

Antimikrobna aktivnost terapeutskih eutektskih otopala

Nakić, Mirna

Undergraduate thesis / Završni 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:159:786691>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-29**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Mirna Nakić

7656/BT

Antimikrobna aktivnost terapijskih eutektičkih otopala
ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Antimikrobna aktivnost terapijskih eutektičkih otapala Mirna Nakić, 0058213093

Sažetak: S obzirom na pojačanu svijest o potrebi zaštite okoliša, znanstvena se zajednica okrenula razvijanju zelenih tehnologija koje će imati manje štetan učinak na okoliš. Kao jedna od novih zelenih otapala ističu se eutektička otapala, a ukoliko se takva otopina pripremi s djelatnom tvari kao jednom od komponenti, onda je riječ o terapijskom eutektičkom otapalu (THEDES, eng. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*). Stoga je cilj ovog rada bio ispitati antimikrobni utjecaj komponenti koje sačinjavaju THEDES te antimikrobni utjecaj samog THEDES-a na neke od najčešćih predstavnika humanih patogena: bakterije *Escherichia coli* 3014, *Staphylococcus aureus* 3048, *Pseudomonas aeruginosa* 3024 te kvasca *Candida albicans* 86. Navedeno ispitivanje provedeno je disk-difuzijskom metodom. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost sinergističkog antimikrobnog učinka oktanske kiseline i timola prema *E. coli* 3014, budući da nije uočena inhibicija rasta bakterije u prisutnosti navedenih komponenti, dok je u prisutnosti smjese oktanske kiseline i timola uočljivo antibakterijsko djelovanje. Zapaženo je inhibicijsko djelovanje THEDES-a prema svim test-mikroorganizmima, a najosjetljivijom na THEDES pokazala se bakterija *E. coli* 3014.

Ključne riječi: antimikrobna aktivnost, bakterije, eutektička otapala, kvasci

Rad sadrži: 27 stranica, 6 slika, 4 tablice, 40 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: Željko Jakopović, mag.ing.techn.aliment.

Datum obrane: 9. srpnja, 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Antimicrobial activity of therapeutic eutectic solvents

Abstract: Given the heightened awareness of the need to protect the environment, the scientific community has turned to develop green technologies that will have a less harmful effect on the environment. Eutectic solvents stand out as one of the new green solvents, and if such a solution is prepared with the active substance as one of the components, then it is a therapeutic eutectic solvent (THEDES, Therapeutic Deep Eutectic Solvents). Therefore, the aim of this study was to examine the antimicrobial effect of the components that make up THEDES and the antimicrobial effect of THEDES itself on some of the most common representatives of human pathogens: *Escherichia coli* 3014, *Staphylococcus aureus* 3048, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, and *Candida albicans* 86. This test was performed by the disk-diffusion method. The obtained results indicate the possibility of a synergistic antimicrobial effect of octanoic acid and thymol according to *E. coli* 3014, since no inhibition of bacterial growth was observed in the presence of these components, while in the presence of a mixture of octanoic acid and thymol antibacterial activity is observed. The inhibitory effect of THEDES on all test microorganisms was observed, and *E. coli* 3014 proved to be the most sensitive to THEDES.

Keywords: antimicrobial activity, bacteria, eutectic solvents, yeast

Thesis contains: 27 pages, 6 figures, 4 tables, 40 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD. Ksenija Markov, Full Professor

Technical support and assistance: Željko Jakopović, MSc

Defence date: July 9th 2021

Izrada ovog rada omogućena je uz sredstva Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih spojeva“ IP-2019-04-7712.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Terapeutska eutektička otapala	2
2.2. Djelatne tvari lijeka (API).....	3
2.2.1. Klotrimazol	3
2.2.2. Ciprofloksacin	4
2.3. Test-mikroorganizmi.....	5
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	5
2.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
2.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.3.4. <i>Candida albicans</i>	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Mikroorganizmi	9
3.1.2. Hranjive podloge.....	9
3.1.3. Pribor i aparatura	10
3.1.4. Kemikalije	11
3.2. Metode.....	11
3.2.1. Uzgoj mikroorganizama	11
3.2.2. Neizravno određivanje broja živih stanica bakterija.....	11
3.2.3. Priprema otopina NADES-a i THEDES-a	12
3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti ispitivanih tvari disk-difuzijskom metodom	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
5. ZAKLJUČCI	23
6. LITERATURA	24

1. UVOD

Posljednjih desetljeća znanstvena se zajednica okrenula razvijanju zelenih tehnologija koje će imati manje štetan učinak na okoliš od dosad korištenih tehnologija. Poticanje korištenja bezopasnih medija, nove ekološki prihvatljive metode solubilizacije, blaži reakcijski uvjeti samo su neki od principa koji se zagovaraju u kontekstu zelene kemije, a možda jedan od najvažnijih principa jest razvoj novih zelenih otapala (Dai i sur., 2013). Kao jedna od novih, zelenih otapala ističu se eutektička otapala (DES, eng. *Deep Eutectic Solvents*) koja su definirana kao smjese dvaju ili više spojeva čijim miješanjem se dobije otapalo s nižom točkom tališta nego što je imaju pojedine komponente koje ga sačinjavaju, a eutektička otapala odlikuju se svojom jednostavnom pripremom, niskim troškovima proizvodnje, velikom mogućnošću upotrebe te biorazgradivošću (Silva i sur., 2019).

S obzirom na veliku incidenciju infekcija kod ljudi i na porast antimikrobne rezistencije, naglasak se stavlja na pronalaženje alternativnih lijekova koji bi pomogli u sprječavanju infekcija ili se pak nastoji poboljšati postojeće formulacije. Nadalje, još neki od problema s kojima se susreće farmaceutska industrija su vrlo često smanjena farmakokinetička svojstva korištenih antimikrobnih sredstava što se očituje u slaboj topljivosti djelatne tvari lijeka, slaboj apsorpciji i permeabilnosti. Eutektička otapala su se pokazala kao dobra alternativa za prevladavanje nedostataka postojećih lijekova, uglavnom u pogledu biorasploživosti, te se mogu pripremiti s djelatnom tvari lijeka kao jednom od komponenti, što se onda naziva terapijsko eutektičko otapalo (THEDES, eng. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*), ili mogu poslužiti kao sustav za isporuku lijeka otapajući pritom teško topljivu djelatnu tvar (Santos i Duarte, 2021).

Činjenica da postoji nebrojeno mnogo spojeva koji bi mogli tvoriti eutektičke smjese, čak se pretpostavlja da postoji 10^6 različitih kombinacija, čini ta otapala vrlo svestranima i fleksibilnima te otvara mogućnosti primjene u mnogim znanstvenim područjima, ali to između ostalog i znači da dosad nije istražen veliki broj eutektičkih otapala (Silva i sur., 2019). Stoga je cilj ovog rada bio ispitati antimikrobni utjecaj komponenti koje sačinjavaju THEDES te antimikrobni utjecaj samog THEDES-a na neke od najčešćih humanih patogena: dvije gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* 3014 i *Pseudomonas aeruginosa* 3024), gram-pozitivnu bakteriju *Staphylococcus aureus* 3048 te kvasac *Candida albicans* 86. Određivanje antimikrobne aktivnosti terapijskih eutektičkih otapala provedeno je disk-difuzijskom metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Terapeutska eutektička otapala

Eutektička otapala su smjese dvaju ili više spojeva koji su inače pri sobnoj temperaturi u čvrstom agregatnom stanju, ali njihovom kombinacijom najčešće nastaje otapalo koje je tekućina pri sobnoj temperaturi jer je došlo do značajnog smanjenja tališta (Aroso i sur., 2016). Ta pojava smanjenja vrijednosti točke tališta (koja se može predvidjeti na temelju poznatih entalpija taljenja pojedinih spojeva) objašnjava se formiranjem vodikovih mostova između spojeva, a ključne su još i van der Waalsove sile te elektrostatske interakcije (Silva i sur., 2019).

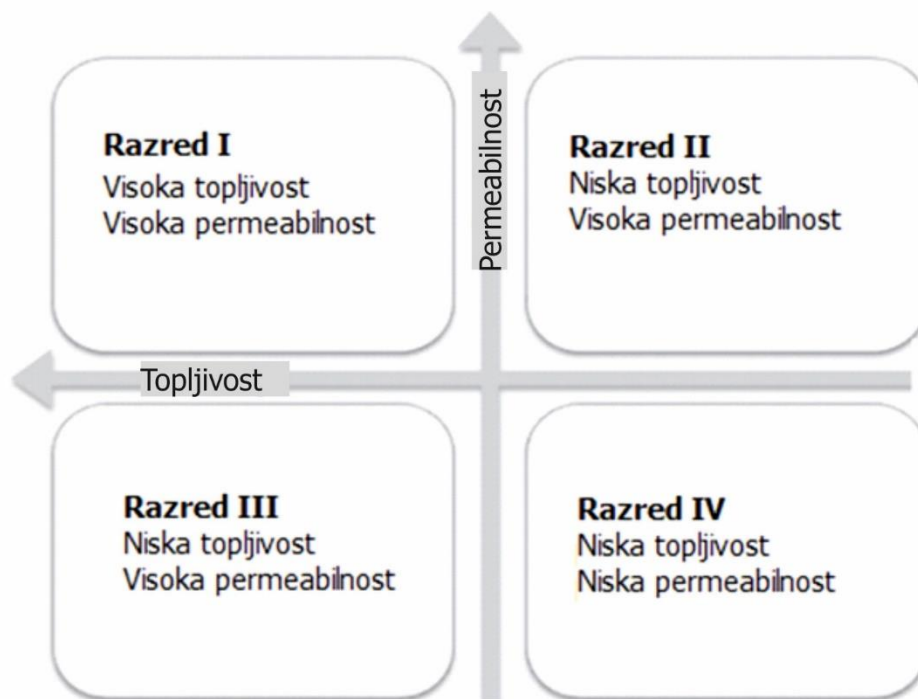
Termin NADES (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*) skovali su Choi i sur. (2011), a opisuje kategoriju eutektičkih otapala koja se sastoje od primarnih metabolita poput organskih kiselina, aminokiselina, šećera, poliola te derivata kolina. Također jedna od sastavnica prirodnih eutektičkih otapala može biti i voda. (El Achkar i sur., 2021).

Prije nekoliko desetljeća opisana je uporaba eutektičkih smjesa za terapijske primjene u vidu transdermalne primjene anestetika i protuupalnih lijekova (Evers i sur., 1985; Santos i Duarte, 2021). Nešto kasnije, Stott i sur. (1998) opazili su kako bi ibuprofen mogao stvarati eutektičke smjese s različitim terpenima, pritom poboljšavajući permeaciju, topljivost i apsorpciju djelatne tvari lijeka (Santos i Duarte, 2021). Aroso i sur. (2016) takva su otapala nazvali terapeutskim eutektičkim otapalima jer je riječ o eutektičkim otapalima kojima djelatna tvar lijeka (API, eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*) predstavlja jednu od komponenti.

S obzirom da su eutektička otapala vrlo često u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi, pokazala su se kao bolja otapala za neke slabo topljive ili netopljive djelatne tvari. Stoga njihova primjena u terapijske svrhe može omogućiti unaprjeđenje i poboljšanje formulacija te prevladavanje teškoća u primjeni polimorfnih lijekova. Polimorfizam je sposobnost tvari da postoji u kristalnom matriksu u dva ili više kristalnih oblika s različitim rasporedima ili konformacijama molekula, a upravo to problem je kristalnih djelatnih tvari lijeka koji se u farmaceutskoj industriji najviše koriste za formulaciju lijekova. Međutim, pogodna svojstva kojima se ističu eutektičke smjese, poput niskog tališta, niske toksičnosti, visoke stabilnosti i tekućeg oblika omogućuje njihovu primjenu u cilju poboljšanja bioraspoloživosti i farmakokinetike dovodeći do učinkovitije apsorpcije, visoke biokompatibilnosti, visoke permeabilnosti i topljivosti te niske toksičnosti. Uporaba eutektičkih otapala može osigurati nove formulacije ili pak poboljšane formulacije bez modificiranja djelatne tvari lijeka (Santos i Duarte, 2021).

2.2. Djelatne tvari lijeka (API)

Lijekovi se prema sustavu klasifikacije biofarmaceutika (BCS, eng. *Biofarmaceutics Classification System*) mogu podijeliti u 4 grupe na temelju njihove topljivosti u vodi u određenim dozama pri trima relevantnim pH vrijednostima i permeabilnosti (slika 1.) (Breda i sur., 2009).



Slika 1. Sustav klasifikacije biofarmaceutika (Duarte i sur., 2017)

Često se zbog niske topljivosti i/ili permeabilnosti lijekova, pacijentima moraju davati veće doze lijeka no što je to stvarno potrebno, što može biti toksično i uzrokovati ozbiljne nuspojave (Duarte i sur., 2017).

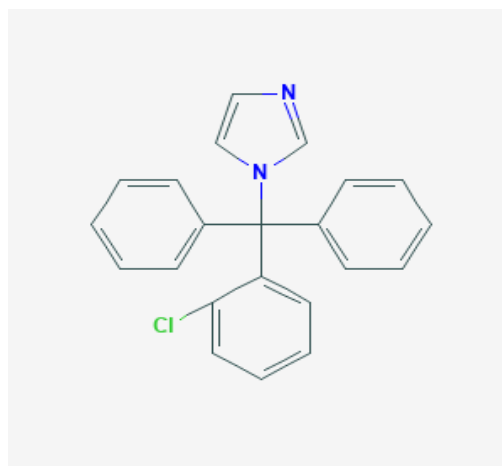
2.2.1. Klotrimazol

Klotrimazol je antifungalni agens (antimikotik), sintetski derivat imidazola (slika 2), sa širokim spektrom djelovanja, molarne mase 344,8 g/mol. Inhibirajuće djeluje na biosintezu sterola, posebice ergosterola koji je ključni sastojak stanične membrane funga, uzrokujući

promjenu permeabilnosti stanične membrane što u konačnici dovodi do lize stanica (NCBI, 2021a).

Prema sustavu klasifikacije biofarmaceutika klotrimazol spada u razred II zbog svog lipofilnog karaktera i niske topljivosti u vodi unatoč dobroj permeabilnosti (Grimling i sur., 2016).

U širokoj je uporabi u liječenju kandidijaza, gljivičnih infekcija uzrokovanih kvascima iz roda *Candida*, pri čemu lokalna, topikalna primjena lijeka ima prednost nad oralnom primjenom lijeka, premda topikalni pripravci pokazuju lošu dermalnu biodostupnost zbog slabog prodiranja u *stratum corneum*, vanjski sloj epiderme (Bolla i sur., 2019).

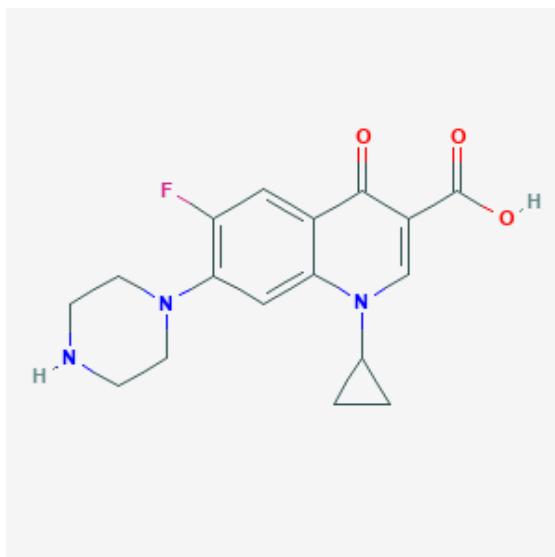


Slika 2. Kemijska struktura klotrimazola (NCBI, 2021a)

2.2.2. Ciprofloksacin

Ciprofloksacin (slika 3) je sintetski fluorokinolonski antibiotik širokog spektra djelovanja čija molekulska masa iznosi 331,34 g/mol (NCBI, 2021b). Mehanizam djelovanja uključuje vezanje na bakterijsku DNA girazu, enzim koji je sudjeluje u replikaciji DNA, što uzrokuje inhibiciju enzima i posljedično ometa replikaciju DNA. Pokazuje antibiotsku aktivnost prema mnogim mikroorganizmima poput *Pseudomonas aeruginosa*, vrstama iz obitelji *Enterobacteriaceae* te gram-pozitivnim stafilokokima, premda je zabilježena pojačana aktivnost prema gram-negativnim bakterijama u odnosu na gram-pozitivne bakterije (Davis i sur., 1996, NCBI, 2021b).

Primjenjuje se u obliku ciprofloksacin hidroklorida koji prema BCS klasifikaciji spada u razred IV što označava da taj API ima i nisku topljivost i nisku permeabilnost (Breda i sur., 2009).



Slika 3. Kemijska struktura ciprofloksacina (NCBI, 2021b)

2.3. Test-mikroorganizmi

2.3.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli štapićasta je, gram-negativna bakterija koja pripada porodici *Enterobacteriaceae* (Jang i sur., 2017). *E. coli* okarakterizirana je kao predominantno fakultativni anaerob koji pripada ljudskoj crijevnoj flori. Asporogena je, neki sojevi imaju kapsulu, a većina sojeva su pokretni. Posjeduje veliku fermentativnu i oksidativnu sposobnost. Sintetizira laktat, etanol, sukcinat, acetat i CO₂ u anaerobnim uvjetima (Matić, 2009). Naseljava gastrointestinalni trakt novorođenčadi u prvim satima njihova života (Nataro i Kaper, 1998). *E. coli* i njen ljudski domaćin najčešće desetljećima koegzistiraju u dobrom zdravlju i uz obostranu korist. Naime, ključna je za proces probave te sintezu nekih neophodnih za život tvari, poput vitamina K. Ovi komenzalni sojevi *E. coli* rijetko uzrokuju oboljenja, osim u imunokompromitiranih pojedinaca ili u onih domaćina kod kojih je poremećena normalna gastrointestinalna barijera, primjerice u slučaju peritonitisa (Kaper i sur., 2004; Matić, 2009).

Nišu komenzalskog soja čini mukozni sloj debelog crijeva sisavaca. *E. coli* kao vrlo uspješan konkurent je najzastupljeniji fakultativni anaerob u ljudskoj crijevnoj mikroflori. Iako mehanizmi pomoću kojih osigurava ovu povoljnu simbiozu nisu do kraja objašnjeni, jedna hipoteza sugerira kako *E. coli* učinkovitije iskorištava glukonat od ostalih vrsta prisutnih u intestinalnom traktu što joj omogućava da zauzme visoko specifičnu metaboličku nišu (Kaper i sur., 2004).

Osim komenzalnih sojeva, postoje i patogeni sojevi (patotipovi) *E. coli* koji uzrokuju razna oboljenja u ljudi što ima za posljedicu više od 2 milijuna smrtnih slučajeva svake godine (Kaper i sur., 2004). Infekcija patogenim sojevima može uzrokovati široki spektar bolesti koje mogu zahvaćati gastrointestinalni trakt (enteričke bolesti i dijareja) ili ekstraintestinalna područja, primjerice urinarni trakt, krvotok (sepsa) te središnji živčani sustav (meningitis) (Croxen i sur., 2013).

Crijevni patotipovi *E. coli* mogu se podijeliti u 6 skupina prema svojstvima virulencije i mehanizmima patogenosti koji uzrokuju gastrointestinalne bolesti, što uključuje *E. coli* koja proizvodi šiga-toksine, enteropatogenu, enterotoksigena, enteroagregativnu, difuzno prijanjavuću *E. coli* te enteroinvazivne *E. coli* kojima pripadaju *Shigella* sojevi (Jang i sur., 2017).

2.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je sveprisutna gram-negativna, aerobna, štapićasta bakterija iz porodice *Pseudomonadaceae* koja sintetizira nekoliko pigmenata, a karakterističan izgled kolonija na hranjivoj podlozi uzrokuje plavo-zeleni pigment piocijanin (Sadikot i sur., 2005). Pokretljivost joj omogućuje jedan bič koji može posredovati u početnim interakcijama na površini, a za prijanjanje na membrane stanica ili druge površine odgovorni su brojni pilusi na površini stanice (Driscoll i sur., 2007).

Pseudomonas aeruginosa nalazi se u vodi, biljkama, tlu te u epidermi životinja. U prirodi se obično pojavljuje kao plankton koji slobodno pliva u tekućem mediju ili u obliku biofilma (Jenny i Kingsbury, 2018). Oblikovanje biofilma proces je u kojem su organizirane zajednice bakterija zatvorene u matriks izvanstaničnih polimernih tvari (EPS, eng. *Extracellular Polymeric Substances*) koje pričvršćuju mikrobne stanice zajedno za površinu. Biofilmovi se smatraju ključnim uzrokom 65-80 % mikrobnih infekcija. Izvanstanične polimerne supstance se u najvećem dijelu sastoje od biomolekula, egzopolisaharida, izvanstanične DNA te polipeptida koji zajedno tvore izrazito hidratiziranu polarnu smjesu što doprinosi samoj strukturi biofilma (Rasamiravaka i sur., 2015).

Pseudomonas aeruginosa jedan je od vodećih uzročnika izvanbolnički (domicilno) i bolnički (nozokomijalno) stečenih infekcija. Neke od izvanbolničkih infekcija koje se mogu pojaviti uključuju periferni ulcerozni keratitis (povezan je s upotrebom kontaktnih leća), upalu vanjskog uha te infekcije kože i mekih tkiva. Nozokomijalne infekcije koje uzrokuje *P. aeruginosa* su pneumonije, infekcije urinarnog trakta, infekcije krvotoka, infekcije na mjestu kirurškog zahvata te kožne infekcije na mjestu opekline (Driscoll i sur., 2007). Dominantni je

uzročnik morbiditeta i smrtnosti u pacijenata s cističnom fibrozom čiji abnormalni epitel dišnih puteva omogućuje bakterijama dugotrajnu kolonizaciju pluća (Stover i sur., 2000).

Za uspjeh *P. aeruginosa* kao oportunističkog patogena ključna je velika genetska fleksibilnost koja je posljedica njenog velikog genoma. Veliki genom također omogućuje metaboličku sposobnost da napreduje u okolišu koji je negostoljubiv prema većini ostalih organizama (Sadikot i sur., 2005). Analiza kompletne sekvence genoma otkrila je neke od mogućih uzroka genetske svestranosti. *P. aeruginosa* ima veliku sposobnost transporta, metaboliziranja i rasta na organskim spojevima, brojne sustave unosa željezo-siderofor kompleksa, povećanu sposobnost izlučivanja spojeva (poput enzima i antibiotika) pomoću mnogobrojnih sustava efluks pumpi i sustava za izlučivanje proteina. Posjeduje 4 potencijalna sustava kemotaksije od kojih barem jedan pridonosi sposobnosti stvaranja biofilma. Infekcije je posebice teško liječiti zbog intrinzične rezistencije bakterije na antibiotike (Stover i sur., 2000).

2.3.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je fakultativno anaerobna, gram-pozitivna bakterija koja se pojavljuje u obliku koka. Nepokreta je i asporogena. Okrugle stanice mogu biti samostalne ili dolaziti u paru ili pak mogu postojati u nakupinama u obliku grozda. Može rasti u širokom rasponu temperatura (7 °C do 48,5 °C s optimumom od 30 °C do 37°C), pH vrijednosti (4,2 do 9,3, a optimum je između 7 i 7,5) i koncentracija natrijeva klorida (do 15 % NaCl) (Le Loir i sur., 2003). Kolonije su obično okrugle, glatke i uzdignute, a mogu biti i pigmentirane (zlatno-žute, svijetlo žute i bijele) (Imširović i sur., 2013).

S. aureus je komenzalna bakterija, ali ujedno i humani patogen (Tong i sur., 2015). Kolonizira 30-35 % ljudske populacije, a često je prisutan u nosnicama te na koži i dlaci toplokrvnih životinja (Le Loir i sur., 2003). Od početka razvoja mikrobiologije, *S. aureus* prepoznat je kao važan patogen, odgovoran za brojne infekcije u bolničkom okruženju, ali i u općoj populaciji. Infekcije započinju tako da mikroorganizam uđe kroz mikrotraumu kože ili sluznice gdje može uzrokovati lokalnu infekciju ili se pak može proširiti u udaljene organe i uzrokovati po život opasne invazivne infekcije poput bakterijemije, pneumonije ili osteomijelitisa (Monaco i sur., 2017).

Uspjeh *S. aureus* u koloniziranju i patogenosti uvelike leži u njegovoj sposobnosti prilagođavanja različitim okolišima zahvaljujući stjecanju nove DNA putem horizontalnog transfera gena (Monaco i sur., 2017).

Konzumacijom namirnica kontaminiranih sa *S. aureus* može doći do trovanja hranom jer neki izolati *S. aureus* proizvode stafilokokne enterotoksine (SE) (Jorgensen i sur., 2005). Stafilokokni enterotoksini su bakterijski proteini koji su pirogeni i osim trovanja hranom mogu biti uzročnici sindroma toksičnog šoka (Pinchuk i sur., 2010).

2.3.4. *Candida albicans*

Candida albicans se obično pojavljuje kod mnogih toplokrvnih životinja kao benigni komenzal, dok kod ljudi uglavnom nastanjuje kožu i površinu sluznice pritom ne nanoseći štetu (Sorgo i sur., 2010). Međutim, uslijed bilo kakvog poremećaja u okolini (npr. promjene pH ili sadržaja nutrijenata) ili u uvjetima imunosne supresije, može brzo postati patogen i uzrokovati razne infekcije. Zapravo, *C. albicans* jedan je od najčešćih uzročnika nozokomijalnih infekcija (Tsui i sur., 2016; Nobile i Johnson, 2015). Dvije su vrste infekcija koje može uzrokovati: površinske infekcije, poput oralne i vaginalne kandidijaze te životno ugrožavajuće sistemske infekcije (Mayer i sur., 2013). Vulvovaginalne kandidijaze učestale su i mogu se pojaviti kod 75 % žena barem jednom u životu, dok se kod malog udjela žena (5-10 %) epizode kronično ponavljaju što negativno utječe na kvalitetu života (Sudbery, 2011). Infekcije *Candidom* posebno su opasne kod imunokompromitiranih pojedinaca (koji imaju AIDS ili primaju antikancerogene ili imunosupresivne terapije) te kod zdravih ljudi koji imaju ugrađene medicinske uređaje (Nobile i Johnson, 2015).

C. albicans je polimorfni kvasac koji može rasti u obliku jajolikih stanica kvasca ili izduženih elipsoidnih pseudohifa ili pak poput pravih hifa (Mayer i sur., 2013). Sposobnost promjene rasta iz oblika kvasca u rast u obliku hifa jedan je od glavnih faktora virulencije. Na modelu mišje sistemske infekcije pokazano je da gubitak te sposobnosti dovodi do gubitka virulencije (Sorgo i sur., 2010). Još jedno svojstvo koje je ključno za patogenost *C. albicans* sposobnost je stvaranja biofilma na domaćinu ili abiotičkim površinama poput medicinskih uređaja što dovodi do velikog morbiditeta i smrtnosti. Zbog robusne strukture biofilma, omogućeno je stabilno okruženje u kojem mogu tolerirati ekstremno visoke koncentracije antimikrobnih sredstava (Tsui i sur., 2016).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Za ispitivanje antimikrobnog djelovanja terapijskih eutektičkih otopala korištena su četiri test-mikroorganizma, od kojih jedan kvasac te tri bakterije. Korištene bakterijske vrste *Escherichia coli* 3014, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphylococcus aureus* 3048 te kvasac *Candida albicans* 86 čuvaju se u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za Opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Bakterijske kulture čuvaju se u hranjivom bujonu s 30 % (v/v) glicerola, a kultura kvasca u sladovini s 30 % (v/v) glicerola na -20 °C.

3.1.2. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija *Escherichia coli* 3014, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphylococcus aureus* 3048 korišten je hranjivi bujon, dok je za praćenje antimikrobnog utjecaja ispitivanih tvari prema navedenim bakterijama korišten hranjivi agar. Podloge se pripremaju iz dehidratiranih podloga u prahu suspendiranjem u 1000 mL destilirane vode te se nakon otapanja steriliziraju u autoklavu na 121 °C kroz 15 minuta.

Sastav hranjivog bujona:

- mesni ekstrakt (3 g/L)
- pepton (5 g/L)
- pH 6,5

Sastav hranjivog agara:

- mesni ekstrakt (3 g/L)
- pepton (5 g/L)
- agar (15 g/L)
- pH 6,5

Za uzgoj kvasca *Candida albicans* 86 korištena je sladovina dok je za praćenje antimikrobnog utjecaja ispitivanih tvari prema navedenom kvascu korišten sladni agar.

Sladovina sastava:

- sladni ekstrakt (praškasti, 20 g/L)
- glukoza (20 g/L)
- pepton (6 g/L)
- pH 5,5.

Sladni agar sastava:

- sladni ekstrakt (prašasti, 20 g/L)
- glukoza (20 g/L)
- agar (15 g/L)
- pepton (6 g/L)
- pH 5,5

3.1.3. Pribor i aparatura

U eksperimentalnom radu korišten je sljedeći laboratorijski pribor i aparatura:

- Epruvete (16 × 160 mm)
- Safe-lock tube (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- Štapići po Drigalskom
- Histološka pinceta
- Diskovi od filter papira (Ø 6 mm) (Macherey-Nagel GmbH, Njemačka)
- Bunsenov plamenik
- Pipetman 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vibromikser Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija)
- Brojač kolonija (BZG30) WTW-Weilheim
- Termostati (Sutjeska, Beograd)
- Autoklav (Sutjeska, Beograd)
- Stalci za epruvete
- Stalci za kivete
- Ravnalo

3.1.4. Kemikalije

- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Hranjivi bujon i hranjivi agar (Biolife, Milan, Italija)
- Sladni bujon i sladni agar (Biolife, Milan, Italija)
- Timol (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- Oktanska kiselina (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- Ciprofloksacin (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- Klotrimazol (Carlo Erba Reagents, Barcelona, Španjolska)
- DMSO (Sigma, St. Louis, MO, SAD)

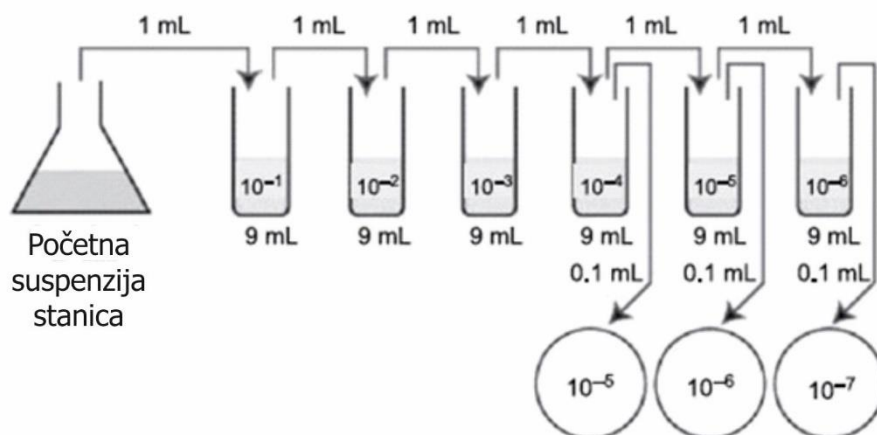
3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj mikroorganizama

Korišteni test-mikroorganizmi čuvaju se na temperaturi -20 °C u hranjivom bujonu, odnosno sladovini uz dodatak 30% (v/v) glicerola. Da bi se mogle koristiti, bakterijske vrste je prethodno potrebno revitalizirati u hranjivom bujonu, a kvasac u sladovini, na odgovarajućim temperaturama. Stoga su kulture prekonoćno inkubirane u termostatu na optimalnim temperaturama rasta, bakterijske vrste na 37 °C, a kvasac *C. albicans* 86 na 28 °C te su korištene za određivanje antimikrobne aktivnosti.

3.2.2. Neizravno određivanje broja živih stanica bakterija

Radi procjene živih i/ili infektivnih mikroorganizama u nekom materijalu/uzorku određuje se broj živih stanica uz pretpostavku da će iz svake žive stanice porasti jedna kolonija. Broj živih stanica određen je neizravnom metodom pripremom decimalnih razrjeđenja u omjeru 1:10 (slika 4). Nakon inkubacije iz suspenzija bakterija/kvasca načinjene su serije decimalnih razrjeđenja i po 0,1 mL određenog razrjeđenja otpipetiran je na čvrstu hranjivu podlogu u Petrijevoj zdjelici. Kolonije mikroorganizama koje su porasle na čvrstoj hranjivoj podlozi predstavljale su stvaran broj živih stanica, a dobivene vrijednosti izražene su kao CFU vrijednost (CFU, eng. *Colony Forming Units*) i iznosile su 10^7 - 10^8 CFU/mL.



Slika 4. Priprava serije decimalnih razrjeđenja (Biocyclopedia, 2021)

3.2.3. Priprema otopina NADES-a i THEDES-a

Za pripremu NADES-a, u ovom radu je korištena metoda zagrijavanja u molarnim omjerima 1:1, timola i oktanske kiseline.

Za pripreme THEDES-a, 420 mg derivata ciprofloksacina je otopljeno u mililitru odgovarajućeg NADES-u dok je 153 mg klotrimazola otopljeno u mililitru odgovarajućeg NADES-a. Obje smjese su miješane u termobloku na 25 °C tijekom 24 sati. Kako bi se dobile željene koncentracije THEDES-a, isti su razrjeđivani s 10% DMSO-a.

Formulacije NADES-a i THEDES-a pripremljene su i pohranjene u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

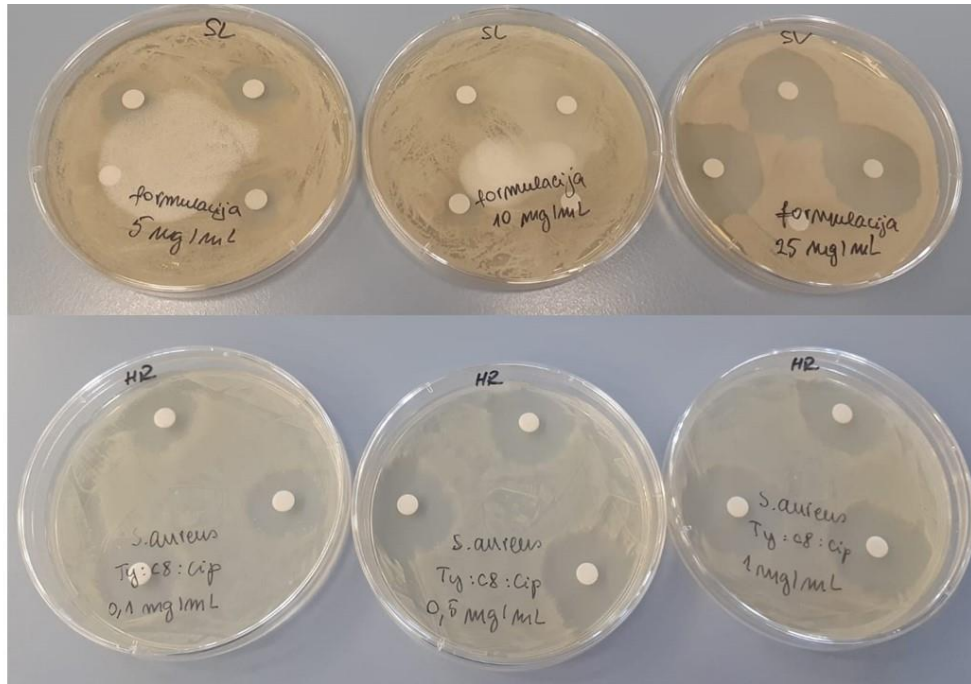
3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti ispitivanih tvari disk-difuzijskom metodom

Princip određivanja antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom temelji se na postavljanju diskova od filter papira (promjera 6 mm), koji su natopljeni s ispitivanim spojem u željenoj koncentraciji, na površinu čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici koja je prethodno inokulirana s određenim volumenom suspenzije (100 µL) testnog mikroorganizma.

Petrijeve zdjelice potom se inkubiraju u termostatu na odgovarajućim temperaturama. Tvar čija se antimikrobna aktivnost ispituje, polako difundira iz diska u agar, pritom inhibirajući rast test-mikroorganizma te se formira tzv. zona inhibicije, odnosno svjetlije područje gdje nema rasta mikroorganizma. Mjeri se promjer zone inhibicije (mm) koji je proporcionalan osjetljivosti test-mikroorganizma na ispitivani spoj (Balouiri i sur., 2016).

Pokus određivanja antimikrobnog djelovanja ispitivanih terapijskih eutektičkih otapala i njihovih komponenti započne naciepljivanjem 0,1 mL suspenzije pojedine kulture mikroorganizma na površinu hranjivog agara (bakterije), odnosno sladnog agara (*Candida albicans* 86) u Petrijevim zdjelicama, pritom radeći u aseptičnim uvjetima. Naciepljena suspenzija mikroorganizma se potom ravnomjerno razmaže po površini hranjive podloge štapićem po Drigalskom. Kada se suspenzija upije u hranjivu podlogu, pincetom se filter diskovi prethodno umočeni u odgovarajuće otapalo određene koncentracije postave na obilježena mjesta na hranjivu podlogu.

Antimikrobna aktivnost komponenti koje tvore THEDES te samog THEDES-a prema bakterijama ispitivana je u tri koncentracije: 0,1; 0,5 i 1 mg/mL, dok su za ispitivanje antimikrobne aktivnosti prema *C. albicans* 86 testirane tri koncentracije: 5, 10 i 25 mg/mL. Svaka ispitivana tvar, tj. svaka ispitivana koncentracija određene tvari se na površinu čvrste hranjive podloge stavlja u tri paralele. Kontrolne uzorke tijekom ispitivanja antimikrobnih svojstava THEDES-a prema bakterijama činili su filter diskovi umočeni u destiliranu vodu. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti THEDES-a prema *C. albicans* 86 filter diskovi koji su predstavljali kontrolne uzorke, umočeni su u otopinu dimetilsulfoksida (DMSO) jer klotrimazol nije topljiv u vodi. Nakon postavljanja pokusa, Petrijeve zdjelice s uzorcima bakterijskih vrsta su stavljene na inkubaciju u termostat na 37 °C kroz 24h, dok su Petrijeve zdjelice s uzorcima kvasca *C. albicans* 86 stavljene na inkubaciju tijekom 48 h pri 28 °C. Nakon inkubacije ravnalom su izmjereni promjeri zona inhibicije oko diskova (slika 5).



Slika 5. Zone inhibicije rasta, na čvrstim podlogama u Petrijevim zdjelicama, *C. albicans* 86 (gornja slika) i *S. aureus* 3048 (donja slika) (vlastita fotografija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivan je antimikrobni utjecaj THEDES-a te njegovih komponenti na neke od najčešćih patogena disk difuzijskom metodom mjerenjem promjera zona inhibicije na čvrstim podlogama u Petrijevim zdjelicama. Dvije gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* 3014 i *Pseudomonas aeruginosa* 3024), jedna gram-pozitivna bakterija (*Staphylococcus aureus* 3048) te kvasac *Candida albicans* 86 korišteni su kao test-mikroorganizmi jer su upravo oni najčešći uzročnici infekcija kod ljudi, a ta oboljenja se mogu liječiti primjenom antibiotika ili antimikotika. Vrlo često je ta primjena lijekova popraćena poteškoćama u vidu smanjene topljivosti lijeka, smanjene apsorpcije ili permeabilnosti što za posljedicu može imati potrebu povećanja doze lijeka kako bi se zadržala učinkovitost, a to je nepovoljno za pacijenta. Zato se pristupa otkrivanju novih otapala za sintezu i primjenu djelatnih tvari lijeka koja će imati poboljšana svojstva u odnosu na već postojeća otapala. Kao jedno od takvih novih otapala ističu se NADES-i (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*).

Svi pokusi postavljeni su u tri paralele, a dobivene vrijednosti promjera zone inhibicije rezultat su mjerenja promjera u sva tri ponavljanja te su izražene kao njihova aritmetička sredina. Rezultati antimikrobnog djelovanja komponenta NADES-a, samog NADES-a i THEDES-a prikazani su u tablicama 1-4.

Tablica 1. Zone inhibicije rasta *C. albicans* 86 u prisutnosti THEDES-a te pojedinih komponenti

Ispitivani spoj	Koncentracija (mg/mL)	Promjer zone inhibicije (mm)
Oktanska kiselina (C₈)	1	-
Timol (Ty)	5	-
	10	-
	25	-
NADES (C₈:Ty)	5	17,33 ± 4,93
	10	15,00 ± 1,24
	25	34,33 ± 0,58
THEDES (C₈:Ty:klotrimazol)	5	14,67 ± 1,15
	10	10,00 ± 1,00
	25	30,33 ± 0,58

Tablica 2. Zone inhibicije rasta *S. aureus* 3048 u prisutnosti THEDES-a te pojedinih komponenti

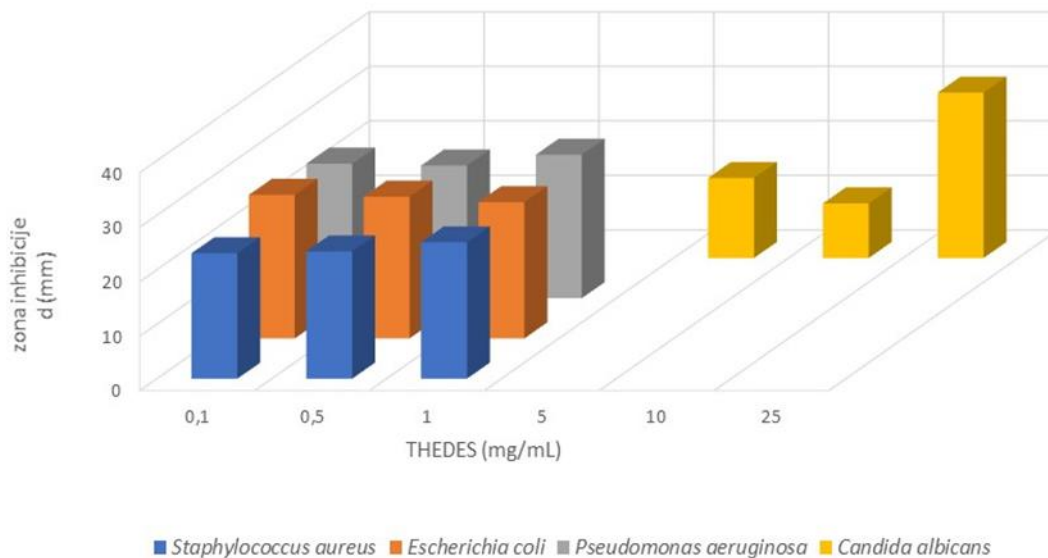
Ispitivani spoj	Koncentracija (mg/mL)	Promjer zone inhibicije (mm)
Oktanska kiselina (C₈)	0,1	-
	0,5	-
	1	-
Timol (Ty)	0,1	11,00 ± 1,00
	0,5	-
	1	9,83 ± 2,36
NADES (C₈:Ty)	0,1	8,50 ± 0,50
	0,5	9,50 ± 0,00
	1	12,67 ± 2,52
THEDES (C₈:Ty:Cip)	0,1	23,00 ± 1,00
	0,5	23,33 ± 0,58
	1	25,00 ± 0,00

Tablica 3. Zone inhibicije rasta *E. coli* 3014 u prisutnosti THEDES-a te pojedinih komponenti

Ispitivani spoj	Koncentracija (mg/mL)	Promjer zone inhibicije (mm)
Oktanska kiselina (C₈)	0,1	-
	0,5	-
	1	-
Timol (Ty)	0,1	-
	0,5	-
	1	-
NADES (C₈:Ty)	0,1	-
	0,5	7,50 ± 0,71
	1	8,67 ± 0,58
THEDES (C₈:Ty:Cip)	0,1	26,33 ± 0,58
	0,5	26,00 ± 1,73
	1	25,00 ± 1,00

Tablica 4. Zone inhibicije rasta *P. aeruginosa* 3024 u prisutnosti THEDES-a te pojedinih komponenti

Ispitivani spoj	Koncentracija (mg/mL)	Promjer zone inhibicije (mm)
Oktanska kiselina (C₈)	0,1	12,00 ± 2,00
	0,5	14,00 ± 2,00
	1	11,33 ± 2,52
Timol (Ty)	0,1	23,00 ± 1,00
	0,5	17,33 ± 1,15
	1	19,67 ± 1,53
NADES (C₈:Ty)	0,1	-
	0,5	7,67 ± 0,00
	1	-
THEDES (C₈:Ty:Cip)	0,1	24,67 ± 0,58
	0,5	24,33 ± 2,31
	1	26,33 ± 0,58



Slika 6. Usporedba inhibicije rasta test-mikroorganizama THEDES-om

Rezultati dobiveni metodom disk difuzije pokazuju da *C. albicans* 86 nije osjetljiva na prisutnost oktanske kiseline u koncentraciji 1 mg/mL (tablica 1), dok je od bakterijskih vrsta samo *P. aeruginosa* 3024 osjetljiva na oktansku kiselinu u koncentracijama 0,1; 0,5 i 1 mg/mL (tablice 2-4). Ti se rezultati razlikuju od onih koje su iznijeli Silva i sur. (2019), u kojima je pokazana osjetljivost *C. albicans* te gram-pozitivnih bakterija na prisutnost masnih kiselina, dok se gram-negativne bakterije smatraju otpornim na antibakterijsko djelovanje masnih kiselina zbog složenije strukture membrane te je u literaturi opisano kako prisutnost lipopolisaharida na staničnoj stijenci gram-negativnih bakterija sprječava djelovanje masnih kiselina.

Nije uočeno antimikrobno djelovanje timola prema *Candida albicans* 86 i *Escherichia coli* 3014, dok *Pseudomonas aeruginosa* 3024 te *Staphylococcus aureus* 3048 pokazuju osjetljivost na timol (tablica 1-4). Najveća inhibicija rasta *P. aeruginosa* 3024 uočena je pri najmanjoj korištenoj koncentraciji timola (0,1 mg/mL), dok timol u koncentraciji 0,1 mg/mL pokazuje veće inhibitorno djelovanje na *S. aureus* 3048 nego u koncentraciji 1 mg/mL, a pri koncentraciji 0,5 mg/mL nije bilo inhibicije rasta te *P. aeruginosa* 3024 pokazuje veću osjetljivost na timol od *S. aureus* 3048 (tablica 2, 4). Ovi rezultati donekle su slični onima koje su izložili Mathela i sur. (2010) u svom radu u kojem su, između ostalog, ispitivali

antibakterijsku aktivnost timola prema gram-pozitivnim bakterijama uključujući *S. aureus* te prema gram-negativnoj *E. coli*. Njihovi su rezultati pokazali da je najosjetljivija ispitivana bakterija *S. aureus*, dok je timol pokazao i umjerenu antibakterijsku aktivnost prema *E. coli*, dok u ovim rezultatima nije zabilježena antibakterijska aktivnost timola prema *E. coli*.

Antimikrobno djelovanje NADES-a prema *S. aureus* 3048 povećavalo se s povećanjem koncentracije, a takav trend ne može se uočiti kod ostalih korištenih test-mikroorganizama (tablice 1-4). Najveću osjetljivost na prisutnost NADES-a pokazao je upravo *S. aureus* 3048, a rast *E. coli* 3014 inhibirao je NADES u koncentracijama od 0,5 mg/mL i 1 mg/mL, dok je rast *P. aeruginosa* 3024 bio inhibiran samo s koncentracijom od 0,5 mg/mL (tablica 2-4). *E. coli* 3014 nije pokazala osjetljivost ni na oktansku kiselinu niti na timol, međutim NADES, tj. kombinacija oktanske kiseline i timola, inhibirao je rast (tablica 3). Ta se pojava može pripisati sinergističkom baktericidnom djelovanju kombinacije srednjelančanih masnih kiselina i eteričnih ulja, što je opisano u radu Kim i Rhee (2015).

Sve korištene bakterije pokazale su veću osjetljivost na THEDES nego na NADES (tablice 2-4) što može označavati postojanje sinergističkog efekta između antibiotika ciprofloksacina i NADES-a (oktanske kiseline i timola). S obzirom da je kod *C. albicans* 86 uočena veća osjetljivost na NADES nego na THEDES (tablica 1), tu u pitanju može biti blagi antagonistički efekt između klotrimazola i NADES-a. Najveća inhibicija rasta *C. albicans* 86 zabilježena je u prisutnosti 25 mg/mL NADES-a i iznosila je 34,33 mm (tablica 1). Najveći promjer zone inhibicije rasta kod bakterija zabilježen je pri koncentraciji 0,1 mg/mL THEDES-a kod *E. coli* 3014 te pri koncentraciji 1 mg/mL THEDES-a kod *P. aeruginosa* 3024, a iznosi 26,33 mm (tablica 3, 4).

Pri usporedbi inhibicije rasta test-mikroorganizama THEDES-om (slika 6) može se zaključiti kako je, među korištenim bakterijama, THEDES uzrokovao najmanju inhibiciju rasta kod *S. aureus* 3048 jer su zabilježeni najmanji promjeri zona inhibicije rasta, dok je kod *C. albicans* 68 najveća inhibicija rasta uzrokovana najvećom ispitivanom koncentracijom THEDES-a (25 mg/mL).

Disk difuzijska metoda je jednostavna, jeftina i brza, čiji se rezultati jednostavno interpretiraju, ali nije pogodna za određivanja minimalne inhibitorne koncentracije tvari (MIC, eng. *Minimum Inhibitory Concentration*) niti za razlikovanje spojeva s mikrobiostatskim djelovanjem od spojeva s mikrobiocidnim djelovanjem (Balouiri, 2016). Isto tako, širina zone inhibicije nije pokazatelj stupnja djelotvornosti kemijskog agensa, jer, osim osjetljivosti mikroorganizma na kemijski agens i interakcije istraživanog spoja s mikroorganizmom, utječe i čitav niz drugih faktora. Tako sastav i debljina hranjive podloge mogu utjecati na zonu inhibicije. Sastav mineralnih tvari, koji može varirati u podlogama, može utjecati na aktivnost

antimikrobnih tvari. Nadalje, količina inokuluma i rast samog mikroorganizma ako nije ravnomjeran mogu u određenoj mjeri smanjiti zonu inhibicije. Koncentracija, molekulska masa, topljivost, pH, ionizacija i vezanje antimikrobne tvari na agar može utjecati na stupanj difuzije u podlogu.

Iako disk difuzijska metoda omogućuje utvrđivanje osjetljivosti mikroorganizma na više agensa, odnosno više različitih koncentracija nekog agensa istovremeno, puno je drugih faktora koji mogu utjecati na rezultate istraživanja pa se širina zone inhibicije ne može koristiti za direktnu usporedbu antimikrobnog djelovanja dvaju različitih kemijskih tvari.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Od istraživanih mikroorganizama samo je bakterija *Pseudomonas aeruginosa* 3024 pokazala osjetljivost na prisutnost oktanske kiseline.
- Timol je pokazao antibakterijsko djelovanje samo prema *Staphylococcus aureus* 3048 i to u koncentracijama 0,1 mg/mL i 1 mg/mL te prema *P. aeruginosa* 3024 u svim ispitivanim koncentracijama.
- Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost sinergističkog antimikrobnog učinka oktanske kiseline i timola prema *Escherichia coli* 3014, budući da nije uočena inhibicija rasta bakterije u prisutnosti navedenih komponenti, a njihova kombinacija pokazala je antibakterijski učinak.
- Svi test-mikroorganizmi pokazali su osjetljivost na THEDES, a *E. coli* 3014 se pokazala kao najosjetljivija bakterija jer, iako je najveći izmjereni promjer inhibicije bio jednak za *E. coli* 3014 i *P. aeruginosa* 3024 ta inhibicija rasta je kod *E. coli* bila uzrokovana nižom koncentracijom THEDES-a.
- Najveća inhibicija rasta *Candida albicans* 86 uzrokovana je NADES-om u koncentraciji 25 mg/mL, a s obzirom da su izmjereni promjeri inhibicije rasta *C. albicans* 86 bili veći u prisutnosti NADES-a nego THEDES-a, može se smatrati da je tome uzrok blagi antagonistički efekt između klotrimazola i NADES-a.

6. LITERATURA

Aroso, I. M., Silva, J. C., Mano, F., Ferreira, A. S. D., Dionísio, M., Sá-Nogueira, I., Barreiros, S., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C. (2016) Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* **98**, str. 57–66.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S. K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, **6(2)**, str. 71–79.

Biocyclopedia (2021) Enumeration of microorganisms. Biotechnology methods, <https://biocyclopedia.com/index/biotechnology_methods/microbiology/enumeration_of_microorganisms.php> Pristupljeno 25. lipnja 2021.

Bolla, P.K., Meraz, C. A., Rodriguez, V. A., Deaguero, I., Singh, M., Yellepeddi, V. K., Renukuntla, J. (2019) Clotrimazole loaded ufosomes for topical delivery: Formulation development and in-vitro studies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **24(17)**, str. 3139.

Breda, S. A., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H., Olivera, M. E. (2009) Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *International journal of pharmaceutics*, **371(1–2)**, str. 106–113.

Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R. (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant physiology*, **156(4)**, str. 1701–1705.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., Finlay, B. B. (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clinical microbiology reviews*, **26(4)**, str. 822–880.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica chimica acta*, **766**, str. 61–68.

Davis, R., Markham, A., Balfour, J. A. (1996) Ciprofloxacin: An updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs*, **51(6)**, str. 1019–1074.

Driscoll, J. A., Brody, S. L., Kollef, M. H. (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs*, **67(3)**, str. 351–368.

Duarte, A. R. C., Ferreira, A. S. D., Barreiros, S., Cabrita, E., Reis, R. L., Paiva, A. (2017) A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* **114**, str. 296–304.

El Achkar, T., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S. (2021) Understanding the basics and properties of deep eutectic solvents. U: Deep Eutectic Solvents for Medicine, Gas Solubilization and Extraction of Natural Substances. *Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Fourmentin S., Costa Gomes M., Lichtfouse E., ur., 1. izd., Springer International Publishing, str. 1–40.

Evers, H., Von Dardel, O., Juhlin, L., Ohlsén, L., Vinnars, E. (1985) Dermal effects of compositions based on the eutectic mixture of lignocaine and prilocaine (emla). *British journal of anaesthesia*, **57(10)**, str. 997–1005.

Grimling, B., Jasińska, J., Meler, J., Szcześniak, M., Pluta, J., Górnjak, A. (2016). Physicochemical characterization and dissolution studies of solid dispersions of clotrimazole with chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. **21**, str. 63–72.

Imširović, E., Brčina, A., Dautbašić, A., Aličić, D. (2013) DJELOVANJE KANTARIONOVOG ULJA NA BAKTERIJE STAPHYLOCOCCUS AUREUS I ESCHERICHIA COLI. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, **2(1)**, str. 17–23.

Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, **11(2)**, str. 403.

Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., Ishii, S. (2017) Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review. *Journal of applied microbiology*, **123(3)**, str. 570–581.

Jenny, M., Kingsbury, J. (2018) Properties and prevention: A review of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Biology and Medical Research*, **3(3)**: 2017–2021

Jørgensen, H. J., Mørk, T., Høgåsen, H. R., Rørvik, L. M. (2005) Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in bulk milk in Norway. *Journal of applied microbiology*, **99(1)**, str. 158–166.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. (2004) Pathogenic Escherichia coli. *Nature reviews. Microbiology*, **2(2)**, str. 123–140.

Kim, S. A., Rhee, M. S. (2016) Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans -cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against Escherichia coli O157:H7. *Food control*, **60**, str. 447–454.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003) Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and molecular research: GMR*, **2(1)**, str. 63–76.

Mathela, C. S., Singh, K. K., Gupta, V. K. (2010) Synthesis and in vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. *Acta poloniae pharmaceutica*, **67(4)**, str. 375–380.

Matić, J. (2009) Patogene bakterije u hrani. Tehnologija hrane, <[Patogene bakterije u hrani | Tehnologija hrane](#)> Pristupljeno 15. svibnja 2021.

Mayer, F. L., Wilson, D., Hube, B. (2013) Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, **4(2)**, str. 119–128

Monaco, M., Pimentel de Araujo, F., Cruciani, M., Coccia, E. M., Pantosti, A. (2017) Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of Staphylococcus aureus. U: Staphylococcus aureus. *Current topics in microbiology and immunology*, 1. izd., Bagnoli F., Rappuoli R., Grandi G., ur., Springer, Cham, str. 21–56.

NCBI (2021a) PubChem Compound Summary for CID 2812, Clotrimazole. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clotrimazole>> Pristupljeno 19. svibnja 2021.

NCBI (2021b) PubChem Compound Summary for CID 2812, Ciprofloxacin. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>> Pristupljeno 21. svibnja 2021.

Nobile, C. J., Johnson, A. D. (2015) Candida albicans Biofilms and Human Disease. *Annual review of microbiology*, **69(1)**, str. 71–92.

Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., Reyes, V. E. (2010) Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*, **2(8)**, str. 2177–2197.

Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., El Jaziri, M. (2015) The formation of biofilms by Pseudomonas aeruginosa: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international*, 2015, str. 759348.

Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., Prince, A. S. (2005) Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **171(11)**, str. 1209–1223.

Santos, F., Duarte, A. R. C. (2021) Therapeutic deep eutectic systems for the enhancement of drug bioavailability. U: Deep Eutectic Solvents for Medicine, Gas Solubilization and Extraction of Natural Substances. *Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Fourmentin S., Costa Gomes M., Lichtfouse E., ur., 1. izd., Springer International Publishing, str. 103–129.

Silva, J. M., Silva, E., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2019) A closer look in the antimicrobial properties of deep eutectic solvents based on fatty acids. *Sustainable chemistry and pharmacy*, **14(100192)**, str. 100192.

Sorgo, A. G., Heilmann, C. J., Dekker, H. L., Brul, S., de Koster, C. G., Klis, F. M. (2010) Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. *Yeast (Chichester, England)*, **27(8)**, str. 661–672.

Stott, P. W., Williams, A. C., Barry, B. W. (1998) Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, **50(1–3)**, str. 297–308.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., Olson, M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406(6799)**, str. 959–964.

Sudbery, P. E. (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature reviews. Microbiology*, **9(10)**, str. 737–748.

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G., Jr (2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, **28(3)**, str. 603–661.

Tsui, C., Kong, E. F., Jabra-Rizk, M. A. (2016) Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and disease*, **74(4)**, ftw018.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Mirna Nakić

ime i prezime studenta