

Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u farmaceutskoj industriji

Stipić, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:280030>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2021.

Antonia Stipić

1027/MB

**PRIMJENA
NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA U
FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Radošević u sklopu projekta: „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“ (HRZZ IP-2019-04-7712).

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević na neizmjernej pomoći, razumijevanju i motivaciji tijekom pisanja diplomskog rada. Hvala što ste izvukli najbolje iz mene, probudili želju za istraživanjem i toplim riječima me usmjerili u bolje sutra.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

Antonia Stipić, 1027/MB

Sažetak: Porast globalne ekološke svijesti značajno je utjecao na razvoj područja zelene kemije u sklopu kojega su od velikog interesa istraživanja o sintezi, svojstvima i primjeni niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Niskotemperaturna eutektička otapala su zbog svoje niske toksičnosti, biorazgradivosti i jednostavne pripreme istisnula svoje prethodnike, ionske kapljvine te se smatra da su pogodnija „zelena“ zamjena za štetna organska otapala. Niskotemperaturno eutektičko otapalo dobiva se miješanjem dviju ili više komponenata pri čemu dolazi do smanjenja tališta smjese u odnosu na ishodišne komponente i tekuće je pri sobnoj temperaturi. Navedena otapala su našla svoju primjenu u kemijskoj industriji, ekstrakciji organskih spojeva, biokatalizi, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, itd. Za farmaceutsku industriju jedan od najvećih problema, ali i izazova, je slaba topljivost i loša permeabilnost djelatnih farmaceutskih tvari što se nastoji riješiti raznim tehnikama i pristupima, od kojih je jedna primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Navedena otapala istražuju se prvenstveno kao otapala za otapanje djelatne farmaceutske tvari te za sintezu tzv. terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala kojima je jedna od komponenti djelatna farmaceutska tvar. U ovom radu dan je pregled sinteze i svojstava niskotemperaturnih eutektičkih otapala te njihova podjela. Također su navedene mogućnosti razvoja novih formulacija djelatnih farmaceutskih tvari niske topljivosti i permeabilnosti u kombinaciji s niskotemperaturnim eutektičkim otapalima sa ciljem povećanja njihove biodostupnosti.

Ključne riječi: djelatna farmaceutska tvar, niskotemperaturno eutektično otapalo, permeabilnost, terapijsko niskotemperaturno eutektičko otapalo, topljivost

Rad sadrži: 52 stranice, 11 slika, 129 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr.sc. Kristina Radošević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević
3. doc. dr. sc. Teuta Murati
4. izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetić (zamjena)

Datum obrane: 8. ožujka 2021

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

APPLICATION OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Antonia Stipić, 1027/MB

Abstract: The rise of global ecological awareness has significantly influenced the development of the field of green chemistry, within which research on the synthesis, properties and application of deep eutectic solvents is of great interest. Due to their low toxicity, biodegradability and simple preparation, deep eutectic solvents have surpassed their predecessors, ionic liquids, and are considered to be a more suitable "green" substitute for harmful organic solvents. Deep eutectic solvent is obtained by mixing two or more components whereby the melting point of the mixture decreases in comparison to the starting components and it is liquid at room temperature. Hence, these solvents have found their application in the chemical industry, extraction of organic compounds, biocatalysis, food and pharmaceutical industry, etc. For the pharmaceutical industry, one of the biggest problems, but also challenges, is the low solubility and poor permeability of active pharmaceutical substances, which is sought to be solved by various techniques and approaches, among others by the use of deep eutectic solvents. The deep eutectic solvents are primarily investigated as a solvents for dissolving the active pharmaceutical substance and later in the synthesis of so-called therapeutic deep eutectic solvents, in which one of the components is active pharmaceutical ingredient. Therefore, this graduation thesis presents an overview on the synthesis and properties of deep eutectic solvents as well as the possibility for a development of new formulations of active pharmaceutical ingredients of low solubility and permeability in combination with deep eutectic solvents with the aim of increasing their bioavailability.

Keywords: *active pharmaceutical ingredient, deep eutectic solvents, permeability, therapeutic deep eutectic solvents, solubility*

Thesis contains: 52 pages, 11 figures, 129 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Kristina Radošević, Associate professor

Reviewers:

1. PhD Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
2. PhD Kristina Radošević, Associate professor
3. PhD Teuta Murati, Assistant professor
4. PhD Ivana Kmetič, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 8 March 2021

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA.....	4
2. 1. 1. Metode pripreme DES-a.....	6
2. 1. 2. Fizikalno-kemijska svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala	8
2. 1. 3. Citotoksičnost DES-a	10
2.2. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA	12
2.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva.....	14
2.2.2. Budućnost zelenih otapala u području ekstrakcije biološki aktivnih spojeva	18
2.3. TERAPEUTSKA NISKOTEMPERATURNA EUTEKTIČKA OTAPALA	18
2.4. SVOJSTVA FARMACEUTSKI AKTIVNIH TVARI	24
2.4.1. Topljivost.....	25
2.4.2. Permeabilnost	29
2.4.2.1. PAMPA test.....	30
2.4.2.2. Stanična metoda za određivanje permeabilnosti	33
2.4.3. Biodobrenje	37
3. ZAKLJUČCI	39
4. LITERATURA	40

1. UVOD

Niskotemperaturna eutektička otapala su mješavine dvije ili više jeftinih, obnovljivih i biorazgradivih komponenata, od kojih je jedna najčešće sol kolin-klorida, te su zbog svoje lakoće pripreme, niske cijene, kemijske inertnosti s vodom, biorazgradivosti iz upotrebe gotovo istisnule ionske kapljevine (Paiva i sur., 2014). Glavna prednost niskotemperaturnih eutektičkih otapala proizlazi iz njihovog sastava, budući da interakcije vodikovih veza između sastavnih komponenata utječu na smanjenje tališta mješavine zbog čega su niskotemperaturna eutektička otapala najčešće u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi (Aroso i sur, 2015). Kako se najčešće smjesa sastoji od molekula prirodno prisutnih u prirodi kao što je to slučaj kod prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala karakterizira ih niska toksičnost (Dai i sur., 2013a).

Dodavanjem farmaceutski aktivne stvari u sastav niskotemperaturnih eutektičkih otapala dobije se terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo sa izraženim bioaktivnim komponentama zbog čega se sve više radi na dizajnu novih terapeutskih otapala. Prednost ovih otapala veliki je prinos u kojem nema gubitaka zahvaljujući jednostavnoj pripremi koja ne zahtijeva daljnje korake pročišćavanja (Paiva i sur., 2014) što olakšava scale – up procesa, a posebice njegovu primjenu u farmaceutskoj industriji (Schultheiss i Newman, 2009). Budući da biodostupnost farmaceutski aktivne tvari ovisi ponajviše o topljivosti i permeabilnosti aktivne tvari, upotreba niskotemperaturnih eutektičkih otapala u kompleksu sa farmaceutski aktivnom tvari jedan je od istraživanijih pristupa u mehanizma dobave djelatne tvari do ciljanih stanica i tkiva (Kawabata i sur., 2011).

Biofarmaceutski klasifikacijski sistem klasificira farmaceutski aktivne tvari u 4 kategorije ovisno o topljivosti i permeabilnosti svake te je postao temelj za određivanje primijenjenih doza djelatnih tvari (Amidon i sur., 1995). Kako bi se prevladao problem niske topljivosti i male permeabilnosti koriste se metode za njihove povećanje u svrhu postizanja veće biodostupnosti, od kojih se za povećanje permeabilnosti najčešće koristi PAMPA test, a za ispitivanje citotoksičnosti i permeabilnosti farmaceutskih aktivnih tvari i niskotemperaturnih eutektičkih otapala najčešće se koriste stanične linije Caco -2. Cilj ovog diplomskog rada je dati teorijski pregled svojstava niskotemperaturnih eutektičkih otapala, njihove podjele i primjene s naglaskom na primjenu u farmaceutskoj industriji za razvoj novih formulacija djelatnih farmaceutskih tvari niske topljivosti i permeabilnosti kako bi se u konačnici povećala njihova biodostupnost.

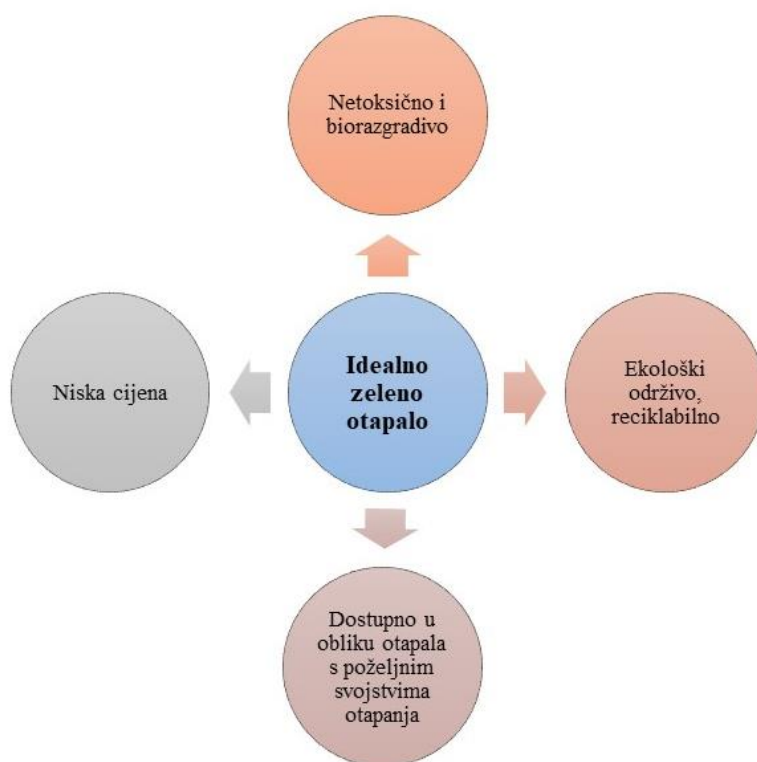
2. TEORIJSKI DIO

Posljednjih godina, sveukupno čovječanstvo, ali i svjetske vlade i vodstva raznih tvrtki svjesne su ugroženosti opstanka planeta te je dizajn ekološki prihvatljivih otapala u području zelene kemije pronašao strateško mjesto u raznim smjernicama i strategijama razvoja. Kao dio strategije održivog razvoja ističe se područje zelene kemije, definirane kao grana kemije koja proučava dizajn kemijskih procesa i produkata u pokušaju potpunog uklanjanja ili smanjenja upotrebe i stvaranja opasnih tvari (Anastas i Warner, 2007). Najvažniji aspekt zelene kemije karakterizira sintezu i molekularni dizajn koji teži smanjenju nepovoljnih učinaka na okoliš, što se postiže održivošću proizvoda na molekularnom nivou stoga nije čudno da su principi zelene kemije svoju primjenu našli u svim sektorima industrije, od automobilske, kozmetičke i farmaceutske industrije, te u agronomiji i aeronautici (Office of Pollution Prevention and Toxics, 2009).

Prije više od 20 godina, kemičari Paul Anastas i John Warner predstavili su dvanaest principa zelene kemije koji su postali okosnica za dizajn novih kemijskih proizvoda i procesa, a primjenjivi su u svim fazama proizvodnje od polaznih sirovina, učinkovitosti procesa, toksičnosti te biorazgradivosti korištenih otapala i dobivenih proizvoda (Tang i sur., 2005). Principi zelene kemije temelje se na pravilima koja osiguravaju održivost proizvodnje u svim fazama, od postizanja ekonomičnosti atoma (engl. *Atom Economy*) kojom se definira pregrupiranje svih atoma početnog reaktanta u konačni produkt čime se sprječava nastanak otpada i manje štetne kemijske sinteze. Potiče se dizajn sigurnijih i manje toksičnih otapala, korištenje minimalno potrebne količine energije za proces, korištenje obnovljivih izvora kad god je to moguće, smanjenje upotrebe derivata ukoliko nisu potrebni u završnim koracima, prednost upotrebe katalitičkih reagensa kad je to moguće, dizajn produkta koji se nakon upotrebe razgrađuju i ne čine otpad u okolišu, pravovremena analiza i reakcija za sprječavanje gomilanja otpada te sprječavanje mogućih nesreća, eksplozija i požara (Anastas i Eghbali, 2009).

Razvoj i dizajn ekološki prihvatljivih otapala, ili kako se često nazivaju „zelena“ otapala, čine značajni dio istraživanja u području zelene kemije. Zelena otapala moraju zadovoljiti određene kriterije poput jednostavne i energetske ne zahtjevne sinteze, niske cijene, dostupnosti, biorazgradivosti, mogućnosti ponovne upotrebe, nezapaljivosti, niske toksičnosti te male hlapljivosti (Zhang i sur., 2012). Do sada je broj dostupnih zelenih otapala bio prilično ograničen, a u zadnja dva-tri desetljeća intenzivno se istražuju ionske kapljevine (engl. *Ionic*

liquids – IL) kao otapala koja su se prva istaknula u tom području. Pretpostavljena je vrlo široka mogućnost njihove primjene u različitim industrijskim poljima upravo zbog svojstava poput nezapaljivosti, ne hlapljivosti, mogućnosti recikliranja i stabilnost strukture, no nakon nekoliko godina istraživanja očekivanja su se promijenila. Najviše istraživane ionske kapljevine na bazi imidazola ili pirimidina ne odlikuju se niskom cijenom, čak štoviše, ona može 5 -20 puta nadmašiti cijenu uobičajenih organskih otapala, dok im je toksičnost jednaka ili čak veća od toksičnosti organskih otapala koje su trebale zamijeniti, a i odlikuje ih i izrazito niska biorazgradivosti što je dodatan problem (Cvjetko Bubalo i sur., 2014).



Slika 1. Svojstva zelenih otapala (prilagođeno prema Yangu i sur., 2019)

Zbog svega navedenog, znanstvenici su se okrenuli razvoju nove generacije otapala koja će objediniti sve prednosti ionskih kapljevine, a u isto vrijeme neće imati visoku cijenu i biti će minimalno štetne za okoliš kako je prikazano na slici 1. Ta se nova generacija otapala, koja se razvila kao alternativa ionskim kapljevinama i u početku se čak i klasificirala kao 4.-ta generacija ionskih kapljevine, naziva niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep eutectic*

solvents – DES) (Zhang i sur., 2012). Ova otapala su nazvana upravo tako kako bi se razlikovala od ionskih kapljevine koje se sastoje od iona, a izraz eutektička se odnosi na sastav smjese, odnosno na molarni udio tvari kojim se ostvaruje najniža točka tališta.

2.1. NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Niskotemperaturna eutektička otapala su zelena otapala koja nastaju miješanjem dvije ili više komponenata koje se nalaze u čvrstom stanju pri sobnoj temperaturi, ali kombinacija komponenata u određenom molarnom udjelu dovodi do značajnog pada tališta zbog čega otapalo postaje tekuće pri sobnoj temperaturi. Njihovo ime, etimološki, izvedenica je dvije grčke riječi, *ευ* (eu) i *τηξίς* (teksis) što znači lako topljenje, a niskotemperaturna označava pad temperature tališta smjese u odnosu na tališta pojedinačnih komponenata (Paiva i sur., 2014). Eutektička otapala sadrže velike, nesimetrične ione i imaju malu energiju kristalne rešetke (Abbott i sur., 2001). DES se sastoji od dvije ili tri ishodne komponente niske cijene i najčešće su same po sebi sigurne su za korištenje, a koje se povezuju vodikovim vezama pri čemu tvore eutektičku smjesu koja je tekuća pri temperaturama nižim od 150 °C, iako se najčešće spominje i razmatra njihovo tekuće stanje u području između sobne temperature i 70 °C.

Prema Smithu i suradnicima u radu iz 2014. struktura niskotemperaturnih eutektičkih otapala može se opisati općom formulom Cat^+X^-zY pri čemu je amonijev, sulfonijev ili fosfonijev kation u obliku Cat^+ , halogenid, X je Lewisova baza te oni zajedno u obliku Cat^+X^- predstavljaju akceptor vodikove veze (engl. *hydrogen bond acceptor*, HBA). Donor vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor*, HBD), Lewisova ili Brønstedova kiselina (Y) tvori kompleks s X^- , a unutar strukturne formule z označava broj molekula Y u kompleksu. Prema navedenom niskotemperaturna eutektička otapala najčešće se dijele na četiri vrste:

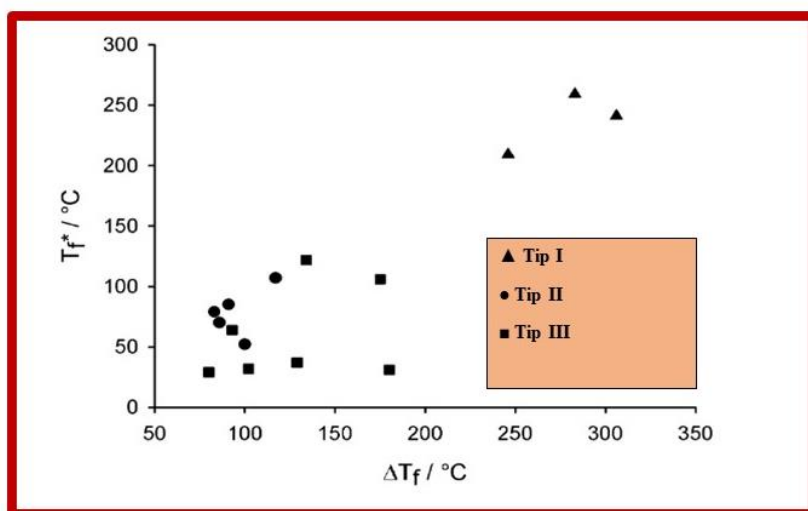
Tip I (kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe)

Tip II (kvaterna sol Cat^+X^- i halogenid metala poput Cr, Co, Fe)

Tip III (kvaterna sol Cat^+X^- i donor vodikove veze poput amida, kiseline i alkohola)

Tip IV (halogenid metala i donor vodikove veze poput amida i alkohola)

Korelacija između temperature tališta i smanjenja točke tališta vidljiva je na slici 2. koja prikazuje depresiju točke tališta kada su metalne soli i amidi pomiješani sa kolin-kloridom u omjeru 2:1, gdje svaka točka prikazuje različiti tip niskotemperaturnih eutektičkih otapala.



Slika 2. Razlika u smanjenju točke tališta kod eutektičkih otapala tipa I, II i III (prilagođeno prema Smithu i sur., 2014).

Upravo zbog svojih dobro poznatih i povoljnih svojstava se kao sol za sintezu niskotemperaturnih eutektičkih otapala najčešće koristi kolin-klorid, biorazgradiva tvar niske toksičnosti, dok se kao donori vodikove veze često koriste urea, glicerol, derivati poliola te karboksilne kiseline, koji su također niske cijene (Tang i Ho., 2013). Različiti donori vodikove veze su tema niza istraživanja, posebno oni gdje se koriste amidi, alkoholi i karboksilne kiseline, čija upotreba rezultira DES-ovima koji su jednostavni za pripremu, ne reagiraju s vodom, relativno su biorazgradivi i cijena im je niska. Ovakve eutektičke smjese pokazuju slična fizikalno-kemijska svojstva kao i ionske kapljevine, koje kao bazu imaju imidazol, ali su zbog spomenutih ekonomskih i ekotoksikoloških aspekata znatno povoljnije za upotrebu od spomenutih ILs-a. Pri usporedbi DES-ova s klasičnim organskim otapalima glavna praktična prednost niskotemperaturnih eutektičkih otapala je da nisu lako zapaljiva niti hlapiva što olakšava njihovo skladištenje, dok se u nizu mogućnosti njihove primjene posebno ističe i vrlo je zanimljiva njihova kompatibilnost s enzimima (Tang i sur., 2015).

U počecima razvoja DES-ova najzastupljenija otapala tog tipa su bila upravo ona na bazi kolin-klorida (ChCl), karboksilnih kiselina i ostalih donora vodikove veze, primjerice glicerola,

limunske kiseline ili uree (Carriazo i sur., 2012), a kasnije su Dai i suradnici (2013) uveli novu klasu niskotemperaturnih eutektičkih otapala koja su nazvali NADES (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents* - NADES) koja u potpunosti zadovoljavaju načela zelene kemije. To su otapala koja se sastoje od prirodnih komponenata, prvenstveno primarnih metabolita, kao što su organske kiseline, aminokiselina i šećeri.

Ime prirodna niskotemperaturna eutektička otapala duguju upravo širokoj rasprostranjenosti ishodnih komponenti NADES-a u prirodi, a osim podrijetla, naziv prirodni opisuje i njihovu pretpostavljenu ulogu „trećeg medija“ u živim organizmima, kao tekućine za otapanje, skladištenje i transport metabolita koji nisu topljivi u vodi ili u mastima (Dai i sur., 2013). Nadalje, velik je broj kombinacija ishodnih komponenata koje formiraju NADES, a one se mogu modeliranjem predvidjeti što otvara mogućnost sinteze novih NADES-a koji će biti dizajnirani „po mjeri“ da imaju željena svojstva potrebna za određenu primjenu, npr. u proizvodnji funkcionalne hrane ili nutriceutika (Dai i sur., 2013). Primjena DES-ova i NADES-a u ekstrakciji biološki aktivnih tvari je jedno od najbolje istraženih područja njihove primjene s općenitim zaključkom da su ekstrakti dobiveni u obliku DES-a ili NADES-a potpuno sigurni, te ih je moguće koristiti u prehrani ljudi bez dodatnih koraka pročišćavanja (Choi i sur., 2011; Panić i sur., 2019).

2. 1. 1. Metode pripreme DES-a

Najčešći način pripreme niskotemperaturnog eutektičkog otapala je miješanje kvaterne amonijeve soli sa solima metala ili sa donorom vodikove veze koji ima sposobnost formirati kompleks sa halidnim anionom kvaterne amonijeve soli, pri čemu do delokalizacije naboja dolazi unutar nastale vodikove veze, koja povezuje halidni ion i donora vodikove veze, što rezultira smanjenjem tališta individualnih komponenti (Abbott i sur., 2001). Osim te najčešće metode zagrijavanja i miješanja za sintezu DES-a, postoje i druge mogućnosti njihove sinteze kako je navedeno u nastavku (Radović i sur., 2021).

a) Metoda zagrijavanja i miješanja

U posudu u kojoj će se DES sintetizirati stave se izračunate količine odabranih ishodnih sirovina, prema molarnim omjerima, koje se zagriju do temperature od 60 °C (uobičajeno od 50 do 60 °C) uz pomoć magnetske miješalice tijekom 2-5 sati, odnosno, dok se ne formira bistra

tekućina. Ako je voda neophodna za daljnju primjenu niskotemperaturnog eutektičkog otapala, može se dodati izravno s ostalim komponentama tijekom pripreme ili nakon pripreme u novopripravljeno otapalo. Ukoliko se kao donor vodikove veze koristi neka od karboksilnih kiselina u kombinaciji sa kolin-kloridom, ova metoda se ne preporučuje budući da mogu nastati nečistoće u obliku estera pa se u takvim slučajevima preporuča korištenje tarionika i tučka, gdje se komponente usitnjavanju i melju do nastanka tekuće faze.

b) Metoda usitnjavanja uz homogenizaciju (mehanokemijski pristup)

Kod svih metoda sinteze DES-a zajednički je prvi korak, miješanje akceptora i donora vodikove veze u određenom molarnom omjeru, ali se daljnji koraci provode drugačije. Kod mehanokemijskog načina sinteze komponente se usitnjavaju u tarioniku pri sobnoj temperaturi uz neprestano miješanje do stvaranja eutektičke smjese.

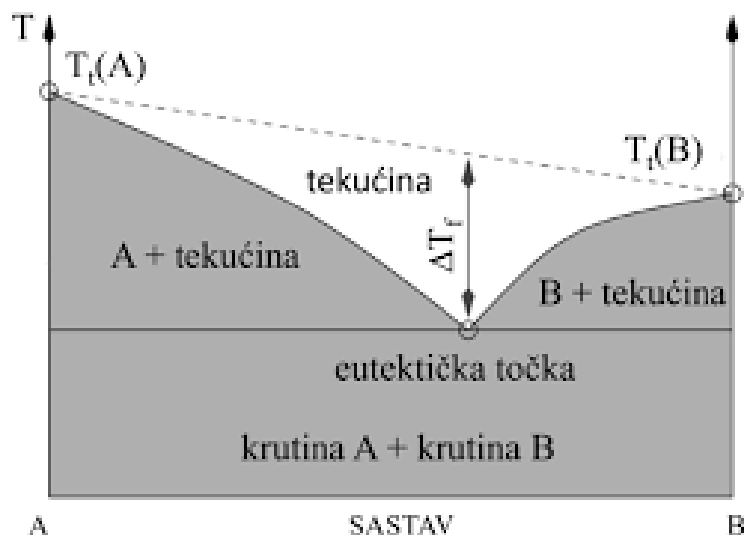
c) Metoda pripreme vodene otopine komponenata

Ishodne komponente za sintezu željenog DES-a prvo se otapaju u vodi, a potom se voda uklanja ili uparivanjem na 50 °C pri sniženom tlaku ili liofilizacijom, pri čemu zaostaje niskotemperaturno eutektičko otapalo.

d) Metoda primjenom alternativnih izvora energije

Komponente za sintezu DES-a se pomiješaju te se homogenizacija i zagrijavanje provodi primjenom mikrovalnog zračenja i/ili ultrazvuka.

Kao što je već rečeno, najčešći način sinteze DES-a uključuje miješanje komponenata pri određenom molarnom udjelu tijekom kojeg se smjesa lagano zagrijava. Razlika u točki tališta eutektičke mješavine A + B uspoređuje se sa točkom tališta idealne mješavine ΔT_f i uspoređuje se sa magnitudom interakcija između A i B te što između njih dolazi do više interakcija, viša će biti ΔT_f , što se vidi na slici 3.



Slika 3. Fazni dijagram eutektičke točke otapala s dvokomponentnim sustavom (prilagođeno prema Smithu i sur., 2014).

Što se tiče DES-ova tipa I, interakcije između različitih metalnih halida i halidnih iona nastalih iz kvaternih amonijevih soli rezultirat će sličnim halometalnim vrstama koje imaju sličnu entalpiju nastanka te će vrijednosti ΔT_f kod eutektičkih otapala tipa I biti između 200 i 300 °C. Eutektička otapala tipa II razvijena su u pokušaju da se uključe i drugi metali u formulaciju otapala te je pronađeno da hidrati halidnih spojeva imaju nižu točku tališta od anhidridnih soli iz čega je moguće zaključiti da voda u spoju snižava točku tališta metalnih soli snižavanjem energije kristalne rešetke. Eutektička otapala tip III temelje se na formaciji vodikove veze između soli halidnih aniona i donora vodikove veze, a također je u istraživanju Abbotta i suradnika iz 2004. dokazano da je smanjenje točke ledišta povezano sa masenim udjelom komponenata u smjesi.

2. 1. 2. Fizikalno-kemijska svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala imaju slična fizikalna svojstva kao i ionske kapljevine, imaju niski tlak pare, ponašaju se kao tekućine u širokom rasponu temperatura i nezapaljiva su (Lin i Vasam, 2005). Za razliku od ionskih kapljevina koje se definiraju kao tekućine pri temperaturama nižima od 100 °C i sastoje se od iona (Abbott i sur., 2008) niskotemperaturna eutektička otapala puno su lakša za pripremu i sastoje se od jeftinih, lako dostupnih komponenata koje su toksikološki dobro istražene i kemijski inertne što olakšava njihovu proizvodnju u većem mjerilu. No, iako je toksikološki profil komponenata od kojih se DES-ovi najčešće sastoje poznat, još je uvijek relativno malo podataka o toksikološkim profilu tih otapala, koja se *a priori* smatraju netoksičnima zbog netoksičnosti njihovih ishodnih tvari, stoga je njihova toksičnost još uvijek tema brojnih znanstvenih istraživanja (Lin i Vasam, 2005).

Najvažnija i najčešće određivana fizikalno-kemijska svojstva ovih otapala su talište, viskoznost, gustoća, polarnost i pH. Navedena svojstva značajno ovise o strukturi komponenata koje ga tvore te o njihovom molarnom omjeru. U raznim istraživanjima promatrana su svojstva viskoznosti, vodljivosti i tališta kao varijabli u funkciji temperature te su rezultati pokazali da tip soli i donora vodikove veze te molarni udio obje komponente značajno utječu na ispitivana svojstva (Kareem i sur., 2012).

Prema definiciji DES-ovi imaju talište niže od 150 °C, iako ona koja se najviše primjenjuju imaju talište ispod 50 °C što je ujedno i njihova glavna prednost, mogućnost korištenja i na sobnoj temperaturi. Talište DES-a ovisi o strukturi tvari koje ga tvore i njihovom molarnom omjeru, pa je tako dokazano da se povećanjem broja hidroksilnih grupa u molekuli koja djeluje kao HBD povećava vrijednost tališta.

Gustoća niskotemperaturnih eutektičkih otapala obično je veća od gustoće vode i uobičajenih organskih otapala, kao što su npr. etanol, etil-acetat i dr., a kreće se u rasponu 1,1 g cm⁻³- 1,4 g cm⁻³. U radu Shahbaz i suradnika (2011) predložena je metoda za predviđanje gustoće DES-ova pri različitim temperaturama. Vrijednosti izmjerenih i predviđenih gustoća usporedili su pomoću veličine koja prikazuje prosjek relativnog postotka pogreške (engl. *Average of absolute relative percentage error – ARPE*) te je on za testirane DES-ove iznosio 1,9 % .

U usporedbi s ionskim kapljevinama, ali i uobičajenim organskim otapalima, niskotemperaturna eutektička otapala imaju veću viskoznost i slabije su vodljivosti, a razlika u navedenim svojstvima može se objasniti velikim ionima i relativnim slobodnim volumenom u ionskim sustavima (Abbott i sur., 2004), dok se obzirom na povezanost viskoziteta i temperature, moglo zaključiti da je električna vodljivost DES-ova ovisna o temperaturi, što je i dokazano (Bagh i sur., 2013). Nadalje, sastav DES-a odnosno struktura ishodnih tvari korištenih za njihovu sintezu, značajno utječe njihovu gustoću i viskoznost, pa su tako npr. otapala na bazi kolin-klorida sa šećerom kao HBD-om najviskoznija i najgušća, dok su ona na bazi poliola najmanje gusta i viskozna. Pored prirode spojeva koji tvore DES, njihov molarni omjer, kao i temperatura, imaju snažan utjecaj na gustoću i viskoznost ovih otapala. Također, navedena svojstva DES-a se mogu prilagođavati dodavanjem vode čime se smanjuje viskoznost i gustoća istog, što je od iznimnog značaja sa tehnološkog aspekta njihove primjene. Međutim, kod dodavanja vode treba imati na umu da previsoki udio vode u otapalu > 40 - 50 %, može negativno utjecati na kompleks donor-akceptor vodikove veze, što u konačnici rezultira vodenom otopinom pojedinih komponenata otapala zbog gubitka mreže vodikovih veza između njih (Mitar i sur., 2019). Hammond i suradnici (2017) su također pokazali da je pri masenom

udjelu vode većem od 51 % struktura otapala narušena te prevladavaju interakcije voda - voda i otapalo – voda.

Kada se govori o pH vrijednosti DES-a ona također ovisi o prirodi komponenti koje ga sačinjavaju pa su tako otapala s organskom kiselinom kao HBD kisela (pH <3), dok su ona koja sadrže amid kao HBD bazična s pH vrijednostima > 8, poput kolin-klorid:urea ($n_A:n_D = 1:2$) za koju pH iznosi 8,51 (Radović i sur., 2021).

Što se tiče polarnosti, najčešće korišteni DES-ovi su polarni, pri čemu su otapala na bazi organskih kiselina najpolarnija, dok su ona na bazi šećera i poliola najmanje polarna. Nadalje, većina do sada opisanih DES-ova su hidrofilnog karaktera, no posljednjih godina istražuju se hidrofobna otapala (npr. mentol:oktanska kiselina, $n_A:n_D = 1:1$) čime će svakako omogućiti još šira primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala s različitim rasponom polarnosti i hidrofilnosti/hidrofobnosti.

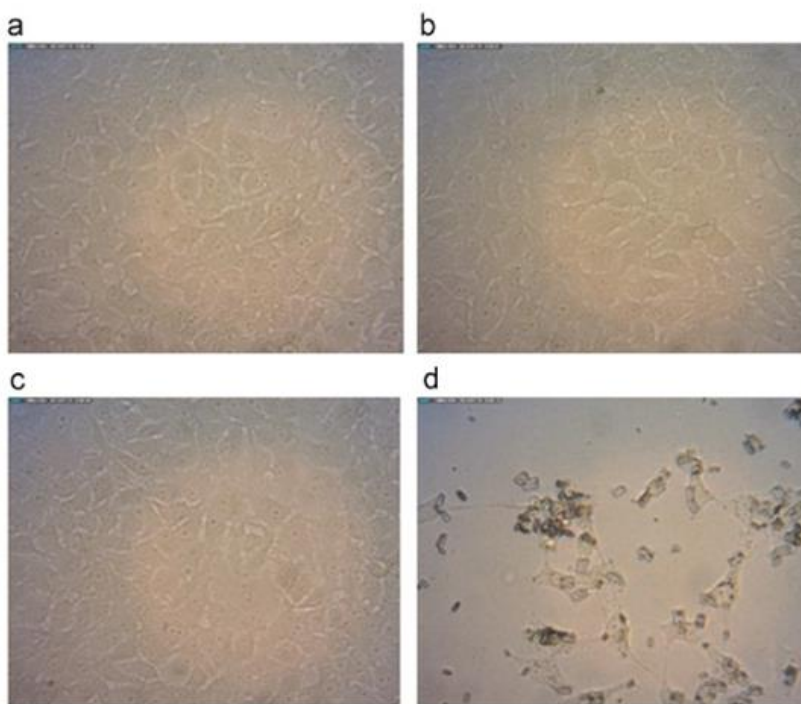
Upravo zbog opisanog širokog raspona vrijednosti fizikalno-kemijskih svojstava DES-ova ova otapala se smatraju dizajniranim otapalima (engl. *designer solvents*) budući se pravilnim odabirom ishodnih komponenti za njihovu sintezu i promjenama u njihovim molarnim omjerima može utjecati na njihova svojstva te samim time utjecati na uspješnost njihove primjene.

2. 1. 3. Citotoksičnost DES-a

Provedena su istraživanja toksičnosti i citotoksičnosti eutektičkih otapala na bazi fosfora i kolin-klorida *in vivo* na morskim kozicama i na dva soja bakterija, od kojeg je jedan soj gram pozitivan, a drugi gram negativan. Studije su pokazale da toksičnost niskotemperaturnog eutektičkog otapala ovisi o njegovom sastavu, viskoznosti i koncentraciji. Osim toga, rezultati rada Hayyan i suradnika (2013) pokazali su da puno jači toksični efekt ima DES nego same vodene otopine pojedinačnih molekula od kojih je to otapalo sačinjeno. Nadalje, sama toksičnost DES-a na bakterijama ukazala je na mogućnost njihove upotrebe kao antibakterijskog agensa. Takav učinak objašnjen je narušavanjem integriteta membrane bakterija do kojeg dolazi zbog prisutnosti delokaliziranog naboja u DES-ovima (Hayyan i sur., 2013). Druga studija bavila se toksičnosti DES-a na bazi kolin-klorida i aminokiselina te je ispitana njegova toksičnost prema enzimu acetilkolinesterazi, enzimu ključnom za normalno funkcioniranje živčanog sustavu svih viših organizama. Toksično djelovanje DES-a bilo je za

jedan red veličine manje u usporedbi s ionskim kapljevina na bazi imidazola. No, toksičnost ispitanih DES-ova se razlikuje ovisno o aminokiselinama u sastavu DES-a (Hou i sur., 2013).

Budući da je studija Florinda i suradnika (2014) dokazala važnost uloge kolina, komponente vitamina B, koji ima važnu ulogu u staničnom metabolizmu, studija Radošević i suradnika (2018) ispitala je četiri različita NADES-a na bazi kolin-klorida i oksalne kiseline, uree, ksilitola i sorbitola na staničnim linijama MCF-7, HEK293T i HeLa stanicama te je najveći inhibitorni efekt pokazala smjesa kolin-klorida i oksalne kiseline na tumorskim HeLa i MCF-7 stanicama (EC_{50} od $330,90 \pm 29,75 \text{ mg L}^{-1}$ i $558,98 \pm 54,32 \text{ mg L}^{-1}$). Inhibitorni efekt na normalne stanice HEK293T pokazao je vrijednost $EC_{50} > 2000 \text{ mg L}^{-1}$ koja je znatno viša nego kod tumorskih stanica što se objašnjava metabolizmom tumorskih stanica, koje imaju veće energetske potrebe zbog čega zahtjevaju više koncentracije esencijalnih sastojaka poput aminokiselina, soli, faktora rasta i glukoze, ali i smjese kolin-klorida i oksalne kiseline. NADES na bazi uree i kolin-klorida pokazao je toksičan efekt samo na MCF-7 stanice gdje je EC_{50} iznosio $83,50 \pm 7,94 \text{ mg L}^{-1}$ što se prema Cvjetko Bubalo (2015) objašnjava visokom pH vrijednošću otapala (pH ~ 9) budući je optimalna vrijednost pH za kultivacije stanica = 7. Nadalje, kako takav efekt ChCl:U nije zapažen na ostalim staničnim linijama može se zaključiti da citotoksičnost NADES-a ovisi i o ispitivanoj staničnoj liniji. Nadalje, eutektičke smjese kolin-klorida i ugljikohidrata ksilitola i sorbitola pokazale su niski citotoksični učinak što se pripisuje energetskom metabolizmu stanice. Također, u studiji Radošević i suradnika (2014) koja se bavila određivanjem toksičnog efekta niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi kolin-klorida s oksalnom kiselinom (OA), glukozom (Glu) i glicerolom (Gly) na humanoj staničnoj liniji MCF-7 i na staničnoj liniji ribe (CCO), veći je toksični efekt dokazan na CCO stanicama djelovanjem sa ChCl:OA, dok ChCl:Glc i ChCl:Glu nisu pokazale inhibitorno djelovanje. Navedenim istraživanjem pokazano je da citotoksičnost DES-a ovisi o tipu HBD, a osim određivanja citotoksičnosti MTT testom takav rezultat je potvrđen i promatranjem stanica svjetlosnim mikroskopom, gdje je vidljivo smanjenje broja stanica i gustoće monosloja stanica nakon djelovanjem ChCl:OA nakon 72h (Slika 4).



Slika 4. Morfologija CCO stanica slikana svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 400x. (Radošević i sur., 2014).

- a) Kontrola CCO stanica, b) CCO stanice tretirane najjačom testiranom koncentracijom ChCl:Gly nakon 72h (2000 mg L^{-1}), c) stanice tretirane ChCl:Glc d) stanice tretirane EC_{50} koncentracijom ChCl:OA

2.2. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

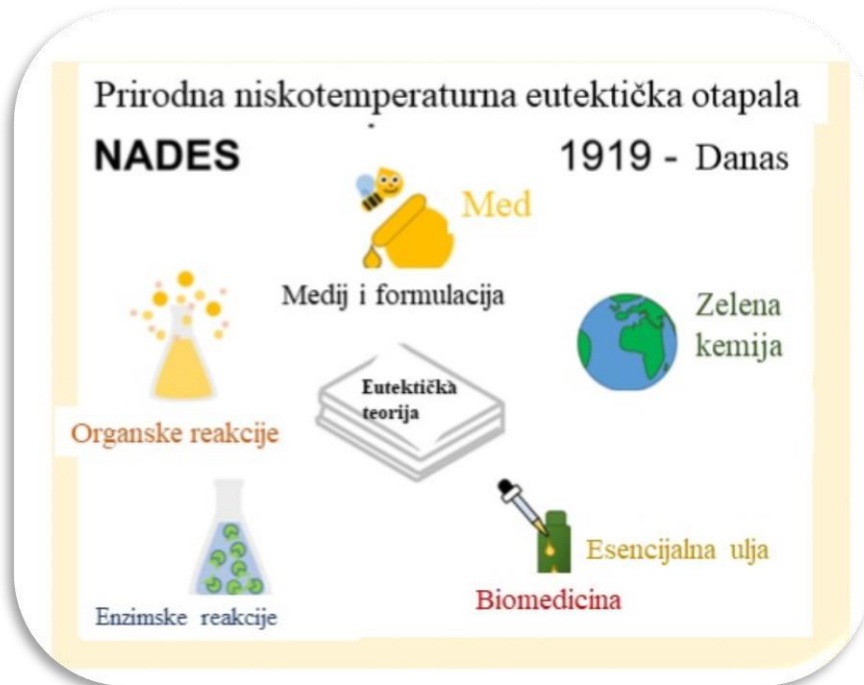
Raznolikost mogućih donora i akceptora vodikove veze rezultira velikim brojem mogućih kombinacija različitih niskotemperaturnih eutektičkih otapala s različitim fizikalno – kemijskim svojstvima zahvaljujući čemu je moguće dizajnirati velik broj otapala namijenjenih primjeni u različite svrhe (Zhang i sur., 2012).

Posljednje desetljeće obilježila su istraživanja DES-ova, a najčešća područja istraživanja su:

- a) Područje elektrokemije u kojoj se DES koristi zbog sposobnosti otapanja različitih oksida i soli metala;
 b) Katalizi i biokatalizi te sintetskoj kemiji kao ko-otapalo različitih organskih i anorganskih spojeva;

- c) Separacijskim procesima poput apsorpcije kiselih plinova (CO₂, SO₂, H₂S) te ekstrakcije dušikovih i sumporovih spojeva iz loživih ulja, razdvajanje alkohola i estera;
- d) Farmaceutskom inženjerstvu gdje se DES često koristi kao otapalo koja poboljšava topljivost djelatnih tvari klase II (slabo topljivih tvari), sustav za kontroliranu isporuku lijeka te kao komponente nove klase terapijskih niskotemperaturnih otapala;
- e) Biomedicini gdje se niskotemperaturna eutektička otapala koriste kao medij za čuvanje biološkog materijala (stanica i tkiva) te molekulka DNA i proteina; za fiksiranje različitih bioloških uzoraka, za sintezu biopolimera i biorazgradivih materijala za tkivne materijale koji pokazuju antibakterijsko djelovanje;
- f) Biotehnologiji i prehrambenom inženjerstvu za obradu lignoceluloznih sirovina zbog sposobnosti otapanja istih te u proizvodnji biodizela, kao rezervoar za glicerol te tijekom procesa ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora zbog sposobnosti otapanja i stabilizacije različitih prirodnih spojeva o čemu će biti više riječi u nastavku (Hammons i sur., 2016; Chen i sur., 2017; Martinez i sur., 2016; Tian i sur., 2020).

Na slici 5. nalazi se shematski prikaz područja u kojem se najčešće koriste prirodna niskotemperaturna eutektička otapala od 1919. pa sve do danas.



Slika 5. Shematski prikaz najčešćih područja primjene prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (prilagođeno prema Liu i sur., 2018).

2.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Fenolni spojevi, koje nalazimo u svim biljkama u obliku sekundarnih metabolita, su najveća skupina fitokemikalija. Njihova uloga je dvostruka, pomažu biljci u rastu i razvoju istodobno je štiteći od predatora i patogena (Tsao, 2010). Karakteriziraju ih jedan ili više aromatskih prstena na kojima se nalazi jedna ili više hidroksilnih skupina te je upravo njihova kemijska struktura izvor njihove raznolikosti i razlog zašto su tema brojnih i različitih istraživanja među kojima je možda najvažnije mogućnost njihove primjene u prevenciji različitih bolesti. Fenolni spojevi pokazuju antiupalno, antiviralno, antikancerogeno, analgetsko, antioksidativno i antimikrobno djelovanje (Manach i sur., 2004).

U fenole ili fenolne spojeve, kao što je već rečeno, ubraja se veliki broj aromatskih spojeva koji uključuju flavanoide, primjerice flavonole, antocijane, flavan-3-ole, tanine, ali i ne-flavonoide poput elagitanina, fenolnih kiselina i lignina (Shahidi i sur., 2010). Zbog prije navedenih svojstava fenoli se često koriste kao konzervansi u hrani i kozmetici najviše zbog izrazitih antimikrobnih svojstava kao zamjena za, potrošače sve više nepoželjne, sintetičke konzervanse (Rodriguez Vaquero i sur., 2010).

Iako su biljke bogate fenolnim spojevima, najveći izazov za njihovu širu primjenu, u industrijskom smislu, je njihova ekstrakcija. Najčešće tehnike ekstrakcije su ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid liquid extraction* – LLC) i ekstrakcija čvrsto-tekuće (engl. *Solid phase extraction* – SPE) (Khezeli i sur., 2016) pri čemu se kao otapala koriste organska otapala poput acetona ili etil-acetata, metanola, etanola, propanola i njihovih mješavina (Khoddami i sur., 2013). Iako organska otapala imaju odličnu sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva, njihove korištenje se nastoji smanjiti i ako je ikako moguće u potpunosti zamijeniti drugim metodama i/ili otapalima. Zbog toksičnosti, zapaljivosti, hlapljivosti i nakupljanja u zraku, nemogućnosti biorogradnje i troškova zbrinjavanja organska se otapala nastoje zamijeniti zelenim otapalima (Ruesgas – Ramon i sur., 2017) u svim područjima njihove primjene, pa tako i u području ekstrakcija biološki aktivnih spojeva.

Obzirom da je do sada poznato 8000 različitih fenolnih struktura, koje se razlikuju veličinom i kompleksnošću molekule, brojem aromatskih prstena i variraju od malih, jednostavnih molekula do velikih kompleksa tanina i derivata polifenolnih struktura poput glikozida, estera i amida, izuzetno je teško predvidjeti pravo otapalo za neki sustav i pronaći metodu koja nudi najučinkovitiju ekstrakciju željenog spoja iz prirodnog izvora. Zbog svojeg „zelenog“ karaktera, ali i razloga što se DES-ovi smatraju „dizajniranim otapalima“ čija je fizikalno-

kemijska svojstva moguće prilagođavati specifičnoj namjeni, istaknuli su se kao moguća i obećavajuća alternativa organskim otapalima u ekstrakciji fenolnih spojeva. Najčešću primjenu u području ekstrakcija biološki aktivnih tvari imaju DES-ovi na bazi kolin-klorida u kombinaciji s nizom donora vodikove veze kao što su urea, etilen-glikol i glicerol, iako su i alkoholi, aminokiseline i karboksilne kiseline ovdje našle svoju primjenu (Tang i Ho, 2012).

Osim kemijskih svojstava otapala i tvari koju je potrebno ekstrahirati, veliku doprinos učinkovitosti ekstrakcije ima i metoda te uvjeti provođenja samog procesa ekstrakcije. U preglednom radu Gullona i suradnika (2017) ističe se i važnost primjene novih tehnika ekstrakcije koje se također temelje na principima zelene kemije.

Spomenute nove metode se koriste kako bi se ubrzao i poboljšao proces ekstrakcije, uz poželjno smanjene utroška energije, a uključuju razne tehnike poput ekstrakcije pomoću mikrovalova (engl. *Microwave assisted extraction* – MAE), ekstrakcija pomoću ultrazvuka (engl. *Ultrasound assisted extraction* – UAE) te ekstrakcije potpomognute zagrijavanjem (engl. *Heating extraction* – HE). Sve tri spomenute metode rađene su u kombinaciji s primjenom DES-ova. Osim što ove metode poboljšavaju sam proces ekstrakcije fenolnih spojeva, smanjuju trošak procesa, jer smanjuju potreban volumen otapala i vrijeme ekstrakcije (Garcia-Salas i sur., 2010). Jedina metoda koja do sada nije ispitana s primjenom DES-a kao otapala je ekstrakcija potpomognuta enzimima (engl. *Enzyme-assisted extraction* – EAE), no obzirom na niz radova na temu biokatalize i DES-ova, može se pretpostaviti uspješna primjena i te metode za proces ekstrakcije biološki aktivnih spojeva.

Bi i suradnici su 2013.g. proveli istraživanje ekstrakcije fenola iz biljke japanski čempres (*Chamaecyparis obtuse*) pomoću metoda ekstrakcije zagrijavanjem (20 min na 20 °C ili 60 °C) i ekstrakcije ultrazvučnim valovima (30 min na 75W). Optimalni uvjeti procesa ekstrakcije zagrijavanjem postignuti su finim podešavanjem temperature i trajanja procesa čime se prinos same ekstrakcije povećao sa 0,031 mg g⁻¹ na 0,518 mg g⁻¹ za miricetin i amentoflavon (Bi i sur., 2013). Dvije godine kasnije, Tang i suradnici ekstrahirali su kvercentin, miricetin i amentoflavone iz biljke japanskog čempresa koristeći mješavinu dvojnog sustava 16 različitih DES-ova kombiniranih sa 5 različitih otapala (voda, metanol, etanol, kloroform i aceton) te je najveći prinos ekstrakta dobiven korištenjem Me(Ph)₃PBr/ etilen-glikolu (omjer 1:5) kombiniran sa metanolom, a DES/MeOH omjeri 50, 65 i 80 % ekstrahirali su slične koncentracije spoja (Tang i sur., 2015).

Ovisno o primijenjenoj metodi, različiti čimbenici su odgovorni za učinkovitost ekstrakcije, primjerice kod ultrazvučne ekstrakcije učinkovitost ovisi o kavitaciji mjehurića stvorenih unutar DES-a gdje prolaz ultrazvučnih valova razara staničnu stjenku biljke pri čemu se stanični sadržaj oslobađa u otapalo za ekstrakciju. No, razaranje stjenke može imati za posljedicu i negativni učinak na učinkovitost ekstrakcije, odnosno degradaciju fenolnih spojeva ili nastajanje slobodnih radikala unutar mjehurića zraka (Khodammi i sur., 2013). Mehanizam ekstrakcije mikrovalovima temelji se na poticanju kretanja molekula u materijalima ili otapalima, koji su sastavljeni od dipola, zbog čega dolazi do zagrijavanja uzorka, puknuća stanice i oslobađanja aktivnih komponenata (Garcia-Salas i sur., 2010). Pozitivna strana ekstrakcije mikrovalovima svakako je višestruko smanjenje volumena otapala korištenog tijekom ekstrakcije, pri čemu DES-ovi zbog svoje polarnosti i visoke dielektrične konstante mogu apsorbirati veću energiju mikrovalova što poboljšava prinos ekstrahiranih fenolnih spojeva (Khodammi i sur., 2013). Važna značajka tijekom odabira metoda ekstrakcije je temperatura, budući da je pri niskoj temperaturi DES poprilično viskoznan, što ometa prijenos mase, pa i mali porast temperature pri kojoj se provodi ekstrakcija rezultira poboljšanjem ekstrakcije povećavajući fluidnost otapala koje tada lakše ulazi unutar biljnog matriksa. Iako ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazuje najveću učinkovitost ekstrakcije, izbor prikladne metode ekstrakcije ovisi ponajviše o svojstvima odabranog DES-a i prirodi spoja koji se želi ekstrahirati (Ruesgas-Ramon i sur., 2017).

Za učinkovitu ekstrakciju bitna su fizikalno-kemijska svojstva otapala, a tlak para jedno je od svojstva, koje u isto vrijeme može biti nedostatak ukoliko je tlak para iznimno nizak, odnosno prednost, ako to nije slučaj. Otapala s niskim tlakom pare ne isparavaju, no u isto vrijeme otežavaju izdvajanje nehlapive otopljene tvari. Vrlo dobra sposobnost ekstrakcije koju DES-ovi pokazuju posljedica je snažnih intermolekularnih interakcija uspostavljenih između fenolnih spojeva i otapala, no što su te interakcije jače, nastaje veći problem pri izdvajanju fenolnog spoja iz otapala. Ako je potrebna izolacija biološki aktivne tvari iz DES-a koji je korišten za primarnu ekstrakciju iz biljnog materijala, i recikliranje samog DES-a, to se može postići različitim vrstama ekstrakcije, ekstrakcija tekuće-tekuće, ekstrakcija čvrsto-tekuće, korištenje molekularnih sita, smole ili precipitacija korištenjem anti-otapala, preferencijalno vode. Jake vodikove veze osnovna su značajka DES-ova, koje između ostalog i određuju sposobnost miješanja otapala, pa se tako DES-ovi lakše miješaju sa protičnim polarnim otapalima, metanolom, etanolom ili vodom. Transfer mase se pri tome odvija između kapljica, koje se ponašaju kao dispergirana faza DES-a i okoline aprotičkog otapala. Ovisno o veličini

koeficijenta raspodjele, fenolne komponente će se razdijeliti između aprotičkog i DES-a. Općenito vrijedi što je slabiji kapacitet vezanja vodikove veze, učinkovitija je ekstrakcija iz faze DES-a, no za to je potrebno nekoliko koraka ili veliki volumeni protičkih otapala, što će omogućiti lakše recikliranje DES-a (Ruesgas-Ramon i sur., 2017).

Uspješni primjer ekstrakcije tekuće-tekuće je protustrujna separacija koju su Liu i suradnici (2016) koristili za izolaciju i pročišćavanje rutina, kvercentina, kempferola i daidzeina ekstrahiranih u NADES-u (ChCl:Glc:H₂O u omjeru 5:2:5). Te molekule su iz NADES-a izolirane različitim smjesama organskih otapala te su sa 95,7 %, 94,6 %, 97 % i 96,7 % uspješnosti izolirane iz navedenog NADES-a. Iako je za izolaciju korišteno organsko otapalo, ova metoda je zanimljiva za odijeljivanje fenolne tvari iz eutektičke smjese budući da je pri tome NADES u potpunosti recikliran (Liu i sur., 2016).

U počecima istraživanja metode ekstrakcije čvrsto-tekuće za izolaciju fenola iz ekstrakata u NADES-u zahtijevala je primjenu slabo polarne smole HP-20 (Dai i sur., 2013b). Fenolne komponente su se apsorbirale na kolonu, a DES se mogao otopiti i eluirati u vodi. Jedan od sastojaka DES-a, sukroza u ovom slučaju, može utjecati na navedeni proces separacije, jer se fenolna komponenta koeluirala zajedno sa sukrozom u prvom procesu elucije vodom što je riješeno korištenjem 0,1 % mravlje kiseline čime se poveća retencijsko vrijeme prije elucije s etanolom. S uspješnošću od 90 % pročišćene su polarne fenolne komponente, a manje polarne komponente poput kartamina, pigmenta dobivenog iz šafrana, izolirane su s uspješnošću od 84 % (Ruesgaz-Ramon i sur., 2017).

Velika topljivost DES-ova u polarnim protičkim otapalima poput etanola ili vode omogućava potpuno razlaganje i otapanje komponenata od kojih se DES sastoji. Poznato je da razrjeđenje DES-a vodom doprinosi povećanju udaljenosti komponenata zbog čega se smanjuje jačina intramolekularnih veza što uvelike utječe na sposobnost primjene DES-a kao otapala. Osim ekstrakcijom, precipitacijom ili stvaranjem netopljivog sloja u etanolu ili vodi moguće je također izolirati fenolne spojeve iz DES-a, nakon čega je uklanjanjem vode ili etanola isparavanjem, moguće je obnavljanje tj. recikliranje komponenata DES-a (Ruesgaz-Ramon i sur., 2017).

2.2.2. Budućnost zelenih otapala u području ekstrakcije biološki aktivnih spojeva

Velika je prednost zelenih otapala njihova raznolikost, niska cijena, održivost, lagana priprema i veliki potencijal DES-a kao otapala za ekstrakciju, dok najveći nedostatak ovih otapala proizlazi iz njihovih fizikalno-kemijskih svojstava poput velike gustoće i viskoznosti u usporedbi sa konvencionalnim otapalima. No, navedene nedostatke je moguće nadići dodatkom vode i povećanjem temperature te se finim podešavanjem tih parametara može značajno povećati prinos ekstrakcije primjenom DES-a. Nadalje, osim fenolnih tvari čija ekstrakcija primjenom DES-a je najviše istražena, niskotemperaturna eutektička otapala se mogu koristiti i za ekstrakciju drugih spojeva poput proteina, polarnih lipida, šećernih taloga ili različitih vrsta celuloza.

Nizak tlak para koje ova otapala imaju ističe se kao velika mana budući da otežava proces izolacije i pročišćavanja ekstrahirane tvari i otežava prijenos u veće industrijsko mjerilo. Iako su prethodno opisane metode kojim se može izolirati spoj ekstrahiran DES-om i pri tome reciklirati sam DES, treba imati na umu i činjenicu da izolacija možda i nije potrebna, pogotovo u slučaju korištenja NADES-a kao otapala za ekstrakciju, jer je pretpostavljeno da se tako pripremljeni ekstrakti mogu smatrati „*ready-to-use*“ (Panić i sur., 2019) budući se korišteno otapalo sastoji od prirodnih spojeva i smatra se netoksičnim. Prije stvarne primjene tako dobivenih biljnih ekstrakata potrebno je svakako navedenu hipotezu potvrditi dodatnim *in vitro* i *in vivo* studijama.

Na temelju navedenog, osim primjene niskotemperaturnih eutektičkih otapala kao medija za ekstrakciju biološki aktivnih tvari, iz prvenstveno biljnih izvora, otvara se i mogućnost njihove upotrebe kao jednog od sastojka gotovog proizvoda čime se nadilazi problem izolacije ekstrahirane tvari. Nadalje, zelena otapala, ovisno o vrsti koja se koristi, mogu biti kompatibilna s primjenom u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Sintra i sur., 2015). U konačnici, razna istraživanja potvrđuju velike mogućnosti primjene DES-ova i NADES-a u različitim područjima, no prije upotrebe u širem mjerilu te u industrijske svrhe, bitno je otkloniti nedostatke koje otežavaju njihovu industrijsku primjenu (Rusegaz-Ramon i sur., 2017).

2. 3. TERAPEUTSKA NISKOTEMPERATurna EUTEKTIČKA OTAPALA

Primjena NADES-a kao netoksičnih i biokompatibilnih „zelenih“ otapala sve se više istražuje u proizvodnji lijekova, odnosno u farmaceutskoj industriji. Njihova primjena moguća je u

raznim fazama farmaceutске proizvodnje, od sinteze farmaceutski aktivne tvari (engl. *active pharmaceutical ingredient* - API), otapanja teško topivih API-ja do sustava za formulaciju i isporuku lijekova. Veliki problem za farmaceutsku industriju predstavlja upravo činjenica da je čak oko 40% API-ja odobrenih za tržište zbog svoje kemijske strukture teško ili u potpunosti netopivo u vodi (Kalepu i Nekkanti, 2015), a loša topljivost lijeka posljedično dovodi do niske biodostupnosti što rezultira suboptimalnom isporukom lijeka na ciljnom mjestu.

Obzirom na vrlo dobre rezultate primjene NADES-a u ekstrakciji biološki aktivnih spojeva, gdje je pokazano koliko je veliki potencijal poboljšanja ekstrakcije/topljivosti raznih spojeva u NADES-ima naspram uobičajenih organskih otapala pretpostavljena je mogućnost primjene DES-ova u farmaceutici za poboljšanje topljivosti teško topivih spojeva. Na primjeru nesteroidnih protuupalnih lijekova tu su hipotezu među prvima potvrdili Morrison i sur. (2009) koji su za pet slabo topljivih modelnih spojeva odredili da je topljivost u DES-u 5 do 22,000 puta veća nego u vodi. Osim otapanjem API-ja u DES-u kao otapalu, kako bi se poboljšala njihova topljivost mogu se sintetizirati niskotemperaturna eutektička otapala koja sadrže API kao jednu od ishodnih komponenti smjese. Takve eutektičke smjese čine novu klasu DES-ova tzv. terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Therapeutic deep eutectic solvents* – THEDES) (Aroso i sur., 2015). Većina farmaceutski aktivnih tvari može se ponašati i kao HBD i kao HBA stoga prilikom odabira drugih komponenti koje će činiti THEDES treba odabrati onu kombinaciju komponenti kod koje će dobivena eutektička smjesa pri normalnoj tjelesnoj temperaturi ima očuvana terapijska svojstva samog API-ja (Abbott i sur., 2017). Unatoč nebrojeno velikog broja mogućih kombinacija, većina THEDES-a priprema se korištenjem API-ja kao donora vodikove veze, budući da API-ji u svojoj strukturi najčešće imaju vodikom bogate funkcionalne skupine poput amino skupine, karboksilne skupine ili hidroksilne skupine. Kod formulacija THEDES-a, najviše obećava upravo ona smjesa koja u tekućoj formi kombinira dva aktivna sastojka u istoj formulaciji uz istovremeno izbjegavanje nastajanje polimorfizama oba sastojka (Abbott i sur., 2017). THEDES-i, osim što sadrže API, u praksi često sadrže i različite sastojke koji mogu poboljšati permeabilnost aktivne tvari (Stott i sur., 1998) što je drugi parametar na temelju kojeg je napravljen sustav klasifikacije biofarmaceutika (engl. *Biopharmaceutics Classification System* - BCS).

Krema EMLA[®] (engl. *Eutectic Mixture of Local Anaesthetic*) jedna od najstarijih terapijskih eutektičkih smjesa je lidokaina i prilokaina, koja se koristi kao lokalni transdermalni anestetik. Temperature tališta pojedinačnih komponenti prilokaina i lidokaina su 38 °C, odnosno 68 °C, dok je temperatura tališta njihove eutektičke smjese 16 °C. Osim što je EMLA[®] poznata kao

prva terapijska eutektična smjesa koja je komercijalizirana i patentirana, ona se u današnjoj industriji koristi kao polazna točka pri odabiru strategije poboljšanja topljivosti lijekova. No, navedena krema, iako u upotrebi, ima, kao i većina lijekova, nepovoljne nuspojave poput žarenja, peckanja, promjene boje kože koje se ponajviše pripisuju prilokainu zbog čega su razvijene i na tržište stavljene nove smjese lidokain:prokain i lidokain:tetrakain koje su svoju primjenu našle kao smjese za isporuku i dostavu lijeka za transdermalnu primjenu (Stott i sur., 1998).

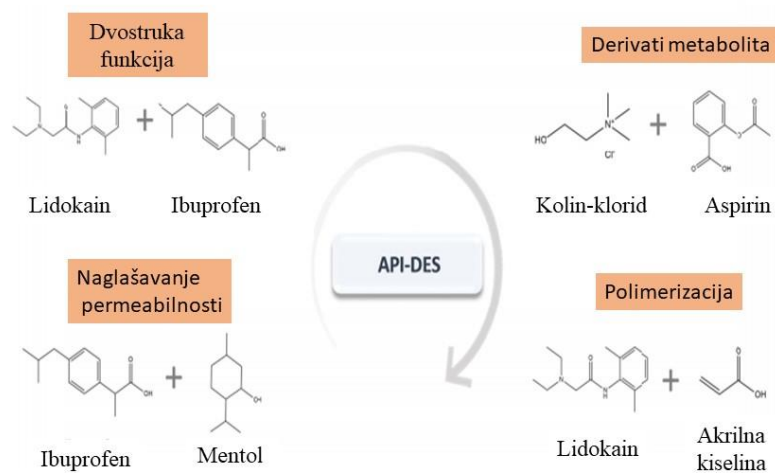
Jedanaest godina nakon, objavljen je znanstveni rad koji pokazuje poboljšanje topljivosti benzojeve kiseline, danazola, griseofulvina i itrakonazola primjenom DES-a. Korištena su niskotemperaturna eutektička otapala kolin-klorid:urea i kolin-klorid:malat pri čemu je topljivost navedenih spojeva bila 5 do 22 000 puta bolja u DES-u nego u vodi (Morrison i sur., 2009). Korištenje kolin - klorida, kao ishodne tvari za sintezu DES-a, pogodno je zbog njegove cijene, niske toksičnosti i sposobnosti biorazgradnje. Ohrabrujući su rezultati otapanja API-ja, koji su inače slabo topljivi u vodi, ponajviše jednog od najčešće korištenog lijeka, ibuprofena čija je topljivost u vodenoj otopini upotrebom propilen glikola i polietilen glikola (PEG 300) povećana 200 i više puta. Nadalje, primjenom raznih DES-ova topljivost ibuprofena se može povećati čak 5400 puta, u usporedbi s vodom (Lu i sur., 2013). Objašnjenje za navedena poboljšanja u topljivosti API-ja primjenom DES-ova, odnosno sposobnost solvatacije eutektičkih otapala, dano je u istraživanju lidokaina u mješavini kolin-klorida:mliječne kiseline i β -alanina:mliječne kiseline u omjeru 1:1. Rezultati pokazuju da je dobra topljivost lidokaina u DES-ovima temelji upravo na kombinaciji vodikovih veza i Van der Waalsovih sila između API-ja i DES-a (Gutierrez i suradnici, 2018).

Osim povećanja topljivosti, kao prednost korištenja niskotemperaturnih eutektičkih otapala za otapanje raznih biološki aktivnih tvari, od onih iz prirodnih izvora do sintetiziranih API-ja, ističe se i poboljšanje kemijske stabilnosti aktivne tvari. Mnoge aktivne tvari metaboliziraju se u različitim metaboličkim putevima te nisu stabilne u vodenim otopinama. Na primjer aspirin, koji podliježe hidrolizi tijekom duljeg čuvanja u obliku vodene otopine (Blessy i sur., 2014), u studiji Lu i suradnika (2013) pokazano je da je hidroliza aspirina na salicilnu i octenu kiselinu u DES-u kolin - klorida i 1,2 – propandiola bila 8,2 puta sporija nego u vodenoj otopini iz čega proizlazi da niskotemperaturna eutektička otapala mogu biti dizajnirana i korištena sa ciljem poboljšanja topljivosti API-ja, ali i njihove kemijske stabilnosti.

Wang i suradnici (2014) u svojoj studiji opisali su THEDES u kojem su farmaceutski aktivne tvari lidokain:ibuprofen otopljene u 95 % -tnom etanolu čime je značajno povećana permeabilnost ovih sastojaka koji se primjenjuju transdermalno. Niz istraživanja o korištenju lidokaina u eutektskim smjesama ukazuje na brže i snažnije djelovanje, za čak 9 puta, u usporedbi s komercijalno dostupnom EMLA[®] kremom. Bez obzira na sve postojeće modifikacije osnovnog sastava EMLA[®], komercijalizacija navedene anestetske kreme donijela je puno toga i potaknula mnoge studije u tom području, od čega je možda najvažnije primjena DES-ova u farmaceutici i sve mogućnosti koje se tu otvaraju. Ta istraživanja obuhvaćaju tvari koje pojačavaju i poboljšavaju permeabilnost API-ja, osobito onih koji imaju topikalnu i transdermalnu primjenu (Stott i sur., 1998).

Najčešća tvar koja se koristi za poboljšavanje permeabilnosti djelatne tvari je mentol i već je u nekoliko studija ispitana njegova upotreba u novim formulama API-ja s DES-ovima. Mentol je do sada kombiniran s ibuprofenom prilikom čega se istraživala topljivost API – ja, no, do sada nisu postojali radovi koji istražuju promjenu topljivosti API – ja u izotoničnoj otopini do rada Duarte i suradnika (2017) i to kombinacija mentol:ibuprofen, mentol:fenilacetilna kiselina i mentol:borna kiselina u različitim omjerima. Studija pokazuje nedosljednost u ponašanju sustava budući da je topljivost ibuprofena povećana dvanaest puta u kompleksu ibuprofen:mentol, u odnosu na topljivost ibuprofena u referentnoj vodenoj otopini, dok je kompleks mentol:borna kiselina topljivost povećao za samo 2 puta, a u kompleksu mentol:fenilacetilna kiselina nije zamijećena promjena što se pripisuje stvaranju estera unutar THEDES-a.

Osim kombinacije mentola i prethodno spomenutih djelatnih tvari, Wang i suradnici (2017) istražili su topljivost sustava mentol:paeonol u obliku gela sa mikroemulgiranim česticama što je značajno poboljšalo sustav dopreme aktivnih tvari putem kože čemu je dobivena eutektska smjesa s temperaturom tališta pri normalnoj tjelesnoj temperaturi, $T_m = 32\text{ }^{\circ}\text{C} - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Studije koje su uspoređivale permeabilnost nove formulacije API-ja u DES-u u odnosu na permeabilnost samog API-ja, pokazale su i do 3 puta veće permeabilnost takvih formulacija, no i dalje je to područje koje će se intenzivno istraživati u narednom razdoblju zbog iznimnog interesa znanstvene i farmaceutske zajednice (Duarte i sur., 2017), a različita funkcija API-DES-a prikazana je na slici 6.

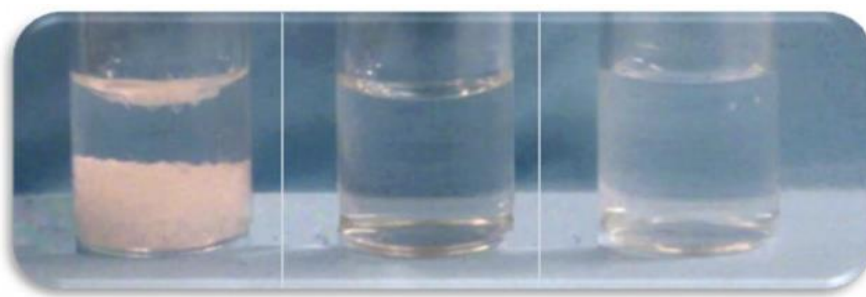


Slika 6. Shematski prikaz različitih funkcija API - DES formulacija (prilagođeno prema Pedro i sur., 2019).

Nadalje, za formulacije THEDES-a od iznimnog su interesa i masne kiseline, osobito za formulacije s transdermalnom primjenom. Kombinacija djelatnih aktivnih tvari ibuprofena i lidokaina s laurinskom i palmitinskom masnom kiselinom rezultirale su THEDES-om koji je u tekućem stanju pri tjelesnoj temperaturi čovjeka (Benessam i sur., 2013). Također, osim za transdermalnu primjenu laurinska kiselina je korištena u pripremi THEDES-a sa koenzimom-Q10 za oralnu primjenu budući da je nastala formulacija tekuća pri 37,93 ° C (Tarate i Bansal, 2015).

Osim poboljšanja permeabilnosti i biodostupnosti djelatnih aktivnih tvari primjenom DES-ova, formulacije API-ja u DES-u imaju mogućnost primjene kao novi, poboljšani načini unosa i isporuke API-ja kako bi se izbjegli slučajevi nepravilne apsorpcije lijeka, poput itrakonazola te njegove nedovoljne koncentracije u plazmi nakon unosa (Ye i sur, 2007). Tamo gdje je moguće, prednost pred oralnom primjenom ima topikalna primjena, čime je moguće izbjeći mogući nepovoljni sistemski učinak lijeka. Topikalna primjena lijeka je terapija primjenom lijeka na određeno područje kože ili sluznice, a njena prednost je npr. mogućnost lokalnog tretmana gljivičnih infekcija, te brza apsorpcija na ciljnom mjestu što za posljedicu ima višu koncentraciju aktivne tvari u tkivima (Park i sur., 2012a) te istovremeno onemogućava rekristalizaciju (Park i sur., 2012b).

Značajno poboljšanje topljivosti korištenjem API – DES formulacije utvrđena su za nekoliko djelatnih aktivnih tvari, uključujući paeonol, čija se topljivost povećala za $60\mu\text{g ml}^{-3}$ (Wang i sur., 2017), dok je za najpoznatiji primjer povećanje topljivosti farmaceutski aktivne tvari ibuprofen čija je topljivost u API – DES formulaciji povećana 12 puta (Duarte i sur., 2017). Formulacija „tekućeg aspirina“ rezultat je pokušaja povećanja topljivosti nesteroidnog protuupalnog lijeka aspirina koja je formirana otapanjem acetilsalicilne kiseline u kolin-kloridu. Dobivena mješavina se miješa se s vodom i pokazuje stabilnost od 3 dana, nakon čega se javljaju prvi znakovi rekristalizacije (Abbott i sur., 2017) koja je prikazana na slici 7. gdje se vidi razlika u otapanju aspirina u različitim otapalima



a) aspirin u vodi, b) aspirin:ChCl c) aspirin:ChCl u vodi

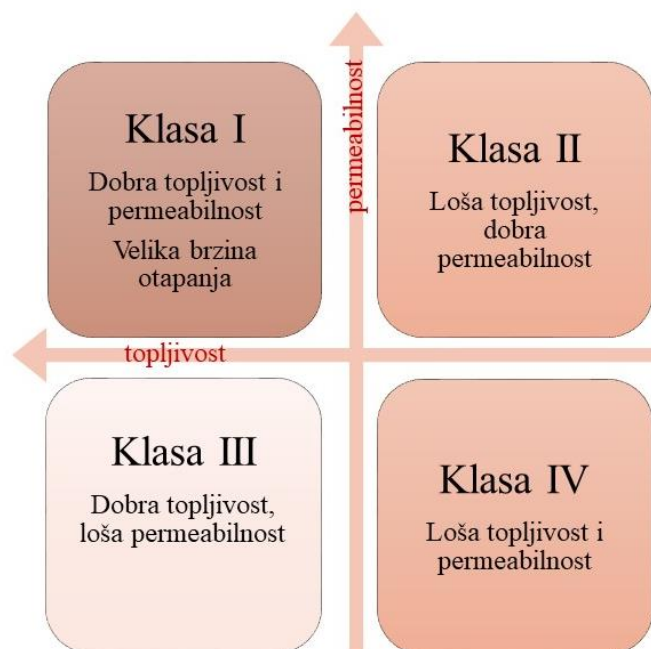
Slika 7. Otapanje aspirina (Abbott i sur., 2017).

Pereira i suradnici (2019) su proveli predkliničku i kliničku studiju kojom je istražen limonen, ciklički terpen kemoterapeutskih svojstava s potencijalnom primjenom u borbi protiv raka pluća, želudca, dojke, prostate (Bicas i sur., 2011). Limonen je zahvalan za istraživanje zbog svog GRAS statusa (engl. *generally recognized as safe*) koji je potvrdio Sun 2007. godine. Zahvaljujući izrazito visokoj lipofilnosti, potpuno se apsorbira u crijevima što doprinosi velikoj biodostupnosti u sistemskoj cirkulaciji (Vigushin i sur., 1998). Jia i suradnici (2013) dokazali su apoptotsko djelovanje kod kolorektalnih tumorskih stanica putem mitohondrija koji utječu na PI3K/Akt signalne puteve, a sudjeluju u mehanizmu preživljenja stanice i sposobnosti apoptoze. Zbog navedenih otprije poznatih karakteristika limonena cilj studije Pereire i suradnika (2019) bio je ispitati ideje budućeg razvoja novih farmaceutskih sustava koji se temelje na DES-ovima u cilju povećanja bioaktivnosti i efikasnosti dizajniranih sustava koji mogu pridonijeti u terapiji liječenja raka.

Pereira i suradnici (2019) su kreirali THEDES napravljen miješanjem miristinske kiseline (MA), kaprične kiseline (CA) ili ibuprofena (IBU) sa limonenom kako bi se stvorila nova formulacija s potencijalnim učinkom u terapiji liječenja raka. Rezultati potvrđuju da je koncentracija limonena od 2 mM inducira apoptozu zahvaljujući aktivnosti kaspaze-3. Slični rezultati određene aktivnosti s formulacija CA:LIM i mentol:LIM dokazuju da je citotoksičnost i antiproliferativni efekt posljedica samog limonena koji inhibira rast tumorskih stanica debelog crijeva (Jia i sur., 2013). Od svih istraženih sustava, jedino je sustav IBU:LIM pokazao antiproliferativnu aktivnost spram humane stanične linije raka debelog crijeva (HT29) pri čemu nije utjecao na vijabilnost stanica zdravog tkiva zbog čega je taj sustav izabran kao polazna točka za daljnja istraživanja antitumorskih svojstava navedene formulacije THEDES-a.

2.4. SVOJSTVA FARMACEUTSKI AKTIVNIH TVARI

Veliki izazov u razvoju novih farmaceutskih formulacija je vrlo često niska topljivost API-ja u vodi što stvara poteškoće u početnim fazama ispitivanja novih djelatnih tvari (Lipinski, 2001). Istraživanja pokazuju da se takve poteškoće javljaju kod gotovo 40% djelatnih tvari u razvoju, a loša topljivost djelatne tvari u vodi posljedično utječe na apsorpciju i biodostupnost lijeka, koje su ključne za njegovo učinkovito djelovanje (Heimbach i sur., 2007). Farmaceutska industrija klasificira lijekove u četiri skupine prema biofarmaceutskom klasifikacijskom sustavu (engl. *Biopharmaceutics classification system - BSC*) ovisno o topljivosti u vodi i permeabilnosti (Slika 8.). Kako bi se prevladao problem slabe topljivosti i/ili slabije permeabilnosti API-ja često se koriste više doze lijeka, kako bi se osigurala dovoljna djelatna koncentracija na ciljnom mjestu, što posljedično može rezultirati sistemskom toksičnošću i ozbiljnim nuspojavama koje nije moguće zanemariti (Leuner i Dressman, 2000).



Slika 8. Biofarmaceutski sistem klasifikacije API-ja (prilagođeno prema Duarte i sur., 2017).

BSC sustav se prvenstveno odnosi na lijekove koji se primjenjuju oralno stoga se topljivost često povezuje s topljivosti u simuliranim tjelesnim tekućinama, a permeabilnost s prolaskom kroz membrane u gastrointestinalnom traktu. Djelatne tvari skupine I pokazuju dobru permeabilnost i topljivost, ali i brzo apsorpciju preko stjenke gastrointestinalnog sustava te kvantitativno otapanje djelatne tvari definirano kao brzinu otapanja. Djelatne tvari skupine II imaju veliku sposobnost permeabilnosti kroz stijenke gastrointestinalnog sustava, ali pokazuju slabiju topljivost u tjelesnim tekućinama. Za razliku od djelatnih tvari skupine II, djelatne tvari skupine III pokazuju dobru topljivost u tjelesnim tekućinama, ali lošu permeabilnost kroz stijenke gastrointestinalnog trakta zbog čega često te tvari budu izlučene iz organizma, a budući da ne dolazi do apsorpcije, nema ni željenog farmakološkog efekta. Djelatne tvari iz skupine IV predstavljaju veći izazov za farmaceutsku industriju jer uz lošu permeabilnost te tvari imaju i lošu sposobnost otapanja (Lobenberg i Amidon, 2000).

2.4.1. Topljivost

Topljivost se definira kao količina otopljene tvari koja je nakon postizanja stanja ravnoteže između otopine i otopljene tvari prešla u otopinu pri određenim uvjetima tlaka i temperature (Gothoskar, 2005). Djelatna tvar se smatra dobro topljivom u vodi ako se najjača djelotvorna doza rastapa u najviše 250 mL vodenog medija duž različitih pH vrijednosti (Centre for Drug

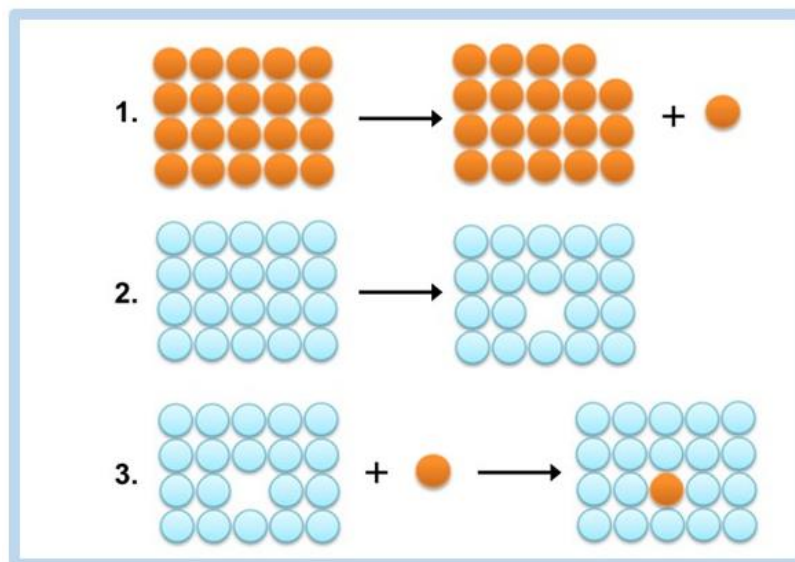
Evaluation, USFDA, 2000). Volumen od 250 mL odabran je jer odgovara volumenu tekućine koji se uzima pri oralnoj primjeni nekog lijeka. Uvjeti temperature pri kojoj se lijek ispituje je 37 ± 1 °C pri rasponu pH vrijednosti 1-7,5 prema USFDA-u, rang pH vrijednosti 1,2-6,8 prema WHO, dok je za Europsku agenciju za procjenu lijekova (engl. *European Medicines Evaluation Agency* - EMEA) raspon pH vrijednosti 1-8. Zbog širokog raspona pH vrijednosti moguće je da dođe do degradacije djelatne tvari te je u tom slučaju potrebno uzeti na razmatranje topljivost djelatne tvari u širem rasponu pH vrijednosti (Chavda i sur., 2009).

Mogućnosti poboljšanja slabe topljivosti farmaceutski aktivnih tvari u vodenoj otopini uključuju upotrebu surfaktanata, korištenje derivata u obliku organskih soli, promjene pH vrijednosti i hidrofobnu solubilizaciju za što se najčešće koriste hidrotropi (Subbarao i sur., 2012). Skupina hidrotropa obuhvaća spojeve koji imaju nisku toksičnost i malen bioakumulacijski koeficijent, a prvi put je pojam hidrotropnog agensa uveo Neuberger 1916.g. Hidrotropi su tvari koje bitno utječu na povećanje topljivosti hidrofobnih molekula u vodi, a najčešće u svom sastavu imaju aromatski prsten i anionski dio molekule gdje amonijevi, kalcijevi, kalijevi ili natrijevi ioni služe kao protuioni koji održavaju neutralnost cijele molekule (Hodgdon i Kaler, 2007). Iako su hidrotropi amfifilne molekule, one se ne koriste u svojstvu surfaktanta, budući da imaju kratke hidrofobne izdanke i ne tvore micide te imaju slabu tendenciju za samoagregaciju u vodi (Subramanian i sur., 2013). Sintra i suradnici su 2018.g. istraživali načine povećanja topljivosti kod lijekova koji po biofarmaceutskoj klasifikaciji pripadaju BCS skupini II te ih karakterizira dobra permeabilnost i slaba topljivost, što je npr. karakteristika nesteroidnog protuupalnog lijeka ibuprofena. Istraživanje je pokazalo visoku učinkovitost ionskih kapljevina kao hidrotropa za ibuprofen, koje su uz podešavanje aniona i kationa mogle djelovati sinergistički na mehanizam solubilizacije.

Iako BSC klasifikacija služi svrstavanju farmaceutski aktivnih tvari po parametrima topljivosti i permeabilnosti, ona nije strogo određena pa djelatne tvari koje zbog svoje slabe topljivosti pripadaju skupini II ne moraju nužno zbog toga imati nisku biodostupnost. Mnoge slabe kiseline koje pri niskim vrijednostima pH, primjerice pri pH želudca = 1 pokazuju nisku topljivost, pri intestinalnoj pH vrijednosti kod koje je pH = 6-7 pokazale su se poprilično topljivima, no klasa II ipak znači da te tvari mogu biti limitirane stupnjem otapanja, uspoređujući ih sa djelatnim tvarima koje pripadaju u skupinu I i pokazuju dobru topljivost i permeabilnost.

Općenito, učinkovit proces otapanja molekula prolazi u tri stupnja kako je prikazano na slici 9.:

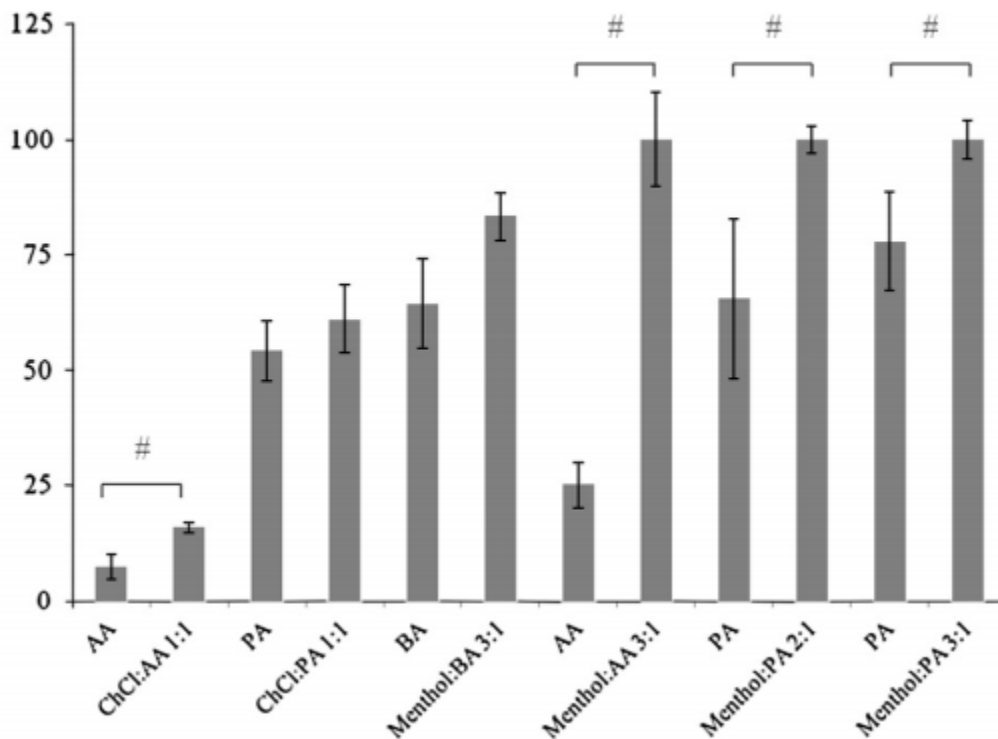
1. Molekula otopljene tvari odvaja se od ostalih molekula koje se nalaze u čvrstom stanju, a to je proces u kojem dolazi do pucanja veza između molekula otopljenih tvari.
2. Unutar molekula otapala treba biti prisutna praznina koja će biti dovoljna za odvojenu molekulu otopljene tvar, a kako intramolekularne sile slabije djeluju kod tekućina, nego kod čvrstih stanja, energija potrebna za disrupciju entiteta molekula tekućine otapala bit će poprilično niska.
3. Nadalje, preostaje jedino da molekula otopljene tvari zauzme mjesto molekule otapala koja nedostaje. Za molekule koje imaju visoki afinitet prema polarnim otapalima poput vode, ovaj proces je energetski povoljan te molekule spontano prelaze u sastav molekula otapala



Slika 9. Grafički prikaz tri stupnja otapanja molekula otopljenih tvari (Williams i sur., 2013).

Metodama koje se u današnje vrijeme razvijaju sa ciljem poboljšanja topljivosti djelatnih tvari u vodenom mediju nastoji se postići topljivost koja je do sada pokazana za otapanje djelatnih tvari u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Tako je npr. utvrđeno povećanje topljivosti ibuprofena između 5 i 22 000 puta otapanjem u terapijskom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu koji sadrži mentol, kamfor i spomenuti API (Tuntarawongsa i Phaechamud, 2012). Topljinost djelatne tvari smatra se ključnim parametrom za farmaceutske tehnologije, budući da djelatna tvar koja ne pokazuje dobru topljivost nema dobru biodostupnost. Aroso i suradnici

(2016) proučavali su razlike u topljivosti acetilsalicilne (AA), benzojeve (BA) i fenilacetilne kiseline (PA) primjenom THEDES-a, a razlike u topljivosti prikazane su na slici 10.



Slika 10. Grafički prikaz poboljšanja otapanja čistih djelatnih tvari u etanolu (95 %) i djelatnih tvari u DES-u i nakon 7 h, prevedeno prema radu (Aroso i sur., 2015).

Aroso i suradnici (2016) provodili su test otapanja djelatne tvari u prahu ili kao sastavne komponente THEDES-a te je koncentracija djelatne tvari bila jednaka u slučaju ishodišne tvari otopljene u vodi i u formulaciji THEDES otopine. Kako je vidljivo iz grafa prikazanog na slici 7, otapanje je puno uspješnije u formulaciji THEDES-a, nego kad se radi o čistoj otopljenoj djelatnoj tvari u etanolu. Štoviše, iz grafa se jasno vidi da sve tri djelatne tvari, AA, PA i BA, pokazuju bržu stopu otapanja u THEDES-u s mentolom, u usporedbi s onim koji sadrži kolin-klorid gdje je prosječna stopa otapanja 60%. Kod THEDES-a s mentolom i ispitivanim API-jima postotak otapanja je iznad 90% iz čega možemo zaključiti da metoda kompleksacije djelatne tvari s nekom drugom tvari unutar THEDES-a vrlo obećavajući pristup za poboljšanje topljivosti API-ja (Aroso i sur., 2016). Nadalje, niz je istraživanja provedeno s mentolom, s naglaskom na njegovu učinkovitost u poboljšanju permeabilnosti lijeka, a ti podaci su od velike važnosti za određivanje prikladnih doza terapije i mehanizma unosa lijekova, napose topikalno i/ili transdermalno.

Budući da se djelatna tvar različito ponaša kao pojedinačna tvar ili u smjesi s drugim tvarima, pa primjerice već spomenuti ibuprofen kao API pripada djelatnoj tvari klase II, u kombinaciji s mentolom ima povećanu permeabilnost i topljivost te pripada djelatnim tvarima skupine I. Benzojeva kiselina, koja kao zasebni API pripada skupini III, u kompleksu sa mentolom u omjeru mentol:benzojeva kiselina = 3:1 povećava joj se topljivost i permeabilnost zbog čega svojim svojstvima pripada klasi I farmaceutski aktivnih tvari. Fenilacetilna kiselina, koja je kao zasebna djelatna tvar pripadala skupini I aktivnih tvari, nakon kompleksacije pripada skupini I, no u formi estera gubi se stabilnost formulacije (Duarte i sur., 2017).

Oralna primjena farmaceutski aktivnih tvari smatra se najprirodnijim, najjednostavnijim i najprikladnijim načinom unosa lijeka, zbog čega je veliki interes za poboljšanja upravo tog načina terapije, a koja uključuje lijekove koji su u vodi slabo topljivi. Najveću razliku u biodostupnost moguće je vidjeti kod lijekova čija je aktivna tvar visoko permeabilna i slabo topljiva, kao što je slučaj kod karbamazepina, antiepileptičke tvari slabe topljivosti ($0,15 \pm 0,07$ mg ml⁻¹) pri 25 °C, zbog čega se navedeni lijek daje pacijentima u visokim dozama te je stoga tema niza istraživanja (Nesamony i sur., 2013).

Općenito gledano, najčešće korištene tehnike za povećanje topljivosti djelatnih tvari se temelje na smanjenju veličine čestica, disperziji lijeka u nosačima, kompleksaciji i solubilizaciji surfaktantima (Neduri i sur., 2013). Disperzijom čvrstih farmaceutski aktivnih tvari slabe topljivosti u hidrofilne nosače način otpuštanja lijeka određen je svojstvima korištenog polimera, što je moguće optimirati i mijenjati ovisno o svojstvima nosača i čestica. Najbolji rezultati u poboljšanju biodostupnosti postižu se izmjenama i kombinacijama u molekularnoj masi i kompoziciji nosača, kristalnog stanja aktivne tvari te poroznosti čestica (Vasconcelos i sur., 2007).

2.4.2. Permeabilnost

Permeabilnost je veličina koja indirektno opisuje apsorpciju aktivne tvari u probavnom sustavu čovjeka, a direktno postotak prijenosa mase aktivne tvari kroz membranu tankog crijeva. Za određivanje permeabilnosti API-ja koriste se testovi s umjetnim membranama i testovi koje se baziraju na primjeni kulture stanica, poput *in vitro* stanične kulture epitelnih stanica. Metode *in vitro* koje se koriste za procjenu permeabilnosti novih kemijskih tvari dijele se na stanične i nestanične metode. Prema USFDA i BSC klasifikaciji API-ja visoko permeabilna je ona djelatna

tvar, koja je stabilna u području gastrointestinalnog trakta, i postiže minimalnu apsorpciju od 90% u usporedbi s intravenoznom referentnom dozom, dok prema WHO visoko permeabilnom djelatnom tvari smatra onu koja u odnosu na intravenoznu referentnu dozu postiže minimalno 85% apsorpcije. Znanstvena zajednica se zalaže za snižavanje kriterija u skladu s WHO tj. da se 85 %-tna apsorpcija prihvati kao univerzalna klasifikacija visoko permeabilne djelatne tvari. Kao dodatna metoda koja je prihvatljiva i koristi se za dokazivanje permeabilnosti je *in vivo* intestinalna perfuzija kod ljudi te ukoliko u tom testu djelatna stvar ima linearan odziv i potpunu apsorpciju, ona se smatra visoko permeabilnom (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2008).

Istraživanja u području apsorpcije i razdiobe lijekova u posljednja dva desetljeća polažu velike nade u tzv. kombiniranu sintezu koja omogućuje istovremenu sintezu i pročišćavanje stotine tvari čime se ekonomično iskorištavaju financijski i vremenski resursi (Bhattacharyya, 2001). Metode koje omogućuju odabir i preliminarnu procjenu velikog broja uzoraka istovremeno olakšavaju brzu identifikaciju farmakološki djelatnih tvari, no nažalost dokazana aktivnost *in vitro* ne jamči učinkovitost tog istog API-ja *in vivo*. Mnoge djelatne tvari u daljnjim ispitivanjima pokazuju neprikladnu farmakokinetiku te loš toksikološki i metabolički profil zbog čega često ne budu prihvaćeni za daljnja ispitivanja u kliničkim studijama (Caldwell i sur., 2001). Kako bi se smanjila velika stopa pogrešaka u programima razvoja farmaceutskih proizvoda, od velike je važnosti unutar takvih programa uključiti toksikološke i farmakokinetičke analize u ranim fazama razvoja novih proizvoda. Djelatne tvari koje se uzimaju oralnim putem smatraju se najprikladnijim oblikom terapije, no ono što ih ograničava je intestinalna apsorpcija o kojoj ovisi biodostupnost novih potencijalnih lijekova.

2.4.2.1. PAMPA test

Kako bi se ispitala permeabilnost farmaceutski aktivne tvari koriste se metode s umjetnim membranama, tzv. ne-stanične metode, i stanične metode u kojima se primjenjuju kulture stanica. Korištenje umjetnih membrana kao alternativnih modela za simulaciju membrana u gastrointestinalnom sustavu za procjenu apsorpcije API-ja temelji se na činjenici da se većina tvari apsorbira potpuno ili djelomično pasivnim transportom pa korelacija permeabilnosti kroz umjetnu membranu, koja oponaša pasivni unutarstanični transport, daje dobru smjernicu o apsorpcijskom potencijalu lijeka (Zhu i sur., 2002). Nedostatak testova s umjetnim membranama je u tome što ne uključuje čimbenik vezanja lijekova na proteine plazme (iznad

90%), što znatno utječe na koncentraciju lijeka u plazmi te na njegovu bioaktivnost i sigurnosti (Basalious i sur., 2010).

Dva najčešće korištena predstavnika nestaničnih metoda za određivanje permeabilnosti lijekova su PAMPA metoda (engl. *Parallel artificial membrane permeability assay*) i PVPA metoda (engl. *phospholipid vesicle-based permeation assay*). PAMPA metoda se smatra učinkovitijom od PVPA metode, a u odnosu na stanične metode kraćeg je trajanja i manje zahtjevna zbog čega se često koristi u ranim fazama razvoja lijeka bez obzira što se ovom metodom može testirati samo transport lijeka pasivnom difuzijom kroz lipidnu membranu. Kako lipofilne komponente općenito ne pokazuju dobru topljivost u puferima koji se uobičajeno koriste u istraživanjima apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (engl. *Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion - ADME*) novih lijekova, koriste se agensi, ko-otapala te neionski surfaktanti poput polisorbata 80 i Cremophora EL za povećanje topljivosti. Osim loše topljivosti, na rezultate može utjecati i nespecifično vezanje lipofilnih komponenata na plastičnu površinu što može dovesti do netočnih rezultata procjene permeabilnosti PAMPA testom (Buckley i sur., 2012).

PAMPA se koristi kao metoda za predviđanje transstanične pasivne apsorpcije u gastrointestinalnom traktu. Često se koristi u ranim fazama testiranja primarne permeabilnosti tvari tijekom istraživanja biodostupnosti zbog mogućnosti da se istovremeno testira velik broj uzoraka, a pokazuje i visoku korelaciju sa podacima apsorpcije *in vivo* (Awortwe i sur., 2014). Iako ne sadrži enzime i transportne proteine bitne prilikom transporta i apsorpcije tvari, PAMPA metoda daje podatke o relativnoj pasivnoj transstaničnoj difuziji tvari sa razumnom točnošću zbog čega se koristi kao standard pri određivanju permeabilnosti. Osim poznatih lijekova, očekuje se da PAMPA test može predvidjeti ne samo dio intestinalne apsorpcije, već i distribucijske karakteristike novih kemijskih tvari.

Osim za predviđanje apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, PAMPA se vrlo često se koristi i kao metoda za procjenu permeabilnosti kroz kožu, tj. za API-je namijenjene transdermalnoj primjeni. Pri izvedbi PAMPA testa koriste se ploče sa 96 jažica koja imaju umjetnu membranu, na koju se prije same provedbe testa nanosi odgovarajuća lipidna smjesa, ovisno o tome koja je ciljna membrana, odnosno koja lipidna membrana je ključna za permeabilnost ispitivanog API-ja. Moffat i suradnici su 2010.g. istraživali permeabilnost ibuprofena koristeći umjetnu silikonsku membranu, tkivo svinje, ljudsku kožu i PAMPA test pri čemu se u usporedbi sa ljudskom kožom najboljim pokazao PAMPA test. Nadalje, Zhang i suradnici su 2019.g. istražili

prikladnost korištenja PAMPA testa za kožu kao modela za predviđanje permeabilnosti nikotinamida u kožu. Nikotinamid, amidni je oblik vitamina B3, koji se koristi u proizvodima za osobnu i kozmetičku njegu prilikom raznih dermatoloških stanja poput akni, atopijskog dermatitisa, starenja kože, i drugo (Lee i sur., 2016). Rezultati su pokazali lošiju permeabilost kod PAMPA testa u usporedbi s biološkim tkivima, stoga navedeni autori smatraju da PAMPA test mora i dalje biti ispitivan i evaluiran kako bi se potvrdio potencijal te metode za istraživanja velikog broj uzoraka među kojima su mnogi novosintetizirani spojevi o kojima nema prethodnih saznanja (Zhang i sur., 2019).

Kao što je već spomenuto kod nestaničnih modela za ispitivanje permeabilnosti lijekova koriste se umjetne membrane različitih tipova, ovisno o načinu unosa lijeka i ciljnom mjestu. Osim umjetnih membrana koje oponašaju ljudsku kožu, razvijaju se i modeli kojima bi se ispitao *in vitro* prolazak kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) (engl. *Blood- brain barrier-BBB*). Najveća prepreka djelotvornosti lijekova za središnji živčani sustav (engl. *Central nervous system - CNS*) je prolazak kroz KMB kako bi postigao terapijski učinak (Clark i Pickett, 2000). Krvno-moždana barijera sastoji se od čvrsto spojenih endotelnih stanica mozga i smatra se sučeljem između periferne cirkulacije i CNS-a. KMB kontrolira protok iona i molekula izvan cirkulacije CNS-a te omogućava pritek hranjivih tvari i kisika živčanim stanicama i tako osigurava normalno funkcioniranje živčanog sustava (Liu i Su, 2014). Zanimljivo je da se permeabilnost krvno-moždane barijere povećava u gotovo svim bolestima CNS-a poput moždanog udara, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti, epileptičkih napadaja, traume mozga, ali i šećerne bolesti (Krol i sur., 2013). Međutim, još uvijek nije utvrđeno je li disfunkcija krvno-moždane barijere, koja rezultira povećanjem permeabilnosti kroz nju, posljedica bolesti CNS-a ili je to prethodilo razvoju bolesti (Obermier i sur., 2013). Zbog svega navedenog ispitivanja i određivanje permeabilnosti tvari kroz KMB je i nadalje vrlo izazovno i zanimljivo za mnoge znanstvenike.

Obzirom da je proces transporta molekula u mozak vrlo složen, znanstvenici ulažu velike napore u razvoj *in vitro* modela krvno-moždane barijere. Postoje tri različita mehanizma transporta molekula kroz KMB, a jedan od njih uključuje pasivni transport kroz staničnu membranu endotelnih stanica i naziva se transstanični mehanizam i opisuje se kao mehanizam transporta nepolarnih molekula topivih u lipidima. No, neke hidrofobne molekule (fosforilirani glikoproteini) nemaju sposobnost prolaska kroz KMB, jer ih posebne pumpe koje kontroliraju izljev molekula izbacuju iz membrane u krvotok. Za razliku od hidrofobnih molekula, mozgu potrebni nutrijenti poput folata, aminokiselina i molekularnog prijenosnika transferina mogu proći kroz krvno-moždanu barijeru transportom potpomognutim receptorima, koji se danas

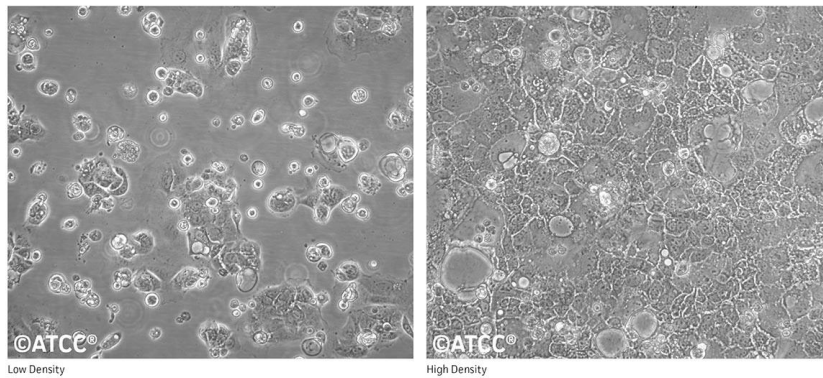
smatra neinvazivnim transportom molekula kroz KMB koji najviše obećava. Treća vrsta mehanizma transporta uključuje penetraciju malih hidrofilnih molekula i iona kroz međustanični spoj u procesu koji se zove parastanični mehanizam transporta (Kuntz i sur., 2014).

Kao alternativa laboratorijskim eksperimentalnim *in vitro* i *in vivo* metodama, računalnim simulacijama i *in silico* metodama razvijeni su alati koji predviđaju svojstva molekula koje mogu proći KMB, što značajno pridonosi istraživanjima u ovom vrlo izazovnom i zahtjevnom području, a prednost ovakvog pristupa je brzina prikupljanja podataka i relativno niska cijena u odnosu na laboratorijske pokuse (Shityakov i sur., 2013). Pri računalnoj analizi koristi se pojam LogBB koji označava omjer koncentracije lijeka unutar mozga i koncentracije lijeka u krvi, dok je LogPS veličina koja označava produkt permeabilnosti i površine. Treća veličina koja je bitna u predviđanju permeabilnosti kroz KMB je P_{eff} koji kombinira koeficijent difuzije i slobodne energije te se on uspoređuje sa veličinama LogBB i LogPS tijekom predviđanja sposobnost molekule za prolazak kroz krvno-moždanu barijeru. Ova metoda računalne analize se, za sada, uspješno koristi u predviđanju permeabilnosti malih molekula čije su vrijednosti i eksperimentalno potvrđene (Carpenter i sur., 2014).

2.4.2.2. Stanična metoda za određivanje permeabilnosti

Stanična metoda, odnosno *in vitro* metoda koja se pokazala kao dobar pristup i sada je već prihvaćena kao standard u istraživanju intestinalne permeabilnosti je primjena stanična linija Caco-2 (Artursson i sur., 2001). Davne 1983.g. Pinto i suradnici opisali su jedinstvenu mogućnost stanica iz stanične linije Caco-2 da diferenciraju u enterocite, epitelne stanice crijeva, nakon čega je ta stanična linija postala najčešće korišten model predviđanja apsorpcije djelatnih tvari putem epitela tankog crijeva (Sun i sur., 2008). Danas se ta stanična linija, kojom se dobivaju diferencirane stanice u monosloju, koristi u laboratorijima diljem svijeta u istraživanju novih mehanizama unosa lijekova (Maher i sur., 2016). Caco-2 stanice (Slika 11) su epitelne stanice tumora debelog crijeva i koriste se kao model za intestinalnu apsorpciju djelatnih tvari. Kultivacija monosloja preduvjet je diferencijacije te se Caco-2 stanice kultiviraju na poroznoj membrani u posebnim komoricama s medijem za uzgoj stanica, koji istovremeno hrani i apikalnu i bazalnu površinu staničnog monosloja, a nakon otprilike 21 dana u kulturi stanice diferenciraju te pokazuju dobru korelaciju sa genskom ekspresijom i molekularnom permeabilnosti humanih stanica tankog crijeva (Press i Grandi, 2008).

ATCC Number: HTB-37
Designation: Caco-2



Slika 11. Caco-2 stanična linija, preuzeto s web stranice ATCC-a (Anonymus 1, 2021)

Diferencirani konfluentni oblik Caco-2 stanica ekspirira neke proteine koji sudjeluju u aktivnim oblicima transporta, koji su prisutni *in vivo* u ljudskom tankom crijevu, kao što su transporteri za žučne kiseline, aminokiseline i šećere (Audus i sur, 1990) ali i fosforilirane glikoproteine koji su produkti MDR gena (engl. *multi – drug resistance*) i MRP (engl. *multi-drug resistance associated protein*), a ekspirirani su u staničnoj membrani Caco-2 stanica i sudjeluju u transportu specifičnih ksenobiotika iz bazolateralnog dijela do apikalnog dijela membrane (Walle i sur., 1999). Velika većina intestinalnih transportera i enzima ekspirira se u *in vitro* uvjetima tj. u monosloju Caco-2 stanica što je potvrđeno kvantitativnim PCR-om koji je pokazao dobru korelaciju molekula mRNA transportera između Caco-2 stanica i stanica ljudskog intestinalnog sustava. Citokrom P450 3A4 konstitutivno se ne ekspirira, ili je njegova ekspresija izrazito slaba u stanicama Caco-2, no moguća je indukcija ekspresije na dva načina. Nadalje, enzimi koji sudjeluju u metabolizmu lijekova visoko su ekspirirani u Caco-2 staničnoj liniji te se ti podaci mogu koristiti u studijama o metabolizmu lijekova (Manna i sur., 2000). U funkcionalnim Caco-2 stanicama su ekspirirane hidrolaze, karboksilesteraze, glutation-S transferaze i sulfotransferaze. Predstavnici skupine enzima faze II, sulfotransferaze i glukoroniltransferaze, sudjeluju u metabolizmu, apsorpciji i distribuciji djelatnih tvari, a posebno su značajni jer indirektno utječu na biodostupnost lijekova unesenih oralnim putem budući da proces konjugacije, koja je tipična reakcija koju provode enzimi faze II, rezultiraju smanjenjem aktivnosti ili potpunim uklanjanjem djelatnih tvari iz organizma (Yu i sur., 2002). Primjena Caco-2 stanica olakšava određivanje intestinalne permeabilnosti djelatnih tvari i omogućava identifikaciju specifičnih transportnih proteina te proteina koji sudjeluju u metabolizmu djelatnih tvari koji mogu pojačati ili spriječiti intestinalnu apsorpciju (van Breemen i Li, 2005). Zbog svega navedenog, osim za *in vitro* određivanje permeabilnosti API-

ja, Caco-2 stanice u monosloju koriste se kao *in vitro* alat za ispitivanje genske ekspresije proteina transportera i enzima nakon izlaganja raznim kemikalijama ili citokinima.

Intestinalna apsorpcija lijekova uzetih oralnim putem odvija se na tri moguća načina različitim mehanizmima transporta: pasivnom difuzijom, olakšanom difuzijom i vezikularnim transportom. Velika je prednost primjene stanične linije Caco-2 što osigurava u *in vitro* uvjetima sva tri oblika transporta za razliku od nebioloških modela, odnosno umjetnih membrana kao što je npr. PAMPA. Pasivna difuzija može se odvijati na dva načina. Kod parastanične pasivne difuzije tvari se transportiraju duž epitela putem vodenih, izvanstaničnih puteva prilikom čega je pokretačka snaga prijenosa tvari razlika u koncentraciji djelatne tvari, električnog potencijala i hidrostatskog tlaka između lumine i krvne strane intestinalnog epitela. Transstanični transport kao pokretačku snagu koristi također elektrokemijski gradijent, budući da je površina stanične membrane puno veća od površine uskih spojeva među stanicama (99,9:0,01%). Tvari koje koriste ovaj oblik pasivne difuzije pokazuju veću stopu apsorpcije (Hidalgo, 2001).

Najčešće se pri izvođenju *in vitro* testa permeabilnosti primjenom Caco-2 stanica, stanice kultiviraju tijekom dvadeset i jednog dana nakon čega prolaze diferencijaciju u enterocite koji imaju spomenute transportne proteine i uske spojeve među stanicama. Prilikom pripreme monosloja Caco-2 stanica, medij za uzgoj stanica se odstranjuje iz bazolateralnih i apikalnih komorica i zamjenjuje se s otopinom soli, koja se koristi za održavanje i manipulaciju stanicama (engl. *Hank's Balanced Salt Solution* - HBSS), a sadrži 25mM HEPES pufer čiji je pH 7,4. Kako bi se odredila čvrstoća međustaničnih spojeva primjenjuje se mjerenje transepitelne električne otpornosti (engl. *Transepithelial Electrical Resistance* - TEER) čime se procjenjuje integritet monosloja pri čemu rezultat $> 300 \Omega\text{cm}^{-2}$ ukazuje na zadovoljavajući integritet monosloja (Mukherjee i sur., 2004) te se tako uzgojene stanice mogu koristiti dalje za *in vitro* test permeabilnosti.

Prilikom predviđanja permeabilnosti lijekova u crijevima primjenom Caco-2 stanica određuje se doza koja se apsorbira, što se označava simbolom f_a . Efektivna permeabilnost (P_{app}), veličina je koju je moguće izračunati, a opisuje prijenos tvari odnosno koliko molekula prelazi po jedinici površine stanične membrane, što se može se izračunati prema jednadžbi 1:

$$P_{app} = \frac{\Delta A_R / \Delta t}{Area \times 60 \times C_{D,0}} \quad [1]$$

gdje omjer $\Delta A_R / \Delta t$ opisuje ukupno otpuštanje lijeka u vremenu. Površina (*Area*) je veličina koja opisuje površinu monosloja stanice, a oznaka $C_{D,0}$ označava koncentraciju ispitivanog lijeka pri početku eksperimenta kad je $t = 0$. Jednadžba je izvedena iz jednadžbe Fickovog zakona koji se koristi za opisivanje permeabilnosti otopljene tvari s jedne strane membrane na drugu putem pasivne difuzije (Guidance for industry, 2008). Studija provedena od strane Lennernäsa i suradnika (1996) usporedila je efektivnu permeabilnost (P_{app}) određenu primjenom Caco-2 stanica i stanica proksimalnog dijela jejunuma (Lennernäs i sur., 1996). Istraživanje je pokazalo podudaranje vrijednosti dobivenih na obje stanične linije za lijekove koji su imali visoku pasivnu permeabilnost. Za lijekove koji se apsorbiraju primarno parastanično ili pomoću transportnih proteina, vrijednost efektivne permeabilnosti (P_{app}) je manja zbog užih spojeva između stanica i slabije ekspresije gena za transportne proteine. Dobiveni podaci iskorišteni su za komercijalno dostupan software poput softwarea GASTROPLUS™ i IDEA™ koji predviđaju koncentraciju apsorbirane doze (f_a) (Parrott i Lave, 2002). Pomoću navedenih softwarea, izračunate su koncentracije apsorbirane doze koja se izvedene iz vrijednosti efektivne permeabilnosti. Navedeni podaci koriste za klasifikaciju aktivnih farmaceutskih tvari prema BSC-u te ga je moguće koristiti prilikom procjene apsorpcije lijeka u ranim fazama njegova razvoja (Matsson i sur., 2005).

Osim za određivanje permeabilnosti Caco-2 stanice se koriste i za određivanje citotoksičnosti. Periera i suradnici (2019) su citotoksičnost sintetiziranih THEDES formulacija limonena u kombinaciji s ibuprofenom, miristinskom ili kapričnom kiselinom testirali na Caco-2 konfluentnoj staničnoj liniji, na nediferenciranom monosloju stanica nakon 7 dana, što je vremenski period u kojem razviju karakteristike entrocita zbog čega se ove stanice mogu koristiti kao *in vitro* intestinalni model za ispitivanje toksičnosti kemikalija i komponenata hrane na stanica epitela crijeva (Manda i sur., 2015).

2.4.3. Bioodobrenje

Termin bioodobrenje (engl. *Biowaiver*) se primjenjuje u procesu odobrenja lijeka, a dobije se na temelju dokazane biološke vrijednosti na testiranjima koji ne uključuju *in vivo* test biološke istovrijednosti. Termin bioodobrenje uključuje odricanje od izvođenja istraživanja bioekvivalencije i biodostupnosti koja su najčešće izuzetno skupa, ali i dugotrajna. Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari pruža bioodobrenje za lijekove I, II i III skupine lijekova koji imaju određene specifikacije.

Koncept koji se koristi kod BSC klasifikacije doveo je do postupnog odstupanja od *in vivo* studija biološke istovrijednosti (engl. *Bioequivalence* - BE) i prelazak na specifične komparativne *in vitro* studije kako bi se došlo do zaključka o biološkoj istovrijednosti trenutnog oslobađanja djelatnih tvari uzetih oralnim putem koje izazivaju sistemske reakcije. Ako dvije djelatne tvari postižu isti koncentracijski profil duž gastrointestinalnog trakta, one će pokazati imati isti profil u plazmi nakon oralne primjene što se vidi iz sljedeće jednadžbe do koje su došli Dressman i suradnici 2001.g.:

$$J = P_w \times C_w \quad [2]$$

gdje veličina J označava prijenos tvari kroz stijenku crijeva, P_w permeabilnost djelatne tvari kroz stijenku crijeva, a C_w koncentracijski gradijent na stijenci crijeva (Dressman i sur., 2001).

Budući da loša topljivost i permeabilnost, pa posljedično i slaba biodostupnost, predstavljaju veliki problem za farmaceutsku industriju napredak tehnologija doveo je do razvoja metoda i strategija, poput kompleksacije lijekova sa ciklodekstrinima, formulacije u obliku soli kod lijekova koji se mogu ionizirati te upotreba pomoćnih otapala pri izradi formulacija, no univerzalna metoda koja bi poboljšala biodostupnost ne postoji (Thakuria i sur., 2013). Tako je npr., kristalografsko inženjerstvo, posljednjih godina u fokusu studija koje se bave poboljšanjem topljivosti i permeabilnosti djelatnih tvari u lijekovima, a koristi se kao metoda koja može osigurati učinkovitiju terapiju bez dodatnih nuspojava koje bi osobama koje uzimaju tu terapiju negativno utjecale na kvalitetu života (Kawabata i sur., 2011).

Kriteriji preporučeni od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *United States Food and Drug Administration* - USFDA) za bioodobrenje:

1. Aktivna tvar treba pripadati u skupinu dobro topljivih i visoko permeabilnih tvari;
2. Lijek mora pokazivati trenutno otpuštanje;
3. Kako bi se dobilo bioodobrenje, na *in vivo* studijama biodostupnosti, aktivna tvar mora biti topljiva u 3 različita medija, i to s postotkom od minimalno 85% u 30 minuta;
4. Lijek ne smije imati niski terapijski indeks što označava malu razliku u koncentraciji terapijskog i toksičnog djelovanja;
5. Pomoćne tvari koje se koriste u formulaciji trebale bi biti korištene u prethodno odobrenim čvrstim oblicima aktivnih tvari sa trenutnim otpuštanjem;
6. Lijek treba biti stabilan u gastrointestinalnom traktu, a proizvod se dizajnira tako da se ne apsorbira u usnoj šupljini.

Sustav je primjenjiv za čvrste oralne formulacije koje imaju trenutno otpuštanje, a sastoji se od jedne ili više djelatnih tvari, koje su identificirane kao prihvatljive prema medicinskom programu prekvalifikacije od strane Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation* – WHO). Ako potrebna dokumentacija osigurava sličnost predanog farmaceutskog proizvoda i proizvoda s kojim se novi proizvod uspoređuje, a uzima se sa liste preporučenih WHO proizvoda, uključujući i preporučenu dozu usporednog proizvoda, sustav je primjenjiv. (Center for Drug Evaluation, USFDA, 2000).

3. ZAKLJUČCI

1. Niskotemperaturna eutektička otapala zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava: niske toksičnosti, biorazgradivosti, jednostavne pripreme te niske cijene, ističu se kao dobra zamjena za štetna organska otapala u raznim područjima primjene.
2. Za niskotemperaturna eutektička otapala se pretpostavlja veliki potencijal primjene u područjima biotehnologije, farmaceutike i biomedicine zbog njihove iznimne sposobnosti otapanja polarnih i nepolarnih spojeva, poboljšanja enzimske aktivnosti te mogućnosti stabilizacije raznih bioloških spojeva.
3. Topljivost i permeabilnost farmaceutski aktivne tvari znatno utječe na biodostupnost lijeka, stoga loša topljivost i permeabilnost predstavljaju veliki problem za farmaceutsku industriju. Poboljšanje topljivosti i permeabilnost djelatne farmaceutske tvari može se postići primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala i sintezom tzv. terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala.
4. Za ispitivanje permeabilnosti novih formulacija farmaceutski aktivnih tvari koriste se ne-stanične i stanične metode. Među ne-staničnim metodama najčešće je korišten PAMPA test koji koristi umjetne membrane za određivanje pasivne difuzije lijeka. Najčešće korištena stanična linija za *in vitro* ispitivanje permeabilnosti je Caco-2 stanična linija koja dobro simulira permeabilnost tvari kroz membranu tankog crijeva.
5. Mentol se u dosadašnjim istraživanjima često koristi kao komponenta u sastavu terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala jer značajno poboljšava permeabilnost farmaceutski aktivne tvari loše permeabilnosti (klase II). Posebno se ističe u istraživanju formulacija namijenjenih za topikalnu i transdermalnu primjenu.

4. LITERATURA

Abbott, A. P., Ahmed, E. I., Prasad, K., Qader, I. B., Ryder, K. S. (2017) Liquid pharmaceuticals formulation by eutectic formation. *Fluid Phase Equilib.* **448**, 2-8.

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. (2004) Deep eutectic solvents formed between cholin chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **29**, 9142-9147.

Abbott, A. P., Dalrymple, I., Endres, F., MacFarlane, D. R. (2008) Why we use ionic liquids for electrodeposition? U: Electrodeposition from ionic liquids, (Abbott, A. P., Endres, F., MacFarlane, D. R., ured.). Wiley –VCH, Weinheim. str. 1-13.

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H.L., Rasheed, R., Tambyrajah, V. (2001) Preparation of novel, moisture stable, Lewis – acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem. Commun.* **19**, 2010-2011.

Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., Crison, J. R. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm. Res.* **12**, 413-420.

Anastas, P., Eghbali, N. (2009) Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301-312.

Anastas, P.T., Warner, J.C. (2007) Theory and practice. U: Green Chemistry (Horvatsh, I., Anastas, P. T., ured.) Oxford University Press, New York.

Anonymus 1, (2021) Caco – 2 (ATCC ® - HTB-37) <<https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-37%20Low%20High.ashx>> . pristupljeno 20. 2. 2021.

Aroso, I. M., Craveiro, R., Rocha, A., Dionisio, M., Barreiros, S., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C. (2015) Design of controlled release systems for THEDES – Therapeutic deep eutectic solvents, using supercritical fluid technology. *Int. J. Pharm.* **492**, 73-79.

Aroso, I. M., Silva, J. C., Mano, F., Ferreira, A. S. D., Dionisio, M., Sa-Nogueira, I., Barreiros, S., Reis, R I., Paiva, A., Duarte, A. R. C. (2016) Dissolution enhancement of

active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **98**, 57-66.

Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001) Caco – 2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 27-43.

Audus, K. L., Bartel, R. L., Hidalgo, I. J., Borchard, R. T. (1990) The use of cultured epithelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm. Res.* **7**, 435-451.

Awortwe, C., Fasinu, P. S., Rosenkranz, B. (2014) Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. *J Pharm Pharm Sci.* **17**, 1-19.

Bagh, F. S. G., Shahbaz, K., Mjalli, F. S., AlNashef, I. M., Hashim, M. A. (2013) Electrical conductivity of ammonium and phosphonium based deep eutectic solvents: Measurements and artificial intelligence – based prediction. *Fluid Phase Equil.* **356**, 30-37.

Basalious, E. B., Shawky, N., Badr-Eldin, S. M. (2010) SNEDDS containing bioenhancers for improvement of dissolution and oral absorption of lacidipine. I: Development and optimization. *Int. J. Pharm.* **391**, 203-211.

Benessam, S., Khimeche, K., Djelloulli, F., Benziane, M., Dahmani, A. (2013) Phase diagram of ibuprofen with fatty acids. *J. Therm. Anal. Calorim.* **112**, 317 – 320.

Bhattacharyya, S. (2001) Combinatorial approaches in anticancer drug discovery: recent advances in design and synthesis. *Curr. Med. Chem.* **8**, 1383-749.

Bi, W., Tian, M., Row, K. H. (2013) Evaluation of alcohol based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A.* **1285**, 836-840.

Bicas, J. L., Neri-Numa, I. A., Ruiz, A. L. T. G., De Carvalho, J. E., Pastore, G. M. (2011) Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1610-1615.

Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N., Agrawal, Y. K. (2014) Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. *J. Pharm. Anal.* **4**, 159-165.

- Buckley, S. T., Fischer, S. M., Fricker, G., Brandl, M. (2012) In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. *Eur J Pharm. Sci.* **45**, 235-250.
- Caldwell, G. W., Richie, D. M., Masucci, J. A. (2001) The new pre-preclinical paradigm: compound optimization in early and late phase drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 353-366.
- Carpenter, T.S., Kirshner, D. A., Lau, E. Y., Wong, S. E., Nilmeier, J. P., Lightstone, F. C. (2014) A method to predict blood brain barrier permeability of drug-like compounds using molecular dynamics simulations. *Biophys J.* **107**, 630-641.
- Carriazzo, D., Serrano, M. C., Gutierrez, M. C., Ferrer, M. L., del Monte, F. (2012) Deep eutectic solvents playing multiple roles in the synthesis of polymers and related materials. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4996-5014.
- Chavda, H. V., Patel, C. N., Amand, I. S. (2009) Biopharmaceutic Classification System. *Sys Rev Pharm.* **1**, 62-69.
- Chen, F., Xie, S., Huang, X., Qiu, X. (2017) Ionothermal synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as efficient heterogeneous Fenton-like catalysts for degradation of organic pollutants with H₂O₂. *J. Hazard Mater.* **322**, 152–162.
- Cherukuvada, S., Nangia, A. (2014) Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chem. Commun.* **50**, 906-923.
- Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y. T., Verberne, M., Hollman, F., Arends, I. W. C. E., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.* **156**, 1701-1705.
- Clark, D. E., Pickett, S. (2000) Computational methods for the prediction of 'drug-likeness'. *Drug Discov. Today* **5**, 49-58.
- Cvjetko Bubalo, M., Mazur, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I. (2015) Baker's yeast-mediated asymmetric reduction of ethyl 3-oxobutanoate in deep eutectic solvents. *Process Biochem.* **50**, 1788-1792.

Cvjetko Bubalo, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Halambek, J., Gaurina Srček, V. (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicol. Environ.* **99**, 1-12.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. - J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* **766**, 61-68.

Dai, Y., Withkamp, G.-J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013b) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolite sin *Charthamus tinctorius*. *L. Anal. Chem.* **85**, 6272-6278.

Dressman, J., Butler, J., Hempenstall, J., Repass, C. (2001) The BCS: Where do we go from here? *Pharmaceut Technol.* **25**, 68-76.

Duarte, A. R. C., Ferreira, A. S. D., Barreiros, S., Cabrita, E., Reis, R. L., Paiva, A. (2017) A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *Eur J Pharm. Biopharm.* **114**, 296-304.

Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2015) From green chemistry to nature: the versatile role of low transition temperature mixtures. *Biochimie* **120**, 119-123.

Florindo, C., Oliviera, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., Marrucho, I. M. (2014) Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvent based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustain Chem Eng.* **2**, 2416-2425.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2010) Phenolic copmapund systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* **15**, 8813-8826.

Gothoskar, A. V. (2005) Biopharmaceutical classification system of drugs. *Pharmaceut Rev.* [online] <<https://www.pharmainfo.net/reviews/biopharmaceutical-classification-drugs>> pristupljeno 19.12.2020.

Guidance for Industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system (2000) United States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.

Guideline on the Investigation of Bioequivalence. (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1) (2008) Committee for Medicinal Products for Human Use.

Gullon, B., Lu - Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., Eibes, G. (2017) Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends Food Sci Technol.* **76**, 220-235.

Gutierrez, A., Atilhan, M., Aparicio, S. (2018) A theoretical study on lidocaine solubility in deep eutectic solvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 27464-27473.

Gutierrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., del Monte, F. (2009) Freeze drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of self assembled structures. *Langmuir* **25**, 5509-5515.

Hammond, O. S., Bowron, D. T., Edler, K. J. (2017) The effect of water upon deep eutectic solvent nanostructure: an unusual transition from ionic mixture to aqueous solution. *Angew. Chemie Int. Ed.* **56**, 9782–9785.

Hammons, J. A., Ustarroz, J., Muselle, T., Torriero, A. A. J., Terryn, H., Suthar, K., Ilavsky, J. (2016) Supported silver nanoparticle and near-interface solution dynamics in a deep eutectic solvent. *J. Phys. Chem. C.* **120**, 1534–1545.

Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. S., Saheed, O. K. (2013) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **99**, 2193-2195.

Heimbach, T., Fleisher, D., Kaddoumi, A. (2007) Overcoming poor aqueous solubility of drugs for oral delivery. *Prodrugs.* **5**, 157-215.

Hidalgo, I. J. (2001) Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**, 385-401.

Hodgdon, T. K., Kaler, E. W. (2007) Hydrotropic solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **12**, 121-128.

Hou X. D., Liu Q. P., Smith T. J., Li, N., Zong M. H. (2013) Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Cholinium Amino Acids Ionic Liquids. *PLoS One.* **8**, 1-7.

Incandela, L., Cesarone, M. R., DeSanctis, M. T., Belcaro, G., Dugall, M., Acerbi, G. (2002) Treatment of diabetic microangiopathy and edema with HR (Paroven, Venoruton: o-(β -hydroxyethyl)-rutosides): a prospective, placebo-controlled randomized study. *J Cardiovasc Pharm T.* **7**, 11-15.

Jia, S.-S., Xi, G.-P., Zhang, M., Chen, Y.-B., Lei, B., Dong, X.-S., Yang, Y.-M. (2013) Induction of apoptosis by D – limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* **29**, 349-354.

Kalepu, S., Nekkanti, V. (2015) Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B.* **5**, 442-453.

Kareem, M.A., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., Hadj – Kali, M. K. O., Saadat, F., Bagh, G., Alnashef, I. M. (2012) Phase equilibria of a toluene/heptane with tetrabutylphosphonium bromide based deep eutectic solvents for the potential use in the separation of aromatics from naphtha. *Fluid Phase Equilib.* **333**, 47-54.

Kawabata Y., Wada, K., Nakatani, M., Yamada, S., Onoue, S. (2011) Formulation design for poorly water soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. *Int J. Pharm.* **420**, 1-10.

Khezeli, T., Daneshfar, A., Safraei, R. (2016) A green ultrasonic – assisted liquid – liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the HPLC – UV determination of ferulic, caffeic and cinnamic acid from olive, almond, sesame and cinnamon oli. *Talanta* **150**, 577-585.

Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. (2013) Techinques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* **18**, 2328-2375.

Krol, S., Macrez, R., Docagne, F. Therapeutic benefits from nanoparticles: The potential significance of nanoscience in diseases with compromise to the blood brain barrier. *Chem Rev.* **113**, 1877-1903.

Lee, E. R., Kang, G. H., Cho, S. G. (2008) Effects of flavonoids on human health. Old subjects but new challenges. *Recent Pat Biotechnol.* **1**, 139-150.

- Lee, Y. H., Thomas, P., Scharnitz, B. S., Muscat, J., Chen, A., Gupta-Elera, G., Kirby, J. S. (2016) Laboratory monitoring during isotretinoin therapy for acne. A systematic review and meta – analysis. *JAMA Dermatol.* **152**, 35-44.
- Lennernäs, H., Palm, K., Fagerholm, U. Artursson, P. (1996) Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human in vivo. *Inter J Pharm.* **127**, 103-107.
- Leuner, C., Dressman, J. (2000) Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **12**, 413-420.
- Lin, I. B. J., Vasam, C. S. (2005) Metal – containing ionic liquids and ionic liquid crystals based on imidazolium moiety. *J. Org. Chem.* **690**, 3498-3512.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* **46**, 3-26.
- Liu, W. Y., Su, D. F. (2014) Blood-brain barrier is not a barrier in the development of new drugs for ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther.* **20**, 1013-1014.
- Liu, Y., Brent Friesen, J., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S. N., Pauli, G. F. (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J. Nat. Prod.* **8**, 679-690.
- Liu, Y., Garzon, J., Friesen, B., Zhang, y., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S.-N., Pauli, G. F. (2016) Countercurrent assisted quantitative recovery of metabolites from plant-associated natural deep eutectic solvents. *Fitoterapia.* **112**, 30-37.
- Lobenberg, R., Amidon, G. L. (2000) Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approach to international regulatory standards. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 3-12.
- Lu, C., Cao, J., Wang, N., Su, E. (2013) Significantly improving the solubility of non – steroidal anti – inflammatory drug sin deep eutectic solvents for potential non – aqueous liquid administration. *R. Soc. Chem.* **7**, 1-3.

- Maher, S., Mrsny, R. J., Brayden, D. J. (2016) Intestinal permeation enhancers for oral peptide delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **106**, 277-319.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.
- Manda, G., Mocanu, M., Marin, D., Taranu, I. (2015) Dual effects exerted in vitro by micromolar concentrations of deoxynivalenol on differentiated Caco-2 cells. *Toxins* **7**, 593-603.
- Manna, C., Galletti, P., Maisto, G., Cucciolla, V., D'Angelo, S. (2000) Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Lett.* **470**, 341-344.
- Martinez, R., Berbegal, L., Guillena, G., Ramon, D. J. (2016) Bio – renewable enantioselective aldol reaction in natural deep eutectic solvents. *Green Chem.* **18**, 1724-1730.
- Matsson, P., Bergstrom, C. A., Nagahara, N. (2005) Exploring the role of different drug transport routes in permeability screening. *J Med Chem.* **48**, 604-613.
- Mitar, A., Panić, M., Prlić Kardum, J., Halambek, J., Sander, A., Zagajski Kučan, K., Radojčić Redovniković, I., Radošević, K. (2019) Physicochemical properties, cytotoxicity, and antioxidative activity of natural deep eutectic solvents containing organic acid. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **33**, 1–18.
- Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B. (2010) *Natural Toxins. U: Clarke's analysis of drugs and poisons*, (Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., ured.) Pharmaceutical Press, London.
- Morrison H. G., Sun C. C., Neervannan S. (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int J Pharm.* **378**, 136-139.
- Neduri, K., Bontha, V. K., Vemula, S. K. (2013) Different techniques to enhance the dissolution rate of lovastatin: Formulation and evaluation. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **6**, 56-60.

Nesamony, J. Karla, A., Majrad, M. S., Boddu, S. H. S., Jung, R., Williams, F. E., Schnapp, A. P. M., Nauli, S. M., Kalinoski, A. L. (2013) Development and characterization of nanostructured mists with potential for actively targeting poorly water-soluble compounds into the lungs. *Pharm. Res.* **30**, 2625-2639.

Obermeir, B., Daneman, R., Ransohoff, R. M. (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* **19**, 1584-1596.

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**, 1063–1071.

Panić, M., Radić Stojković, M., Kraljić, K., Škevin, D., Radojčić Redovniković, I., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2019) Ready-to-use green polyphenolic extracts from food byproducts. *Food Chemistry.* **283**, 628-636.

Park C. W., Kim, J. Y., Rhee, Y. S., Oh, T. O., Ha, J. M., Choi, N. Y., Chi, S. C., Park, E. S. (2012b) Preparation and valuation of a topical solution containing eutectic mixture of itraconazole and phenol. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 1935 – 1943.

Park, C. W., Mansour, H. M., Oh, T. O., Kim, J. Y., Ha, J. M., Lee, B. J., Seo, M. H. (2012a) A mixed polymeric micellar formulation of itraconazole – phenol mixtures and its pharmaceutical applications. *Int J. Pharm.* **436**, 652 – 658.

Parrott, N., Lave, T. (2002) Prediction of intestinal absorption: comparative assessment of GASTROPLUS and IDEA. *Eur J Pharm Sci.* **17**, 51-61.

Pedro, S. N., Freire, M. G., Freire, C. S. R., Silvestre, J. D. (2019) Deep eutectic solvents comprising active pharmaceutical ingredients in the development of drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* **16**, 1742-1753.

Peng, X., Duan, M.-H., Yao, X.-H., Zhang, Y.H., Zhao, C.-J., Zu, Y., Fu, Y.-J. (2016) Green extraction of five target phenolic acid from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent. *Sep. Purif. Technol.* **157**, 249-257.

- Pereira, C. V., Silva, J. M., Rodriguez, L., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C., Matias, A. (2019) Unveil the anticancer potential of limonene based therapeutic deep eutectic solvents. *Sci Rep.* **9**, 14926-14936.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assman, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. (1983) Enterocyte - like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco - 2 in culture. *Biol Cell.* **47** (323), 323-30.
- Press, B., di Grandi D. (2008) Permeability for intestinal absorption: Caco - 2 assay and related issues. *Curr Drug Metab.* **9**, 893-900.
- Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić, Redovniković, I. (2014) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol Environ Saf.* **112**, 46-83.
- Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Cvjetko Bubalo, M., Frece, J., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ Sci Pollut Res.* **25**, 14188-14196.
- Radović, M., Panić, M., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kemija u industriji* (rad prihvaćen za objavljivanje)
- Rodriguez-Vaquero, M. J., Aredas Fernandez, P. A., Manca de Nadra, M. C., Strasser De Saad, A. M. (2010) Phenolic compound combinations on Escherichia coli viability in a meat system. *J Agric. Food Chem.* **58**, 6048-6052.
- Ruesgas-Ramon, M., Figureoa-Espinoza, M. C., Durand, E. (2017) Application of Deep eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *J. Agric. Food. Chem* **65**, 3591-3601.
- Schultheiss, N., Newman, A. (2009) Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Cryst. Growth Des.* **6**, 2950-2967.
- Shahbaz, K., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., AlNashef, I. M. (2011) Prediction of deep eutectic solvents densities at different temperatures. *Thermochim. Acta*, **515**, 67-72.

Shahidi, F., Zhong, Y. (2010) Novel antioxidant in food quality preservation and health promotion. *Eur J Lipid Sci . Technol.* **11**, 622-646.

Shityakov, S., Salvador, E., Forster, C. (2013) In silico, in vitro and in vivo methods to analyse drug permeation across the blood – brain barrier: a critical review. *OA Anaesthetics.* **1**, 13-20.

Sintra, T. E., Luis, A., Rocha, S. N., Lobo Ferreira, A. I. M. C., Goncalves, S., Santos, L. M. N. B. F., Neves, B. M., Freire, M. G., Ventura, S. P. M., Coutinho, J. A. P. (2015) Enhancing the antioxidant characteristics of phenolic acids by their conversion into cholinium salts. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **3**, 2558 – 2565.

Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060-11082.

Stott, P. W., Williams, A. C., Barry, B. W. (1998) Transdermal delivery from eutectic systems: Enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J. Control. Release* **50**, 297 - 308.

Subbarao, C. V., Chakravarthy, I. P.K., Sai Bharadwaj, A. V. S. L., Prasad, K. M. M. (2012) Functions of hydrotropes in solutions. *Chem. Eng. Technol.* **35**, 225-237.

Subramanian, D., Boughter, C. T., Klauda, J. B., Hammouda, B., Anisimov, M. A. (2013) Mesoscale inhomogeneities in aqueous solutions of small amphiphilic molecules. *Faraday Discuss.* **167**, 217-238.

Sun, H., Chow., E. C., Liu, S., Du, Y., Pang, K. S. (2008) The Caco – 2 cells monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **4**, 395 – 411.

Sun, J. (2007) D – Limonene: safety and clinical applications. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* **12**, 259-264.

Tang, B., Eun Park, H., Ho Row, K. (2015) Simultaneous extraction of flavonoids from *Chamaecyparis obtusa* using deep eutectic solvents as additives of conventional extractions solvents. *J. Chromatogr. Sci.* **53**, 836 – 840.

Tang, B., Ho, K. (2013) Recent development sin deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatsh. Chem.* **144**, 1427-1454.

- Tang, S. L., Smith, R. L., Poliakoff, M. (2005) Principles of green chemistry: Productively. *Green Chem.* **11**, 761-762.
- Tarate, B., Bansal, A. K. (2015) Characterization of CoQ-10 lauric acid eutectic system. *Thermochim. Acta.* **605**, 100-106.
- Thakuria, R., Delori, A., Jones, W., Lipert, M. P., Roy, L., Rodriguez-Hornedo, N. (2013) Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *Int J. Pharm.* **453**, 101-125.
- Tian, D., Guo, Y., Hu, J., Yang, G., Zhang, J., Luo, L., Xiao, Y., Deng, S., O. Deng, O., Zhou, W., Shen, F. (2020) Acidic deep eutectic solvents pretreatment for selective lignocellulosic biomass fractionation with enhanced cellulose reactivity. *Int. J. Biol. Macromol.* **142**, 288–297.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.
- Tuntarawongsa, S., Phaechamud, T. (2012) Menthol, borneol, camphor and WS-3 eutectic mixture. *Biomater Appl.* **506**, 355-358.
- Van Breemen, R. B., Li, Y. (2005) Caco – 2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **1**, 175-185.
- Vasconcelos, T., Sarmiento, B., Costa, P. (2007) Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov. Today.* **12**, 1068-1075.
- Vigushin, D. M., Poon, G. K., Boddy, A., English, J., Halbert, G. W., Pagonis, C., Jarman, M., Coombes, R. C. (1998) Phase I and pharmacokinetic study of D – limonen in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother Pharmacol.* **42**, 111-117.
- Walle, U. K., Galijatovic, A., Walle, T. (1999) Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco – 2. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 431-438.
- Wang, H., Gurau, G., Shamshina, J., Cojocar, O. A., Janilowski, J., MacFarlane, D. R., Davis, J.H., Rogers, R. D. (2014) Simultaneous membrane transport of two active

pharmaceutical ingredients by charge assisted hydrogen bond complex formation. *Chem. Sci.* **5**, 3449 – 3459.

Wang, W., Cai, Y., Liu, Y., Zhao, Y., Feng, J., Liu, C. (2017) Microemulsions based on paeonol – menthol eutectic mixture for enhanced transdermal delivery: formulation development and in vitro evaluation. *Artif Cell Nanomed B.* **45**, 1241-1246.

Williams, W. D., Trevaskis, N. L., Charman, S. A., Shanker, R. M., Chatman, W. N., Pouton, C. W., Porter, C. J. H. (2013) Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev.* **65**, 315-499.

Yang, Z. (2019) Toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents and natural deep eutectic solvents. U: Deep eutectic solvents: synthesis, and application, (ured. Ramon, D. J. i Guillena G.) Wiley-VCH Verlag GmbH & KGaA, str. 43-60.

Ye, G., Wang, S., Heng, P. W. S., Chen, L., Wang, C. (2007) Development and optimization of solid dispersion containing pellets of itraconazole prepared by high shear pelletization. *Int. J. Pharm.* **337**, 80-87.

Yu, C., Shin, Y. G., Chow, A. (2002) Human rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharm. Res.* **19**, 1907-1914.

Zhang, Q., de Oliveira Vigier, K., Royer, S. Jérôme, F. (2012) Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108–7146.

Zhang, Y., Lane, M. E., Hadrhaft, J., Heinrich, M., Chen, T., Lian, G., Sinko, B. (2019) A comparison of the in vitro permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model. *Int. J. Pharm.* **556**, 142–149.

Zhu, C., Jiang, L., Chen, T., Hwang, K. (2002) A comparative study of artificial membrane permeability assay for high through profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Med. Chem.* **37**, 399-407.