Date of analysis start:

Data zakończenia badania: 12.10.2020
Date of analysis end:

Wyniki badania odnoszą się wyłącznie do badanego obiektu / Results are connected only with samples which were analysed

Neutralizator : Bulon Eugen LT 100, sól: penowalny hydroizat łazakny 15g, papelnowy hydroizat maszki łazakny 15g, chlork sodu 4g, L-cystyna 0.7g, siarczyn (IV) sodu 0.2g
Neutralizer : Bulon Eugen LT 100, composition: penowalny oasln hydroizat 15g, papeln oasln hydroizat 15g, sodium chlride 4g, L-cystine 0.7g, sodium sulfite (IV) 0.2g

Pożytek mikrobiologiczny : Bakteria - Tryptic soy agar (TSA); drożdże i pleśń / yeast & molds - Sabouraud Dextrose Agar medium (SDA);
Media:

Warunki inkubacji: 32,5 ± 2,5°C, 3 - 5 dni (bakterie)
Incubation conditions: 22,5 ± 2,5°C, 3 - 5 dni (yeast & molds)

Wielkość próbki: 20g (19,5 - 20,4 g) próbki dla każdego rozprawy wzorcowego, 22,5 ± 2,5°C, 28 dni
Sample size: 20g (19,5 - 20,4 g) samples for each reference strain, 22,5 ± 2,5°C, 28 days

Kalibrowana zawiesina: 0,2 ml kalibrowanej zawiesiny, stędnienie końcowe w próbce: 1,0 × 10⁸ - 1,0 × 10⁹ CFU/g
Calibrated suspension: 0,2 ml of calibrated suspension, final concentration in the sample: 1,0 × 10⁸ - 1,0 × 10⁹ CFU/g

Lp. No.	Parametr / Parameter	szczep strain	Nrf [CFU/g]	Nrn [CFU/g]	Nrf ≥ 0,5 Nrn	Kontrola Nr Controls Nr	N [CFU/ml]	No [CFU/ml]	(3)
1.	Wykazanie skuteczności neutralizacji / Demonstration of neutralizer effectiveness	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	5,5 × 10 ⁵	5,6 × 10 ⁵	≥ 0,5	5,2 × 10 ⁵	5,3 × 10 ⁵	5,3 × 10 ⁵	(N)
	Nrf - liczba jk w mieszaninie neutralizatora i badanej próbki / No. of CFU in the mixture with neutralizer and tested sample	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6558	4,3 × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁵	≥ 0,5	3,9 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	
	Nrn - liczba jk mieszaninie bez badanej próbki / No. of CFU in the mixture without tested sample	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3,9 × 10 ⁵	4,0 × 10 ⁵	≥ 0,5	3,7 × 10 ⁵	3,7 × 10 ⁵	3,7 × 10 ⁵	
	Inokulum / Inoculum	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3,5 × 10 ⁵	3,7 × 10 ⁵	≥ 0,5	3,0 × 10 ⁵	3,2 × 10 ⁵	3,2 × 10 ⁵	
	No - liczba drobnoustrojów po czasie To / number of microorganisms after time To	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	4,2 × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁵	≥ 0,5	4,0 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	4,1 × 10 ⁵	

WYNIKI / RESULTS

Lp. No.	Parametr / Parameter	szczep strain	Logarytm redukcji w czasie T _x [R _x] / Logarithm of reduction in time T _x [R _x]								(3)
			T ₂	kryterium criterion	T ₇	kryterium criterion	T ₁₄	kryterium criterion	T ₂₈	kryterium criterion	
2.	Test konserwacji / Challenge test	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	4,25	≥ 2	4,25	≥ 3	4,25 NI	×	4,25 NI	≥ 3 NI	(N)
	R _x = lg N ₀ - lg N _x / No - liczba drobnoustrojów w czasie To / No. of CFU at time To	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6558	4,14	≥ 2	4,14	≥ 3	4,14 NI	×	4,14 NI	≥ 3 NI	
	N _x - liczba drobnoustrojów w czasie T _x / No. of CFU at time T _x	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	4,09	≥ 3	4,09	≥ 3	4,09 NI	×	4,09 NI	≥ 3 NI	
	NI - liczba drobnoustrojów nie wykazująca się w czasie T ₇ , T ₁₄ , T ₂₈ dni / No. of CFU does not increase at time T ₇ , T ₁₄ , T ₂₈ days	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	×	×	×	×	4,03	≥ 2	4,03 NI	≥ 2 NI	
	R _x = 0 gdy / when lg N ₀ = lg N _x (nie wykazano zmiany w populacji w czasie) / (no population change was observed in the time course)	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	×	×	×	×	4,44	≥ 2	4,44 NI	≥ 2 NI	

Zgodnie z Ph. Eur. 10.0, tab. 5.1.3-2 należy przygotować do użycia, preparaty do nosa, preparaty do stosowania na skórę i preparaty do inhalacji
According to the EP 10.0, tab. 5.1.3-2 for ear preparations, nasal preparations, preparations for cutaneous application and preparations for inhalation

Wymagania / Requirements									
mikroorganizmy / microorganisms		Bakterie / Bacteria				C. albicans		A. brasiliensis	
czas pobrania próbki / sampling time		T ₂	T ₇	T ₁₄	T ₂₈	T ₁₄	T ₂₈	T ₁₄	T ₂₈
Kryterium A / Criterion A		≥ 2	≥ 3	bnk	≥ 3 NI	bnk	≥ 2 NI	≥ 2	≥ 2 NI
Kryterium B / Criterion B		bnk	bnk	≥ 3	≥ 3 NI	bnk	≥ 1	≥ 1 NI	≥ 1 NI

Legenda:

(1) - zgodnie z wewnętrzными wymaganiami Klienta

(2) - badanie podłożone

(3) - badanie/pobór próbki oznaczone symbolem (A) - badanie/pobór próbki planowane do akredytacji w 2020 roku; symbolem (N) - badanie/pobór próbki nieplanowane do akredytacji w 2020 roku

N/A - nie dotyczy

Legend:

(1) - according to internal Customer requirements

(2) - sub-validated test

(3) - parameter (A) method / sampling planned for accreditation in 2020; parameter (N) - method / sampling not planned for accreditation in 2020

N/A - not applicable

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S4–S6).

UWAGA: Uzupełnienie do Sprawozdania z badań nr: 0003 - MB / A / 09 / 20, rev. 02. Zmiana tabeli wyników dostosowana do wymagań dla produktów przeznaczonych do stosowania na skórze.
 COMMENTS: Supplement to the Test Report no. 0003 - MB / A / 09 / 20, rev. 02. Modification of the scoreboard adapted to the requirements for products intended to be applied to the skin.

Autoryzował: Authorized:	27.10.2020 data / date	drNowaczyk: 003 Nr pracownika / Employee no.	 kod QR / QR code	Kierownik Pracowni Mikrobiologii i Fizyko-Chemii (zweryfikowany podpis elektroniczny)* <i>Microbiological & Physico-Chemical Laboratory Manager (qualified electronic signature)*</i>
---	----------------------------------	--	---	---

UWAGA: Bezpieczny podpis elektroniczny zweryfikowany przy pomocy certyfikatu kwalifikowanego jest równoważny pod względem skutków prawnych z podpisem własnoręcznym. Oryginalne sprawozdanie z badań są wydawane w formie elektronicznej z rozszerzeniem **""-sig.pdf"** lub **""-signed.pdf"**. W związku z tym wszystkie wydruki, z których nie są pochłonięte za zgodności z oryginałem, są kopiami.
COMMENTS: Secure electronic signature verified by a qualified certificate is equivalent in terms of legal consequences handwritten signature. The original test report is issued in electronic form with the extension **""-sig.pdf"** lub **""-signed.pdf"**. Therefore, all prints, if not confirmed as being true to the original, are copies.

Badania wykonujemy w dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. są przeprowadzane zgodnie ze standardowymi metodami badawczymi. Uzyskane wyniki są zgodne z przyjętymi międzynarodowymi standardami, chyba że zostały ustalone inne szczególne wymagania, zażądane na piśmie przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. oraz Klienta, przed rozpoczęciem badania. Wyniki badań laboratoryjnych są wyrażane do protokołów badań, w których jest uwzględnione i przy użyciu metod badawczych i procedur zgodnych z wytycznymi Klienta. Oświadczamy Klientowi, że zapewnienie, że każdy jednostka produktu i opakowanie jest wyprodukowane w sposób bezpieczny, dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. nie ponosi odpowiedzialności za jakiegokolwiek uszkodzenia, interakcje i uszkodzenia spowodowane przez klienta z wyjątkiem przed dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. sprawozdaniem z badań. Niniejsze sprawozdanie z badania jest poufny własnością Klienta. Nie ponosimy zgody dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. sprawozdanie z badania nie może być powielane inaczej, jak tylko w oryginale.
 Testing at dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. is performed according to standard test procedures. Respective test results are accurate to generally accepted international standards, unless specific requirements have been agreed in writing by dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. and Customer prior to the test commencing. Our reports apply only to the specific sample tested, under strict conditions and using test methods and routines agreed in advance with our customers. It is the manufacturer's responsibility to ensure that conditions prior to use of product and packaging are manufactured correctly. dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. shall have no liability for any reactions, interferences or generalisations drawn by the Customers or others from dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. issued reports. This report is the confidential property of dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K. and its Customer. Goods from the test report shall not be reproduced, except in full, and not without prior written approval of dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp. K.

Sprawozdanie z badania zostało skopiowane w jednym egzemplarzu. <i>Test Report appeared in single copy.</i>	Oryginał nr 1 - Klient <i>Original copy No. 1 - Customer</i>	Kopie egzemplarska nr 1 - <i>Copies of copy No. 1 -</i>	Archiwum <i>Archive</i>
---	--	---	-----------------------------------

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S4–S6).

UWAGA: Uzupełnienie do Sprawozdania z badań nr: 0001 - MB / A / 09 / 20, nrw. 02. Słód w kryterium akceptacji dla P, uwzględnia w T2, dostosowanie tabeli z kryteriami do wymagań Klienta.
 COMMENTS: Supplement to the Test Report no. 0001 - MB / A / 09 / 20, nrw. 02. Słód in criterion for P, uwzględnia w T2, adjusting the table with the criteria to the client's requirement.

Autoryzował : Authorized :	30.10.2020 data / date	dhlowaczki: 003 nr pracownika / Employee ID	 kod QR / QR code	Kierownik Pracowni Mikrobiologii i Fizyko-Chemii (kwalifikowany podpis elektroniczny)* Microbiological & Physico-Chemical Laboratory Manager (qualified electronic signature)*
fotografia / profile				

UWAGA : Bezpieczny podpis elektroniczny weryfikowany przy pomocy certyfikatu kwalifikowanego jest równoważny pod względem skutków prawnych z podpisem własnoręcznym. Oryginalne sprawozdanie z badań są wydawane w formie elektronicznej z rozszerzeniem ".sig.pdf" lub ".signed.pdf". W związku z tym wszystkie wydruki, z których nie są potwierdzone za zgodności z oryginałem, są kopiami.
COMMENTS : Secure electronic signature verified by a qualified certificate is equivalent in terms of legal consequences handwritten signature. The original test report is issued in electronic form with the extension ".sig.pdf" lub ".signed.pdf". Therefore, all prints, if not confirmed as being true to the original, are copies.

Badania wykonywane w dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. są przeprowadzane zgodnie ze standardowymi metodami badawczymi. Użytkownik wyniki są zgodnie z przyjętymi międzynarodowymi standardami, chyba że zostały ustalone inne szczególne wymagania, stwierdzone na piśmie przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. oraz Klienta, przed rozpoczęciem badań. Wyniki badań odnoszą się wyłącznie do przedstawionych próbek, w określonych warunkach i przy użyciu badań badawczych i procedur zgodzonych wcześniej z Klientem. Oświadczam Klienta jest odpowiedzialny za jakość i celność danych i nie odpowiada za ewentualne błędy, które mogą wystąpić w wyniku użycia danych z wydanych przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. sprawozdań z badań. Niniejsze sprawozdanie z badań jest własnością Klienta. Nie ponajemy zgody z Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. sprawozdanie z badań nie może być powielane inaczej, jak tylko w całości.

Testing at dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. is performed according to standard test procedures. Reported test results are accurate in generally accepted international standards, unless specific requirements have been agreed to in writing by dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. and Customer prior to the test commencing. Our reports apply only to the specific samples tested, under stated conditions and using test methods and routines agreed in advance with our customers. It is the manufacturer's responsibility to ensure that additional production units of product and package are manufactured identically. dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. shall have no liability for any deviations, differences or generalizations shown by the Customer or others from dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. issued reports. This report is the confidential property of dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K. And As Customer. Copies from the test report shall not be reproduced, except in full, and not without prior written approval of dr Nowaczyk Centrum Badań i Rozwoju Sp. z o.o. Sp. K.

Sprawozdanie z badania zostało eksportowane w jednym egzemplarzu. Test Report was exported in single copy.	Original nr 1 - Klient Original copy No. 1 - Customer	Kopia egzemplarza nr 1 Copy of copy No. 1	Archiwum Archive
---	--	--	-----------------------------------

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :		0013	- DR / A / 09 / 20	rev. 01
Test report, no :				
(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)				
BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS				
Zleceniodawca : <i>Customer :</i>	Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych Uniwersytet Medyczny w Łodzi ul. Muszyńskiego 1 91-151 Łódź		Kontrahent : <i>Contractor :</i> Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych Uniwersytet Medyczny w Łodzi ul. Muszyńskiego 1 91-151 Łódź	
Nazwa próbki: <i>Name of sample:</i>	żel ŻDD_Zn-Gly_2.5%_1_10.06.20 Gel ŻDD_Zn-Gly_2.5%_1_10.06.20			
Numer zlecenia: <i>Protocol-order No.:</i>	0014 – Z / 09 / 20	Metoda pobrania próbki (5) : <i>Method of sampling (5):</i>	Nie podano Not given	
Próbka pobrana przez: <i>Sample collected by:</i>	Klienta Customer	Postępowanie z próbką wg: <i>Handling of sample acc to:</i>	LAB-05.00.00, rev. 02	
Stan i ilość próbki: <i>Sample evaluation & quantity:</i>	Bez zastrzeżeń Correct	Data przyjęcia próbki: <i>Date of receiving sample:</i>	02.09.2020	
Numer próbki: <i>Sample No.:</i>	0057 – P / 09 / 20	Data rozpoczęcia badania: <i>Date of analysis start:</i>	19.10.2020	
Numer analizy : <i>Analysis No.:</i>	0013– DR / A / 09 / 20	Data zakończenie badania: <i>Date of of analysis end:</i>	23.10.2020	
Metoda badawcza (5): <i>Test method (5):</i>	MD-0xx.0, rev.01 „Badanie dermatologiczne testem płatkowym półotwartym” MD-0xx.00, rev. 01 „Badanie dermatologiczne testem płatkowym otwartym” MD-0XX.00, rev.01 „Dermatological semi-open patch test” MD-0xx.00, rev.01 „Dermatological open patch test”			
Metoda badań zgodna z: <i>Method of test acc to:</i>	➤ Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych (Dz. Urz. UE L 342 z 22.12.2009); <i>Regulation No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (OJ L 342, 22.12.2009);</i> ➤ Decyzja Wykonawcza Komisji z dnia 25 listopada 201 r. w sprawie wytycznych dotyczących załącznika I do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych; <i>Commission Implementing Decision of 25 November 2013 on Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products;</i> ➤ Ustawa z dnia 4 października 2018 r. o produktach kosmetycznych (Dz. U. 2018, poz. 2227); <i>Act on cosmetic products of 4 October 2018 (Journal of Laws of 2018, item 2227);</i> ➤ Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines „Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997”; <i>Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines “Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997;”</i> ➤ Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines „Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients, Edition of 1997”; <i>Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines “Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients, Edition of 1997;”</i> ➤ Cosmetics Europe - The Personal Care Association Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products 2008 ➤ The SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Substances and their Safety Evaluation 10th Revision – SCCS/1602/18 Final version ➤ „Basic Criteria of The protocols for the skin compatibility testing of potentially cutaneous irritant cosmetic ingredients of mixtures of ingredients on human volunteers” – SCCNFP/0245/99 Final December 1999 ➤ Deklaracja Helsińska z 1984 r. wraz z późniejszymi zmianami <i>Declaration of Helsinki of 1964 as amended;</i> ➤ „Memorandum on use of Human Data in risk assessment of skin sensitisation” – SCCS/1567/15			
Wyniki badania odnoszą się wyłącznie do badanego obiektu Results are connected only with samples which were analysed				

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@drnowaczyk.com
www.drnowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :
Test report, no : 0013 - DR / A / 09 / 20 rev. 01
(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

Spis treści / Index

1. Podstawa wykonania badania / Study basis	2
2. Charakterystyka próbki / Sample characteristics	2
3. Opis metody / Description of the method	3
4. Cel badania / Purpose of the study	3
5. Dobór probantów do badania / Selection of subjects	3
6. Wyniki badania / Test result	4
7. Wnioski / Conclusion	4
8. Zatwierdzenie / Approval	5

1. Podstawa wykonania badania / Study basis

- Próbkę do badań dostarczona przez Zleceniodawcę
Test sample delivered by the Customer
- Skład jakościowy próbki dostarczony przez Zleceniodawcę
Test sample qualitative composition delivered by the Customer
- Wyniki czystości mikrobiologicznej próbki dostarczone przez Zleceniodawcę
Test sample microbiological purity results delivered by the Client
- Informacje o sposobie użycia i przeznaczeniu produktu
Information about the manner of use and indications of the product

2. Charakterystyka próbki / Sample characteristics

Zgodnie ze specyfikacją jakościową producenta:
Acc. to the manufacturer's quality Specification:

Wygląd produktu: <i>Product appearance:</i>	Żel <i>Gel</i>
Barwa: <i>Color:</i>	Jasno słomkowa <i>Light straw</i>
Zapach: <i>Smell:</i>	Charakterystyczny dla użytych surowców <i>Typical of the materials used</i>
Opakowanie: <i>Package:</i>	Opakowanie zastępcze zawierające nazwę próbki <i>Replacement packaging with the sample name</i>
Przeznaczenie produktu: <i>Product designation:</i>	Żel do skóry trądzikowej <i>Gel for acne skin</i>
INCI (*) :	Aqua, Carrageenan, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Zinc Glycinate, Citric Acid.

(*) - sprawozdanie nie zawiera analizy składu próbki; za zgodność przygotowanych do badań próbek z deklarowanym składem jakościowym i czystością mikrobiologiczną produktu odpowiada Zleceniodawca / The report does not include sample composition analysis; the Client is responsible for the consistency of the test samples with the declared qualitative composition and microbiological purity of the product

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :

Test report, no : **0013 - DR / A / 09 / 20 rev. 01**
(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

3. Opis metody / Description of the method

Testy platkowe wg Jadassohna-Blocha (w modyfikacji Rudzkiego) prowadzono pod nadzorem lekarza dermatologa. Ocenę właściwości alergizujących i podrażniających preparatu przeprowadzono na grupie 25 zdrowych ochotników z wywiadem alergologicznym (panel wrażliwy) / bez wywiadu alergologicznego (panel zwykły) (niepotrzebne skreślić)

Patch tests according to Jadassohn-Bloch (as modified by Rudzki) were performed under the supervision of a dermatologist. The evaluation of sensitising and irritant properties of the product was made based on a sample of 25 healthy volunteers with (sensitive panel) / without (normal panel) a history of allergy.
(delete as appropriate)

Badanie przeprowadzono przy zastosowaniu plastrów Finn Chamber z bibułkami filtracyjnymi, na które nanosi się badany produkt, a następnie całość przykleja na skórę ochotnika (ramię lub okolica międzyłopatkowa). Próby zdejmowano po 48 h. Pierwszego odczytu dokonano po 15-20 minutach od zdjęcia plastra, a następnie po 72 h.

The study was conducted using Finn Chamber patches with filter paper onto which the tested product was applied; the whole patch was then applied to the volunteer's skin (arm or interscapular region). The patches were removed after 48 h. The first reading was done 15–20 minutes after patch removal, and subsequently after 72 h.

Odczyt został wykonany wg ogólnie przyjętej skali w badaniach dermatologicznych, a następnie oceniony przez lekarza dermatologa.

The reading was based on a generally acknowledged scale for dermatological studies, and subsequently evaluated by a dermatologist.

Odczyn dodatni (rumień) potwierdza alergizujące właściwości preparatu, zaś wynik ujemny (brak rumienia) potwierdza brak właściwości alergizujących.

A positive reaction (erythema) confirms sensitising properties, while a negative reaction (no erythema) confirms the lack of sensitising properties.

4. Cel badania / Purpose of the study

Ocena właściwości drażniących / uczulających produktu u zdrowego, dorosłego ochotnika metodą jednokrotnego nałożenia testu platkowego.

Assessment of irritant / sensitising properties of the product in a healthy adult volunteer with a single application of a patch test.

5. Dobór probantów do badania / Selection of subjects

Dobór ochotników uwzględnia kryteria włączeń i wyłączeń do badań.

The volunteers were selected on the basis of inclusion and exclusion criteria.

Główne kryteria włączenia: zdrowe kobiety i mężczyźni w wieku 18-65 lat, fototyp: I – IV w skali Fitzpatrick'a, typ skóry Kaukaski.

The main inclusion criteria were: healthy females and males aged 18–65 years; phenotype: I–IV in the Fitzpatrick scale, Caucasian skin type.

W badaniu wzięło udział 25 ochotników, którzy wyrazili dobrowolną zgodę na udział w badaniu.

The study involved 25 volunteers who expressed a voluntary consent to the participation in the study.

Skóra w miejscu badania była prawidłowa, bez podrażnień i zmian chorobowych.

The skin at the test site was normal, without irritation or pathological changes.

Ochotników poinformowano o sposobie szczególnej ostrożności w postępowaniu z testem platkowym.

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@drnowaczyk.com
www.drnowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :
Test report, no : 0013 - DR / A / 09 / 20 rev. 01

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev. 02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

The volunteers were informed about the manners of particular caution with respect to patches.

6. Wyniki badania / Test result

Tab. 1. Skala oceny wyników badań zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Grupy Badającej Wyprysk Kontaktowy (ICDRG).

The assessment scale was consistent with the recommendations of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)

Skala oceny Assessment scale	Wynik Result	Typ odczynu Reaction type
(-)	Odczyn ujemny Negative reaction	Brak zmian skórnych No skin changes
(?)	Odczyn wątpliwy / podrażnienie od plastra Doubtful result / patch irritation	Lekki odczyn rumieniowy Slight erythema
(+)	Słaby odczyn Mild reaction	Odczyn rumieniowy, wyczuwalny palpacyjnie, bez pęcherzyków Palpable erythema, no vesicles
(++)	Silny odczyn Strong reaction	Odczyn rumieniowy, grudki, obecne pęcherzyki lub obrzęk Erythema, papules, vesicles or swelling
(+++)	Bardzo silny odczyn Very strong reaction	Odczyn rumieniowy, grudki, pęcherzyki i / lub owrzodzenia Erythema, papules, vesicles and/or ulceration
(IR)	Reakcja podrażnieniowa Irritant reaction	Stan zapalny, brak nacieku, krostki, rumień, tendencja do wygasania Inflammation, no infiltration, papules, erythema, tendency to subside

Tab. 2. Wyniki badania / Test results

Ochoznik Volunteer	Wiek Age	Płeć Sex*	Fototyp skóry Skin phototype	Miejsce aplikacji Application area	Wynik Result	Ochoznik Volunteer	Wiek Age	Płeć Sex*	Fototyp skóry Skin phototype	Miejsce aplikacji Application area	Wynik Result
1.	36	K/F	II	Arm	(-)	14.	36	K/F	III	Arm	(-)
2.	42	K/F	I	Arm	(-)	15.	28	K/F	II	Arm	(-)
3.	40	K/F	III	Arm	(-)	16.	42	K/F	II	Arm	(-)
4.	32	K/F	III	Arm	(-)	17.	35	K/F	I	Arm	(-)
5.	60	K/F	I	Arm	(-)	18.	44	K/F	II	Arm	(-)
6.	44	K/F	II	Arm	(-)	19.	56	K/F	II	Arm	(-)
7.	46	K/F	III	Arm	(-)	20.	53	K/F	III	Arm	(-)
8.	43	K/F	II	Arm	(-)	21.	31	K/F	II	Arm	(-)
9.	39	K/F	II	Arm	(-)	22.	30	K/F	II	Arm	(-)
10.	55	K/F	III	Arm	(-)	23.	33	K/F	I	Arm	(-)
11.	38	K/F	II	Arm	(-)	24.	30	K/F	II	Arm	(-)
12.	39	K/F	I	Arm	(-)	25.	40	K/F	II	Arm	(-)
13.	30	K/F	II	Arm	(-)						

* - K/F – kobieta / female / M/M – mężczyzna / male

7. Wnioski / Conclusions

Na podstawie przeprowadzonego testu platkowego stwierdza się, że badany produkt:

żel ŻDD_Zn-Gly_2.5%_1_10.06.20
nie działa / ~~działa~~ drażniąco ani / ~~oraz~~ alergizująco na skórę badanych osób.
(niepotrzebne skreślić) (niepotrzebne skreślić)

Based on the patch test, it has been shown that the tested product:

Żel ŻDD_Zn-Gly_2.5%_1_10.06.20
has no / has irritant or / and sensitising effects on the skin of the subjects.

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Zmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@drnowaczyk.com
www.drnowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr : 0013 - DR / A / 09 / 20 rev. 01
Test report, no :
(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

(delete as appropriate)

(delete as appropriate)

Wydana opinia nie dotyczy osób, u których występuje udokumentowana alergia na którykolwiek składnik tego produktu.

The issued opinion does not refer to persons with a documented allergy to any of the product's components.

8. Zatwierdzenie / Approval

Opracował : Prepared :	26/10/2020 data / date	drNowaczyk: 001 Nr pracownika / Employee no	Dyrektor Laboratorium Laboratory Director	(kwalifikowany podpis elektroniczny) (qualified electronic signature)
			funkcja / position	
Autoryzował : Authorized :	26/10/2020 data / date	drNowaczyk: 005 Nr pracownika / Employee no	Specjalista dermatolog - wenerolog Specialist dermatologist - venerologist	
			funkcja / position	

UWAGA : Bezpieczny podpis elektroniczny weryfikowany przy pomocy certyfikatu kwalifikowanego jest równoważny pod względem skutków prawnych z podpisem własnoręcznym. Oryginalne sprawozdanie z badań są wydawane w formie elektronicznej z rozszerzeniem "-sig.pdf" lub "-signed.pdf". W związku z tym wszystkie wydruki, o ile nie są potwierdzone za zgodność z oryginałem, są kopiami.

COMMENTS : Secure electronic signature verified by a qualified certificate is equivalent in terms of legal consequences handwritten signature. The original test report is issued in electronic form with the extension "-sig.pdf" lub "-signed.pdf". Therefore, all prints, if not confirmed as being true to the original, are copies.

Badania wykonywane w dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. są prowadzone zgodnie ze standardowymi metodami badawczymi. Uzyskane wyniki są zgodne z przyjętymi międzynarodowymi standardami, chyba że zostały ustalone inne szczegółowe wymagania, zatwierdzone na piśmie przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. oraz Klienta, przed rozpoczęciem badania. Wyniki badań odnoszą się wyłącznie do przebadanych próbek, w określonych warunkach i przy użyciu metod badawczych i procedur uzgodnionych wcześniej z Klientem. Obowiązkiem Klienta jest zapewnienie, że każda jednostka produktu i opakowania jest wyprodukowana w sposób identyczny. dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. nie ponosi odpowiedzialności za jakiegokolwiek wniosek, interpretację i uogólnienia wykonane przez Klienta z wydanych przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. sprawozdań z badań. Niniejsze Sprawozdanie z Badania jest poufną własnością Klienta. Bez pisemnej zgody dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. sprawozdanie z badania nie może być powielane inaczej jak tylko w całości. Odpowiedzialność dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w oryginalnym sprawozdaniu.

The studies performed in Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. are conducted in accordance with standard research methodology. The results are concordant with acknowledged international standards unless other specific requirements have been established and approved in writing by Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. and the Client prior to the initiation of the study. The study results refer solely to the tested samples, given conditions and adopted research methods and procedures agreed on previously with the Client. It is the Client's obligation to produce each unit of the product and each package in an identical way. Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. is not responsible for any conclusions, interpretations and generalisations made by the Client based on the study reports issued by Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. This Study Report is confidential Client's property. Without the Client's consent in writing, Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. shall not copy the study report in other ways than in whole. The liability of Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. is restricted solely to the data included in the original report.

Sprawozdanie z badania zostało sporządzone w jednym egzemplarzu. Test Report prepared in single copy.	Oryginal nr 1 : Klient Original copy No. 1 : Customer	Kopia egzemplarza nr 1 : Archiwum Duplicate of copy No. 1 : Archive
--	--	--

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :		0014 - DR / A / 09 / 20		rev. 01
Test report, no :		0014 - DR / A / 09 / 20		rev. 01
(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)				
BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS				
Zleceniodawca :	Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych	Kontrahent:	Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych	
Customer :	Uniwersytet Medyczny w Łodzi	Contractor :	Uniwersytet Medyczny w Łodzi	
	ul. Muszyńskiego 1		ul. Muszyńskiego 1	
	91-151 Łódź		91-151 Łódź	
Nazwa próbki:	Żel ŻDD_Zn-His_2.5%_1_16.07.20			
Name of sample:	Gel ŻDD_Zn-His_2.5%_1_16.07.20			
Numer zlecenia:	0014 – Z / 09 / 20	Metoda pobrania próbki (5) :	Nie podano	
Protocol-order No.:		Method of sampling (5):	Not given	
Próbka pobrane przez:	Klienta	Postępowanie z próbką wg:	LAB-05.00.00, rev. 02	
Sample collected by:	Customer	Handling of sample acc to:		
Stan i ilość próbki:	Bez zastrzeżeń	Data przyjęcia próbki:	02.09.2020	
Sample evaluation & quantity:	Correct	Date of receiving sample:		
Numer próbki:	0058 – P / 09 / 20	Data rozpoczęcia badania:	19.10.2020	
Sample No.:		Date of analysis start:		
Numer analizy :	0014– DR / A / 09 / 20	Data zakończenie badania:	23.10.2020	
Analysis No.:		Date of of analysis end:		
Metoda badawcza (5):	MD-0xx.0, rev.01 „Badanie dermatologiczne testem płatkowym półotwartym”			
Test method (5):	MD-0XX.00, rev.01 „Badanie dermatologiczne testem płatkowym otwartym”			
	MD-0XX.00, rev.01 „Dermatological semi-open patch test”			
	MD-0xx.00, rev.01 „Dermatological open patch test”			
Metoda badań zgodna z:	➤ Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych (Dz. Urz. UE L 342 z 22.12.2009); <i>Regulation No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (OJ L 342, 22.12.2009);</i> ➤ Decyzja Wykonawcza Komisji z dnia 25 listopada 201 r. w sprawie wytycznych dotyczących załącznika I do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych; <i>Commission Implementing Decision of 25 November 2013 on Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products;</i> ➤ Ustawa z dnia 4 października 2018 r. o produktach kosmetycznych (Dz. U. 2018, poz. 2227); <i>Act on cosmetic products of 4 October 2018 (Journal of Laws of 2018, item 2227);</i> ➤ Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines „Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997”; <i>Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines “Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997;”</i> ➤ Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines „Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients, Edition of 1997”; <i>Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines “Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients, Edition of 1997;”</i> ➤ Cosmetics Europe - The Personal Care Association Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products 2008 ➤ The SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Substances and their Safety Evaluation 10th Revision – SCCS/1602/18 Final version ➤ „Basic Criteria of The protocols for the skin compatibility testing of potentially cutaneous irritant cosmetic ingredients of mixtures of ingredients on human volunteers” – SCCNFP/0245/99 Final December 1999 ➤ Deklaracja Helsińska z 1964 r. wraz z późniejszymi zmianami <i>Declaration of Helsinki of 1964 as amended;</i> ➤ „Memorandum on use of Human Data in risk assessment of skin sensitisation” – SCCS/1567/15			
Method of test acc to:				

Wyniki badania odnoszą się wyłącznie do badanego obiektu
Results are connected only with samples which were analysed

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@drnowaczyk.com
www.drnowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :
Test report, no : 0014 - DR / A / 09 / 20 rev. 01

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev. 02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

Spis treści / Index

1. Podstawa wykonania badania / Study basis	2
2. Charakterystyka próbki / Sample characteristics	2
3. Opis metody / Description of the method	3
4. Cel badania / Purpose of the study	3
5. Dobór probantów do badania / Selection of subjects	3
6. Wyniki badania / Test result	4
7. Wnioski / Conclusion	4
8. Zatwierdzenie / Approval	5

1. Podstawa wykonania badania / Study basis

- Próbkę do badań dostarczona przez Zleceniodawcę
Test sample delivered by the Customer
- Skład jakościowy próbki dostarczony przez Zleceniodawcę
Test sample qualitative composition delivered by the Customer
- Wyniki czystości mikrobiologicznej próbki dostarczone przez Zleceniodawcę
Test sample microbiological purity results delivered by the Client
- Informacje o sposobie użycia i przeznaczeniu produktu
Information about the manner of use and indications of the product

2. Charakterystyka próbki / Sample characteristics

Zgodnie ze specyfikacją jakościową producenta:
Acc. to the manufacturer's quality Specification:

Wygląd produktu: <i>Product appearance:</i>	Żel <i>Gel</i>
Barwa: <i>Color:</i>	Jasno słomkowa <i>Light straw</i>
Zapach: <i>Smell:</i>	Charakterystyczny dla użytych surowców <i>Typical of the materials used</i>
Opakowanie: <i>Package:</i>	Opakowanie zastępcze zawierające nazwę próbki <i>Replacement packaging with the sample name</i>
Przeznaczenie produktu: <i>Product designation:</i>	Żel do skóry trądzikowej <i>Gel for acne skin</i>
INCI (*):	Aqua, Carrageenan, Zinc Histidine, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Citric Acid.

(*) - sprawozdanie nie zawiera analizy składu próbki; za zgodność przygotowanych do badań próbek z deklarowanym składem jakościowym i czystością mikrobiologiczną produktu odpowiada Zleceniodawca / The report does not include sample composition analysis; the Client is responsible for the consistency of the test samples with the declared qualitative composition and microbiological purity of the product

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :

Test report, no : 0014 - DR / A / 09 / 20 rev. 01
(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

3. Opis metody / Description of the method

Testy platkowe wg Jadassohna-Blocha (w modyfikacji Rudzkiego) prowadzono pod nadzorem lekarza dermatologa. Ocenę właściwości alergizujących i podrażniających preparatu przeprowadzono na grupie 25 zdrowych ochotników z wywiadem alergologicznym (panel wrażliwy) / bez wywiadu alergologicznego (panel zwykły) (niepotrzebne skreślić)

Patch tests according to Jadassohn-Bloch (as modified by Rudzki) were performed under the supervision of a dermatologist. The evaluation of sensitising and irritant properties of the product was made based on a sample of 25 healthy volunteers with (sensitive panel) / without (normal panel) a history of allergy.
(delete as appropriate)

Badanie przeprowadzono przy zastosowaniu plastrów Finn Chamber z bibułkami filtracyjnymi, na które nanosi się badany produkt, a następnie całość przykleja na skórę ochotnika (ramię lub okolica międzyopatkowa). Próby zdejmowano po 48 h. Pierwszego odczytu dokonano po 15-20 minutach od zdjęcia plastra, a następnie po 72 h.

The study was conducted using Finn Chamber patches with filter paper onto which the tested product was applied; the whole patch was then applied to the volunteer's skin (arm or interscapular region). The patches were removed after 48 h. The first reading was done 15–20 minutes after patch removal, and subsequently after 72 h.

Odczyt został wykonany wg ogólnie przyjętej skali w badaniach dermatologicznych, a następnie oceniony przez lekarza dermatologa.

The reading was based on a generally acknowledged scale for dermatological studies, and subsequently evaluated by a dermatologist.

Odczyn dodatni (rumień) potwierdza alergizujące właściwości preparatu, zaś wynik ujemny (brak rumienia) potwierdza brak właściwości alergizujących.

A positive reaction (erythema) confirms sensitising properties, while a negative reaction (no erythema) confirms the lack of sensitising properties.

4. Cel badania / Purpose of the study

Ocena właściwości drażniących / uczulających produktu u zdrowego, dorosłego ochotnika metodą jednokrotnego nałożenia testu platkowego.

Assessment of irritant / sensitising properties of the product in a healthy adult volunteer with a single application of a patch test.

5. Dobór probantów do badania / Selection of subjects

Dobór ochotników uwzględnia kryteria włączeń i wyłączeń do badań.

The volunteers were selected on the basis of inclusion and exclusion criteria.

Główne kryteria włączenia: zdrowe kobiety i mężczyźni w wieku 18-65 lat, fototyp: I – IV w skali Fitzpatrick'a, typ skóry Kaukaski.

The main inclusion criteria were: healthy females and males aged 18–65 years; phenotype: I–IV in the Fitzpatrick scale, Caucasian skin type.

W badaniu wzięło udział 25 ochotników, którzy wyrazili dobrowolną zgodę na udział w badaniu.

The study involved 25 volunteers who expressed a voluntary consent to the participation in the study.

Skóra w miejscu badania była prawidłowa, bez podrażnień i zmian chorobowych.

The skin at the test site was normal, without irritation or pathological changes.

Ochotników poinformowano o sposobie szczególnej ostrożności w postępowaniu z testem platkowym.

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :

Test report, no :

0014

- DR / A / 09 / 20

rev. 01

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

The volunteers were informed about the manners of particular caution with respect to patches.

6. Wyniki badania / Test result

Tab. 1. Skala oceny wyników badań zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Grupy Badającej Wyprysk Kontaktowy (ICDRG).

The assessment scale was consistent with the recommendations of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)

Skala oceny Assessment scale	Wynik Result	Typ odczynu Reaction type
(-)	Odczyn ujemny Negative reaction	Brak zmian skórnych No skin changes
(?)	Odczyn wątpliwy / podrażnienie od plastra Doubtful result / patch irritation	Lekki odczyn rumieniowy Slight erythema
(+)	Słaby odczyn Mild reaction	Odczyn rumieniowy, wyczuwalny palpacyjnie, bez pęcherzyków Palpable erythema, no vesicles
(++)	Silny odczyn Strong reaction	Odczyn rumieniowy, grudki, obecne pęcherzyki lub obrzęk Erythema, papules, vesicles or swelling
(+++)	Bardzo silny odczyn Very strong reaction	Odczyn rumieniowy, grudki, pęcherzyki i / lub owrzodzenia Erythema, papules, vesicles and/or ulceration
(IR)	Reakcja podrażnieniowa Irritant reaction	Stan zapalny, brak nacieku, krostki, rumień, tendencja do wygasania Inflammation, no infiltration, papules, erythema, tendency to subside

Tab. 2. Wyniki badania / Test results

Ochotnik Volunteer	Wiek Age	Płeć* Sex*	Fototyp skóry skin phototype	Miejsce aplikacji Application area	Wynik Result	Ochotnik Volunteer	Wiek Age	Płeć* Sex*	Fototyp skóry skin phototype	Miejsce aplikacji Application area	Wynik Result
1.	36	K/F	II	Arm	(-)	14.	36	K/F	III	Arm	(-)
2.	42	K/F	I	Arm	(-)	15.	28	K/F	II	Arm	(-)
3.	40	K/F	III	Arm	(-)	16.	42	K/F	II	Arm	(-)
4.	32	K/F	III	Arm	(-)	17.	35	K/F	I	Arm	(-)
5.	60	K/F	I	Arm	(-)	18.	44	K/F	II	Arm	(-)
6.	44	K/F	II	Arm	(-)	19.	56	K/F	II	Arm	(-)
7.	46	K/F	III	Arm	(-)	20.	53	K/F	III	Arm	(-)
8.	43	K/F	II	Arm	(-)	21.	31	K/F	II	Arm	(-)
9.	39	K/F	II	Arm	(-)	22.	30	K/F	II	Arm	(-)
10.	55	K/F	III	Arm	(-)	23.	33	K/F	I	Arm	(-)
11.	38	K/F	II	Arm	(-)	24.	30	K/F	II	Arm	(-)
12.	39	K/F	I	Arm	(-)	25.	40	K/F	II	Arm	(-)
13.	30	K/F	II	Arm	(-)						

* - K/F – kobieta / female / M/M – mężczyzna / male

7. Wnioski / Conclusions

Na podstawie przeprowadzonego testu platkowego stwierdza się, że badany produkt:

żel ŻDD_Zn-His_2.5%_1_16.07.20
nie działa / działa drażniąco ani / oraz alergizująco na skórę badanych osób.
(niepotrzebne skreślić) (niepotrzebne skreślić)

Based on the patch test, it has been shown that the tested product:

Gel ŻDD_Zn-His_2.5%_1_16.07.20
has no / has irritant or / and sensitising effects on the skin of the subjects.

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.drnowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr : 0014 - DR / A / 09 / 20 rev. 01
Test report, no :
(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

(delete as appropriate)

(delete as appropriate)

Wydana opinia nie dotyczy osób, u których występuje udokumentowana alergia na którykolwiek składnik tego produktu.

The issued opinion does not refer to persons with a documented allergy to any of the product's components.

8. Zatwierdzenie / Approval

Opracował : Prepared :	26/10/2020 data / date	drNowaczyk: 001 Nr pracownika / Employee no	Dyrektor Laboratorium Laboratory Director	(kwalifikowany podpis elektroniczny) (qualified electronic signature)
Autoryzował : Authorized :	26/10/2020 data / date	drNowaczyk: 005 Nr pracownika / Employee no	Specjalista dermatolog - wenerolog Specialist dermatologist - venerologist	

UWAGA : Bezpieczny podpis elektroniczny weryfikowany przy pomocy certyfikatu kwalifikowanego jest równoważny pod względem skutków prawnych z podpisem własnoręcznym. Oryginalne sprawozdanie z badań są wydawane w formie elektronicznej z rozszerzeniem "-sig.pdf" lub "-signed.pdf". W związku z tym wszystkie wydruki, o ile nie są potwierdzone za zgodność z oryginałem, są kopiami.

Secure electronic signature verified by a qualified certificate is equivalent in terms of legal consequences handwritten signature.

COMMENTS : The original test report is issued in electronic form with the extension "-sig.pdf" lub "-signed.pdf". Therefore, all prints, if not confirmed as being true to the original, are copies.

Badania wykonywane w dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. są prowadzone zgodnie ze standardowymi metodami badawczymi. Uzyskane wyniki są zgodne z przyjętymi międzynarodowymi standardami, chyba że zostały ustalone inne szczególne wymagania, zatwierdzone na piśmie przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. oraz Klienta, przed rozpoczęciem badania. Wyniki badań odnoszą się wyłącznie do przebadanych próbek, w określonych warunkach i przy użyciu metod badawczych i procedur uzgodnionych wcześniej z Klientem. Obowiązkiem Klienta jest zapewnienie, że każda jednostka produktu i opakowania jest wyprodukowana w sposób identyczny. dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. nie ponosi odpowiedzialności za jakiegokolwiek wniosek, interpretację i uogólnienia wykonane przez Klienta z wydanych przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. sprawozdań z badań. Niniejsze Sprawozdanie z Badania jest poufną własnością Klienta. Bez pisemnej zgody dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. sprawozdanie z badania nie może być powielane inaczej jak tylko w całości. Odpowiedzialność dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w oryginale sprawozdania.

The studies performed in Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. are conducted in accordance with standard research methodology. The results are concordant with acknowledged international standards unless other specific requirements have been established and approved in writing by Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. and the Client prior to the initiation of the study. The study results refer solely to the tested samples, given conditions and adopted research methods and procedures agreed on previously with the Client. It is the Client's obligation to produce each unit of the product and each package in an identical way. Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. is not responsible for any conclusions, interpretations and generalisations made by the Client based on the study reports issued by Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. This Study Report is confidential Client's property. Without the Client's consent in writing, Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. shall not copy the study report in other ways than in whole. The liability of Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. is restricted solely to the data included in the original report.

Sprawozdanie z badania zostało sporządzone w jednym egzemplarzu. Test Report prepared in single copy.	Oryginal nr 1 : Klient Original copy No. 1 : Customer	Kopia egzemplarza nr 1 : Archiwum Duplicate of copy No. 1 : Archive
--	--	--

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@drnowaczyk.com
www.drnowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :		0012 - DR / A / 09 / 20 rev. 01	
Test report, no :		0012 - DR / A / 09 / 20 rev. 01	
<i>(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)</i>			
BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS			
Zleceniodawca :	Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych	Kontrahent :	Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych
Customer :	Uniwersytet Medyczny w Łodzi	Contractor :	Uniwersytet Medyczny w Łodzi
	ul. Muszyńskiego 1		ul. Muszyńskiego 1
	91-151 Łódź		91-151 Łódź
Nazwa próbki:	żel ŻDD_2.5%_1_10.06.20	Metoda pobrania próbki (5) :	Nie podano
Name of sample:	Gel ŻDD_2.5%_1_10.06.20	Method of sampling (5):	Not given
Numer zlecenia:	0014 – Z / 09 / 20	Postępowanie z próbką wg:	LAB-05.00.00, rev. 02
Protocol-order No.:	0014 – Z / 09 / 20	Handling of sample acc to:	LAB-05.00.00, rev. 02
Próbka pobrane przez:	Klienta	Data przyjęcia próbki:	02.09.2020
Sample collected by:	Customer	Date of receiving sample:	02.09.2020
Stan i ilość próbki:	Bez zastrzeżeń	Data rozpoczęcia badania:	19.10.2020
Sample evaluation & quantity:	Correct	Date of analysis start:	19.10.2020
Numer próbki:	0056 – P / 09 / 20	Data zakończenia badania:	23.10.2020
Sample No.:	0056 – P / 09 / 20	Date of analysis end:	23.10.2020
Numer analizy :	0012– DR / A / 09 / 20		
Analysis No.:	0012– DR / A / 09 / 20		
Metoda badawcza (5):	MD-0xx.0, rev.01 „Badanie dermatologiczne testem płatkowym półotwartym”		
Test method (5):	MD-0xx.00, rev. 01 „Badanie dermatologiczne testem płatkowym otwartym”		
	MD-0XX.00, rev.01 „Dermatological semi-open patch test”		
	MD-0xx.00, rev.01 „Dermatological open patch test”		
Metoda badań zgodna z:	➤ Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych (Dz. Urz. UE L 342 z 22.12.2009); ➤ Decyzja Wykonawcza Komisji z dnia 25 listopada 201 r. w sprawie wytycznych dotyczących załącznika I do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 dotyczącego produktów kosmetycznych; Commission Implementing Decision of 25 November 2013 on Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products; ➤ Ustawa z dnia 4 października 2018 r. o produktach kosmetycznych (Dz. U. 2018, poz. 2227); ➤ Act on cosmetic products of 4 October 2018 (Journal of Laws of 2018, item 2227); ➤ Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines „Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997”; ➤ Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines „Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients, Edition of 1997”; ➤ Cosmetics Europe – The Personal Care Association Guidelines „Guidelines for the Assessment of Skin Tolerance of Potentially Irritant Cosmetic Ingredients, Edition of 1997”; ➤ Cosmetics Europe - The Personal Care Association Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products 2008 ➤ The SCCS's Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Substances and their Safety Evaluation 10th Revision – SCCS/1602/18 Final version ➤ „Basic Criteria of The protocols for the skin compatibility testing of potentially cutaneous irritant cosmetic ingredients of mixtures of ingredients on human volunteers” – SCCNFP/0245/99 Final December 1999 ➤ Deklaracja Helsińska z 1964 r. wraz z późniejszymi zmianami ➤ Declaration of Helsinki of 1964 as amended; ➤ „Memorandum on use of Human Data in risk assessment of skin sensitisation” – SCCS/1567/15		
Method of test acc to:			
Wyniki badania odnoszą się wyłącznie do badanego obiektu			
Results are connected only with samples which were analysed			

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Zmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :

Test report, no :

0012

- DR / A / 09 / 20

rev. 01

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

Spis treści / Index

1. Podstawa wykonania badania / Study basis	2
2. Charakterystyka próbki / Sample characteristics	2
3. Opis metody / Description of the method	3
4. Cel badania / Purpose of the study	3
5. Dobór probantów do badania / Selection of subjects	3
6. Wyniki badania / Test result	4
7. Wnioski / Conclusion	4
8. Zatwierdzenie / Approval	5

1. Podstawa wykonania badania / Study basis

- Próbkę do badań dostarczona przez Zleceniodawcę
Test sample delivered by the Customer
- Skład jakościowy próbki dostarczony przez Zleceniodawcę
Test sample qualitative composition delivered by the Customer
- Wyniki czystości mikrobiologicznej próbki dostarczone przez Zleceniodawcę
Test sample microbiological purity results delivered by the Client
- Informacje o sposobie użycia i przeznaczeniu produktu
Information about the manner of use and indications of the product

2. Charakterystyka próbki / Sample characteristics

Zgodnie ze specyfikacją jakościową producenta:
Acc. to the manufacturer's quality Specification:

Wygląd produktu: <i>Product appearance:</i>	Gęsta ciecz <i>Thick liquid</i>
Barwa: <i>Color:</i>	Jasno słomkowa <i>Light straw</i>
Zapach: <i>Smell:</i>	Charakterystyczny dla użytych surowców <i>Typical of the materials used</i>
Opakowanie: <i>Package:</i>	Opakowanie zastępcze zawierające nazwę próbki <i>Replacement packaging with the sample name</i>
Przeznaczenie produktu: <i>Product designation:</i>	Żel do skóry trądzikowej <i>Gel for acne skin</i>
INCI (*) :	Aqua, Carrageenan, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Citric Acid

(*) - sprawozdanie nie zawiera analizy składu próbki; za zgodność przygotowanych do badań próbek z deklarowanym składem jakościowym i czystością mikrobiologiczną produktu odpowiada Zleceniodawca / The report does not include sample composition analysis; the Client is responsible for the consistency of the test samples with the declared qualitative composition and microbiological purity of the product

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@drnowaczyk.com
www.drnowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :

Test report, no : 0012 - DR / A / 09 / 20 rev. 01

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

3. Opis metody / Description of the method

Testy platkowe wg Jadassohna-Blocha (w modyfikacji Rudzkiego) prowadzono pod nadzorem lekarza dermatologa. Ocenę właściwości alergizujących i podrażniających preparatu przeprowadzono na grupie 25 zdrowych ochotników z wywiadem alergologicznym (panel wrażliwy) / bez wywiadu alergologicznego (panel zwykły) (niepotrzebne skreślić)

Patch tests according to Jadassohn-Bloch (as modified by Rudzki) were performed under the supervision of a dermatologist. The evaluation of sensitising and irritant properties of the product was made based on a sample of 25 healthy volunteers with (sensitive panel) / without (normal panel) a history of allergy.
(delete as appropriate)

Badanie przeprowadzono przy zastosowaniu plastrów Finn Chamber z bibułkami filtracyjnymi, na które nanosi się badany produkt, a następnie całość przykleja na skórę ochotnika (ramię lub okolica międzyłopatkowa). Próby zdejmowano po 48 h. Pierwszego odczytu dokonano po 15-20 minutach od zdjęcia plastra, a następnie po 72 h.

The study was conducted using Finn Chamber patches with filter paper onto which the tested product was applied; the whole patch was then applied to the volunteer's skin (arm or interscapular region). The patches were removed after 48 h. The first reading was done 15–20 minutes after patch removal, and subsequently after 72 h.

Odczyt został wykonany wg ogólnie przyjętej skali w badaniach dermatologicznych, a następnie oceniony przez lekarza dermatologa.

The reading was based on a generally acknowledged scale for dermatological studies, and subsequently evaluated by a dermatologist.

Odczyn dodatni (rumień) potwierdza alergizujące właściwości preparatu, zaś wynik ujemny (brak rumienia) potwierdza brak właściwości alergizujących.

A positive reaction (erythema) confirms sensitising properties, while a negative reaction (no erythema) confirms the lack of sensitising properties.

4. Cel badania / Purpose of the study

Ocena właściwości drażniących / uczulających produktu u zdrowego, dorosłego ochotnika metodą jednokrotnego nałożenia testu platkowego.

Assessment of irritant / sensitising properties of the product in a healthy adult volunteer with a single application of a patch test.

5. Dobór probantów do badania / Selection of subjects

Dobór ochotników uwzględnił kryteria włączeń i wyłączeń do badań.

The volunteers were selected on the basis of inclusion and exclusion criteria.

Główne kryteria włączenia: zdrowe kobiety i mężczyźni w wieku 18-65 lat, fototyp: I – IV w skali Fitzpatrick'a, typ skóry Kaukaski.

The main inclusion criteria were: healthy females and males aged 18–65 years; phenotype: I–IV in the Fitzpatrick scale, Caucasian skin type.

W badaniu wzięło udział 25 ochotników, którzy wyrazili dobrowolną zgodę na udział w badaniu.

The study involved 25 volunteers who expressed a voluntary consent to the participation in the study.

Skóra w miejscu badania była prawidłowa, bez podrażnień i zmian chorobowych.

The skin at the test site was normal, without irritation or pathological changes.

Ochotników poinformowano o sposobie szczególnej ostrożności w postępowaniu z testem platkowym.

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :

0012 - DR / A / 09 / 20 rev. 01

Test report, no :

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

The volunteers were informed about the manners of particular caution with respect to patches.

6. Wyniki badania / Test result

Tab. 1. Skala oceny wyników badań zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Grupy Badającej Wyprysk Kontaktowy (ICDRG).

The assessment scale was consistent with the recommendations of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)

Skala oceny Assessment scale	Wynik Result	Typ odczynu Reaction type
(-)	Odczyn ujemny Negative reaction	Brak zmian skórnych No skin changes
(?)	Odczyn wątpliwy / podrażnienie od plastra Doubtful result / patch irritation	Lekki odczyn rumieniowy Slight erythema
(+)	Słaby odczyn Mild reaction	Odczyn rumieniowy, wyczuwalny palpacyjnie, bez pęcherzyków Palpable erythema, no vesicles
(++)	Silny odczyn Strong reaction	Odczyn rumieniowy, grudki, obecne pęcherzyki lub obrzęk Erythema, papules, vesicles or swelling
(+++)	Bardzo silny odczyn Very strong reaction	Odczyn rumieniowy, grudki, pęcherzyki i / lub owrzodzenia Erythema, papules, vesicles and/or ulceration
(IR)	Reakcja podrażnieniowa Irritant reaction	Stan zapalny, brak nacieków, krostki, rumień, tendencja do wygasania Inflammation, no infiltration, papules, erythema, tendency to subside

Tab. 2. Wyniki badania / Test results

Ochotnik Volunteer	Wiek Age	Płeć* Sex*	Fototyp skóry Skin phototype	Miejsce aplikacji Application area	Wynik Result	Ochotnik Volunteer	Wiek Age	Płeć* Sex*	Fototyp skóry Skin phototype	Miejsce aplikacji Application area	Wynik Result
1.	36	K/F	II	Arm	(-)	14.	36	K/F	III	Arm	(-)
2.	42	K/F	I	Arm	(-)	15.	28	K/F	II	Arm	(-)
3.	40	K/F	III	Arm	(-)	16.	42	K/F	II	Arm	(-)
4.	32	K/F	III	Arm	(-)	17.	35	K/F	I	Arm	(-)
5.	60	K/F	I	Arm	(-)	18.	44	K/F	II	Arm	(-)
6.	44	K/F	II	Arm	(-)	19.	56	K/F	II	Arm	(-)
7.	46	K/F	III	Arm	(-)	20.	53	K/F	III	Arm	(-)
8.	43	K/F	II	Arm	(-)	21.	31	K/F	II	Arm	(-)
9.	39	K/F	II	Arm	(-)	22.	30	K/F	II	Arm	(-)
10.	55	K/F	III	Arm	(-)	23.	33	K/F	I	Arm	(-)
11.	38	K/F	II	Arm	(-)	24.	30	K/F	II	Arm	(-)
12.	39	K/F	I	Arm	(-)						
13.	30	K/F	II	Arm	(-)	25.	40	K/F	II	Arm	(-)

* - K/F – kobieta / female / M/M – mężczyzna / male

7. Wnioski / Conclusions

Na podstawie przeprowadzonego testu platkowego stwierdza się, że badany produkt:

żel ŻDD_2.5%_1_10.06.20
nie działa / działa drażniąco ani / oraz alergizująco na skórę badanych osób.
(niepotrzebne skreślić) (niepotrzebne skreślić)

Based on the patch test, it has been shown that the tested product:

Gel ŻDD_2.5%_1_10.06.20
has no / has irritant or / and sensitising effects on the skin of the subjects.

Załączniki do publikacji [P1] (Supplementary Materials: Test reports S7–S9).



dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K.
ul. Żmigrodzka 81-83, lok. 205, 51-130 Wrocław, Poland
tel. +48 509 387 307, e-mail: biuro@dmowaczyk.com
www.dmowaczyk.com

Laboratorium badawcze
zgodnie z normą ISO / IEC 17025

Testing laboratory
according to the standard ISO / IEC 17025

Sprawozdanie z badań, nr :
Test report, no : 0012 - DR / A / 09 / 20 rev. 01

(zgodnie z / acc. to LAB-05.00.03, rev.02)

BADANIE DERMATOLOGICZNE / KOSMETYKI / DERMATOLOGICAL TEST / COSMETICS

(delete as appropriate)

(delete as appropriate)

Wydana opinia nie dotyczy osób, u których występuje udokumentowana alergia na którykolwiek składnik tego produktu.

The issued opinion does not refer to persons with a documented allergy to any of the product's components.

8. Zatwierdzenie / Approval

Opracował : Prepared :	26/10/2020 data / date	drNowaczyk: 001 Nr pracownika / Employee no	Dyrektor Laboratorium Laboratory Director	
			funkcja / position	(kwalifikowany podpis elektroniczny) (qualified electronic signature)
Autoryzował : Authorized :	26/10/2020 data / date	drNowaczyk: 005 Nr pracownika / Employee no	Specjalista dermatolog - wenerolog Specialist dermatologist - venerologist	
			funkcja / position	

UWAGA : Bezpieczny podpis elektroniczny weryfikowany przy pomocy certyfikatu kwalifikowanego jest równoważny pod względem skutków prawnych z podpisem własnoręcznym. Oryginalne sprawozdanie z badań są wydawane w formie elektronicznej z rozszerzeniem ".sig.pdf" lub ".signed.pdf". W związku z tym wszystkie wydruki, o ile nie są potwierdzone za zgodność z oryginałem, są kopiami.

Secure electronic signature verified by a qualified certificate is equivalent in terms of legal consequences handwritten signature.

COMMENTS : The original test report is issued in electronic form with the extension ".sig.pdf" lub ".signed.pdf". Therefore, all prints, if not confirmed as being true to the original, are copies.

Badania wykonywane w dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. są prowadzone zgodnie ze standardowymi metodami badawczymi. Uzyskane wyniki są zgodne z przyjętymi międzynarodowymi standardami, chyba że zostały ustalone inne szczególne wymagania, zatwierdzone na piśmie przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. oraz Klienta, przed rozpoczęciem badania. Wyniki badań odnoszą się wyłącznie do przebadanych próbek, w określonych warunkach i przy użyciu metod badawczych i procedur uzgodnionych wcześniej z Klientem. Obowiązkiem Klienta jest zapewnienie, że każda jednostka produktu i opakowania jest wyprodukowana w sposób identyczny. dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. nie ponosi odpowiedzialności za jakiegokolwiek wniosek, interpretację i uogólnienia wykonane przez Klienta z wydanych przez dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. sprawozdań z badań. Niniejsze Sprawozdanie z Badania jest poufną własnością Klienta. Bez pisemnej zgody dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. sprawozdanie z badania nie może być powielane inaczej jak tylko w całości. Odpowiedzialność dr Nowaczyk Centrum Badań i Innowacji Sp. z o.o. Sp.K. jest ograniczona wyłącznie do danych zawartych w oryginale sprawozdania.

The studies performed in Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. are conducted in accordance with standard research methodology. The results are concordant with acknowledged international standards unless other specific requirements have been established and approved in writing by Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. and the Client prior to the initiation of the study. The study results refer solely to the tested samples, given conditions and adopted research methods and procedures agreed on previously with the Client. It is the Client's obligation to produce each unit of the product and each package in an identical way. Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. is not responsible for any conclusions, interpretations and generalisations made by the Client based on the study reports issued by Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. This Study Report is confidential Client's property. Without the Client's consent in writing, Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. shall not copy the study report in other ways than in whole. The liability of Dr Nowaczyk Research and Innovation Centre Sp. z o.o. Sp.K. is restricted solely to the data included in the original report.

Sprawozdanie z badania zostało sporządzone w jednym egzemplarzu. Test Report prepared in single copy.	Oryginal nr 1 : Klient Original copy No. 1 : Customer	Kopia egzemplarza nr 1 : Archiwum Duplicate of copy No. 1 : Archive
--	--	--



Article

Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity

Michał Abendrot ¹, Lilianna Chęcińska ², Joachim Kusz ³, Katarzyna Lisowska ⁴,
Katarzyna Zawadzka ⁴, Aleksandra Felczak ^{4,*} and Urszula Kalinowska-Lis ^{1,*}

¹ Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Łódź, Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź, Poland; michal.abendrot@gmail.com

² Faculty of Chemistry, University of Łódź, Pomorska 163/165, 90-236 Łódź, Poland; lilianna.checinska@chemia.uni.lodz.pl

³ Institute of Physics, University of Silesia, 75 Pułku Piechoty 1, 41-500 Chorzów, Poland; joachim.kusz@us.edu.pl

⁴ Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, 12/16 Banacha Street, 90-237 Łódź, Poland; katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl (K.L.); katarzyna.zawadzka@biol.uni.lodz.pl (K.Z.)

* Correspondence: aleksandra.felczak@biol.uni.lodz.pl (A.F.); urszula.kalinowska-lis@umed.lodz.pl (U.K.-L.)

Received: 30 January 2020; Accepted: 18 February 2020; Published: 20 February 2020



Abstract: The multifunctional profile of Zn^{2+} has influenced its great popularity in various pharmaceutical, food, and cosmetic products. Despite the use of different inorganic and organic zinc derivatives, the search for new zinc-containing compounds with a safer skin profile still remains an open issue. The present paper describes the synthesis, structural characterization, and antibacterial activity of zinc(II) complexes with proteinogenic amino acids as potential candidates for dermatological treatments. The obtained complexes are of the general formula $[Zn(AA)_2]$, where AA represents an amino acid (L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met, and L-Trp). Their synthesis was designed in such a way that the final bis(aminoacidate) zinc(II) complexes did not contain any counter-ions such as Cl^- , NO_3^- , or SO_4^{2-} that can cause some skin irritations. The chemical structure and composition of the compounds were identified by 1H NMR spectroscopy and elemental analysis, and four were also characterized by single-crystal X-ray diffraction. The Hirshfeld surface analysis for the Zn^{2+} metallic center helped to determine its coordination number and geometry for each complex. Finally, the antibacterial properties of the complexes were determined with respect to three Gram-positive strains, viz. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, and two Gram-negative bacteria, viz. *Escherichia coli* ATCC 25992 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and were compared with the activity of zinc 2-pyrrolidone 5-carboxylate (ZnPCA), commonly applied in dermatology. It was found that the Zn(II) complexes with methionine and glycine exhibited a higher antibacterial activity than the tested standard, and the antimicrobial properties of complex with Trp were satisfactory. The results of the antimicrobial activity examination allow us to postulate that the obtained zinc complexes might become new active substances for use in dermatological products.

Keywords: zinc(II) complexes; proteinogenic amino acids; crystal structures; antibacterial activity; Hirshfeld surface analysis

1. Introduction

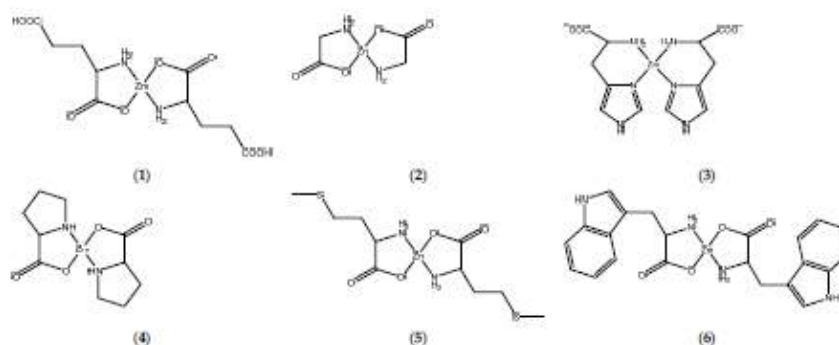
Zinc derivatives are often utilized in pharmaceutical, food, and cosmetic products. Their popularity in medicine is associated with the antimicrobial, antifungal, antioxidant, and anti-inflammatory properties of Zn^{2+} [1]. Zinc is considered as one of the most important trace elements in the human body, and its coordination chemistry is of considerable interest. It is incorporated in the active center of many essential enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), carbonic anhydrase, carboxypeptidase, and alcohol dehydrogenase [2,3]. It plays a vital role in sustaining proper human body function through bone formation, cell-mediated immunity, brain function, and tissue growth, among others [4,5]. Zinc has the ability to accept certain proteins domains to form zinc-finger proteins (ZNFs): these can interact with DNA, RNA, and proteins such as PAR, and are involved in the regulation of several cellular processes [6]. It has greater acceptor affinity than calcium (Ca^{2+}) or magnesium (Mg^{2+}) [7]. Zn^{2+} can create inert chelate complexes by accepting the free electron pairs of O-, N-, S- from certain amino acid motifs. Not only it does play a crucial role in a variety of biochemical processes, but it can also participate in numerous reactions in organometallic chemistry. Although zinc ions typically have a coordination number of 4, they can also form trigonal bipyramidal and octahedral complexes [8,9].

Several zinc derivatives are used in dermatology, the most common of which are zinc sulphates. However, they have been found to possess low bioavailability and can irritate the skin. Thus, there is a great interest in identifying safer alternatives with superior bioavailability [1]. One potential group of candidates comprises zinc compounds containing organic moieties, which in general have shown better tolerability and bioavailability than the inorganic salts [10–12]. The exact organic ligand structure finally determines its main direction of use. A great example is zinc ricinoleate, which does not possess bactericidal properties but serves as an anti-odor agent. Another organic derivative, zinc pyrithione, demonstrates antifungal activity against *Pityrosporum* (*Malassezia*) and exhibits an antibacterial activity, whereas zinc stearate is known for its emulsion-stabilizing properties and lack of antimicrobial properties [1]. Although many organic zinc derivatives are utilized in dermatological products, zinc-containing antimicrobial agents are becoming insufficient due to growing bacterial resistance. That is why the search for newer zinc antimicrobials still remains a big challenge. Interestingly, there are a few zinc proteinogenic amino acids complexes which are widely used in dietary supplements and animal feed, such as zinc bisglycinate and zinc methionine, but their use in dermatological products is rare [13–15]. It seems that conducting research in this direction could be very promising. Although the effect of zinc derivatives ultimately depends on their administered concentration, zinc compounds are generally recognized as safe in trace amounts [16]. Taking into consideration that L- α -amino acids are biogenic molecules, their zinc complexes should reveal an excellent safety profile which is worth examining.

Zinc oxide, zinc gluconate, zinc pyrithione, and zinc 2-pyrrolidone 5-carboxylate (ZnPCA) are also common ingredients in sunscreens and anti-acne and anti-dandruff agents [17–20]. However, to overcome drug resistance, new antimicrobial agents are always required for dermatological disorders, especially for acne vulgaris. A useful alternative to the zinc derivatives in current use may be zinc complexes of proteinogenic amino acids: their good safety profile, high bioavailability [11,21], and potential antioxidant activity [22,23], as well as the antimicrobial properties of Zn^{2+} [21], make them particularly well suited for use in both oral preparations and dermal products. Previous studies have examined the antimicrobial activity of various complexes of transition metals, including zinc, with amino acid ligands: for example with L-alanine- and L-aspartic acid-capped ZnS nanoparticles [24] and mixed complexes with L-proline and kojic acid [21].

The main aim of the present study is to examine innovative zinc derivatives with potential use in dermatology and also in the cosmetic and pharmaceutical industries. The antimicrobial activity of bis(aminoacidate) zinc(II) complexes without an anionic ingredient has not yet been examined. Theoretically, these derivatives should be better absorbed and safer due to their nonionic structure and weak influence on the skin pH which will make them excellent ingredients for dermal products. The paper describes the synthesis and full characterization of novel zinc coordination compounds

with selected amino acids (AAs), viz. L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met, and L-Trp (Scheme 1), and evaluates their antibacterial activity on three Gram-positive strains, viz. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12,228, and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, and two Gram-negative bacteria, viz. *Escherichia coli* ATCC 25992 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Bacterial strains selected for the present studies are microorganisms that cause various disorders from urinary, respiratory, and heart diseases to skin and wound infections. *Staphylococcus aureus* is a component of human natural microflora, but under certain conditions it can colonize skin and soft tissues, causing infection and contributing to atopic dermatitis or hand eczema [25,26]. *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes* are often isolated from wounds and skin lesions [27]. Also, *Pseudomonas aeruginosa* can cause mild and severe skin and soft tissue infections [28]. It is worth mentioning that infections of wounds, burns, and skin are particularly difficult to treat, especially if they are caused by multi-resistant microorganisms. Therefore, the search for new effective drugs is extremely important.



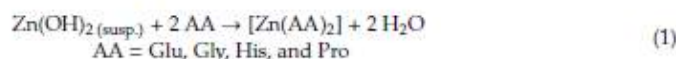
Scheme 1. Chemical structures of Zn(II) complexes with L-glutamic acid (1), glycine (2), L-histidine (3), L-proline (4), L-methionine (5), and L-tryptophan (6).

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis and Characterization of Zn(II) Complexes 1–6

The synthesized zinc(II) complexes were prepared using two different simple methods, with compounds 1 to 4 produced by reacting the corresponding amino acid with an aqueous suspension of zinc hydroxide (Method I), and compounds 5 and 6 by reacting a sodium salt of the corresponding amino acid with zinc(II) chloride in water (Method II). The choice of the method was related to the properties of the compounds. It is worth noting each method was performed to avoid the presence of counter-ions, such as Cl^- or NO_3^- , in the final zinc(II) complexes. All synthesized complexes have the general formula $[\text{Zn}(\text{AA})_2]$, with AA representing an amino acid: L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met, and L-Trp.

Regarding Method I, the water-soluble zinc(II) complexes containing L-Glu, Gly, L-His, and L-Pro amino acids (1–4), were synthesized according to a general procedure described to obtain a Zn(II) complex with methionine [25]. The method is based on the addition of an aqueous solution of an appropriate amino acid (AA) to an aqueous suspension of zinc hydroxide at a molar ratio of 2:1. Method I:

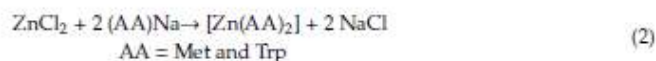


Zinc hydroxide $\text{Zn}(\text{OH})_2$ was firstly obtained by reacting zinc(II) chloride with 1M NaOH at a molar ratio of 1 to 2.

The suspension of $\text{Zn}(\text{OH})_2$ disappeared completely during the synthesis of Zn(II) complexes 1 to 4, i.e., those with Glu, Gly, His, and Pro. The resulting water-soluble complexes were isolated from the

reaction solutions, either by partial concentration on a rotary evaporator or by allowing the solvent to evaporate slowly at room temperature.

Regarding Method II, the Zn(II) complexes of Met and Trp (5–6) were synthesized as follows:



The process was preceded by an amino acid alkalization step.

Both methods were used to prepare the poorly water-soluble compound 5, i.e., Zn(II) with methionine. Although the obtained products had the same structure, method II gave a higher yield. The complex obtained by method I was characterized by X-ray and elemental analysis [29].

Method II, starting with ZnCl₂ and AA sodium salt, was not suitable for the synthesis of water-soluble complexes (1 to 4), because it would be difficult to remove the water-soluble by-product, NaCl. However, method II could be used to obtain Zn(II) complexes 5 and 6. These compounds were precipitated directly from the reaction mixtures and were easily isolated from the water-soluble by-product.

Although the synthesis of [Zn(Pro)₂] (4) has been already described in the literature [30], the strategy was different from the one we used. It was performed by reacting zinc acetate with proline in the presence of trimethylamine, using methanol as a solvent. The compound obtained in this way was used as a catalyst for some organic transformations.

Zinc(II) complexes (1–6) were characterized by elemental analysis and ¹H NMR spectroscopy. Four of them, containing Gly, Pro, His, and Met ligands, were also characterized by X-ray single-crystal crystallography. All but one of the obtained zinc (II) complexes constitute five-membered chelates, with each amino moiety coordinated to the zinc ion through the nitrogen atom and the oxygen atom of the deprotonated carboxyl group. The Zn-histidine complex, in contrast, forms a six-membered chelate ring through coordination with two N atoms of the histidine moiety, viz. the -NH₂ group and the N of the imidazole ring. None of the formed complexes contain any counter-ions; it is in accordance with the synthesis process of Zn²⁺ cations with amino acids with a deprotonated carboxyl group.

The ¹H NMR spectra of Zn(II) complexes and free ligands were recorded in D₂O (1–5) or DMSO (6). When using D₂O, no signals of amino and carboxyl protons nor protons connected with nitrogen atoms of heterocyclic rings were identified. These protons were exchanged for deuterium in solutions. Thus, the spectra in D₂O solvent illustrate the image of protons associated with carbon atoms. The signals of the protons for CH₂, CH of heterocyclic rings, or CH-N of zinc complexes were more or less shifted compared to these of the free amino acids (Appendix ??). The most significant shifts, amounting to 0.12, 0.30, 0.14, 0.12, 0.20, and 0.11 ppm, were respectively observed for CH₂(γ) (1), CH₂ (2), CH(5') (4), CH(2) (4), CH(α) (5), and CH₂(β) (6) protons.

2.2. Crystal and Molecular Structures of Compounds 2–5

The crystallographic data obtained from the structural analyses of (2), (3), (4), and (5) have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC Nos. 1966206–1966209). These data can be obtained free of charge from CCDC via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif. Basic information pertaining to crystal parameters and structure refinement is summarized in Table 1.

2.2.1. A Single-Crystal Structure of 2

As shown in Figure 1, the asymmetric unit of (2) consists of four independent glycine moieties as monoanions (Gly-1, Gly-2, Gly-3, Gly-4), two Zn²⁺ cations (Zn1 and Zn2), and two water molecules. The geometry around each Zn(II) ion is roughly square pyramidal (SQP); however, the degree of trigonality (τ) is 0.458 for Zn1 and 0.326 for Zn2, indicating a strong shift to trigonal bipyramidal (TBP). The τ value for ideal polyhedrons is τ = 0 for SQP and τ = 1 for TBP [31]. The basal plane of each polyhedron is formed by two oxygen and two nitrogen atoms (N₂O₂). The chelating glycine-ligands

are arranged in the *trans* configuration. According to bond angles around the Zn cations, each basal plane of SQP is tetrahedrally distorted [32]: two *trans* oriented oxygen atoms lie above the best least-squares plane (N_2O_2), whereas two *trans* oriented nitrogen atoms are below it. The zinc cations sit 0.5 Å above the best plane toward the apical atom (Table S2). Interestingly, the apical bonds Zn1–O8 and Zn2–O6 are the shortest bonds observed around metal cations. The dihedral angle between the best least-squares basal-planes of Zn1 and Zn2 polyhedrons is 54.7(1)°. Bond lengths for the Zn(II) coordination sphere are given in Table 2.

Table 1. Crystallographic data for complexes of Zn(II) with glycine (2), L-histidine (3), L-proline (4), and L-methionine (5).

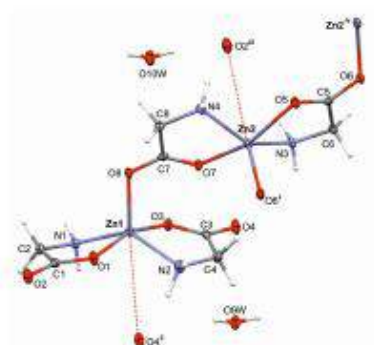
	(2)	(3)	(4)	(5)
Empirical Formula	$C_8H_{16}N_4O_8Zn_2 \cdot 2(H_2O)$	$C_{12}H_{16}N_6O_4Zn_4(F_2O)$	$C_{10}H_{16}N_2O_6Zn$	$C_{10}H_{20}N_2O_4S_2Zn$
Formula Weight	463.02	445.74	293.62	361.77
Crystal System	Monoclinic	Tetragonal	Monoclinic	Monoclinic
Space Group	$P2_1/c$	$P4_32_12$	$P2_1$	$P2_1$
<i>a</i> (Å)	15.0075(6)	7.5879(2)	9.3868(1)	9.3952(3)
<i>b</i> (Å)	10.4204(4)	31.1659(11)	5.5883(1)	5.0863(1)
<i>c</i> (Å)	9.7717(4)	7.5879(2)	10.6039(1)	15.4324(6)
α (°)	90.000	90.000	90.000	90.000
β (°)	92.646(3)	90.000	93.017(1)	107.657(4)
γ (°)	90.000	90.000	90.000	90.000
<i>V</i> (Å ³)	1526.51(11)	1794.41(11)	555.47(1)	792.72(4)
<i>Z</i>	4	4	2	2
<i>T</i> (K)	100(2)	100(2)	100(2)	100(1)
<i>F</i> (000)	944	928	304	376
<i>D_x</i> (g cm ^{−3})	2.015	1.650	1.755	1.710
μ (mm ^{−1})	3.20	1.43	2.22	5.32
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	1.54184
θ range (°)	3.4–30.0	3.00–29.0	3.9–33.0	3.00–70.0
Measured Reflections	14323	17886	7230	4735
Unique Reflections	4407	2396	3310	2127
Observed Reflections [$ I > 2\sigma(I)$]	3731	2341	3264	2093
Completeness to θ_{max} (%)	98.9	99.7	99.7	99.6
Parameters/Restraints	265/0	149/5	162/2	190/1
<i>R</i> [$ I > 2\sigma(I)$]	0.030	0.053	0.014	0.033
<i>wR</i> (all data)	0.084	0.113	0.039	0.087
<i>S</i>	1.04	1.24	1.08	1.04
$\Delta\rho_{max}$ (e Å ^{−3})	2.17 ^a	1.06 ^b	0.36	0.63
$\Delta\rho_{min}$ (e Å ^{−3})	−0.78 ^a	−1.05 ^b	−0.28	−0.94

^a The highest peak and deepest hole are close to the zinc atom, at 1.19 Å and 0.67 Å from Zn1, respectively. ^b The highest peak is 0.86 Å from Zn1, whereas the deepest hole is 1.75 Å from N2.

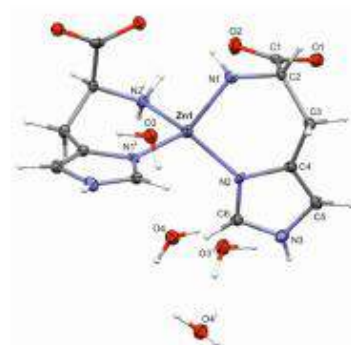
Four independent glycine moieties differ each other in molecular conformation, as confirmed by the N–C–O torsion angle: $\angle O1-C1-C2-N1 = 15.7(2)^\circ$ (Gly-1); $\angle O3-C3-C4-N2 = 4.8(2)^\circ$ (Gly-2); $\angle O5-C5-C6-N3 = 21.4(2)^\circ$ (Gly-3); and $\angle O7-C7-C8-N4 = 1.4(2)^\circ$ (Gly-4). The bidentate coordination of the glycine ligands around the Zn atoms results in the formation of five-membered chelate rings adopting an envelope (Zn1/O1/C1/C2/N1 and Zn2/O7/C7/C8/N4) or twisted conformation (Zn1/O3/C3/C4/N2 and Zn2/O5/C5/C6/N3) according to asymmetry parameters [33]. (Table S1). The dihedral angle between the best least-squares planes of the chelate rings is 30.5(1)° around Zn1 and 24.7(1)° around Zn2.

Table 2. Bond lengths to the Zn(II) ions (Å) for (2).

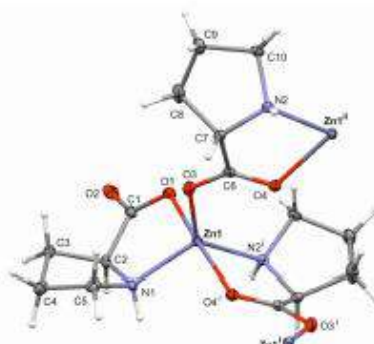
Bond	Distance	Bond	Distance
Zn1–O1	2.1407(13)	Zn2–O5	2.1915(12)
Zn1–O3	2.1262(12)	Zn2–O7	2.1205(12)
Zn1–O8	2.0127(12)	Zn2–O6 ⁱ	2.0026(12)
Zn1–N1	2.0321(15)	Zn2–N3	2.0257(15)
Zn1–N2	2.0320(16)	Zn2–N4	2.0224(15)
Zn1–O4 ⁱⁱ	3.5650(13)	Zn2–O2 ⁱⁱⁱ	3.4259(13)

Symmetry code: (i) $x, \frac{1}{2} - y, -\frac{1}{2} + z$; (ii) $x, \frac{3}{2} - y, -\frac{1}{2} + z$; (iii) $x, y, 1 + z$

(i) $x, \frac{1}{2} - y, -\frac{1}{2} + z$; (ii) $x, \frac{3}{2} - y, -\frac{1}{2} + z$;
(iii) $x, y, 1 + z$; (iv) $x, \frac{1}{2} - y, \frac{1}{2} + z$

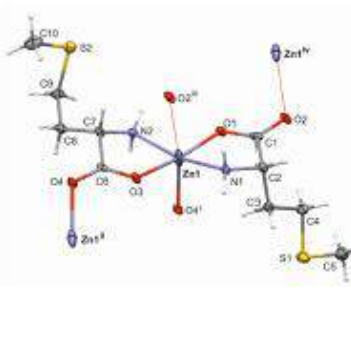
(2)


(i) $1 - y, 1 - x, \frac{1}{2} - z$

(3)


(i) $-x, \frac{1}{2} + y, 1 - z$; (ii) $-x, -\frac{1}{2} + y, 1 - z$

(4)


(i) $1 - x, \frac{1}{2} + y, 1 - z$; (ii) $1 - x, -\frac{1}{2} + y, 1 - z$

(iii) $-x, -\frac{1}{2} + y, 1 - z$; (iv) $-x, \frac{1}{2} + y, 1 - z$

(5)

Figure 1. The molecular structures of Zn(II) complexes with glycine (2), L-histidine (3), L-proline (4), and L-methionine (5), showing the atom-numbering scheme. Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level and hydrogen atoms are shown as small spheres of arbitrary radii.

Complex (2) exhibits a two-dimensional polymeric structure. The infinite (1 0 0) coordination sheets are separated by layers built from water molecules (Figure S1). Both types of structural layers are connected to each other via hydrogen bonds (Table S3).

A careful inspection of the packing within the coordination sheets revealed that two additional Zn...O interactions exist, Zn1...O4($x, 3/2-y, -\frac{1}{2}+z$) and Zn2...O2($x, y, 1+z$); their distances are much longer than those of the Zn–O bonds within the first Zn-coordination sphere, but are still shorter than the corresponding van der Waals radii of 3.77 Å (Table 2). It is possible that these weak interactions complement the coordination geometries around each Zn(II) atom, thus significantly elongating the octahedral ones. It appears that all carboxylic oxygen atoms are involved in the coordination scheme; however, the Zn–O contacts have a different character (Figure 1).

2.2.2. A Single-Crystal Structure of 3

Complex (3) crystallizes in a tetragonal system with the metal (Zn1) located on a twofold axis; the asymmetric unit consists of one histidine moiety, in the form of a monoanion, and two water molecules. As illustrated in Figure 1, the zinc cation is coordinated independently with two N atoms of the histidine moiety, thus giving a coordination mode without oxygen atoms, which is different to those of the other presented structures of Zn(II) with deprotonated amino acids, Gly (2), L-Pro (4), and L-Met (5). Moreover, the coordinative Zn–N bonds are also the shortest observed (Table 3). The geometry around the Zn1 cation is distorted tetrahedral, with the angles varying from 97.79(18)° to 118.1(3)°. The six-membered chelate ring Zn1/N1/N2/C2/C3/C4 adopts a conformation between envelope (with the C2 atom being out-of-plane) and half-chair (a pseudo two-fold axis passing through the Zn1–N2 bond) (Table S1). The dihedral angle between the symmetrically-related chelate rings around Zn1 is 75.4(2)°.

Table 3. Bond lengths to Zn(II) ion (Å) for (3).

Bond	Distance
Zn1–N1	1.989(4)
Zn1–N1 ⁱ	1.989(4)
Zn1–N2	2.026(4)
Zn1–N2 ⁱ	2.026(4)

Symmetry code: (i) $1-x, 1-y, \frac{1}{2}-z$.

The most interesting feature of (3) is the organization of complex molecules in the crystal lattice. In contrast to structures (1), (4), and (5), no infinite coordination motifs are observed. In (3), the intermolecular interaction N3–H3...O1 ($3/2-x, \frac{1}{2}+y, \frac{3}{4}-z$) is responsible for the formation of the 3D hydrogen-bonded network. Thus, each complex molecule is associated with four molecules forming a supramolecular structure. Additionally, the crystal packing of (3) is stabilized by a number of O–H...O and N–H...O interactions where the water molecules play the role of proton acceptor and/or proton donor. The geometries of these contacts are presented in Table S3.

Although the supramolecular structure of (3) can be organized by complex molecules of the Zn(II) complex, the presence of water molecules in this structure seems to be important. The packing index calculated for the entire structure (3) is 74.1; however, this value decreases to 60.2 for the water-free structure, clearly demonstrating that water molecules fill the space between the complex molecules in the supramolecular architecture. The Zn(II) complex with glycine (2) also crystallizes as hydrate, with respective packing indices of 79.6 and 71.8 for the entire and water-free structures, respectively. It shows that the infinite metallopolymeric motifs generate more closely-packed structures, which is additionally supported by the packing indices of 76.8 and 75.4, calculated for the crystal structures of (4) and (5), respectively.

2.2.3. A Single-Crystal Structure of 4

As shown in Figure 1, in the molecular structure of (4), the Zn(II) is pentacoordinated. The Addison τ parameter for the zinc polyhedron has a value of 0.75, which indicates that the coordination geometry is closer to trigonal-bipyramidal (TBP, $\tau = 1$) than square-pyramidal (SQP, $\tau = 0$). The equatorial plane consists of O3, N1, and N2($-x, \frac{1}{2} + y, 1 - z$) atoms; the zinc cation appears to rest on it, since it is displaced only by 0.023(4) Å towards the apical atom O1 (Table S2). The widest angle of 173.37(4)° is observed between atoms O1 and O4($-x, \frac{1}{2} + y, 1 - z$) indicating the opposite peaks of the bipyramid. The Zn–O4 bond is the longest observed within the polyhedron (Table 4). Two independent L-proline moieties form five-membered chelate rings oriented in a *trans* configuration around a metal center. Their best planes form a dihedral angle of 65.3(1)°. The conformation of chelate rings, Zn1/O1/C1/C2/N1 and Zn1/O4ⁱ/C6ⁱ/C7ⁱ/N2ⁱ (i: $-x, \frac{1}{2} + y, 1 - z$), can be described as twisted and envelope, respectively (Table S1).

Table 4. Bond lengths to the Zn(II) ion (Å) for (4).

Bond	Distance
Zn1–O1	2.094(1)
Zn1–O3	1.9937(9)
Zn1–O4 ⁱ	2.1535(10)
Zn1–N1	2.0556(11)
Zn1–N2 ⁱ	2.0559(9)

Symmetry code: (i) $-x, \frac{1}{2} + y, 1 - z$.

The inspection of the crystal packing of (4) revealed metallopolymeric chains running along *b* axis (see Figure S2). In contrast to other investigated structures, only two hydrogen bonds exist in crystal lattice: an intermolecular interaction, N1–H1A...O1($x, 1 + y, z$), is observed within molecules of polymeric chain, whereas a contact, N2–H2...O2($x, y, 1 + z$), links the neighboring chain-motifs along the [001] direction.

2.2.4. A Single-Crystal Structure of 5

Although the crystal structure of (5) previously reported by Wilson et al. [29] is in good agreement with our determination (unit cell constants: *a* and *c* are swapped), we decided to use our low-temperature data for a more consistent comparison between investigated structures of all four Zn(II) complexes and Hirshfeld surface analysis.

The coordination geometry around Zn is a distorted octahedral with four short and two long bonds (Table 5). The basal plane of the octahedron is formed by two nitrogen (N1, N3) and two oxygen (O1, O3) atoms from two independent methionine moieties arranged in a *trans*-fashion. The RMS deviation of the fitted atoms from the best plane is 0.0672. The axial sites are occupied by oxygen atoms (O2, O4) from two other molecules. Thus, each Zn²⁺ cation is bonded with four methionine moieties, whereas each methionine monoanion is associated with two Zn(II) centers (Figure 1).

Two independent methionine moieties display different molecular conformations, as confirmed by corresponding torsion angles of $\angle N1-C2-C3-C4 = 175.4(4)^\circ$ and $\angle N2-C7-C8-C9 = -54.7(5)^\circ$.

There are two five-membered chelate rings formed by methionine ligands: ring Zn1/O1/C1/C2/N1 adopts a conformation between envelope (with the C2 atom being out-of-plane) and twisted (pseudo two-fold axis passing through the O1–C1 bond), while ring Zn1/O3/C6/C7/N2 adopts an envelope conformation, with the C7 atom being out-of-plane (Table S1). The interplanar angle is 13.6(2)°.

Table 5. Bond lengths to the Zn(II) ion (Å) for (5).

Bond	Distance
Zn1–O1	2.051(3)
Zn1–O3	2.059(3)
Zn1–O4 ⁱ	2.221(3)
Zn1–O2 ⁱⁱⁱ	2.656(3)
Zn1–N1	2.093(4)
Zn1–N2	2.064(4)

Symmetry code: (i) $1 - x, \frac{1}{2} + y, 1 - z$; (iii) $-x, -\frac{1}{2} + y, 1 - z$.

The coordination polymer forms an infinite two-dimensional sheet framework lying parallel to the (001) plane (Figure S3). The thickness of each separate layer is equal to the *c* unit cell constant. The side-chain alkyl groups of methionine ligands are directed toward the outside layer.

2.3. Hirshfeld Surface Analysis of the Zn²⁺ Centre

The structural investigations of Zn(II) complexes with glycine (2), L-histidine (3), L-proline (4), and L-methionine (5) were extended by Hirshfeld surface analysis of the metallic center using CrystalExplorer [34,35]. Such an approach has been stressed in recent studies (see: Pinto et al.) [36]. Figure 2 presents the Hirshfeld surface (HS) of the Zn²⁺ center with the normalized contact distance (*d*_{norm}) encoded on it. The geometrical *d*_{norm} function is defined as the sum of the distances of any surface point to the nearest atom outside (*d*_e) and inside (*d*_i) the surface, with both components normalized by the van der Waals radii of the atoms (*r*_i^{vdW} and *r*_e^{vdW}, respectively) [37]. The minimum and maximum values of a geometrical function are presented as red and blue, respectively. Geometrical properties mapped on the Hirshfeld surface of the metal centers can be applied to rationalize coordination bonds.

As shown in Figure 2, all investigated surfaces differ in shape, indicating that the polyhedrons display different coordinations. The coordination bonds Zn–O and Zn–N are mostly drawn as very similar bright regions perpendicular to the bond direction, indicating their comparable strength. It is also evident that the Zn–O interaction completing the octahedral geometry in (5) (bottom drawing) is much weaker than those forming the square pyramid, but is still observed on the HS. In contrast, the long-range interactions observed in (2) are not visible on the HS. Both the HS shapes determined for Zn1 and Zn2 and its positive *d*_{norm} values indicate that Zn1...O4 and Zn2...O2 interactions are very weak van der Waals contacts.

Figure 3 presents the fingerprint plot (two-dimensional histograms of *d*_i vs. *d*_e) [38] for the Hirshfeld surface of the metallic center in (2), (3), (4) and (5). Such a plot generated for the Zn²⁺ cation reveals not only general but also very subtle differences in interaction schemes around metal. The overall form is reminiscent of a leaf shape. The central “leaf nerve” displays the shortest metal–ligand contacts (mainly red and green dots starting at 1 Å of *d*_i vs. *d*_e), which dominate in structure (5), demonstrating the smallest spread of the weakest interactions (*d*_i ≈ 2.2 Å and *d*_e ≈ 1.8 Å). A breakdown of each fingerprint plot for the metal into individual contacts is shown in Figure 4; corresponding fingerprint plots reduced to a single type of contact with Zn(II) are presented in Figure S4. It is clearly seen that structure (3) has a completely different interaction scheme regarding the metal center than the others. While the Zn...N (57.3%) and Zn...H (38.6%) contacts cover almost the entire coordination sphere in (3), the Zn...O contacts clearly dominate for the remaining structures (49–57%).

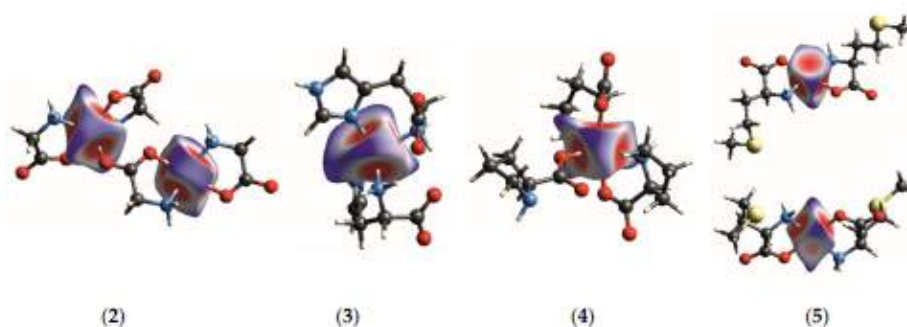


Figure 2. The Hirshfeld surface of the Zn^{2+} center in (2), (3), (4), and (5) with a normalized contact distance (d_{norm}) mapped on it. The parameter d_{norm} ranges from -0.61 to 1.14 for Zn1 and from -0.62 to 1.12 for Zn2 (2); from -0.64 to 1.42 (3); from -0.62 to 1.26 (4), and from -0.59 to 0.90 (5).

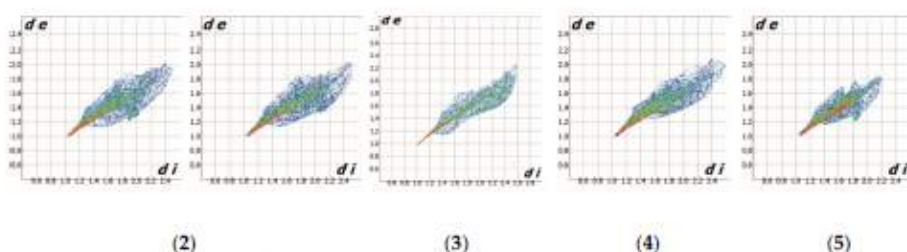


Figure 3. Fingerprint plot for the Hirshfeld surface of the metallic center of (2), (3), (4), and (5).

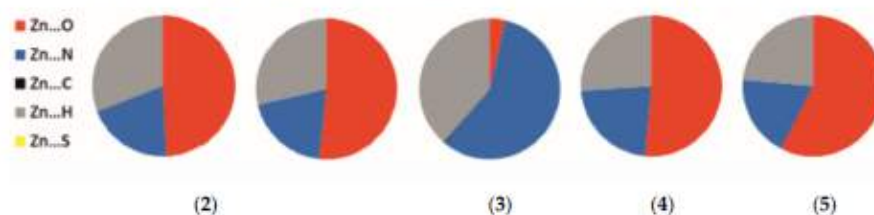


Figure 4. The percentage contribution of contacts of the Zn^{2+} in complexes (2), (3), (4), and (5).

2.4. Antibacterial Activity

The antibacterial activity of the six synthesized complexes toward selected Gram-positive (Table 6, Figure 5) and Gram-negative (Figure S5) bacteria was determined and compared with that of zinc 2-pyrrolidine 5-carboxylate (ZnPCA).

The results revealed that one of the tested complexes demonstrated similar activity to ZnPCA [20,39], and other two demonstrate better antibacterial properties.

Complex (5), ZnMet, possesses higher antimicrobial properties than the currently-used standard. The addition of 200 mg/L ZnMet to samples limited *S. aureus* growth by 45% (Figure 5); in addition, its minimum inhibitory concentration (MIC) values were found to be 100 mg/L for *S. epidermidis* and 200 mg/L for *S. pyogenes*, both of which were lower than those for ZnPCA (Table 6). Complex (5) also exhibited better antibacterial activity toward *E. coli* than ZnPCA (Figure S5). At the highest tested concentration, 60% bacterial growth inhibition was observed in relation to biotic control.

Complex (2), ZnGly, also demonstrated greater antibacterial activity than ZnPCA. The addition of 200 mg/L ZnGly to the cultures of *S. aureus* and *S. pyogenes* limited growth of bacteria by 60% and

90%, respectively (Figure 5). In analogous samples containing ZnPCA, *S. aureus* tolerance was 50% and growth inhibition of *S. pyogenes* reached the value of 75% (Figure 5). Complex (2) also exhibited stronger antimicrobial activity toward *P. aeruginosa* than ZnPCA (Figure S5).

Complex (6), ZnTrp, demonstrated comparable antimicrobial activity to ZnPCA, with both compounds demonstrating MIC values of 200 mg/L for *S. epidermidis* and 300 mg/L for *S. pyogenes* (Table 6).

Table 6. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of Zn(II) complexes for Gram-positive bacteria.

Tested Compound	MIC (mg/L)	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
ZnGlu (1)	400	400
ZnGly (2)	200	ND *
ZnHis (3)	300	ND *
ZnPro (4)	300	500
ZnMet (5)	100	200
ZnTrp (6)	200	300
ZnPCA	200	300

MIC for *Staphylococcus aureus* > 500 mg/L; * ND—not detected.

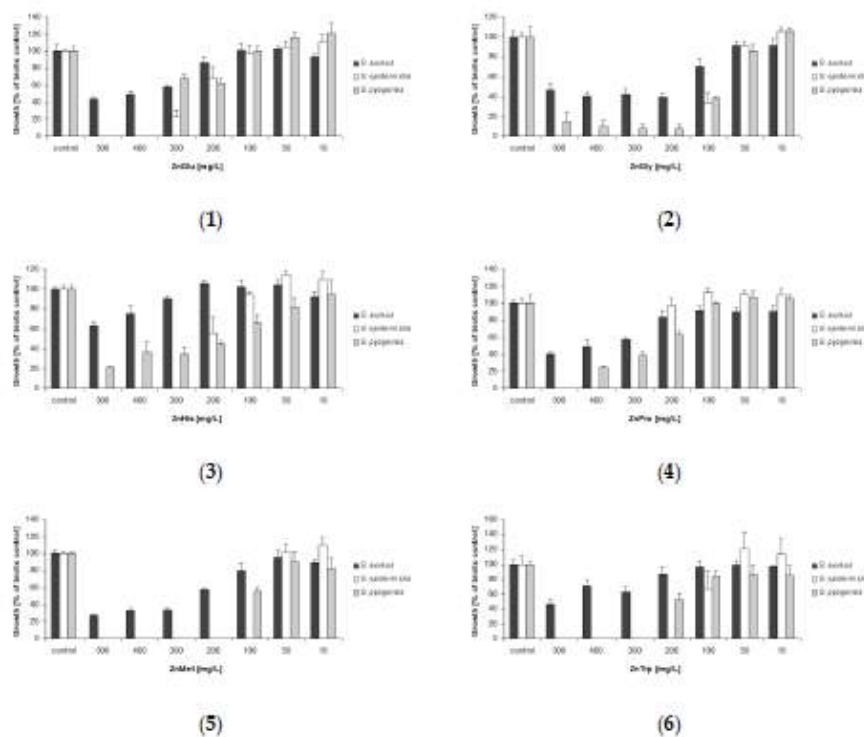


Figure 5. Cont.

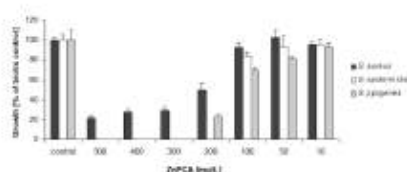


Figure 5. The antibacterial properties of zinc(II)-amino acid complexes (1–6) and the ZnPCA reference compound.

The decreasing effectiveness of existing antibiotics and rapid growth of drug resistance among a variety of bacteria have added impetus to the search for newer, more effective antimicrobial compounds. Literature data indicate that some transition metal complexes of amino acid derivatives may exhibit good antimicrobial properties [24,40,41]. Our findings confirm that zinc–amino acid complexes exhibit antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and that two of them were found to possess better antibacterial properties than ZnPCA, a commonly-used antiseptic agent in cosmetic products. Premata et al. [42] also note that mixed zinc(II) complexes with 2-substituted benzothiazoles and amino acids are more active than tested standards.

Our findings revealed that in samples containing 500 mg/L of complexes, growth inhibition of tested Gram-negative microorganisms was in range from 20% to 80%. (Figure S5). The tested compounds showed higher antimicrobial activity toward Gram-positive than Gram-negative bacteria. Similar results were received by Aiyelabola et al. [43] who studied the antimicrobial properties of coordination compounds of aspartic acid. Similarly, copper and cobalt amino acids complexes also exhibited lower antibacterial activity toward Gram-negative bacteria [44]. Such differences in susceptibility of Gram-positive and Gram-negative bacteria to the tested complexes may be associated with differences in the structure of the cell membranes.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals and Apparatus

L-Glu, Gly, L-His, L-Met, L-Pro, and L-Trp were purchased from Alfa Aesar, ZnCl_2 from Sigma-Aldrich and NaOH from POCH (Poland).

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer using D_2O or $\text{DMSO}-d_6$ as the solvent. Elemental analyses (C, H, and N) were performed with a Perkin-Elmer 2400 analyzer.

3.2. Synthesis and Characterization of the Zn(II) Complexes (1–6)

3.2.1. Preparation of $\text{Zn}(\text{OH})_2$

In this step, 44 mL of 1M NaOH (0.0440 mol) were added to the zinc chloride (3 g, 0.0220 mol) and mixed. The white solid immediately precipitated. The reaction mixture was left for about one hour on a magnetic stirrer and mixed intensively. The precipitate was then filtered off under reduced pressure, washed with cold water, and dried on air overnight.

3.2.2. Synthesis of the Zn(II) Complexes (1–4)

Zinc hydroxide (1 mmol, 0.0994 g) was suspended in approximately 15 mL of distilled water; following this, a clear aqueous solution (approximately 10 mL) of a corresponding amino acid (2 mmol) (Glu (0.2942 g), Gly (0.1502 g), His (0.3104 g) and Pro (0.2302 g)) was added to the suspension. The reaction mixture was stirred at 50 °C for several minutes until the suspension was dissolved, and then left stirring for two hours. Any white solid, if it appeared, was filtered off and discarded. The remaining clear solution was evaporated to one-third of the initial volume and allowed to crystallize.

After one to three days, the precipitated white solid product was washed with anhydrous diethyl ether and air-dried.

Zn(II) complex of L-glutamic acid. $[\text{Zn}(\text{Glu})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1): MW = 375.64; yield: 0.285 g (76%). Anal. Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9\text{Zn}$ ($[\text{Zn}(\text{Glu})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$): C, 31.97; H, 4.83; N, 7.46%. Found: C, 32.02; H, 5.02; N, 7.48%. ^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 1.95–2.07 (m, 4H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(\beta)$), 2.30–2.38 (m, 4H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(\gamma)$), 3.66–3.68 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}(\alpha)$).

Zn(II) complex of glycine. $[\text{Zn}(\text{Gly})_2]$ (2): MW = 213.50; yield: 0.181 g (85%). Anal. Calcd for $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{Zn}$ ($[\text{Zn}(\text{Gly})_2]$): C, 22.50; H, 3.75; N, 13.12%. Found: C, 22.51; H, 4.29; N, 12.97%. ^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 3.23 (s, 4H, 2 $\times$ CH_2).

Zn(II) complex of L-histidine. $[\text{Zn}(\text{His})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3): MW = 409.72; yield: 0.332 g (81%). Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_6\text{Zn}$ ($[\text{Zn}(\text{His})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): C, 35.18; H, 4.92; N, 20.52%. Found: C, 35.13; H, 4.58; N, 20.53%. ^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 2.95–2.98 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(6')$), 3.09–3.13 (dd, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(6'')$), 3.87–3.89 (dd, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}(7)$), 6.93 (s, 2H, 2 $\times$ $\text{H}(5)$), 7.65 (s, 2H, 2 $\times$ $\text{H}(2)$).

Zn(II) complex of L-proline. $[\text{Zn}(\text{Pro})_2]$ (4): MW = 293.63; yield: 0.200 g (68%). Anal. Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Zn}$ ($[\text{Zn}(\text{Pro})_2]$): C, 40.90; H, 5.49; N, 9.54%. Found: C, 40.91; H, 7.21; N, 9.55%. ^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 1.81 (m, 4H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(4)$), 2.19 (m, 4H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(3)$), 3.13 (m, 4H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(5)$), 3.86 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}(2)$).

3.2.3. Synthesis of the Zn(II) Complexes (5–6)

Zn(II) complex of L-methionine. $[\text{Zn}(\text{Met})_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ (5):

Method I: An aqueous solution (approximately 20 mL) of methionine (2 mmol, 0.2984 g) was added to a suspension of $\text{Zn}(\text{OH})_2$ (1 mmol, 0.0994 g) in water (ca. 15 mL) and stirred for three hours at 50 °C. After this time a white solid product was filtered off and washed with cold water, diethyl ether and dried in air. MW = 370.80; yield: 0.237 g (64%).

Method II: Briefly, 2 mL of 1M solution of NaOH (2 mmol) were added to the solid methionine (2 mmol, 0.2984 g) and mixed until it dissolved. An aqueous solution (approximately 10 mL) of zinc chloride (1 mmol, 0.1364 g) was mixed with the previous solution. The white product was precipitated immediately. The mixture was stirred for around an hour at a room temperature, and then filtered and washed with cold water and diethyl ether. MW = 370.80; yield: 0.308 g (83%).

Anal. Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4.5\text{S}_2\text{Zn}$ ($[\text{Zn}(\text{Met})_2] \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$): C, 32.39; H, 5.71; N, 7.56%. Found: C, 31.99; H, 5.40; N, 7.48%. ^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 1.86–1.92 (m, 2H, 2 $\times$ 1H of $\text{CH}(\beta)$), 2.02 (s, 6H, 2 $\times$ CH_3), 2.05–2.11 (m, 2H, 2 $\times$ 1H of $\text{CH}(\beta)$), 2.50–2.59 (m, 4H, 2 $\times$ $\text{CH}_2\text{-S}$), 3.53–3.58 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}(\alpha)$).

Zn(II) complex of L-tryptophan. $[\text{Zn}(\text{Trp})_2]$ (6): Briefly, solid tryptophan (2 mmol, 0.4085 g) was first dissolved in 2 mL of 1M NaOH (2 mmol). Following this, approximately 10 mL of aqueous zinc chloride solution (1 mmol, 0.1364 g) were added. A white product was precipitated immediately. The mixture was then stirred a further hour at room temperature, and subsequently filtered and washed with cold water and diethyl ether. MW = 471.81; yield: 0.425 g (90%). Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4\text{Zn}$ ($[\text{Zn}(\text{Trp})_2]$): C, 56.00; H, 4.70; N, 11.88%. Found: C, 55.87; H, 4.43; N, 11.89%. ^1H NMR (600 MHz, DMSO): δ 2.87–2.92 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(\beta')$), 3.32–3.35 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}_2(\beta'')$), 3.47–3.48 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{CH}(\alpha)$), 6.94–6.97 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{H}(3)$ (indol)), 7.05–7.07 (m, 2H, 2 $\times$ $\text{H}(4)$ (indol)), 7.30 (s, 2H, 2 $\times$ $\text{H}(7)$ (indol)), 7.35–7.37 (d, 2H, 2 $\times$ $\text{H}(5)$ (indol)), 7.55–7.57 (d, 2H, 2 $\times$ $\text{H}(2)$ (indol)), 10.96 (s, 2H, 2 $\times$ $\text{NH}(1)$ (indol)) (Figure S6).

3.3. X-ray Diffraction Studies

Single crystal X-ray data were collected on a micro-focus SuperNova diffractometer with an Atlas detector (3, 4, 5) and Xcalibur Sapphire detector (2), all using $\text{MoK}\alpha$ ($\text{CuK}\alpha$ was exceptionally used for 5) and ω scan. The measurements were carried out at low temperature of 100(2)K. The X-ray data

were corrected for absorption [45,46]. All structures were solved using SHELXT [47] and refined with SHELXL-2018/3 [48].

Generally, all (C)-H atoms were geometrically placed and constrained to their parent atoms as a rigid body. All other H atoms were located in a difference map and refined isotropically.

Structure (3) was refined as a two-component twin with BASF 0.0486. The H-atoms of the water molecules (H31W, H32W, H41W, H42W) were refined with the O–H distances restrained to 0.84 Å ($U_{iso} = 1.5 U_{eq}$ of atom O3W and O4W, respectively), whereas the N3–H3 distance was restrained to 0.86 Å ($U_{iso} = 1.2 U_{eq}$ of atom N3).

In (4), a distance DFIX-restraint of 0.86 Å was used for N2–H2A bond length.

The crystallographic programs MERCURY [49] and PLATON [50] and were used for structure analysis and presentation of the results.

3.4. Antibacterial Activity Study

The antibacterial properties of complexes 1 to 6 were determined with respect to three Gram-positive strains, viz. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12,228, and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, and two Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25,992 and *Pseudomonas aeruginosa* 27853. The growth of microorganisms in the presence of the tested compounds was estimated by a modified broth microdilution method, in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M07–18). The obtained results were presented as tolerance toward the studied complex (% of biotic control) or as minimum inhibitory concentration (MIC). The tested compounds were dissolved in water (1–4) or in DMSO (5–6).

4. Conclusions

Our investigations concerns bis(aminoacidate) zinc(II) complexes as potentially safe and effective antibacterial components for dermatological treatment. The combination of zinc, one of the most important trace elements, with proteinogenic amino acids afforded compounds expected to be non-toxic, well tolerable, and effective agents for skin diseases involving inflammation and irritation of the skin, such as ulcers and acne vulgaris.

The synthesis was designed in such a way that the final complexes did not contain any counter-ions, such as Cl^- , NO_3^- or SO_4^{2-} , that could cause skin irritations. The simplicity of the complexes' composition is their advantage; they contain only zinc and aminoacidates ligands.

The research presents a thorough investigation of the crystal structures of zinc(II) complexes of selected amino acids. Single-crystal X-ray diffraction analysis found that compounds ZnGly (2) and ZnMet (5) have a 2D-coordination-layer architecture; ZnPro (4) is characterized by 1D-metallopolymetric chains and the complex molecules of ZnHis (3) are organized into a 3D hydrogen-bonded network. The Hirshfeld surface analysis for the metallic center showed that all Zn-surfaces differed in shape, as confirmed by their different coordination geometries: square-pyramidal in (2), tetrahedral in (3), trigonal-bipyramidal in (4), and octahedral in (5).

The antimicrobial analysis found two compounds, ZnGly (2) and ZnTrp (6), to exhibit promising antibacterial properties, and another one, ZnMet (5), to demonstrate greater antibacterial activity than the tested standard. All complexes exhibit better antimicrobial properties against Gram-positive bacteria than Gram-negative microorganisms.

Further antimicrobial studies and cytotoxicity tests on the zinc(II)-AA complexes will be the subject of our next study.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/25/4/951/s1>. Table S1: The asymmetry parameters for selected rings of (2), (3), (4), and (5). Table S2: The least-squares planes and deviations from them for (2), (4), and (5). Table S3: Hydrogen-bonding geometries (Å, °) of Zn(II) complexes with glycine (2), L-histidine (3), L-proline (4), L-methionine (5). Figure S1: A part of the crystal structure showing a single coordination sheet of (2) (a). The crystal packing of (2), view along the *b* axis (b). Figure S2: A part of the crystal structure showing a single coordination chain of (4). For clarity the ring-fragment of the L-proline moiety is omitted (a). The crystal packing of (2), view along the *b* axis (b). Figure S3: A part of the crystal structure showing

a single coordination sheet of (5). For a comparison to structure (2) the side-chain of L-methionine moieties is omitted (a). The crystal packing of (2), view along the *c* axis (b). Figure S4: Fingerprint plot for the Hirshfeld surface of the metallic center of (2), (3), (4), and (5) and corresponding plots reduced to a given contact type: Zn–O, Zn–N, and Zn–H. Figure S5: The antibacterial properties of zinc(II)-aminoacidate complexes (1–6) and the ZnPCA reference compound towards Gram-negative bacteria. Figure S6: Exemplary ^1H NMR spectra of L-tryptophan (a) and its zinc(II) complex (6) (b). Appendix S1. Description of ^1H NMR spectra of free amino acids: L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met, L-Trp.

Author Contributions: Conceptualization, M.A. and U.K.-L.; synthesis and characterization of complexes, M.A. and U.K.-L.; crystallography, L.C. and J.K.; antibacterial activity, A.F., K.Z., and K.L.; writing—original draft preparation, M.A., U.K.-L., L.C., and A.F.; writing—review and editing, U.K.-L., L.C., and A.F.; supervision, U.K.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The work was supported by grant No. 503/3-066-02/503-31-001-19 of Medical University of Lodz.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Abendrot, M.; Kalinowska-Lis, U. Zinc-containing compounds for personal care applications. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2018**, *40*, 319–327. [\[CrossRef\]](#)
2. Myari, A.; Malandrinos, G.; Deligiannakis, Y.; Plakatouras, J.C.; Hadjiladis, N.; Nagy, Z.; Sóvágó, I. Interaction of Cu(2+) with His-Val-His and of Zn(2+) with His-Val-Gly-Asp, two peptides surrounding metal ions in Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *85*, 253–261. [\[CrossRef\]](#)
3. Krishnamurthy, V.M.; Kaufman, G.K.; Urbach, A.R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K.L.; Weibel, D.B.; Whitesides, G.M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 946–1051. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Kidambi, S.S.; Lee, D.K.; Ramamoorthy, A. Interaction of Cd and Zn with biologically important ligands characterized using solid-state NMR and ab initio calculations. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3142–3151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Bagherani, N.; Smoller, B.R. An overview of zinc and its importance in dermatology-Part I: Importance and function of zinc in human beings. *Glob. Dermatol.* **2016**, *3*, 330–336. [\[CrossRef\]](#)
6. Cassandri, M.; Smirnov, A.; Novelli, F.; Pitolli, C.; Agostini, M.; Malewicz, M.; Melino, G.; Raschella, G. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov.* **2017**, *3*, 17071. [\[CrossRef\]](#)
7. Krężel, A.; Maret, W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *611*, 3–19. [\[CrossRef\]](#)
8. Trzaskowski, B.; Adamowicz, L.; Deymier, P.A. A theoretical study of zinc(II) interactions with amino acid models and peptide fragments. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 133–137. [\[CrossRef\]](#)
9. Dudev, T.; Lim, C. Tetrahedral vs. Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest: A DFT/CDM Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11146–11153. [\[CrossRef\]](#)
10. Deters, A.; Schnet, E.; Schmidt, M.; Hensel, A. Effects of zinc histidine and zinc sulfate on natural human keratinocytes. *Forsch. Komplex.* **2003**, *10*, 19–25. [\[CrossRef\]](#)
11. Schlegel, P.; Windisch, W. Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with ^{65}Zn labelled rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2006**, *90*, 216–222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Sobel, S.; Theophall, G. The Complexation of Aqueous Metal Ions Relevant to Biological Applications. 2. Evaluation of simultaneous equilibria of poorly soluble zinc salts with select amino acids. *Chem. Speciat. Bioavailab.* **2010**, *22*, 201–205. [\[CrossRef\]](#)
13. Aquilina, G.; Bach, A.; Bampidis, V.; De Lourdes Bastos, M.; Flachowsky, G.; Gasa-Gasó, J.; Gralak, M.A.; Hogstrand, C.; Leng, L.; López-Puente, S.; et al. Scientific Opinion on the safety and efficacy of niacin (nicotinic acid and nicotinamide) as a feed additive for all animal species based on a dossier submitted by VITAC EEIG. *EFSA J.* **2013**, *11*, 3038.

14. Aguilar, F.; Autrup, H.; Barlow, S.; Castle, L.; Crebelli, R.; Dekant, W.; Engel, K.-H.; Gontard, N.; Gott, D.; Grilli, S.; et al. Opinion on certain bisglycinates as sources of copper, zinc, calcium, magnesium and glycinate nicotinate as source of chromium in foods intended for the general population (including food supplements) and foods for particular nutritional uses. *EFSA J.* **2008**, *718*, 1–26.
15. Chen, N.N.; Liu, B.; Xiong, P.W.; Guo, Y.; He, J.N.; Hou, C.C.; Ma, L.X.; Yu, D.Y. Safety evaluation of zinc methionine in laying hens: Effects on laying performance, clinical blood parameters, organ development, and histopathology. *Poult. Sci.* **2018**, *97*, 1120–1126. [\[CrossRef\]](#)
16. Plum, L.; Rink, L.; Haase, H. The essential toxin: Impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 1342–1365. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Kim, K.B.; Kim, Y.W.; Lim, S.K.; Roh, T.H.; Bang, D.Y.; Choi, S.M.; Lim, D.S.; Kim, Y.J.; Baek, S.H.; Kim, M.K.; et al. Risk assessment of zinc oxide, a cosmetic ingredient used as a UV filter of sunscreens. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **2017**, *20*, 155–182. [\[CrossRef\]](#)
18. Gupta, M.; Mahajan, V.K.; Mehta, K.S.; Chauhan, P.S. Zinc Therapy in Dermatology: A Review. *Dermatol. Res. Pract.* **2014**, *11*, 709152. [\[CrossRef\]](#)
19. Reeder, N.L.; Xu, J.; Youngquist, R.S.; Rust, R.C.; Saunders, C.W. The antifungal mechanism of action of zinc pyrithione. *Br. J. Dermatol.* **2011**, *165*, 9–12. [\[CrossRef\]](#)
20. Piquero-Casals, J.; Hexsel, D.; Francisco Mir-Bonafé, J.; Rozas-Muñoz, E. Topical Non-Pharmacological Treatment for Facial Seborrheic Dermatitis. *Dermatol. Ther.* **2019**, *9*, 469–477. [\[CrossRef\]](#)
21. Sharma, C.S.; Ramani, J.; Bhalodia, J.; Patel, N.; Thakkar, K.; Patel, R. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Some Transition Metal Complexes (Mn, Co, Zn, Ni) With L-Proline and Kojic Acid. *Adv. Appl. Sci. Res.* **2011**, *2*, 374–382.
22. Sardana, K.; Garg, V.K. An observational study of methionine-bound zinc with antioxidants for mild to moderate acne vulgaris. *Dermatol. Ther.* **2010**, *23*, 411–418. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Bagchi, D.; Bagchi, M.; Stohs, S.J. Comparative in vitro oxygen radical scavenging ability of zinc methionine and selected zinc salts and antioxidants. *Gen. Pharmac.* **1997**, *28*, 85–91. [\[CrossRef\]](#)
24. Mofokeng, T.P.; Moloto, M.J.; Shumbula, P.M.; Nyamukamba, P.; Mubiayi, P.K.; Takaidza, S.; Marais, L. Antimicrobial Activity of Amino Acid-Capped Zinc and Copper Sulphide Nanoparticles. *J. Nanotechnol.* **2018**, *2018*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
25. Blicharz, A.L.; Rudnicka, L.; Samochocki, Z. *Staphylococcus aureus*: An underestimated factor in the pathogenesis of atopic dermatitis? *Postępy Dermatol. Alergol.* **2019**, *36*, 11–17.
26. Kuraitis, B.D.; Williams, L. Decolonization of *Staphylococcus aureus* in Healthcare: A Dermatology Perspective. *J. Healthc. Eng.* **2018**, 2382050.
27. Akiyama, C.H.; Morizane, S.; Yamasaki, O.; Oono, T.; Iwatsuki, K. Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J. Dermatol. Sci.* **2003**, *32*, 193–199. [\[CrossRef\]](#)
28. Wu, D.D.C.; Chan, W.W.; Metelitsa, A.I.; Fiorillo, L.; Lin, A.N. *Pseudomonas* skin infection: Clinical features, epidemiology, and management. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2011**, *12*, 157–169. [\[CrossRef\]](#)
29. Wilson, R.B.; de Meester, P.; Hodgson, D.J. Structural characterization of bis(L-methionato)zinc(II), Zn(L-met)₂. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 1498–1502. [\[CrossRef\]](#)
30. Poddar, R.; Jain, A.; Kidwai, M. Bis[(l)proline-N,O]Zn: A water-soluble and recycle catalyst for various organic transformations. *J. Adv. Res.* **2017**, *8*, 245–270. [\[CrossRef\]](#)
31. Addison, A.W.; Rao, T.N.; Reedijk, J.; van Rijn, J.; Verschoor, G.C. Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper(II) compounds containing nitrogen–sulphur donor ligands; the crystal and molecular structure of aqua [1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane]copper(II) perchlorate. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1984**, *7*, 1349–1356. [\[CrossRef\]](#)
32. Bukowska-Strzyżewska, M.; Maniukiewicz, W.; Sieroń, L. The deformation of di-mi-halide dinuclear five-coordinate copper(II) complexes in the crystalline state. *Acta Crystallogr. Sect. B* **1997**, *52*, 466–475. [\[CrossRef\]](#)
33. Duax, L.; Norton, D.A. *Atlas of Steroid Structure*; IFI/Plenum: New York, NY, USA, 1975; Volume 1, pp. 16–22.
34. Spackman, M.A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld Surface Analysis. *CrystEngComm* **2009**, *11*, 19–32. [\[CrossRef\]](#)
35. Turner, M.J.; McKinnon, J.J.; Wolff, S.K.; Grimwood, D.J.; Spackman, P.R.; Jayatilaka, D.; Spackman, M.A. *CrystalExplorer17*, University of Western Australia. 2017. Available online: <http://crystalexplore17.scb.uwa.edu.au/> (accessed on 19 February 2020).

36. Pinto, C.B.; Dos Santos, L.H.R.; Rodrigues, B.L. Understanding metal–ligand interactions in coordination polymers using Hirshfeld surface analysis. *Acta Crystallogr. Sect. C* **2019**, *75*, 707–716.
37. McKinnon, J.J.; Jayatilaka, D.; Spackman, M.A. Towards quantitative analysis of intermolecular interactions with Hirshfeld surfaces. *Chem. Commun.* **2007**, *37*, 3814–3816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Spackman, M.A.; McKinnon, J.J. Fingerprinting intermolecular interactions in molecular crystals. *CrystEngComm.* **2002**, *4*, 378–392. [[CrossRef](#)]
39. Frydrych, A.; Arct, J.; Kasiura, K. Zinc: A critical importance element in cosmetology. *Appl. Cosmetol.* **2004**, *22*, 1–13.
40. Hadjer, F.; Tahar, B.; Eddine, A.D.; Sofiane, D. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Some Transition Metal Complexes with Non-natural Amino Acids Used as Ligand. *J. Mater. Environ. Sci.* **2018**, *7*, 2153–2157.
41. Lakshmi, S.S.; Geetha, K. Synthesis, characterization and biological studies of tridentate amino acid (L-tryptophan) Schiff base transition metal complexes. *J. Chem. Pharm. Res.* **2016**, *8*, 668–674.
42. Premrata, S.; Verma, G. Seth, Synthesis and Antibacterial Activity of Zn(II) Complexes with 2-substituted Benzothiazoles and Amino Acids. *J. Chem. Pharm. Res.* **2012**, *4*, 1327–1331.
43. Aiyelabola, T.O.; Isabiyi, D.A.; Akinkunmi, E.O.; Ogunkunle, O.A.; Ojo, I.A.O. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activities of Coordination Compounds of Aspartic Acid. *J. Chem.* **2016**, *2016*, 8. [[CrossRef](#)]
44. Stănilă, A.; Braicu, C.; Stănilă, S. Antibacterial Activity of Copper and Cobalt Amino Acids Complexes. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* **2011**, *39*, 124–129. [[CrossRef](#)]
45. CrysAlisPRO, version 1.171.38.41q. Rigaku Oxford Diffraction: Yarnton, UK, 2015. Available online: <https://www.rigaku.com/products/smc/crystalis> (accessed on 19 February 2020).
46. CrysAlisPRO, Ver. 1.171.39.46. Rigaku Oxford Diffraction: Yarnton, UK, 2015. Available online: <https://www.rigaku.com/products/smc/crystalis> (accessed on 19 February 2020).
47. Sheldrick, G.M. SHELXT—Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. A* **2015**, *71*, 3–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C* **2015**, *71*, 3–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Macrae, C.F.; Bruno, I.J.; Chisholm, J.A.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P.A. New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, *41*, 466–470. [[CrossRef](#)]
50. Spek, A.L. Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2009**, *65*, 148–155. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds 1–6 are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1. The asymmetry parameters for selected rings of (2), (3), (4) and (5).

Compound	Ring	Asymmetry parameters	Conformation
(2)	Zn1/O1/C1/C2/N1	$\Delta C_s(N1)=4.9(2)^\circ$ $\Delta C_s(N1-C2)=8.4(2)^\circ$	E/T
	Zn1/O3/C3/C4/N2	$\Delta C_s(Zn1)=5.6(2)^\circ$ $\Delta C_s(Zn1-N2)=4.8(2)^\circ$	E/T
	Zn2/O5/C5/C6/N3	$\Delta C_s(N3)=10.4(2)^\circ$ $\Delta C_s(N3-C6)=3.5(2)^\circ$	E/T
	Zn2/O7/C7/C8/N4	$\Delta C_s(Zn2)=1.9(2)^\circ$ $\Delta C_s(Zn2-N4)=8.6(2)^\circ$	E/T
(3)	Zn1/N1/N2/C2/C3/C4	$\Delta C_s(C2)=13.0(4)^\circ$ $\Delta C_s(Zn1-N2)=15.2(5)^\circ$	E/H
(4)	Zn1/O1/C1/C2/N1	$\Delta C_s(Zn1)=2.6(2)^\circ$ $\Delta C_s(O1)=3.0(2)^\circ$ $\Delta C_s(Zn1-O1)=1.9(2)^\circ$	E/T
	Zn1/O4/C6/C7/N2 ⁱ	$\Delta C_s(C6)=4.4(2)^\circ$ $\Delta C_s(O4-C6)=5.4(2)^\circ$	E/T
	N1/C2/C3/C4/C5	$\Delta C_s(C4)=3.2(2)^\circ$	E
	N2/C7/C8/C9/C10	$\Delta C_s(C9)=7.1(2)^\circ$	E
(5)	Zn1/O1/C1/C2/N1	$\Delta C_s(C2)=7.6(5)^\circ$ $\Delta C_s(O4-C6)=7.8(5)^\circ$	E/T
	Zn1/O3/C6/C7/N2	$\Delta C_s(C7)=3.3(5)^\circ$	E

Symmetry code for (4) (i) $-x, \frac{1}{2}+y, 1-z$.

Table S2. The least-squares planes and deviations from them (calculated by SHELXL using MPLA instruction) for (2), (4) and (5).

(2) - basal plane of square-pyramids of Zn1 and Zn2 Least-squares planes (x,y,z in crystal coordinates) and deviations from them (* indicates atom used to define plane) $9.4925 (0.0070) x + 4.3116 (0.0052) y - 6.6767 (0.0033) z = 3.3603 (0.0033)$ * -0.2339 (0.0008) O1 * 0.2203 (0.0007) N1 * -0.2251 (0.0007) O3 * 0.2386 (0.0008) N2 -0.3530 (0.0007) Zn1 Rms deviation of fitted atoms = 0.2296 $-9.6641 (0.0068) x + 5.2393 (0.0047) y + 5.9193 (0.0034) z = 3.9534 (0.0046)$ Angle to previous plane (with approximate esd) = 54.771 (0.041) * -0.1572 (0.0007) O5 * 0.1531 (0.0007) N3 * -0.1549 (0.0007) O7 * 0.1590 (0.0007) N4 -0.5151 (0.0007) Zn2 Rms deviation of fitted atoms = 0.1561
(4) - equatorial plane of trigonal bipyramid of Zn1 Least-squares planes (x,y,z in crystal coordinates) and deviations from them (* indicates atom used to define plane) $-1.4143 (0.0045) x + 4.1727 (0.0017) y + 6.9447 (0.0035) z = 5.0128 (0.0010)$ * 0.0000 (0.0000) N1 * 0.0000 (0.0000) O3 * 0.0000 (0.0000) N2, Zn2 -0.0231 (0.0007) Zn1 Rms deviation of fitted atoms = 0.0000
(5) - equatorial plane of octahedron of Zn1 Least-squares planes (x,y,z in crystal coordinates) and deviations from them (* indicates atom used to define plane) $5.0688 (0.0080) x + 2.5020 (0.0057) y + 7.5234 (0.0169) z = 5.8953 (0.0064)$ * 0.0682 (0.0017) O1 * -0.0670 (0.0017) N1 * 0.0661 (0.0017) O3 * -0.0673 (0.0018) N2 0.2032 (0.0019) Zn1 Rms deviation of fitted atoms = 0.0672

Table S3. Hydrogen-bonding geometries ($\text{\AA}$, $^\circ$) of Zn(II) complexes with glycine (2), L-histidine (3), L-proline (4), L-methionine (5).

Comp.	H-bond	D-H	H...A	D...A	D-H...A
(2)	N1-H1A...O10W ⁱⁱ	0.86(3)	2.05(3)	2.900(2)	169(2)
	N1-H1B...O3 ⁱⁱ	0.89(2)	2.35(2)	3.060(2)	136(2)
	N1-H1B...O7 ⁱⁱ	0.89(2)	2.45(2)	3.157(2)	136(2)
	N2-H2A...O5 ⁱ	0.79(3)	2.55(3)	3.258(2)	149(2)
	N2-H2B...O4 ⁱⁱ	0.97(3)	2.10(3)	3.007(2)	155(2)
	N3-H3A...O9W ^v	0.91(2)	2.03(2)	2.937(2)	171(2)
	N3-H3B...O3 ^{vi}	0.92(2)	2.23(2)	3.054(2)	148(2)
	N4-H4A...O1 ^{iv}	0.83(3)	2.23(3)	2.992(2)	152(2)
	N4-H4B...O2 ⁱⁱⁱ	0.93(3)	2.12(3)	2.975(2)	151(2)
	O9W-H9A...O4 ^v	0.85(3)	1.89(3)	2.723(2)	170(3)
	O9W-H9B...O6 ^{vii}	0.80(3)	2.05(3)	2.845(2)	173(3)
	O10W-H10A...O8 ^{viii}	0.83(3)	2.00(3)	2.827(2)	173(3)
	O10W-H10B...O2 ⁱⁱⁱ	0.81(3)	1.93(3)	2.732(2)	169(3)
(3)	N1-H1A...O4 ⁱⁱ	0.90(7)	2.21(7)	3.034(6)	153(6)
	N1-H1B...O2 ⁱ	0.86(7)	2.16(7)	2.920(6)	146(6)
	N3-H3...O1 ⁱⁱⁱ	0.87(3)	1.96(3)	2.786(5)	159(6)
	O3-H31W...O4	0.84(1)	1.95(2)	2.781(6)	167(7)
	O3-H32W...O2 ^{iv}	0.84(1)	1.95(1)	2.780(6)	173(7)
	O4-H41W...O1 ^v	0.84(1)	1.90(2)	2.727(5)	170(8)
	O4-H42W...O3 ^{vi}	0.84(1)	1.96(2)	2.780(6)	164(7)
(4)	N1-H1A...O1 ⁱⁱⁱ	0.88(2)	2.23(2)	3.020(2)	150(2)
	N2-H2A...O2 ^{iv}	0.84(1)	2.11(2)	2.906(2)	159(2)
(5)	N1-H1A...O4 ⁱⁱ	0.91(6)	2.71(6)	3.425(5)	136(5)
	N1-H1B...O1 ^v	0.88(9)	2.19(9)	2.944(5)	143(7)
	N1-H1B...O1 ⁱⁱⁱ	0.88(9)	2.37(8)	3.007(5)	129(7)
	N2-H2A...O3 ^{vi}	0.87(6)	2.34(6)	3.145(5)	155(5)
	N2-H2A...O3 ⁱ	0.87(6)	2.33(5)	2.923(5)	125(5)
	N2-H2B...O2 ^{iv}	0.85(8)	2.61(8)	3.207(5)	128(6)

Symmetry codes: 2: (i) $x, \frac{1}{2}-y, -\frac{1}{2}+z$; (ii) $x, \frac{3}{2}-y, -\frac{1}{2}+z$; (iii) $x, y, 1+z$; (iv) $x, \frac{1}{2}-y, \frac{1}{2}+z$; (v) $1-x, 1-y, 1-z$; (vi) $x, \frac{3}{2}-y, \frac{1}{2}+z$; (vii) $x, y, -1+z$; (viii) $-x, 1-y, 1-z$.

Symmetry codes: 3: (i) $1-y, 1-x, \frac{1}{2}-z$; (ii) $\frac{1}{2}+x, \frac{3}{2}-y, \frac{1}{4}-z$; (iii) $\frac{3}{2}-x, \frac{1}{2}+y, \frac{1}{4}-z$; (iv) $\frac{1}{2}-y, -\frac{1}{2}+x, -\frac{1}{4}+z$; (v) $1-y, 2-x, \frac{1}{2}-z$; (vi) $-\frac{1}{2}+x, \frac{3}{2}-y, \frac{1}{4}-z$.

Symmetry codes: 4: (iii) $x, 1+y, z$; (iv) $x, y, 1+z$.

Symmetry codes: 5: (i) $1-x, \frac{1}{2}+y, 1-z$; (ii) $1-x, -\frac{1}{2}+y, 1-z$; (iii) $-x, -\frac{1}{2}+y, 1-z$; (iv) $-x, \frac{1}{2}+y, 1-z$; (v) $x, -1+y, z$; (vi) $x, 1+y, z$.

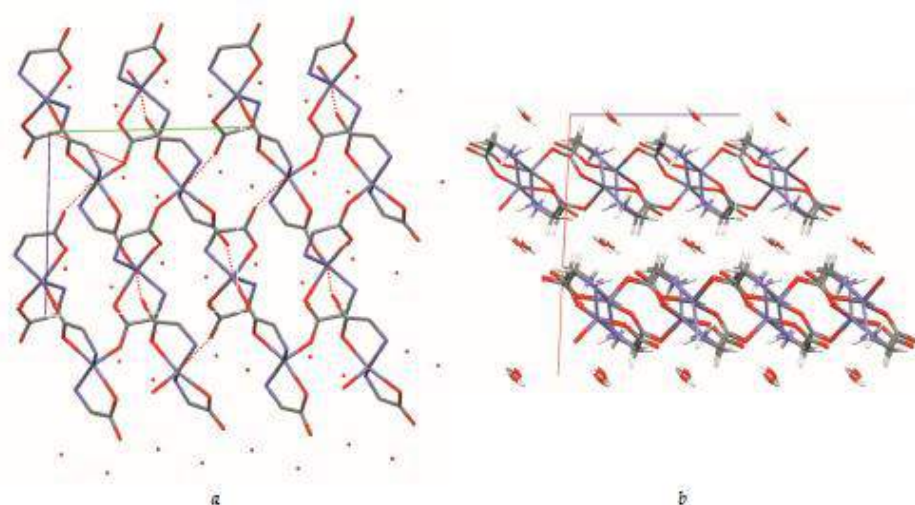


Figure S1. A part of the crystal structure showing a single coordination sheet of (2) (a). The crystal packing of (2), view along *b* axis (b).

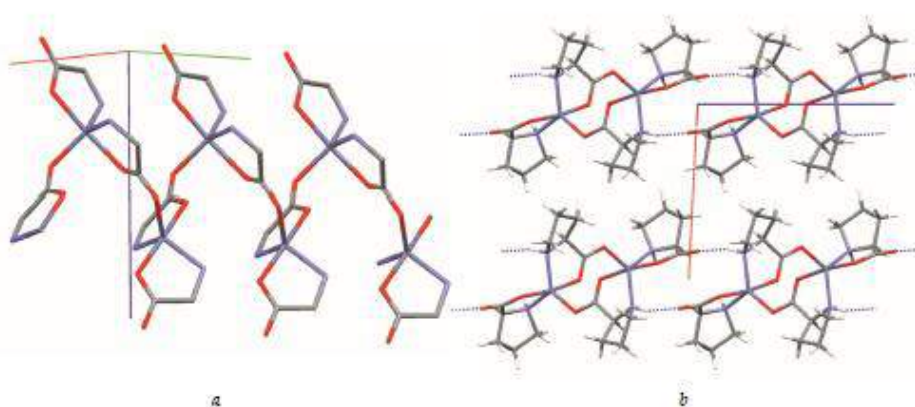


Figure S2. A part of the crystal structure showing a single coordination chain of (4). For clarity reason the ring-fragment of L-proline moiety is omitted (a). The crystal packing of (2), view along *b* axis (b).

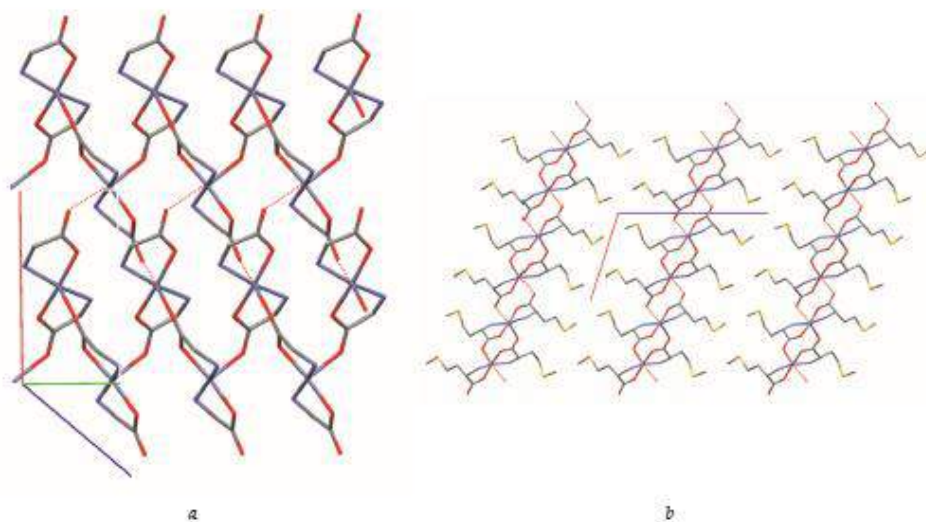


Figure S3. A part of the crystal structure showing a single coordination sheet of (5). For a comparison reason to structure (2) the side-chain of L-methionine moieties is omitted (a). The crystal packing of (2), view along *c* axis (b).

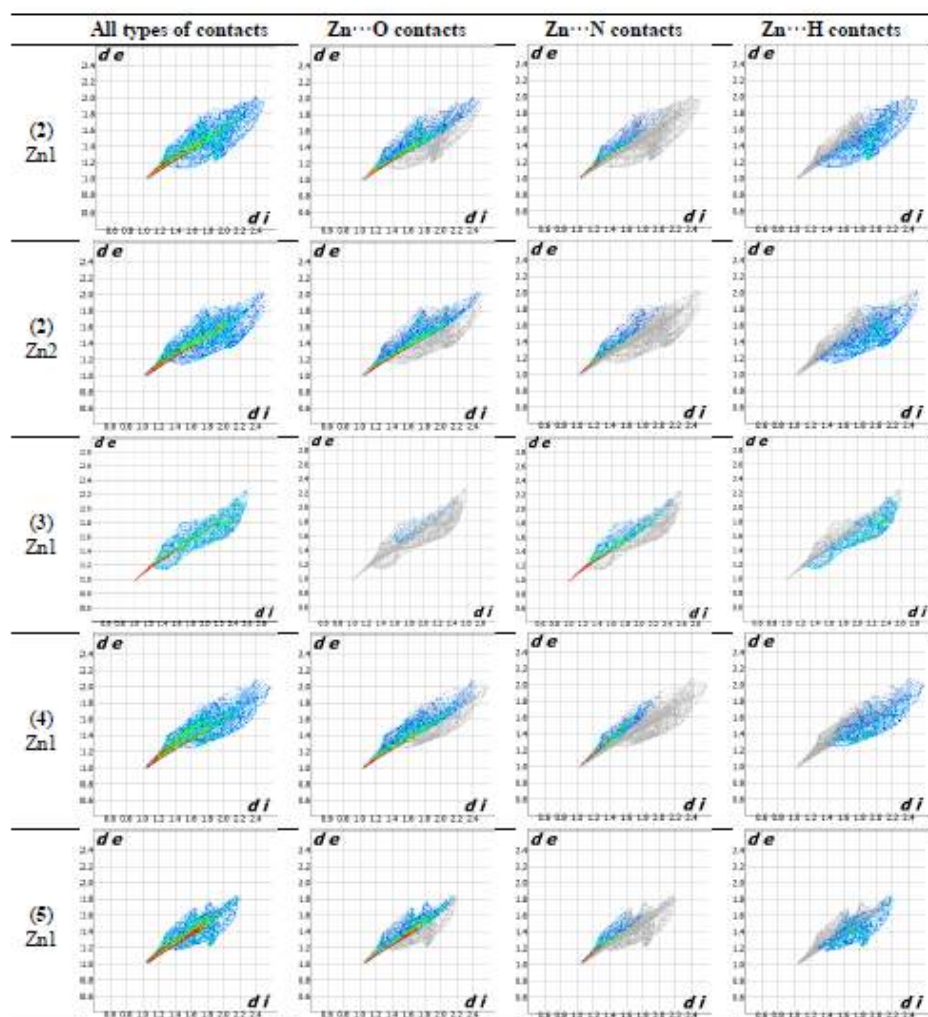


Figure S4. Fingerprint plot for the Hirshfeld surface of the metallic centre of (2), (3), (4) and (5) and corresponding plots reduced to a given contact type: Zn...O, Zn...N and Zn...H.

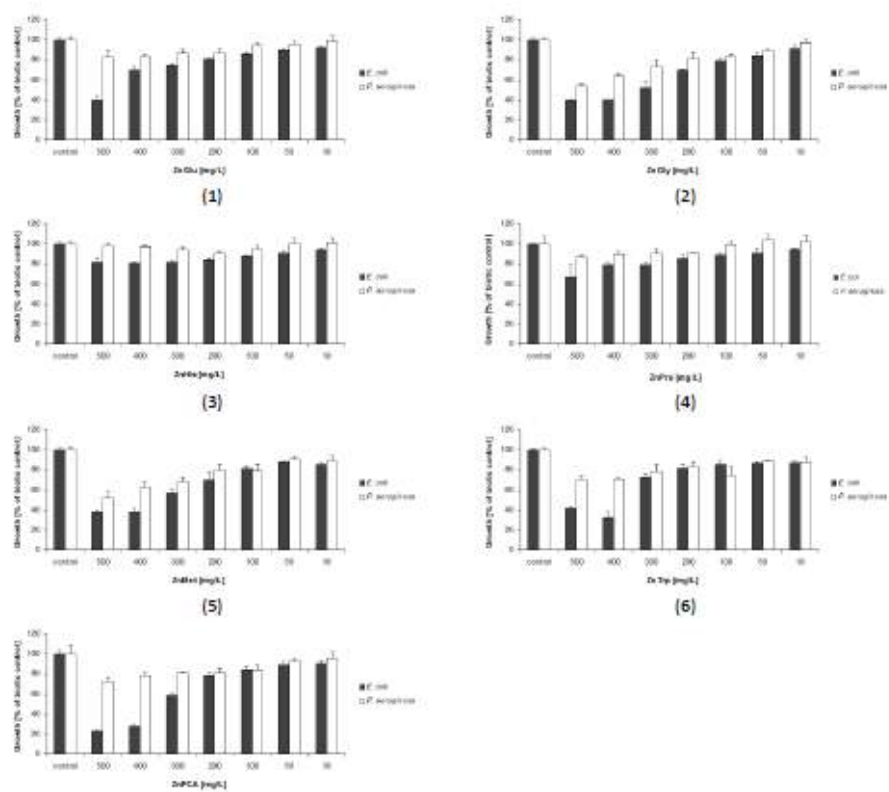
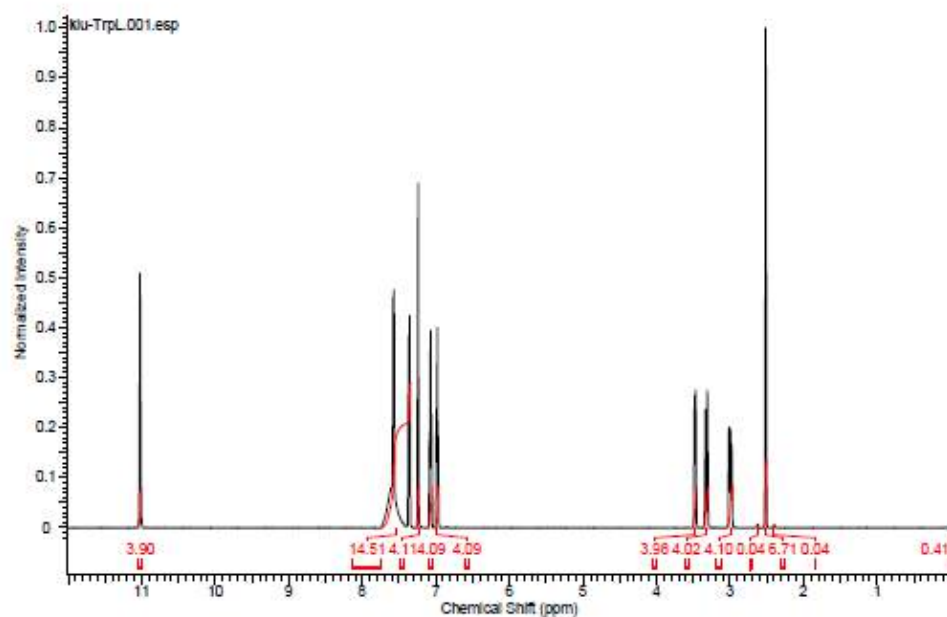
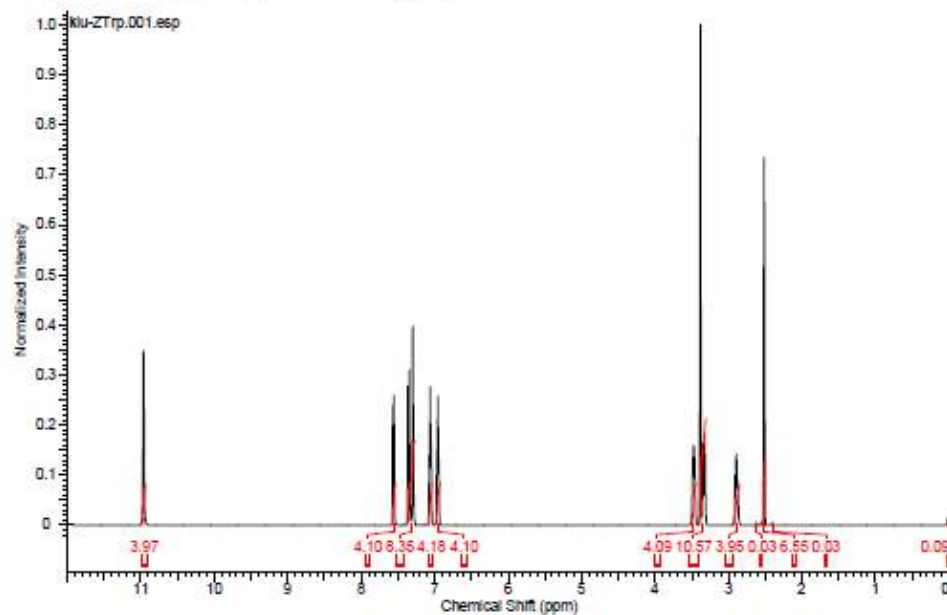


Figure S5. The antibacterial properties of zinc(II)- aminoacidate complexes (1-6) and ZnPCA reference compound towards Gram-negative bacteria.



(a) ^1H NMR (DMSO) spectrum of L- tryptophan



(b) ^1H NMR (DMSO) spectrum of zinc (II) complex of L- tryptophan (6)

Figure S6. Exemplary ^1H NMR spectra of L- tryptophan (a) and its zinc(II) complex (6) (b).

Appendix S1. Description of ^1H NMR spectra of free amino acids: L-Glu, Gly, L-His, L-Pro, L-Met, L-Trp,

L-Glutamic acid (for comparative purpose)

^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 2.01-2.10 (m, 2H, $\text{CH}_2(\beta)$) ($\Delta = -0.06$), 2.42-2.49 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2(\gamma)$) ($\Delta = -0.12$), 3.70-3.72 (m, 1H, $\text{CH}(\alpha)$) ($\Delta = -0.04$).

Glycine (for comparative purpose)

^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 3.53 (s, 1H, CH_2) ($\Delta = -0.30$).

L-Histidine (for comparative purpose)

^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 2.95-2.98 (m, 1H, $\text{CH}_2(6')$) ($\Delta = 0$), 3.06-3.10 (dd, 1H, $\text{CH}_2(6'')$) ($\Delta = +0.03$), 3.83-3.85 (dd, 1H, $\text{CH}(7)$) ($\Delta = +0.04$), 6.90 (s, 1H, $\text{H}(5)$) ($\Delta = +0.03$), 7.60 (s, 1H, $\text{H}(2)$) ($\Delta = +0.05$).

L-Proline (for comparative purpose)

^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 1.84-1.96 (m, 3H, 2H of $\text{CH}_2(4)$ ($\Delta = -0.03$) and 1H of $\text{CH}_2(3')$), 2.19-2.25 (m, 1H, $\text{CH}_2(3'')$) ($\Delta = 0$), 3.18-3.23 (m, 1H, $\text{CH}(5'')$), 3.27-3.32 (m, 1H, $\text{CH}(5')$) ($\Delta = -0.14$), 3.98-4.01 (m, 1H, $\text{CH}(2)$) ($\Delta = -0.12$).

L-Methionine (for comparative purpose)

^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 2.01 (m, 3H, CH_3) ($\Delta = -0.01$), 2.05-2.13 (m, 2H, CH_2) ($\Delta = -0.19$ and $\Delta = -0.01$), 2.50-2.55 (t, 2H, $\text{CH}_2(5)$) ($\Delta = 0$), 3.73-3.75 (dd, 1H, $\text{CH}(\alpha)$) ($\Delta = -0.20$).

L-Tryptophan (for comparative purpose)

^1H NMR (600 MHz, DMSO): δ 2.98-3.02 (m, 1H, $\text{CH}_2(\beta')$) ($\Delta = -0.11$), 3.31-3.35 (m, 1H, $\text{CH}_2(\beta'')$) ($\Delta = 0.01$), 3.47-3.38 (m, 1H, $\text{CH}(\alpha)$) ($\Delta = 0$), 6.97-7.00 (m, 1H, $\text{H}(3)(\text{indol})$) ($\Delta = -0.03$), 7.06-7.09 (m, 1H, $\text{H}(4)(\text{indol})$) ($\Delta = -0.02$), 7.24 (s, 1H, $\text{H}(7)(\text{indol})$) ($\Delta = 0.06$), 7.35-7.37 (d, 1H, $\text{H}(5)(\text{indol})$) ($\Delta = 0$), 7.52-7.58 (d, 1H, $\text{H}(2)(\text{indol})$) ($\Delta = -0.02$), 11.02 (s, 1H, $\text{NH}(1)(\text{indol})$) ($\Delta = -0.06$).

where Δ is a difference in values of chemical shifts of corresponding signals of free ligands and their Zn(II) complexes.

Review Article

Zinc-containing compounds for personal care applications

M. Abendrot* and U. Kalinowska-Lis† 

*Dr Kosiej Ltd, Independent Cosmetic Testing Facility, Rumiana 1, Warsaw 02-956, Poland and †Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Medical University of Łódź, Muszyńskiego 1, Łódź 90-151, Poland

Received 9 March 2018, Accepted 23 April 2018

Keywords: acne vulgaris, antimicrobial activity, antioxidant activity, dandruff, Zn compounds**Abstract**

It is well-known that zinc ions are widely used in cosmetic products. Their popularity is associated with the multifunctional profile of Zn^{2+} , which is classified as an essential chemical element in the human body. This review examines numerous beneficial biological properties of zinc-containing compounds and classifies the compounds used in cosmetic products according to their functionality profile: antioxidant, sunscreen, anti-inflammatory, anti-pigmentation, anti-ageing, anti-acne, antimicrobial, anti-odor, cleansing or stabilizing activity. It also underlines the significance of zinc in enzymatic processes, which depends on the enzyme type acts as inhibitor or enzymatic stimulator. Moreover, the article describes the chemical nature of the most interesting groups of Zn compounds.

Résumé

Il est bien connu que les ions de zinc sont largement utilisés dans les produits cosmétiques. Leur popularité est associée au profil multifonctionnel de Zn^{2+} , qui est classé comme un élément chimique essentiel dans le corps humain. Cette revue examine de nombreuses propriétés biologiques bénéfiques des composés contenant du zinc et classe les composés utilisés dans les produits cosmétiques en fonction de leur profil fonctionnel: antioxydant, protection solaire, anti-inflammatoire, anti-pigmentation, anti-âge, anti-acné, antimicrobien, anti-odeur, nettoyage ou activité stabilisante. Il souligne également l'importance du zinc dans les processus enzymatiques, qui en fonction du type d'enzyme agit comme un inhibiteur ou un stimulateur enzymatique. De plus, l'article décrit la nature chimique des groupes les plus intéressants de composés de Zn.

General Information about Zn Compounds

Zinc is acknowledged as one of most essential elements in the human body and is classified as a trace element, along with chromium, cobalt, copper, iron, manganese, magnesium, molybdenum and selenium. Zinc is present in various tissues and organs, and it takes part in over 200 chemical reactions regulated by enzymes. The total Zn content in an average human organism is estimated at about 2 g, of which about 60% is present in the muscles, about 30% in the bones and about 6% in the skin [1]. It demonstrates a primary

role of Zn^{2+} ions for these external body parts. It is important to note, however, that zinc concentration differs between skin layers, with the amount of Zn in lower dermis estimated to be one-sixth of that in the epidermis layer, so as there is six times less Zn in lower dermis than in epidermis [1,2]. An interesting fact is that although the zinc concentration decreases with age in the epidermis, the same cannot be said for the serum, with no significant difference in Zn serum level observed between middle-aged people (less than 35 years) and the elderly (over 65). This shows that low Zn content in the epidermis may be a consequence of a reduction of local enzymatic activity, and so appropriate cosmetic products containing Zn ions may play an important role in preventing skin ageing.

In terms of acting as co-factor for various types of enzymes, zinc is similar to magnesium [3]. In enzymatic reactions, zinc typically has a coordination number of 4. This has been observed, for example, in carbonic anhydrase, carboxypeptidase and alcohol dehydrogenase, where the free orbitals of Zn^{2+} are occupied by three histidine nitrogen atoms and one water molecule. Zn^{2+} ions as coordinate covalent bond acceptors are found in many other enzymes and regulatory proteins [3]. The example of the latter is Zn-containing transcription factors, in the form of so-called zinc finger motif. The Zn finger protein family encompasses about 2500 proteins divided into six different classes. The classes are distinguished by the number of histidine and cysteine residues with the proteins [4]. In all of them, Zn^{2+} stabilizes the folded protein structure in a finger-like shape, which can bind to the major groove of DNA double helix.

Total content of zinc in human body depends mainly on dietary intake. The average requirement (AR) values differ in terms of body size and general organism condition. It is considered that sex differences do not affect AR importantly. However, one of the most significant factors to consider, when estimating AR, is the effect of phytate intake-related inhibition on Zn absorption [4]. Despite the presence of zinc in meat, fish, eggs, nuts, dairy products, seafood, legumes and whole grains, as well as many other popular dietary products, it is likely to be poorly absorbed from the food. Zn^{2+} ions interact with other bivalent elements, including calcium, copper and iron, as well as with oxalic acid, phosphates, fibre, tannins and phytates, which are abundant in bran and seeds [1,4,5]. Interestingly, the absorption can be improved by intaking zinc as chelates, for example Zn-bisglycinate [6].

Although food is the main source of zinc, and the best way to prevent deficiency is to follow a correct diet, Zn^{2+} can be administered in numerous types of dietary supplements and even in medicines. Zinc sulphate, gluconate, acetate and asparaginate can be administered orally; however, far more Zn compounds are used in

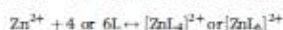
Correspondence: U. Kalinowska-Lis, Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Medical University of Łódź, Muszyńskiego 1, Łódź 90-151, Poland. Tel.: +48 422725596; fax: +42 422725596; e-mail: urszula.kalinowska-lis@umed.lodz.pl

cosmetics. A wide variety of Zn compounds mirror their multifunctional properties, which depend on the exact nature of anions or chelating agents. The detailed functionality profiles are discussed below.

Chemical nature of Zn compounds

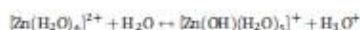
Zn compounds used in skin care products are usually salts, coordinated compounds (complexes) or as the zinc oxide, which is hardly soluble in water.

Thanks to the ability of the Zn^{2+} to accept lone electron pairs, it can be complexed by different ligands. In a complex formation reaction, Zn^{2+} plays the role of a Lewis acid and ligands (L), serve as Lewis bases. The Zn^{2+} typically has a coordination number of 4 or 6:



Depending on the stability constants of the complexes, solutions of the Zn complexes typically possess Zn bound in the form of more or less stable complex, which stays in the equilibrium with a relatively low concentration of Zn ions and free ligands.

Generally, Zn salts possessing ionic bonds have a weakly acidic character when dissolved in water. The Zn ion binds six water molecules, creating a labile complex cation $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ that subsequently undergoes hydrolysis, with the formation of the hydronium ion:



The pH of the Zn salt solutions depends on the properties of the anions. The stronger is the acid from which the anion is derived from, the more acidic reaction the salt has.

Zinc oxide (ZnO), very often used in topical products, is sparingly soluble in water, with a solubility approximately 2 mg dm^{-3} (20°C). ZnO has an amphoteric nature. Although it is nearly insoluble in water, it will dissolve in strong acids giving Zn^{2+} and in strong alkalis, yielding soluble zincates $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$. In order to improve the water solubility of ZnO , the phenomenon of the so-called salt effect can be applied. This effect bases on adding a substance that has not got common ions with a sparingly soluble compound, to the supersaturated solution of a sparingly soluble compound (herein ZnO). This operation will result in a little rise of ZnO solubility. For example, the presence of a culture medium during the determination of antimicrobial activity of ZnO may increase its solubility according to the mentioned salt effect [7].

The next notable Zn compound belonging to the group of coordination compounds is the Zn-glycine complex. The glycine molecule may be bound with Zn^{2+} in several ways: by one or two oxygen

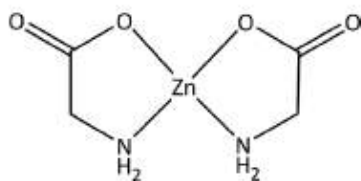


Figure 1 Outline of zinc(II)-glycine complex's structure.

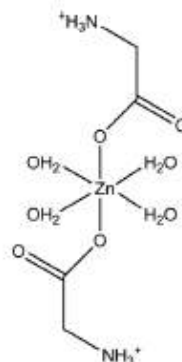


Figure 2 Section of the structure of Zn complex containing glycine.

atoms of the carboxylate group or by oxygen and nitrogen atoms forming chelate complexes. The chelating is possible when the glycine does not exist as a zwitterion $\text{NH}_3^+\text{-CH}_2\text{-COO}^-$, but is in its anionic form: $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$ with a lone electrons pair on the nitrogen atom (Fig. 1) [8].

To give an appropriate example of Zn-glycine complex in which glycine does not play as chelate ligand, a hexaaquazinc tetraaquaglycinexinc bis(sulphate) of the general formula $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6][\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ was presented (Fig. 2). Conditions in which the complex was synthesized had to promote the existence of the ligand as a zwitterion $\text{NH}_3^+\text{-CH}_2\text{-COO}^-$, and therefore, it coordinated to Zn only by an oxygen atom [9]. Likewise, in the case of another Zn complex $[\text{Zn}(\text{Gly})_2]_2$, the chelate was not formed and glycine adopted a monodentate coordination to the Zn^{2+} (Fig. 3) [10]. When the glycine zwitterion constitutes the ligand, it would also act as a bidentate bridging ligand linked with two Zn^{2+} ions by the carboxylate oxygen atoms [10].

Functionality spectrum of Zn compounds

The wide array of physiological functions of Zn-containing compounds is determined by the chemical nature of the element. Zn is known to control metabolism, growth and development of bones and thus constitutes an essential factor throughout life. It maintains the immune and neuropsychiatric functions and enhances wound healing. It has been observed also that Zn reduces the risk

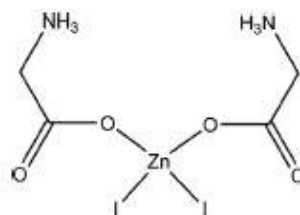


Figure 3 Structure of $[\text{Zn}(\text{Gly})_2]_2$ complex.

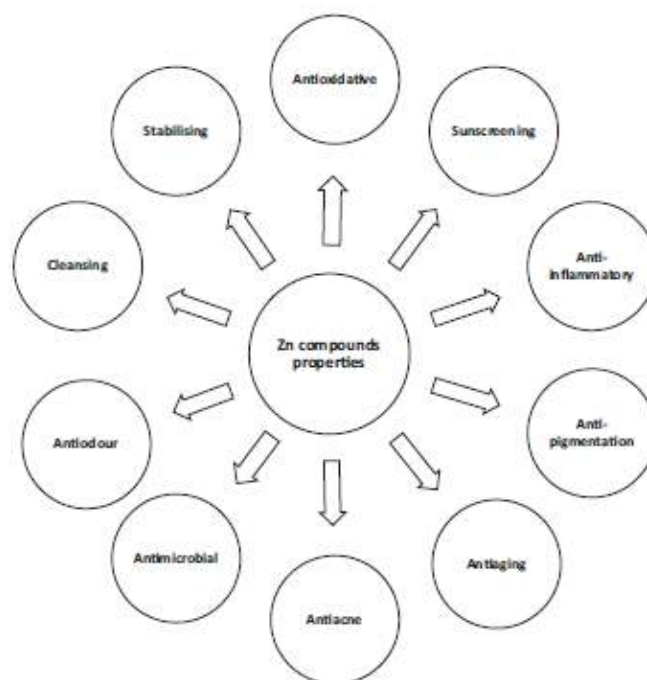


Figure 4 Functionality profile of Zn compounds

of cancer, cardiovascular diseases and has UV-protecting properties [11,12]. However, when used in cosmetic products, Zn offers relatively few benefits to the human organism as a whole, due to its limited absorption through skin. Although most of the beneficial features of Zn are reflected in skin care products, each type of molecule possesses its own functionality profile, which is still being discovered over time (Fig. 4).

Antioxidant activity

Zinc possesses well-known antioxidant properties. The data refer not only to skin, but also to various systemic diseases. Zn compounds are therefore often employed to fight free radicals, which are responsible for causing many undesirable oxidative alterations in biomolecules, cells, tissues and organs.

In general, zinc exerts its antioxidative properties through two routes, either directly or indirectly. In the first case, Zn^{2+} ions are bound to the active centre of antioxidative enzymes. This is the case of e.g. superoxide dismutase, which can incorporate zinc and copper in its structure (SOD type 1) [13]. Another example of antioxidant-boosting effect of zinc ions is a stimulating production of the protein, which is rich in sulfhydryl groups – metallothionein (MT). Its antioxidant properties derive from the high chemical affinity of its zinc-thiolate moieties to reduce other molecules; in addition to their antioxidant properties, the high-cysteine proteins also detoxify the body by binding free heavy metal ions. It has been found that

zinc protects skin from immunosuppression caused by UV radiation by inducing MT production [11]. There are data, which confirm that Zn increases the activity of well-known antioxidant enzymes such as glutathione catalase (GSH) or superoxide dismutase (SOD) and reduce the induced oxidative potential by decreasing the activity of inducible nitric acid synthase (iNOS) and NADPH oxidase [14,15].

In addition, zinc also offers high complexing affinity or competitive inhibition properties to metals in different enzymes. Zn^{2+} ions may replace redox-prone copper (Cu) and iron (Fe) ions, which take part in a number of redox reactions, including those in which natural-occurring free radicals like superoxide radical anion or hydroxyl radical are created [11,14].

Divalent Zn^{2+} ions have been found to provide skin photoprotection via their indirect antioxidant properties. Zinc has demonstrated a protective effect on skin fibroblasts exposed to UVA and UVB radiation, resulting in decreased cytotoxicity and lipid peroxidation [11]. It has been proven that zinc acts as a superior lipid oxidation protector by decreasing the amount of characteristic lipid oxidation products, such as malondialdehyde, coupled dienes and hydroxyalkenols. Zinc also has been found to protect DNA by reducing the concentration of 8'-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a well-known oxidation product of DNA [13]; also, zinc chloride significantly decreased the numbers of UV-induced DNA helix alterations in human fibroblast cultures and UVA-induced free radical level in mouse skin cell culture [16]. A similar effect has also been observed

when zinc chloride was applied directly to the skin [17]. Interestingly, the antioxidant efficacy of zinc compounds is related to their bioavailability: organic chemicals with a complex structure like zinc cysteine $[Zn(Cys)_2]$ demonstrated much greater antioxidant activity than simpler chemicals, such as zinc oxide, citrate, sulphate or gluconate. Its total antioxidative effect was even comparable with those of vitamin C or E [18]. Similarly, the $Zn(II)$ -glycine complex $[Zn(Gly)_2]$ (Fig. 1) not only protects against extrinsic oxidative stress, but also enhances UVB protection by inducing MT production [19]. Zn -glycine chelate was found to be better absorbed by rats *in vivo* than inorganic compounds such as zinc sulphate, oxide or carbonate and is excreted from the body more slowly [6]. Zn -Gly supplementation has also been found to improve overall oxidative stress protection and increase storage of zinc in tissues [20–22] and in a dose-dependent manner in serum and the liver [23].

Sunscreening properties

Sunscreen properties are well-known for zinc oxide. ZnO is a white powder, which is often used as a UV filter and a colourant in cosmetic products. Zinc oxide is an example of physical sunscreen of broad spectrum, which has been used for many years in cosmetic and pharmaceutical products. It most effectively blocks UV rays within the 340–400 nm band. An entire UVA range is divided into two parts with different wavelengths: 320–340 nm for UVA-2 and 340–400 nm for UVA-1, which shows that zinc oxide ensures protection against almost entire range of UVA. Zinc oxide can be used alone as a sunscreen, but is more commonly used in combination with other sunscreen agents, particularly titanium dioxide, which protects mainly against UVB (290–320 nm) [15,24]. In response to their high tendency to sediment over time, micronized forms of these physical sunscreens had become to be more popular. It is worth remembering that decreasing particle size increases UVB blocking potential and reduces UVA protection at the same time. Hence, a blend of zinc oxide and titanium oxide, which is not micronized, will offer lower level of protection across the full range of UV wavelengths than the partly micronized blend would. Therefore, to ensure an optimal UVA and UVB protection, it is recommended to use the blend of nanosized TiO_2 with mixed nanosized and large micronized ZnO particles [24]. Although ZnO was recognized to be safe when used as a sunscreen agent with the maximal concentration of 25% [25], recently it has been banned as a colourant agent for cosmetic products, because of the risk of its particles inhalation, which may lead to lungs inflammation [26].

Topical use of 1% $ZnCl_2$ has also been found to offer protection against UVA- and UVB-induced sunburn cell formation in mouse skin [11]. An important alternative for sunscreen agents is Zn -glycine complex, which has ability to induce MT, which also improves the resistance against UV-induced oxidative stress preventing from skin hyperpigmentation [19]. In spite of potential use of zinc chloride or Zn -glycine complex, zinc oxide remains nowadays the most widespread sunscreen blocking agent in cosmetic products.

Anti-inflammatory activity

Anti-inflammatory features could be considered as a derivative functionality of zinc-containing moieties, which are exactly responsible for antioxidant properties.

Zn^{2+} ions diminish reactive oxygen species (ROS) production by inhibiting nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase. The list of ROS, which production Zn^{2+} affects, includes

oxygen-based molecules comprising superoxide radical anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals ($\cdot OH$), which are produced in an aerobic environment as byproducts of normal cell metabolism. However, at high concentrations, they can cause alterations in various molecules and damage cell structures; NADPH oxidase inhibitors such as zinc might thus have a protective influence taking into account the decrease in ROS formation [14,27].

However, zinc also contributes indirectly to the dismutation of $O_2^{\cdot-}$ by acting as an essential co-factor for SOD. This results in the production of H_2O_2 , which is subsequently reduced to free water molecules and oxygen by catalase [14,27].

Zinc also inhibits the formation of inflammatory mediators such as nitric oxide due to inhibiting the activity of iNOS [15].

All these mechanisms have been demonstrated in animal and human models. Zinc supplementation was found to reduce the level of inflammation-causing cytokines and oxidative stress biomarkers, such as C-reactive protein [14].

Hence, Zn compounds are used in the treatment of a range of skin ailments associated with the inflammation process: acne, rosacea, seborrhoeic dermatitis, eczema, erosive pustular dermatosis and wounds of various aetiologies. Moreover, zinc-containing chemicals could be employed in the treatment of hair disorders (alopecia) and mucosal conditions (Oral Lichen Planus) [2,11,15].

The topical application of zinc oxide paste and zinc sulphate has been found to be effective in treating diaper dermatitis and hand eczemas. Zinc oxide and zinc carbonate have also demonstrated soothing properties and hence have been used to treat pruritus [15].

The anti-inflammatory effect of zinc peroxide nanoparticles (ZnO_2 -NPs) was compared with that of standard aspirin, which is the well-known example of anti-inflammatory drug. The nanoparticles showed significant anti-inflammatory activity towards *Pseudomonas aeruginosa* PA6 and *Aspergillus niger* AN4 strains, with regard to membrane stabilization, proteinase inhibition and albumin denaturation [28].

Anti-pigmentation properties

Of all known Zn compounds, Zn -glycine complex $[Zn(Gly)_2]$ (Fig. 1) is believed to have the greatest anti-pigmentation potential, which has been attributed to its antioxidant and sunscreening properties [19]. It is a well-known MT-inducer, and moreover, it activates γ -glutamyl cysteinyl synthetase (γ -GCS). $[Zn(Gly)_2]$ exhibits an ability to decrease oxidative stress by preventing intracellular ROS formation [8]. It is also possible that Zn is a co-factor which plays a role in tyrosine metabolism, oxidation and conversion to melanin [1].

Zinc oxide is also used in sunscreening products used for melasma treatment.

Moreover, the topical application of 10% zinc sulphate solution twice a day for three months was found to improve a skin condition with melasma, but not significantly, and hence could not be considered a regular mode of melasma treatment [15]. It is important to note that the maximum zinc concentration allowed in cosmetic products in the European Union is 1% [29].

Anti-ageing properties

The anti-ageing properties of Zn -containing compounds are not well-established. Zn -glycine complex is believed to act as anti-ageing agent by preventing ROS formation [8]. Moreover, cream with 0.1% copper-zinc malonate was found to have a positive effect on

photosaged facial skin over an eight-week course of treatment, with beneficial results being observed in group of 21 female patients: significant regeneration of skin elastic fibres was observed, leading to wrinkle smoothing [15, 30].

Anti-acne activity

Acne vulgaris is a disease that is incidental with the presence and activity of bacteria, inflammation and excess sebum production and keratinization. It is a common disease which affects almost 90–95% of teenagers [15].

Zn compounds have well-established anti-acne properties. Although Zn-containing products are not first choice antimicrobial drugs, they are often used in cases of antibiotic-resistant *Propionibacterium acne* bacteria. Zn compounds have been used to treat acne due to its ability to reduce the inflammation of acne lesions and inhibit sebum production and are administered not only topically, but also orally.

The oral form of Zn, typically zinc sulphate or the better absorbed zinc gluconate, is recommended for the treatment of moderate and severe acne, and its effectiveness is comparable to that of systemic tetracyclines, such as minocycline or oxytetracycline. However, as oral administration of Zn salts is associated with side effects, such as nausea, diarrhoea or vomiting, Zn salts are used as supporting agents rather than as the main remedy.

Otherwise, in case of topical administration, Zn compounds are widely used in cosmetic formulas due to their anti-inflammatory properties and an ability to decrease number of *P. acne* bacteria, by blocking of the *P. acne* lipases and reducing of free fatty acids' level. Zinc sulphate is used rarely, because of its high irritating potential [15].

For acne treatment, the astringent properties of Zn salts are also beneficial. One excellent example is zinc oxide, which has also been found to have sebum regulating properties, and another is zinc 2-pyrrolidone 5-carboxylate (Zn PCA) (Fig. 5). It offers significant benefits for acne-prone skin because, as well as its astringent properties, it exhibits antimicrobial properties against *P. acne* and *S. epidermidis* [1].

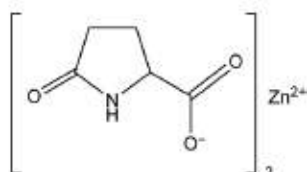


Figure 5 Structure of zinc 2-pyrrolidone 5-carboxylate.

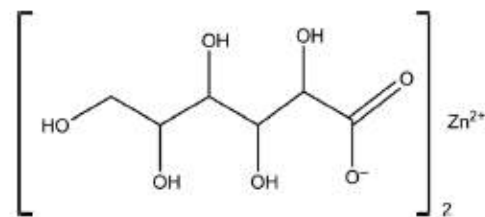


Figure 6 The structure of zinc gluconate.

Zinc gluconate (Fig. 6) is known to be effective in healing inflammatory acne and possesses antimicrobial activity against *P. acne*. It is also effective against erythromycin-resistant *P. acne* strains. An *in vivo* study carried out on a group of thirty patients with inflammatory acne found that treatment with 30 mg of zinc gluconate per day for two months was effective and caused a reduction in the number of inflammatory lesions, regardless of the presence of erythromycin-resistant *P. acne* strains. The addition of zinc gluconate to the culture medium of *P. acne* was also found to reduce the resistance of *P. acne* strains to erythromycin [31]. Another publication indicates that Zn appears to increase the total topical absorption of erythromycin, which could constitute a probable explanation of decreasing resistance to this antibiotic [15].

Another research on *Propionibacterium acne* has showed that ZnO of three different particle sizes mixed with citric acid (CA) may be a good candidate for the prevention of and treatment of acne. The smallest particles (<50 nm) showed the best antimicrobial activity. What interesting, the mixture of the two ingredients ZnO : CA (1 : 1) resulted the higher antimicrobial activity than ZnO and CA separately did [32].

The efficacy of oral intake of capsule formulations containing lactoferrin, zinc and vitamin E has been confirmed for mild-to-moderate acne vulgaris [33].

Antibacterial activity

It should be emphasized that it is difficult to compare antimicrobial agents because their activity is often estimated under varying conditions, that is incubation time, type of culture medium, type of microbial strain and choice of unit (e.g. μM , mg L^{-1} and other).

The optimal level of Zn^{2+} ions in microbial cells has been found to range from 10^{-7} to 10^{-5} M depending on the strain. It has been observed that concentrations above 10^{-4} M disturb the homeostasis of Zn^{2+} ions and enhance its permeability through the cell membrane, and this has cytotoxic effects on prokaryotes. Although antimicrobial activity is mainly influenced by Zn^{2+} concentration, the form of the Zn compound itself also has an effect [7].

Zinc acetate has greater antibacterial potential against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* than *Pseudomonas aeruginosa* [34], with the effectiveness above 11 mmol L^{-1} calculated on Zn^{2+} ions. In turn, long-term contact with $100 \mu\text{g g}^{-1}$ of Zn decreased the generation of *Aspergillus brasiliensis* spores [7,34]. Zinc chloride also exhibits dose-related growth-inhibiting potential against *Escherichia coli* [7]. Zinc sulphate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) is used in oral care products, typically at concentrations of 0.02–0.5% calculated on Zn^{2+} content. In addition, it has been established that using Zn salts in such products might inhibit tartar formation [1].

The dose-dependent effect has been also observed for zinc oxide and zinc gluconate. The Challenge Test, used by the pharmaceutical and cosmetic industry to check microbiological safety by calculating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), found zinc gluconate salt to have higher antimicrobial activity than ZnO. Zinc gluconate tends to have greater efficacy against *A. brasiliensis*, *E. coli* and *C. albicans*, but zinc oxide supernatant is more active against *S. aureus* and *P. aeruginosa* [7].

A variety of antimicrobial mechanisms can be observed depending on the tested Zn compound; however, a key distinction can be made between those used by soluble species and by insoluble species. The former has two postulated mechanisms of action: in the first, interaction between Zn^{2+} ions and cell membrane leads to its

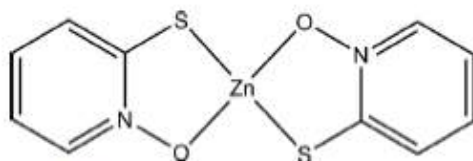


Figure 7 Outline of zinc pyrithione's structure (ZPT).

destabilization and enhanced permeability, while in the second, the nucleic acids are thought to interact with the Zn^{2+} ions, causing dysfunctions in the respiratory enzymes. However, the exact mechanism of soluble compounds' activity remains unclear, due to its complexity. Three mechanisms have been proposed for insoluble Zn compounds like ZnO: production of reactive oxygen species (ROS) [35,36], the destruction of cell walls by direct contact with microbial membranes, and the intrinsic cytotoxic effect obtained by releasing Zn^{2+} ions [7,37].

Although the antibacterial activity of regular ZnO has been relatively well investigated, the activity of ZnO nanoparticles remains poorly studied. Nevertheless, ZnO nanoparticles have demonstrated significant antibacterial activity on a broad spectrum of microorganisms, with greater activity against *S. aureus* than other metal oxide nanoparticles. It has been found that the activity of ZnO is dependent on the particle size and the presence of visible light [37]: the MIC value against *S. aureus* was found to be 1 mM (or $80 \mu\text{g mL}^{-1}$) for smaller ZnO nanoparticles (ca. 8 nm), but 15 mM (or 1.2 mg mL^{-1}) for larger ones (50–70 nm) [32,38]. The antimicrobial activities of water suspensions of nanosized ZnO, TiO_2 and SiO_2 were compared against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Better results were obtained for *B. subtilis*. The study also confirmed that ZnO nanoparticles were the most active among other metal oxide particles, and their activity was proportional to decreasing particle size [32,37,39].

Hence, Zn-containing chemicals may serve as an important group of preservatives in cosmetic and pharmaceutical products.

Antifungal activity

Zn compounds also demonstrate antifungal activity. An excellent example is the Zn complex with pyridinethione (Fig. 7), commonly known as pyrithione. Zinc pyrithione (ZPT) demonstrates anti-dandruff properties. It has an ability to reduce the activity of *Pityrosporum* (*Malassezia*), a pathogenic species responsible for such skin conditions as dandruff and seborrheic dermatitis [1,15,40]. Zinc pyrithione is often used in anti-dandruff shampoo (AD), and its low water solubility allows it to remain on the scalp after rinsing. To increase deposition of ZPT onto the scalp, a dual-active AD shampoo containing both ZPT and CBZ (climbazole) has been tested with

satisfactory results [41]. Such dual-active AD shampoos not only reduce *Malassezia furfur* regrowth, but also may enhance sensory benefits by selecting suitable conditioning ingredients [42]. In addition, as it has no impact on the odour and colour of the final formulation, it can be easily incorporated into new products.

The mechanism of the antifungal action of ZPT appears quite complex. It has been demonstrated that ZPT depolarizes the cell membrane and prevents transport through it [43,44], while it has also been found that its antifungal efficacy depends on its iron-blocking properties [45]. Recently, it was established that fungal growth inhibition is related to an increase in the copper concentration and the destruction of the iron-sulphur protein clusters crucial for fungal metabolism [40].

It is worth underlining that ZPT has also high antibacterial efficacy: thermoplastic elastomers (TPE) incorporated with zinc pyrithione (ZPT) were found to demonstrate a good inhibitory effect towards *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [46]. This material coated with ZPT was also evaluated against *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Claudiosporium claudiosporoides* fungi by the measurement of inhibition zones, which amounted to 7 mm, 2 mm and 6 mm, respectively [46].

The antifungal activity of biosynthesized ZnO nanoparticles (ZnONps) stabilized by *Althaea rosea* proteins was studied against *Candida* sp., *Fusarium* sp., *Microsporum audouinii*, *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus fumigatus*. The obtained MIC (MFC) values were 256 (256), 64 (128), 256 (512), 64 (128) and 32 (32) $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The most pronounced antifungal effect was noticed against *Aspergillus fumigatus*. Most importantly, the cream with ZnONps exhibited significant inhibitory activity towards *Candida* sp., which showed resistance against a commercial antifungal cream (2%) [47].

Zinc undecylenate (ZnUA) and free undecylenic acid (UA) have been known as effective antifungal agents. They have been used in medicine as ingredients of many topical preparations [48].

Anti-odour activity

Two Zn compounds that do not show antibacterial activity, that is zinc glycinate and zinc ricinoleate have been found to have anti-odour activity. This activity is believed to be based on the inhibition of two hydrolytic enzymes produced by bacteria found in the human axilla area. There are two groups of bacteria known to colonize the axilla: *Corynebacterium* (known also as lipophilic diphtheroids) responsible for the production of odour associated with delta-16 steroids, and micrococci such as *Staphylococcus epidermidis* which tend to produce isovaleric acid odours. Enzymes such as aryl sulfatase and beta-glucuronidase show hydrolytic activity for appropriate sulphate or glucuronide derivatives. In the case of sweat and odour, their ester decomposing effectiveness is connected with realizing free volatile steroid 5- α -androstanol from their following esters: 5- α -androst-16-ene-3,6 α glucuronide by beta-

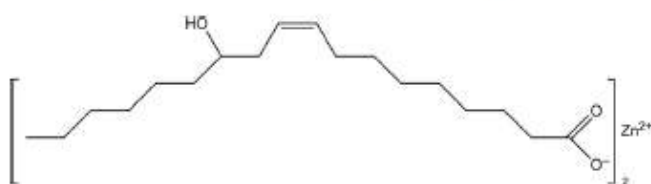


Figure 8 Structure of zinc ricinoleate.

glucuronidase and from 5 α -androst-16-ene-3 β -ol sulphate by aryl sulfatase. As free 5 α -androstanol is one of the odorants known to be present in the axilla, inhibition of these two enzymes is important for anti-odour activity [1,49].

Despite the fact that zinc ricinoleate (Fig. 8) does not possess bactericidal properties, it has a deodorizing effect which can be maintained for up to 24 h after topical application. This has been attributed to its high reactivity with low molecular weight organic compounds containing -SH and -NH groups, which are abundantly released from sweat by microorganisms. Zn ricinoleate has also an ability to react with free fatty acids. Interestingly, Zn salts with stearic and oleic acids do not exhibit similar odour-eliminating properties [1,50].

Of the new Zn-containing materials, which have been created, a hybrid (ZnAl-Ag₂Se₂) based on silver nanoparticles and ZnAl layered double hydroxides (ZnAl LDHs) and raw ZnAl LDH appears of interest. ZnAl-Ag₂Se₂ was found to be ten times more effective than the reference Zn ricinoleate in a study of deodorant activity against a fatty acid mixture. In addition, ZnAl-Ag₂Se₂ also shows antibacterial activity against *E. coli* [51].

Zinc oxide also has deodorizing properties, because of converting short and medium-chain free fatty acids into water-insoluble, non-volatile salts. ZnO is an essential ingredient of baby products for use in the diaper area, thanks to its astringent and absorbing features and good skin covering potential [1].

A 15% solution of Zn sulphate was found to have high efficiency in reducing foot odour in 70% of patients in a 2-week study. This high level of clearance was sustained by applying the solution as maintenance therapy once a week [52]. Although this solution was found to have high efficiency, the Zn concentration in cosmetic products is limited to 1% in the European Union [29], and so further studies have to be performed to confirm the effectiveness at lower concentrations.

Zn propionate, caprylate and undecylenate are also often found in foot care products, as they offer antiseptic and deodorizing properties and the ability to inhibit bacterial growth [1,48].

Cleansing properties

One example of a Zn compound used in skin cleansing products is Zinc Lauryl Ether Sulphate (ZnLES). It combines the antibacterial, deodorizing and sebum-reducing potential of Zn²⁺ ions with the detergency and good foaming potential characteristic of alkyl ether sulphate derivatives. One advantage of this Zn salt over other Lauryl Ether Sulphate salts is its lower potential for skin irritation. Its critical micelle concentration value (CMC) is lower than that of the widely used Sodium Lauryl Ether Sulphate (SLES) and comparable to that of Magnesium Lauryl Ether Sulphate (MgLES). The maximal recommended concentration of ZnLES in skin cleansing products is

12.5%. From a technological point of view, it is necessary to adjust the pH around 4.5–6.0 before adding this substance to final product. It is crucial to avoid zinc hydroxide precipitation, as this results in the product losing its transparency [1].

Stabilizing property

Zinc salt with stearic acid possesses stabilizing property and thus is utilized in many personal care products. That is why zinc stearate is a common additive for w/o emulsions, because it has the ability to inhibit phase separation by controlling viscosity. In addition, zinc stearate and zinc myristate are also used as adhesion enhancers in face powders [1].

Conclusion

Zn compounds are widely used in cosmetic formulations and are often included as active or supportive ingredients in a wide range of formulations. The continuing popularity of cosmetics, which are based on Zn compounds, attests to their excellent biological properties and good skin tolerance. Two of the most important properties offered by Zn compounds are their antimicrobial and antioxidative effects, which allow treatment of skin ailments, including acne, dandruff, dermatitis, psoriasis, eczema or diaper rash. The anti-acne, anti-odour and anti-dandruff properties are derived from its antimicrobial activity, whereas the anti-inflammatory, anti-pigmentation, sunscreens properties from its antioxidative potential. In turn, these latter properties combine to anti-ageing activity.

The most widely used Zn compound in personal care formulations is zinc oxide. It possesses a variety of beneficial UV-protective, anti-acne, antibacterial, astringent, anti-odour and anti-inflammatory properties for skin, among others. In coloured cosmetics, it is used for whitening cosmetic products as an addition to powders and fluids. ZnO is non-toxic, non-sensitizing and bio-safe ingredient. However, it occurs to be hazardous to inhale ZnO nanoparticles fumes [26]. The most promising Zn compound seems to be Zn-glycine complex as it displays a wide spectrum of biological activity, but is not toxic and does not cause skin irritation. The stabilizing and cleansing properties of the mentioned Zn salts are generally associated with the properties of the anions, but Zn²⁺ ions were most probably selected as cations in these salts because of their positive impact on skin, that is their lack of toxicity and irritation.

Acknowledgements

This work was supported by the Medical University of Lodz under Grant 503/3-066-02/503-31-001. The authors thank Dr Maria Kasprzak for helpful proofreading of the manuscript.

References

1. Frydrych, A., Arcf, J. and Kautura, K. Zinc: a critical importance element in cosmetology. *J. Appl. Cosmetol.* **22**, 1–13 (2004).
2. Nisran, Y.R. and Cohen, A.D. Zinc in skin pathology and care. *J. Dermatol. Treat.* **17**, 205–210 (2006).
3. Krishnamurthy, V.M., Kaulman, G.K., Urbach, A.R., Githin, L. and Gudiksen, K.L., Weibel, D.B. and Whitesides, G.M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem. Rev.* **108**, 946–1051 (2008).
4. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). 2014. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. *EFSA Journal* **12**, 3844 (2014).
5. Harceloux, D.G. Zinc. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **37**, 279–292 (1999).
6. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from

- the Commission on certain bioglycinates and glycinate nicotinate as sources for copper, zinc, calcium, magnesium and chromium. *The EFSA Journal* **7**, 1–266 (2008).
7. Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Courval, R., Bouvier, D. and Bokinger, M.-A. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloid Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **457**, 263–274 (2014).
 8. Masaki, H. Possible use of zinc ions for anti-pigmentation and anti-wrinkling skin care. *Yakugaku Zasshi* **132**, 261–269 (2012).
 9. Fortes, A.D., Howard, C.M., Wood, I.G. and Gutmann, M.J. Glycine zinc sulfate pentahydrate: redetermination at 10 K from time-of-flight neutron laue diffraction. *Acta Cryst. E72*, 1438–1445 (2016).
 10. Tepavtcharov, S., Havlíček, D., Matulková, I. et al. New zinc-glycine-iodide complexes as a product of equilibrium and non-equilibrium crystallization in the $\text{Gly-ZnI}_2\text{-H}_2\text{O}$ system. *J. Mol. Struct.* **1120**, 42–49 (2016).
 11. Rostan, E.F., DeBays, H.V., Mackey, D.L. and Pinnell, S.R. Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *Int. J. Dermatol.* **41**, 606–611 (2002).
 12. Lansdown, A.B., Miraschipski, U., Stubbs, N., Scanlon, E. and Agren, M.S. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen* **15**, 2–16 (2007).
 13. Prydyrzh, A., Aret, J. and Kastura, K. Antioxidative role of metals in the skin. *J. Appl. Cosmetol.* **26**, 143–157 (2008).
 14. Prasad, A.S. Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent: its role in human health. *Front. Nutr.* **1**, 1–10 (2014).
 15. Gupta, M., Mahajan, V.K., Mehta, K.S. and Chauhan, P.S. Zinc therapy in dermatology: a review. *Dermatol. Res. Pract.* **2014**, 11 (2014) Article ID 709152.
 16. Sakurai, H., Yasui, H., Yamada, Y., Nishimura, H. and Shigemoto, M. Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection. *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 715–720 (2005).
 17. Sakurai, H., Yasui, Y. and Mishina, K. Protective effect of zinc ion on ultraviolet light-induced skin damage: studies on imaging of ROS by chemiluminescence method. *Biomol. Res. Trace Elem.* **14**, 17–21 (2013).
 18. Chien, X.X., Zafra-Stone, S., Bagchi, M. and Bagchi, D. Bioavailability, antioxidant and immune-enhancing properties of zinc methionine. *BioFactors* **27**, 231–244 (2006).
 19. Masaki, H., Ochiai, Y., Okano, Y. et al. A zinc(II)-glycine complex is an effective inducer of metallothionein and removes oxidative stress. *J. Dermatol. Sci.* **45**, 73–75 (2007).
 20. Ma, W., Niu, H., Feng, J. and Wang, Y. Effects of zinc glycine chelate on oxidative stress, contents of trace elements, and intestinal morphology in broilers. *Biol. Trace Elem. Res.* **142**, 546–556 (2011).
 21. Yue, M., Fang, S.L., Zhuo, Z., Li, D.D. and Feng, J. Zinc glycine chelate absorption characteristics in Sprague Dawley rat. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **99**, 457–464 (2015).
 22. Kwiecień, M., Winiarska-Mieczan, A., Miśkiewicz, A. and Klebanek, R. Biological response of broiler chickens to decreasing dietary inclusion levels of zinc glycine chelate. *Biol. Trace Elem. Res.* **175**, 204–213 (2017).
 23. Huang, D., Hu, Q., Fang, S. and Feng, J. Dosage effect of zinc glycine chelate on zinc metabolism and gene expression of zinc transporter in intestinal segments on rat. *Biol. Trace Elem. Res.* **171**, 363–370 (2016).
 24. Smija, T.G. and Pavel, S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotech. Sci. Appl.* **4**, 95–112 (2011).
 25. Kim, K.H., Kim, Y.W., Lim, S.K. et al. Risk assessment of zinc oxide, a cosmetic ingredient used as a UV filter of sunscreens. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* **20**, 155–182 (2017).
 26. <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R1413&to=EN>
 27. Dayem, A.A., Hossain, M.K., Lee, S.B. et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 120 (2017).
 28. Ali, S.S., Morry, R., El-Zawawy, N.A., Fareed, M.F. and Reda, M. Synthesized zinc peroxide nanoparticles ($\text{ZnO}_2\text{-NPs}$): a novel antimicrobial, anti-elastase, anti-keratinase, and anti-inflammatory approach toward polymicrobial burn wounds. *Int. J. Nanomed.* **12**, 6059–6073 (2017).
 29. Safety Assessment of Zinc Salts as Used in Cosmetics. *Cosmetic Ingredient Review*. (2017). October 12.
 30. Mahoney, M.G., Brennan, D., Starcher, B., Faryniarz, J., Ramirez, J., Parr, L. and Uitto, J. Extracellular matrix in cutaneous aging: the effects of 0.1% copper-zinc malonate-containing cream on elastin biosynthesis. *Exp. Dermatol.* **18**, 205–211 (2009).
 31. Dreno, B., Bouk, P., Reynaud, A., Moyse, D., Habert, H. and Richet, H. Effect of zinc gluconate on propionibacterium acnes resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: in vitro and in vivo study. *Br. J. Dermatol.* **15**, 152–155 (2005).
 32. Bae, J.Y. and Park, S.N. Evaluation of antimicrobial activities of ZnO , citric acid and a mixture of both against *Propionibacterium acnes*. *Int. J. Cosmet. Sci.* **38**, 550–557 (2016).
 33. Chan, H., Chan, G., Santos, J., Dee, K. and Co, J.K. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to determine the efficacy and safety of lactoferrin with vitamin E and zinc as an oral therapy for mild to moderate acne vulgaris. *Int. J. Dermatol.* **56**, 686–690 (2017).
 34. Atmaca, S., Gul, K. and Cicek, R. The effect of zinc on microbial growth. *Br. J. Med. Sci.* **28**, 595–597 (1998).
 35. Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M. and Yock, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofibers). *J. Nanopart. Res.* **9**, 479–489 (2007).
 36. Xia, T., Korochich, M., Dong, M. et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* **2**, 2121–2134 (2008).
 37. Raghupathi, K.R., Koodali, R.T. and Manna, A.C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle. *Langmuir* **27**, 4020–4028 (2011).
 38. Jones, N., Ray, B., Ranjit, K.T. and Manna, A.C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**, 71–76 (2008).
 39. Adams, L.K., Lyon, D.Y. and Alvares, P.J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO_2 , SiO_2 and ZnO water suspensions. *Water Res.* **40**, 3527–3532 (2006).
 40. Reeder, N.L., Xu, J., Youngquist, R.S., Rust, R.C. and Saunders, C.W. The antifungal mechanism of action of zinc pyrithione. *Br. J. Dermatol.* **165**(Suppl 2), 9–12 (2011).
 41. Chen, G., Miao, M., Hopcraft, M., Fei, X., Collins, L.Z., Jones, A. and Janice, H.-G. Sensitive and simultaneous quantification of zinc pyrithione and climbazole deposition from anti-dandruff shampoo onto human scalp. *J. Chromatogr. B* **1003**, 22–26 (2015).
 42. Turner, G.A., Matheson, J.R., Li, G.-Z., Fei, X.-Q., Zhu, D. and Baines, F.L. Enhanced efficacy and sensory properties of an anti-dandruff shampoo containing zinc pyrithione and climbazole. *Int. J. Cosmet. Sci.* **35**, 78–83 (2013).
 43. Ermolayeva, E. and Sanders, D. Mechanism of pyrithione-induced membrane depolarization in *Neutropora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3385–3390 (1995).

44. Chandler, C.J. and Segel, I.H. Mechanism of the antimicrobial action of pyrrithione: effects on membrane transport, ATP levels, and protein synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 60–68 (1978).
45. Yasokawa, D., Murata, S., Iwahashi, Y., Kitaqawa, R., Kishi, K., Okamura, Y. and Iwahashi, H. DNA microarray analysis suggests that zinc pyrrithione causes iron starvation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **285**, 479–486 (2010).
46. Pittel, M., Tomachek, I.D., Simões, D.N., Ribeiro, V.P. and Santana, R.M.C. Antimicrobial performance of thermoplastic elastomers containing zinc pyrrithione and silver nanoparticles. *Mater. Res.* **20**, 1266–1273 (2017).
47. Sonia, S., Linda, J.K.H., Ruckmani, K. and Shukumar, M. Antimicrobial and antioxidant potentials of biosynthesized colloidal zinc oxide nanoparticles for a footbed cold cream formulation: A potent nanocosmeceutical application. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 581–589 (2017).
48. Nikolov, A. and Ganchev, D. Effect of zinc undecylenates on plant pathogenic fungi. *Bulg. J. Agricul. Sci.* **16**, 220–226 (2010).
49. Proebe, C., Simone, A., Charig, A. and Eigen, E. Axillary malodor production: A new mechanism. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **41**, 173–185 (1990).
50. Kuhn, H., Müller, F., Peggau, J. and Telom, R. Mechanism of the odor-absorption effect of zinc ricinoleate. A molecular dynamics computer simulation. *J. Surfact. Deterg.* **3**, 335–343 (2000).
51. Ballarín, R., Mignani, A., Mogavero, F., Gabbanini, S. and Morigi, M. Hybrid material based on ZnAl hydrotalcite and silver nanoparticles for deodorant formulation. *Appl. Clay Sci.* **114**, 303–308 (2015).
52. Sharqut, K.E., Noumi, A.A. and Hameed, S.D. Topical 15% zinc sulfate solution is an effective therapy for feet odor. *J. Cosmet., Dermatol. Sci. Appl.* **3**, 203–208 (2013).

Oświadczenia kandydata ubiegającego się o nadanie stopnia doktora

Załącznik nr 4
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi



Michał Abendrot

(imię i nazwisko Kandydata)

Łódź, *20.02.2021*

**PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU***

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Świadomy/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że prezentowana przeze mnie rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w żadnej wyższej uczelni, instytucie badawczym i/lub jednostce badawczo-rozwojowej.

20.02.2021, Michał Abendrot
(data i podpis Kandydata)

* niewłaściwe skreślić

Oświadczenia współautorów

Łódź, 17.02.2021

mgr farm. Michał Abendrot
Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że:

w pracy „Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations” autorstwa Michała Abendrot, Elżbiety Płuciennik, Aleksandry Felczak, Katarzyny Zawadzkiej, Eweliny Piątczak, Piotra Nowaczyka oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis, opublikowanej w Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 1641; <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>

mój udział obejmował: współudział w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzenie syntez kompleksów na potrzeby pracy, przygotowanie formułacji dermatologicznych i próbek na badania tych preparatów, wykonanie badań fizykochemicznych preparatów dermatologicznych, interpretację i opis wyników badań w zakresie: badań fizykochemicznych, czystości mikrobiologicznej i ochrony przeciwdrobnoustrojowej, współudział w finalnej korekcie manuskryptu. Swój udział w pracy szacuję na 55%.

w pracy „Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity” autorstwa Michała Abendrot, Lilianny Chęcińskiej, Joachima Kusza, Katarzyny Lisowskiej, Katarzyny Zawadzkiej, Aleksandry Felczak oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis, opublikowanej w Molecules 2020, 25, 951.; <https://doi.org/10.3390/molecules25040951>

mój udział obejmował: współudział w opracowywaniu koncepcji badań, wyszukiwanie literatury naukowej do stworzenia publikacji, przeprowadzenie doświadczeń w zakresie syntezy i charakterystyki kompleksów cynku, współautorstwo manuskryptu w zakresie syntezy i charakterystyki oraz współudział w jego finalnej korekcie. Swój udział w pracy szacuję na 45%.

w pracy „Zinc-containing compounds for personal care applications” autorstwa Michała Abendrot oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis, opublikowanej w Int. J. Cosmet. Sci. 2018 ,40, 319-327; <https://doi.org/10.1111/ics.12463>

mój udział obejmował: współudział w opracowaniu planu pracy i wyszukiwaniu literatury naukowej, współautorstwo manuskryptu. Swój udział w pracy szacuję na 65%.

Podpis


Dr hab. n. farm. Urszula Kalinowska-Lis, prof. UM

Łódź, dn. 19.02.2021r.

Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Oświadczam, że:

w pracy „Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations” autorstwa Michała Abendrot, Elżbiety Płuciennik, Aleksandry Felczak, Katarzyny Zawadzkiej, Eweliny Piątczak, Piotra Nowaczyka oraz **Urszuli Kalinowskiej-Lis**, opublikowanej w *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1641; <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, planowaniu poszczególnych etapów badań, nadzorze merytorycznym nad pracą, współautorstwie manuskryptu i wykonaniu jego finalnej korekty, pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego oraz rozwiązywaniu problemów naukowo-badawczych poruszonych przez recenzentów.

w pracy „Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity” autorstwa Michała Abendrot, Lilianny Chęcińskiej, Joachima Kusza, Katarzyny Lisowskiej, Katarzyny Zawadzkiej, Aleksandry Felczak oraz **Urszuli Kalinowskiej-Lis**, opublikowanej w *Molecules* **2020**, *25*, 951.; <https://doi.org/10.3390/molecules25040951>

mój udział polegał na współtworzeniu koncepcji badań, nadzorze merytorycznym nad przeprowadzonymi doświadczeniami w zakresie syntezy i charakterystyki kompleksów cynku, współautorstwie manuskryptu i wykonaniu jego finalnej korekty, pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego oraz rozwiązywaniu problemów naukowo-badawczych poruszonych przez recenzentów.

w pracy „Zinc-containing compounds for personal care applications” autorstwa Michała Abendrot oraz **Urszuli Kalinowskiej-Lis**, opublikowanej w *Int. J. Cosmet. Sci.* **2018**, *40*, 319-327; <https://doi.org/10.1111/ics.12463>

mój udział polegał na współudziale w opracowaniu planu pracy i wyszukiwaniu literatury naukowej, współautorstwie manuskryptu, wykonaniu finalnej korekty pracy, pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego. W niniejszej pracy udział pierwszego autora (M. Abendrot) był dominujący.

Urszula Kalinowska-Lis

Dr Aleksandra Felczak

Łódź, dn. 08.02.2021r.

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations” autorstwa Michała Abendrot, Elżbiety Płuciennik, Aleksandry Felczak, Katarzyny Zawadzkiej, Eweliny Piątczak, Piotra Nowaczyka oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1641. <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: przeprowadzenie eksperymentów mających na celu określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków oraz opis otrzymanych wyników.



Dr Aleksandra Felczak

Łódź, dn. 25.01.2021r.

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity” autorstwa Michała Abendrot, Lilianny Chęcińskiej, Joachima Kusza, Katarzyny Lisowskiej, Katarzyny Zawadzkiej, Aleksandry Felczak oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Molecules* **2020**, *25*, 951; <https://doi.org/10.3390/molecules25040951>.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: przeprowadzenie eksperymentów mających na celu określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków oraz opis otrzymanych wyników.



Dr Katarzyna Zawadzka

Łódź, dn. 25.01.2021r.

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity” autorstwa Michała Abendrot, Lilianny Chęcińskiej, Joachima Kusza, Katarzyny Lisowskiej, Katarzyny Zawadzkiej, Aleksandry Felczak oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Molecules* **2020**, *25*, 951; <https://doi.org/10.3390/molecules25040951>.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: przeprowadzenie eksperymentów mających na celu określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków oraz charakterystykę wykorzystanych metod.

Katarzyna Zawadzka

Dr Katarzyna Zawadzka

Łódź, dn. 08.02.2021r.

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations” autorstwa Michała Abendrot, Elżbiety Płuciennik, Aleksandry Felczak, Katarzyny Zawadzkiej, Eweliny Piątczak, Piotra Nowaczyka oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1641. <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: przeprowadzenie eksperymentów mających na celu określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków oraz opis wykorzystanych metod.



Chorzów, dn. 25.01.2021r.

Prof. dr hab. Joachim Kusz
Uniwersytet Śląski
Instytut Fizyki
75 Pułku Piechoty 1
41-500 Chorzów

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity” autorstwa Michała Abendrot, Lilianny Chęcińskiej, Joachima Kusza, Katarzyny Lisowskiej, Katarzyny Zawadzkiej, Aleksandry Felczak oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Molecules* **2020**, *25*, 951; <https://doi.org/10.3390/molecules25040951>.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował wykonanie rentgenowskich pomiarów strukturalnych dla czterech kompleksów cynku z aminokwasami.



Prof. dr hab. Katarzyna Lisowska

Łódź, 12.02.2021r.

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity” autorstwa Michała Abendrot, Lilianny Chęcińskiej, Joachima Kusza, Katarzyny Lisowskiej, Katarzyny Zawadzkiej, Aleksandry Felczak oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Molecules* 2020, 25, 951; <https://doi.org/10.3390/molecules25040951>.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: dyskusję wyników badań mikrobiologicznych, korektę powstałego manuskryptu.



Łódź, dn. 25.01.2021r.

dr hab. Lilianna Chęcińska, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Chemii
Katedra Chemii Fizycznej
ul. Pomorska 163/165
90-236 Łódź

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity” autorstwa Michała Abendrot, Lilianny Chęcińskiej, Joachima Kusza, Katarzyny Lisowskiej, Katarzyny Zawadzkiej, Aleksandry Felczak oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Molecules* **2020**, 25, 951; <https://doi.org/10.3390/molecules25040951>.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował wykonanie badań strukturalnych opartych na rentgenowskiej analizie monokryształów dla czterech kompleksów cynku z aminokwasami oraz przygotowaniu materiału krystalograficznego do publikacji.

L. Chęcińska

Dr hab. n. farm. Ewelina Piątczak

Łódź, dn. 08.02.2021r.

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

Umed Łódź

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations” autorstwa Michała Abendrot, Elżbiety Płuciennik, Aleksandry Felczak, Katarzyny Zawadzkiej, Eweliny Piątczak, Piotra Nowaczyka oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1641. <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował wykonanie i interpretację analizy statystycznej otrzymanych wyników.

Ewelina Piątczak

Opole, 17.02.2021

dr n. biol. Piotr Nowaczyk
Katedra Nauk o Zdrowiu,
Uniwersytet Opolski,
Katowicka 68, 45-069 Opole

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy:

Abendrot, M., Płuciennik, E., Felczak, A., Zawadzka, K., Piątczak, E., Nowaczyk, P., & Kalinowska-Lis, U. (2021). Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1641. <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>

przedstawia się jak poniżej:

wykonanie badań czystości mikrobiologicznej zgodnie z normami ISO dla produktów kosmetycznych, ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej zgodnie z wymaganiami Farmakopei Europejskiej 10.0.

Podpis
Piotr Nowaczyk


Dr hab. n med. Elżbieta Płuciennik

Zakład Kancerogenezy Molekularnej

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, dn. 08.02.2021r.

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu „Zinc(II) Complexes of Amino Acids as New Active Ingredients for Anti-Acne Dermatological Preparations” autorstwa Michała Abendrot, Elżbiety Płuciennik, Aleksandry Felczak, Katarzyny Zawadzkiej, Eweliny Piątczak, Piotra Nowaczyka oraz Urszuli Kalinowskiej-Lis. Artykuł opublikowano w *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 1641. <https://doi.org/10.3390/ijms22041641>

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: wykonanie eksperymentu oceny wpływu związków cynku na cytotoksyczność komórek fibroblastów i keratynocytów oraz analizie wyników.

Adiunkt
Zakładu Kancerogenezy Molekularnej
Katedry Medycyny Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Elżbieta Płuciennik
dr hab. n. med. Elżbieta Płuciennik

Całkowity dorobek naukowy

Całkowity IF (ISI Journal Citation Reports) wszystkich publikacji zgodny z rokiem opublikowania jest równy **9,304**, zaś punktacja MNiSW wynosi **293** punktów MNiSW.

Wykaz wszystkich publikacji punktowanych wraz z analizą bibliometryczną



Łódź, 22-02-2021

JM01.545.19.2021

Spis publikacji – mgr farm. Michał Abendrot

Punktacja została wykonana na podstawie spisu publikacji przedstawionego przez osobę zainteresowaną, przy użyciu list Impact Factor i MNiSW za rok publikacji artykułu.

Łącznie 11 cytowań (10 bez autocytowań), indeks Hirscha wynosi 2 (Źródło: ISI Web of Science Core Collection).
Łącznie 15 cytowań (12 bez autocytowań), indeks Hirscha wynosi 2 (Źródło: Scopus).

Punktacja wg list MNiSW oraz współczynnik impact factor prac umieszczonych w dysertacji:

Prace	1 autor? T/N	IF z roku publ	MNiSW z roku publ	Typ publ
Abendrot M., Phucienik E., Felczak A., Zawadzka K., Piątczak E., Nowaczyk P. and Urszula Kalinowska-Lis. Zinc(II) complexes of amino acids as new active ingredients for anti-acne dermatological preparations. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(4), 1641; https://doi.org/10.3390/ijms22041641 - IF (2019)= 4,556; 5-Year IF (2019)= 4,653; 140 pkt MNiSW (2019)	t	4,556	140	oryginal
Abendrot M., Chęcińska L., Kusz J., et al. Zinc(II) Complexes with Amino Acids for Potential Use in Dermatology: Synthesis, Crystal Structures, and Antibacterial Activity. Molecules 2020, 25(4), 951; https://doi.org/10.3390/molecules25040951 IF (2019)= 3,267; 5-Year IF (2019)= 3,589; 100 pkt MNiSW (2019)	t	3,267	100	oryginal
Abendrot M., Kalinowska-Lis U. Zinc-containing compounds for personal care applications. Int J Cosmet Sci. 2018 Aug;40(4):319-327. doi: 10.1111/ics.12463 IF (2018)= 1,481; 5-Year IF (2018)= 1,928; 20 pkt MNiSW (2018); 70 pkt MNiSW (2019)	t	1,481	20	poglądowa
SUMA		9,304	260	

Punktacja wg list MNiSW oraz współczynnik impact factor pozostałych prac wchodzących do dorobku:

Prace	1 autor? T/N	IF z roku publ	MNiSW z roku publ	Typ publ
Punkty przypisane wg. List Impact Factor i MNiSW z roku publikacji artykułu				
Abendrot M., Merks P., Kalinowska-Lis U.: Opieka farmaceutyczna – witaminy i minerały, informacje niezbędne farmaceutom w prawidłowej opiece nad pacjentem. Farm Pol, 2019, 75 (9): 510–518. 20 pkt. MNiSW (2019)	t	brak	20	poglądowa
Abendrot M., Świeczkowski D., Krysiński J., Merks P.: Problemy współczesnej farmacji w Niemczech na przykładzie apteki szpitalnej. Farm Pol, 2016, 72(1): 3–7. -8 pkt. MNiSW (2016)	t	brak	8	poglądowa
Abendrot M. Depresja jako choroba i problem społeczny. Gabinet Prywatny 04/2013. 5pkt MNiSW (2016)	t	brak	5	poglądowa
SUMA		0	33	

mgr Ewa Fidelus
Oddział Bibliografii i Bibliometrii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
punktacja@umed.lodz.pl

Wykaz pozostałych artykułów

1. Abendrot M. Środki powierzchniowo czynne stosowane w produktach dla dzieci. Świat Przemysłu Kosmetycznego. 01/2017
2. Abendrot M. Opakowania szklane. Świat Przemysłu Kosmetycznego. 01/2018
3. Abendrot M. Pielęgnacja skóry wrażliwej. Świat Przemysłu Kosmetycznego. 03/2018
4. Abendrot M. Peelingi chemiczne w medycynie estetycznej. Chemia i Biznes. 01/2017
5. Abendrot M. Możliwości regulowania wydzielania sebum. Chemia i Biznes. 03/2017
6. Abendrot M. Silikony w kosmetyce. Chemia i Biznes. 04/2017
7. Abendrot M. Cera trądzikowa – porównanie skóry mężczyzn i kobiet. Chemia i Biznes. 02/2018
8. Abendrot M. Rozwiązania do pielęgnacji brody i wąsów. Chemia i Biznes. 03/2018
9. Abendrot M. Co zmieni się po 1 lipca 2019 roku? Dokument techniczny do Rozporządzenia Komisji (UE) nr 655/2013 z dnia 10 lipca 2013 r. Chemia i Biznes. 2/2019

10. Abendrot M. Hipoalergicznosc w ujęciu naukowo-marketingowym. *Chemia i Biznes*. 03/2019
11. Abendrot M. Analiza wpływu niebieskiego światła na skórę - nowe wyzwanie dla branży kosmetycznej. *Przemysł Farmaceutyczny*. BMP 6/2018
12. Abendrot M. Jakie zmiany przyniesie dokument techniczny do rozporządzenia 655/2013 w kontekście oświadczeń typu „nie zawiera”. *Przemysł Farmaceutyczny*. BMP 1/2019
13. Abendrot M. Produkty hipoalergiczne w świetle dokumentu technicznego. *Przemysł Farmaceutyczny*. BMP 3/2019
14. Abendrot M. W walce z niedoborem magnezu. *Manager Apteki*. 7/2012.