

Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za poboljšanje formulacije lijeka s derivatima ciprofloksacina kao aktivnim farmaceutskim sastojkom

Belavić, Viktorija

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:159:681844>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Viktorija Belavić

**PRIMJENA
NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA
POBOLJŠANJE FORMULACIJE
LIJEKA S DERIVATIMA
CIPROFLOKSACINA KAO
AKTIVNIM FARMACEUTSKIM
SASTOJKOM**

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, te uz pomoć dr. sc. Manuele Panić.

Projekt: „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otopala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“ (HRZZ IP-2019-04-7712)

Izvor financiranja: Hrvatska zaklada za znanost

Voditelj projekta: prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković



ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević na vodstvu i nesebičnoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada te na prenesenom znanju. Hvala joj što mi je podijelila ne samo stručne nego i životne savjete. Veliko hvala i dr. sc. Manueli Panić na uloženom trudu i vremenu tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada te najviše na strpljenju za sva moja pitanja. Hvala i ostatku Laboratorija na ugodnoj radnoj atmosferi i pruženoj pomoći.

Posebno se zahvaljujem roditeljima, obitelji, dečku i prijateljima koji su mi bili najveća podrška i motivacija tijekom cijelog mog obrazovanja i koji su mi pružili beskrajnu ljubav te uvijek vjerovali u moj uspjeh.

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 ZA POBOLJŠANJE FORMULACIJE LIJEKA S DERIVATIMA CIPROFLOKSACINA KAO AKTIVNIM FARMACEUTSKIM SASTOJKOM

Viktorija Belavić, univ. bacc. ing. biotechn.
0058208091

Sažetak: Cilj ovoga rada je poboljšanje topljivosti aktivnih farmaceutskih sastojaka (API) primjenom prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES) kao zelenih otapala te sinteza derivata ciprofloksacina zbog sve većeg problema antibiotske rezistencije spram tog lijeka. Upotrebom softvera COSMOtherm predviđena je topljivost dva 7-(4-(supstituiran)piperazin-1-il) derivata ciprofloksacina u NADES-ima, pri čemu je najbolja topljivost predviđena u kiselim i hidrofobnim otapalima. UV/Vis spektrofotometrijom je eksperimentalno određena najbolja topljivost derivata u hidrofobnom NADES-u timol:kumarin (3:2) koja iznosi 10 mg mL⁻¹ za *N*-acetilirani i 5 mg mL⁻¹ za *N*-2-metilpentanoilni derivat. Stabilnost formulacija praćena je spektrofotometrijski tijekom vremena pri 4 °C i 25 °C te su derivati stabilni prvih desetak dana, nakon čega je došlo do pada stabilnosti. Testom propusnosti kroz umjetnu membranu (PAMPA) uočeno je poboljšanje propusnosti *N*-acetiliranog derivata u formulaciji s NADES-om, ali ne i za drugi derivat. Ispitana je biološka aktivnost otopina derivata ciprofloksacina na Caco-2 staničnoj liniji, pri čemu je primijećeno inhibitorno djelovanje na rast stanica.

Ključne riječi: prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, derivati ciprofloksacina, COSMOtherm, PAMPA, biološka aktivnost

Rad sadrži: 56 stranica, 18 slika, 3 tablice, 66 literaturnih navoda, 0 priloga

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

Pomoć pri izradi: Manuela Panić, dr. sc.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Senka Djaković (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (mentor)
3. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (član)
4. doc. dr. sc. Jasmina Lapić (zamjenski član)

Datum obrane: 20. prosinca 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 Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

APPLICATION OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS FOR IMPROVEMENT OF DRUG FORMULATION WITH CIPROFLOXACIN DERIVATIVES AS AN ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT

*Viktorija Belavić, univ. bacc. ing. biotechn.
0058208091*

Abstract: The aim of this work is to improve the solubility of active pharmaceutical ingredients (API) by using natural deep eutectic solvents (NADES) as green solvents and the synthesis of ciprofloxacin derivatives due to the growing problem of antibiotic resistance. Using COSMOtherm software, the solubility of two 7-(4-(substituted)piperazin-1-yl) ciprofloxacin derivatives in NADESs was predicted, with the best solubility in acidic and hydrophobic solvents. Solubility was experimentally determined by UV/Vis spectrophotometry and the best solubility of derivatives was in the hydrophobic NADES thymol:coumarin (3:2) of 10 mg mL⁻¹ for *N*-acetyl and 5 mg mL⁻¹ for *N*-2-methylpentanoyl derivative. The stability of the formulation was monitored spectrophotometrically over the time at 4 °C and 25 °C and the derivatives were stable for the first ten days, afterward a decrease in stability was observed. The parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) was conducted and improvement of permeability *N*-acetyl derivative in the formulation with NADES was detected, but not for another derivative. The biological activity of solution of ciprofloxacin derivatives on the Caco-2 cell line was examined, and an inhibitory effect on cell growth was determined.

Keywords: *natural deep eutectic solvents, ciprofloxacin derivatives, COSMOtherm, PAMPA, biological activity*

Thesis contains: 56 pages, 18 figures, 3 tables, 66 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Kristina Radošević, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: *Manuela Panić, PhD*

Reviewers:

1. Senka Djaković, PhD, Full professor
2. Kristina Radošević, PhD, Associate professor
3. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor
4. Jasmina Lapić, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: December 20th, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. CIPROFLOKSACIN	3
2.1.1. Antimikrobna i antitumorska svojstva	4
2.1.2. Fizikalna i farmakokinetička svojstva	4
2.1.3. Antibiotička rezistencija	5
2.2. DERIVATI CIPROFLOKSACINA	7
2.2.1. <i>N</i> -acilirani derivati ciprofloksacina	7
2.3. ZELENA OTAPALA	9
2.3.1. Niskotemperaturna eutektička otapala	10
2.3.1.1. <i>Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala</i>	10
2.3.1.2. <i>Toksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala</i>	12
2.3.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u farmaceutici	14
2.3.2.1. <i>Otapanje teško topljivih spojeva</i>	14
2.3.2.2. <i>Terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala</i>	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Derivati ciprofloksacina	18
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Caco-2 stanična linija	19
3.1.4. Oprema	20
3.1.5. Otopine i puferi	20
3.2. METODE RADA	21
3.2.1. Sinteza derivata ciprofloksacina	21
3.2.2. Sinteza prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES)	22
3.2.3. Procjena topljivosti derivata ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima korištenjem softvera COSMOtherm	23
3.2.4. Eksperimentalna provjera topljivosti derivata ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	25
3.2.5. UV/Vis spektrofotometrija	26
3.2.6. Stabilnost derivata ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	28
3.2.7. <i>In vitro</i> ispitivanje biološke aktivnosti derivata ciprofloksacina na Caco-2 staničnoj liniji	28
3.2.7.1. <i>Uzgoj, određivanje broja i naciepljivanje Caco-2 stanica</i>	28

3.2.7.2. <i>MTS metoda određivanja biološke aktivnosti derivata ciprofloksacina na Caco-2 stanice</i>	29
3.2.8. Određivanje propusnosti kroz umjetnu membranu- PAMPA test.....	30
3.2.9. Obrada rezultata	32
4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1. PROCJENA TOPLJIVOSTI DERIVATA CIPROFLOKSACINA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA POMOĆU SOFTVERA COSMO^{therm}	34
4.2. TOPLJIVOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	37
4.3. STABILNOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA U ODABRANOM PRIRODNOM NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU	39
4.4. PERMEABILNOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA U ODABRANOM PRIRODNOM NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU	42
4.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA	44
5. ZAKLJUČCI	48
6. LITERATURA	49

1. UVOD

Ciprofloksacin je fluorokinolonski antibiotik širokog spektra djelovanja koji inhibira bakterijske topoizomerase tipa II te djeluje na gram-negativne i gram-pozitivne bakterije. Međutim, bakterijska rezistencija na lijekove čini ciprofloksacin sve neučinkovitijim. Zbog toga, postoji potreba za razvojem novih antibakterijskih lijekova odnosno raznovrsnih derivata ciprofloksacina učinkovitih protiv rezistentnih patogena. Dosadašnja istraživanja mnogih derivata ciprofloksacina pokazala su veliku *in vitro* i *in vivo* aktivnost prema organizmima rezistentnih na fluorokinolone, ali i prema organizmima koji su rezistentni na više skupina lijekova (Zhang i sur., 2018).

Izuzev antibiotske rezistencije, obilježje ciprofloksacina je i njegova slaba topljivost u vodi, što utječe na njegovu nisku bioraspoloživost i posljedično na otežanu isporuku lijeka na ciljno mjesto. Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije lijekova (eng. *Biopharmaceutics classification system*, BCS) ciprofloksacin pripada četvrtoj skupini lijekova s niskom topljivosti i niskom permeabilnosti (Assali i sur., 2016). Topljivost aktivnih farmaceutskih sastojaka lijeka (eng. *Active Pharmaceutical Ingredients*, API) predstavlja glavni problem za farmaceutsku industriju te su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES) pronašla svoju primjenu u poboljšanju topljivosti (Abidin i sur., 2019). Niskotemperaturna eutektička otapala definiraju se kao smjese nabijenog akceptora vodika (kvaterna amonijeva sol) i nenabijenog donora vodika (ugljikohidrati, amini, amidi, alkoholi i vitamini) povezani jakim vodikovim vezama, pri čemu dolazi do snižavanja točke tališta u usporedbi s pojedinačnim komponentama te do nastajanja tekuće smjese na sobnoj temperaturi (Kudlak i sur., 2015). Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala su podskupina eutektičkih otapala sastavljena od primarnih metabolita, najčešće organskih kiselina, aminokiselina, šećera i alkohola (Paiva i sur., 2014). NADES-i u potpunosti zadovoljavaju načela zelene kemije jer ih karakterizirana niska cijena, niska toksičnost, biorazgradivost, jednostavna priprema i mogućnost reciklacije (Cvjetko Bubalo i sur, 2018), stoga se u posljednjih pet godina zbog svog zelenog karaktera istražuju u poboljšanju topljivosti, permeabilnosti i apsorpciji lijekova.

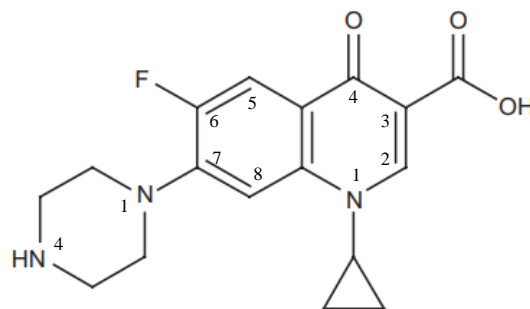
Cilj rada je bio ispitati mogućnost primjene NADES-a kao otapala za poboljšanje topljivosti API-ja u odnosu na organska otapala te sinteza derivata ciprofloksacina radi sve većeg problema antibiotske rezistencije. Topljivost će se prvotno predvidjeti pomoću softvera COSMO $_{therm}$, a potom i eksperimentalno primjenom UV/Vis spektrofotometrije. Potom će se

pratiti stabilnost formulacija derivata u odabranim NADES-ima pri različitim temperaturama kroz određeni vremenski period. Nadalje, MTS metodom ispitati će se *in vitro* biološka aktivnost pripremljenih formulacija odnosno otopina derivata ciprofloksacina na Caco-2 staničnoj liniji. Primjenom testa propusnosti (PAMPA testa), ispitat će se prolaznost otopine derivata ciprofloksacina u NADES-u kroz umjetnu membranu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. CIPROFLOKSACIN

Ciprofloksacin pripada drugoj generaciji fluorokinolonskih antibiotika širokog spektra djelovanja koji se primjenjuju za liječenje različitih bakterijskih oboljenja. Fluorokinoloni su skupina sintetskih lijekova jakog antibakterijskog djelovanja, a strukturno su slični nalidiksinskoj kiselini. Antibiotici ove skupine imaju odličnu bioraspoloživost, dobru apsorpciju u tkivima i relativno nisko štetno i toksično djelovanje. Potencijalno se primjenjuju u liječenju bakterijskih infekcija respiratornog i urinarnog trakta, kroničnog prostatitisa, infekcija kože, kostiju i mekog tkiva, te spolno prenosivih bolesti. S naglaskom na antimikrobnu primjenu, sve više se primjenjuju i kao antitumorski lijekovi i lijekovi protiv malarije. Najučinkovitiji fluorokinolon, ciprofloksacin, 1-ciklopropil-6-fluor-7-(piperazin-1-il)-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina (slika 1), patentiran je 1983. godine te je 1987. godine odobren od strane Američke agencije za hranu i lijekove (eng. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) (Sharma i sur., 2010; Castro i sur., 2013).



Slika 1. Struktura molekule ciprofloksacina (Sharma i sur., 2010)

Mehanizam djelovanja fluorokinolona temelji se na inhibiciji dvaju esencijalnih bakterijskih enzima, DNA giraze i topoizomeraze IV iz skupine topoizomeraza tipa II važnih za replikaciju, transkripciju, rekombinaciju i popravak bakterijske DNA. Fluorokinoloni stvaraju ternarne komplekse s podjedinicama DNA giraze i topoizomeraze IV i molekulom DNA što dovodi do prekida replikacije, cijepanja bakterijske DNA i smrti bakterija. DNA topoizomeraze tipa II u eukariotskim stanicama su različito građene i otporne na djelovanje fluorokinolona. Međutim, fluorokinoloni mogu inhibirati i eukariotsku DNA topoizomerazu II ako se primjenjuju za liječenje mikrobnih infekcija u 100 puta većoj koncentraciji od potrebne,

što ukazuje na potencijalnu primjenu ovog antibiotika za liječenje tumora (Conley i sur., 2018; Weitner i sur., 2004).

2.1.1. Antimikrobna i antitumorska svojstva

Ciprofloksacin jače djeluje na gram-negativne bakterije nego na gram-pozitivne i atipične patogene. Prvenstveno se koristi u liječenju infekcija izazvanih gram-negativnim uzročnicima poput *E. coli*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, te vrsta *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* i *Neisseria* i gram-pozitivnih bakterija vrste *Staphylococcus* (Weitner i sur., 2004). Mnoga *in vitro* ispitivanja osjetljivosti antibiotika pokazala su da je minimalna inhibitorna koncentracija (eng. *Minimum inhibitory concentration*, MIC) ciprofloksacina puno veća prema gram-negativnim bakterijskim sojevima za razliku od ostalih fluorokinolona (Sharma i sur., 2010).

Osim dobro opisanog antimikrobnog djelovanja ciprofloksacin pokazuje i antiproliferativni i apoptotički učinak prema određenim tumorskim staničnim linijama. Koristi se u liječenju raka prostate, jer u većim dozama od onih koji se primjenjuju za liječenje bakterijskih infekcija, ovaj fluorokinolon pokazuje antiproliferativno djelovanje i izaziva apoptozu stanica raka prostate, a zbog svoje netoksičnosti sigurniji je od kemoterapije. Za pacijente oboljele od raka, oralna primjena ciprofloksacina je sigurna i učinkovita za mnoge ozbiljne infekcije (Sharma i sur., 2010). *In vitro* ispitivanja na tumorskim stanicama prijelaznog epitela mokraćnog mjehura pokazala su da ciprofloksacin djeluje inhibirajuće na rast stanica ovisno o dozi i vremenu (Aranha i sur., 2000). Herold i sur. (2002) proveli su istraživanje na staničnim linijama karcinoma debelog crijeva te pokazali da ciprofloksacin zaustavlja rast i potiče staničnu smrt procesom apoptoze.

2.1.2. Fizikalna i farmakokinetička svojstva

Ciprofloksacin dolazi u obliku bijelog praha gorkog okusa. Čuva se na temperaturi od +4 °C i na tamnom mjestu zbog moguće fotolitičke razgradnje. Temperatura tališta ciprofloksacina je 313-315 °C, a slabo je topljiv u vodi, metanolu, etanolu i acetonu, dok ima dobru topljivost u octenoj kiselini (Sharma i sur., 2010). Topljivost ciprofloksacina pri 20 °C u vodi iznosi 0,067 mg mL⁻¹, dok je u acetonu 0,107 mg mL⁻¹. Povećanjem temperature povećava se i topljivost, te pri 30 °C topljivost u vodi iznosi 0,080 mg mL⁻¹ i 0,164 mg mL⁻¹ za aceton (Caço i sur., 2008). Izoelektrična točka ciprofloksacina iznosi pI=7,14 što polazi od srednje vrijednosti pKa₁=6,09 za 6-karboksilnu grupu i pKa₂=8,62 za N-4 piperazinskog prstena. Pri fiziološkom pH, pKa₂

iznosi 8,25 te dolazi do značajne disocijacije obje nabijene grupe i do stvaranja zwitterionskog oblika (Sharma i sur., 2010). Topljivost antibiotika ciprofloksacina ovisi i o pH vrijednosti. Pri pH-vrijednosti 4-5 pokazuje najveću topljivost ($>40 \text{ mg mL}^{-1}$) ako se pH podesi pomoću klorovodične kiseline, jer dolazi do stvaranja hidrokloridnog oblika ciprofloksacina. Ciprofloksacin je gotovo netopiv pri neutralnom pH, dok se porastom pH povećava topljivost te pri pH 11 iznosi približno 30 mg mL^{-1} (Parwe i sur., 2014).

U farmakokinetička svojstva ubrajamo apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju (eng. *absorption, distribution, metabolism, and excretion*; ADME). Ciprofloksacin se lako apsorbira, ali potpuna apsorpcija se ne postiže oralnom primjenom. Apsolutna bioraspoloživost oralnog ciprofloksacina iznosi 70 do 80 %, bez značajnog gubitka. Distribucija ciprofloksacina u tkivo je bolja od drugih lijekova iste skupine zbog slabog vezanja na proteine plazme. Ciprofloksacin dobro prolazi u različite tekućine i tkiva, osim u središnji živčani sustav nakon oralne primjene. Koristi se uglavnom za infekcije mokraćnog sustava jer je koncentracija lijeka u mokraći veća od minimalne inhibitorne koncentracije. Metabolizam ciprofloksacina se uvelike razlikuje u stupnju do kojeg se metabolizira i eliminira u jetri ili bubrežnim izlučivanjem. Primarni put eliminacije je putem bubrega, dok je sekundarni put izlučivanja preko jetre (Sharma i sur., 2010).

2.1.3. Antibiotička rezistencija

Bakterijske infekcije predstavljaju značajnu prijetnju zdravlju na globalnoj razini i odgovorne su za većinu bolničkih infekcija što dovodi do velike smrtnosti i opterećenja zdravstvenog sustava. Druga generacija fluorokinolonskih antibiotika pokazuje izvrsno antimikrobno djelovanje i farmakokinetička svojstva te je uvedena u kliničku praksu za liječenje bakterijskih infekcija otprilike 3 desetljeća. Međutim, danas široko rasprostranjeni antibiotičko rezistentni patogeni čine lijekove poput ciprofloksacina sve neučinkovitijima, pa je naglasak na razvitku novih antibakterijskih lijekova. Evolucija novih virulentnih oblika bakterija, poput patogena otpornih na lijekove s različitom razinom rezistencije kao što su meticilin-rezistentna *S. aureus* (MRSA), meticilin-rezistentna *S. epidermidis* (MRSE), vankomicin-rezistentna *S. aureus* (VRSA), dovela je do povećanja stope smrtnosti. Zbog toga, postoji potreba za racionalnim dizajnom novih i učinkovitih derivata antibiotika s velikim potencijalom protiv patogena rezistentnih na postojeće lijekove (Zhang i sur., 2018).

Harrison i Lederberg (1998) definirali su antibiotičku rezistenciju kao sposobnost bakterije da inaktivira ili isključuje antibiotik, ili mehanizam koji blokira inhibitorne ili smrtonosne

učinke antibiotika. Bakterije postanu rezistentne na djelovanje antibiotika radi spontanih promjena - mutacija, koje se povremeno javljaju radi pogrešaka u replikaciji DNA u pojedinim jedinkama. Fluorokinoloni izazivaju oštećenje bakterijske DNA, stoga je terapija ovom vrstom antibiotika podložna tim promjenama. Postoje dva mehanizma stvaranja rezistencije na fluorokinolone: 1) promjena u strukturi enzima DNA giraze i topoizomeraze IV i 2) smanjenje koncentracije lijeka unutar bakterijske stanice smanjenom permeabilnošću lijeka u stanicu ili povećanom aktivnošću pumpi koje lijek izbacuju iz stanice. Promjena enzima važnih za replikaciju DNA podrazumijeva smanjen afinitet za molekulu fluorokinolona, koja se ne može vezati za njih i time gubi aktivnosti. Promjena se događa na mjestu bakterijskog kromosoma koji kodira za redosljed aminokiselina u podjedinici enzima koje se naziva QRDR (eng. *quinolone resistance determining region*) tj. područje koje određuje rezistenciju na kinolone. Drugi mehanizam stvaranja rezistencije smanjenjem koncentracije lijeka unutar bakterijske stanice bazira se na smanjenju količine membranskih proteina - porina, koji sudjeluju u ulasku fluorokinolona u bakterijsku stanicu procesom difuzije. Proteinske pumpe u bakterijskoj citoplazmatskoj membrani odgovorne su za izbacivanje pojedinih molekula iz stanice. Ukoliko dođe do mutacija u DNA koja će povećati ekspresiju gena zaduženog za sintezu tih proteinskih pumpi, doći će i do povećanog izbacivanja fluorokinolona iz bakterijske stanice te samim time i smanjenje antibakterijskog učinka. Osim toga, u nekim gram-negativnim bakterijama je primijećena rezistencija na kinolone uzrokovana plazmidima jer bakterije imaju sposobnost razmjene genetskog materijala plazmidima (Hooper, 2002).

Ali i sur. (2010) proveli su *in vitro* testove antimikrobne aktivnosti ciprofloksacina te se pokazalo da je 27,02 % *Escherichia coli* otporno na antibiotik ciprofloksacin, te zatim redom: 21,95 % *Staphylococcus aureus*, 16,66 % *Salmonella typhi*, 72,22 % *Klebsiella pneumonia* i 44,44 % *Pseudomonas aeruginosa*. U radu El Astal (2005) provedeno je istraživanje učestalosti rezistencije ciprofloksacina između 480 izolata dobivenih od pacijenata s urinarnom infekcijom, pri čemu je stopa rezistencije iznosila 15 %, a najveći postotak rezistencije primijećen je kod bakterija *Staphylococcus saprophyticus* (25 %) i *Acinetobacter haemolyticus* (28,6 %). Nedavne studije i meta-analiza pokazale su da se stopa rezistencije na ciprofloksacin u *Escherichia coli* povećava te da uporabu ciprofloksacina potrebno pažljivo dozirati i kontrolirati osobito u zemljama u razvoju (Alsughayer i sur., 2021). Općenito, učestalost rezistencije na fluorokinolone je u porastu, stoga je potrebno oprezno i racionalno koristiti tu skupinu lijekova u dovoljnim dozama i dovoljnom trajanju terapije, kako bi se antibiotska rezistencija svela na minimum (Weitner i sur., 2004).

2.2. DERIVATI CIPROFLOKSACINA

Ciprofloksacin ima snažno antimikrobno djelovanje, no porast antimikrobne rezistencije na ovaj lijek zahtijeva razvoj novih derivata na koji ciljni mikroorganizmi ne bi bili otporni i što bi omogućilo produljenje kliničke upotrebe ovoga lijeka. Istraživanja strukturne aktivnosti fluorokinolona započela su 1970-ih te su omogućila značajna poboljšanja njihove učinkovitosti, spektra djelovanja i *in vivo* aktivnosti (Cormier i sur., 2012). Razvijeni su brojni derivati ciprofloksacina koji su pokazali različita biološka svojstva poput antibakterijskih, antitumorskih, antifungalnih, antioksidacijskih, antimalarijski, antituberkuloznih među kojima antibakterijsko svojstvo glavno područje istraživanja tih derivata (Zhang i sur., 2018). Molekularne modifikacije poput bioizosteričkih zamjena, homologije ili grananja bočnih lanaca, stereokemije i ostale korisne tehnike za dizajnirane derivata i razvoj ciprofloksacina dovele su do postojanja antimikrobnog lijeka širokog spektra djelovanja, minimalne toksičnosti i nuspojava.

Različite modifikacije molekule ciprofloksacina napravljene su radi poboljšanja antibakterijske aktivnosti, ali primarni ciljevi su bili slijedeći:

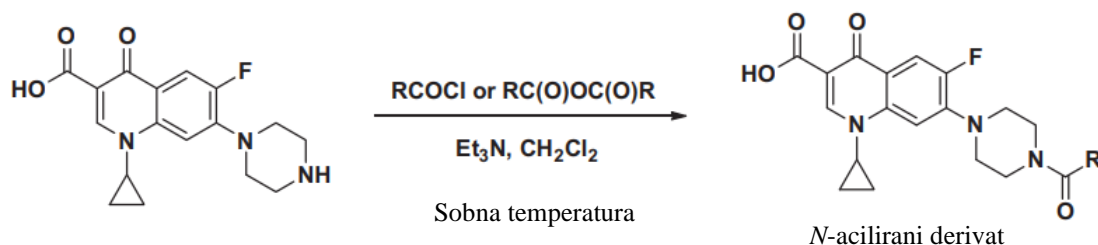
1. Povećanje aktivnosti prema rezistentnim sojevima mikroba, anaeroba i atipičnih mikroorganizama;
2. Smanjenje stope rezistentnosti;
3. Poboljšanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih parametara.

Modifikacije postojećih antibiotika su puno isplativije nego proces razvoja novih antibiotika i njihovog kliničkog ispitivanja. Također, sintetizirani derivati pokazuju veću antibakterijsku aktivnost, veću bioraspoloživost, te poboljšanu distribuciju u tkiva od izvornog ciprofloksacina (Sharma i sur., 2010).

2.2.1. *N*-acilirani derivati ciprofloksacina

Struktura ciprofloksacina omogućuje vezanje susptituenata na brojne ugljikove atome, pri čemu je supstituent na *N*-4 poziciji piperazinskog prstena najvažniji pri svladavanju rezistencije, jer se tim dijelom fluorokinolon veže za topoizomerazu IV (Alsughayer i sur., 2021). Cormier i sur. (2012) pronašli su način kako povećati bioaktivnost ciprofloksacina, te su dizajnirali derivate ciprofloksacina dodatkom hidrofobnih acilnih ostataka na dušik piperazinskog prstena. Dodatak acilnih supstituenata na ovome mjestu smanjuje rezistenciju bakterija na lijekove, povećava hidrofobnost molekule ciprofloksacina što omogućava lakši

prolazak kroz staničnu membranu, te manji afinitet za eksportne membranske proteine. Sinteza *N*-aciliranih derivata ciprofloksacina (slika 2) provedena je tretiranjem ciprofloksacina s odgovarajućim acil-kloridom ili anhidridom kiseline uz prisutnost trietilamina na sobnoj temperaturi.



Slika 2. Sinteza *N*-aciliranih derivata ciprofloksacina (R= metil, etil, propil, butil, pentil itd.)
(prema Cormier i sur., 2012)

Antimikrobna aktivnost sintetiziranih *N*-aciliranih derivata ispitana je disk difuzijskom metodom te je primijećena veća sposobnost inhibicije prema meticilin-rezistentnoj *Staphylococcus aureus* (MRSA) od izvornog ciprofloksacina, pri čemu je najveću aktivnost pokazao *N*-heksanoilni derivat ciprofloksacina. Derivat 1-ciklopropil-6-fluor-7-[4-(2-metilpentanoil)piperazin-1-il]-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina (2-metilpentanoil-ciprofloksacin) ima nižu minimalnu inhibitornu koncentraciju za MRSA soj i ona iznosi $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok je za ciprofloksacin $15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Prilikom ispitivanja učestalost spontanijh mutacija bakterije MRSA, 7-(4-acetilpiperazin-1-il)-1-ciklopropil-6-fluor-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina i 2-metilpentanoil-ciprofloksacin pri MIC od $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ pokazali su aktivnost bolju od ciprofloksacina, jer nije došlo do rasta rezistentnih bakterija. U slučaju gram-negativnih bakterija *E. coli* i *Bartonella sp.*, derivati su pokazali bolju antibakterijsku aktivnost te postoji opći trend smanjenja bioaktivnosti spojeva povećanjem duljine acilnog lanca, što povežujemo s povećanjem hidrofobnosti.

Zhang i sur. (2018) sintetizirali su nekoliko različitih derivata s alkilnim supstituentom na pozicijama *N*-1 i *N*-4 molekule ciprofloksacina, od kojih se *N*-4-metil ciprofloksacin pokazao najučinkovitijim prema gram-pozitivnim *S. aureus* i *S. pneumoniae* te prema dvjema gram-negativnim *P. aeruginosa* i *E. coli*. Njegova minimalna inhibitorna koncentracija značajno je manja od izvornog ciprofloksacina. Marquez i sur. (2014) sintetizirali su četiri *N*-acilirana derivata ciprofloksacina na *N*-4 poziciji piperazinskog prstena (acetil-, benzoil-, etil- i benzil-) te su odredili njihova farmakološka svojstva uključujući antibakterijsku aktivnost, akumulaciju u fagocite, aktivnost prema unutarstaničnim bakterijama i osjetljivost prema eksportnim proteinima. Modifikacija na tom položaju ne utječe na smanjenje antibakterijske

aktivnosti, jer je okosnica strukture fluorokinolona zadržana. Iako ovi derivati pokazuju slabiju antibakterijsku aktivnost od ciprofloksacina, derivat *N*-benzil-ciprofloksacin pokazao je vrlo visoku razinu akumulacije u makrofage i nije osjetljiv na određene bakterijske efluksne pumpe.

Osim antimikrobne aktivnosti, ciprofloksacinu se pripisuje i antiproliferativna i apoptotička aktivnost u nekoliko tumorskih staničnih linija. Vodeći se time, Azema i sur. (2009) sintetizirali su nove derivate ciprofloksacina, supstituirane na *N*-4 položaju piperazinskog prstena, različite hidrofobnosti i ispitani njihovu aktivnost na 5 humanih tumorskih staničnih linija. Također, je ispitana i *in vivo* toksičnost u miševima te su se derivati pokazali netoksično djelovanje prema maksimalnoj toleriranoj dozi $> 80 \text{ mg kg}^{-1}$ što ukazuje da jednostavnim supstituentima možemo regulirati toksičnost. *N*-acilirani derivat s 9 C atoma se pokazao puno učinkovitiji od izvornog ciprofloksacina, te je pokazao veće antiproliferativno djelovanje od *N*-alkoksikarbonilnog i *N*-oksietilalkanoatnog derivata. Povećanjem lipofilnosti, povećava se afinitet za staničnu membranu, a time i lakši ulazak lijeka u stanicu.

Modifikacija piperazinskog dušika acilacijom, ne mijenja efekt molekule prema bakterijskoj meti. *N*-acilirani derivati su vrlo učinkoviti u uništavanju unutarstaničnih bakterija, što ukazuje na prikladnost ovih antibiotika u terapijskom liječenju (Cormier i sur., 2012).

2.3. ZELENA OTAPALA

Globalni ekološki problemi poput onečišćenje zraka, tla i vode te promjena klime predstavljaju veliku opasnost za čovječanstvo, a sve je to posljedica primjene raznih štetnih tvari koje izravno ili neizravno primjenjuju u kemijskoj, petrokemijskoj, farmaceutskoj, biotehnološkoj i agrokemijskoj industriji (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Povećanjem ekološke osviještenosti, pokrenuto je sve više istraživanja za pronalazak „zelenijih“ rješenja s ciljem smanjenja onečišćenja okoliša uzrokovanim tehnološkim procesima uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje i s naglaskom na održivost procesa. Postoji 12 principa zelene kemije, a neki od njih su: zaštita okoliša, ekonomičnost tehnoloških procesa, primjena sigurnijih otapala, dizajniranje sigurnijih kemikalija, učinkovito korištenje energije, upotreba obnovljivih sirovina, upotreba katalizatora i biokatalizatora, upotreba biorazgradivih proizvoda itd. Usvajanjem tih načela mogu se riješiti globalni ekološki problemi, a jedan od takvih je zamjena štetnih organskih otapala sa sigurnim, netoksičnim, jeftinijim i biorazgradivim zelenim otapalima (Kudlak i sur., 2015).

Svakodnevno se u mnogim industrijskim procesima koriste organska otapala koja čine 60 % svih industrijskih emisija te 30 % emisije hlapljivih organskih tvari na planeti. Njihova primjena je neizbježna zbog ključne uloge u otapanju krutina, prijenosu mase i topline, utjecaju viskoznosti te u koracima separacije i pročišćavanja. Međutim, većina organskih otapala je toksična, zapaljiva i korozivna, te uzrokuje brojne negativne učinke na okoliš i ljudsko zdravlje. Osim toga, većina takvih otapala se sastoji od komponenti iz naftnih derivata te je potreba za zamjenom tih komponenti iz obnovljivih izvora. Voda je uvijek prvi izbor otapala jer je netoksična i lako dostupna, ali zbog slabe topljivosti mnogih organskih komponenti u vodi i visokih energetske troškova prilikom izdvajanja vode iz reakcijskih sustava, njena primjena je ograničena (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Kao alternativa organskim otapalima i vodi ističu se različita ekološki prihvatljiva, netoksična, biorazgradiva otapala poput ionskih kapljevina, superkritičnih i subkritičnih fluida, fluorirana otapala, otapala dobivena iz prirodnih ili obnovljivih izvora (npr. niskotemperaturna eutektička otapala i otapala na bazi glicerola). Među njima, niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Deep Eutectic Solvents*, DES) pokazala su najveći potencijal u području zelene kemije zbog svoje neznatne hlapljivosti, nezapaljivosti, biorazgradivosti, niske toksičnosti te upotrebe u različitim područjima od kemijske sinteze, (bio)katalize, razdvajanja i analize različitih spojeva, biomedicine i dr. (Radović i sur., 2021).

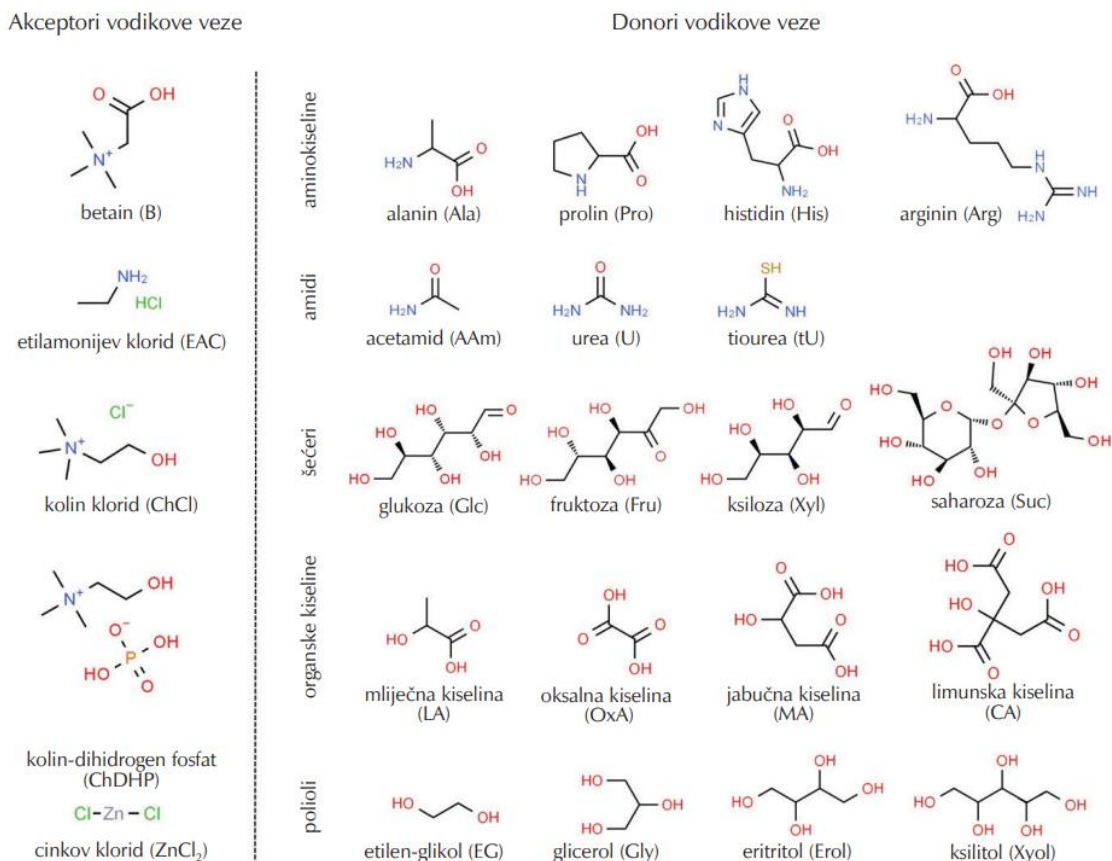
2.3.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

2.3.1.1. Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Niskotemperaturno eutektičko otapalo je smjesa dvije ili više komponenti, koja ima niže talište u odnosu na tališta pojedinačnih sastavnih komponenti (Tang i Row, 2013). Niskotemperaturno eutektičko otapalo dobiva se miješanjem nabijenog akceptora vodika (eng. *hydrogen bond acceptor*, HBA) kao što je netoksična kvaterna amonijeva sol (npr. kolin klorid i betain) i nenabijenog donora vodika (eng. *hydrogen bond donor*, HBD) poput amina, ugljikohidrata, alkohola i karboksilnih kiselina, gdje su komponente povezane jakim vodikovim vezama i u određenom molarnom omjeru. S obzirom na slična fizikalno-kemijska svojstva (nehlapljivost, nezapaljivost, visoka viskoznost) i velikog broja mogućih struktura, DES-ovi se svrstavaju u četvrtu generaciju ionskih kapljevina, iako se radi o različitoj vrsti otapala (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Niskotemperaturna eutektička otapala se jednostavno pripremaju, imaju nisku toksičnost i cijenu, te ih karakterizira veliki broj mogućih kombinacija ishodnih tvari i mogućnost odabira poželjnih fizikalno-kemijskih svojstava što ih čini „dizajniranim“ otapalima. Prilikom sinteze

DES-a može se utjecati na viskoznost, provodljivost, gustoću, točku leđišta i dr. Većina DES-a ima gustoću veću od vode i sirovina od kojih su sintetizirani, a ona ovisi o molarnim omjerima ishodnih tvari. Viskoznost DES-a se može regulirati dodatkom vode pri sintezi ili u već sintetizirano otapalo, te ovisi o temperaturi (Tang i sur., 2015).



Slika 3. Primjer komponenti za sintezu niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Radović i sur., 2021)

Opći postupak sinteze niskotemperaturnih eutektičkih otapala uključuje miješanje dvije ili više tvari u određenom molarnom omjeru uz zagrijavanje (od 50 do 60 °C) do nastanka prozirne tekućine. Neka otapala zahtijevaju dodatak vode koja se može dodati izravno s ostalim komponentama tijekom sinteze ili nakon pripreme u sintetizirano otapalo. Poznato je još nekoliko načina pripreme DES-a, no prvi korak koji uključuje miješanje akceptora i donora vodikove veze u određenom molarnom omjeru je zajednički. Obzirom na ishodne tvari koje se koriste za sintezu niskotemperaturnih eutektičkih otapala razlikujemo četiri vrste: 1) Tip I- kvaterna sol i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe; 2) Tip II- kvaterna sol i halogenid metala poput Cr, Co, Fe; 3) Tip III- kvaterna sol i donor vodikove veze poput amida, kiseline i alkohola i 4) Tip IV- halogenid metala i donor vodikove veze poput amida i alkohola. Većina njih su

tipa III jer se temelje na mješavini jeftinih i lako dostupnih spojeva (slika 3) (Radović i sur., 2021).

Podskupina niskotemperaturnih eutektičkih otapala su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES), čiji su donori vodikove veze primarni metaboliti poput aminokiselina, organskih kiselina, ugljikohidrata, alkohola, amida i i poliola (Paiva i sur., 2014). NADES-i se smatraju dobrom alternativnom klasičnim organskim otapalima radi niza svojstava: niska toksičnost, niska hlapljivost i zapaljivost, pristupačna cijena te veliki broj različitih kombinacija i prilagodljive fizikalno-kemijske karakteristike (Kudlak i sur., 2015).

Ova otapala okarakterizirana su dobrim fizikalno-kemijskim svojstvima, uključujući zanemarivu hlapljivost, često su kapljevine pri sobnoj temperaturi, ponekad i na temperaturama ispod 0 °C, promjenjivu viskoznost, široki raspon polarnosti i mogućnosti otapanja različitih teško topljivih komponenti (Radošević i sur., 2016). Jedno od bitnih svojstva NADES-a je to što su njegove komponente prirodne, pa se NADES može sintetizirati i metabolizirati u većini organizmima što ga čini visoko biokompatibilnim. Nadalje, ima prednost pred konvencionalnim organskim otapalima jer je biorazgradivo te ne predstavlja opasnost za okoliš, a uz to moguće ga je reciklirati i ponovno upotrijebiti (Liu i sur., 2018). Smatra se da tijekom sinteze NADES-a ne nastaju toksični i neželjeni produkti niti otpad, stoga teoretski E-faktor iznosi 0. E-faktor (eng. *Environment Factor*) je omjer proizvedenog otpada i dobivenog produkta te predstavlja mjeru zelenosti neke reakcije. Shodno tome, sinteza NADES-a je u potpunosti održivi i zeleni proces. Također, prinos procesa sinteze je 100 % iz razloga što su ova otapala većinom smjese dviju komponenti te nije potrebna nikakva kemijska reakcija pa je i *ekonomija atoma* 100 % (Paiva i sur., 2014).

2.3.1.2. Toksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala pripremaju se isključivo od prirodnih komponenti, te se smatraju „zelenijima“ od DES-a (Yang i sur., 2019). Upravo radi toga, njihova toksičnost je niska, ali procjena toksičnosti i biorazgradivosti neizostavni je dio istraživanja njihove sinteze i primjene (Radošević i sur., 2018).

Prvi test citotoksičnosti NADES-a proveli su Paiva i sur. (2014). Testirali su 11 NADES-a na staničnoj liniji fibroblasta L929 u usporedbi s dvije tipične ionske kapljevine. Četiri NADES-a čije su komponente vinska i limunska kiselina djelovali su iznimno inhibirajuće na staničnu liniju, kao i ionske kapljevine. To upućuje da prisutnost organske kiseline može imati štetan učinak na stanice, što se pripisuje niskoj pH vrijednosti organske kiseline. Jednak trend,

uočili su i Radošević i sur. (2018) u ispitivanju antimikrobnog učinka prema bakterijama *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhiurium*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* i kvascu *Candida albicans* te citotoksičnog učinka na humanim staničnim linijama HEK293T, HeLa i MCF-7 deset različitih NADES-a. NADES-i koji sadrže limunsku kiselinu djelovali su inhibirajuće na rast mikroorganizama što ih čini potencijalnim antimikrobnim agensima, te se njihovo inhibirajuće djelovanje povezuje s pH vrijednosti jer dolazi do oštećenja stanične membrane uslijed visoke kiselosti. S druge strane, NADES-i čije su komponente betain, kolin, šećeri i šećerni alkoholi, nisu pokazali antimikrobnu aktivnost, dok je urea pokazala niski antimikrobni učinak. Kvasac *Candida albicans* nije pokazao osjetljivost na testirane NADES-e, dok su svi ostali mikroorganizmi relativno osjetljivi. Četiri NADES-a baziranih na kolin kloridu s oksalnom kiselinom, ureom, ksilitolom i sorbitolom, testirani su na jednoj normalnoj staničnoj liniji HEK293T i dvije tumorske stanične linije- HeLa i MCF-7. Najveći inhibitorni učinak imao je NADES kolin klorid:oksalna kiselina u tumorskim stanicama HeLa i MCF-7, dok je za normalne stanice bio manji. Takvi rezultati se slažu s prethodnima (Radošević i sur., 2015), gdje formiranje kristala kalcijevog oksalata unutar stanice inducira štetno djelovanje na tumorske i normalne stanice. Jači toksični učinak u tumorskim stanicama od normalnih objašnjava se činjenicom da tumorske stanice zbog većih potreba za energijom, unose i više sastojaka iz medija za rast (npr. glukoza, aminokiselina, faktori rasta), pa samim time i više otapala. Nadalje, Zhao i sur. (2015) testirali su antimikrobnu aktivnost 12 NADES-a na bazi kolin klorida s aminima, alkoholima, šećerima i organskim kiselinama. Sedam NADES-a s organskom kiselinom imali su značajni inhibicijski učinak na gram-negativne (*Echerichia coli* i *Salmonella enteritidis*) i gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*), s time da je veći učinak prema gram-negativnim bakterijama zbog različite građe stanične stijenke. Ostalih pet otapala sa šećerima, alkoholom i aminima nisu pokazali inhibitorni učinak.

Hayyan i sur. (2013) proveli su testove citotoksičnosti na vodenom raku *Artemia salina*. Rezultati su pokazali da komponente DES-a pojedinačno imaju manju toksičnost od dvokomponentnog DES-a. Naime, sama priroda DES-a nastala kao posljedica interakcija donora vodikove veze i organske soli, ali i loš prijenos kisika u kulturi stanica u hranjivoj podlozi zbog povećane viskoznost DES-a može biti razlog takvoj aktivnosti. Da su NADES-i manje toksični od DES-a, pokazali su Mbous i sur. (2017) u svom ispitivanju citotoksičnosti dva NADES-a (kolin klorid:fruktoza (2:1) i kolin klorid:glukoza (2:1)) i DES-a (*N,N*-dietil etanolamonijev klorid:trietilen glikol (1:3)) na šest humanih tumorskih staničnih linija. Najtoksičniji je bio DES, a najmanji inhibitorni učinak imala je kolin klorid:fruktoza. Glukoza

i fruktoza se koriste kao izvori energije, pa njihova visoka razina unosa u stanicu može potaknuti sintezu produkata glikacije, a zatim i sintezu reaktivnih kisikovih radikala (eng. *Reactive oxygen species*, ROS). Osim toga, napravljen je i test permeabilnosti otapala kroz membranu, te je DES uzrokovao oštećenje stanične membrane što je posljedično dovelo do nekroze stanica.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da su niskotemperaturna eutektička otapala niske do umjerene toksičnosti, obzirom na komponente od kojih su građeni, no potrebno je provesti još studija (cito)toksičnosti kako bi se ova otapala mogla sigurno primjenjivati.

2.3.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u farmaceutici

Farmaceutska industrija suočava se s velikim problemima prilikom pripreme i formulacije lijekova od kojih su najveći topljivost i propusnost lijeka, što vodi do neprikladne farmakokinetike i slabe biodostupnosti djelatne tvari lijeka (eng. *Active pharmaceutical ingredient*, API). Kako bi se prevladao problem niske topljivosti i/ili propusnosti lijekova, često se daju veće doze od potrebnih što dovodi do systemske toksičnosti i teških nuspojava (Duarte i sur., 2017). Zbog svoje raznolikosti, netoksičnosti i biorazgradivosti, DES je pronašao primjenu u razvoju farmaceutskih formulacija. Objavljeno je niz studija u kojem DES može otopiti lijekove i povećati njihovu topljivost, permeabilnost i apsorpciju (Paiva i sur., 2014).

DES-ovi imaju široku znanstvenu i tehnološku pozornost kao jeftina alternativa organskim otapalima i ionskim tekućinama, te se koriste u različitim područjima kemijske, biotehnološke i elektrokemijske industrije. U farmaceutici, niskotemperaturna eutektička otapala zbog prilagodljivosti fizikalno-kemijskih svojstava, niske toksičnosti te kemijske i toplinske stabilnosti, koriste se kao sredstva za isporuku lijekova do ciljnog mjesta u organizmu, medija za enzimске reakcije te za otapanje teško topljivih lijekova u vodi. Poznato je da učinkovitost lijeka ili djelatne farmaceutske tvari u izravnoj korelaciji s njegovom topljivosti, biodostupnosti i propusnosti. Niža topljivost lijeka dovodi do niže stope biodostupnosti i permeabilnosti. Idealno otapalo može spriječiti agregaciju i taloženje lijeka/API-ja, stoga DES-ovi zbog svojih pogodnih svojstava predstavljaju obećavajuće rješenje problema topljivosti te isporuke lijekova do ciljnih mjesta u organizmu (Abidin i sur., 2019).

2.3.2.1. Otapanje teško topljivih spojeva

U pripravi i formulaciji novih lijekova često se susrećemo s problemom niske topljivosti, što utječe na nisku bioraspoloživost i posljedično do otežane isporuke lijeka na ciljno mjesto.

Mnoge aktivne farmaceutске tvari su polarnog ili ionskog karaktera kako bi se omogućilo vezanje za aktivno mjesto supstrata, što često rezultira slabom topljivošću u vodenim otopinama. Složeni spojevi s farmaceutskom aktivnosti često su građeni od polimorfniх kristala koji mogu pokazati različitu farmakokinetiku prvenstveno zbog različite stope topljivosti. U tom slučaju, proučavani su ko-kristali koji se smatraju načinom zaobilaznja polimorfizma. Međutim, nedavna istraživanja su pokazala da i u ko-kristalima mogu postojati polimorfne strukture (Abbot i sur., 2017). Za prevladavanje ovog problema, DES-ovi imaju veliki potencijal u formulaciji lijekova zbog svojih prilagodljivih fizikalno-kemijskih svojstava. Jedna od najznačajnijih primjena DES-a je u otapanju teško topljivih lijekova/API-ja u vodi (Abidin i sur., 2019). Većina formulacija lijeka je poželjna u tekućem obliku pri čemu je najjednostavnija priprema u vodi. Međutim, mnoge djelatne tvari lijeka nisu dovoljno topljive u vodi niti su stabilne u vodenim otopinama. Topljivost je jedan od najvećih problema za farmaceutsku industriju jer oko 40 % lijekova odobrenih za tržište i skoro 90 % molekula u razvoju slabo su topljivi u vodi (Kalepu i Nekkanti, 2015). Iako se organska otapala mogu koristiti za otapanje određenih lijekova i minimiziranje razgradnje molekula posredovane vodom, upotreba organskih otapala nije praktična niti poželjna u većini farmaceutskih okruženja. Korištenje organskih otapala nije poželjno zbog toksičnosti, zapaljivosti, hlapljivosti te nepovoljnih utjecaja na okoliš. Nadalje, mnoga organska otapala imaju neugodan miris odnosno okus. Stoga, NADES-i koji se sastoje od komponenti prirodnog podrijetla, imaju veliki potencijal za farmaceutsku primjenu zbog svoje biorazgradivosti, niske toksičnosti i sposobnosti otapanja različitih spojeva uključujući i one netopive u vodi (Lu i sur., 2016).

Zbog velike moći otapanja i niske toksičnosti, DES-ovi se uvelike istražuju kao alternativna otapala za otapanje API-ja, posebice za topičke formulacije (Pedro i sur., 2019). Stott i sur. (1998) su među prvima za poboljšanje permeabilnosti kroz kožu i transdermalni sustav dostave lijeka opisali upotrebu DES-a na bazi mentola i ibuprofena. Topljivost lijekova poput benzojeve kiseline, itrakonazola i grizeofulvina je 5 do 22 000 puta veća u NADES-ima (kolin klorid:urea (1:3) i klon klorid:malična kiselina (1:1)) nego u vodi (Morrison i sur., 2009). Rozema i sur. (2015) pokazali su izvedivost i dobrobit otapanja ne aciliranog salicilata, slabo topljivog u vodi u NADES-u 1,2-propandiol:kolin klorid:voda (1:1:1). Tu je NADES korišten kao alternativa za DMSO u funkcionalnim *in vitro* testovima sa stanicama adipocita. Da je topljivost bolja u DES-u nego u vodi, pokazali su i Lu i sur. (2016) na primjeru topljivosti pet nesteroidnih protuupalnih lijekova (aspirin, acetaminofen, ketoprofen, naproksen, ibuprofen) inače netopljivih u vodi. DES-ovi s kolin kloridom kao akceptorom vodikove veze i s različitim donorima vodika poput alkohola, šećera, organskih kiselina i uree, pokazali su se dobrim

otapalima za navedene lijekove te se topljivost lijekova povećala za 17 do 5477 puta u usporedbi s njihovom topljivošću u vodi. Takvo povećanje topljivosti pokazalo je da se DES-ovi mogu koristiti kao potencijalni nosači za nevodene tekuće formulacije lijekova.

Osim što imaju utjecaja na topljivost API-ja, DES-ovi utječu i na kemijsku stabilnost te posljedično na biodostupnost API-ja (Pedro i sur., 2019). Većina API-ja nije stabilna u vodenim otopinama te su poznati različiti putevi njihove razgradnje. Primjer su farmaceutici koji sadrže estersku skupinu kao što je aspirin, koji uslijed čuvanja u vodenoj otopini podliježe hidrolizi do salicilne i octene kiseline. Lu i sur. (2016) pokazali su da je hidroliza aspirina u DES-u kolin klord:1,2-propandiol 8,2 puta sporija nego u vodenoj otopini. Također, NADES betain:urea utječe na povećanje stabilnost β -laktamskih antibiotika-imipenema i klavulanske kiseline za 2,5 do 7 puta više u usporedbi s vodenom otopinom (Olivares i sur., 2018).

Topljivost je jedna od najvažnijih i najkritičnijih fizikalno-kemijskih svojstava lijekova te je od iznimne važnosti poznavati topljivost aktivnih tvari u odabranim otapalima sa ciljem identifikacije najučinkovitijeg puta isporuke lijeka do ciljnog mjesta i razvitka učinkovitijih API-ja. Iako je podatak o topljivosti lijeka iznimno važan prilikom odlučivanja u procesu razvoja lijeka, postojeći eksperimentalni podaci o topljivosti pri poželjnim uvjetima još su uvijek oskudni i većinom nedostupni. Budući da ciprofloksacin ima slabu topljivost u vodi, a veću u organskim otapalima, njega karakterizira i manja biorasploživost zbog slabe topljivosti u biološkim tekućinama, koje su u osnovi vodene otopine (Caco i sur., 2008). Nadalje, zbog toksičnosti organskih otapala, veliki je potencijal primjene NADES-a kao mogućih otapala za ovaj antibiotik sa ciljem povećanja topljivosti i biodostupnosti lijeka.

2.3.2.2. *Terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala*

Izraz terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo (eng. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*, THEDES) odnosi se na bioaktivni eutektički sustav koji sadrži API kao komponentu koja tvori DES. Primjena THEDES-a rezultira povećanom topljivosti, biodostupnosti i permeabilnosti API-ja. API u sklopu THEDES formulacije ima različitu topljivost od samostalnog, a razlog tome je njegova pretvorba u tekuće stanje. Na primjer, ibuprofen u sklopu DES formulacije postoji u tekućem obliku dok je čisti ibuprofen u obliku praha (Abidin i sur., 2019). Priprema THEDES-a predstavlja veliki doprinos farmaceutici jer dolazi do stvaranja tekućeg API-ja čime je moguće povećati biorasploživost i brzinu isporuke lijeka, te smanjiti njegovu toksičnost. Dizajn novih THEDES-a nije lak proces te još uvijek nedostaju znanja o interakcijama uspostavljenih između molekula THEDES-a što usporava razvoj ovakvih sustava. Ipak, ovaj pristup je zbog svoje jednostavne pripreme jedna od važnijih strategija pri

razvoju novih formulacija lijekova. Sinteza THEDES-a daje 100 % čisti proizvod, bez gubitaka tijekom proizvodnje i bez potrebe za naknadnim koracima pročišćavanja. Nadalje, prijenos procesa u veliko mjerilo je relativno jednostavan, što je još jedna pozitivna strana za farmaceutsku industriju (Duarte i sur., 2017).

THEDES-i se mogu pripremiti iz velikog broja API-ja pri čemu je pravilan odabir akceptora i donora vodikove veze ključan za stvaranje tekuće formulacije sa zadovoljavajućim terapijskim svojstvima. Prvi THEDES sustav sastavljen od mentola i ibuprofena opisali su Stott i suradnici 1998. godine, a cilj im je bio povećati kožnu permeabilnost te razviti transdermalni način dostave API-ja putem THEDES-a. Nadalje, Tuntarawongsa i sur. (2012) pripremili su DES otopine s terapijskim svojstvima od mentola i kamfora s otopljenim ibuprofenom. Rezultati su pokazali da je THEDES otopio znatnu veću količinu ibuprofena od vode te je dobivena tekuća formulacija API-ja. Aroso i sur. (2016) predlažu THEDES sustav kao transportno sredstvo za bioaktivne molekule. Sintetizirali su THEDES sustav na bazi kolin klorida i mentola konjugiran s tri različita API-ja (acetilsalicilna kiselina, benzojeva kiselina i feniloctena kiselina) te su takvi sustavi okarakterizirani prema termičkom svojstvu, strukturnim značajkama, brzini otapanja i antibakterijskoj aktivnosti. Dobiveni tekući oblici API-ja pokazali su i veću topljivost takvih API-ja u PBS-u u usporedbi s čistim API-jem, uz veću antibakterijsku aktivnost THEDES-a. Promjena fizikalnog stanja API-ja u tekući oblik utječe i na permeabilnost. Wang i sur. (2014) razvili su THEDES lidokain:ibuprofen te opisali propusnost API-ja kroz membranu. Pokazalo se da je propusnost THEDES-a puno veća za razliku od čistog API-ja što nam govori da je veća topljivost usko povezana sa boljom biodostupnošću lijekova. Veću permeabilnost pokazuje i THEDES na bazi mentola s API-jima poput ibuprofena i aspirina, gdje je permeabilnost 3 puta veća u usporedbi s čistim API-jem. Mentol se koristi kao pojačivač permeabilnosti u THEDES formulacijama za transdermalnu primjenu (Pedro i sur., 2019).

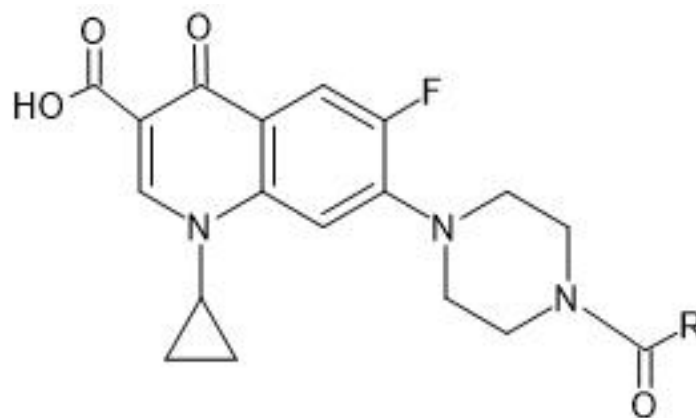
Pokazalo se da je promjena iz čvrstog stanja API-ja u tekuće pomoću THEDES sustava jednostavna i učinkovita metoda za poboljšanje biodostupnosti lijeka (Duarte i sur., 2017). Razvoj bioaktivnih eutektičkih sustava koji sadrže API kao jednu od komponenti DES-a dodatno povećava potencijal ovih sustava i otvara širok spektar za budući razvoj farmaceutskih i biomedicinskih primjena.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Derivati ciprofloksacina

U ovom radu korištena su dva *N*-acilirana derivata antibiotika ciprofloksacina (slika 4): 7-(4-acetilpiperazin-1-il)-1-ciklopropil-6-fluor-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina (acetil-ciprofloksacin; CIPM) i 1-ciklopropil-6-fluor-7-[4-(2-metilpentanoil)piperazin-1-il]-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina (2-metilpentanoil-ciprofloksacin; CIPK). Derivati su prethodno sintetizirani u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.



Slika 4. Kemijska struktura derivata ciprofloksacina: 1) CIPM (R= CH₃), 2) CIPK (R= CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃).

3.1.2. Kemikalije

- 0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- 2-metilpentanoil-klorid, 98 %, Alfa Aesar, Kandel, Njemačka
- Acetil-klorid, 99 %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Aceton, Kemika, Zagreb, RH
- Acetonitril, >99 %, Honeywell, Riedel-de Haen, Njemačka
- Betaine, 98 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ciprofloksacin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kumarin, 99+ %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- D-(+)-glukoza, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Deionizirana voda, PBF
- Dekanska kiselina, 99 %, Acros Organics, New Jersey, SAD

- Diklormetan, Kemika, Zagreb, RH
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- DL-Malična kiselina, 99+ %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Kemika, Zagreb, RH
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Glicerol, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH
- Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH
- Ketoprofen, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- L-(-)-Prolin, 99+ %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Limunska kiselina monohidrat, p.a., T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, RH
- L- α -fosfatidilkolin, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Mentol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], Promega, SAD
- Natrijev klorid, NaCl, Kemika, Zagreb, RH
- n-dodekan, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Oksalna kiselina, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, New Jersey, SAD
- Oktanska kiselina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Thymol, 99 %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Trietilamin, Fisher ChemicalTM, Hampton, New Hampshire, SAD
- Tripan plavo (0,4 %), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Caco-2 stanična linija

Za ispitivanje *in vitro* biološke aktivnosti pripremljenih formulacija API-ja korištena je Caco-2 stanična linija humanog epitela karcinoma debelog crijeva. Caco-2 stanice uspostavljene su iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma i koriste se kao *in vitro* modeli crijevne epitelne barijere odnosno crijevne apsorpcije lijekova i drugih tvari u ljudi. Ova stanična linija dobivena je iz CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germany) radne banke stanica. Caco-2 stanice čuvaju se na -80 °C, a tijekom uzgoja optimalni uvjeti su: 37 °C

u inkubatoru s relativnom vlažnošću > 95 % i 5 % CO₂ do gustoće od oko 80 – 90 %. U *in vitro* kulturi stanice spontano diferenciraju u heterogenu smjesu epitelnih stanica crijeva tijekom 21 dana. Preporučeni medij za rast Caco-2 stanične linije je Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) uz dodatak 20 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS).

3.1.4. Oprema

- Analitička vaga, Mettler Toledo AX205 delta Range, Ohio, SAD
- Centrifuga tip PLC-332, Tehnica Železnik, Slovenija
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Digitalna vaga, BAS 31 plus, Boeco, Njemačka
- Hladnjak (4 °C), Gorenje, Slovenija
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator-IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Assistant, Bright – Line, Njemačka
- Petrijeve popsude za uzgoj stanica, Thermo Fisher Scientific, Drive Rochester, NY, SAD
- Ploče s 96 jažica, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Svjetlosni mikroskop AxioStar 1122-100, Zeiss, Njemačka
- UV/Vis spektrofotometar, GENESYSTM10S, Thermo Fisher Scientific, Madison, SAD

3.1.5. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev Klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Deionizirana voda	do 1000 mL

80 % acetonitril

Acetonitril	8 mL
Deionizirana voda	2 mL

10 % DMSO

DMSO	1 mL
Deionizirana voda	9 mL

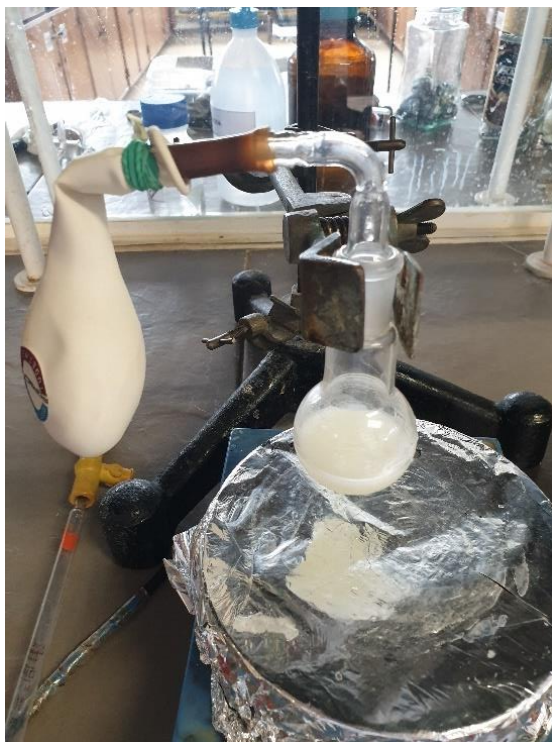
1 % L- α -fofatidilkolin u dodekanu

L- α -fofatidilkolin	5 mg
n-dodekan	0,5 mL

3.2. METODE RADA

3.2.1. Sinteza derivata ciprofloksacina

Sinteza *N*-aciliranog ciprofloksacin derivata - 7-(4-acetilpiperazin-1-il)-1-ciklopropil-6-fluor-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina, provedena je kako je opisano u radu - Azema i suradnici (2009). U tikvicu s okruglim dnom pomiješani su ciprofloksacin (200 mg, 0,03 mmol), trietilamin (0,052 mg, 0,33 mmol) i 10 mL diklormetana te se reakcijska smjesa miješala 15 min na 0 °C te zatim 1 h na sobnoj temperaturi u struji argona uz postepeno dodavanje acetil-klorida (107 μ L, 0,75 mmol). Sinteza derivata ciprofloksacina je prikazana na slici 5. Nakon jednosatnog miješanja na magnetnog miješalici dodano je 5 mL destilirane vode te je provedena ekstrakcija s diklormetanom. Vodeni sloj je odbačen, a organski sloj ispran vodom, osušen kristalima natrijevog dihidrogenfosfata i uparen na rotacijskom vakuum uparivaču te pročišćen kolonskom kromatografijom te preparativnom kromatografijom na silika gelu (CH₂Cl₂-MeOH 3 %). Dobiveni su bijelo-žuti kristali aciliranog ciprofloksacina koji su čuvani na +4 °C do upotrebe.



Slika 5. Sinteza derivata ciprofloksacina (*vlastita fotografija*)

Sinteza derivata s kiralnim središtem - 1-ciklopropil-6-fluor-7-[4-(2-metilpentanoil)piperazin-1-il]-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karbonsilna kiselina, provedena je na jednak način kao i sinteza prethodnog derivata samo uz dodatak odgovarajućeg 2-metilpentanoil-klorida u reakcijsku smjesu.

3.2.2. Sinteza prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES)

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES) sintetizirana su miješanjem dvije komponente u određenim molarnim omjerima na temperaturi od 50 °C do 60 °C neprestanim miješanjem kroz 2 do 5 h do nastanka tekućine. U otapala koja zahtijevaju vodu, dodan je i određeni volumen vode. Pripremljena otapala čuvana su u zatvorenoj boci na tamnijem mjestu i sobnoj temperaturi. U tablici 1 navedeno je 8 prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala korištenih u eksperimentu, koji su prethodno sintetizirani u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a.

Tablica 1. Sintetizirani NADES-i korišteni u ovom radu

NADES	Kratica	Omjer komponenti	Udio vode
Prolin:jabučna kiselina	Pro:Ma	1:1	10 %
Citratna kiselina:glukoza	CA:Glc	1:1	10 %
Betain:oksalna kiselina:glicerol	B:OxA:Gly	1:2:1	10%
Timol:oktanska kiselina	Ty:C8	1:3	0 %
Timol:dekanska kiselina	Ty:C10	1:1	0 %
Timol:kumarin	Ty:Cou	3:2	0 %
L-mentol:linolna kiselina	L-men:C18:2	1:1	0 %
L-mentol:timol	L-men:Ty	3:2	0 %

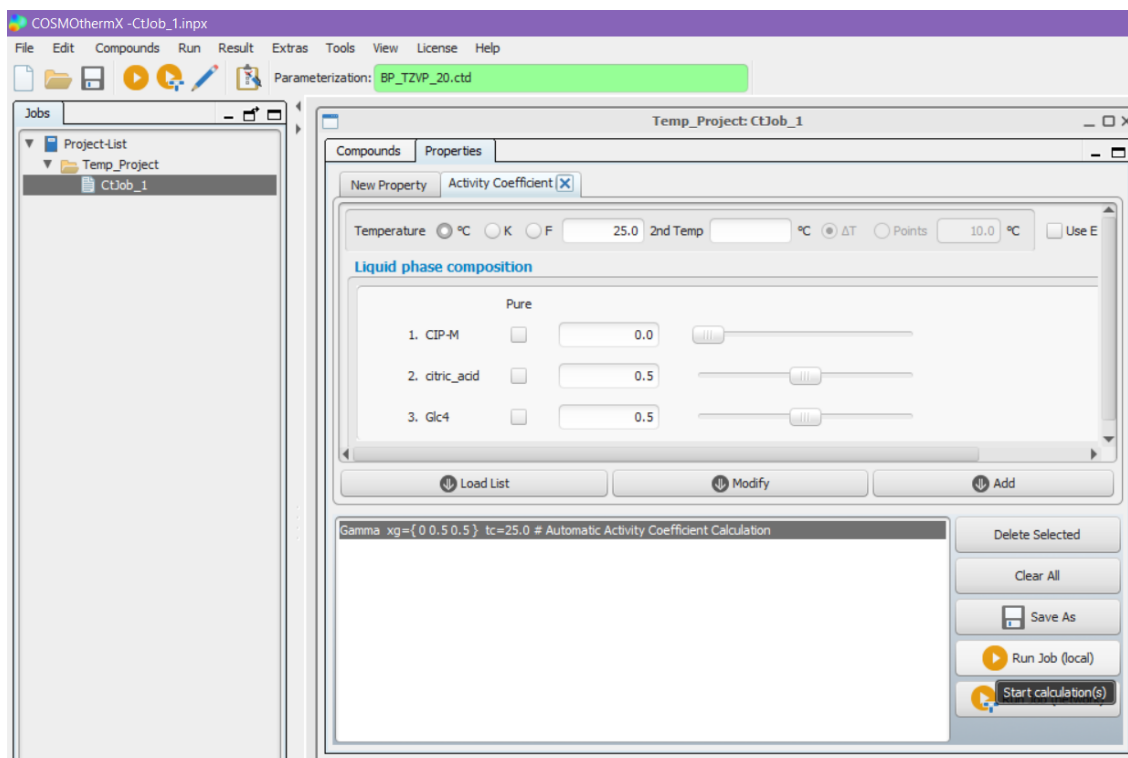
3.2.3. Procjena topljivosti derivata ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima korištenjem softvera COSMO_{therm}

COSMO-RS model (eng. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) smatra se jednom od najtočnijih računskih *ab initio* metoda za predviđanje topljivosti komponenata i svrstavanje otapala. Računalno predviđanje topljivosti komponenata u otapalu može značajno smanjiti količinu eksperimentalnog rada i posljedično potrošnju kemikalija. COSMO-RS model predstavlja kombinaciju elektrostatičke teorije i statičke termodinamičke obrade interaktivnih površina (Palmelud i sur., 2019). Model ujedinjuje koncept kvantne teorije, dielektričnog kontinuuma i površinskih interakcija molekula otapala i otopljene tvari (Klamt i sur., 2001). Temelji se na kvantno-kemijskoj metodi predviđanja kemijskog potencijala i svih vrsta termodinamičkih ravnotežnih svojstava tekućih sustava baziranih na strukturnim informacijama komponenata. COSMO-RS model karakterizira otopljenu tvar i otapalo na jednakim, kvantno-kemijskim i statističko-termodinamičkim osnovama te otapalo promatra kao

dielektrični kontinuum kojeg okružuju molekule otopljene tvari (Klamt, 2011). COSMO-RS razmatra disperzijska međudjelovanja i vodikove veze između otapala i otopljenih tvari za izračun kemijskog potencijala što omogućuje procjenu topljivosti komponenata u otapalu, ali i drugih termodinamičkih svojstava (Palmelud i sur., 2019).

Prvi korak u predviđanju topljivosti je izračunavanja optimalne geometrije molekula u savršenom vodljivom mediju za što se koristi programski paket TmoleX i model COSMO. COSMO model promatra otapala kao savršene električne vodiče što omogućuje izračun ukupne energije međudjelovanja otapala i otopljenih tvari iz površinske gustoće naboja otopljene tvari. Rezultati tih proračuna pohranjuju se kao izlazna datoteka COSMO-proračuna, tzv. σ -profil. U okviru programskog paketa COSMO $therm$, σ -profili komponenata se statističko-termodinamičkim proračunima preračunavaju u σ -potencijale komponenata ili njihovih smjesa i kemijske potencijale, koji se dalje koriste za određivanje svojstava poput koeficijenta aktivnosti, ravnotežnog tlaka para, topljivosti ili koeficijenta raspodjele. COSMO-RS se može primjenjivati za predviđanje termodinamičkih i fizikalno-kemijskih svojstava otapala i otopljenih tvari kao i za predviđanje topljivosti komponenata u NADES-u. U budućim istraživanjima s velikim izborom prirodnih niskotemperaturnih otapala, COSMO-RS uvelike može pridonijeti i ubrzati odabir idealnog NADES-a za određeni API.

Procjena topljivosti započinje pokretanjem COSMO $therm$ softvera i unosom .cosmo datoteke molekula čija se topljivost želi ispitati i molekule otapala koje tvore prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo. Molekule se dodaju opcijom *From Database*, ako već postoje u bazi podataka ili opcijom *From File*, ako ih nema u bazi te su prethodno nacrtane i optimirane u programu TmoleX. Nakon unosa svih molekula odabire se opcija *Activity Coefficient* pod sekcijom *Properties*. Odabirem te opcije otvara se prozor u kojem se definira temperatura pri kojoj se topljivost ispituje te sastav smjese, odnosno udio akceptora vodikove veze, donora vodikove veze te ispitivane tvari (slika 6). Nakon toga odabire se *Add* te *Run Job Local*.



Slika 6. Sučelje softvera COSMOtherm – definiranje sastava smjese i temperature za određivanje koeficijanta aktivnosti acetil-ciprofloksacina pri beskonačnom razrjeđenju u NADES-u limunska kiselina:glukoza (1:1)

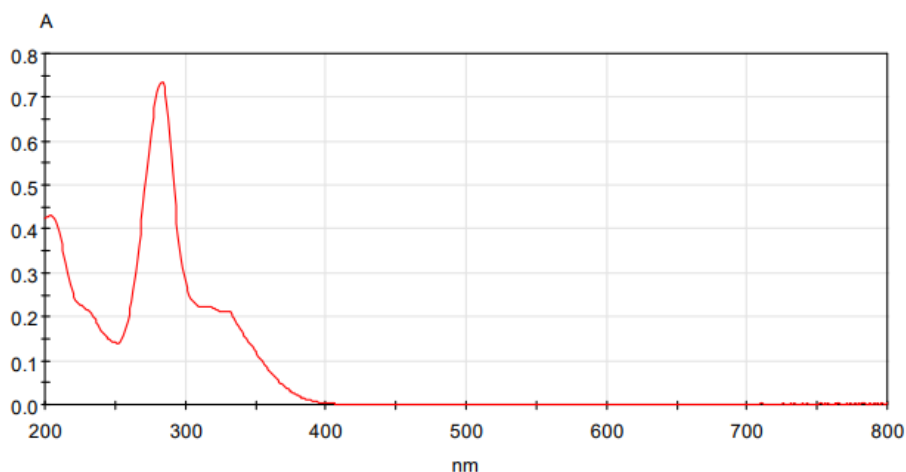
Kao rezultat proračuna dobije se logaritam koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$, koji govori o topljivosti ispitivanog spoja u ispitivanom otapalu. Negativniji koeficijent aktivnosti tvari znači veću topljivost u promatranom otapalu. Pri definiranju udjela komponenata, suma svih udjela mora biti jednaka 1, a ukoliko se odabere udio 0, izračunava se logaritam aktivnosti te tvari pri beskonačnom razrjeđenju.

3.2.4. Eksperimentalna provjera topljivosti derivata ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Palmelund i sur. (2019) opisali su metodu za određivanje topljivosti API-ja u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Derivati ciprofloksacina otopljeni su u suvišku u softverski predviđenim NADES-ima te je takva smjesa miješana u homogenizatoru s termostatom na 25 °C tijekom 24 h. Nakon homogenizacije, smjese su stavljene na centrifugu te je uzet alikvot od prozirnog supernatanta koji je razrijeđen vodom ili u slučaju hidrofobnog NADES-a, 80 % acetonitrilnim puferom. Koncentracija derivata ciprofloksacina u otapalima kvantificirana je UV/Vis spektrofotometrijom.

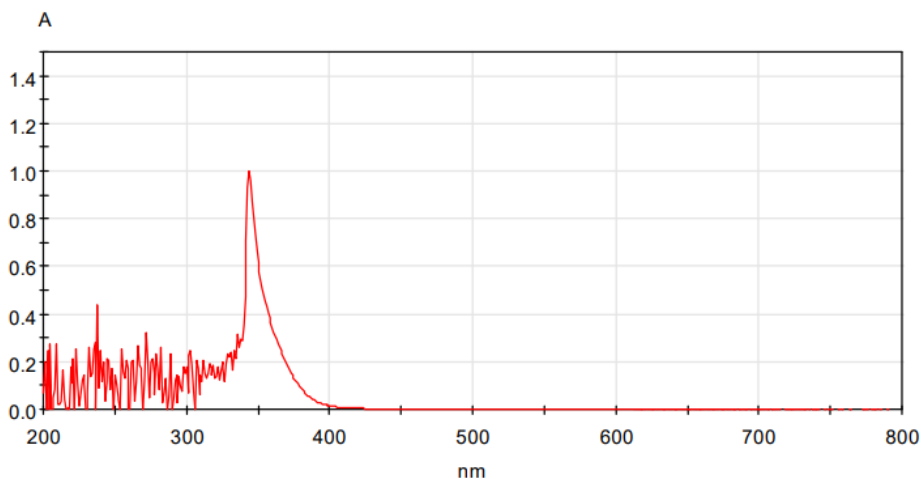
3.2.5. UV/Vis spektrofotometrija

Identifikacija i kvantitativna analiza derivata ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i u 80 % acetonitrilu provedena je upotrebom UV/Vis spektrofotometrije. Snimljeni su spektri u UV/Vis području od 200 do 800 nm.



Slika 7. Spektar derivata ciprofloksacina otopljenih u 80 % acetonitrilu

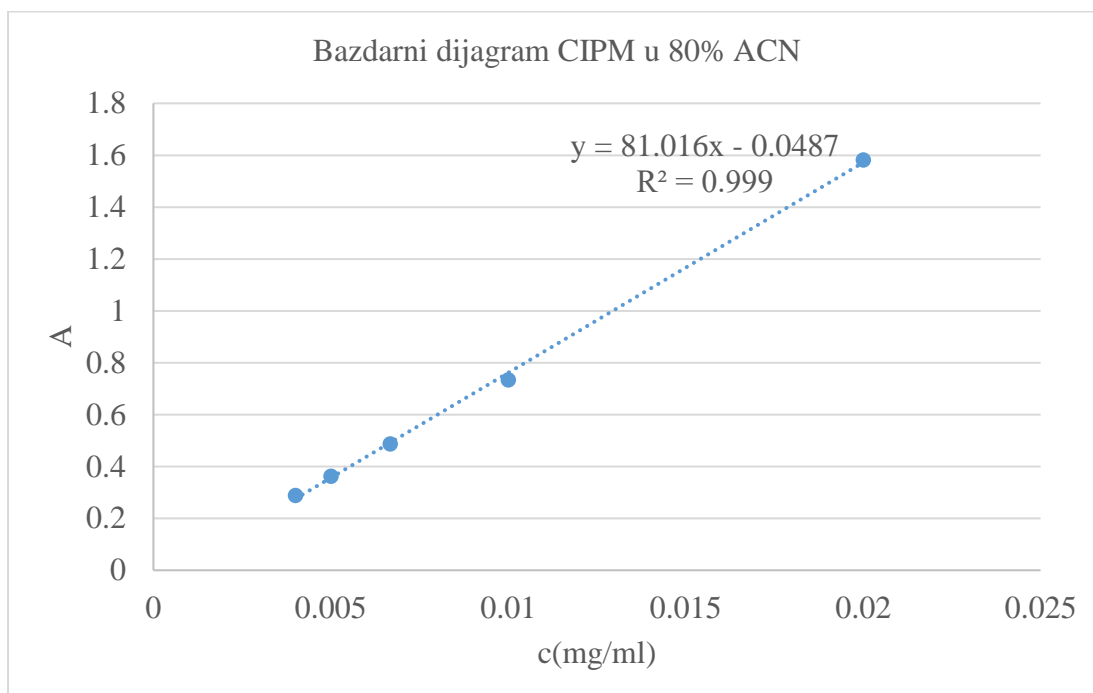
Derivati ciprofloksacina otopljeni u 80 % acetonitrilu pokazuju apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 283 nm (slika 7), dok se kod derivata otopljenih u NADES-u apsorpcijski maksimum pomiče na 350 nm što je prikazano na slici 8.



Slika 8. Spektar derivata ciprofloksacina u NADES-u

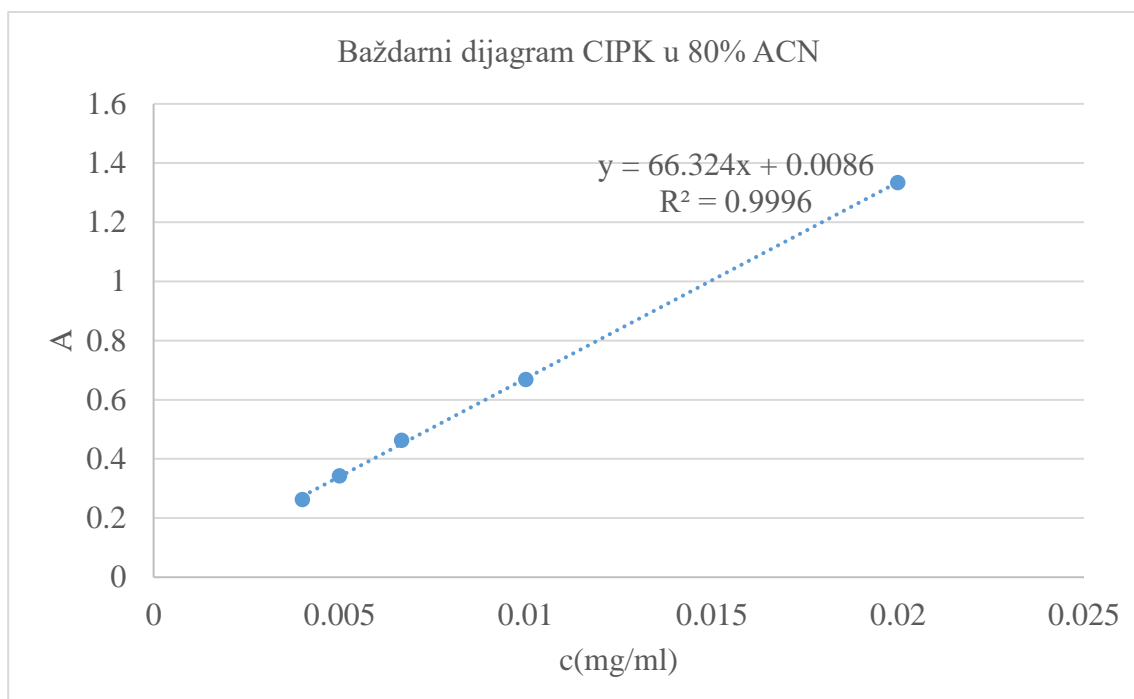
Kvantifikacija derivata ciprofloksacina provedena je metodom vanjskog standarda. Apsorbancije i masena koncentracija postavljene su kao ovisne veličine te je nacrtan baždarni

dijagram s pripadajućom jednažom pravca. Slika 9 prikazuje baždarni pravac za derivat CIPM, dok je na slici 10 baždarni pravac za derivat CIPK.



Slika 9. Baždarni dijagram acetil-ciprofloksacina

Koncentracije otopljenog derivata ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima određena je iz jednažbe pravca.



Slika 10. Baždarni dijagram 2-metilpentanoil-ciprofloksacina

3.2.6. Stabilnost derivata ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektskim otapalima

Stabilnost derivata ciprofloksacina u NADES-u i 80 % acetonitrilu pratila se kroz 30 dana na temperaturi od 4 °C i 25 °C. U nasumično odabranim vremenskim intervalima mjerila se apsorbancija pomoću UV/Vis spektrofotometra. Formulacije derivata ciprofloksacina prije mjerenja razrijeđene su u 100 % acetonu. Rezultati su iskazani kao graf ovisnost omjera apsorbancija (A/A_0 , apsorbancija određenog dana i početna apsorbancija) A/A_0 o vremenu.

3.2.7. *In vitro* ispitivanje biološke aktivnosti derivata ciprofloksacina na Caco-2 staničnoj liniji

Pri radu s kulturama životinjskih stanica potrebno je osigurati sterilne uvjete kako ne bi došlo do kontaminacije stanica. Eksperimenti se izvode u komori za sterilan rad uz sterilni laboratorijski pribor te uz prethodnu dezinfekciju radne površine i ruku 70 %-tnim etanolom.

3.2.7.1. *Uzgoj, određivanje broja i nacjepljivanje Caco-2 stanica*

Caco-2 stanice čuvaju se u ampulama od 1 mL na -80 °C u mediju za smrzavanje te se odmrzavaju naglim uranjanjem u vodenu kupelj na 30 °C. Stanice se centrifugiraju te se pipetom pažljivo uklanja supernatant, a talog koji sadrži stanice resuspendira se u mediju za uzgoj koji sadrži 20 % FBS pufera. Stanice se nacjepljuju u Petrijeve zdjelice te uzgajaju u inkubatoru na 37 °C s udjelom CO₂ od 5 % i relativnom vlažnošću zraka od 95 %. Stanica je potrebno svakodnevno promatrati pod inverznim mikroskopom i pasažirati svaka 4 dana da bi se održale u eksponencijalnoj fazi rasta u kojoj su stanice pogodne za postavljanje eksperimenta. Tijekom uzgoja prati se i boja medija, jer svaka promjena boje ukazuje na pojavu kontaminacije ili prerastanja podloge za uzgoj. Također je potrebno i prihranjivanje svježim medijem kako bi se nadomjestile komponente medija koje su iscrpljene i da se uklone proizvodi metabolizma kako bi se održao optimalni pH.

Prije postavljanja eksperimenta potrebno je odrediti broj stanica prihvaćenih za površinu Petrijeve zdjelice uz pomoć boje tripan-plavo. Najprije se uklonio sav medij iz Petrijeve zdjelice i dodao se 1 mL PBS pufera za ispiranje stanica. PBS pufer se maknuo te se dodao 1 mL prethodno zagrijane otopine tripsina. Petrijeva se zatim vratila u inkubator na 5 minuta kako bi se stanice zaokružile i odvojile od površine. Djelovanje tripsina provjerilo se pod inverznim mikroskopom te kada su se stanice odvojile dodan je 1 mL hranjivog medija da zaustavi djelovanje tripsina. Alikvot suspenzije stanica od 20 µL pomiješan je s 20 µL boje tripan-plavo

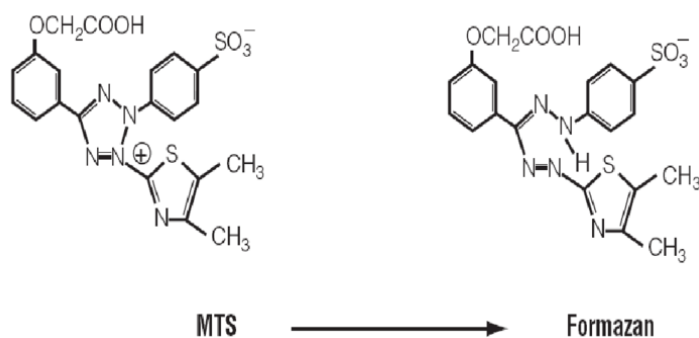
te je 10 μL nanijeto na Neubauer komoricu za brojanje stanica. Komorica se sastoji od 4 velika kvadrata koja su podijeljena na 16 malih kvadratića. Stanice se broje u svim kvadratima, a broje se žive i mrtve stanice obojeno plavo zbog oštećene membrane. Nakon izbrojanih stanica, računa se koncentracija stanica po mL prema slijedećoj formuli [1]:

$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{broj stanica u 4 velika kvadrata} \times 5000 \quad [1]$$

Za potrebe eksperimenta koriste se ploče s 96 jažica u koje je naciyepljeno 100 μL suspenzije stanica po jažici koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} . Stanice iz eksponencijalne faze su tripsinizirane, izbrojane uz dodatak boje tripan-plavo i naciyepljene u ploče s 96 jažica te su stavljene u inkubator na 24 h. Nakon 24 h od naciyepljivanja, stanice su tretirane različitim volumenima derivata ciprofloksacina od 1 do 5 % (v/v) otopljenih u 100 % dimetilsulfoksidu (DMSO) i ciprofloksacinom otopljenom u 10 % DMSO uz dodatak 1 μL HCl-a. Ploča s jažicama je stavljena u inkubator na 37 °C tijekom 72 h nakon čega je određen citotoksični učinak MTS metodom.

3.2.7.2. MTS metoda određivanja biološke aktivnosti derivata ciprofloksacina na Caco-2 stanice

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se primjenjuje za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, nutrijentima, citokinima i mitogenima, za određivanje antitijela koja inhibiraju rast te za analizu citotoksičnosti i citostatičkih spojeva. MTS reagens sastoji se od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] i PES [fenazin etosulfat]. Djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza, MTS se reducira do ljubičastog formazana otopljenog u mediju uz oksidaciju NADPH ili NADH u NADP^+ ili NAD^+ (slika 11) (Arab-Bafrani i sur., 2016).



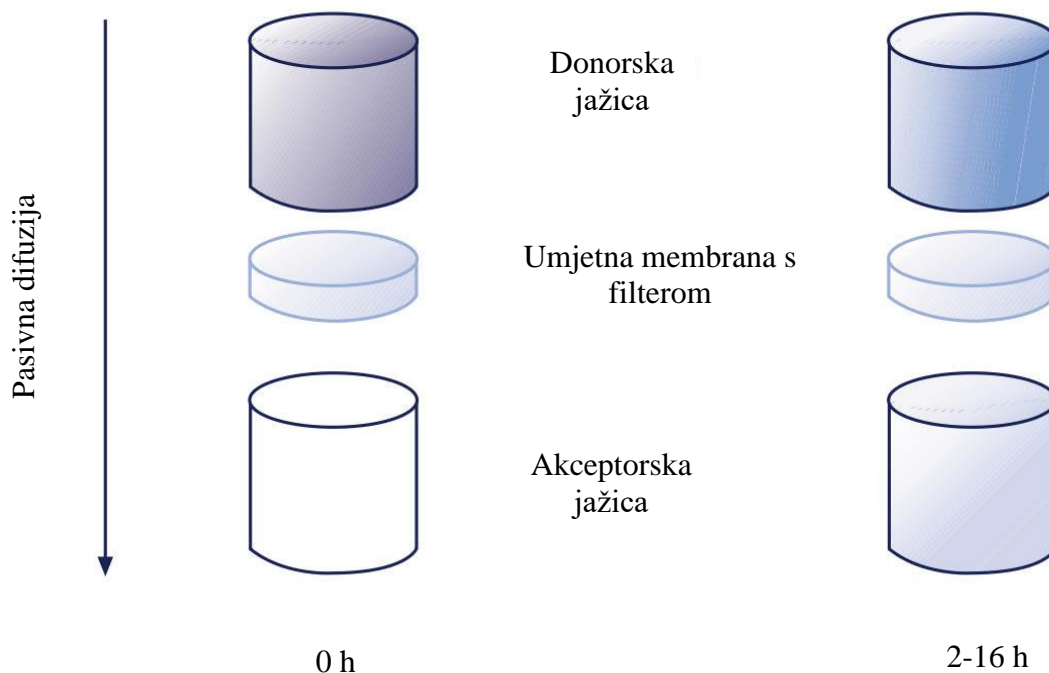
Slika 11. Struktura tetrazolijeve soli MTS i produkta formazan (Anakok, 2010)

Nakon perioda tretmana od 72 h uklonjen je medij, stanice su isprane PBS-om te je u svaku jažicu dodan svježi medij za uzgoj s MTS reagensom – 10 µL MTS/100 µL medija, te su stanice inkubirane 4 h na 37 °C. Intezitet razvijene boje odredio se spektrofotometrijski primjenom čitača ploča pri valnoj duljini od 492 nm. Intezitet obojenja medija ovisan je količina nastalog topivog produkta formazana u živim i zdravim stanicama. Preživljenje tretiranih Caco-2 stanica naspram netretiranih (kontrolnih) stanica računa se prema formuli [2]:

$$\text{preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ uzorka}}{\text{srednja vrijednost } A_{492} \text{ kontrole}} \times 100 \quad [2]$$

3.2.8. Određivanje propusnosti kroz umjetnu membranu- PAMPA test

PAMPA test (eng. *Parrallel Artificial Membrane Permeabilty Assay*) koristi se kao test permeabilnosti za predviđanje apsorpcije lijekova u farmaceutskoj industriji. PAMPA test predstavlja brzu i jeftinu alternativu staničnim modelima permeabilnosti kod kojeg se koriste sustavi umjetnih lipidnih membrana s filterom (Nožinić i sur., 2010). PAMPA test se sastoji od donorske i akceptorske jažice napunjene puferom i odvojene umjetnom membranom s filterom kroz koju se komponente transportiraju pasivnom difuzijom (slika 12). Većina se lijekova apsorbira u potpunosti ili djelomično pasivnim transportom, stoga su umjetne membrane idealni zamjenski sustav za gastrointestinalne ili druge tipove bioloških membrana u procjeni potencijala apsorpcije lijeka. PAMPA se izvodi na pločama s 96-jažica što omogućuje istovremeno testiranje velikog broja uzoraka (Kerns i sur., 2004).



Slika 12. Prikaz donorske/akceptorske jažice prije i nakon inkubacije (prema Schimdt i Lynch, 2003)

Metoda je provedena prema radu – Nožinić i suradnici (2010). Na filtere u svaku jažicu donorske ploče nanešeno je pažljivo bez dodirivanja 5 μL otopine L- α -fosfatidilkolina u dodekanu (1 %, m/v) te je ostavljeno da se osuši 24 h. Potom je donorska ploča postavljena na akceptorsku ploču koja je prethodno bila napunjena puferom. Dio akceptorske ploče je napunjen s 300 μL 5 % (v/v) DMSO u fosfatnom puferu (PBS, pH=7,4), dok je ostatak napunjen s 300 μL 5 % (v/v) NADES-a (Ty:Cou) u PBS-u. U jažice donorske ploče dodano je redom po 150 μL : otopine formulacija CIPM:Ty:Cou i CIPK:Ty:Cou koncentracije 5 mg mL^{-1} , otopina derivata ciprofloksacina ($c=5 \text{ mg mL}^{-1}$) u DMSO-u te samo otapalo- Ty:Cou. U donorske jažice ispod kojih je akceptorska ploča napunjena s 5 % (v/v) Ty:Cou u PBS-u, dodano je po 150 μL 50 % otopine formulacije CIPM:Ty:Cou i CIPK:Ty:Cou razrijeđene u 50 % DMSO u PBS-u. Takav sustav je prekriven plastičnim poklopcem kako bi se spriječilo isparavanje i inkubiran je na sobnoj temperaturi 24 sata. Nakon inkubacije, izmjereni su volumeni u akceptorskoj i donorskoj jažici, a koncentracije API-ja u odgovarajućim jažicama akceptorske ploče kao i u ishodnim otopinama određene su UV/Vis spektrofotometrijom. Kao pozitivna kontrola korišten je ketoprofen (NSAID KTP).

Nakon određenih koncentracija i volumena API-ja u donorskoj i akceptorskoj jažici, izračunata je masa API-ja u akceptorskim jažicama te su rezultati prikazani kao omjer mase

API-ja u akceptorskoj jažici i mase ishodnih otopina API-ja u donorskoj jažici (m/mo) nakon 24 h.

3.2.9. Obrada rezultata

Za obradu rezultata korišten je Microsoft Excel. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [3]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [4]$$

gdje je n ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačna vrijednost uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Jedan od principa Zelene kemije uključuje upotrebu sigurnih otapala za okoliš i ljude koja će smanjiti ili potpuno zamijeniti upotrebu opasnih organskih otapala koja se svakodnevno koriste u farmaceutskoj industriji u procesima sinteze, pročišćavanja, kristalizacije i formulacije aktivnih farmaceutskih tvari. Organska otapala su hlapljiva, zapaljiva i toksična, stoga postoji veliki interes za pronalazak alternativnih otapala (Emami i Shayanfar, 2020), među kojima su se prirodna niskotemperaturna eutektička otapala pokazala kao dobra zamjena. NADES-i radi niske toksičnosti, nehlapljivosti, nezapaljivosti te biorazgradivosti u potpunosti su u skladu s principima Zelene kemije.

U farmaceutskoj industriji, prirodna niskotemperaturna eutektička otapala pronašla su primjenu u mnogim područjima poput sustava za kontroliranu isporuku lijeka, medija za enzimske reakcije te za otapanje aktivnih farmaceutskih tvari. Iz literature je poznato da NADES-i utječu na poboljšanje topljivosti, kemijske stabilnosti, permeabilnosti i biodostupnosti aktivnih farmaceutskih tvari, što je zapravo i najveći izazov farmaceutske industrije u razvoju i formulaciji lijekova (Abidin i sur., 2019). Učinkovitost lijekova koji su već u upotrebi, može se postići poboljšanjem topljivosti API-ja. Tvari koje su teško topljive u vodi mogu se prevesti u tekući oblik tako da postanu dio DES-a, odnosno tada čine terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo. Zbog mogućnosti da otope tvari koje su teško topljive u vodi što posljedično utječe na njihovu biorasploživost, NADES-i se intenzivno istražuju posljednjih nekoliko godina za farmaceutsku primjenu.

Ciprofloksacin je fluorokinolonski antibiotik širokog spektra djelovanja, međutim sve veći porast antibiotske rezistencije utječe na smanjenje učinkovitosti ovog antibiotika te je nužna sinteza novih derivata kojima će se prevladati rezistencija. Osim toga, ciprofloksacin kao aktivna farmaceutska tvar se svrstava prema BCS-u u četvrtu skupinu lijekova s niskom topljivosti i permeabilnosti. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati mogućnost primjene prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala u poboljšanju topljivosti ciprofloksacina kao aktivne farmaceutske tvari te sinteza novih derivata ovog antibiotika. S obzirom na to da postoji velik broj potencijalnih kombinacija NADES-a, za predviđanje topljivosti derivata ciprofloksacina korišten je softver COSMO_{therm}. NADES-i u kojima je predviđena najbolja topljivost, odabrani su za eksperimentalno ispitivanje topljivosti primjenom UV/Vis spektrofotometrije. Nakon eksperimentalnog odabira najboljeg NADES-a pripremljene su formulacija derivata u tom otapalu te je spektrofotometrijski praćena stabilnost formulacija tijekom određenog vremenskog razdoblja pri različitim temperaturama. Nadalje, ispitana je *in vitro* biološka

aktivnost otopina derivata ciprofloksacina na Caco-2 staničnoj liniji primjenom MTS kolorimetrijske metode. PAMPA testom određena je prolaznost otopine derivata ciprofloksacina u NADES-u kroz umjetnu membranu.

4.1. PROCJENA TOPLJIVOSTI DERIVATA CIPROFLOKSACINA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA POMOĆU SOFTVERA COSMOtherm

Softver COSMOtherm korišten je za procjenu topljivosti dvaju derivata ciprofloksacina- CIPM i CIPK u različitim prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Pomoću softvera određeni su logaritmi koeficijenta aktivnosti ($\ln(\gamma)$), koji govore o topljivosti derivata ciprofloksacina u ispitanom NADES-u. Što je logaritam aktivnosti manji, to je veća topljivost derivata u odabranom otapalu. Na slikama 13 i 14 prikazani su rezultati ispitivanja topljivosti derivata CIPM, odnosno CIPK u NADES-ima s molarnim omjerima komponenti s udjelom vode 0 % prikazanih u tablici 2. Procjena topljivosti napravljena je dodatno i za NADES-e s udjelom vode od 10, 20, 30 i 50 %, međutim, prikazani su rezultati samo za postotak vode od 0 %.

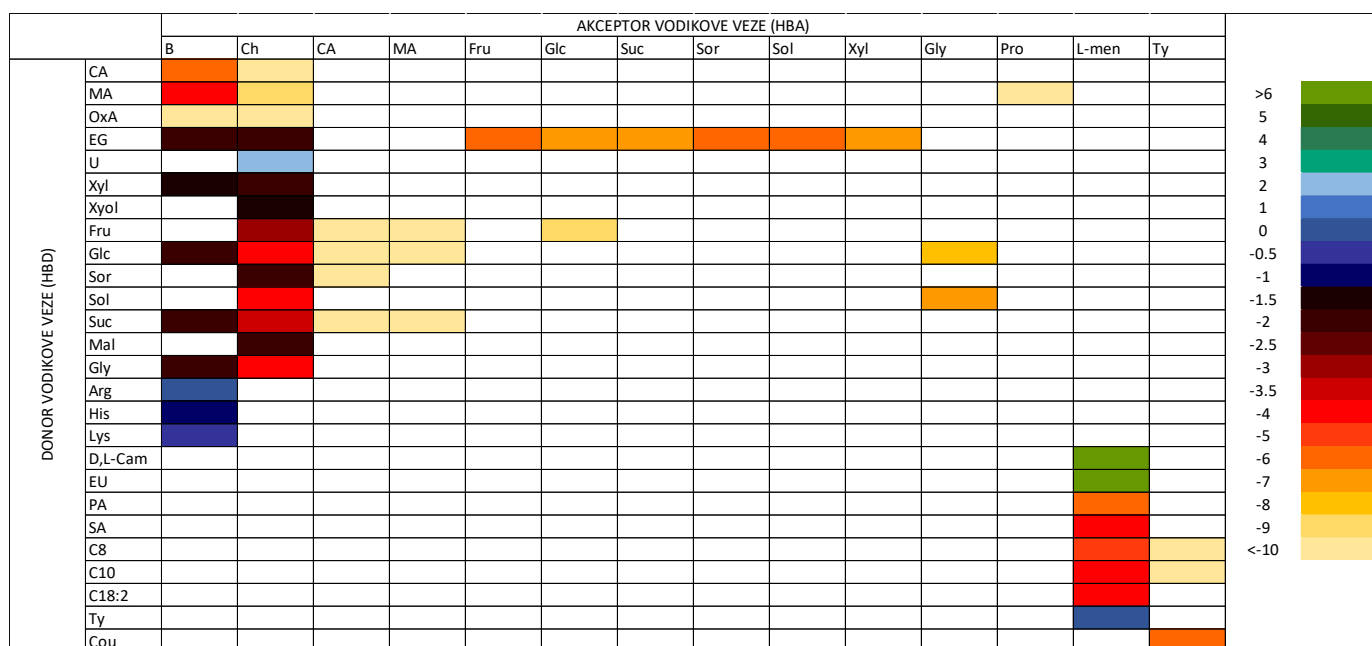
Tablica 2. Molarni omjeri komponenti NADES-a s 0 % vode za koje je ispitana topljivost derivata CIPM i CIPK primjenom softvera COSMOtherm

NADES	Molarni omjer	NADES	Molarni omjer
B:CA	1:1	CA:Suc	1:1
B:Glc	1:1	CA:Glc	1:1
B:Gly	1:2	Fru:EG	1:2
B:OxA:Gly	1:2:1	Glc:EG	1:2
B:Ma	1:1	Glc:Fru	1:1
B:EG	1:1	Gly:Glc	2:1
B:Arg	1:1	Gly:Sol	2:1
B:His	1:1	Ma:Fru	1:1
B:Lys	1:1	Ma:Glc	1:1
B:Xyl	1:1	Ma:Suc	2:1
B:Suc	4:1	Pro:Ma	1:1
ChCl:CA	1:1	Suc:EG	1:2
ChCl:EG	1:2	Sor:EG	1:2

Tablica 2. Molarni omjeri komponenti NADES-a s 0 % vode za koje je ispitana topljivost derivata CIPM i CIPK primjenom softvera COSMO $therm$ - nastavak

ChCl:Fru	1:1	Sol:EG	1:2
ChCl:Glc	1:1	Xyl:EG	1:2
ChCl:Gly	1:2	L-men:D,L-cam	1:1
ChCl:Ma	1:1	L-men:EU	1:1
ChCl:Mal	4:1	L-men:PA	1:1
ChCl:OxA	1:1	L-men:SA	4:1
ChCl:Suc	2:1	L-men:C8	1:1
ChCl:Sol	2:3	L-men:C10	1:1
ChCl:Sor	1:1	L-men:C18:2	1:1
ChCl:U	2:1	L-men:Ty	3:2
ChCL:Xyl	2:1	Ty:C8	1:3
ChCl:Xyol	5:2	Ty:C10	1:1
CA:Fru	1:1	Ty:Cou	3:2
CA:Sor	2:3		

Popis kratica za komponente otapala navedenih u tablici 2 i na slikama 13 i 14: Arg: arginin, B: betain, C10: dekanska kiselina, C18:2: linolna kiselina, C8: oktanska kiselina, CA: citratna kiselina, ChCl: kolin-klorid, Cou: kumarin, D,L-cam: D,L-kamfor, EG: etilen-glikol, EU: eukaliptol, Glc: glukoza, Gly: glicerol, His: histidin, L-men: L-mentol, Lys: lizin, Ma: jabučna kiselina, Mal: maltoza, OxA: oksalna kiselina, PA: perililna kiselina, SA: salicilna kiselina, Sol: sorbitol, Sor: Sorboza, Suc: saharoza, Ty: timol, U: urea, Xyl: ksiloza, Xyol: ksilitol.



Slika 13. Prikaz vrijednosti $\ln(\gamma)$ za CIPM u različitim NADES-ima s 0 % vode

Ciprofloksacin je jedan od primjera lijekova koji su praktički netopljivi u vodi i pri neutralnom pH. Njegova topljivost ovisi o pH vrijednosti te je najveća topljivost u kiselom mediju (Kalepu i Nekkanti, 2015). Takvi rezultati dobiveni su i nakon predviđanja topljivosti pomoću softvera COSMO $therm$, gdje su derivati CIPM i CIPK imali najmanju vrijednost $\ln(\gamma)$ za NADES-e s citratnom i maličnom kiselinom kao jednom od komponenti otapala. Nakon određenih logaritama koeficijenata aktivnosti, odabrano je šest prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za derivat CIPM od kojih su tri s najboljom predviđenom topljivošću ovog derivata te tri hidrofobna otapala. Za derivat CIPK odabrano je pet hidrofobnih otapala. Odabrana otapala za derivate CIPM, odnosno CIPK su:

- Citratna kiselina: glukoza (CA:Glc)=1:1, 10 % vode
- Prolin: malična kiselina (Pro:MA)=1:1, 10 % vode
- Betain: oksalna kiselina: glicerol (B:OxA:Gly)=1:2:1, 10 % vode
- Timol: oktanska kiselina (Ty:C8)=1:3, 0 % vode
- Timol: dekanska kiselina (Ty:C10)=1:1, 0 % vode
- Timol: kumarin (Ty:Cou)=3:2, 0 % vode
- L-mentol: linolna kiselina (L-men:C18:2)=1:1, 0% vode
- L-mentol: timol (L-men:Ty)=3:2, 0 % vode



Slika 14. Prikaz vrijednosti $\ln(\gamma)$ za CIPK u različitim NADES-ima s 0 % vode

Odabrana otapala su sintetizirana kako bi se u njima eksperimentalno odredila topljivost derivata CIPM i CIPK. Otapala koja nisu uspješno sintetizirana bez vode, dodana je voda u udjelu od 10 %. Potrebno je naglasiti kako su predviđanjem topljivosti softverom COSMOtherm odabrana najbolja otapala za derivate ciprofloksacina što značajno smanjuje laboratorijski rad i posljedično upotrebu kemikalija.

4.2. TOPLJIVOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA U PRIRODNYM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Važno farmakokinetičko svojstvo lijekova je topljivost te oralna bioraspoloživost koja predstavlja ukupni dio oralne doze koja će se isporučiti do ciljnog mjesta. Osim crijevne propusnosti, oralna bioraspoloživost u velikoj mjeri ovisi o apsorpciji lijeka, a samim time i o brzini otapanja lijeka u vodenom mediju, što predstavlja izazov za slabo topljive spojeve. Prema sustavu klasifikacije biofarmaceutika (BCS) ciprofloksacin pripada četvrtoj skupini spojeva koji imaju nisku topljivost i permeabilnost (Assali i sur., 2016). NADES-i su zbog svog zelenog karaktera uključujući netoksičnost, nehlapljivost i nezapaljivost pronašli primjenu u farmaceutici, posebice kao otapala za spojeve slabo topljive u vodenom mediju kao što je antibiotik ciprofloksacin. Osim što iskazuju dobru topljivost djelatne tvari lijeka, utječu i na poboljšanje propusnosti i stabilnosti te omogućuju učinkovitu dostavu lijeka do ciljnog mjesta u organizmu (Abidin i sur., 2019). Pretvorbom API-ja u tekuću formulaciju ostvaruje se bolja

bioraspoloživost, međutim, API mora biti otopljen u dostatnoj koncentraciji kako bi se postigao željeni terapijski učinak. Nakon odabira NADES-a u kojima je predviđena topljivost pomoću softvera COSMO $_{therm}$, eksperimentalno je određena topljivost derivata ciprofloksacina kako je opisano u poglavlju 3.2.4. Rezultati analize prikazani su u tablici 3, a kvalitativna i kvantitativna analiza derivata CIPM i CIPK otopljenog u odabranim otapalima provedena je primjenom UV/Vis spektrofotometrije.

Tablica 3. Topljivost derivata CIPM i CIPK u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (NADES)

NADES	Topljivost derivata CIPM (mg mL ⁻¹) pri 25 °C
CA:Glc (1:1) s 10 % vode	mlječno obojenje
Pro:Ma (1:1) 10% vode	<1
B:OxA:Gly (1:2:1) s 10 % vode	<1
Ty:C8 (1:3)	<1.2
Ty:C10 (1:1)	2.6
Ty:Cou (3:2)	10
	Topljivost derivata CIPK (mg mL ⁻¹) pri 25 °C
L-men:C18:2 (1:1)	<5
L-men:Ty(3:2)	<5
Ty:C8 (1:3)	<1.25
Ty:C10 (1:1)	2.5
Ty:Cou (3:2)	5

Topljivost ciprofloksacina predstavlja veliki problem za farmaceutsku industriju jer je netopljiv u polarnim i nepolarnim otapalima na sobnoj temperaturi. Njegova topljivost ovisi o pH vrijednosti te je gotovo netopiv u vodi i alkoholu. Pri pH vrijednosti 4 do 5 ima najveću topljivost (>40 mg mL⁻¹) ukoliko se pH podesi HCl-om. Također, njegova topljivost ovisi i o temperaturi, povećanjem temperature povećava se i topljivost (Parwe i sur., 2014). S obzirom na slabu topljivost u vodi, intenzivno se istražuju novi derivati ciprofloksacina koji će imati bolju topljivost. Assali i sur. (2016) sintetizirali su tri derivata ciprofloksacina dodatkom etilen glikola te odredili njihovu topljivost pri temperaturi od 37 °C i pH 7,4. Postigli su topljivost od 38,7 mg mL⁻¹ za derivat s trietilen glikolom zbog povećanja hidrofilnog karaktera molekule, što je veća topljivost od ciprofloksacina u vodi koja iznosi 0,1 mg mL⁻¹. Breda i sur. (2009) odredili su topljivost hidrokloridnom derivatu ciprofloksacina s aluminijskim ionom pri uvjetima od 37 °C i pH 6,9 koja iznosi 3,1 mg mL⁻¹, dok je za ciprofloksacin pri istim uvjetima 0,22 mg mL⁻¹.

Iz rezultata dobivenih UV/Vis spektroskopijom vidljivo je kako je najveća topljivost derivata pri 25 °C zabilježena u hidrofobnom NADES-u timol:kumarin=3:2 te za acetil-ciprofloksacin iznosi 10 mg mL⁻¹, dok za 2-metilpentanoil-ciprofloksacin iznosi 5 mg mL⁻¹. Iako je COSMO^{therm} softverom predviđena najveća topljivost derivata u kiselim NADES-ima, eksperimentalno je potvrđeno drugačije. Pri određivanju topljivost u NADES-u koji je predviđen kao najbolje otapalo (citratna kiselina:glukoza=1:1) došlo je do stvaranja mliječnog obojenja. Možemo zaključiti da aciliranjem ciprofloksacina povećavamo njegovu hidrofobnost te se takvi derivati najbolje otapaju u hidrofobnim otapalima. Shodno tome, hidrofobno otapalo timol:kumarin (Ty:Cou)=3:2 odabrano je za pripremu formulacije derivata CIPM i CIPK.

Dosadašnja istraživanja primjene DES-ova u farmaceutici većinom su bazirana na hidrofilnim DES-ovima. Međutim, sve veću pozornost imaju hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala u poboljšanju topljivosti, permeabilnosti i apsorpciji API-ja, čime se razvija novi sustav isporuke lijekova do ciljnog mjesta (Cao i Su, 2021). Još su 1998., Stott i suradnici opisali formiranje eutektičke smjese terpena (mentola i timola) za poboljšanje topljivosti i transdermalne permeabilnosti ibuprofena. Prema Tuntarawongsa i Phaechamud (2012) topljivost ibuprofena u hidrofobnom DES-u mentol:kamfor (1:1) je 1100 puta veća u usporedbi s vodom. Također, Al-Akayleh i sur. (2019) pokazali su učinkovitost hidrofobnog DES-a (mentol:dekanska kiselina) pri otapanju slabo topljivih lijekova u vodi (flukonazol i mometazon furoat), gdje je topljivost u hidrofobnom DES-u bila 26 do 120 puta veća od topljivosti ovih API-ja u vodi.

Osim u farmaceutici, hidrofobna niskotemperaturna eutektička otapala pronašla su primjenu i u ekstrakciji onečistila iz vode. Florindo i sur. (2019) opisali su upotrebu hidrofobnog DES-a u pročišćavanju vode zagađene ciprofloksacinom, gdje se DES laurinska kiselina:dekanska kiselina (1:2) pokazao kao najbolje otapalo za ciprofloksacin.

Obzirom na povoljna svojstva hidrofobnih DES-a u poboljšanju topljivosti API-ja te činjenicu da su ova otapala još uvijek relativno nova i nedovoljno istražena, potrebno je provesti daljnje studije za potencijalnu primjenu u razvoju formulacije lijekova i u ostalim područjima industrije.

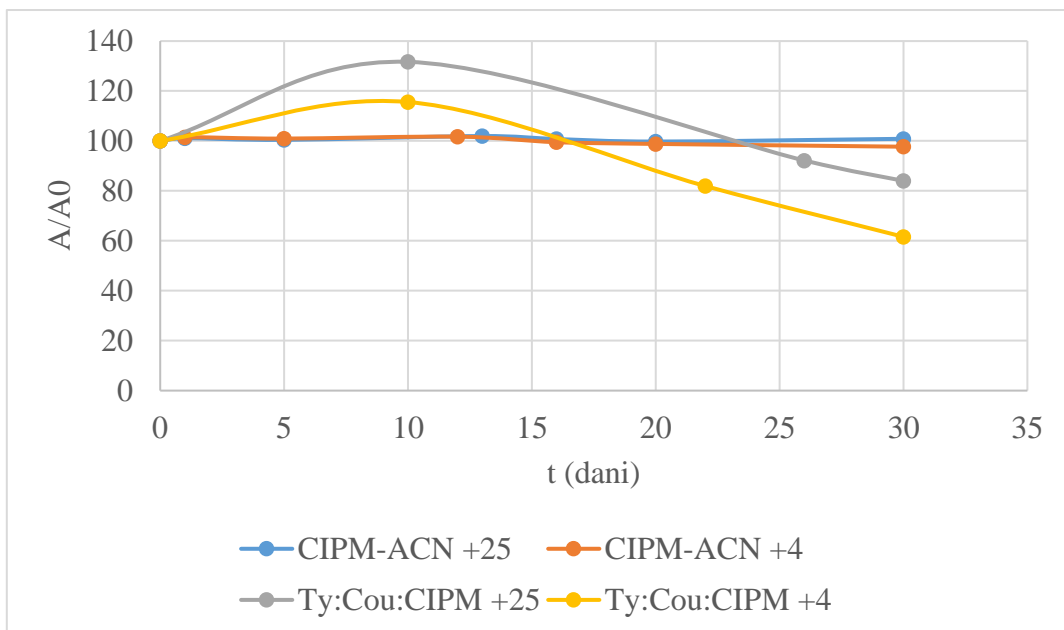
4.3. STABILNOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA U ODABRANOM PRIRODNOM NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU

Stabilnost aktivne farmaceutske tvari definira se kao sposobnost određene formulacije da u određenom sustavu zadrži svoja fizikalna, kemijska, mikrobiološka i toksikološka svojstva. Ispitivanje stabilnost API-ja predstavlja preduvjet za prihvaćanje i odobrenje bilo kojeg

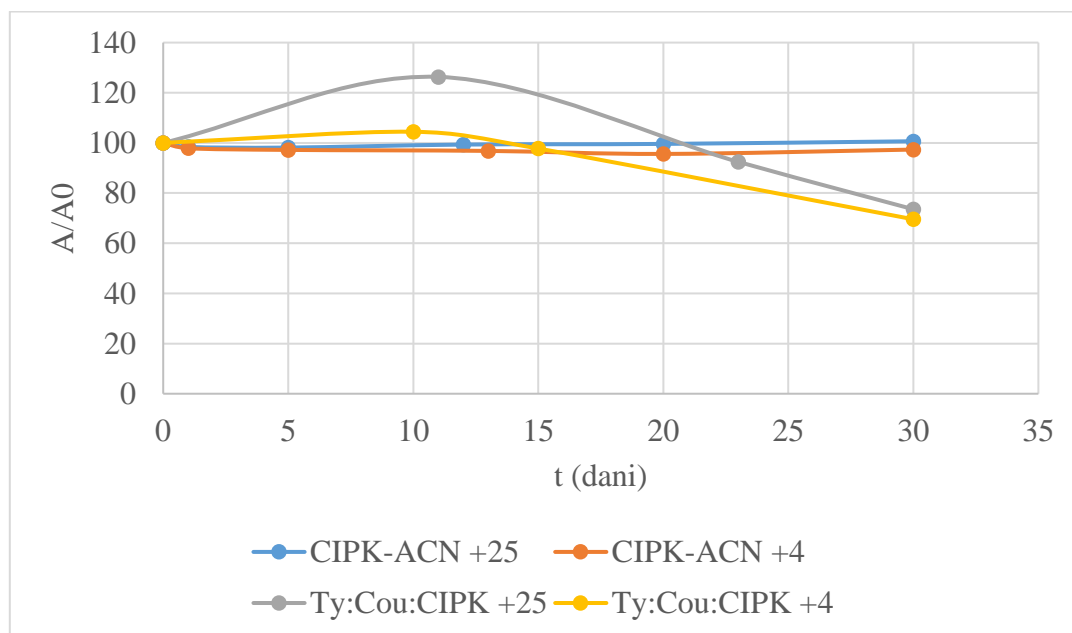
farmaceutskog proizvoda, stoga se određuje u ranoj fazi razvoja formulacije i proizvodnje lijeka. Na stabilnost API-ja utječu različiti faktori kao što su: temperatura, pH, vlaga, svjetlost, kisik (Zothanpuii i sur., 2020). Osim povoljnog utjecaja na topljivost API-ja, DES-ovi mogu utjecati i na njihovu kemijsku stabilnost (Pedro i sur., 2019). Primjer je aspirin, koji nije stabilan u vodenoj otopini tijekom dužeg skladištenja jer sadrži ester koji podliježe hidrolizi, međutim, ako je aspirin otopljen u DES-u, njegova hidroliza je usporena (Lu i sur., 2013). Pokazano je da DES-ovi utječu i na stabilnost β -laktamskih antibiotika (Olivares i sur., 2018). Što se tiče ciprofloksacina, potrebno ga je čuvati na tamnijem mjestu jer je podložan fotolitičkoj razgradnji (Sharma i sur., 2010). Međutim, stabilnost suhe tvari ciprofloksacina vrlo je visoka na sobnoj temperaturi. Ciprofloksacin otopljen u tekućini za dijalizu (25 mg L^{-1}) uz dodatak 1,36 % dekstroze, stabilan je i nakon 42 dana pri skladištenju na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Parwe i sur., 2014).

U ovom radu stabilnost derivata ciprofloksacina- CIPM i CIPK otopljenih u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Ty:Cou=3:2 i u organskom otapalu 80 % (v/v) acetonitrilu praćena je spektrofotometrijski. U određenim vremenskim intervalima, mjerene su apsorbancije otopine derivata ciprofloksacina čuvane na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a rezultati su prikazani kao ovisnosti omjera apsorbancije (A/A_0) o vremenu (t). Grafički prikaz stabilnosti derivata ciprofloksacina CIPM u NADES-u Ty:Cou=3:2 i u organskom otapalu 80 % (v/v) acetonitrilu pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i $25 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom vremena prikazan je na slici 15, odnosno za derivat CIPK na slici 16.

Oba derivata ciprofloksacina otopljeni u organskom otapalu (80 % (v/v) acetonitril) stabilna su tijekom 30 dana pri temperaturi od $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i $25 \text{ }^\circ\text{C}$, što se vidi iz izmjerenih apsorbancija čije su vrijednosti gotovo iste tokom vremena. Primjećuje se razlika stabilnosti ovisno o temperaturi, gdje je veća stabilnost derivata ciprofloksacina otopljenih u organskom otapalu zabilježena pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Stabilnost formulacija CIPM i CIPK u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Ty:Cou=3:2 prvih 10 dana je bolja od stabilnosti u organskom otapalu, međutim, nakon 10.-tog dana dolazi do pada stabilnosti te su apsorbancije pri isteku 30.-tog dana niže od izmjerenih apsorbancija u organskom otapalu. Također, stabilnost formulacija CIPM i CIPK u Ty:Cou je veća pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$, nego pri skladištenju na $4 \text{ }^\circ\text{C}$, što je malo neočekivan rezultat. Zaključujemo da stabilnost otopine derivata ciprofloksacina ovisi o temperaturi te su otopine formulacija derivata ciprofloksacina u NADES-u stabilnije ako se čuvaju na sobnoj temperaturi. Zbog pada stabilnosti u NADES-u nakon desetog dana, potrebno je ispitati i druge DES-ove u kojima će ovaj API biti stabilan i nakon dužeg skladištenja.



Slika 15. Grafički prikaz stabilnosti derivata ciprofloksacina CIPM otopljenog u Ty: Cou=3:2 i 80 % (v/v) acetonitrilu pri 4 °C i 25 °C tijekom 30 dana



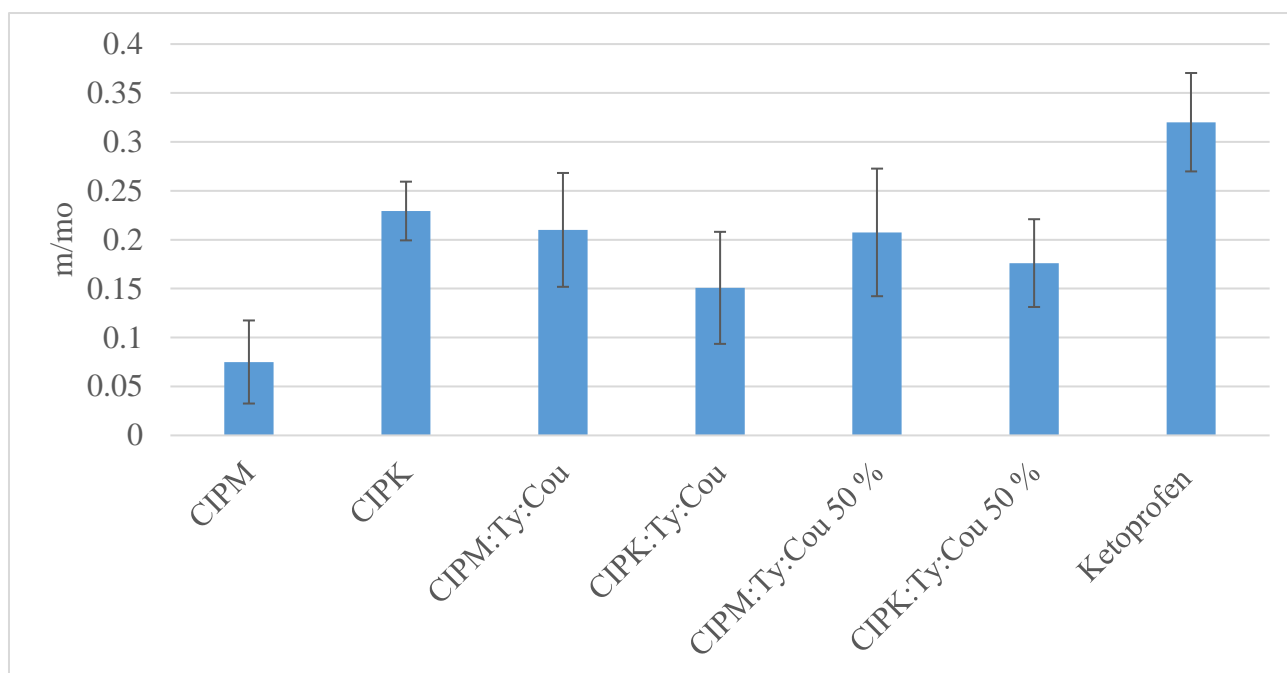
Slika 16. Grafički prikaz stabilnosti derivata ciprofloksacina CIPK otopljenog u Ty: Cou=3:2 i 80 % (v/v) acetonitrilu pri 4 °C i 25 °C tijekom 30 dana

4.4. PERMEABILNOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA U ODABRANOM PRIRODNOM NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU

Test propusnosti kroz umjetnu membranu ili tzv. PAMPA test je ne-biološki i reproducibilan test određivanja pasivne, transmembranske permeabilnosti koji se koristi prilikom rane faze otkrivanja lijekova. Više od 80 % lijekova ulazi u krvotok pasivnom difuzijom kroz crijevni epitel te je propusnost kroz umjetnu lipofilnu membranu pasivnim transportom određena ovim testom u korelaciji s apsorpcijom lijekova kod ljudi. Prednost PAMPA testa nad biološkim modelima je u jednostavnosti izvedbe, niske cijene i ispitivanju velikog broja uzoraka u kratkom periodu (do 24 h) (Schmidt i Lynch, 2003). Ne-stanični modeli trebali bi se koristiti kao primaran model za procjenu permeabilnosti tijekom ranog otkrića lijeka, a zatim kao idući korak može se provesti ispitivanje *in vitro* sustavom među kojima se monosloj Caco-2 stanica najčešće koristi u predviđanju permeabilnosti i apsorpcije lijekova (Nožinić i sur., 2010).

U radu Bermejo i sur. (2004) prikazana je upotreba PAMPA testa za određivanje propusnosti ciprofloksacina i pojedinih derivata koji se razlikuju u duljini alkilnog lanca na N-4 poziciji piperazinskog prstena. Prema izračunatoj permeabilnosti, $P [10^{-6} \text{ cm s}^{-1}]$, ciprofloksacin u vodenoj otopini ima permeabilnost od $2,7 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, dok dodatkom metilne skupine permeabilnost se povećava 50,74 puta. Povećanje duljine alkilnog lanca rezultira povećanjem permeabilnosti, prosječno 2,2 puta po metilnoj grupi, izuzev ciprofloksacina i derivata s jednom metilnom skupinom gdje je povećanje permeabilnosti veće. U ovom radu, također je pokazano da PAMPA test može dobro predvidjeti propusnost kao što je i dobiveno *in vivo* modelom zbog čega ima prednost u primjeni nad biološkim modelom s Caco-2 stanicama (Bermejo i sur., 2004).

Ciprofloksacin je prema BCS-u svrstan u skupinu lijekova s niskom topljivosti i permeabilnosti (klasa IV) te je u ovom radu ispitana permeabilnost derivata ciprofloksacina u formulaciji s NADES-om pomoću PAMPA testa s pretpostavkom da će NADES-i poboljšati propusnost API-ja budući da se pretpostavlja njihov pozitivan utjecaj na poboljšanje topljivosti.



Slika 17. Propusnost otopine derivata ciprofloksacina u DMSO (CIPM, CIPK), formulacija derivata u NADES-u (CIPM:Ty:Cou, CIPK:Ty:Cou) i 50 % razrijeđenih formulacija derivata u 50 %-tnom DMSO (CIPM:Ty:Cou 50 %, CIPK:Ty:Cou 50 %) određena PAMPA testom nakon 24 sata***

*rezultati su srednja vrijednost ± S.D. (n=3)

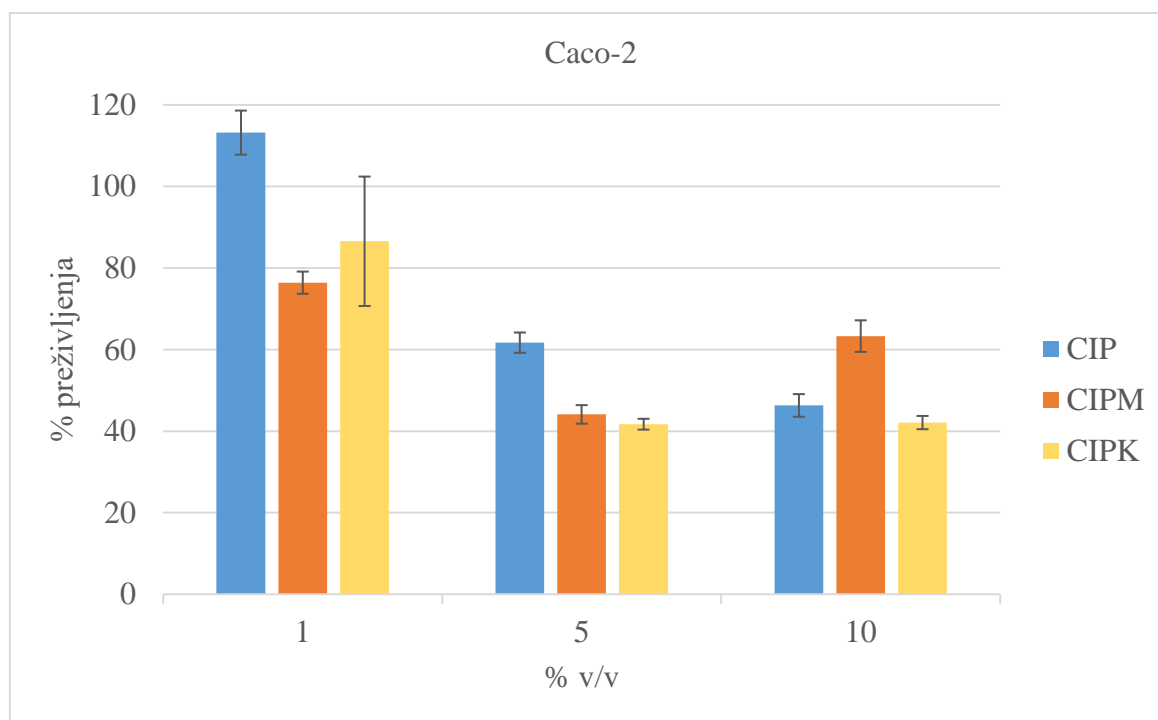
**Ketoprofen – pozitivna kontrola

Propusnost formulacija derivata ciprofloksacina u NADES-u, 50 % razrijeđene formulacije u 50 %-tnom DMSO i derivata ciprofloksacina u DMSO kroz umjetnu lipidnu membranu određena je PAMPA testom, a rezultat na slici 17 prikazan je kao omjer mase API-ja u akceptorskoj jažici i mase ishodnih otopina API-ja u donorskoj jažici (m/m_0) nakon 24 sata od nanošenja uzoraka. Kao pozitivna kontrola korišten je ketoprofen radi njegove dobre permeabilnosti. Koncentracija ishodnih otopina derivata ciprofloksacina u Ty:Cou i DMSO dodanih u donorsku jažicu iznosila je 5 mg mL^{-1} , odnosno za 50 % razrijeđenu formulaciju $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Koncentracije API-ja u akceptorskoj jažici nakon 24 sata određene su spektrofotometrijski te su izmjereni i volumeni otopina u akceptorskoj jažici kako bi se izračunala masa API-ja koja je permeabilizirala iz donorske u akceptorsku jažicu. Prema izračunatim omjerima masa API-ja u akceptorskoj i donorskoj jažici, za derivat CIPM otopljen u DMSO taj omjer iznosi $0,075 \pm 0,04$ dok je za formulaciju CIPM u Ty:Cou $0,21 \pm 0,06$ te za razrijeđenu formulaciju $0,20 \pm 0,07$. Možemo zaključiti da je odabrani NADES poboljšao permeabilnost CIPM, u odnosu na otopinu u DMSO-u, i to za $>2,6$ puta. Izračunata vrijednost omjera masa je veća za CIPM u NADES-u nego za CIPM u DMSO-u što znači da je i više API-

ja permeabiliziralo kroz membranu iz donorske u akceptorsku jažicu. Uspoređujući formulaciju CIPM s onom 2x razrijeđenom s DMSO-om, rezultati su skoro jednaki, ali je ipak nerazrijeđena formulacija CIPM u Ty:Cou imala veću propusnost od razrijeđene. Što se tiče CIPK derivata, odabrani NADES nije poboljšao permeabilnost jer omjer masa iznosi $0,15 \pm 0,06$ dok je za otopinu CIPK u DMSO $0,23 \pm 0,03$. Razrijeđena formulacija CIPK pokazala je bolju permeabilnost od nerazrijeđene, što je i očekivano radi bolje propusnosti ovog API-ja u DMSO. Međutim, CIPK radi većeg acilnog dodatka i shodno tome većoj hidrofobnosti, pokazao je bolju permeabilnost kada je otopljen u DMSO-u od otopine CIPM u DMSO, što je u skladu s rezultatima iz rada Bermejo i sur. (2004). Za derivat CIPK potrebno je pronaći druge NADES-e u kojima će se postići bolja topljivost i prema tome i veća permeabilnost nego u klasičnom organskom otapalu.

4.5. BIOLOŠKA AKTIVNOST DERIVATA CIPROFLOKSACINA

Dosadašnja istraživanja ukazuju da ciprofloksacin i njegovi derivati osim antimikrobne aktivnosti pokazuju i antitumorsku aktivnost. U ovom radu provedeno je ispitivanje djelovanja derivata ciprofloksacina na tumorsku staničnu liniju Caco-2. Caco-2 je stanična linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma te se koristi kao model crijevne epitelne barijere. Iako je cilj bio ispitati *in vitro* biološku aktivnost otopina derivata CIPM i CIPK u odabranom NADES-u, prilikom ispitivanja biološke aktivnosti *in vitro* u kulturi stanica pojavio se problem u provedbi metode zbog različite lipofilnosti formulacije derivata u NADES-u i medija za uzgoj stanica. Derivati su bili otopljeni u hidrofobnom NADES-u timol:kumarin (3:2) te uslijed tretiranja Caco-2 stanica pripremljenim formulacijama došlo je do razdvajanja masnog sloja na površini medija za uzgoj što je onemogućavalo mjerenje apsorbancija, odnosno određivanje postotka preživljenja stanica. Masni sloj se nije mogao ukloniti, probali smo na nekoliko načina to riješiti, stoga je odlučeno da se ispita *in vitro* učinak derivata CIPM i CIPK otopljenih u DMSO kao organskom otapalu na tumorskim stanicama, budući da u literaturi nema podataka o njihovom učinku na Caco-2 stanice. Stanice su bile nacijepljene na ploče od 96 jažica i nakon 24 sata tretirane različitim volumenima derivata ciprofloksacina od 1 do 10 % (v/v) otopljenih u 100 % dimetilsulfoksidu (DMSO) koncentracije 1 mg mL^{-1} i ciprofloksacinom otopljenom u 10 % DMSO ($c=1 \text{ mg mL}^{-1}$) uz dodatak $1 \text{ }\mu\text{L HCl-a}$. Nakon 72 sata tretmana, preživljenje stanica određeno je MTS kolorimetrijskom metodom i izraženo u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.



Slika 18. Utjecaj ciprofloksacina, acetil-ciprofloksacina i 2-metilpentanoil-ciprofloksacina na Caco-2 staničnu liniju*

*rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. (n=4)

Na temelju rezultata preživljenja stanica (%) prikazanih na slici 18 može se uočiti da derivati ciprofloksacina CIPM i CIPK imaju inhibitorni učinak na proliferaciju Caco-2 stanica pri volumnim udjelima od 1, 5 i 10 % (v/v), gdje je najveći inhibitorni učinak postignut pri volumnom udjelu od 5 % (v/v) te je približno jednak za oba derivata. Postotak inhibicije pri tom volumnom udjelu za CIPM iznosi 56 %, a za derivat CIPK 59 %. Derivati su također djelovali inhibitorno i pri najmanjem volumnom udjelu, gdje je postotak preživljenja stanica za CIPM 76 % te za CIPK 86 %. Budući da su derivati ciprofloksacina izazvali inhibiciju rasta Caco-2 veću od 50 %, izračunata je IC_{50} vrijednost, odnosno ona koncentracija ispitivane tvari pri kojoj je vijabilnost stanica 50 %. IC_{50} za CIPM iznosi $0,037 \text{ mg mL}^{-1}$, dok je za CIPK $0,039 \text{ mg mL}^{-1}$. Što se tiče samog ciprofloksacina, postotak preživljenja pri volumnom udjelu od 1 % (v/v) iznosi 113 % što znači da nije došlo do inhibitornog učinka, međutim pri volumnim udjelima od 5 i 10 % (v/v) postotak preživljenja je 61 % odnosno 46 %. IC_{50} vrijednost za ciprofloksacin je veća od ispitanih derivata te iznosi $0,068 \text{ mg mL}^{-1}$. Možemo zaključiti da derivati ciprofloksacina CIPM i CIPK imaju bolji antitumorski učinak od čistog ciprofloksacina, međutim, derivati su otopljeni u 100 % DMSO koji je pri volumnim udjelima većim od 1 % toksičan za stanice (Yuan i sur., 2014) te je i ovo organsko otapalo jednim dijelom zaslužno za inhibiciju proliferacije Caco-2 stanica.

Azema i sur. (2009) su također primijetili inhibitorni učinak *N*-aciliranih derivata ciprofloksacina različite lipofilnosti na pet tumorskih staničnih linija (adenokarcinom prostate (PC-3), glioblastoma (U373-MG), kolorektalni adenokarcinom (LoVo), adenokarcinom pluća (A549) i dojke (MCF-7)) te su izračunali njihove IC₅₀ vrijednosti. Rezultati su pokazali da lipofilnost molekule nije u korelaciji s antitumorskom aktivnošću te da su dva derivata 1-ciklopropil-6-fluor-7-[4-(2-kloroacetil)piperazin-1-il]-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina, 7-(4-dekanoilpiperazin-1-il)-1-ciklopropil-6-fluoro-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina) pokazala IC₅₀ vrijednost ($\leq 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) manju od čistog ciprofloksacina. Osim toga, ovim istraživanjem je potvrđeno da se na citotoksičnost ciprofloksacina može pozitivno utjecati dodatkom jednostavnih supstituenata na piperazinski prsten te naši rezultati potvrđuju ovu hipotezu jer je jednostavnom modifikacijom ciprofloksacina postignuto veće inhibicijsko djelovanje od čistog ciprofloksacina. Nadalje, Rabbani i Islam (2020) također su koristili DMSO kao otapalo za *N*-acilirane derivate ciprofloksacina pri ispitivanju citotoksičnosti na račiću *Artemia salina*. Rezultati su pokazali da svih šest derivata ciprofloksacina imaju veću aktivnost od ciprofloksacina gdje su vrijednosti IC₅₀ derivata 1,8 do 7,2 puta manje od ciprofloksacina čija IC₅₀ iznosi $36,42 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Antitumorski učinak *N*-aciliranih derivata na piperazinskom prstenu potvrdili su i Alipour i sur. (2011) na humanoj staničnoj liniji raka dojke, gdje je postotak preživljenja stanica određen MTT kolorimetrijskom metodom, a IC₅₀ vrijednost za derivat koji sadrži *N*-2-(furyl-2-il)-2-(klorobenziloksimino)-etil supstituent iznosi $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, što je 2,4 puta manje od tamoksifena koji se koristi u prevenciji raka dojke.

Budući da je NADES Ty:Cou (3:2) korišten u pripremi formulacija derivata ciprofloksacina CIPM i CIPK, u završnom radu Šarac (2021) ispitana je citotoksičnost NADES-a na tumorskoj staničnoj liniji HeLa i normalnoj staničnoj liniji HaCat. Otapalo Ty:Cou okarakterizirano je kao nisko citotoksično eutektičko otapalo, jer ni pri najvišim koncentracijama otapala, preživljenje stanica nije manje od 50 %. Pri koncentraciji od 2000 mg L^{-1} vidljivo je najveće inhibitorno djelovanje na proliferaciju HaCaT stanica gdje postotak inhibicije iznosi tek 26 %, dok je za HeLa staničnu liniju koncentracija otapala od 1000 mg L^{-1} imala najveći inhibicijski učinak od 23 % (Šarac, 2021). Malo je poznatih istraživanja o učinku hidrofobnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala na rast staničnih linija te njihovoj primjeni za razvoj formulacije lijekova u obliku terapijskog eutektičkog otapala, stoga su navedeni rezultati o biološkoj aktivnosti derivata ciprofloksacina i otapala Ty:Cou smjernica za daljnja istraživanja koja uključuju antimikrobnu i biološku aktivnost formulacije derivata

ciprofloksacina u Ty:Cou, a provest će se u narednom periodu u sklopu HRZZ projekta „Racionala dizajn prirodnih eutektskih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“.

Cormier i sur. (2012) ispitali su antimikrobnu aktivnost derivata CIPM i CIPK prema metilicin-rezistentnoj *Staphylococcus aureus* (MRSA) mjereći promjer zone inhibicije i uspoređujući ga s ciprofloksacinom, gdje su oba derivata pokazala jače inhibitorno djelovanje. Promjer inhibicije ciprofloksacina je 6 mm, dok je za CIPM- 24 mm i za CIPK - 33 mm. Također su odredili i minimalnu inhibitornu koncentraciju koja za ciprofloksacin iznosi $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, dok su za derivate niže vrijednosti (CIPM- $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, CIPK- $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Osim toga, ispitana je i antimikrobna aktivnost prema *B. anthracis* i *E. faecalis*, gdje su se derivati također pokazali učinkovitiji za razliku od ciprofloksacina.

U konačnici, sukladno postavljenim ciljevima ovog diplomskog rada, možemo zaključiti da prikazani rezultati i zaključci koji iz njih proizlaze doprinose razvoju novih formulacija različitih API-ja primjenom NADES-a kao zamjenskih otapala sa „zelenim“ svojstvima. Predviđanje topljivosti novosintetiziranih derivata ciprofloksacina pomoću softvera COSMOtherm značajno je skratilo vrijeme potrebe za probir najpogodnijeg NADES-a te su eksperimentalno sintetizirani i ispitani samo oni NADES-i koji su se modelom pokazali kao najbolji obzirom na topljivost. Nadalje, iako nije zamijećeno poboljšanje stabilnosti derivata CIPM i CIPK u NADES-u, u odnosu na njihove otopine u organskom otapalu te nije određena biološka aktivnost derivata u NADES-u, rezultati određivanja topljivosti i permeabilnosti pripremljenih formulacija dvaju derivata ciprofloksacina u NADES-u ukazuju na značaj i vrijednost ovakvog pristupa u razvoju novih i boljih formulacija lijekova.

5. ZAKLJUČCI

1. Upotrebom softvera COSMO $_{therm}$ predviđena je topljivost *N*-acetiliranog (CIPM) i *N*-2-metilpentanoilnog derivata ciprofloksacina (CIPK) u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, pri čemu je najbolja topljivost predviđena u nekoliko kiselih i hidrofobnih NADES-a. Na temelju rezultata logaritama koeficijenata aktivnosti, $\ln(\gamma)$, odabrano je i pripremljeno šest NADES-a za otapanje derivata CIPM te pet NADES-a za CIPK.
2. Eksperimentalna topljivost derivata ciprofloksacina određena je spektrofotometrijski. Računalnim programom je predviđena najbolja topljivost u NADES-u limunska kiselina:glukoza (Cit:Glc=1:1), no eksperimentalno je određena najbolja topljivost u hidrofobnom NADES-u timol:kumarin (Ty:Cou=3:2) koja za CIPM iznosi 10 mg mL⁻¹, te za CIPK 5 mg mL⁻¹.
3. Stabilnost derivata ciprofloksacina na temperaturama od 4 °C i 25 °C, tijekom mjesec dana praćena je spektrofotometrijski u hidrofobnom NADES-u Ty:Cou te u organskom otapalu 80 % (v/v) acetonitrilu. Oba derivata su tijekom prvih deset dana stabilna u odabranom NADES-u, gdje nakon toga dolazi do pada stabilnosti. Derivati su stabilni u 80 % (v/v) acetonitrilu tijekom 30 dana.
4. Testom propusnosti kroz umjetnu membranu (PAMPA test) određena je permeabilnost otopine derivata ciprofloksacina u NADES-u. Za derivat CIPM, određeno je poboljšanje propusnosti u formulaciji s NADES-om u odnosu na propusnost ovog derivata u otopini DMSO. Derivat CIPK, koji je hidrofobniji, ima bolju propusnost u klasičnom organskom otapalu DMSO-u, odnosno u formulaciji s NADES-om nije došlo do poboljšanja njegove permeabilnosti.
5. Biološka aktivnost derivata ciprofloksacina otopljenih u DMSO u volumnim udjelima od 1, 5 i 10 % (v/v) ispitana je *in vitro* primjenom MTS kolorimetrijske metode na Caco-2 tumorskoj staničnoj liniji. Derivati su pokazali inhibirajuće djelovanje na proliferaciju Caco-2 stanica. Izračunata su IC₅₀ vrijednosti koje za CIPM iznose 0,037 mg mL⁻¹, za CIPK 0,039 mg mL⁻¹ i za ciprofloksacin 0,068 mg mL⁻¹. U usporedbi sa ciprofloksacinom, sintetizirani derivati su pokazali izraženiji citotoksični učinak odnosno vjerojatno imaju bolji antitumorski potencijal.
6. Poboljšanje topljivosti i permeabilnosti pripremljenih formulacija derivata CIPM i CIPK u NADES-u ukazuje na mogućnost primjene prirodnih niskotemperaturnih eutektička otapala za razvoj novih i boljih formulacija lijekova.

6. LITERATURA

Abbott AP, Ahmed EI, Prasad K, Qader IB, Ryder KS (2017) Liquid pharmaceuticals formulation by eutectic formation. *Fluid Ph Equilibria* 448, 2-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2017.05.009>.

Abidin MHZ, Hayyan M, Ngoh GC, Wong WF, Looi CY (2019) Emerging Frontiers of Deep Eutectic Solvents in Drug Discovery and Drug Delivery Systems. *J Control Release* **316**, 168-195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.019>.

Al-Akayleh F, Mohammed Ali HH, Ghareeb MM, Al-Remawi M (2019) Therapeutic deep eutectic system of capric acid and menthol: characterization and pharmaceutical application. *J Drug Deliv Sci Technol* **53**, 101159. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101159>.

Ali SQ, Zehra A, Naqvi BS, Shah S, Bushra R (2010) Resistance Pattern of Ciprofloxacin Against Different Pathogens. *Oman Med J* 25, 294-298. <https://dx.doi.org/10.5001%2Fomj.2010.85>.

Alipour E, Mohammadhosseini N, Panah F, Ardestani SK, Safavi M, Shafiee A, i sur. (2011) Synthesis and *In Vitro* Cytotoxic Activity of N-2-(Furyl)-2-(chlorobenzyloxyimino) Ethyl Ciprofloxacin Derivatives. *J Chem* **8**, 1226-1231. <https://doi.org/10.1155/2011/842982>.

Alsughayer A, Elassar AA, Hasan AA, Al Sagher F (2021) Antibiotic resistance and drug modification: Synthesis, characterization and bioactivity of newly modified potent ciprofloxacin derivatives. *Bioorg Chem* **108**, 104658. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104658>.

Anakok OF (2010) Serrulatanes from *Eremophila neglecta*: their spectrum of antibacterial activity, cytotoxicity and mode of action (doktorski rad), School of Pharmacy and Medical Sciences, University of South Australia, Australia.

Arab-Bafrani Z, Shahbazi-Gahrouei D, Abbasian M, Fesharaki M (2016) Multiple MTS Assay as the Alternative Method to Determine Survival Fraction of the Irradiated HT-29 Colon Cancer

Cells. *J Med Signals Sens* **6**, 112-116.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855884/>.

Aranha O, Wood DP, Sarkar FH (2000) Ciprofloxacin Mediated Cell Growth Inhibition, S/G₂-M Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in a Human Transitional Cell Carcinoma of the Bladder Cell Line. *Clin Cancer Res* **6**, 891-900. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10741713/>.

Aroso IM, Silva JC, Mano F, Ferreira AS, Dionisio M, Sa-Nogueira I, i sur. (2016) Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *Eur J Pharm Biopharm* **98**, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.002>.

Assali M, Joulani M, Awwad R, Assad M, Almasri M, Kittana N, i sur. (2016) Facile Synthesis of Ciprofloxacin Prodrug Analogues to Improve its Water Solubility and Antibacterial Activity. *ChemistrySelect* **6**, 1132-1135. <https://doi.org/10.1002/slct.201600091>.

Azéma J, Guidetti B, Dewelle J, Le Calve B, Mijatovi T, Korolyov A, i sur. (2009) 7-((4-Substituted)piperazin-1-yl) derivatives of ciprofloxacin: Synthesis and in vitro biological evaluation as potential antitumor agent. *Bioorg Med Chem* **17**, 5396-5407. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.06.053>.

Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, i sur. (2004) PAMPA-a drug absorption in vitro model: 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur J Pharm Sci* **21**, 429-441. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.10.009>.

Breda SA, Jimenez-Kairuz AF, Manzo RH, Olivera ME (2009) Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *Int J Pharm* **371**, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.026>.

Cao J, Su E (2021) Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry. *J Clean Prod* **314**, 127965. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127965>.

Caço AI, Varanda F, Pratas de Melo MJ, Dias AMA, Dohrn R, Marrucho IM (2008) Solubility of Antibiotics in Different Solvents. Part II. Non-Hydrochloride Forms of Tetracycline and Ciprofloxacin. *Ind End Chem Res* **47**, 8083-8089. <https://doi.org/10.1021/ie8003495>.

Castro W, Navarro M, Biot C (2013) Medicinal potential of ciprofloxacin and its derivatives. *Future med Chem* **5**, 81-96. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.181>.

Conley ZC, Bodine TJ, Chou A, Zechiedrich L (2018) Wicked: The untold story of ciprofloxacin. *PLoS Pathog* **14**, 1006805. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006805>.

Cormier R, Burda WN, Harrington L, Edlinger J, Kodigepalli KM, Thomas J, i sur. (2012) Studies on the antimicrobial properties of N-acylated ciprofloxacin. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 6513-6520. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.026>.

Cvjetko Bubalo M, Radošević K, Radojčić Redovniković I, Halambek J, Vorkapić-Furač J, Srček V (2014) Ionske kapljevine-razvoj i izazovi industrijske primjene. *Kem Ind* **63**, 163-171. <http://dx.doi.org/10.15255/KUI.2013.003>.

Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2015) Green solvents for Green Technologies. *J Chem Technol Biotechnol* **90**, 1631-1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>.

Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S (2018) New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod Process* **109**, 52 - 73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001>.

Duarte ARC, Ferreira ASD, Barreiros SM, Cabrita E, Reis RL, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.02.003>.

El Astal Z (2005) Increasing Ciprofloxacin Resistance Among Prevalent Urinary Tract Bacterial Isolates in Gaza Strip, Palestine. *J Biomed Biotechnol* **2005**, 238-241. <https://doi.org/10.1155/jbb.2005.238>.

Emami S, Shayanfar A (2020) Deep eutectic solvents for pharmaceutical formulation and drug delivery applications. *Pharm Dev Technol* **25**, 779-796. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1735414>.

Florindo C, Lima F, Branco LC, Marrucho IM (2019) Hydrophobic Deep Eutectic Solvents: A Circular Approach to Purify Water Contaminated with Ciprofloxacin. *ACS Sustainable Chem Eng* **7**, 14739-14746. <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02658>.

Harrison PF, Lederberg, J (1998) Antimicrobial Resistance: Issues and Options [online], The National Academies Press, Washington, DC. <https://www.nap.edu/download/6121>.

Hayyan M, Hashim MA, Al-Saadi MA, Hayyan A, AlNashef IM, Mirghani MES (2013) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**, 455-459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.013>.

Herold C, Ocker M, Gansmayer M, Gerauer H, Hahn EG, Schuppan D (2002) Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* **86**, 443-448. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600079>.

Hooper DC (2002) Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* **2**, 530-538. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00369-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00369-9).

Kalepu S, Nekkanti V (2015) Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B* **5**, 442-453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.

Kerns EH, Di L, Petusky S, Farris M, Ley R, Jupp P (2004) Combined Application of Parallel Artificial Membrane Permeability Assay and Caco-2 Permeability Assays in Drug Discovery. *J Pharm Sci* **96**, 1440-1453. <https://doi.org/10.1002/jps.20075>.

Klamt A (2011) The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* **1**, 699-709. <https://doi.org/10.1002/wcms.56>.

Klamt A, Eckert F, Hornig M (2001) COSMO-RS: A novel view to physiological solvation and partition questions. *J Comput Aid Mol Des* **15**, 355-365. <https://doi.org/10.1023/A:1011111506388>.

Kudłak B, Owczarek K, Namieśnik J (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents- a review. *Environ Sci Pollut Res* **22**, 11975-11992. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4794-y>.

Liu Y, Brent Friesen J, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod* **81**, 679-690. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>.

Lu C, Cao J, Wang N, Su E (2016) Significantly improving the solubility of non-steroidal anti-inflammatory drugs in deep eutectic solvents for potential non-aqueous liquid administration. *Med Chem Comm* **7**, 955-959. <https://doi.org/10.1039/C5MD00551E>.

Marquez B, Pourcelle V, Vallet CM, Mingeot-Ledercq MP, Tulkens PM, Marchand-Bruynaert J, i sur. (2014) Pharmacological Characterization of 7-(4-(Piperazin-1-yl)) Ciprofloxacin Derivatives: Antibacterial Activity, Cellular Accumulation, Susceptibility to Efflux Transporters and Intracellular Activity. *Pharm Res* **31**, 1290-1301. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1250-x>.

Mbous YP, Hayyan M, Wong WF, Looi CY, Hashim MA (2017) Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Sci Rep* **7**, 41257. <https://doi.org/10.1038/srep41257>.

Morrison HG, Sun CC, Neervannan S (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int J Pharm* **378**, 136-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.039>.

Nožinić D, Milić A, Mikac L, Ralić J, Padovan J, Antolović R (2010) Assessment of Macrolide Transport Using PAMPA, Caco-2 and MDCKII-hMDR1 Assays. *Croat Chem Acta* **83**, 323-331. <https://hrcak.srce.hr/62210>.

Olivares B, Martínez F, Rivas L, Calde C, Munita JM, Campodonico PR (2018) A Natural Deep Eutectic Solvent Formulated to Stabilize β -Lactam Antibiotics. *Sci Rep* **8**, 14900. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33148-w>.

Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural Deep Eutectic Solvents- Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chem Eng* **2**, 1063-1071. <http://dx.doi.org/10.1021/sc500096j>.

Palmelund H, Andersson MP, Asgreen C, Boyd BJ, Rantanen J, Lobmann K (2019) Tailor-made solvents for pharmaceutical use? Experimental and computational approach for determining solubility in deep eutectic solvents (DES). *Int J Pharm* **1**, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100034>.

Parwe SP, Chaudhari PN, Mohite KK, Selukar BS, Nande SS, Garnaik B (2014) Synthesis of ciprofloxacin-conjugated poly (L-lactic acid) polymer for nanofiber fabrication and antibacterial evaluation. *Int J Nanomedicine* **9**, 1436-1477. <https://doi.org/10.2147/IJN.S54971>.

Pedro SN, Freire MG, Freire CSR, Silvestre AJD (2019) Deep eutectic solvents comprising active pharmaceutical ingredients in the development of drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* **16**, 497-506. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1604680>.

Rabbani MG, Islam MR (2020) Synthesis and Characterization of Some NH-Analogues of Ciprofloxacin on Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activities. *J Sci Res* **12**, 349-362. <http://dx.doi.org/10.3329/jsr.v12i3.42804>.

Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Grgas D, Landeka Dragičević T, Radojčić Redovniković I (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol Environ Saf* **112**, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>.

Radošević K, Čanak I, Panić M, Markov K, Cvjetko Bubalo M, Frece J, i sur. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ Sci Pollut Res* **25**, 14188-14196. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>.

Radošević K, Ćurko N, Gaurina Srček V, Cvjetko Bubalo M, Tomašević M, Kovačević Ganić K, i sur. (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT- Food Sci Technol* **73**, 45-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>.

Radović M, Panić M, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Radojčić Redovniković I (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala-racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kem Ind* **70**, 551-562. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.074>.

Rozema E, van Dam AD, Sips HCM, Verpoorte R, Meijer OC, Kooijman S, i sur. (2015) Extending pharmacological dose-response curves for salsalate with natural deep eutectic solvents. *RSC Adv* **5**, 61398-61401. <https://doi.org/10.1039/C5RA10196D>.

Schmidt D, Lynch J (2003) Evaluation of the reproducibility of Parallel Artificial Membrane Permeation Assays (PAMPA). <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/pharmacology-and-drug-discovery-research/evaluation-of-the-reproducibility-of-pampa>. Pristupljeno 20. rujna 2021.

Sharma PC, Jain A, Jain S, Pahwa R, Yar MS (2010) Ciprofloxacin: review on development in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *J Enzyme Inhib Med Chem* **25**, 577-589. <https://doi.org/10.3109/14756360903373350>.

Stott PW, Williams AC, Barry BW (1998) Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J Control Release* **50**, 297-308. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(97\)00153-3](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(97)00153-3).

Šarac S (2021) Ispitivanje citotoksičnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za farmaceutsku primjenu (završni rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tang B, Row KH (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatsh Chem* **144**, 1427 - 1454. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs00706-013-1050-3>.

Tang B, Zhang H, Ho Row K (2015) Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples. *J Sep Sci* **38**, 1053-1064. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401347>.

Tuntarawongsa S, Phaechamud T (2012) Polymeric eutectic drug delivery system. *J Met Mater Miner* **22**, 27–32. <http://jmmm.material.chula.ac.th/index.php/jmmm/article/view/46>.

Wang H, Gurau G, Shamshina J, Cojocaru OA, Janikowski J, MacFarlane DR, i sur. (2014) Simultaneous membrane transport of two active pharmaceutical ingredients by charge assisted hydrogen bond complex formation. *Chem Sci* **5**, 3449–3456. <http://dx.doi.org/10.1039/C4SC01036A>.

Weitner T, Bečirević M, Biruš I, Božikov V, Romić Ž, Bačić Vrca V (2004) Kinolonski antimikrobni lijekovi. *Farm Glas* **60**, 603-625. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:017342>.

Yang Z (2019) Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **168**, 31-59. https://doi.org/10.1007/10_2018_67.

Yuan C, Gao J, Guo J, Bai L, Marshall C, Cai Z, i sur. (2014) Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes. *PLoS One* **9**, 107447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447>.

Zhang G, Liu X, Zhang S, Pan B, Liu M (2018) Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem* **146**, 599-612. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.078>.

Zhao BY, Xu P, Yang FX, Wu H, Zong MH, Lou WY (2015) Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chem Eng* **3**, 2746-2755. <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619>.

Zothanpuii F, Rajesh R, Selvakumar K (2020) A review on stability testing guidelines of pharmaceutical products. *Asian J Pharm Clin Res* **13**, 3-9. <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i10.38848>.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Viktorija Belavić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Viktorija Belavić

Vlastoručni potpis