

Primjena niskotemperaturnih eutektskih otapala za razvoj formulacije lijekova s klotrimazolom kao aktivnim farmaceutskim sastojkom

Sopić, Tihana

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:159:116011>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Tihana Sopić

1415/MB

**PRIMJENA
NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA
RAZVOJ FORMULACIJE
LIJEKOVA S KLOTRIMAZOLOM
KAO AKTIVNIM
FARMACEUTSKIM SASTOJKOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Kristine Radošević te uz pomoć dr.sc. Manuele Panić. Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta HRZZ IP-2019-04-7712 „Racionalni dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“

Prije svega, zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević na pomoći, vodstvu i korisnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada te na prenesenom znanju koje ću primijeniti u budućem životu. Veliko hvala dr.sc. Manueli Panić na uloženom vremenu, strpljenju i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te hvala ostatku Laboratorija koji su osigurali ugodnu radnu atmosferu.

Posebno se zahvaljujem roditeljima koji su mi pružili bezuvjetnu ljubav, motivaciju tijekom školovanja i što su uvijek vjerovali u moj uspjeh te hvala bratu i šogorici. Od srca hvala baki i dedi što su me naučili pravim vrijednostima života. Hvala prijateljima koji su uljepšali ovo razdoblje moga života i hvala dečku koji je uvijek bio velika podrška.

Hvala Bogu na zdravlju, sreći, svim izazovima i prilikama.

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 RAZVOJ FORMULACIJE LIJEKOVA S KLOTRIMAZOLOM KAO AKTIVNIM FARMACEUTSKIM SASTOJKOM

Tihana Sopić, 1415/MB

Sažetak: Niskotemperaturna eutektička otapala (DES) intenzivno se istražuju kao zelena otapala za razvoj novih formulacija lijekova, prvenstveno za poboljšanje topljivosti, stabilnosti i permeabilnosti aktivnog farmaceutskog sastojka (API). U ovom radu, topljivost klotrimazola u različitim DES-ovima predviđena je korištenjem računalnog programa COSMO $therm$, pri čemu je najbolja topljivost predviđena u hidrofobnim otapalima. Za eksperimentalno određivanje topljivosti pripremljena su tri DES-a, a najbolja topljivost iznosila je 151,62 mg mL⁻¹ u otapalu timol:oktanska kiselina molarnog omjera 1:3, što je određeno tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Stabilnost formulacije praćena je spektrofotometrijski tijekom vremena, na sobnoj temperaturi i +4 °C. Klotrimazol se nije pokazao stabilnim, čak ni uz dodatak β -ciklodekstrina. Citotoksičnost formulacije i DES-a ispitana je na HaCaT staničnoj liniji u rasponu koncentracija 0,01-10 mg mL⁻¹, pri čemu nije uočen značajan negativan učinak na rast stanica. Testom propusnosti umjetne membrane (PAMPA) određeno je da u formulaciji s DES-om nije postignuto poboljšanje permeabilnosti API-ja. Iako razvijena formulacija klotrimazola u timol:oktanska kiselina pokazuje značajno bolju topljivost API-ja obzirom na referentno otapalo i nisku citotoksičnost tako pripremljene formulacije, potrebna su daljnja ispitivanja s drugim DES-ovima kako bi se riješilo pitanje stabilnosti API-ja u takvoj formulaciji i postigla bolja permeabilnosti.

Ključne riječi: niskotemperaturno eutektičko otapalo, klotrimazol, COSMO $therm$, PAMPA, citotoksičnost

Rad sadrži: 48 stranica, 15 slika, 5 tablica, 87 literaturnih navoda, 1 prilog

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: dr.sc. Manuela Panić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. Izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević
3. Doc.dr.sc. Teuta Murati
4. Izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetič (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Tehnology, Application and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

APPLICATION OF DEEP EUTECTIC SOLVENT FOR DEVELOPMENT OF DRUG FORMULATION WITH CLOTRIMAZOLE AS AN ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT

Tihana Sopić, 1415/MB

Abstract: Deep eutectic solvents (DES) are being intensively investigated as green solvents for the development of new drug formulations, primarily to improve the solubility, stability and permeability of the active pharmaceutical ingredient (API). In this work, the solubility of clotrimazole in different DESs was predicted using the computer program COSMO $therm$, with the best solubility predicted in hydrophobic solvents. Three DESs were prepared for the experimental determination of solubility, and the best solubility was 151,62 mg mL⁻¹ in a solvent thymol:octanoic acid with a molar ratio of 1:3, as determined by high performance liquid chromatography. The stability of the formulation was monitored spectrophotometrically over the time, at room temperature and +4 °C. Clotrimazole was not stable, even with the addition of β -cyclodextrin. The cytotoxicity of the formulation and DES was examined on the HaCaT cell line in the concentration range 0,01-10 mg mL⁻¹, but no significant negative effect on cell growth was observed. The parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) showed that DES formulation did not improve API permeability. Although in the developed formulation of clotrimazole in thymol:octanoic acid significant improvement in solubility was achieved and low cytotoxicity was observed, further research with other DESs is needed to solve the stability of the API in such formulation and to achieve better permeability.

Keywords: deep eutectic solvent, clotrimazole, COSMO $therm$, PAMPA, cytotoxicity

Thesis contains: 48 pages, 15 figures, 5 tables, 87 references, 1 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Kristina Radošević, Associate Professor*

Technical support and assistance: *PhD Manuela Panić*

Reviewers:

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

Thesis defended: 29 September 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ZELENA KEMIJA I ZELENA OTAPALA	2
2.1.1. Eutektička otapala	4
2.1.1.1. Svojstva eutektičkih otapala.....	4
2.1.1.2. Toksičnost eutektičkih otapala.....	7
2.1.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u farmaceutskoj industriji	10
2.2. KLOTRIMAZOL - AKTIVNI FARMACEUTSKI SASTOJAK	13
2.2.1. Klotrimazol i ciklodekstrin.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Kemikalije	17
3.1.2. Pufferi	17
3.1.3. Stanična linija	18
3.1.3.1. HaCaT stanična linija.....	18
3.1.4. Oprema	18
3.1.5. Računalni programi	19
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Sinteza niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	19
3.2.2. Procjena topljivosti klotrimazola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pomoću računalnog programa COSMO _{therm}	20
3.2.3. Eksperimentalna provjera topljivosti klotrimazola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	21
3.2.4. Stabilnost klotrimazola u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu	23
3.2.5. Ispitivanje citotoksičnosti klotrimazola na HaCaT staničnoj liniji	23
3.2.6. Određivanje permeabilnosti	25
3.2.6.1. PAMPA test.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. PROCIJENJENA TOPLJIVOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA POMOĆU RAČUNALNOG PROGRAMA COSMO _{therm}	29
4.2. TOPLJIVOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA.....	31

4.3. STABILNOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	33
4.4. CITOTOKSIČNOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	35
4.5. PERMEABILNOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	36
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA.....	41
7. PRILOZI	
7.1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA	

1. UVOD

Gljivične infekcije, iako uglavnom nisu smrtonosne, često su neugodne i smanjuju kvalitetu života zaražene osobe. Klotrimazol ima širok spektar antimikotičkog djelovanja, no problem klotrimazola kao aktivnog farmaceutskog sastojka (engl. *Active Pharmaceutical Ingredients*, API) lijeka je njegova slaba topljivost u vodi. Koliko je topljivost veliki problem za farmaceutsku industriju ukazuje činjenica da je skoro 90 % molekula u razvojnom procesu slabo topljivo u vodi (Kalepu i Nekkanti, 2015) što ograničava njihovu biodostupnost. Stoga, da bi neka molekula postala učinkovit lijek potrebno je odabrati odgovarajuće otapalo za formulaciju, koje će očuvati djelatna svojstva API-ja, a ujedno biti sigurno za primjenu kod pacijenata.

Značajan napredak u svijetu Zelene kemije je otkriće niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES). DES nastaje kompleksacijom između kvartarne amonijeve soli kao akceptora vodikove veze i donora vodikove veze (amin, šećer, alkohol ili karboksilna kiselina) u određenom molarnom omjeru, što rezultira smanjenjem točke tališta smjese u usporedbi s pojedinačnim komponentama, čime se dobiju smjese tekuće na sobnoj temperaturi. Osim povoljnog ekološkog profila, priprema DES-a je jednostavna, a sirovine su jeftine, sigurne, niskotoksične i biorazgradive. DES-ovi su proučavani kao alternativna otapala za otapanje API-ja, jer se na temelju dosadašnjih istraživanja očekivalo da će omogućiti poboljšanje njihove topljivosti i permeabilnosti, što u konačnici rezultira povećanjem biodostupnosti ili povećanom terapijskom učinkovitosti lijekova. Također, DES-ovi se mogu koristiti za rješavanje neželjenih pojava poput polimorfizma ili degradacije API-ja koje su također izazov prilikom formulacije lijeka (Nguyen i sur., 2021).

Cilj ovog rada je sinteza i odabir najboljeg niskotemperaturnog eutektičkog otapala za stvaranje formulacije s klotrimazolom kao aktivnim farmaceutskim sastojkom. Topljivost klotrimazola u DES-u biti će predviđena pomoću računalnog programa COSMO_{therm}, a zatim i eksperimentalno provjerena primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Stabilnost formulacije pri različitim temperaturama tijekom vremena pratit će se spektrofotometrijski. Nadalje, ispitat će se biološki učinak pripremljene formulacije na HaCaT staničnu liniju te odrediti stupanj permeabilnosti kroz umjetnu membranu (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA). Na temelju dobivenih rezultata donijet će se zaključak o mogućnosti primjene DES-a za dobivanje nove formulacije lijeka s klotrimazolom sa ciljem poboljšanja njegove biodostupnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA KEMIJA I ZELENA OTAPALA

Ubrzan razvoj, osim napretka, rezultira i značajnim gubitcima prirodnih resursa našega planeta. Zelena kemija ima sve veću ulogu u provedbi pravila održivog razvoja za sprječavanje ili smanjenje onečišćenja okoliša uzrokovanog tehnološkim procesima, uz istovremeno povećanje prinosa proizvodnje (Kudlak i sur., 2015). Zelena kemija relativno je novo područje usmjereno stvaranju kemijskih inovacija, uz istovremeno ispunjenje okolišnih i ekonomskih ciljeva. Definira se kao dizajn kemijskih proizvoda i procesa za smanjenje ili uklanjanje uporabe i stvaranja opasnih tvari. Dvanaest principa Zelene kemije (Tablica 1) uveli su Paul Anastas i John Warner 1998. godine, što je rezultiralo stvaranjem programa i vladinih inicijativa o Zelenoj kemiji diljem svijeta. To je vodeći okvir za dizajn novih kemijskih proizvoda i procesa koji se primjenjuje na sve aspekte životnog ciklusa procesa, od korištenih sirovina do učinkovitosti i sigurnosti transformacije, toksičnosti i biorazgradivosti korištenih proizvoda i reagensa (Anastas i Eghbali, 2010).

Tablica 1. Dvanaest principa Zelene kemije

12 PRINCIPA ZELENE KEMIJE

1. Prevencija	5. Korištenje sigurnih otapala i drugih tvari	9. Kataliza
2. Ekonomija atoma	6. Učinkovito korištenje energije	10. Dizajniranje razgradivih proizvoda
3. Manje opasne kemijske sinteze	7. Uporaba obnovljivih sirovina	11. Smanjenje onečišćenja praćenjem procesa u stvarnom vremenu
4. Dizajniranje sigurnijih kemikalija	8. Smanjivanje derivatnih procesa	12. Odgovarajuća razina sigurnosti kemikalija za sprječavanje nezgoda i nesreća

Otapala su neophodna u industriji i eksperimentalnoj grani prirodnih znanosti, a jedno od ključnih pitanja Zelene kemije odnosi se na razvoj ekološki prihvatljivih otapala koja će smanjiti ili potpuno zamijeniti upotrebu opasnih organskih otapala (Kudlak i sur., 2015). Procjena je da otapala čine oko 60 % svih industrijskih emisija i 30 % svih emisija hlapivih organskih tvari u cijelom svijetu (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

U mnogim industrijskim procesima velike se količine hlapivih i zapaljivih organskih otapala koristi u različitim reakcijskim sustavima i koracima odvajanja koji definiraju veliki dio

ekološke i ekonomske performanse procesa (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Brojni kemijski procesi još uvijek koriste štetna otapala, a neke zemlje čak i povećavaju njihovu potrošnju zbog niskih cijena i dostupnosti (Clarke i sur., 2018). Prema Gu i Jerome (2013) nisko vrelište organskih otapala poželjno je zbog lakše izolacije proizvoda, a reciklacija destilacijom na niskim temperaturama izbjegava razgradnju termički osjetljivih proizvoda. Otapala s niskim vrelištem su ekološki i sigurnosno problematična zbog skladištenja, zapaljivosti i izloženosti radnika parama otapala. Područje Zelene kemije pokazalo je kako je moguće osmisliti proizvode i procese nove generacije tako da budu isplativi, a povoljni za zdravlje ljudi i okoliš (Anastas i Eghbali, 2010), no mnogo je stvari za riješiti prije nego novo otapalo uđe u industrijsku primjenu, kao što su cijena, dostupnost, čistoća, propisi, odlaganje, postupci recikliranja te troškovi (Clarke i sur., 2018).

Idealno bi bilo razviti proces bez otapala, no to je izazovan zadatak zbog problema kao što su viskoznost, ograničenje prijenosa mase, talište reaktanata, kontrola egzotermnosti reakcije te izolacija i pročišćavanja proizvoda (Gu i Jerome, 2013). Stoga je predložena strategija razvoja zelenih otapala kao zamjene za otapala dobivena iz nafte s otapalima iz obnovljivih izvora, te zamjena opasnih otapala s onima koja pokazuju bolja okolišna, zdravstvena i sigurnosna svojstva (Cvjetko-Bubalo i sur., 2015). Gu i Jerome (2013) predložili su 12 kriterija koje bi zelena otapala trebala ispuniti vezano za njihovu dostupnost, cijenu, mogućnost recikliranja, stupanj čistoće, sintezu, toksičnost, biorazgradivost, performanse, stabilnost, zapaljivost, skladištenje i obnovljivost.

Voda je sigurno, jeftino i dostupno otapalo, a prikazuje zanimljiva svojstva koja se tiču reaktivnosti: neuobičajena selektivnost, utjecaj vodikovih veza na reakcijsko ponašanje, podesiva pH vrijednost, upotreba soli za učinak usoljivanja ili isoljivanja i primjena dvofaznih reakcijskih sustava. Nedostaci su temperaturno ograničen raspon tekućeg stanja i značajan toplinski kapacitet, zbog čega su destilacijski procesi energetske zahtjevni. Velika potrošnja energije tijekom postupka odvajanja vode od nehlapljivog reakcijskog proizvoda ili nečistoća, zahtjeva odabir drugog otapala (Häckl i Kunz, 2018).

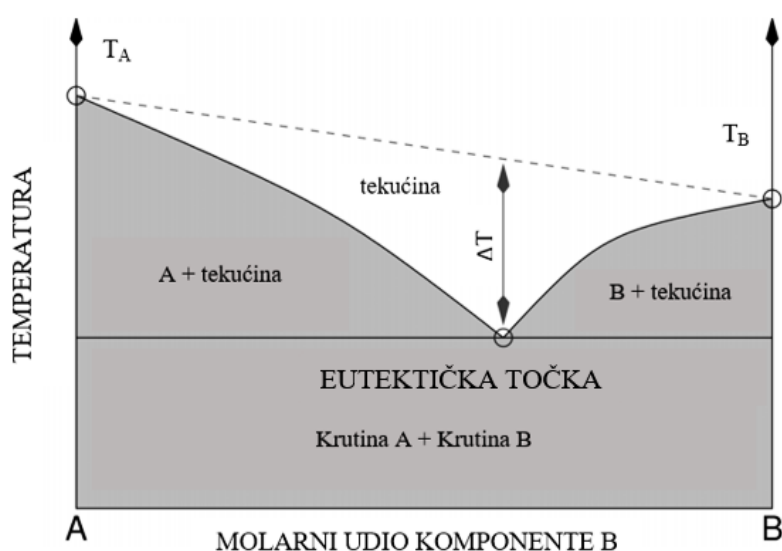
Prema Clarke i sur. (2018) neoterička otapala polako se integriraju u industrijske procese zbog prednosti nad organskim ili vodenim otapalima. Pojam neoteričko otapalo odnosi se na nove vrste otapala ili starijih materijala koji pronazale novu primjenu kao otapala (Wilkes, 2002), a tu pripadaju niskotemperaturna eutektička otapala, ionske kapljevine, tekući polimeri, superkritični ugljikov dioksid, otapala ekspanzirana plinom i zamjenjiva otapala. Broj objavljenih publikacija govori o važnosti ionskih kapljevine i niskotemperaturnih eutektičkih

otapala kao važnog otkrića u području Zelene kemije, a intenzivno se istražuju nove mogućnosti njihove primjene, uključujući proizvodnju lijekova i medicinu (Kudlak i sur., 2015).

2.1.1. Eutektička otapala

2.1.1.1. Svojstva eutektičkih otapala

Broj otapala koja su u skladu sa strogim zahtjevima Zelene kemije je ograničen, no niskotemperaturna eutektička otapala, koja se prema nekima smatraju četvrtom generacijom ionskih kapljevina, relativno su novo otkriće. S obzirom da DES uključuje i neutralne molekule pitanje je mogu li se svrstati u ionske kapljevine ili ne (Kudlak i sur., 2015). Prema Cvjetko Bubalo i sur. (2015) DES je nova generacija otapala nastala kompleksacijom između akceptora vodika (kvartarna amonijeva sol) i nenabijenog donora vodikove veze (amin, šećer, alkohol ili karboksilna kiselina). Kombinacijom u određenom molarnom omjeru dolazi do delokalizacije naboja koje je odgovorno za smanjenje tališta smjese u odnosu na temperature tališta početnih komponenti. Kudlak i sur. (2015) kao primjer navode kombinaciju dviju krutih tvari: uree ($T_U = 133\text{ }^{\circ}\text{C}$) i kolin klorida ($T_{\text{ChCl}} = 302\text{ }^{\circ}\text{C}$) u molarnom omjeru 2:1. Kao rezultat, dobiva se tekuća smjesa temperature tališta $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na Slici 1 nalazi se prikaz dvokomponentnog faznog dijagrama. Osim niske temperature tališta, DES-ovi su nisko hlapljivi, nezapaljivi te se ponašaju kao tekućine u širokom rasponu temperature, pokazuju kemijsku i toplinsku stabilnost, biorazgradivost i nisku toksičnost, priprema im je jednostavna, a komponente koje čine DES su jeftine i lako dostupne (Emami i Shayanfar, 2020).



Slika 1. Prikaz eutektičke točke dvokomponentnog (A + B) faznog dijagrama; T_A : temperatura tališta komponente A; T_B : temperatura tališta komponente B; ΔT : idealna točka tališta smjese (Smith i sur., 2014)

S obzirom da kemijska sinteza spoja uključuje jednu ili više kemijskih reakcija između reaktanata kako bi se dobio produkt, a priprema DES-a je jednostavno miješanje donora i akceptora vodikove veze, ispravnije je reći da se DES-ovi pripremaju, a ne sintetiziraju. Metode pripreme DES-a su: metoda zagrijavanja i miješanja, metoda liofilizacije, metoda vakuum evaporacije, metoda brušenja, metoda istiskivanja s dva vijka, metoda mikrovalnog zračenja te metoda ultrazvuka (Farooq i sur., 2020). S obzirom na komponente koje se koriste za pripremu, razlikujemo četiri vrste DES-a (Tablica 2). Većina DES-ova su hidrofilni, no mogu se pripremiti i hidrofobni DES-ovi čime se značajno proširuje mogućnost njihove primjene (Pena-Pereira i la Calle, 2019). Teoretski, može se pripremiti više od 10^8 varijacija ovih otapala (Radović i sur., 2021), a optimizacija svojstava otapala može se postići uvođenjem treće komponente, na primjer vode (Emami i Shayanfar, 2020).

Tablica 2. Vrste niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Kudlak i sur., 2015)

VRSTA	OPIS	PRIMJER
TIP I	metalna sol + organska sol	ZnCl ₂ + kolin klorid
TIP II	hidrat metalne soli + organska sol	CoCl ₂ x 6H ₂ O + kolin klorid
TIP III	organska sol + donor vodikove veze	kolin klorid + urea
TIP IV	metalna sol + donor vodikove veze	ZnCl ₂ + urea/etilen glikol/acetamid

DES pokazuje umjerenu do izrazito visoku viskoznost, ovisno o korištenim komponentama za njegovu pripremu. Visoka viskoznost pripisuje se jakim vodikovim vezama između komponenata DES-a, ali i elektrostatskim i van der Waalsovima interakcijama. Primjena vrlo viskoznih DES-ova nije praktična zbog slabog prijenosa mase i topline (Pena-Pereira i la Calle, 2019). Prema Zhang i sur. (2012) kolin klorid:etilen glikol ima značajno manju viskoznost od DES-ova koji sadrže šećer (npr. ksilitol, sorbitol) ili karboksilnu kiselinu (npr. malonska kiselina). Također, povećanjem molarnog omjera kolin klorid:glicerol, viskoznost se smanjuje. Prema Pena-Pereira i la Calle (2019) dobivanje manje viskoznih hidrofilnih DES-ova može se postići dodavanjem vode. Osim na viskoznost, prisutnost vode utječe na polaritet i gustoću dobivenih DES-ova. Molekule vode se mogu apsorbirati u molekularnu mrežu bez utjecaja na difuziju iona, no prisutnost vode iznad 50 % potiskuje interakcije između komponenti DES-a što značajno utječe na njegova fizikalno-kemijska svojstva. Dakle, na viskoznost DES-a utječe kemijska priroda komponenata, temperatura, udio vode te slobodni volumen (Zhang i sur., 2012). Polarnost ne određuje samo dodatak vode, već i vrsta komponenata koje čine smjesu. Eutektičke smjese na bazi organskih kiselina su najpolarnije,

zatim smjese na bazi aminokiselina, a smjese na bazi šećera i polialkohola su najmanje polarne (Dai i sur., 2013).

Prema Zhang i sur. (2012) većina DES-ova, zbog relativno visoke viskoznosti, pokazuje lošu ionsku vodljivost. Općenito, vodljivost se povećava kako temperatura raste jer se viskoznost smanjuje. S obzirom da promjena omjera organska sol:donor vodikove veze utječe na viskoznost, utječe i na vodljivost. Površinska napetost DES-a ima sličan trend kao i viskoznost jer strogo ovisi o jačini interakcija među molekulama koje tvore DES. Većina DES-ova ima gustoću veću od vode. Dodatak kolin klorida glicerolu smanjuje gustoću DES-a, no eksperimentalna mjerenja gustoće u ovisnosti o temperaturi teško je provesti. Naravno, prednost DES-a je ta da se fizikalno-kemijska svojstva mogu podesiti promjenom prirode kvaterne amonijeve soli i donora vodikove veze, što omogućuje pripremu otapala za specifične namjene.

Kompleksacijom primarnih metabolita ili bio-obnovljivih sastojaka poput aminokiselina, šećernih alkohola, šećera i organskih kiselina nastaje prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo (engl. *Natural deep eutectic solvents*, NADES) (Zainal-Abidin i sur., 2019). Niz primarnih metaboličkih tvari (šećeri, aminokiseline, kolin i neke organske kiseline) tvore unutarstanične eutektičke smjese koje pružaju stanicu treću vrstu otapala, potpuno različitu od lipida i vode, nazvane NADES (Choi i sur., 2011). Spoznajom da primarni metaboliti biljaka mogu promijeniti svoje stanje iz krutog u tekuće kada su pomiješani u odgovarajućem omjeru rezultiralo je otkrićem više od 100 NADES-a iz prirode (Dai i sur., 2013). Studije su dale popis sastava ovih smjesa kao i njihove molarne omjere (Choi i sur. 2011; Dai i sur., 2013).

Prirodni DES-ovi obećavaju kao otapala zbog biorazgradivosti, niske toksičnosti i sposobnosti kemijskog otapanja različitih spojeva, uključujući spojeve netopive u vodi, kao i makromolekule (npr. DNK, škrob, hitin i bjelančevine) (Lu i sur., 2016). Kovács i sur. (2020) navode druga dobra svojstva NADES-a kao što su niska hlapivost, zapaljivost i cijena te prilagodljivost fizikalno-kemijskih svojstava jednostavnim promjenom vrsta komponenata ili njihovog molarnog omjera. Također, priprava NADES-a se ostvaruje sa 100 % ekonomijom atoma, koja je mjera učinkovitosti provođenja kemijskog postupka u smislu svih uključenih atoma i željenih proizvedenih proizvoda. Najveći potencijal DES-a i NADES-a je njihova primjena kao dizajnerskih otapala, odnosno kao sustava čija se svojstva jednostavno mogu prilagoditi prema željenoj primjeni.

2.1.1.2. Toksičnost eutektičkih otapala

Za primjenu DES-a u industriji, ispitivanje toksikološkog profila nužno je za procjenu njegove sigurnosti prilikom primjene te utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš (Hayyan i sur., 2015). DES i NADES općenito se smatraju netoksičnima jer komponente koje ih čine su većinom same netoksične, no tu pretpostavku je ipak potrebno ispitati zbog moguće toksičnosti kao rezultat sinergijskog djelovanja, koji je definiran kao učinak dvije ili više tvari, entiteta, sredstava ili čimbenika, koji je veći od zbroja njihovih pojedinačnih učinaka (Hayyan i sur., 2013a). Studije toksičnosti DES-a ispitane su na vodenim organizmima, bakterijskim stanicama, humanim staničnim linijama te su provedene *in vivo* studije na glodavcima, iako su i drugi organizmi, poput stanica gljiva, biljaka, beskralježnjaka i riba također spomenuti u literaturi (Nguyen i sur., 2021).

Prema Florindo i sur. (2014) najčešće sintetizirani DES-ovi su na bazi kolin klorida zbog niske cijene i toksičnosti, biorazgradivosti i biokompatibilnosti. Ispitan je toksičan i citotoksičan učinak DES-a na bazi kolin klorida (Hayyan i sur., 2013a) i na bazi metil-trifenilfosfanijevog bromida (MTPB) (Hayyan i sur., 2013b) na bakterije *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* te larve račića *Artemia salina*. Samo je DES na bazi MTPB pokazao inhibirni učinak na razvoj bakterija. *A. salina* bila je osjetljivija na djelovanje DES-ova, ukazujući na pojavu sinergije, odnosno da DES ima veću citotoksičnost od njegovih individualnih komponenti. No, smrtnost račića može biti i učinak drugih čimbenika poput niske dostupnosti kisika ili ograničene mogućnosti kretanja zbog viskoznosti otopina. Zaključeno je da toksičnost ovisi o sastavu, viskoznosti i koncentraciji otapala te da dvokomponentni DES sustav ima znatno veću toksičnost nego vodene otopine svake zasebne komponente. Ispitivanjem toksičnosti DES-a na bazi kolin klorida i aminokiselina prema acetilkolinesterazi, enzimu ključnom za normalno funkcioniranje živčanog sustavu svih viših organizama, pokazalo je da se toksičnost DES-a ovisi o aminokiselinskom sastavu (Hou i sur., 2013).

Huang i sur. (2014) ispitali su toksičnosti DES-a kolin klorid:urea (1:1) na vodenom beskičmenjaku *Hydra sinensis* koji je osjetljiv na kemijska zagađenja te se kombinacija sastojaka u DES-u pokazala manje toksična u odnosu na učinak svake komponente zasebno ili fizički pomiješanog kolin klorida s ureom. Toksičnost DES-a na bazi kolin klorida i kolin acetata sa donorima vodikove veze (urea, acetamid, glicerol i etilen glikol) Wen i sur. (2015) testirali su na bakteriji *Escherichia coli*, biljci *Allium sativum* i beskičmenjaku hidri. Ovi DES-ovi pokazuju inhibitorne učinke na modelne organizme, ovisno o sastavu i koncentraciji DES-a, pri čemu DES-ovi na bazi kolin klorida imaju veći inhibitorni učinak od onih na bazi kolin

acetata, osobito u kombinaciji s glicerolom i etilen glikolom. Utjecaj DES-a i njihovih komponenti na različite organizme mogu se povezati s njihovim interakcijama s staničnim membranama. Torregrosa-Crespo i sur. (2020) uočili su da DES acetilkolin klorid:acetamid nije toksičan za bakteriju *Escherichia coli* u koncentracijama do 300 mM, no iznad 600 mM DES uzrokuje potpunu inhibiciju rasta. Ova toksičnost nije samo posljedica kemijskog sastava DES-a, već i zakiseljenosti medija uzrokovane hidrolizom DES-a tijekom staničnog rasta.

Radošević i sur. (2015) procijenili su toksičnost DES-a na bazi kolin klorida koji sadrže šećer (glukoza), alkohol (glicerol) i organsku kiselinu (oksalna kiselina) kao donore vodika, na riblju (CCO) i humanu (MCF-7) staničnu liniju. Kolin klorid:oksalna kiselina pokazuje umjerenu citotoksičnost, dok su se kolin klorid:glukoza i kolin klorid:glicerol pokazali netoksičnima. Kako je uočeno, umjerena citotoksičnost uzrokovana je formiranjem kalcij-oksalatnih kristala koji oštećuju stanice. Također, došlo je do pada pH, a promjena okolišnog pH može modificirati staničnu proliferaciju i njihova metabolička svojstva.

Prema Zhao i sur. (2015) DES na bazi amina, alkohola i šećera ne djeluju inhibitoryno, dok je DES na bazi organske kiseline imao inhibitoryni učinak na bakterije *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*. DES-ovi na bazi organskih kiselina inhibiraju rast bakterija kao posljedica promjena pH, koje su ispod optimalnih za rast bakterija. Kiseli donori vodikove veze mogu inaktivirati stanice denaturiranjem proteina koji se nalaze na staničnoj stijenci, što rezultira smrću stanice. Delokalizacija naboja čini DES puno toksičnijim u usporedbi sa pojedinim kemikalijama, a mreža vodikovih veza u DES-u na bazi kiseline je gušća i kompaktnija, pa delokalizirani naboji imaju veći utjecaj, osobito kolin klorid:limunska kiselina i kolin klorid:vinska kiselina.

Hayyan i sur. (2015) ispitali su citotoksičnost DES-a na pet humanih staničnih linija raka i jednoj normalnoj staničnoj liniji. DES se temelji na kolin kloridu u kombinaciji s glicerinom, etilen glikolom, trieten glikolom i ureom. Citotoksični mehanizam proizlazi iz povećane poroznosti membrane zbog oštećenja uzrokovane DES-om. Nakon ulaska, DES doprinosi povećanju koncentracija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) čime se povećava oksidativni stres stanice. Krajnja točka kaskade reakcija je potpuno uništavanje stanice putem apoptoze. Macário i sur. (2019) ispitali su citotoksičnost DES-a pomoću dvije stanične linije: HaCaT i MNT-1. Općenito su primijetili da otapala koji su kao donor vodikove veze imali kolin klorid ili tetrametilamonijev klorid nisu toksični za ove stanične linije, dok su one koje sadrže tetrabutilamonijev klorid bile toksične. Kao akceptor vodikovih veza ispitana je butanska kiselina, heksanoična kiselina, 1-propanol, etilen glikol i urea. Zanimljivo, uočili su povećanu vijabilnost HaCaT stanica uzrokovanu većinom ispitivanih spojeva. Ipak, važno je razumjeti

mehanizme koji stoje iza zapaženog učinka, jer povećana vijabilnost može predstavljati staničnu proliferaciju koja potiče regeneraciju kože, ali također može ukazivati na aktivaciju mehanizama mutageneze.

Paiva i sur. (2014) testirali su citotoksičnost 11 različitih NADES-a na staničnoj liniji L929, a rezultati sugeriraju da prisutnost vinske kiseline ima štetan učinak na metaboličku aktivnost stanica. Hayyan i sur. (2016) ispitali su NADES-e na bazi kolin klorida s različitim donorima vodikovih veza (glukoza, fruktoza, saharoza, glicerol i malonska kiselina), te je dodana voda kao tercijarna komponenta. Citotoksičnost je bila određena na humanim i mišjim staničnim linijama raka (HeLaS3, CaOV3, MCF-7 i B16F10). Zapažen je trend između citotoksičnosti NADES-a i čimbenika, kao što su priroda i fizikalna svojstva NADES-a (osobito viskoznost), dodatak vode, kao i njihove interakcije s različitim funkcionalnim skupinama prisutnim na površini stanica. Također, očito je da organske kiseline kao donori vodikove veze uvelike doprinose povećanoj toksičnosti eutektičkih smjesa.

Radošević i sur. (2018) ispitali su učinak četiri različita NADES-a na bazi kolin klorida i oksalne kiseline, uree, ksilitola te sorbitola kao donora vodikove veze na MCF-7, HEK293T i HeLa stanične linije. Najveći inhibitorni učinak imao je kolin klorid:oksalna kiselina na tumorske HeLa i MCF-7 stanice, dok je učinak na normalne HEK293T stanice bio znatno manji. Stvaranje kristala kalcijevog oksalata unutar stanica izazvalo je štetne učinke i na tumorske i na normalne stanice, a jači toksični učinak na tumorske stanice može se objasniti da tumorske stanice, zbog većih energetske potrebe, unose više sastojaka medija, ali i smjese kolin klorid:oksalna kiselina. Rezultati su potvrdili utjecaj organske kiseline na ukupnu toksičnost NADES-a. Citotoksični učinak kolin klorid:urea zabilježen je samo kod MCF-7 stanica što može biti uzrokovano visokim pH (pH ~ 9) pa, s obzirom da ovakav učinak nije zabilježen na ostalim staničnim linijama, može se zaključiti da citotoksičnosti NADES-a ovisi i o ispitivanoj staničnoj liniji. Zanimljivim se pokazao proliferativni učinak betain:jabučna kiselina:prolin, dok ostali ispitani NADES-i na bazi betaina i limunske kiseline nisu imali citotoksični učinak te se smatraju netoksičnima.

Halder i Cordeiro (2019) razvili su *in silico* pristup analizi toksičnosti, mtk-QSTR (engl. *multitasking-Quantitative Structure Toxicity Relationships*) analiza. Naveli su parametre koji su važni za određivanje toksičnosti DES-a: polaritet, elektronegativnost, priroda donora vodikove veze i topološke značajke te su uspješno rangirali glavne klase donora vodikovih veza u smislu toksičnosti DES-a: šećerni alkoholi i alkoholi ravnog lanca daju nisku toksičnost, šećeri i amidi daju srednju toksičnost te organske i anorganske kiseline koje daju visoku razinu

toksičnosti, što je u skladu s dosadašnjim eksperimentalnim rezultatima i zaključcima donešenim na temelju tih rezultata.

2.1.2. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u farmaceutskoj industriji

Sve veće potrebe za zdravstvenom zaštitom na svjetskoj razini pokretač su razvoja novih lijekova, ali i potrage za novim i učinkovitijim farmaceutskim formulacijama (Aroso i sur., 2016). Farmaceutska industrija suočena je s velikim izazovima povezanima s topljivošću i permeabilnošću lijeka, koja, ako nije zadovoljavajuća rezultira neodgovarajućom farmakokinetikom i slabom bioraspoloživosti API-ja (Duarte i sur., 2017). U biomedicinskom području zabilježeno je kako DES poboljšava topljivost, permeabilnost i apsorpciju aktivnih farmaceutskih sastojaka, a ako je API jedna od komponenti DES-a, sustav se tada naziva terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*, THEDES) (Pereira i sur., 2019). Priprema THEDES sustava daje 100 % čisti proizvod, bez gubitaka tijekom proizvodnje i bez potrebe pročišćavanja. Nadalje, *scale-up* procesa je relativno jednostavan, što je vrlo važno za farmaceutsku industriju (Duarte i sur., 2017). Sposobnost stvaranja DES-a s API-jem i mogućnost razvoja novog načina isporuke lijekova, posebno za transdermalnu isporuku lijekova, prvi put su opisali Stott i sur. (1998) koristeći mješavine API-ja (ibuprofena) s različitim terpenima, uključujući mentol i timol.

Nadalje, Morrison i sur. (2009) izvijestili su o značajnom povećanju topljivosti benzojeve kiseline, danazola, griseofulvina i itrakonazola za 5-22 000 puta, u DES-ovima urea:kolin klorid i malonska kiselina:kolin klorid, u usporedbi s topljivosti u vodi. Su i Klibanov (2015) istraživali su mogućnost formiranja DES-a s aspirinom kao donatorom vodikove veze te su uočili da je topljivost aspirina u smjesi kolin klorid:aspirin znatno veća u usporedbi s vodom. Koenzim Q10 je slabo topljiv u vodi što uzrokuje njegovu ograničenu biodostupnost, no, Tarate i Bansal (2015) opisali su nastanak tekuće formulacije pri 37,93 °C između koenzima Q10 i laurinske kiseline u molarnom omjeru 2:1. Abbott i sur. (2017) pokazali su kako se visoko koncentrirane tekuće formulacije mogu proizvesti od farmaceutskih aktivnih tvari koji su ili donori vodikovih veza ili kvaterne amonijeve soli. Navedene smjese mogu prevladati probleme topljivosti u vodi, jer eutektika sprječava rekristalizaciju aktivnog sastojka. Aspirin, paracetamol i salicilna kiselina formulirani su u DES miješanjem s kolin kloridom (Abbott i sur., 2017). Također, pokazano je da složene molekule lijekova koje pokazuju polimorfizam, poput Adifenina i Ranitidina, mogu biti formulirane kao homogena tekućina, pri čemu donor vodikove veze također može biti farmaceutski aktivni sastojak, npr. aspirin. Aroso i sur. (2016) ispitali su THEDES na bazi kolin klorida odnosno mentola konjugiranih s tri različita API-ja:

acetilsalicilnom kiselinom, benzojevom kiselinom i fenilacetilnom kiselinom. Studije su pokazale poboljšano otapanje API-ja, osobito za THEDES na bazi mentola, te da THEDES zadržava antibakterijsko djelovanje API-ja. Općenito, rezultati ističu potencijal THEDES-a kao formulacije kojom se postiže bolja topljivost API-ja, a ujedno mogu biti i učinkovitiji sustavi za isporuku lijekova.

Prema Lu i sur. (2016) osim slabe topljivosti u vodi, API-ji se razgrađuju i nisu stabilni u vodenim otopinama. To je do sada najbolje istraženo na primjeru nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*, NSAID), koji su široko korišteni lijekovi s iznimnim analgetskim, antipiretičkim i protuupalnim djelovanjem. Međutim, NSAID su netopljivi ili slabo topljivi u vodi. Ova je studija pokazala da DES može poboljšati topljivost lijekova netopljivih u vodi za 17-5477 puta. Topljivost može biti prilagođena promjenom molarnog omjera komponenata i sadržaja vode u DES-u. Nadalje, API-ji koji sadrže ester podvrgavaju se hidrolizi tijekom produljenog skladištenja u vodi. Aspirin, hidrolabilan NSAID, pokazao se 8,2 puta stabilniji u DES-u (kolin klorid i 1,2-propandiol) nego u vodi, dok Olivares i sur. (2018) navode poboljšanje stabilnosti β -laktamskih antibiotika u DES-u betain:urea.

Wang i sur. (2014) izvijestili su o razvoju eutektičkog sustava lidokain:ibuprofen, a rezultati pokazuju da je promjenom molarnih omjera komponenata moguća prilagodba formulacije za razvoj novih transdermalnih sustava isporuke. Duarte i sur. (2017) pripremili su THEDES na bazi mentola u kompleksu s tri različita API-ja: ibuprofen, borna kiselina i fenilacetilna kiselina. Potvrđeno je da se eutektički sustav formira vodikovim vezama između mentola i API-ja, a pripremljeni THEDES sustavi ne pokazuju samo povećanu topljivost lijeka u izotoničnoj otopini, već i povećanu permeabilnost. Permeabilnost API-ja trostruko se povećala, topljivost ibuprofena povećala se 12 puta, a manje povećanje topljivosti uočeno je za bornu kiselinu. Sustavi koji sadrže fenilacetilnu kiselinu ne pokazuju ovakav trend. Manipulacija API-ja, odnosno promjena iz krutog oblika u tekući u kompleksu THEDES pokazao se kao jednostavna i učinkovita metoda za poboljšanje bioraspoloživosti API-ja.

Silva i sur. (2018) razvili su THEDES na bazi kolin klorida i askorbinske kiseline u kojem su uspješno otopili deksametazon (DEX). Difuzija i permeabilnost DEX-a malo su povećane, a antioksidacijska svojstva askorbinske kiseline zadržana su do 6 mjeseci kada je spoj u THEDES obliku. Vijabilnost stanica varira ovisno o koncentraciji THEDES-a jer veća koncentracija uzrokuje pad pH i povećanje viskoznosti. Sintetiranje superkričnom tekućinom korišteno je za pripremu prikladnog kontroliranog sustava isporuke lijeka, temeljenog na poli- ϵ -kaprolaktonu s THEDES-om koji sadrži otopljeni DEX. Ova studija ističe potencijalnu

primjenjivost THEDES-a na temelju kolin klorida i askorbinske kiseline u farmaceutskoj industriji i primjeni u tkivnom inženjerstvu.

Cilj rada Santos i sur. (2019) bio je razviti THEDES sustav na bazi etambutola i L-arginina koji poboljšava svojstva ovih tvari, osobito topljivost i permeabilnost, što bi u budućnosti moglo smanjiti potrebne koncentracije u tretmanima liječenja tuberkuloze. Rezultati ukazuju kako je permeabilnost i koeficijent difuzije etambutola u THEDES-u veći, jer je njegova topljivost jako povećana, no to nije slučaj sustavima s L-argininom. Prema biofarmaceutskom klasifikacijskom sustavu (engl. *Biopharmaceutics Classification System*, BCS), etambutol je klasificiran kao spoj klase III, no poboljšana bioraspoloživost API-ja etambutol u obliku THEDES-a svrstava ga u klasu I, budući se u navedenoj formulaciji pokazao vrlo topljivim i visoko permeabilanim.

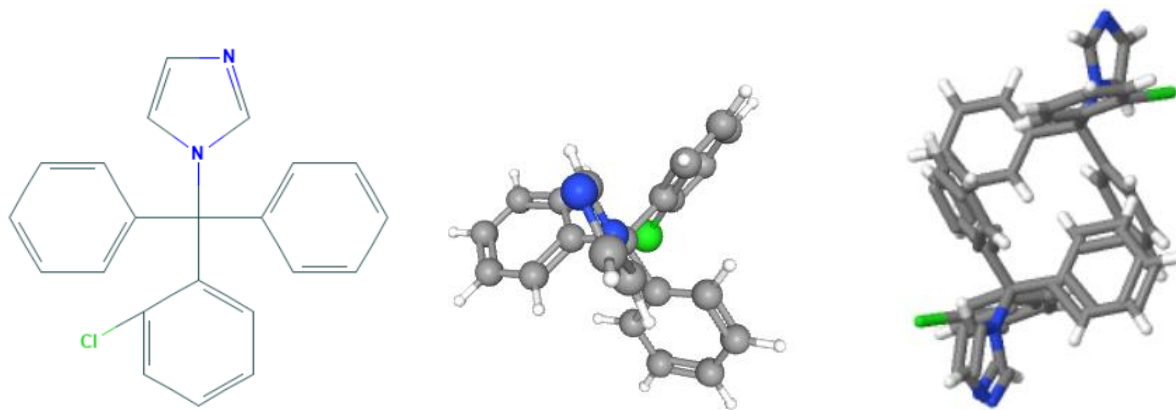
Pereira i sur. (2019) ispitali su THEDES na bazi limonena u kombinaciji s različitim spojevima, uključujući zasićene masne kiseline (miristinska i kaprinska kiselina), derivate eteričnih ulja (mentol) i nesteroidne protuupalne lijekove (ibuprofen). Ibuprofen:limonen je jedina formulacija koja je inhibirala proliferaciju tumorske HT29 stanične linije bez negativnog utjecaja na preživljenje normalne stanične linije debelog crijeva. Ovaj THEDES ima zaštitna i protuupalna svojstva ibuprofena povezana s antikancerogenim svojstvima limonena. Pomoću ibuprofen:limonen (1:4) moguće je smanjiti citotoksičnost povezanu s limonenom i povećati topljivost ibuprofena, što dodatno pokazuje potencijal ovog sustava kao sustava dostave lijekova u terapijama protiv raka. S obzirom da su ionski gelovi privukli interes kao nositelji lijekova na farmaceutskom području, Mokhtarpour i sur. (2020) istražili su razvoj ne-citotoksičnog ionskog-gel nosača koji sadrži lijek protiv karcinoma (Sunitinib malat, SUM) i DES (kolin klorid:askorbinska kiselina), kako bi se dobio biokompatibilan sustav za ciljano oslobađanje SUM-a. Gel je postojan više od šest mjeseci bez degradacije, a oslobađanje SUM-a iz gela ovisi o pH. Eksperiment oslobađanja lijeka pokazao je da DES u sintetiziranom ionskom gelu može biti dobar kandidat kao nosač za ciljanu isporuku SUM-a u krvne žile stanica tumora.

Istraživanje biomedicinskog potencijala hidrofobnih THEDES-a na bazi mentola i zasićenih masnih kiselina (stearinska kiselina, miristinska kiselina i laurinska kiselina) proveli su Silva i sur. (2019). Među različitim formulacijama, THEDES mentol:stearinska kiselina pokazala se kao najperspektivnija formulacija, jer nije izazvala značajnu citotoksičnost, a pojačala je zacjeljivanje rane, dok posjeduje antibakterijska svojstva protiv *Staphylococcus epidermus* i *Staphylococcus aureus* sojeva. To ukazuje na moguću primjenu ovog THEDES-a kao aktivnog premaza u zavojima za rane.

U dosadašnjim istraživanjima THEDES pokazuje potencijal za primjenu u medicinskoj i farmaceutskoj industriji. Razvoj tekućih formulacija omogućuje bolju topljivost, permeabilnost i stabilnost, a time i biodostupnosti aktivnog farmaceutskog sastojka. Nadalje, primjena DES-a omogućuje i razvoj kontroliranog sustava isporuke lijeka što također omogućuje učinkovitiju terapiju. Prema Blokhina i sur. (2019) molekule visoke lipofilnosti i permeabilnosti, također se mogu slabo apsorbirati u organizmu, ako je njihova topljivost u vodi niska. Kod takvih lijekova, kao što je npr. antimikotik klotrimazol, stupanj otapanja utječe na brzinu apsorpcije. Niska bioraspoloživost zahtijeva češće doziranje i povećava rizik od nuspojava. Povećanjem topljivosti ove skupine lijekova može se poboljšati njihova biodostupnost, smanjiti potrebna doza lijeka te povećati učinkovitost.

2.2. KLOTRIMAZOL - AKTIVNI FARMACEUTSKI SASSTOJAK

2D, 3D i kristalna struktura klotrimazola, odnosno 1-[(2-klorofenil) difenilmetil]-1H-imidazola, $C_{22}H_{17}ClN_2$, prikazana je na Slici 2. Molekularna konformacija pokazala je tri fenilna prstena koja su gotovo okomiti na imidazolni prsten (Song i Shin, 1998). Prema Crowley i Gallagher (2014) četiri aromatska prstena vezana su na tetraedarski atom ugljika, pri čemu je poznato da jedan aromatski prsten (imidazolni prsten) posreduje u reakcijama prijenosa elektrona u biološkim sustavima, a preostali aromatski prsteni obuhvaćaju trifenilmetilni sustav, strukturu za koju je poznato da stabilizira radikalne intermedijere. Jedan od tih prstenova je kloro-supstituiran na svom C2 položaju. Navas i sur. (2004) navode kako od četiri stabilna konformera, niti jedan nema dva aromatska prstena u istoj ravnini. Energetski sadržaj pretpostavljenog koplanarnog konformera je vrlo visok, što rezultira izuzetno nestabilnom strukturom, zbog interakcija između supstituenata na *ortho*-pozicijama u aromatskim prstenovima. Za sve četiri konformacije klotrimazola, dipol se orijentira od imidazolskog prstena prema atomu klora, a mapiranje molekularnog elektrostatskog potencijala otkrilo je da klotrimazol posjeduje periferno područje bogato elektronima koje odgovara njegovom nesupstituiranom dušikovom atomu i područje s pozitivnim elektrostatskim potencijalom koji odgovara supstituiranom atomu dušika.



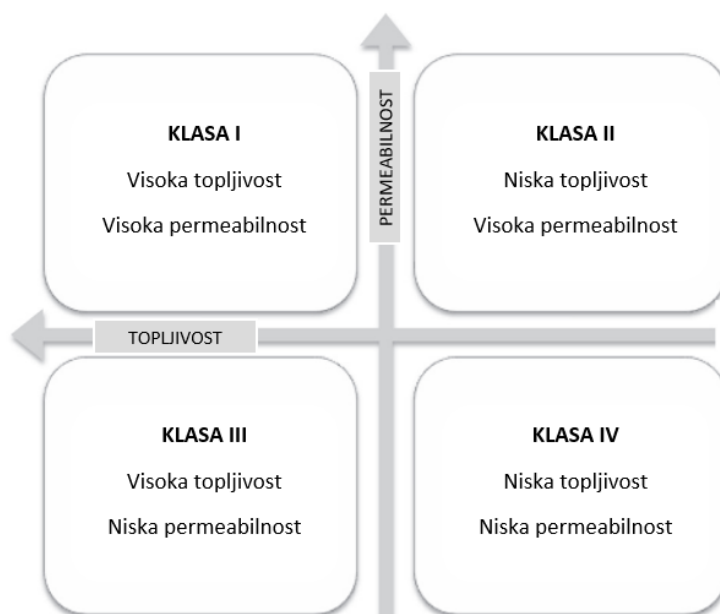
Slika 2. 2D, 3D i kristalna struktura klotrimazola (NCBI, 2021)

Klotrimazol je pripadnik azolne klase sintetskih antimikotičkih agensa koji su otkriveni 1960-ih. Azoli čine najveću klasu antimikotičnih lijekova u kliničkoj uporabi, a klotrimazol spada u imidazole, podrazred azolskih lijekova (Crowley i Gallagher, 2014). Klotrimazol se koristi za liječenje raznih gljivičnih infekcija kože i sluznica. To je lijek kojeg karakterizira snažan antifungalni potencijal, posebno prema kvascima i dermatofitima, a također je obećavajuće sredstvo u farmakoterapiji malarije i karcinoma (Grimling i sur., 2016). Crowley i Gallagher (2014) navode njegovu široku upotrebu kao lokalnog lijeka za atletsko stopalo te vulvovaginalnu i orofaringealnu kandidijazu. Također, može biti kombiniran s drugim molekulama, poput metala, za stvaranje klotrimazol kompleksa koji pokazuju poboljšanu farmakološku učinkovitost. Interesantan je i za terapiju bolesti srpastih stanica jer je za njihov metabolit, ICA 17043, pokazano da ima blagotvoran učinak na dehidraciju eritrocita. Osim toga, klotrimazol se koristi za liječenje metronidazol-rezistentne *Trichomoniasis vaginalis* za ublažavanje simptoma te prokazuje aktivnost protiv određenih Gram-pozitivnih bakterija. Klotrimazol se vrlo dobro tolerira s malo nuspojava, iako postoji određena rezistencija na lijek koja se javlja kod imunokompromitiranih pacijenata.

Svi antifungalni lijekovi azolskog tipa djeluju tako da ometaju biosintezu ergosterola, glavnu komponentu gljivične citoplazmatske membrane. Klotrimazol inhibira citokrom P450, a rezultat je iscrpljivanje ergosterola i njegova zamjena sa aberantnim vrstama sterola što utječe na permeabilnost i fluidnost membrane. Također, smanjena je aktivnost enzima vezanih na membranu, uključujući enzime važne za sintezu staničnih stijenki, pa dolazi do povećanog propuštanja staničnih stijenki i otpuštanja staničnog sadržaja (Crowley i Gallagher, 2014). Općenito se vjeruje da antifungalna aktivnost imidazola proizlazi iz dezorganizacije citoplazmatske membrane gljivica, koja je posljedica inaktivacije P450 vezanjem između N-atoma imidazolskog prstena i HEM mjesta (Song i Shin, 1998). Prema Crowley i Gallagher

(2014) azolni lijekovi ciljaju citokrom P450-Erg11p ili Cyp51p enzime, koji posjeduju monooksigenaznu aktivnost i katalizira uklanjanje 14- α -metilne skupine lanosterola ili eburikola u gljivama. Proteini Cyp51p sadrže željezni protoporfirinski dio smješten na njihovom aktivnom mjestu, a upravo se na ovom mjestu azolni spojevi vežu za atom željeza, preko atoma dušika u njihovom imidazolnom prstenu. Drugi dio azalnog lijeka se veže na apoprotein, a ta interakcija ovisi o individualnoj strukturi samog lijeka. Iskorištavanje razlika nudi mogućnost za racionalno dizajniranje lijekova s poboljšanom učinkovitošću protiv određene gljivične vrste.

Klotrimazol je lipofilan spoj, slabo topljiv u vodi (0,49 mg L⁻¹) (Mohammed i sur., 2016). Prema BCS (Slika 3) klotrimazol pripada klasi II, koju karakterizira dobra permeabilnost i slaba topljivost, a upravo iz ograničene mogućnosti otapanja proizlazi i niska bioraspodijelivost klotrimazola (Grimling i sur., 2016). Topikalna bioraspodijelivost klotrimazola vrlo je niska, u rasponu je od 0,5 % do 10 % zbog njegove slabe topljivosti u vodi (Bolla i sur, 2019). Stoga je poželjno naći sustav koji bi omogućio bolje otapanje klotrimazola u svrhu stvaranja poboljšanih formulacija lijekova.



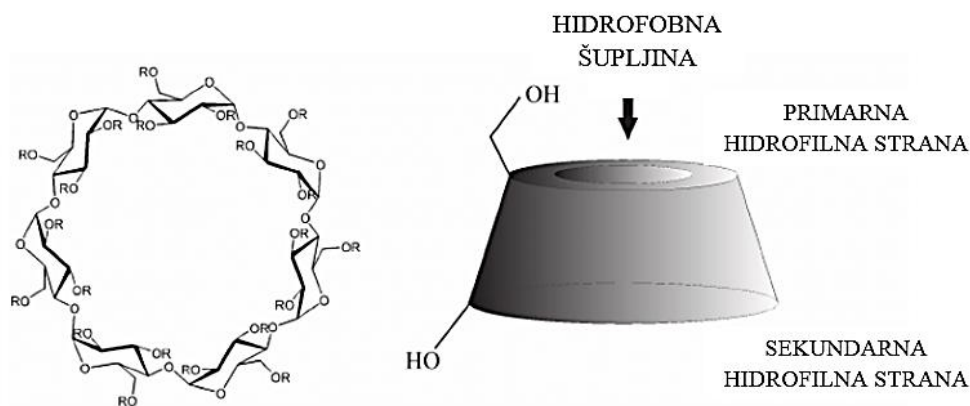
Slika 3. Biofarmaceutski klasifikacijski sustav API-ja (Duarte i sur., 2017)

Kao alternativno otapalo za slabo topljive API-je predloženo je korištenje niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Palmelund i sur., 2019). Prethodno navedene studije ispitivanja DES-a kao otapala za poboljšanje topljivosti, permeabilnosti, stabilnosti i biodostupnosti API-ja pokazale su dobre rezultate. Iz toga proizlazi da bi se za poboljšanje topljivosti klotrimazola mogao koristiti DES sustav, što bi omogućilo razvoj poboljšane

formulacije lijekova s klotrimazolom kao aktivnim farmaceutskim sastojkom, što je i bio cilj ovoga rada.

2.2.1. Klotrimazol i ciklodekstrin

Osim slabe topljivosti i biodostupnosti, pitanje stabilnosti lijeka može ograničiti izvedivost farmaceutske formulacije, no istraživanja su pokazala da se stabilnost kemijski nestabilnih molekula može poboljšati stvaranjem kompleksa sa ciklodekstrinima (CD) (Jug i Bećirević-Laćan, 2008). CD su molekule u obliku prstena koje sadrže hidrofobnu unutrašnjost čime mogu tvoriti inkluzijske komplekse sa prikladnim molekulama (Georgantzi i sur., 2017), a hidroksilne skupine okrenute su prema vanjskoj površini molekule (Slika 4) (Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Stvaranje inkluzijskog kompleksa s lijekom dovodi do mijenjanja nepoželjnih karakteristika kao što je neugodan miris, niska topivost u vodi, niska bioraspoloživost te kemijska nestabilnost (Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Ovi ciklički oligosaharidi sadrže 6, 7 ili 8 glukopiranoznih jedinica (α , β i γ -CD) koji se razlikuju u veličini koja određuje smještaj molekula u šupljinu (Georgantzi i sur., 2017). Zahvaljujući biokompatibilnosti, CD imaju mogućnost korištenja u formulacijama lijeka za različite primjene (Jug i Bećirević-Laćan, 2008). Ionske kapljevine i eutektička otapala mogu djelovati kao vrlo dobra otapala CD, a mogućnost postizanja visokih koncentracija bez agregacije CD u mediju, otvara mogućnost novim, zasad nepredvidivim aplikacijama (Triolo i sur., 2020).



Slika 4. Kemijska struktura β -ciklodekstrina (R=H) (Jug i Bećirević-Laćan, 2008)

U literaturi je do sada opisano da se problem biodostupnosti klotrimazola može riješiti kompleksacijom sa ciklodekstrinom (Prabagar i sur., 2007), a značajno povećanje topljivosti zabilježili su Pradines i sur. (2015) stvaranjem inkluzijskog kompleksa klotrimazola i metiliranog ciklodekstrina. No prema našim saznanjima do sada nije isproban sustav klotrimazola i CD u DES-u, što je ispitano u ovom radu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- 0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Acetonitril, >99.9 %, Honeywell, Riedel-de Haen, Njemačka
- Dekanska kiselina, 99 %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Destilirana voda
- DL-Jabučna kiselina, 99+ %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Dodekan, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Klotrimazol, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Kolin klorid, 99 %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Kumarin, 99+ %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- L(-)-Prolin, 99+ %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Lecitin, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij], Promega, SAD
- Oktanska kiselina, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Timol, 99 %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Tripan plavo (0,4 %), Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Urea, Grammol, Zagreb, Hrvatska
- β -ciklodekstrin, 98 %, Acros Organics, New Jersey, SAD

3.1.2. Pufferi

- Kalij - fosfatni puffer (0,1 M, pH=7)
Dikalijev fosfat (4,67 g)
Monokalijev fosfat (3,15 g)
Destilirana voda (500 mL)
- PBS puffer (pH=7,4)
Kalijev klorid (0,2 g)
Natrijev klorid (8,0 g)

Kalijev dihidrogenfosfat (0,24 g)
Dinatrijev hidrogenfosfat (1,44 g)
Destilirana voda (1000 mL)

3.1.3. Stanična linija

3.1.3.1. HaCaT stanična linija

Boukamp i sur. (1988) uspostavili su spontano transformiranu humanu epitelnu staničnu liniju iz kože odraslih ljudi, koja je zadržala punu sposobnost epidermalne diferencijacije. Stanična linija dobila je naziv HaCaT čime je označeno podrijetlo i početni uvjeti rasta (engl. *Human Adult Low Calcium High Temperature*). HaCaT stanice su spontano transformirani humani keranociti koji imaju karakteristike bazalnih epidermalnih keranocita. Unatoč neograničenom potencijalu rasta, HaCaT stanice formiraju uredno strukturirano i diferencirano epidermalno tkivo kada se transplantiraju *in vivo*. Mogu se smatrati besmrtnima (> 140 pasaža), sa specifičnim stabilnim kromosomskim markerima, a nisu tumorogene. Zbog zadržavanja sposobnosti normalne diferencijacije prikladan su model za studije keratinizacije humanih stanica. HaCaT omogućuje karakterizaciju nekoliko procesa, poput istraživanja metaboličkog puta kalcitriola (vitamin D) i njegovog učinka na rast i diferencijaciju keranocita (Lehmann, 1997). Osim toga, Petushkova i sur. (2020) navode njihovu primjenu u određivanju toksičnosti različitih agenasa za kožu te u istraživanju mehanizama kožnih alergijskih reakcija, upalnih ili neoplastičnih procesa, kao i učinaka UV zračenja i reaktivnih kisikovih vrsta. Također, početni su materijal za istraživanje promjena uključenih u malignu transformaciju. Ha-ras-1 transfekcija HaCaT stanične linije omogućuje analizu uloge ovog proto-onkogeni i drugih čimbenika u procesu malignih bolesti ljudskih epitelnih stanica (Boukamp i sur., 1988).

3.1.4. Oprema

- Analitički HPLC uređaj, 1260 Infinity II, Agilent Infinitylab, SAD
- Centrifuga mrc, MRC- Laboratory Equipment & Instruments, Izrael
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Digitalna vaga BAS 31 plus, Boeco, Njemačka
- Genesys 10S UV-Vis spektrofotometar, ThermoFisher Scientific, SAD
- Hladnjak (4 °C), Gorenje, Slovenija
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Neubauer komorica za brojanje stanica
- Ploče s 96-akceptorskih jažica, MerckMilipore, SAD
- Ploče s 96-donatorskih jažica s filterima, MerckMilipore, SAD
- Ploče s jažicama, Corning, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

3.1.5. Računalni programi

- COSMOtherm
- Microsoft Excel

3.2. METODE RADA

3.2.1. Sinteza niskotemperaturnih eutektičkih otapala

U ovom radu je korišteno pet niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Tablica 3) sintetiziranih u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

Tablica 3. Sintetizirani i korišteni DES-ovi

EUTEKTIČKO OTAPALO	KRATICA	MOLARNI OMJER	UDIO VODE
Timol:oktanska kiselina	Ty:C8	1:3	0 %
Timol:dekanska kiselina	Ty:C10	1:1	0 %
Timol:kumarin	Ty:Cou	3:2	0 %
Prolin:jabučna kiselina	Pro:Ma	1:1	50 %
Kolin klorid:urea	ChCl:U	1:2	10 %

Eutektička otapala sintetizirana su tako da su u tikvicu sa okruglim dnom dodane izračunate količine komponenata za sintezu DES-a te odgovarajući volumen vode. Nakon dodatka magneta, tikvica sa smjesom stavljena je na magnetnu miješalicu te su komponente miješane uz zagrijavanje dok ne nastane homogena, bezbojna i prozirna tekućina. Magnet je

izvađen pomoću magnetnog štapića, a dobiveni DES je prebačen u Falcon epruvetu te čuvan na sobnoj temperaturi na tamnijem mjestu.

3.2.2. Procjena topljivosti klotrimazola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima pomoću računalnog programa COSMO $_{therm}$

Teoretski računski modeli olakšavaju procjenu termofizičkih svojstava otopine smanjujući tako vrijeme, sredstva i ukupne troškove prilikom odabira optimalnog otapala (Eckert i Klamt, 2002). S obzirom na veliki broj potencijalnih DES-ova bilo je nužno razviti računalnu metodu koja će reducirati eksperimentalno ispitivanje topljivosti API-DES kombinacija, a COSMO-RS (engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) je jedan od najtočnijih *ab initio* računalnih metoda za rangiranje otapala (Palmelund i sur., 2019). Metoda se temelji na molekulskim kvantno-kemijskim proračunima, koji u kombinaciji sa metodologijom statističke termodinamike daju informacije potrebne za procjenu molekularnih interakcija u tekućinama (Eckert i Klamt, 2002). U modelu, referentno stanje sustava je kemijski potencijal molekule u savršenom električnom vodiču (Franke i Hannebauer, 2011). Kemijski potencijal se izvodi na temelju interakcija između molekula u sustavu (Grensemann i Gmehling, 2005), a intermolekularna interakcija je opisana diskretnim površinskim segmentima uparenih interakcija površinskih naboja (Franke i Hannebauer, 2011). Prema Ferrarini i sur. (2018) te se gustoće naboja obično prikazuju varijablom koja se označava kao sigma-profil (σ -profil), a predstavlja odnos između udjela molekularne površine i odgovarajuće gustoće naboja. Dobivanje σ -profila je najdugotrajniji korak za procjenu svojstava termodinamičke smjese. Metoda je neovisna o eksperimentalnim podacima i općenito je primjenjiva (Eckert i Klamt, 2002).

Uz međudjelovanje površinskih segmenata, COSMO-RS razmatra vodikove interakcije između otopljene molekule i otapala za izračunavanje kemijskog potencijala, što se može koristiti za procjenu topljivosti molekule u otapalu, ali i za druga termodinamička svojstva (Palmelund i sur., 2019) kao što je koeficijent aktivnosti, tlak pare, koeficijent raspodjele, ali i za predviđanje faznih ravnoteža (Grensemann i Gmehling, 2005). COSMO je učinkovita metoda za uključivanje učinaka otapala u kvantno-kemijske proračune, što rezultira dobrim opisom svojstva i energija molekula u raznim otapalima, a omogućuje učinkovit izračun kemijskog potencijala gotovo bilo koje otopljene tvari u gotovo bilo kojem otapalu (Klamt i sur., 1998). U ovom istraživanju, za procjenu topljivosti klotrimazola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima unutar COSMO paketa koristio se COSMO $_{therm}$ računalni program.

Za predviđanje topljivosti molekula u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu u *COSMOtherm* program unosi se .cosmo datoteka klotrimazola te molekule otapala. To se može napraviti opcijom *From database* (molekule koje postoje u bazi podataka) ili *From File* (molekule nacrtane i geometrijski optimirane u programu TmoleX). Zatim se odabere *Activity Coefficient* pod sekcijom *Properties* te definira udio ispitane tvari, udio donora (HBD) i udio akceptora (HBA) vodikove veze. Suma svih udjela mora biti 1, a ako se kao udio odabere 0, izračunava se koeficijent aktivnosti te tvari pri beskonačnom razrjeđenju. Nakon toga odabere se *Add* te *Run Job (local)*. Kao rezultat dobije se logaritam koeficijenta aktivnosti $\ln(\gamma)$, koji govori o topljivosti klotrimazola u DES-u (Slika 5). Što je koeficijent aktivnosti manji, topljivost klotrimazola u odabranom otapalu je bolja.

The screenshot shows the COSMOtherm software interface. At the top, there are tabs for 'Compounds', 'Properties', '.out file', and '.tab file'. Below the tabs, there are icons for file operations and checkboxes for 'Show extended output' (unchecked) and 'Show results sub-tables' (checked). A window titled '(1) CJob_1.tab' is open, displaying a table with the following data:

Nr	Compound	ln(gamma)
1	Clotrimazol	-2.82081658
2	thymol	0.06558315
3	octanoic_acid	0.00405012

Below the table, there is a text area with the following information:

```
Property job 1 : Activity coefficients ln(gamma) ;
Settings job 1 : T= 298.15 K ; x(2)= 0.2500 x(3)= 0.7500 ;
Units job 1 : Concentrations x : mole fraction ;
```

At the bottom of the window, there is a filter button labeled 'Filter' and a text box containing 'ACTIVITY COEFFICIENT No.1 298.15 K'.

Slika 5. Logaritam koeficijenta aktivnosti $\ln(\gamma)$ klotrimazola u DES-u Ty:C8 (1:3)

3.2.3. Eksperimentalna provjera topljivosti klotrimazola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

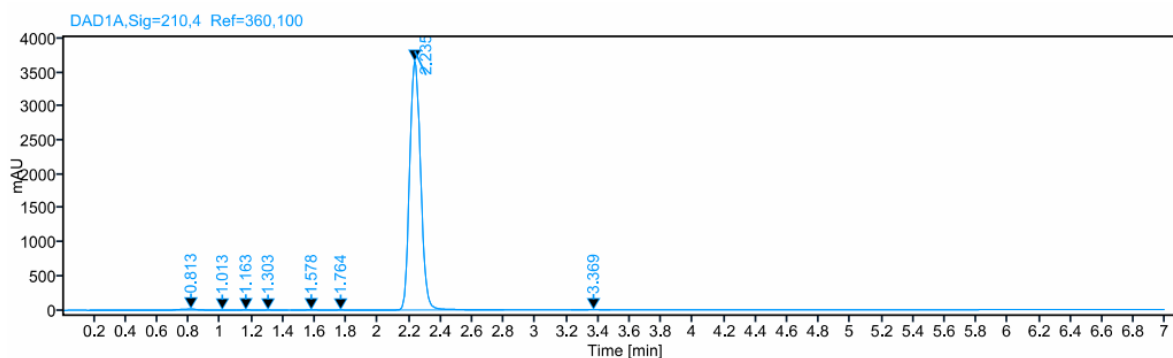
Niskotemperaturna eutektička otapala mogu se koristiti kao otapala za u vodi slabo topljive API-je i kao zamjena za uobičajeno korištena otapala za farmaceutsku namjenu (Palmelund i sur., 2019). Za eksperimentalnu provjeru topljivosti, klotrimazol u prahu otopi se u odabranim DES-ovima (Ty:C8, Ty:C10 i Ty:Cou) tako da se dobije prezasićena otopina. Smjese su miješane u termobloku na 25 °C pri 1400 rpm tijekom 24 sata. Potom je smjesa centrifugirana 5 minuta pri 114 okretaja te je izuzet supernatant koji je potom razrijeđen 200

puta sa 100 %-tnim acetonitrilom. Za izradu baždarnog pravca klotrimazol se otopi u referentnom otapalu (30 % 0,1 M kalij-fosfatni pufer i 70 % 100 %-tni acetonitril). Kvantitativna i kvalitativna analiza klotrimazola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima provedena je upotrebom HPLC-a s UV-Vis detektorom. Identifikacija spoja provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva s vremenom zadržavanja standarda. Kromatogrami klotrimazola određeni su pri 210,4 nm (Slika 6). Na temelju jednadžbe baždarnog pravca izračunata je kvantitativna vrijednost koncentracije klotrimazola.

Kromatografski uvjeti:

- Kolona: AgilentProshell 120 2,1 x 150 mm
- Pokretna faza: A: 0,1 M kalij-fosfatni pufer (pH=7) i B: 100 %-tni acetonitril
- Eluiranje: izokratsko: 30 % otapala A i 70 % B
- Injektirani volumen: 5 μ L
- Temperatura injektiranja: 25 $^{\circ}$ C
- Protok: 0,35 mL min^{-1}
- Temperatura kolone: 25 $^{\circ}$ C
- Vrijeme analize: 7 min
- Detektor: UV/Vis

Data file:	2021-03-24 12-53-24+01-00-04.dx	Operator:	Labos
Instrument:	HPLC1	Injection date:	2021-03-24 12:54:23+01:00
Inj. volume:	5.000	Location:	P1-E4
Acq. method:	clotrimazol_70ACN.amx	Type:	Sample
Processing method:	obrada.pmx	Sample amount:	0.00
Manually modified:	None		



Slika 6. Kromatogram klotrimazola određen pri 210,4 nm u referentnom otapalu (30 % 0,1 M kalij-fosfatni pufer i 70 % 100%-tni acetonitril)

3.2.4. Stabilnost klotrimazola u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu

Stabilnost klotrimazola (KLO) ispitivala se u DES-u koji je pokazao najbolju topljivost, Ty:C8 (1:3) te su dodatno odabrana još dva DES-a: Pro:Ma 1:1 (50 % H₂O) i ChCl:U 1:2 (10 % H₂O). Dodatni DES-ovi nasumično su odabrani kako bi se provjerila stabilnost KLO u hidrofilnim DES-ovima. Osim toga, uz KLO u Pro:Ma i ChCl:U, otopljen je i KLO uz dodatak ciklodekstrina (0,5 % mase DES-a) za koji je poznato da može biti dio formulacije lijeka i pridonjeti stabilnosti API-ja. Nakon pripreme, odnosno vaganja izračunatih masa komponenata, smjese su stavljene u termoblok na 25 °C 24 sata. Nakon navedenog vremena ChCl:U se nije pokazao dobrim otapalom za otapanje klotrimazola, pa je stabilnost praćena 6 dana u Ty:C8, odnosno 14 dana u Pro:Ma, pri sobnoj temperaturi i pri +4 °C. Spektrofotometrijski je određena apsorbancija za KLO u Ty:C8 pri 297 nm, a za KLO Pro:Ma pri 271 nm te za kompleks KLO-CD u Pro:Ma pri 272 nm. Rezultat je prikazan kao graf ovisnosti omjera A/A₀ (izmjerene apsorbancije određeni dan i apsorbancije na početku mjerenja) o vremenu (dan).

3.2.5. Ispitivanje citotoksičnosti klotrimazola na HaCaT staničnoj liniji

HaCaT stanice čuvane su na -70 °C u mediju za smrzavanje. Ampula sa stanicama (1 mL) koje su bile zamrznute, odmrznu se naglim uranjanjem u vodenu kupelj na 30 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant se ukloni pipetom, a talog stanica se resuspendira u mediju za uzgoj koji sadrži 10 % FBS. Stanice se zatim prebace u Petrijevu zdjelicu, u inkubator s reguliranom atmosferom (95 % zraka i 5 % CO₂) i temperaturom (37 °C) uz redovito pasažiranje stanica koje su postigle konfluentnost ili su potrošile hranjive tvari u mediju za uzgoj stanica pa ih je zato potrebno precijepiti.

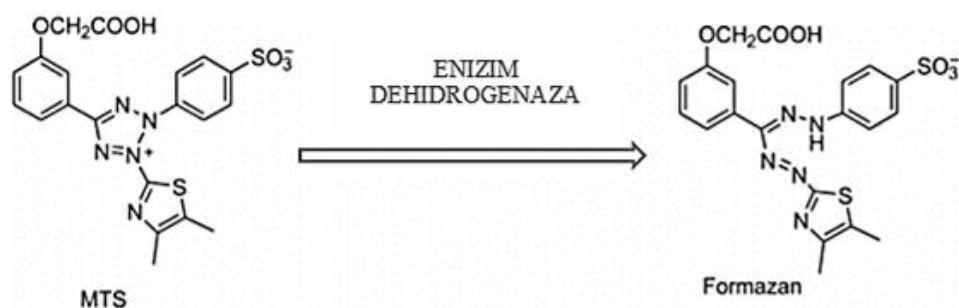
Prije početka rada, Petrijeva zdjelica sa stanicama izvadi se iz inkubatora i pogleda da li je došlo do promjene boje medija, jer promjena boje može ukazati na prerastanja stanica i potrošnju medija, ali i na moguću neželjenu kontaminaciju kulture stanica. Također, pod mikroskopom se provjeri morfologija stanica te se započinje s postupkom tripsiniziranja adherentnih stanica, a potom i određivanja njihovog broja. Postupak se provodi u laminaru koji osigurava aseptične uvjete rada. Postupak započinje uklanjanjem hranjivog medija te dodatkom 1 mL PBS-a za ispiranje, kojeg odmah uklonimo. Zatim se dodaje 1 mL tripsina koji je zagrijan i resuspendiran zbog homogenosti. Petrijeva zdjelica se vrati u inkubator na 10-tak minuta. Djelovanjem tripsina stanice se zaokruže i odvoje od površine što se provjeri pomoću mikroskopa. Zatim se dodaje 1 mL medija te resuspendirane stanice koristimo za određivanje broja stanica. Alikvot suspenzije stanica (20 µL) pomiješa se sa bojom tripan plavo (20 µL) te 20 µL nanese na Neubauer komoru za brojanje koja se sastoji od 4 velika kvadrata, a svaki

veliki kvadrat sadrži 16 manjih kvadrata. Ukupan broj stanica po mililitru izračuna se pomoću formule:

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

Stanice se zatim nacjepljuju u ploču sa 96 jažica, u početnoj koncentraciji 3×10^4 stanica po mL i volumenu od 100 μL , s tim da se rubne jažice ne nacjepljuju. Ploču vratimo u inkubator na 24 sata kako bi se stanice prihvale za podlogu te počele rasti i dijeliti. Nakon 24 h stanice tretiramo DES-om (Ty:C8) i formulacijom (KLO u Ty:C8) pri različitim koncentracijama (0,01-10 mg mL^{-1}), a za svaku koncentraciju su postavljene četiri paralele. Ploču vratimo u inkubator te nakon 72 sata odredimo učinak otapala i formulacije na stanice primjenom MTS metode.

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi za procjenu stanične proliferacije, vijabilnosti i citotoksičnosti. Reagens se sastoji od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] i PES (fenazin etosulfat), a metoda se temelji na redukciji MTS u stanicama čime se dobiva obojen produkt, formazan, koji je topljiv u mediju. Redukciju provode enzimi dehidrogenaze ovisne o NAD(P)H u metabolički aktivnim stanicama. Enzimska redukcija MTS-a u formazan prikazana je na Slici 7.



Slika 7. Enzimska redukcija MTS u formazan (Kuate i sur., 2017)

Nakon 72 sata iz jažica se ukloni medij s ispitivanom tvari, doda PBS i odmah ukloni te se doda 100 μL svježeg medija s otopinom MTS (10% v/v). Ploča se vrati u inkubator 3-4 sata. Intenzitet boje odredi se spektrofotometrijski pomoću čitača ploča pri valnoj duljini od 492 nm, a apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica. Preživljenje stanica (%) izračuna se kao omjer apsorbancije tretiranih stanica i kontrole:

$$\text{Preživljenje stanica} = \frac{\text{srednja vrijednost apsorbancije tretiranih stanica}}{\text{srednja vrijednost kontrole}} \times 100 \quad [2]$$

Srednja vrijednost i standardna devijacija izračunata je pomoću naredba Excel programa (AVARAGE, odnosno STDEV). AVARAGE vraća prosjek (aritmetičku sredinu) argumenta, a STDEV procjenjuje standardnu devijaciju na temelju uzorka.

3.2.6. Određivanje permeabilnosti

Podaci kažu da se 80-95 % lijekova apsorbira prvenstveno pasivnom difuzijom, stoga je bilo potrebno razviti brzi i jeftini test permeabilnosti koji će rezultirati podacima o učinkovitosti pasivne difuzije ispitivane tvari kroz različite membrane (Kerns i sur., 2004). Pasivna difuzija je fizikalno-kemijski proces i na njega utječu osnovna fizikalno-kemijska svojstva kao što su lipofilnost, vodikove veze, molekulska masa, pKa, rotacijske veze te strukturne značajke molekule. Poznavajući permeabilnost molekule pasivnom difuzijom, moguće je učiniti strukturne modifikacije molekule za optimizaciju permeabilnosti (Schmidt i Lynch, 2003).

Za potrebe određivanja permeabilnosti pasivnom difuzijom razvijen je test propusnosti umjetne membrane poznat kao PAMPA (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). PAMPA je metoda kojom se brzo i učinkovito može odrediti permeabilnost spoja kroz membranu pasivnom difuzijom (Kerns i sur., 2004).

3.2.6.1. PAMPA test

PAMPA je prvenstveno razvijena za predviđanje pasivne permeabilnosti kroz gastrointestinalni trakt, no prilagođena je i drugim sustavima kao što je krv-mozak barijera i koža (Bennion i sur., 2017). Prema Balimane i sur. (2000) PAMPA se odlikuje brzim provođenjem analize, niskom cijenom te mogućnošću ispitivanja permeabilnosti velikog broja spojeva, a instrumenti za provođenje analize komercijalno su dostupni. Također, ova tehnika je manje zahtjevna od kultura stanica ili *in vivo* metoda, no ograničenje je nemogućnost razumijevanja prolaska spojeva aktivnim transportom ili hidrofilnih spojeva male molekulske mase.

Novi spojevi koji su dizajnirani i sintetizirani sa ciljem optimizacije aktivnosti, selektivnosti ili fizikalno-kemijskih svojstava, mogu se analizirati PAMPA testom kako bi se procijenio utjecaj optimizacije na permeabilnost molekule pasivnom difuzijom. Osim upotrebe za predviđanje *in vivo* apsorpcije tijekom otkrivanja i razvoja novog lijeka, PAMPA je korisna za testove aktivnosti na bazi stanica te testove permeabilnosti spojeva kroz razne tkivne barijere (Kerns i sur., 2004). PAMPA metoda također se može koristiti za određivanje učinka pH na permeabilnost spoja podešavanjem pH otopina korištenih u analizi (Schmidt i Lynch, 2003). PAMPA pruža uvid u mehanizam pasivne difuzije, no ne obuhvaća učinak prisutnosti

metaboličkih i transportnih proteina (Kerns i sur., 2004). Predstavlja alternativu za probir kemijskih spojeva, gdje se membrana sisavaca oponaša sustavima lipidnih membrana poduprtih filterom (Nožinić i sur., 2010). Schmidt i Lynch (2003) utvrdili su kako male varijacije u protokolu provođenja PAMPA testa ne utječu na permeabilnost, no razlike u sadržaju lipida karakterističnih za određeni tip membrane mogu dati različite rezultate za neke spojeve, što omogućuje upotrebu PAMPA metode za mjerenje permeabilnosti putem lipidnih formulacija koje oponašaju različite tipove membrana. Za ciljanu barijeru važno je odabrati odgovarajuću smjesu i koncentraciju lipida kako bi se što točnije odredila permeabilnost i korelacija s podacima o apsorpciji kod ljudi.

U PAMPA testu se koriste dvije jažice odvojene umjetnom membranom koja se sastoji od lipida u organskom otapalu nanešenih na poroznu matricu filter ploče. U eksperimentu, ispitivani spoj se razrijedi u puferu i stavi u donorsku jažicu te pasivnom difuzijom prolazi umjetnu membranu i ulazi u akceptorsku jažicu (Kerns i sur., 2004) kao što je prikazano na Slici 8. Mjeri se opseg permeabilnost kroz membranu i uspoređuje s poznatim opsegom apsorpcije lijeka kod ljudi, što je pokazalo dobru korelaciju između protoka tvari kroz PAMPA sustav i apsorpcije velikog broja dobro karakteriziranih lijekova *in vivo* kod ljudi (Balimane i sur., 2000). Schmidt i Lynch (2003) navode kako u obzir treba uzeti i vrijeme provođenja eksperimenta. Rezultati za visoko i srednje permeabilne spojeve pokazuju kako se permeabilnost nije puno razlikovala unutar 4-48 sati, dok je tijekom vremena uočena značajna razlika kod spojeva s niskom permeabilnosti.



Slika 8. Sustav donorske i akceptorske jažice prije i nakon inkubacije (Schmidt i Lynch, 2003)

Eksperiment je proveden prema protokolima iz znanstvene literature, na ploči s 96 jažica. Procjenjuje se sposobnost spojeva da difundiraju iz donorske jažice, kroz PVDF (poliviniliden fluorid) membranski filter prethodno tretiran organskim otapalom koji sadrži lipide, u odgovarajuću akceptorsku jažicu (Schmidt i Lynch, 2003). Postupak započinje pripremom umjetne membrane pomoću 1 % otopine lecitina u dodekanu. Kako bi se osiguralo potpuno otapanje moguće je provesti sonifikaciju otopine. Schmidt i Lynch (2003) navode kako ovako pripremljena lipidna umjetna membrana (lecitin/dodekan) nije prikladna za precizno određivanje permeabilnosti svih klasa lijekova. Nakon pripreme membrane, pažljivo pipetiramo 5 μ L smjese lecitin/dodekan u svaku donorsku jažicu pazeći pri tom da s vrhom pipete ne dodirujemo filter. Membranu ostavimo da se suši tijekom 24 sata. Pripremimo otopine tvari koju želimo ispitati: formulacija (5 mg klotrimazola u 1 mL Ty:C8), formulacija razrijeđena 50 % sa 10 %-tnim DMSO, klotrimazol (5 mg u 1 mL 100 %-tnog DMSO) i DES (Ty:C8). Nakon sušenja umjetne membrane, u svaku akceptorsku jažicu dodaje se 300 μ L pufera (5 % DMSO u PBS-u), osim u akceptorske jažice gdje će se pratiti permeabilnost razrijeđene formulacije gdje se nanosi 300 μ L pufera (5 % DES u PBS-u). U donorske jažice se potom nanosi 150 μ L pripremljenih otopina. Donorska ploča se stavlja na akceptorsku tako da je dno membrane u kontaktu sa puferom u akceptorskoj jažici. Sustav poklopimo odgovarajućim poklopcem, ploču zatvorimo parafilmom i ostavimo na sobnoj temperaturi 24 sata. Studije permeabilnosti rađene su u tri paralele. Nakon 24 sata, izuzimaju se otopine iz akceptorske jažice i odredi se njihov volumen te se analiziraju pomoću HPLC-a i spektrofotometra. Kromatografski uvjeti opisani su u poglavlju Eksperimentalna provjera topljivosti klotrimazola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, no korištena je kolona AgilentProshell 120 4,6 x 150 mm. Rezultat je prikazan kao postotak API-ja u akceptorskoj jažici, prema sljedećoj jednadžbi, gdje je c_1 koncentracija API u donorskoj jažici na početku mjerenja, a c_2 koncentracija API u akceptorskoj jažici nakon 24 sata od nanošenja uzoraka:

$$\% \text{ API u akceptorskoj jažici} = \frac{c_2}{c_1} * 100 \quad [3]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Farmaceutska industrija zahtijeva upotrebu otapala, najčešće organskih, koja se koriste za procese sinteze, pročišćavanja, kristalizacije i formulacije aktivnih farmaceutskih sastojaka. Nadalje, otapala imaju ulogu u dizajniranju sustava kontrolirane isporuke lijeka, na primjer za transdermalnu isporuku lijekova slabo topljivih u vodi. Međutim, organska otapala su hlapljiva, zapaljiva i toksična (Emami i Shayanfar, 2020), pa se intenzivno istražuje mogućnost primjene alternativnih otapala koja će biti u skladu sa principima Zelene kemije.

Niskotemperaturna eutektička otapala pokazala su se kao dobra zamjena konvencionalnih otapala, prvenstveno zbog niske temperature tališta smjese, niske hlapljivosti i nezapaljivosti te biorazgradivosti. Jednostavnom pripremom DES-a iz prirodnih ili biorazgradivih materijala dobiva se prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo (NADES) koje se, zbog komponenata koje ga čine, smatra netoksičnim i bezopasnim za okoliš. DES i NADES su pokazali moguću primjenu kao otapala za API-je i rješavanje problema polimorfizama, slabe topljivosti, kemijske stabilnosti i permeabilnosti što vodi povećanju biodostupnosti i terapijske učinkovitosti lijeka. API se može prevesti u tekući oblik tako da postane dio DES-a, čime se dobiva terapijsko niskotemperaturno eutektičko otapalo, a ugradnja API-DES sustava u (bio)polimere može poslužiti za dizajn kontroliranih sustava isporuke lijeka. Navedene karakteristike u proteklih 5 godina potakle su izniman interes za istraživanjem ovih otapala u farmaceutskom i biomedicinskom području.

Klotrimazol je aktivni farmaceutski sastojak lijekova koji pokazuje širok raspon antimikotičnog učinka, no istražuje se i za liječenje drugih bolesti. Prvenstveno se koristi u lijekovima za topikalnu primjenu, a karakterizira ga niska topljivost i dobra permeabilnost, iz čega proizlazi i njegova niska biodostupnost. Iz tog razloga, cilj ovoga rada bio je ispitati mogućnost primjene niskotemperaturnih eutektičkih otapala u razvoju formulacije lijeka s klotrimazolom kao aktivnim farmaceutskim sastojkom. S obzirom na velik broj potencijalnih DES-ova, za predviđanje topljivosti klotrimazola koristio se računalni program COSMO_{therm}. Najbolja topljivost API-ja predviđena je u hidrofobnim DES-ovima te su na temelju *in silico* analize tri DES-a odabrana za eksperimentalnu provjeru topljivosti primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Na temelju rezultata topljivosti, odabrana je formulacija u kojoj je spektrofotometrijski praćena stabilnost klotrimazola tijekom vremena, na dvije različite temperature, te su dodatno odabrana dva DES-a za praćenje stabilnosti klotrimazola u hidrofilnim DES-ovima, a osim toga, ispitana je mogućnost poboljšanja stabilnosti stvaranjem inkluzijskog kompleksa klotrimazola sa ciklodekstrinom. Citotoksični učinak

niskotemperaturnog eutektičkog otapala i odabrane formulacije ispitan je na HaCaT staničnoj liniji, a provedbom PAMPA testa određena je njena permeabilnost.

4.1. PROCIJENJENA TOPLJIVOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA POMOĆU RAČUNALNOG PROGRAMA COSMOtherm

Pomoću računalnog programa COSMOtherm predviđena je topljivost klotrimazola u različitim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Procjena topljivosti napravljena je za DES-ove s različitim udjelima vode (0 %, 10 %, 20 %, 30 % i 50 %). U Tablici 4 prikazani su molarni omjeri komponenti DES-a s udjelom vode 0 %, a izračunate $\ln(\gamma)$ vrijednosti prikazane su na Slici 9. Što je logaritam koeficijenta aktivnosti manji, to je topljivost klotrimazola u otapalu veća. Najbolja topljivost klotrimazola predviđena je u hidrofobnim DES-ovima, od kojih su tri odabrana za sintezu u svrhu eksperimentalnog određivanja topljivosti:

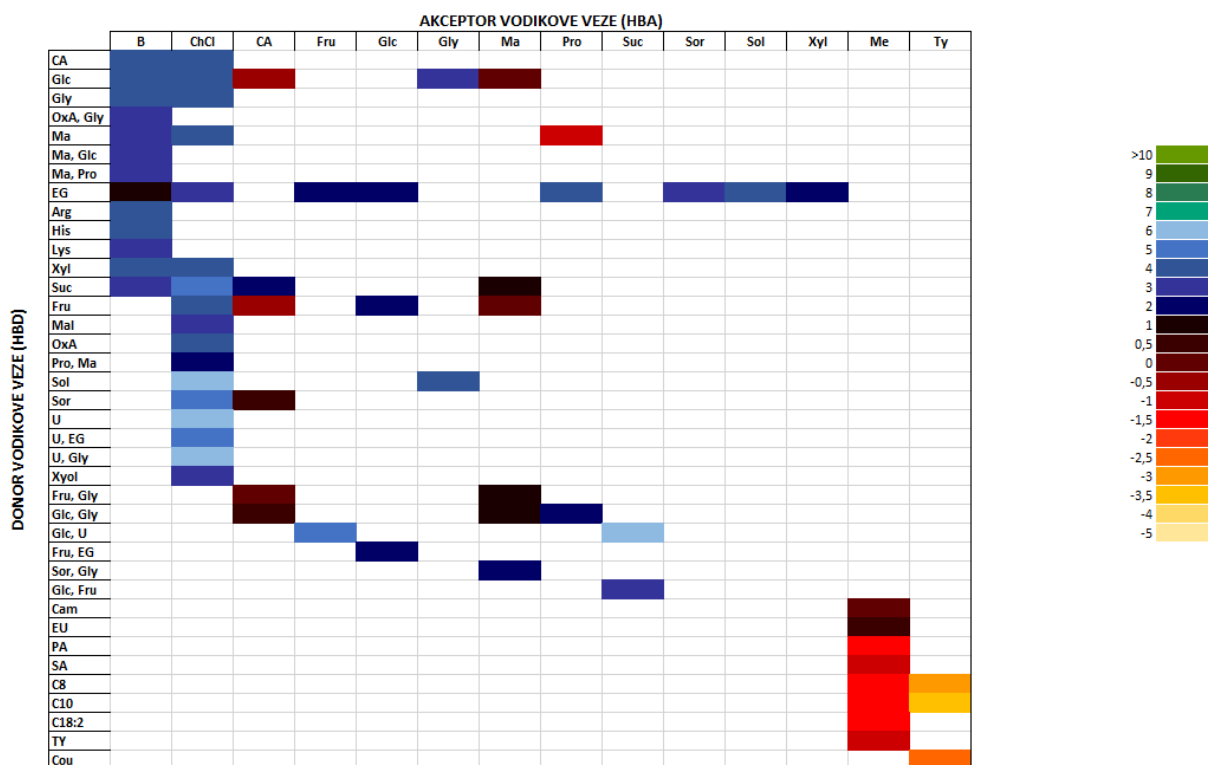
- Timol:oktanska kiselina (Ty:C8) 1:3
- Timol:dekanska kiselina (Ty:C10) 1:1
- Timol:kumarin (Ty:Cou) 3:2

Tablica 4. Molarni omjeri komponenti DES-a s udjelom vode 0 % u kojima je predviđena topljivost klotrimazola pomoću računalnog programa COSMOtherm

DES	MOLARNI OMJER	DES	MOLARNI OMJER	DES	MOLARNI OMJER
B:CA	1:1	ChCl:CA	2:1	CA:Fru	1:1
B:Glc	1:1	ChCl:EG	1:2	CA:Fru:Gly	1:1:1
B:Gly	1:2	ChCl:Fru	1:1	CA:Glc	1:1
B:OxA:Gly	1:2:1	ChCl:Glc	2:1	CA:Glc:Gly	1:1:1
B:Ma	1:1	ChCl:Gly	1:2	CA:Sor	2:3
B:Ma:Glc	1:1:1	ChCl:Ma	1:1	CA:Suc	1:1
B:Ma:Pro	1:1:1	ChCl:Mal	4:1	Fru:EG	1:2
B:EG	1:1	ChCl:OxA	1:1	Fru:Glc:U	1:1:2

B:Arg	1:1	ChCl:Pro:Ma	1:1:1	Glc:EG	1:2
B:His	1:1	ChCl:Suc	2:1	Glc:Fru	1:1
B:Lys	1:1	ChCl:Sol	1:1	Glc:Fru:EG	1:1:2
B:Xyl	1:1	ChCl:Sor	1:1	Gly:Glc	2:1
B:Suc	4:1	ChCl:U	1:2	Gly:Sol	2:1
Ma:Fru	1:1	ChCl:U:EG	1:2:2	Me:Cam	1:1
Ma:Fru:Gly	1:1:1	ChCl:U:Gly	1:2:2	Me:EU	1:1
Ma:Glc	1:1	ChCl:Xyl	2:1	Me:PA	1:1
Ma:Glc:Gly	1:1:1	ChCl:Xyol	5:2	Me:SA	4:1
Ma:Sor:Gly	1:1:2	Pro:Glc:Gly	1:1:1	Me:C8	1:1
Ma:Suc	2:1	Pro:Ma	1:1	Me:C10	1:1
Ty:C8	1:3	Suc:EG	1:2	Me:C18:2	1:1
Ty:C10	1:1	Suc:Glc:Fru	1:1:1	Me:Ty	3:2
Ty:Cou	3:2	Suc:Glc:U	1:1:2	Xyl:EG	1:2
Sor:EG	1:2	Sol:EG	1:2		

* B-betain; ChCl-kolin-klorid; CA-limunska kiselina; Fru-fruktoza; Glc-glukoza; Gly-glicerol; Ma-jabučna kiselina; Pro-prolin; Suc-saharoza; Sor-sorboza; Sol-sorbitol; Xyl-ksiloza; Me-L-mentol; Ty-timol; OxA-oksalna kiselina; EG- etilen-glikol; Arg-arginin; His-histidin; Lys-lizin; Mal-maltoza; U-urea; Cam-kamfor; EU-eukalptol; PA-perililna kiselina; SA-salicilna kiselina; C8-oktanska kiselina; C10-dekanska kiselina; C18:2-linolna kiselina; Cou-kumarin



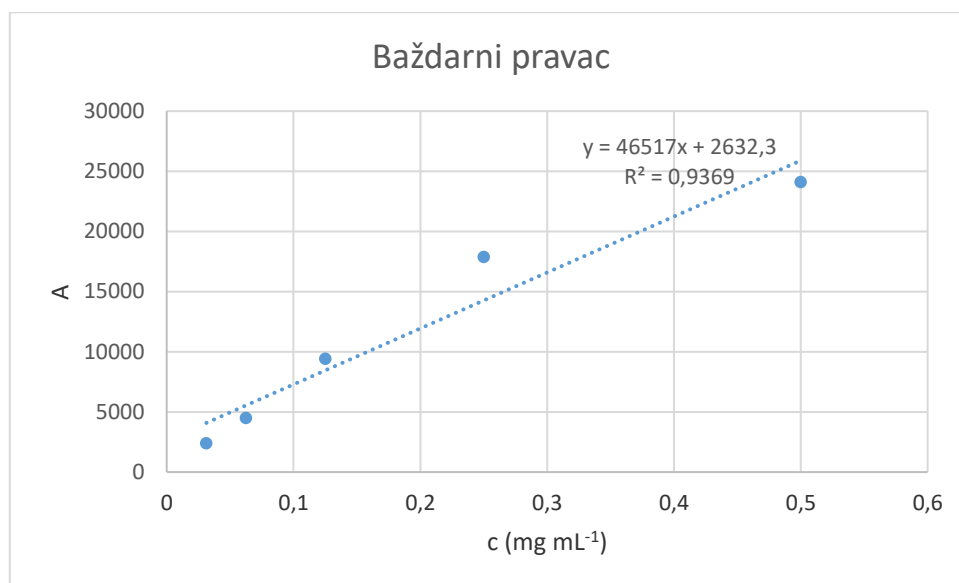
Slika 9. Vrijednosti $\ln(\gamma)$ klotrimazola u različitim DES-ovima sa udjelom vode 0 % predviđene programom COSMOtherm

Najbolja topljivost klotrimazola primjenom računalnog programa COSMOtherm predviđena je u hidrofobnim otapalima. Većina dosadašnjih studija ispitivanja niskotemperaturnih eutektičkih otapala kao alternativnih otapala u poboljšanju svojstva API-ja opisuje primjenu hidrofilnih DES-ova. Koncept hidrofobnog DES-a uveli su van Osch i sur. (2015) kada su kombinirali dekansku kiselinu kao donora vodikove veze s različitim kvarternim amonijevevim solima kao akceptorima vodikove veze. Najčešći donori vodikove veze su kiseline dugog lanca (npr. oktanska ili dekanska kiselina) i terpeni poput timola i mentola, a akceptori vodikove veze su dugolančane tetraalkil-amonijeve soli i terpeni (timol može biti i donor i akceptor vodikove veze) (Warrag i Kroon, 2019). Od tada, sve je više studija usmjereno na istraživanje moguće primjene hidrofobnih DES-ova u razvoju poboljšanih formulacija lijekova, kao i u drugim područjima industrije.

4.2. TOPLJIVOST KLOTTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Za eksperimentalno određivanje topljivosti, na temelju predviđanja pomoću računalnog programa COSMOtherm, odabrana su tri DES-a: Ty:C8 (1:3), Ty:C10 (1:1) te Ty:CoU (3:2). Kvalitativna i kvantitativna analiza klotrimazola otopljenog u odabranim otapalima provedena

je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Baždarni pravac (Slika 10) napravljen je na temelju rezultata HPLC analize klotrimazola otopljenog u referentnom otapalu (30 % 0,1 M kalij-fosfatni pufer i 70 % 100 %-tni acetonitril). Baždarni pravac prikazan je kao ovisnost površine pikova (A) i poznatih koncentracija (c) s odgovarajućom jednačicom.



Slika 10. Baždarni pravac klotrimazola

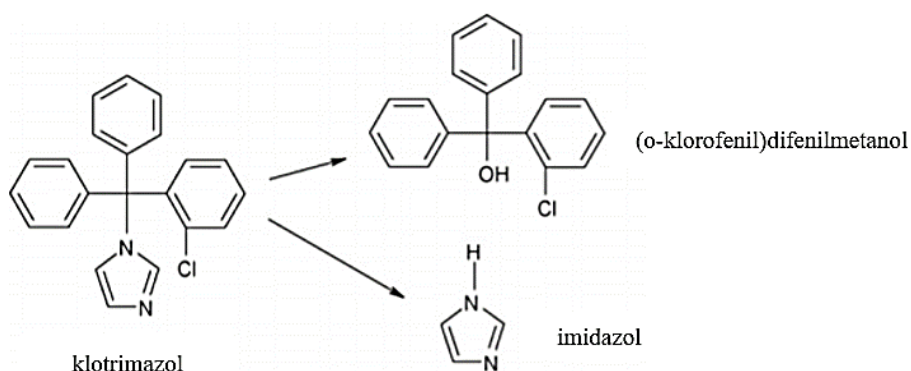
Iz jednačice pravca izračunata je topljivost klotrimazola u DES-ovima. U Tablici 5 navedeni su rezultati. Iako je COSMO program previdio najbolju topljivost klotrimazola u DES-u Ty:C10, a zatim Ty:C8 te Ty:Cou, eksperimentalno određivanje topljivosti ukazuje da je najbolji DES za otapanje klotrimazola Ty:C8 (1:3). Otapanjem 151,62 mg klotrimazola u 1 mL niskotemperaturnog eutektičkog otapala Ty:C8, rezultat je eksperimentalno potvrđen. Svi odabrani DES-ovi pokazali su značajno bolju topljivost klotrimazola, u usporedbi sa njegovom topljivosti u vodi ($4,9 \times 10^{-4}$ mg mL⁻¹) (Bolla i sur., 2019). Upravo je ovaj rezultat, uz druge navedene studije ispitivanja DES-a kao otapala za poboljšanje topljivosti molekula slabo topljivih u vodi, potvrdio njegovu moguću primjenu u ovom području istraživanja. Također, važno je napomenuti kako je COSMO na temelju predviđanja omogućio odabir najboljih DES-ova za otapanje klotrimazola, čime je značajno smanjen utrošak kemikalija i vrijeme eksperimentalnog rada koje bi bilo potrebno za izbor najboljeg otapala.

Tablica 5. Topljivost klotrimazola u odabranim DES-ovima

EUTEKTIČKO OTAPALO	TOPLJIVOST (mg mL ⁻¹)
Ty:C8 (1:3)	151,62
Ty:C10 (1:1)	91,51
Ty:CoU (3:2)	120,72

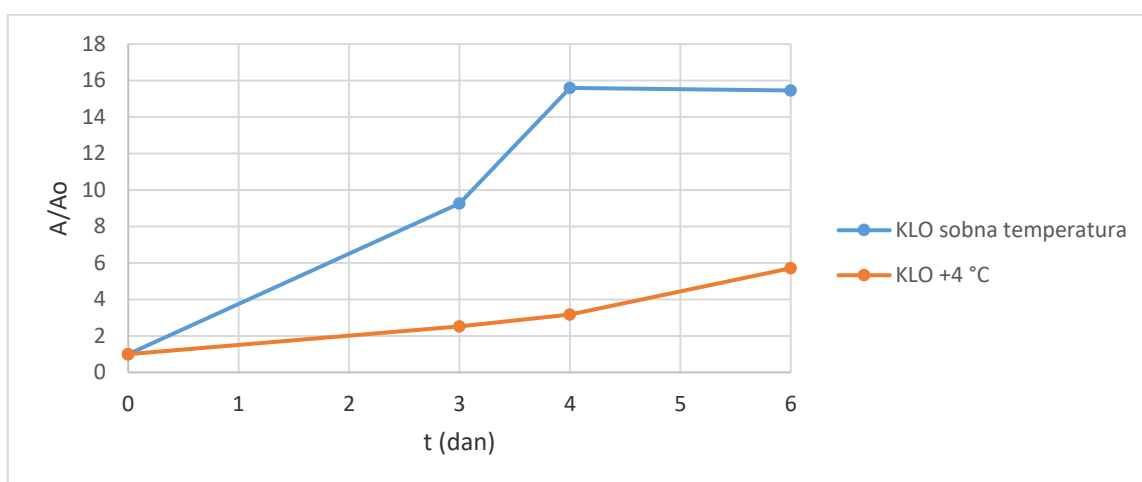
4.3. STABILNOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Svrha provođenja testova stabilnosti lijekova je pružanje dokaza kvalitete API-ja tijekom vremena pod utjecajem raznih okolišnih čimbenika kao što su temperatura, vlaga i svjetlost (WHO, 2009). World Health Organization (2009) propisao je osnovne smjernice podataka o stabilnosti potrebnih za registraciju API-ja. Mnogi API-ji nisu stabilni u vodenim otopinama, na primjer farmaceutici koji sadrže ester hidroliziraju tijekom dužeg vremena skladištenja, no pokazalo se kako DES-ovi mogu poboljšati kemijsku stabilnost API-ja (Pedro i sur., 2019). Povećana stabilnost aspirina (Lu i sur., 2016) i β-laktamskih antibiotika (Olivares i sur., 2018) u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima potvrđuju ovu tvrdnju. Što se tiče klotrimazola, prema Hoogerheide i Wyka (1982), u normalnim uvjetima skladištenja je stabilan, odnosno na njega ne utječe toplina (do 70 °C) niti izloženost svjetlu tijekom dva tjedna, no kada je u otopini, stabilnost klotrimazola ovisi o pH. U alkalnom mediju je stabilan, a u kiselom mediju hidrolizira. Razgradni produkti klotrimazola imidazol i (o-klorofenil)difenilmetanol (Hájková i sur., 2007) prikazani su na Slici 11.

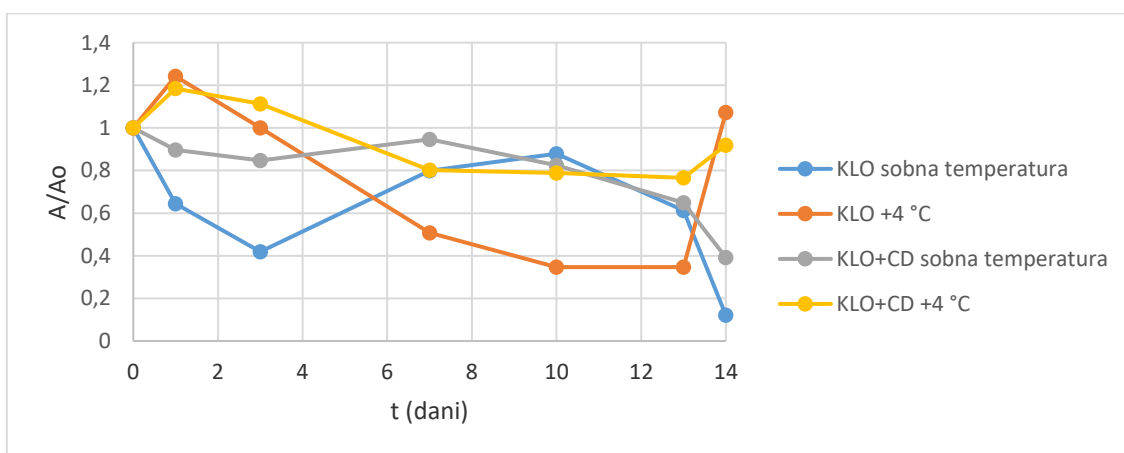


Slika 11. Razgradni produkti klotrimazola, imidazol i (o-klorofenil)difenilmetanol (Hájková i sur., 2007)

Stabilnost klotrimazola u ovom radu praćena je spektrofotometrijski, u DES-u koji je pokazao najbolju topljivost Ty:C8 (1:3). Također, za test stabilnosti odabrana su još dva niskotemperaturna eutektićka otapala, Pro:Ma (1:1) sa udjelom vode 50 % i ChCl:U (1:2) sa udjelom vode 10 % kako bi se ispitala stabilnost KLO u hidrofilnim DES-ovima. Međutim, nakon 24 sata u termobloku, KLO u ChCl:U se nije potpuno otopio pa nije odabran za daljnju analizu. Dakle, stabilnost KLO je praćena u otopinama Ty:C8 i Pro:Ma koje su čuvane na sobnoj temperaturi i na +4 °C kroz 6, odnosno 14 dana. U određenim vremenima izuzimani su alikvoti te se pratila stabilnost klotrimazola mjerenjem apsorbancije, a rezultati su prikazani kao ovisnost apsorbancije (A/A₀) o vremenu (t). Grafički prikaz stabilnosti klotrimazola, pri sobnoj temperaturi i +4 °C, tijekom vremena u Ty:C8 prikazan je na Slici 12, odnosno u Pro:Ma (1:1) sa 50 % vode i Pro:Ma (1:1) sa 50 % vode uz dodatak CD na Slici 13.



Slika 12. Grafički prikaz stabilnosti klotrimazola u Ty:C8 (1:3), pri sobnoj temperaturi i +4 °C, tijekom vremena

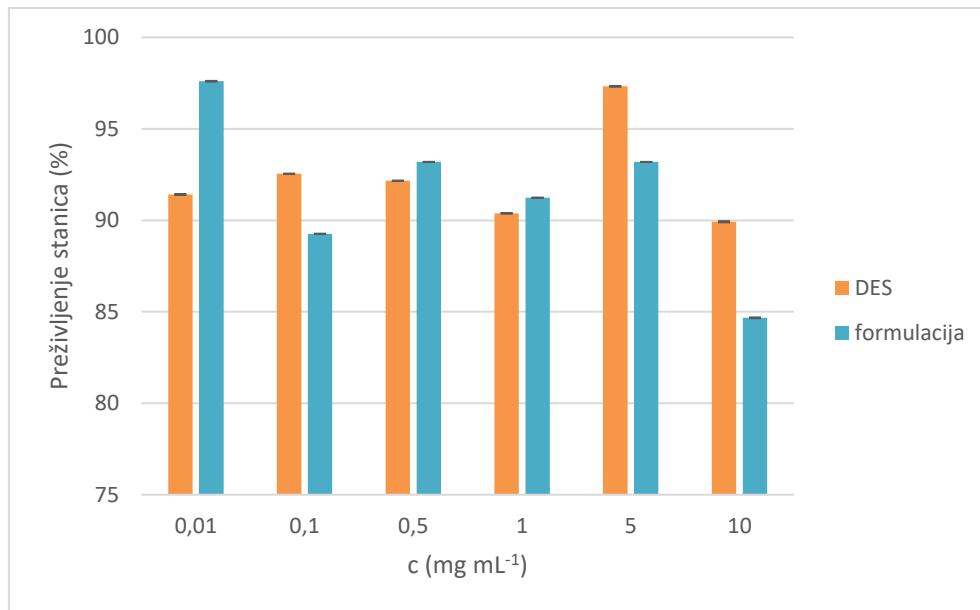


Slika 13. Grafički prikaz stabilnosti klotrimazola u Pro:Ma (1:1) sa 50 % vode i Pro:Ma (1:1) sa 50 % vode uz dodatak ciklodekstrina, pri sobnoj temperaturi i +4 °C, tijekom vremena

Stabilnost klotrimazola u Ty:C8, pri obje temperature, pokazuje da izmjerene apsorbancije (A) rastu tijekom vremena. To se može objasniti raspadom klotrimazola tijekom vremena, odnosno porastom koncentracije razgradnih produkata klotrimazola koji apsorbiraju pri sličnim valnim duljinama. Klotrimazol je nestabilniji pri sobnoj temperaturi u odnosu na +4 °C. Stoga se može zaključiti da klotrimazol u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Ty:C8, nije stabilan. Stabilnost klotrimazola pokušala se poboljšati stvaranjem kompleksa sa ciklodekstinom u DES-u Pro:Ma. Apsorbancije su mjerene za KLO u Pro:Ma i KLO-CD u Pro:Ma tijekom vremena, na sobnoj temperaturi i +4 °C. Uočeno je kako klotrimazol, čak ni uz dodatak ciklodekstrina, nije stabilan u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Pro:Ma tijekom 14 dana. Vrijeme praćenja stabilnosti u odabranim DES-ovim se razlikuje, 6 odnosno 14 dana, no treba napomenuti da je vrijeme praćenja odabrano proizvoljno s obzirom da klotrimazol nije bio stabilan, nego se već nakon 24 sata počeo degradirati na razgradne produkte u oba ispitana DES-a, čak i sa dodatkom CD. To što je praćenje stabilnosti u DES-u Pro:Ma trajalo duže, ne znači da je taj DES bolji od Ty:C8 za stabilnost klotrimazola. Ovi rezultati ukazuju kako klotrimazol nije stabilan u odabranim DES-ovima, što onemogućuje njihovu primjenu za razvoj poboljšane formulacije lijeka s klotrimazolom, unatoč postignutoj boljoj topljivosti u odabranim DES-ovima. No, budući da je iz literature poznato da DES može poboljšati karakteristike API-ja, pa tako i njegovu stabilnost, trebalo bi ispitati i druge DES-ove koje će uz topljivost, omogućiti i bolju stabilnost API-ja tijekom vremena.

4.4. CITOTOKSIČNOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Klotrimazol je antimikotik koji se najčešće koristi kao API u lijekovima za topikalnu primjenu, pa je ispitivanje biološke aktivnosti klotrimazola provedeno na HaCaT staničnoj liniji, odnosno stanicama keratinocita. Stanice su tretirane formulacijom (KLO u Ty:C8) i niskotemperaturnim eutektičkim otapalom (Ty:C8) u rasponu koncentracija od 0,01 do 10 mg mL⁻¹, a preživljenje stanica određeno je kolorimetrijskom MTS metodom. Utjecaj formulacije i DES-a na preživljenje stanica (%) prikazan je na Slici 14.



Slika 14. Utjecaj DES-a (Ty:C8) i formulacije (KLO u Ty:C8) na preživljenje HaCaT stanica

Niskotemperaturno eutektičko otapalo Ty:C8 pokazalo je najveći inhibitorni učinak na rast HaCaT stanica pri najvećoj ispitanoj koncentraciji 10 mg mL⁻¹. Preživljenje HaCaT stanica pri toj koncentraciji DES-a iznosilo je 89,92 %. Također, pri koncentraciji 10 mg mL⁻¹, formulacija KLO u Ty:C8 pokazala je najveći inhibitorni učinak na stanice, sa preživljenjem od 84,67 %. Iako su i DES i formulacija pokazali najveću inhibiciju rasta HaCaT stanica pri najvećoj ispitanoj koncentraciji (10 mg mL⁻¹), oni nisu izazvali inhibiciju veću od 50 % stoga nije izračunata IC₅₀ vrijednost, odnosno ona koncentracija ispitivane tvari pri kojoj je preživljenje stanica 50 %. Na temelju rezultata može se zaključiti da je inhibitorni učinak na stanice ovisan o koncentraciji odabranog DES-a Ty:C8 i formulacije klotrimazola otopljenog u tom DES-u, no općenito sve ispitane koncentracije pokazuju nisku citotoksičnost prema HaCaT stanicama.

4.5. PERMEABILNOST KLOTRIMAZOLA U NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Većina lijekova, kako bi došla do ciljanog mjesta djelovanja, mora proći kroz barem jednu staničnu membranu. Kod eukariota postoje dva glavna modela transporta molekula kroz membrane: aktivan i pasivan transport (Bennion i sur., 2017). Razvoj genomike i kombinatorne kemije, zajedno s tehnološkim inovacijama omogućio je sintezu velikog broja potencijalnih lijekova, no glavni izazov za razvoj tih potencijalnih lijekova postalo je određivanje biološke aktivnosti te biofarmaceutskih svojstva lijekova kao što su topljivost, stabilnost i permeabilnost (Balimane i sur., 2000).

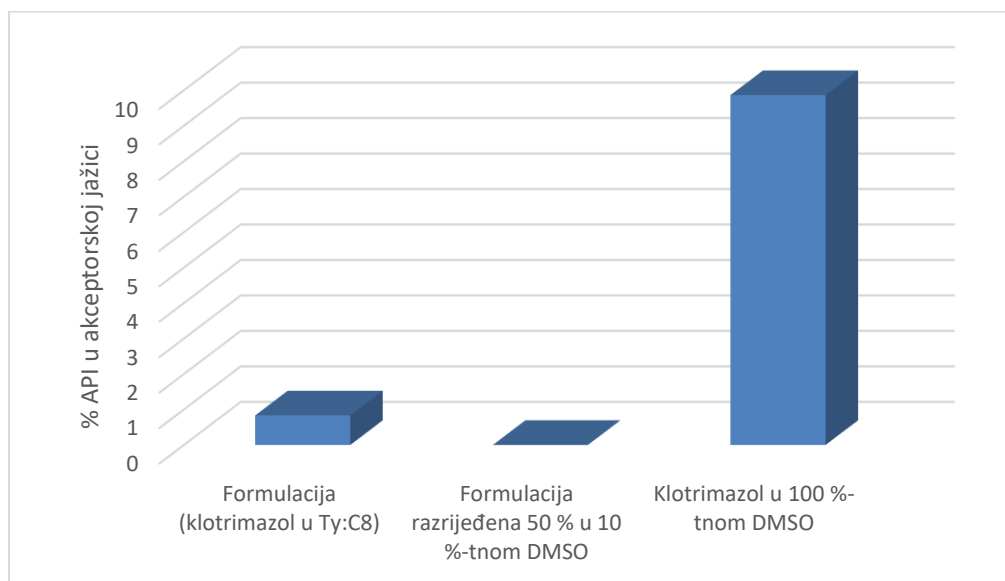
Koeficijent permeabilnosti je mjera brzine kojom spoj može proći kroz membranu (Yang i Hinner, 2015). U predviđanju permeabilnosti molekule važno svojstvo je lipofilnost molekule ($\log P$), a određuje se mjerenjem logaritma koeficijenta raspodjele između oktanol i vode (van Breemen i Li, 2005). Eksperimentalno određeni $\log P$ klotrimazola iznosi 6,1 (Bolla i sur., 2019). Predviđanje $\log P$ važno je u postupku dizajniranja lijeka, jer je ključno znati lipofilna svojstva spoja prije sinteze (Bennion i sur., 2017), međutim postoji značajna razlika između oktanol/voda i membrana/voda koeficijenta raspodjele (van Breemen i Li, 2005). Postoji nekoliko računalnih metoda koje računaju $\log P$ za početno predviđanje lipofilnosti odnosno permeabilnosti, a jedna od najjačih *in silico* tehnika za simulaciju molekularnog procesa difuzije na atomskoj razini je molekularna dinamika (MD), koja je računalno vrlo zahtjevna metoda (Bennion i sur., 2017).

Razvijen je niz modela za predviđanje permeabilnosti pomoću računala, od relativno jednostavnih kvantitativnih do složenih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih modela, u svrhu zamjene za *in vitro* i *in vivo* analize (van Breemen i Li, 2005). Najviše korišten *in silico* pristup procjene permeabilnosti membrane je QSPR (engl. *Quantitative Structure-Permeability Relationship*), kvantitativni model koji koristi statističke odnose iz eksperimentalnih mjerenja permeabilnosti u kombinaciji s fizikalno-kemijskim svojstvima spoja (Bennion i sur., 2017). Uz *in silico* metode, najčešći ne-biološki modeli ispitivanja permeabilnosti su IAM i PAMPA. IAM (engl. *Immobilised Artificial Membrane chromatography*) je tekućinska kromatografija reverzne faze (van Breemen i Li, 2005) koja koristi imobilizirane umjetne membrane, odnosno jedan sloj fosfolipida kovalentno vezan na čestice silicijevog dioksida, oponašajući tako lipidni okoliš fluidne stanične membrane na čvrstom matriksu (Taillardat-Bertschinger i sur., 2003).

Prema van Breemen i Li (2005), iako su umjetne membrane korisne za predviđanje permeabilnosti pasivno transportiranih spojeva, one se razlikuju od bioloških membrana. Stanični modeli koriste besmrtno stanice koje brzo rastu u monosloju i prolaze spontanu diferencijaciju. Caco-2 stanice, izolirane iz adenokarcinoma debelog crijeva čovjeka, najčešći su *in vitro* alati za predviđanje potencijala permeabilnosti i apsorpcije lijeka (Nožinić i sur., 2010). Dakle, kao modeli barijera široko se koriste različiti umjetni lipidni dvosloji ili stanični monoslojevi (Yang i Hinner, 2015).

Brze metode koje ne zahtijevaju upotrebu životinjskog tkiva trebale bi se koristiti kao primaran model za procjenu permeabilnosti tijekom ranog otkrića lijeka, a zatim se sekundarni probir može provesti *in vitro* sustavom (na bazi staničnih kultura ili životinjskog tkiva). Razumna uporaba različitih tehnika procjene permeabilnosti tijekom otkrića lijeka može osigurati odabir dobrih kandidata za daljnji razvoj lijeka (Balimane i sur., 2000). Kao metoda

procjene permeabilnosti u ovom radu odabran je PAMPA test, a rezultati su prikazani na Slici 15.



Slika 15. Permeabilnost određena PAMPA testom

Permeabilnost formulacije, razrijeđene formulacije i klotrimazola u DMSO kroz umjetnu lipidnu membranu određena je PAMPA testom, a rezultat je prikazan kao postotak API-ja u akceptorskoj jažici nakon 24 sata od nanošenja uzoraka. Koncentracije API-ja u akceptorskoj jažici određene su HPLC-om i spektrofotometrom. Koncentracija API-ja iz formulacije koja je permeabilizirala u akceptorsku jažicu iznosi $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$, API iz razrijeđene formulacije nije permeabilizirao, a koncentracija API iz DMSO koja je permeabilizirala preko membrane iznosi $0,49 \text{ mg mL}^{-1}$. Kod razrijeđene formulacije, analizom na HPLC-u nije uočen pik, odnosno koncentracija API-ja u akceptorskoj jažici je nula, što je očekivano, jer je formulacija pokazala nisku permeabilnost kroz membranu. Može se zaključiti da odabrani DES nije poboljšao permeabilnost s obzirom da je veći udio klotrimazola permeabilizirao iz DMSO (9,86 %) u odnosu na DES Ty:C8 (0,83 %). Iako je DES Ty:C8 pokazao poboljšanu mogućnost otapanja klotrimazola u visokoj koncentraciji, iz rezultata PAMPA testa proizlazi kako bi niska permeabilnost formulacije najvjerojatnije u konačnici rezultirala niskom biodostupnosti klotrimazola iz DES-a.

U završnom radu Nakić (2021) ispitana je antimikrobna aktivnost terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Svi test-mikroorganizmi pokazali su osjetljivost na THEDES, pri čemu se *Escherichia coli* 3014 pokazala kao najosjetljivija bakterija, dok je inhibicija rasta *Candida albicans* 86 bila veća u prisutnosti NADES-a nego odgovarajućeg THEDES-a (Nakić, 2021) što ukazuje na očuvanje aktivnosti API-ja u formulaciji terapijskog eutektičkog otapala, ali i na činjenicu da i sam NADES može imati antimikrobni potencijal, kao

što je u literaturi već opisano. Na unatoč navedenoj prisutnoj biološkoj aktivnosti, dobroj topljivosti klotrimazola u odabranim niskotemperaturnim eutektskim otapalima i niskoj citotoksičnosti KLO u Ty:C8 spram HaCaT stanica, zbog nestabilnosti formulacije tijekom čuvanja te niže permeabilnosti API-ja iz DES-a nego iz DMSO, odabrani DES Ty:C8 (1:3) nije dobar kandidat za razvoj nove formulacije klotrimazola te su potrebna daljnja istraživanja koja će rezultirati dobrim vrijednostima ključnih parametara (topljivost, permeabilnost i stabilnost API-ja) za farmaceutsku primjenu novih formulacija pripremljenih pomoću niskotemperaturnih eutektskih otapala.

5. ZAKLJUČCI

1. Korištenjem računalnog programa COSMO $therm$ predviđena je topljivost klotrimazola u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, pri čemu su se hidrofobni DES-ovi pokazali kao najbolja otapala za odabrani aktivni farmaceutski sastojak, klotrimazol.
2. Na temelju rezultata COSMO $therm$ odabrana su i pripremljena tri DES-a u kojima je eksperimentalno određena topljivost klotrimazola. Iako je COSMO predvidio najbolju topljivost KLO u Ty:C10, HPLC analizom eksperimentalno je određena najbolja topljivost u Ty:C8 (1:3) ($151,62 \text{ mg mL}^{-1}$), u usporedbi sa Ty:C10 (1:1) i Ty:Cou (3:2). Svakako, treba naglasiti važnost *in silico* predviđanja topljivosti, jer je $\ln(\gamma)$ vrijednost DES-ova u skladu s eksperimentalnim rezultatima, odnosno KLO je pokazao značajnu topljivost u sva tri navedena DES-a što potvrđuje vrijednost ovog pristupa u razvoju novih formulacija API-ja primjenom niskotemperaturnih eutektičkih otapala.
3. Stabilnost klotrimazola tijekom vremena, pri sobnoj temperaturi i $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, određena je spektrofotometrijski u Ty:C8 (1:3), Pro:Ma (1:1) sa udjelom vode 50 % i inkluzijskom kompleksu klotrimazola sa ciklodekstrinom u Pro:Ma (1:1). Oba odabrana DES-a, kao i kompleksacija sa ciklodekstrinom, nisu povoljno utjecali na stabilnost klotrimazola.
4. Ispitivanje citotoksičnog učinka DES-a Ty:C8 (1:3) i formulacije KLO u Ty:C8 na HaCaT staničnoj liniji u rasponu koncentracija ($0,01\text{-}10 \text{ mg mL}^{-1}$) pokazuju nisku citotoksičnost prema HaCaT staničnoj liniji što je poželjan rezultat obzirom da se klotrimazol najčešće koristi topikalno, odnosno nanosi na kožu.
5. Pomoću PAMPA testa određena je permeabilnost klotrimazola, pri čemu je permeabilnost iz otopine DES-a iznosila 0,83 % u odnosu na permeabilnost od 9,86 % u DMSO. Stoga se može zaključiti kako DES Ty:C8 nije poboljšao permeabilnost klotrimazola.
6. Unatoč dobroj topljivosti klotrimazola u odabranim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima i niskoj citotoksičnosti KLO u Ty:C8 određenoj na HaCaT stanicama, zbog nestabilnosti tijekom čuvanja u Ty:C8 (1:3) te niže permeabilnosti API-ja iz DES-a nego iz DMSO, odabrani DES nije dobar kandidat za razvoj nove formulacije klotrimazola.

6. LITERATURA

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

Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green chemistry: principles and practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301-312.

Aroso, I. M., Silva, J. C., Mano, F., Ferreira, A. S., Dionísio, M., Sá-Nogueira, I., Duarte, A. R. C. (2016) Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **8**, 57-66.

Balimane, P. V., Chong, S., Morrison, R. A. (2000) Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Tox. Met.* **44**, 301-312.

Bennion, B. J., Be, N. A., McNerney, M. W., Lao, V., Carlson, E. M., Valdez, C. A., Carpenter, T. S. (2017) Predicting a drug's membrane permeability: A computational model validated with in vitro permeability assay data. *J. Phys. Chem. B.* **121**, 5228-5237.

Blokhina, S., Sharapova, A., Ol'khovich, M., Perlovich, G. (2019) Experimental solubility of clotrimazole and some thermodynamic aspects of dissolution in different solvents. *Thermochim. Acta.* **682**, 178431.

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* **24**, 3139.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761-771.

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

Clarke, C. J., Tu, W. C., Levers, O., Brohl, A., Hallett, J. P. (2018) Green and sustainable solvents in chemical processes. *Chem. Rev.* **118**, 747-800.

Crowley, P. D., Gallagher, H. C. (2014) Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* **117**, 611-617.

- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biot.* **90**, 1631-1639.
- 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. *Anal. Chim. Acta.* **766**, 61-68.
- Duarte, A. R. C., Ferreira, A. S. D., Barreiros, S., Cabrita, E., Reis, R. L., Paiva, A. (2017) A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **114**, 296-304.
- Eckert, F., Klamt, A. (2002) Fast solvent screening via quantum chemistry: COSMO-RS approach. *AIChE J.* **48**, 369-385.
- Emami, S., Shayanfar, A. (2020) Deep eutectic solvents for pharmaceutical formulation and drug delivery applications. *Pharm. Dev. Technol.* **25**, 779-796.
- Farooq, M. Q., Abbasi, N. M., Anderson, J. L. (2020) Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A.* **1633**, 461613.
- Ferrarini, F., Flôres, G. B., Muniz, A. R., de Soares, R. P. (2018) An open and extensible sigma-profile database for COSMO-based models. *AIChE J.* **64**, 3443-3455.
- Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., Marrucho, I. M. (2014) Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 2416-2425.
- Franke, R., Hannebauer, B. (2011) On the influence of basis sets and quantum chemical methods on the prediction accuracy of COSMO-RS. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 21344-21350.
- Georgantzi, C., Lioliou, A. E., Paterakis, N., Makris, D. P. (2017) Combination of lactic acid-based deep eutectic solvents (DES) with β -cyclodextrin: Performance screening using ultrasound-assisted extraction of polyphenols from selected native Greek medicinal plants. *Agronomy* **7**, 54.
- Grensemann, H., Gmehling, J. (2005) Performance of a conductor-like screening model for real solvents model in comparison to classical group contribution methods. *Industrial & engineering chemistry research* **44**, 1610-1624.

- Grimling, B., Jasińska, J., Meler, J., Szcześniak, M., Pluta, J. M., Górniak, 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**, 63-72.
- Gu, Y., Jerome, F. (2013) Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 9550-9570.
- Häckl, K., Kunz, W. (2018) Some aspects of green solvents. *CR Chim.* **21**, 572-580.
- Hájková, R., Sklenářová, H., Matysová, L., Švecová, P., Solich, P. (2007) Development and validation of HPLC method for determination of clotrimazole and its two degradation products in spray formulation. *Talanta* **73**, 483-489.
- Halder, A. K., Cordeiro, M. N. D. (2019). Probing the environmental toxicity of deep eutectic solvents and their components: An *in silico* modeling approach. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 10649-10660.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E., Saheed, O. K. (2013a). Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193-2195.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Al-Saadi, M. A., Hayyan, A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere* **93**, 455-459.
- Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A. (2015) *In vitro* and *in vivo* toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents. *PLOS One* **10**, e0117934.
- Hayyan, M., Mbous, Y. P., Looi, C. Y., Wong, W. F., Hayyan, A., Salleh, Z., Mohd-Ali, O. (2016) Natural deep eutectic solvents: cytotoxic profile. *SpringerPlus* **5**, 913.
- Hoogerheide, J. G., Wyka, B. E. (1982) Clotrimazole. *Analytical profiles of drug substances* **11**, 225-255.
- Hou X. D., Liu Q. P., Smith T. J., Li, N., Zong M. H. (2013) Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Cholinium Amino Acids Ionic Liquids. *PLOS One* **8**, 1-7.
- Huang, Z. L., Wu, B. P., Wen, Q., Yang, T. X., Yang, Z. (2014) Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biot.* **89**, 1975-1981.

Jug, M., Bećirević-Laćan, M. (2008) Cyclodextrin-based pharmaceutical. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti.* **499=32**, 9-26.

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

Kerns, E. H., 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.* **93**, 1440-1453.

Klamt, A., Jonas, V., Bürger, T., Lohrenz, J. C. (1998) Refinement and parametrization of COSMO-RS. *J. Phys. Chem. A.* **102**, 5074-5085.

Kovács, A., Neyts, E. C., Cornet, I., Wijnants, M., Billen, P. (2020) Modeling the physicochemical properties of natural deep eutectic solvents. *ChemSusChem* **13**, 3789-3804.

Kudlak, B., Owczarek, K., Namieśnik, J. (2015) Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents - a review. *Environ. Sci. Pollut. R.* **22**, 11975-11992.

Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., Sivas, H. (2017) Chapter 10-Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. U: Medicinal Spices and Vegetables from Africa (Kuete, V., ured.) Elsevier Inc, Amsterdam, str. 271-297.

Lehmann, B. (1997) HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 78-82.

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. *MedChemComm.* **7**, 955-959.

Macário, I. P. E., Oliveira, H., Menezes, A. C., Ventura, S. P. M., Pereira, J. L., Gonçalves, A. M. M., Gonçalves, F. J. M. (2019) Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Sci. Rep-UK.* **9**, 1-9.

Mohammed, N. N., Pandey, P., Khan, N. S., Elokely, K. M., Liu, H., Doerksen, R. J., Repka, M. A. (2016) Clotrimazole–cyclodextrin based approach for the management and treatment of Candidiasis-A formulation and chemistry-based evaluation. *Pharm. Dev. Technol.* **21**, 619-629.

Mokhtarpour, M., Shekaari, H., Shayanfar, A. (2020) Design and characterization of ascorbic acid based therapeutic deep eutectic solvent as a new ion-gel for delivery of sunitinib malate. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* **56**, 101512.

Morrison, H. G., Sun, C. C., Neervannan, S. (2009) Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int. J. Pharm.* **378**, 136-139.

Nakić, M. (2021) Antimikrobna aktivnost terapeutskih eutektskih otapala (završni rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

National Center for Biotechnology Information (2021) PubChem Compound Summary for CID 2812, Clotrimazole, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clotrimazole>>. Pristupljeno 28. srpnja 2021.

Navas, J. M., Chana, A., Herradón, B., Segner, H. (2004) Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound. Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives. *Life Sci.* **76**, 699-714.

Nguyen, C. H., Augis, L., Fourmentin, S., Barratt, G., Legrand, F. X. (2021) Deep eutectic solvents for innovative pharmaceutical formulations. U: Deep eutectic solvents for medicine, gas solubilization and extraction of natural substances. Springer, Cham. 41-102.

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.

Olivares, B., Martínez, F., Rivas, L., Calderón, C., Munita, J. M., Campodonico, P. R. (2018) A natural deep eutectic solvent formulated to stabilize β -lactam antibiotics. *Sci. Rep-UK.* **8**, 1-12.

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2014) Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1063-1071.

Palmelund, H., Andersson, M. P., Asgreen, C. J., Boyd, B. J., Rantanen, J., Löbmann, 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.

- Pedro, S. N., Freire, M. G., Freire, C. S., Silvestre, A. J. (2019) Deep eutectic solvents comprising active pharmaceutical ingredients in the development of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Del.* **16**, 497-506.
- Pena-Pereira, F., la Calle, I. (2019) Solvents and Eutectic Solvents. U: Encyclopedia of Analytical Science, 3. izd. (Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., Miró, M., ured.) Elsevier, Španjolska, str. 184-190.
- Pereira, C. V., Silva, J. M., Rodrigues, L., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C., Matias, A. (2019) Unveil the anticancer potential of limonene based therapeutic deep eutectic solvents. *Sci. Rep-UK.* **9**, 1-11.
- Petushkova, N. A., Rusanov, A. L., Pyatnitskiy, M. A., Larina, O. V., Zgoda, V. G., Lisitsa, A. V., Luzgina, N. G. (2020) Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed. Dermatol.* **4**, 1-13.
- Prabagar, B., Yoo, B. K., Woo, J. S., Kim, J. A., Rhee, J. D., Piao, M. G., Yong, C. S. (2007) Enhanced bioavailability of poorly water-soluble clotrimazole by inclusion with β -cyclodextrin. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 249-254.
- Pradines, B., Gallard, J. F., Iorga, B. I., Gueutin, C., Ponchel, G., Loiseau, P. M., Bouchemal, K. (2015) The unexpected increase of clotrimazole apparent solubility using randomly methylated β -cyclodextrin. *J. Mol. Recognit.* **28**, 96-102.
- Radošević, K., Bubalo, M. C., Srček, V. G., Grgas, D., Dragičević, T. L., Redovniković, I. R. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotox. Environ. Safe.* **112**, 46-53.
- Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Cvjetko Bubalo, M., Frece, J., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**, 14188-14196.
- Radović, M., Panić, M., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala–racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **70**, 551-562.
- Santos, F., PS Leitão, M. I., C Duarte, A. R. (2019) Properties of therapeutic deep eutectic solvents of L-arginine and ethambutol for tuberculosis treatment. *Molecules* **24**, 55.

- Schmidt, D., Lynch, J. (2003) Evaluation of the reproducibility of parallel artificial membrane permeation assays (PAMPA). *Millipore Corporation Application Note*. [online] <<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 17. srpnja 2021.
- Silva, J. M., Pereira, C. V., Mano, F., Silva, E., Castro, V. I., Sá-Nogueira, I., Duarte, A. R. C. (2019) Therapeutic role of deep eutectic solvents based on menthol and saturated fatty acids on wound healing. *ACS Appl. Bio Mater.* **2**, 4346-4355.
- Silva, J. M., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C. (2018) Design of functional therapeutic deep eutectic solvents based on choline chloride and ascorbic acid. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **6**, 10355-10363.
- Smith, E. L., Abbott, A. P., Ryder, K. S. (2014) Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060-11082.
- Song, H., Shin, H. S. (1998) The antifungal drug clotrimazole. *Acta Crystallogr. C.* **54**, 1675-1677.
- Stott, P. W., Williams, A. C., Barry, B. W. (1998) Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J. Control. Release.* **50**, 297-308.
- Su, E., Klibanov, A. M. (2015) Low-transition-temperature mixtures (LTTMs) for dissolving proteins and for drug formulation. *Appl. Biochem. Biotech.* **177**, 753-758.
- Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P. A., Barbato, F., Testa, B. (2003) Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. *J. Med. Chem.* **46**, 655-665.
- Tarate, B., Bansal, A. K. (2015) Characterization of CoQ 10-lauric acid eutectic system. *Thermochim. Acta.* **605**, 100-106.
- Torregrosa-Crespo, J., Marset, X., Guillena, G., Ramón, D. J., Martínez-Espinosa, R. M. (2020) New guidelines for testing “Deep eutectic solvents” toxicity and their effects on the environment and living beings. *Sci. Total. Environ.* **704**, 135382.
- Triolo, A., Lo Celso, F., Russina, O. (2020) Structural features of β -cyclodextrin solvation in the deep eutectic solvent, reline. *J. Phys. Chem. B.* **124**, 2652-2660.

- van Breemen, R. B., Li, Y. (2005) Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Met.* **1**, 175-185.
- van Osch, D. J., Zubeir, L. F., van den Bruinhorst, A., Rocha, M. A., Kroon, M. C. (2015) Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chem.* **17**, 4518-4521.
- Wang, H., Gurau, G., Shamshina, J., Cojocaru, O. A., Janikowski, J., MacFarlane, D. R., Rogers, R. D. (2014) Simultaneous membrane transport of two active pharmaceutical ingredients by charge assisted hydrogen bond complex formation. *Chem. Sci.* **5**, 3449-3456.
- Warrag, S. E., Kroon, M. C. (2019) Hydrophobic Deep Eutectic Solvents. U: Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications (Ramon, D.J., Guillena, G., ured.) John Wiley & Sons, New Jersey, str. 83-93.
- Wen, Q., Chen, J. X., Tang, Y. L., Wang, J., Yang, Z. (2015) Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere* **132**, 63-69.
- Wilkes, J. S. (2002) A short history of ionic liquids-from molten salts to neoteric solvents. *Green Chem.* **4**, 73-80.
- World Health Organization (2009) Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. *WHO Tech. Rep. Ser.* **953**, 87-123.
- Yang, N. J., Hinner, M. J. (2015) Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. **1266**, 29-53. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3>. Pristupljeno 20. srpnja 2021.
- Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Ngoh, G. C., Wong, W. F., Looi, C. Y. (2019) Emerging frontiers of deep eutectic solvents in drug discovery and drug delivery systems. *J. Control. Release.* **316**, 168-195.
- Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., Jerome, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108-7146.
- Zhao, B. Y., Xu, P., Yang, F. X., Wu, H., Zong, M. H., Lou, W. Y. (2015) Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **3**, 2746-2755.

7. PRILOZI

7.1. POPIS KORIŠTENIH KRATICA

API - aktivni farmaceutski sastojak

Arg - arginin

B - betain

BCS - biofarmaceutski klasifikacijski sustav

C10 - dekanska kiselina

C18:2 - linolna kiselina

C8 - oktanska kiselina

CA - limunska kiselina

Cam - kamfor

CD - ciklodekstrin

ChCl - kolin-klorid

COSMO-RS - engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*

Cou - kumarin

DES - niskotemperaturno eutektičko otapalo

DEX - deksametazon

DMSO - dimetil sulfoksid

EG - etilen-glikol

EU - eukaliptol

Fru - fruktoza

Glc - glukoza

Gly - glicerol

HBA - akceptor vodikove veze

HBD - donor vodikove veze

His - histidin

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

IAM - engl. *Immobilised Artificial Membrane chromatography*

KLO - klotrimazol

Lys - lizin

Ma - jabučna kiselina

Mal - maltoza

MD - molekularna dinamika

Me - L-mentol

mtk-QSTR - engl. *multitasking-Quantitative Structure Toxicity Relationships*

MTPB - metil-trifenil-fosfanijev bromid

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij

NADES - prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo

NSAID - nesteroidni protuupalni lijekovi

OxA - oksalna kiselina

PA - perililna kiselina

PAMPA - test propusnosti umjetne membrane

PES - fenazin etosulfat

Pro - prolin

QSPR - engl. *Quantitative Structure-Permeability Relationship*

ROS - reaktivne kisikove vrste

SA - salicilna kiselina

Sol - sorbitol

Sor - sorboza

Suc - saharoza

SUM - Sunitinib malat

THEDES - terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo

Ty - timol

U - urea

Xyl - ksiloza

IZJAVA O IZVORNOSTI

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.

Vlastoručni potpis:



Tihana Sopić