

# Primjena prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala u razvoju formulacije reaktivatora acetilkolinesteraze

---

Štokić, Marina

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:159:061524>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Marina Štokić

1318/MB

Zagreb, travanj 2021.

**PRIMJENA PRIRODNOG  
NISKOTEMPERATURNOG  
EUTEKTIČKOG OTAPALA U  
RAZVOJU FORMULACIJE  
REAKTIVATORA  
ACETILKOLINESTERAZE**

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 u laboratoriju Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod neposrednim vodstvom dr.sc. Nikoline Maček Hrvat. Diplomski rad izrađen je u sklopu projekata HrZZIP-2019-04-7712 „Racionalni dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“ i HrZZIP-2018-01-7683 „Analiza interakcija butirilkolinesteraze s novim inhibitorima i reaktivatorima“.

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević. Veliko joj hvala na vodstvu, savjetima i razumijevanju te na ugodnoj atmosferi prilikom cijelog vremena izrade rada. Veliko hvala i dr.sc. Manueli Panić koja mi je bila velika pomoć kod eksperimentalnog rada i na strpljenju te uloženom vremenu za sva moja pitanja. Zahvaljujem se ostatku Laboratorija na ugodnom raspoloženju i dobrodošlici. Veliko hvala dr.sc. Nikolini Maček Hrvat zbog neposrednog vodstva i nesebične pomoći prilikom rada na Institutu gdje sam puno toga naučila, te pri velikoj pomoći prilikom pisanja. I na kraju, veliko hvala obitelji: roditeljima bez kojih ovaj rad ne bi bio ostvariv, sestrama na savjetima i ohrabrenjima i dečku na velikoj potpori.*

## 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 PRIRODNOG NISKOTEMPERATURNOG EUTEKTIČKOG OTAPALA U RAZVOJU FORMULACIJE REAKTIVATORA ACETILKOLINESTERAZE

*Marina Štokić, 1318/MB*

**Sažetak:** Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, nova zelena otapala, istražuju se kao alternativna otapala za otapanje djelatnih farmaceutskih tvari. Razvoj učinkovitog antidota za otrovanja organofosfornim (OP) spojevima, ireverzibilnim inhibitorima esencijalnog enzima acetilkolinesteraze (AChE), predmet je mnogih istraživanja. U središtu pozornosti su tzv. centralno-aktivni oksimski reaktivatori fosfilirane AChE, kao što je, u vodi slabo topljivi oksim RS-194B. U ovom radu je pomoću programa COSMO<sub>therm</sub> predviđena, a zatim i eksperimentalno određena topljivost oksima RS-194B u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Najbolja topljivost postignuta je u otapalu limunska kiselina:glukoza=1:1 s 30 %-tnim udjelom vode. Praćena je stabilnost formulacije oksima RS-194B u odabranom i referentnom otapalu tijekom mjesec dana na temperaturama 4 °C i 25 °C pri čemu nije zapažena razlika u stabilnosti tih formulacija. Prije određivanja kinetičkih parametara reaktivacije AChE inhibirane OP spojevima sarinom i VX-om pomoću formulacije oksima RS-194B u odabranom otapalu, ispitan je utjecaj samog otapala na AChE. Pokazalo se da otapalo inhibira aktivnost AChE u potpunosti i njegov udio mora se održavati ispod 0,2 % kako bi enzim zadržao 90 % aktivnosti. Nadalje, afinitet AChE i fosfilirane AChE je veći za vezanje oksima otopljenog u odabranom otapalu nego u vodi. Oksim je, bez obzira na otapalo bolji reaktivator VX-om nego sarinom fosfilirane AChE. Međutim, brzina reaktivacije fosfilirane AChE je manja s RS-194B u odabranom otapalu nego s RS-194B otopljenim u vodi. Stoga, iako je primjenom odabranog otapala postignuta bolja topljivost oksima RS-194B u usporedbi s vodom kao referentnim otapalom i poboljšan je afinitet AChE za RS-194B, otapalo limunska kiselina:glukoza=1:1, 30 % vode, nije najbolji izbor za pripremu formulacije RS-194B oksima za *in vivo* upotrebu zbog inhibitornog učinka na enzim te viskoznosti i niske pH vrijednosti samog otapala.

**Ključne riječi:** acetilkolinesteraza, COSMO<sub>therm</sub>, oksim, prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, topljivost

**Rad sadrži:** 62 stranice, 17 slika, 6 tablica, 138 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Neposredni voditelj:** dr.sc. Nikolina Maček Hrvat, znan. sur.

**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. Dr.sc. Nikolina Maček Hrvat, znan. sur., Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb
4. Izv.prof.dr.sc. Ivana Kmetić (zamjena)

**Datum obrane:** Travanj, 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 NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENT FOR DEVELOPMENT OF ACETYLCHOLINESTERASE REACTIVATOR FORMULATION

*Marina Štokić, 1318/MB*

**Abstract:** Natural deep eutectic solvents, new green solvents, are being investigated as alternative solvents for dissolving active pharmaceutical ingredients. The development of an effective antidote for poisoning by organophosphates (OPs), irreversible inhibitors of the essential enzyme acetylcholinesterase (AChE), has been a subject of many research. The focus is on the so-called centrally active oxime reactivators of phosphorylated AChE like poorly water-soluble oxime RS-194B. In this study, the solubility of RS-194B oxime in natural deep eutectic solvents has been predicted by the COSMO $_{therm}$  program and experimentally determined using high efficient liquid chromatography. Natural deep eutectic solvent citric acid: glucose=1:1 with 30 % water content has resulted with best solubility of oxime RS-194B. The stability of oxime RS-194B formulation in the selected natural deep eutectic solvent has been monitored during one month period at temperatures of 4 °C and 25 °C where no difference in the stability of these formulations was observed. Before determining the effect of RS-194B oxime formulation in the selected solvent on the reactivation kinetics of AChE inhibited by OPs sarin and VX, the effect of the solvent itself on the AChE was determined. It was found that the selected solvent inhibited AChE completely, and in order for AChE to maintain more than 90 % activity, its content has to be kept below 0,2 %. The affinity of AChE and phosphorylated AChE is higher for the binding of oxime dissolved in the selected solvent than in water. The oxime, regardless of the solvent, is a better reactivator of VX- than sarin-inhibited AChE. However, the maximal first-order reactivation rate of phosphorylated AChE is lower with RS-194B in the selected solvent than with RS-194B dissolved in water. Therefore, although the use of the selected solvent resulted in better solubility of RS-194B oxime compared to water as the reference solvent and improved the affinity of AChE for RS-194B, the solvent citric acid: glucose=1:1, 30 % water, is not suitable for preparing the RS-194B formulation for *in vivo* application due to its inhibitory effect on the enzyme, viscosity and low pH.

**Keywords:** acetylcholinesterase, COSMO $_{therm}$ , oxime, natural deep eutectic solvents, solubility

**Thesis contains:** 62 pages, 17 figures, 6 tables, 138 references, 0 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

**Immediate supervisor:** PhD Nikolina Maček Hrvat, Scientific Associate

**Technical support and assistance:** PhD Manuela Panić

**Reviewers:**

1. PhD Ivana Radojčić Redovniković, Full Professor
2. PhD Kristina Radošević, Associate Professor
3. PhD Nikolina Maček Hrvat, Scientific Associate, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb
4. PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor (substitute)

**Thesis defended:** April, 2021.

# SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. ZELENA OTAPALA .....	3
2.1.1. Niskotemperaturna eutektička otapala.....	5
2.1.1.1. Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	5
2.1.1.2. Toksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	8
2.1.1.3. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala.....	10
2.2. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U FARMACEUTICI .....	12
2.2.1. Otapanje teško topljivih spojeva.....	12
2.2.2. Terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala.....	14
2.3. PRIRODNA NISKOTEMPERATurna EUTEKTIČKA OTAPALA U RAZVOJU ANTIDOTA.....	15
2.3.1. Organofosforni spojevi i acetilkolinesteraza .....	16
2.3.2. Reaktivatori fosfilirane AChE .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>20</b>
3.1. MATERIJALI.....	20
3.1.1. Kemikalije.....	20
3.1.2. Enzim .....	20
3.1.3. Oprema .....	20
3.1.4. Obrada podataka .....	21
3.2. METODE RADA .....	21
3.2.1. Sinteza prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES) .....	21
3.2.2. Procjena topljivosti oksima u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima korištenjem programa COSMOtherm.....	22
3.2.3. Eksperimentalna provjera topljivosti.....	23
3.2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC metoda).....	23
3.2.5. Stabilnost oksima.....	25
3.2.6. Provjera učinka formulacije oksima u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu na kinetiku acetilkolinesteraze .....	25
3.2.6.1. Određivanje aktivnosti AChE metodom po Ellmanu.....	25
3.2.6.2. Određivanje aktivnosti AChE u prisutnosti prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala .....	25
3.2.6.3. Reverzibilna inhibicija AChE.....	26
3.2.6.4. Reaktivacija inhibirane AChE pomoću oksima RS-194B.....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>32</b>
4.1. PROCJENA TOPLJIVOST OKSIMA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA POMOĆU PROGRAMA COSMOTHERM .....	34
4.2. TOPLJIVOST OKSIMA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA .....	36



4.3.	STABILNOST OKSIMA .....	37
4.4.	UTJECAJ PRIRODNOG NISKOTEMPERATURNOG EUTEKTIČKOG OTAPALA NA KINETIKU ACETILKOLINESTERAZE .....	38
4.4.1.	Aktivnost enzima AChE u prisutnosti prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala .....	38
4.4.2.	Reverzibilna inhibicija AChE.....	39
4.4.3.	Reaktivacija AChE inhibirane sarinom i VX-om .....	41
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>49</b>

# 1. UVOD

Razvitkom industrije ljudska populacija se u 21. stoljeću susreće s posljedicama po okoliš štetnih i neodrživih procesa koji imaju utjecaj na klimu, ljudsko zdravlje i opstanak cijelog ekosustava na Zemlji. Kao otapala koja zadovoljavaju kriterije zelenog procesa, u zadnja dva desetljeća intenzivno se istražuju prirodna niskotemperaturna eutektička otapala za primjenu u raznim industrijama. Osim njihovog povoljnog ekološkog profila, primjenom prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala smanjuje se potrošnja energije, a mogu se sintetizirati iz lako dostupnih, sigurnih, netoksičnih i jeftinih sirovina. Nadalje, porast broja stanovništva i bolesti uzrokuje sve veću zabrinutost u svjetskoj zdravstvenoj zaštiti stoga je razvoj i primjena alternativnih održivih procesa u farmaceutskoj industriji od iznimne važnosti. Ograničena ili loša topljivost djelatnih farmaceutskih tvari u vodenim medijima jedan je od najvećih izazova pri razvoju lijekova i njihovih formulacija, što izravno utječe i na biodostupnost lijekova. Spomenuta prirodna niskotemperaturna eutektična otapala mogu povoljno utjecati na topljivost, permeabilnost i apsorpciju lijekova, a zbog svojih neštetnih svojstava već se su našli u nekim drugim primjenama u biomedicinskom i farmaceutskom području.

Upotreba organofosfornih spojeva kao pesticida i u ratne ili terorističke svrhe i dalje je prisutna. Izloženost čovjeka takvim spojevima može dovesti do smrti zbog ireverzibilne inhibicije acetilkolinesteraze, esencijalnog enzima čija je fiziološka funkcija hidroliza neurotransmitera acetilkolina čime se prekida živčani podražaj. Zbog toga je pronalazak učinkovitog antidota u slučaju trovanja organofosfornim spojevima jako važan. Aktivnost fosfilirane acetilkolinesteraze može se reaktivirati jačim nukleofilima od vode kao što su oksimi. Međutim, oksimi koji su odobreni za upotrebu su nabijene molekule koje ne mogu u značajnoj koncentraciji proći krvno-moždanu barijeru i reaktivirati acetilkolinesterazu na ključnom mjestu – u mozgu. Zbog toga je istraživanje tzv. centralno aktivnih oksima u središtu pozornosti. Takav oksim je RS-194B koji nema trajni naboj što mu omogućuje difuziju kroz krvno-moždanu barijeru, a prilikom uspostavljanja pH ravnoteže u mozgu nastane značajan broj protonirane forme oksima koje će moći reaktivirati fosfiliranu acetilkolinesterazu. Učinkovitost ovog oksima na širokom spektru organofosfornih spojeva dokazana je *in vitro*, a njegov potencijal za razvoj antidota podupire i niska *in vivo* toksičnost te vrlo učinkovit oporavak otrovanih miševa i makaki majmuna. Međutim, topljivost ovog spoja u vodi kao netoksičnom otapalu pogodnom za ljudsku primjenu je vrlo slaba. Stoga je pronalazak otapala u kojem bi

RS-194B bio bolje topljiv od velike važnosti za pripremu formulacije ovog spoja u obliku potencijalnog antidota. Primjena prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES-a), koja su se pokazala uspješnim u otapanju nekih drugih u vodi slabo topljivih djelatnih farmaceutskih tvari, razmatra se u ovom radu kao učinkovita, netoksična i ekološki prihvatljiva metoda u razvitku formulacije oksima RS-194B.

Cilj rada je odabir NADES-a kojim će se postići bolja topljivost oksima RS-194B nego u referentnom otapalu, što će se prvobitno predvidjeti pomoću programa za određivanje topljivosti COSMOtherm, a potom i eksperimentalno primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Stabilnost formulacije oksima RS-194B u NADES-u pratiti će se na različitim temperaturama kroz određeni vremenski period. Nadalje, odrediti će se utjecaj NADES-a na enzim acetilkolinesterazu. Pratiti će se kinetika inhibicije acetilkolinesteraze oksimom i odrediti afinitet enzima za oksim, kao i reaktivacijska učinkovitost RS-194B oksima u slučaju inhibicije acetilkolinesteraze živčanim bojnim otrovima sarinom i VX-om. Usporedbom rezultata, odnosno kinetičkih parametara određenih za RS-194B otopljen u NADES otapalu i RS-194B otopljen u vodi kao referentnom otapalu donijeti će se zaključak o prednostima i nedostacima primjene odabrane formulacije prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala za pripremu formulacije oksima RS-194B.

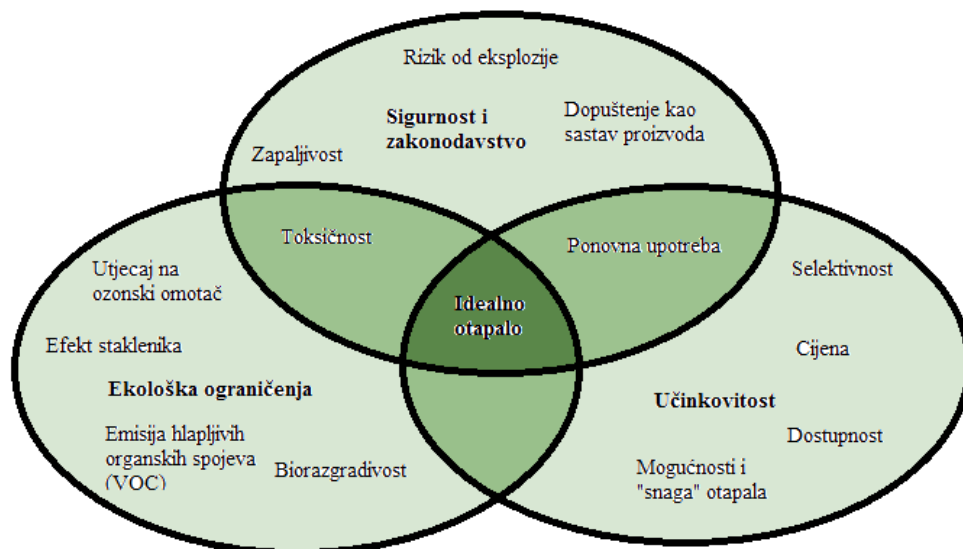
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ZELENA OTAPALA

Cjelokupni ljudski napredak u raznim područjima prati i prilagodba na promjene u okolišu, čime se uviđa sve veća potreba za održivim razvojem. Zagađenje zraka te problem zbrinjavanja otpada (posebice opasnog) povezani su s brzorastućim promjenama klime na Zemlji, što je potaklo na zamjenu starih navika „zelenijim“. Zelena kemija relativno je nova grana kemije koja osmišljava i primjenjuje one kemijske produkte i procese kojima bi se smanjio negativan utjecaj kemikalija na okoliš i ljudsko zdravlje- ona nije program čišćenja, već prevencije (Tao i Kazlauskas, 2011). Kao program održivog razvoja kemijskih tehnologija, bitna je u zadovoljavanju potreba današnjice i budućnosti u proizvodnji uspostavljanjem kompromisa između ekoloških, ekonomskih i socijalnih aspekta. Jedan od ciljeva zelene kemije je i implementacija zelenih otapala, te je u takvom smislu izbor sigurnog, jeftinog, netoksičnog i biorazgradivog otapala glavni cilj u organskoj sintezi (Sperry i Garcia-Alvarez, 2016).

U mnogim industrijskim procesima, velike količine hlapljivih i zapaljivih organskih otapala se koriste u različitim reakcijskim sustavima i separacijskim koracima (Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Organska otapala su najčešće korišteni medij u provođenju kemijskih reakcija, utječu na kemo-, regio- i stereospecifičnost reakcije, a njihova najveća prednost je zadržavanje kemijske stabilnosti prilikom otapanja tvari. Otapala čine  $\approx 60\%$  svih industrijskih emisija te  $\approx 30\%$  emisija svih hlapljivih organskih tvari na planeti (Anastas i Eghbali, 2010; Cvjetko Bubalo i sur., 2015). Većina takvih otapala su organske komponente iz naftnih derivata te time predstavljaju veliki problem za okoliš.

U knjizi „Green Chemistry: Theory and Practice“ 1998. godine, gdje se prvi put definira pojam zelene kemije, Anastas i Warner su objavili smjernice kojima bi se implementirala zelena kemija, a nazvani su principima zelene kemije. U jednom od 12 principa zelene kemije, spominje se potreba za sigurnijim otapalima i ostalim pomoćnim komponentama. Od tada, sve veći broj radova prezentira nova i potencijalna otapala te sustave otapala sa „zelenijim“ pristupom. Posljednjih godina, istražuju se zelena otapala koja bi zadržala tehnološka svojstva organskih otapala, ali s povoljnijim učinkom za ljude i okoliš te zamijenila štetna organska otapala u industriji. Idealno zeleno otapalo mora imati nisku cijenu, biti biorazgradivo, netoksično, lako dostupno i mora postojati mogućnost reciklacije istog (Clarke i sur., 2018).



Slika 1. Izbor idealnog otapala čini kompromis između nekoliko zahtjeva (Hackl i Kunz, 2018; Chemat i Vian, 2014)

Voda je prvi izbor od zelenih otapala zbog gore navedenih razloga (Slika 1). Voda je prirodni medij za kemijske reakcije, koristi se često u industrijskim procesima npr. oksidacije i halogenacija, a s druge strane je nezapaljiva, netoksična, lako je dostupna, cijena je niska te iskazuje neke prednosti kao što su neuobičajena selektivnost i primjena dvofaznih reakcijskih sustava. Međutim, slaba topljivost mnogih organskih spojeva u vodi te visoki energetske troškovi prilikom izdvajanja vode iz reakcijskih sustava ograničavaju njenu primjenu.

U skladu s Principima zelene kemije (Anastas i Warner, 1998), pokazalo se da postoji znatan broj bitnih kemijskih i industrijskih procesa u kojima se otapalo može u potpunosti izbjeći (Hackl i Kunz, 2018). Osim izbjegavanja organskih otapala, sustavi bez primjene otapala imaju prednost visoke energetske učinkovitosti i skraćenog vremena reakcija. Iako danas postoje procesi industrijske polimerizacije koji izbjegavaju upotrebu otapala, ova opcija nije isplativa kada energetske troškovi uslijed pregrijavanja (zbog nedostatka otapala) premašuju prednosti sustava bez otapala. Nadalje, otapala su često neizbježna zbog ključne uloge u otapanju krutina, prijenosu mase i topline, utjecaju na viskoznost te u koracima separacije i pročišćavanja (Cvjetko Bubalo i sur., 2015).

Prema Gu i Jerome (2013) postoji nekoliko kriterija koja bi zelena otapala trebala zadovoljavati, a tiču se njihove dostupnosti, cijene, mogućnost recikliranja, sinteze, toksičnosti, biorazgradivosti, stabilnosti, zapaljivosti, djelotvornosti, skladištenja i obnovljivosti. Naravno,

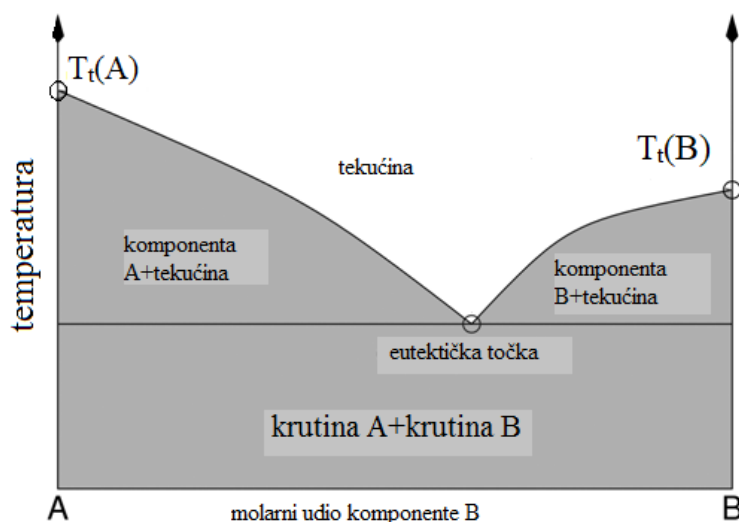
određeno zeleno otapalo najčešće ne zadovoljava sve od navedenih kriterija te je zbog toga potrebna procjena pojedinog otapala za svaki proces. Svaka vrsta zelenog otapala čini jedinstveni spoj svojstava i pridruženih tehnika za različite primjene, a odabir pogodnog otapala bi trebao uzeti u obzir empirijsko saznanje stečeno u okvirima zelene kemije (Dolzhenko i Dolzhenko, 2015). Nova i navodno neštetna otapala mogu se klasificirati kao zelena kada su ona u usporedbi s konvencionalnim otapalom „zelenija“ te postoje čvrsti dokazi koji to mogu potkrijepiti (Hackl i Kunz, 2018).

Kako bi se prevladali nedostaci organskih otapala i primjene vode u raznim industrijskim procesima, razvijaju se brojna neštetna, ekološki prihvatljiva, biorazgradiva i tzv. „pametna“ otapala kao što su ionske kapljevine, superkritične i subkritične tekućine te otapala iz prirodnih komponenata (prirodna niskotemperaturna eutektička otapala i prirodne ionske kapljevine) i obnovljivih izvora (npr. otapala dobivena iz derivata biljne biomase).

#### 2.1.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

##### 2.1.1.1. Svojstva niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) su nova generacija zelenih otapala koja predstavljaju mješavinu dvije ili više komponenti koje se međusobno povezuju vodikovim vezama. Povezivanjem nastaje eutektička mješavina čija je temperatura tališta znatno niža od temperatura tališta pojedinih komponenti od kojih je sačinjena (Paiva i sur., 2014). Najčešće se dobivaju kompleksacijom kvaterne amonijeve soli (ili neki nabijeni akceptor vodikovog atoma) s metalnom soli ili donorom vodikove veze (Smith i sur., 2014). Fazni dijagram dvokomponentnog eutektičkog sustava prikazan je na Slici 2. Pri određenom molarnom omjeru navedenih komponenti A i B, formira se eutektička mješavina pri znatno sniženoj temperaturi tališta, koja odgovara eutektičkoj točki. Depresija točke tališta nastaje zbog delokalizacije naboja uslijed stvaranja vodikovih veza između komponenti (Dai i sur., 2013; Barros i sur., 2017).



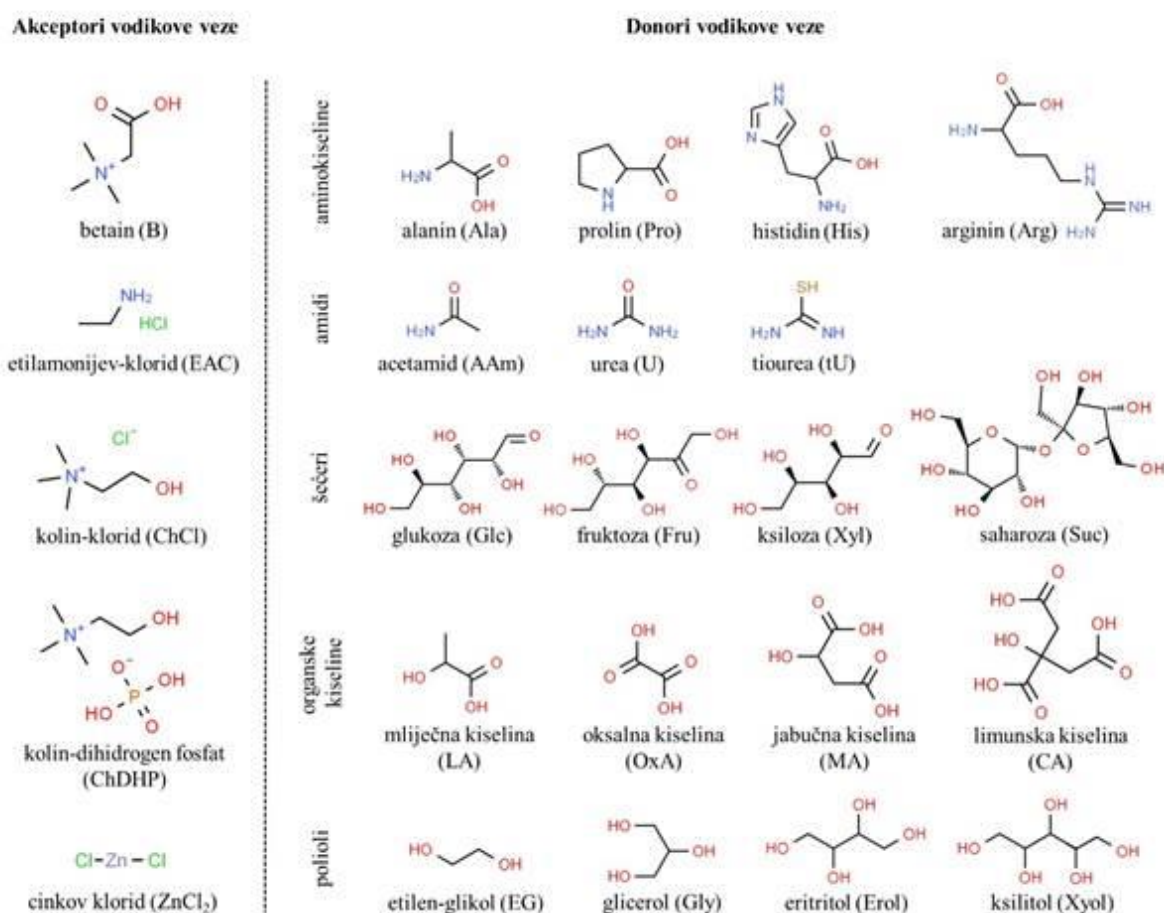
Slika 2. Shematski prikaz dvokomponentnog (A i B) faznog dijagrama;  $T_t(A)$ : temperatura tališta komponente A;  $T_t(B)$ : temperatura tališta komponente B (Smith i sur., 2014)

Zbog lake dostupnosti komponenti potrebnih za sintezu DES-ova, ova otapala se lagano pripremaju procesima zamrzavanja sušenjem ili miješanja sa zagrijavanjem (Yang, 2018). Broj molekula koje mogu tvoriti DES i mogućih kombinacija istih doseže  $10^6$ , a upravo zbog velike mogućnosti kombinacija te svestranosti u primjeni, smatra ih se tzv. „dizajniranim“ ili otapalima po mjeri (Paiva i sur., 2014; Pena-Pereira i Namiesnik, 2014; Wagle i sur., 2014; Carranza i sur., 2016). Niskotemperaturna eutekička otapala se smatraju novom generacijom ionskih kapljevine zbog nekih zajedničkih fizikalno-kemijskih svojstava, međutim, radi se o dvije različite vrste otapala, od kojih se trenutno intenzivnije istražuju DES-ovi zbog njihovih „zelenijih“ karakteristika kao što su niža cijena, lakša priprema, niža toksičnost i veće mogućnosti dizajna.

Kada su komponente koje čine niskotemperaturno eutekičko otapalo primarni metaboliti, kao što su aminokiseline, organske kiseline, šećeri ili kolinski derivati, tada se takvi DES-ovi nazivaju prirodnim niskotemperaturnim eutekičkim otapalima (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) (Paiva i sur., 2014). Smatraju se dobrom „zelenom“ alternativom klasičnim organskim otapalima zbog niza svojstava: niska hlapljivost i zapaljivost, niska toksičnost i pristupačna cijena, te prilagodljivih fizikalno-kemijskih karakteristika (mijenjanjem vrste i molarnog omjera komponenti) (Kovacs i sur., 2020).

Kada se govori o binarnim eutekičkim sustavima, ako mješavina prirodnih metabolita u određenom molarnom omjeru (obično je to 1:1) pri zadanoj okolnoj temperaturi prijeđe u

objedinjenu, prozirnu tekućinu, tada su ti prirodni produkti NADES (Liu i sur., 2018). Na Slici 3 prikazane su prirodne komponente koje se najčešće koriste u sintezi NADES-a. Spomenuti primarni metaboliti koji grade NADES-e su karakterizirani visokom polarnošću i hidrofilnošću, a njihova raznolikost može obogatiti svojstva NADES-a i proširiti njihovu primjenjivost. Također, moguć je dizajn višekomponentnih eutektičkih sustava. NADES-i se mogu pripremiti na 3 načina: zagrijavanjem uz miješanje na temperaturi od približno 80 °C, vakuum evaporacijom, gdje se komponente prethodno otope u vodi te podvrgnu isparavanju (Dai i sur., 2013), te procesom liofilizacije, gdje se komponente također prethodno otope u vodi prije sušenja zamrzavanjem (Gutierrez i sur., 2009).



Slika 3. Prirodne komponente koje se najčešće koriste za pripremu NADES-a (Radović i sur., 2021)

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala se pripremaju iz široko dostupnih prirodnih komponenti. Dakle, NADES-i mogu biti metabolizirani u većini organizama te su zbog toga visoko biokompatibilni. U usporedbi s konvencionalnim otapalima, NADES-i predstavljaju malu ili nikakvu opasnost za okoliš, mogu biti reciklirani i ponovno upotrebljeni.



Također, prinos sinteze NADES-a se može smatrati 100 %-tnim iz razloga što su ova otapala većinom smjese dviju komponenti, a s obzirom da njihova sinteza ne zahtijeva kemijsku reakciju, ekonomija atoma (engl. *atom economy*) ovog procesa je 100 % (Paiva i sur., 2014). Smatraju se ekološki prihvatljivim i zelenim otapalima te time imaju prednost pred organskim otapalima i ionskim kapljevina.

#### 2.1.1.2. Toksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Obzirom da su građeni od prirodnih komponenti, NADES-i se uglavnom smatraju netoksičnima, međutim, procjena njihove toksičnosti i biorazgradivosti neizostavni je dio istraživanja njihove sinteze i primjenjivosti (Radošević i sur., 2018). Iako ih se smatra „zelenijima“ od DES-ova, nedostatak podataka i istraživanja djeluju negativno na njihovu implementaciju. Međutim, zadnjih godina sve je veći fokus na procjeni sigurnosti ovih prirodnih otapala.

Istraživanja citotoksičnosti DES-ova provedena na račiću *Artemia salina* (Hayyan i sur., 2013) daju naznake da je toksičnost ovisna o sastavu, viskoznosti i koncentraciji otapala. U ovom istraživanju je također zaključeno kako dvokomponentni DES ima značajno veću toksičnost nego vodena otopina svake komponente pojedinačno. Hou i suradnici (2013) proučavali su toksičnost DES-ova i ionskih kapljevina prema enzimu acetilkolinesterazi (AChE) – esencijalnom enzimu u živčanom sustavu svih viših organizama i zaključili kako je inhibitorni učinak DES-ova za jedan red manji nego što je to kod ionskih kapljevina. Međutim, također su zaključili kako je ovaj učinak uvjetovan vrstama komponenti koje grade DES.

Paiva i suradnici (2014) proveli su prvi test citotoksičnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Test je proveden na staničnoj liniji L929 koja je tretirana sa 11 NADES-a, u usporedbi s 2 tipične ionske kapljevine. Četiri vrste NADES-a čije su komponente bile vinska i limunska kiselina rezultirale su smanjenom vijabilnošću stanica (kao što je slučaj i kod ionskih kapljevina), što upućuje na to da prisutnost nekih organskih kiselina može imati štetan učinak na stanice. Nadalje, Zhao i suradnici (2015) proveli su istraživanje kojim su dokazali kako NADES-i koji sadrže kiseline imaju antibakterijsko djelovanje. Iako je inhibitorni učinak uočen kod svih bakterija na kojima se provodilo testiranje- Gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*) i Gram-negativnih (*Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis*), činjenica da NADES-i imaju antibakterijsko djelovanje na visoko zaštitni lipopolisaharidni sloj Gram-negativnih bakterija je vrlo zanimljiva. Uvođenjem dodatne hidroksilne grupe u organske

kiseline, koji su donori vodikove veze u DES-ovima, povećava se njihova antibakterijska aktivnost (Zhao i sur., 2015; Wikene i sur., 2017).

Istraživanje utjecaja vode na citotoksični profil NADES-a, kao trojnog sustava s vodom, provedeno je na nekoliko linija humanih i mišjih tumorskih stanica (Hayyan i sur., 2016). Korišteni NADES-i su bili na bazi kolin klorida s 5 različitih donora vodika: fruktoza, glukoza, saharoza, glicerol i jabučna kiselina. Rezultati su pokazali očekivanu višu staničnu toleranciju prema prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima na bazi ugljikohidrata. S druge strane, NADES koji sadrži organsku kiselinu, pokazao se kao najštetnija eutektička smjesa. Ovi rezultati ukazuju da, s obzirom na donore vodikove veze, uključenje organskih kiselina povećava sveukupnu toksičnost NADES-a (Hayyan i sur., 2016). Radošević i suradnici (2018) su proučavali antimikrobni učinak prema bakterijama (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*) i kvascu (*Candida albicans*) te citotoksični učinak na humanim staničnim linijama (HEK293T, HeLa i MCF-7) deset različitih sintetiziranih NADES-a. Rezultati ukazuju kako kolin, betain, šećeri te šećerni alkoholi, kao građevni konstituenti NADES-a, nemaju utjecaj na antimikrobnu aktivnost otapala, urea je pokazala niski antimikrobni učinak, a NADES-i koji sadržavaju limunsku kiselinu su pokazali visoku stopu inhibicije rasta mikroorganizama, što ukazuje na potencijalnu primjenu kao anitmikrobnih agensa. Toksičnost različitih eutektičkih otapala može se povezati s njihovom pH vrijednosti (Radošević i sur., 2018), dolazi do inhibicije rasta mikroorganizama zbog oštećenja stanične membrane i njezinih proteina uslijed visoke kiselosti (Stratfor i sur., 2009; Gauniya i sur., 2010; Juneidi i sur., 2016). Svi testirani mikroorganizmi, osim *Candida albicans*, pokazali su relativno visoku osjetljivost na ispitivane NADES-e. Utjecaj NADES-a na bakterijske membrane još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da ovisi o topljivosti velikog broja tvari (primjerice komponente bakterijske membrane), pH vrijednosti, osmolalnosti ili kelaciji divalentnih kationa vezanih na membranu (Wikene i sur., 2017). Također, moguća je parcijalna disocijacija NADES-a u vodenoj otopini te interakcija kolinijuskog kationa s polisaharidnim lancima, što konačno dovodi do uništenja stanične stijenke (Wen i sur., 2015). Četiri različite vrste NADES-a na bazi kolin klorida (Ch), s oksalnom kiselinom (OX), ureom(U), ksilitolom(Xyol) i sorbitolom(Sor), testirane su na HeLa, MCF-7 i HEK293T stanicama. Najveći inhibitorni efekt uočen je za otapalo ChOX u tumorskim HeLa i MCF-7 stanicama, dok je njegov inhibitorni utjecaj na normalne HEK293T stanice bio manji. Ovo zapažanje potvrđuje raniju pretpostavku (Radošević i sur., 2015) kako formiranje kristala kalcijevog oksalata unutar stanica ima štetni utjecaj na tumorske i normalne

stanice. Jači inhibitorni efekt na tumorske stanice može se objasniti kroz veće potrebe tumorskih stanica za energijom i medijem, pa time i većim unosom ChOX. Neke studije su zabilježile kako DES i NADES povećavaju permeabilnost lipidne membrane eukariotskih stanica (Hayyan i sur., 2013; Mbous i sur., 2017). Također, zanimljivo zapažanje o proliferativnom učinku otapala betain:jabučna kiselina:prolin može se objasniti sinergističkim djelovanjem komponenti otapala na osmolarnost medija, povećano pribavljanje energije te na sintezu proteina (Radošević i sur., 2018).

Iako je obavljen niz znanstvenih studija na različitim modelnim sustavima od bakterija do staničnih linijama, potrebno je i dalje istraživati toksičnost NADES-a budući da se prepostavka da su NADES-i niske toksičnosti ili netoksični, zbog činjenice da su građeni od prirodnih sirovina, pokazala djelomično točnom. Iz tog razloga potrebno je provesti još studija (cito)toksičnosti kako bi se steklo šire znanje o ovim otapalima te kako bi se ona mogla sigurno primjenjivati.

#### *2.1.1.3. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala*

Intenzivnija istraživanja u području niskotemperaturnih eutektičkih otapala pojavljuju se početkom ovog stoljeća te se DES-ove smatra zelenim otapalima 21. stoljeća, a na području njihovog ponašanja, svojstava, dizajna i primjenjivosti se i dan danas intenzivno objavljuju radovi. Od ekstrakcije do krioprezervacije stanica, terapijskih agensa i proteinskih stabilizatora, DES-ovi su se pokazali svestranim otapalima primjenjivim u raznim područjima istraživanja od kemije, prehrambene tehnologije, do biomedicine i biotehnologije. DES-ovi su privukli pozornost kao otapala u organskoj sintezi i biokatalizi, proizvodnji polimera, elektrokemiji, nanomaterijalima, separacijskim procesima i analizi, biomedicinskoj primjeni i ekstrakciji biološki aktivnih komponenti iz biljnih materijala (Tang i Row, 2013; Paiva i sur., 2014; Hayyan i sur., 2016). Prve primjene niskotemperaturnih eutektičkih otapala na bazi kolina su bile u području elektrodepozicije i elektropoliranja metala te u proizvodnji biodizela. DES-ovi pokazuju visoku topljivost prema solima metala (Smith i sur., 2014), što im daje prednost pred vodenim i organskim elektrolitima u procesu površinske zaštite i obrade metala. Istraživanja primjene DES-ova u sintezi i formaciji nanomaterijala su se pokazala uspješnim, posebice u samo-formiranju nanočestica zlata.

Primjene DES-ova koje uključuju separacijske procese, analizu te dobivanje prirodnih bioaktivnih komponenti ili metalnih iona iz njihovih izvora oslanjaju se na sposobnost eutektičkih otapala da odvoje ciljanu komponentu od ostalih otopljenih tvari. Zbog sposobnosti

primanja i davanja protona i elektrona, DES-ovi čine dobre ekstrakcijske agense. Potvrđeno je da niskotemperaturna eutektička otapala imaju visoku sposobnost ekstrakcije fenolnih spojeva, zbog nastajanja stabilne i jake vodikove veze između fenolnih spojeva i komponenata otapala (Dai i sur., 2013). Kao podvrsta eutektičkih otapala, NADES-i se istražuju u velikoj mjeri, a istraživanja pokazuju kako imaju veći prinos ekstrakcije fenolnih komponenti u usporedbi s konvencionalnim otapalima kao što su voda i etanol (Paiva i sur., 2014). S obzirom da mogu otopiti i polarne i nepolarne metabolite (Biswas i sur., 2006), predviđa se kako mogu služiti kao otapala za ekstrakciju raznih vrsta prirodnih komponenti, ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima pojedinog NADES-a. Također, kompatibilnost termodinamičkih svojstava NADES-a s tekućinskom kromatografijom ukazuje na to kako su NADES vrste prikladne kao medij za kromatografiju (Liu i sur., 2018).

U literaturi postoje podaci koji povezuju aktivnost, stabilnost i strukturu enzima s njegovim katalitičkim učinkom u kombinaciji s korištenjem niskotemperaturnih eutektičkih otapala, ali je potrebno još istraživanja kako bi se mogao izvući zaključak o utjecaju DES-ova na enzime. Međutim, većina biokatalitičkih reakcija provedenih s DES-ovima pokazuju značajan porast stabilnosti reaktanata i produkata praćen s povećanom topljivošću enzima i kemijskom inertnošću (Štěpánková i sur., 2014; Juneidi i sur., 2017). Nadalje, dolazi i do povećanja enantio- i regioselektivnosti enzima, čime se poboljšava njegov učinak. DES-ovi se uvelike istražuju u procesima biotransformacija gdje se mogu koristiti kao kootapalo s vodom, kao sekundarna faza u DES-voda sustavu ili kao nehlapljiva alternativa za bezvodno otapalo (Smith i sur., 2014). Obzirom da su biotransformacije s mikroorganizmima ograničene na bezvodne DES-ove, razvijeni su sustavi ugradnje liofiliziranih cjelovitih stanica u DES, čime se zadržava čvrstoća i vijabilnost bakterija. Općenito, korištenje NADES-a u biokatalizi pomoću cijelih stanica pokazalo se djelotvornim, vjerojatno zbog prekida integriteta staničnih membrana i povećanja njihove permeabilnosti (Yang, 2018).

Zbog niske toksičnosti, biorazgradivosti, biokompatibilnosti te mogućnosti svestrane primjene, primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala očekuje se i u području biomedicine i srodnih grana. Pokazalo se kako DES-ovi mogu otopiti razne djelatne farmaceutske tvari (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) te povećati njihovu topljivost, permeabilnost i apsorpciju, međutim, potrebno je provesti još istraživanja.

Uzimajući u obzir sve karakteristike niskotemperaturnih eutektičkih otapala i podatke o njihovoj primjeni kao medija u raznim područjima, bilo kao otapalo, kootapalo ili kao

katalizator za određene biološke procese, očekuje se njihova široka primjena u budućnosti u različitim područjima primjenjenih prirodnih znanosti, posebice u biotehnološkom, biomedicinskom, farmaceutskom i terapijskom području.

## 2.2. PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA U FARMACEUTICI

Jedan od najvećih problema današnjice u farmaceutskoj industriji jest proizvodnja dobro topljivih lijekova te načini dopremanja lijekova do ciljnog mjesta u organizmu. Nadalje, bitna je i sigurnost otapala koji se koristi u konačnoj formulaciji lijeka te njegova biodostupnost. Kako bi se prevladao problem niske topljivosti i/ili permeabilnosti lijekova, često se primjenjuju velike doze koje mogu uzrokovati potencijalnu sistemsku toksičnost i teške nuspojave. Farmaceutske inovacije sa ciljem rješavanja navedenih problema uključuju strategije kristalnog inženjerstva spojene s novim metodama primjene te novim sustavima isporuke lijeka kako bi terapija bila učinkovitija i prilagođena pacijentima (Duarte i sur., 2017). Nekoliko istraživanja predlaže DES-ove kao obećavajuća otapala za otapanje u vodi teško topljivih API-ja te kao zamjenu za konvencionalna otapala (Morrison i sur., 2009; Lu i sur., 2013; Li i Lee, 2016).

### 2.2.1. Otapanje teško topljivih spojeva

Djelatna farmaceutska tvar je biološki aktivna komponenta farmaceutskog proizvoda odnosno lijeka. Cilj dopremanja lijeka u ljudski organizam jest postizanje terapijskog učinka lijeka, uz istovremene minimalne nepovoljne i štetne učinke istog (Anselmo i Mitragotri, 2015). Kako bi API bio primjenjiv i imao dobru biodostupnost, potrebno ga je otopiti u vodenom mediju prije primjene. Dakle, loša topljivost lijekova u vodenom mediju predstavlja veliki problem, a istraživanja pokazuju kako je nezanemariv postotak novo razvijenih lijekova praktički netopljivo (Takagi i sur., 2006). Koliko je topljivost veliki problem za farmaceutsku industriju potvrđuju brojke koje kažu da je oko 40 % lijekova odobrenih za tržište i skoro 90 % molekula u razvoju slabo topljivo u vodi (Kalepu i Nekkanti, 2015). Osim što loša topljivost utječe na biodostupnost lijeka, ona utječe i na povećanje neželjenih nuspojava. Zbog navedenog, potrebno je pronaći nove strategije za formulaciju kako bi se riješio problem loše topljivosti API-ja. Kao funkcionalni tekući medij, NADES-i mogu otopiti prirodne i/ili sintetičke tvari koje su teško topive u vodi (Liu i sur., 2018). Uzimajući u obzir tu činjenicu, sigurnost NADES-a za okoliš i ljudsko zdravlje te prilagodljivost njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, upravo se ova zelena otapala razmatraju kao jedna od novih strategija u rješavanju problema topljivosti lijekova.

DES-ovi su se u velikoj mjeri istraživali kao alternativna otapala za otapanje API-ja, posebice za topičke formulacije. Još 1998. godine, Stott i suradnici su izvjestili o mogućnosti transdermalne dostave lijeka koristeći DES koji se sastavljen od ibuprofena i terpena. Phaechamud i suradnici (2016) su pomoću NADES-a mentol:kamfor u molarnom omjeru 1:1, koji se pokazao kao dobro biokompatibilno otapalo za ibuprofen, uspjeli poboljšati topljivost ibuprofena za skoro 400 puta, u odnosu na topljivost u vodi. Općenito, topljivost ibuprofena može se povećati za čak 5400 puta koristeći DES kao otapalo umjesto vode (Lu i sur., 2013). Istraživanja topljivosti u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima provedena su na raznim skupinama API-jima: drugim ne-steroidnim protuupalnim lijekovima (naproksen, ketoprofen i piroksikam), antifungalnim tvarima (itraconazol i posakonazol) te anestheticima (lidokain) i analgeticima (acetaminofen) (Lu i sur., 2013; Li i Lee, 2016; Shekaari i Zafarani-moattar, 2017). Određivanjem topljivosti različitih tvari u vodenim otopinama pojedinih komponenti koje sačinjavaju DES, ustanovljeno je kako se optimalna topljivost u ovim otapalima postiže samo kada su prisutne obje komponente koje čine taj DES (Morrison i sur., 2009). Dakle, dobra topljivost nije uzrokovana kompleksacijom API-ja s komponentama DES-a, već je posljedica sinergističkog učinka eutektičke smjese.

Osim pozitivnog utjecaja na topljivost, nedavno je ustanovljeno kako DES-ovi povoljno utječu i na kemijsku stabilnost API-ja (Pedro i sur., 2019). Poznato je kako se API-ji razgrađuju kroz različite puteve te da su nestabilni u vodenim otopinama, posebice tvari koje sadrže estere - kao što je aspirin, koji uslijed dugog skladištenja u vodenom mediju bude razgrađen hidrolizom (Blessy i sur., 2014). Lu i suradnici (2013) dokazali su kako je hidroliza aspirina u salicilnu i octenu kiselinu 8,2 puta sporija u DES-u kolin klorid:1,2-propandiol, nego što je to u vodenom mediju. Nadalje, pokazano je da eutektička smjesa betain:urea poboljšava stabilnost  $\beta$ -laktamskih antibiotika, kao što su imipenem i klavulanska kiselina, u odnosu na vodene otopine (Olivares i sur., 2018). Poboljšanjem ove dvije bitne karakteristike - topljivosti i stabilnosti, direktno se utječe na biodostupnost API-ja. Otapanjem nekih djelatnih farmaceutskih tvari u DES-ovima, zabilježena je povećana oralna apsorpcija ciljanog lijeka (Faggian i sur., 2016) te povišene koncentracije djelatne tvari u krvi (Sut i sur., 2017).

Karakterizacija formulacijskog sustava u smislu brzine otapanja, topljivosti i permeabilnosti, najbitnija je stavka u određivanju odgovarajuće doze i načina primjene lijeka (Duarte i sur., 2017). Iako se eutektičke smjese čine dobrom strategijom za rješavanje problema topljivosti, stabilnosti i biodostupnosti različitih API-ja, potrebna je detaljna procjena

citotoksičnosti svakog DES-a, kao i proučavanja interakcija unutar sustava API-DES, prije implementacije takvih formulacija u farmaceutske svrhe.

### 2.2.2. Terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala

Jedna od strategija poboljšanja topljivosti djelatnih farmaceutskih tvari jest pretvorba API-ja u tekuće stanje putem formulacije DES-a koji sadrži aktivnu komponentu, odnosno tvorba API-DES sustava. Ovi bioaktivni eutektički sustavi, koji sadrže API kao komponentu koja tvori DES, definiraju se kao terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*, THEDES), a predloženi su kao poboljšani transporteri i sustavi dostave bioaktivnih molekula (Aroso i sur., 2015). Formulacijom THEDES-a, sami API-ji, kao jedan od njihovih sastojaka, mogu imati poboljšana svojstva, odnosno mogu se riješiti problemi vezani uz topljivost, biodostupnost i prolazak aktivnih tvari kroz biološke membrane. Pripravom THEDES-a se od krutih nemješljivih komponenti dobije tekuća homogena otopina, a dobivanje lijeka u formi tekućine ima nekoliko prednosti, primjerice nenastajanje polimorfnih kristalnih oblika, što ima negativan utjecaj na učinkovitost API-ja. Također, snižena temperatura tališta omogućuje procesiranje pri nižim temperaturama, čime se izbjegava degradacija djelatne tvari. DES-ovi se intenzivno istražuju u područjima farmaceutike i biomedicine, posebice zbog činjenice da eutektičnost može podešavati topljivost i permeabilnost nekih komponenti, uključujući i API-je (Aroso i sur., 2015; Pereira i sur., 2019).

Priprava THEDES-a rezultira 100% čistim produktom, stoga nema gubitaka tijekom sinteze te nema potrebe za naknadnim koracima pročišćavanja ili izdvajanja (Paiva i sur., 2014; Duarte i sur., 2017). Također, prijenos u veće mjerilo (engl. *scale-up*) procesa koji primjenjuje ovakav sustav relativno je jednostavan, što je od velike važnosti za farmaceutsku industriju (Schultheiss i Newman, 2009; Duarte i sur., 2017).

Stott i suradnici (1998) su prvi opisali THEDES sustav koji se sastojao od mentola i ibuprofena, a cilj je bio poboljšanje kožne permeabilnosti i razvoj transdermalnog sustava dostave pomoću THEDES-a. Priprema DES-a sa terapeutskih svojstvima, koji se sastoji od mentola, kamfora i ibuprofena, pokazala se obećavajućom, s obzirom da se ibuprofen u ovakvoj formulaciji znatno bolje otapa nego u vodi (Tuntarawongsa i Phaechamud, 2012). Značajno poboljšanje topljivosti benzojeve kiseline, danazola, grizeofulvina i itraconazola za 5-22 000 puta u eutektičkim sustavima urea:kolin klorid i jabučna kiselina:kolin klorid uočili su Morrison i suradnici (2009). Topljivost glukokortikoida deksametazona, koji je teško topiv u vodi, poboljšana je formulacijom THEDES-a s kolin kloridom i askorbinskom kiselinom, dok su

istovremeno sačuvane antioksidativne karakteristike askorbinske kiseline (Silva i sur., 2018). Antibakterijski API-ji kao što su benzojeva, fenilacetatna i acetilsalicilna kiselina u THEDES formulaciji zadržavaju svoja antimikrobna svojstva (Aroso i sur., 2016). Mogućnost poboljšanja permeabilnosti THEDES-a pokazali su Wang i suradnici (2014) na sustavu lidokain:ibuprofen. Mijenjanjem i podešavanjem molarnih omjera tvorbene komponenti može se poboljšati permeabilnost takvog sustava, odnosno formulacije, što ukazuje na mogući razvoj dizajniranih transdermalnih sustava za dostavu lijeka. Duarte i suradnici (2017) su ustanovili povezanost između topljivosti i permeabilnosti ibuprofena, tako što su uočili porast permeabilnosti koji je bio proporcionalan s poboljšanom topljivošću ibuprofena.

U tekućkoj formi, THEDES-i se mogu impregnirati u polimerne matrice ili inkapsulirati u čestice te tvoriti nove i dizajnirane sustave za dostavu lijeka. Kombinacijom THEDES-a sa prirodnim biorazgradivim polimerom i superkritičnim ugljikovim dioksidom moguće je razviti potencijalno djelotvoran sustav isporuke lijeka (Aroso i sur., 2015). Također, sinteriranjem superkritičnim fluidom te koristeći THEDES s različitim koncentracijama deksametazona, pripremljen je kontrolirani sustav dostave lijeka baziran na kaprolaktonskom polimeru koji se može koristiti u tkivnom inženjerstvu te novim potencijalnim terapeutima (Silva i sur., 2018).

THEDES sustavi, osim utjecaja na topljivost lijeka u izotoničnoj otopini, utječu pozitivno i na permeabilnost lijeka, a mijenjanjem fizikalnih stanja API-ja iz krutog u tekuće stanje u formi THEDES-a, pokazalo se jednostavnim rješenjem za poboljšanje biodostupnosti djelatne farmaceutke tvari (Duarte i sur., 2017). Razvoj terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala povećava potencijal eutektičkih sustava te otvara nove smjerove u budućim postignućima na području farmacije, biomedicine i u razvoju biomaterijala.

### 2.3. PRIRODNA NISKOTEMPERATurna EUTEKTIČKA OTAPALA U RAZVOJU ANTIDOTA

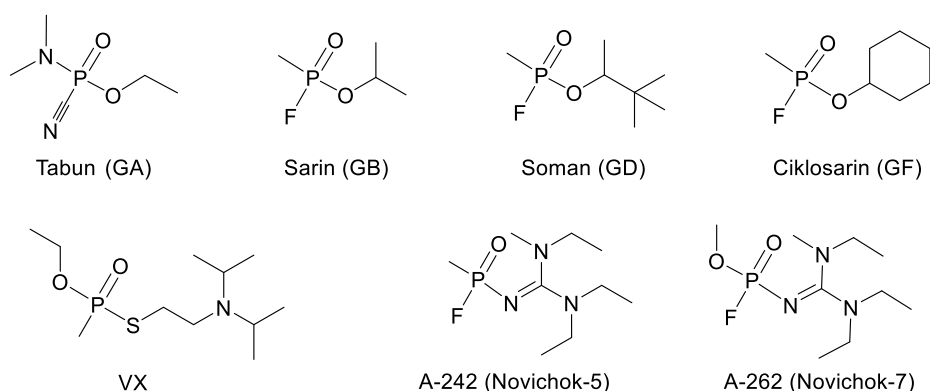
Veliki broj kemijskih spojeva, već prisutnih u okolišu ili sintetiziranih, može biti izvor težih ili lakših, slučajnih ili namjernih otrovanja. Do otrovanja može doći fizičkim kontaktom s kemikalijom ili unošenjem te tvari u organizam, a učinak same kemikalije će ovisiti o dozi tvari, vremenu djelovanja te ostalim čimbenicima. Kako bi se smanjio štetni utjecaj, razvijaju se sredstva koja suzbijaju djelovanje tvari i ublažuju posljedice kod otrovanja – protuotrovi, odnosno antidoti. Često su antidoti spojevi slabe ili nikakve topljivosti u vodi, a problem je naći pogodno otapalo koje samo po sebi ne bi bilo toksično za organizam. Zbog toga je proučavanje



NADES-a kao mogućih otapala takvih spojeva, ali i drugih farmaceutskih pripravaka, od velikog interesa.

### 2.3.1. Organofosforni spojevi i acetilkolinesteraza

Jedna skupina kemijskih tvari koje mogu izazvati otrovanje kod ljudi su organofosforni (OP) spojevi, prvotno razvijeni kao pesticidi za poljoprivredne svrhe. Za vrijeme Drugog svjetskog rata, zbog neselektivne toksičnosti, razvijaju se i kao živčani bojni otrovi tabun, sarin, soman, ciklosarin – tzv. G-serija, VX te u novije doba Novichock serija (Slika 4).



Slika 4. Struktura organofosfornih inhibitora AChE, živčani bojni otrovi G serije, VX i predstavnici Novichock serije (Carlsen, 2019)

Živčani bojni otrovi su zabranjeni Konvencijom o kemijskom oružju za čije provođenje je odgovorna Organizacija za zabranu kemijskog oružja (engl. *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*, OPCW), međutim još uvijek su prijetnja osobito u terorističkim napadima kao nedavno u Engleskoj, a korišteni su i u ratu u Siriji. (Dolgin, 2013; Stone, 2018; Carlsen, 2019). Živčani bojni otrovi G serije su hlapljive tekućine uglavnom bez mirisa i boje koje lako isparavaju za razliku od VX-a koji je uljast i lipofilniji, ali ujedno i najopasniji od spomenutih (Wiener i Hoffman, 2004; Delfino i sur., 2009).

Izlaganje nenabijenim, lipofilnim OP spojevima, bilo pesticidu ili živčanom bojnom otrovu, uzrokuje ireverzibilnu inhibiciju enzima acetilkolinesteraze (AChE, EC 3.1.1.7) u perifernom i središnjem živčanom sustavu.

Enzim AChE je serinska hidrolaza  $\alpha/\beta$  strukture (Soreq i Seidman, 2001) čije je aktivno mjesto oblika ždrijela dubokog 20 Å i širokog 5 Å (Taylor i Radić, 1994; Nachon i sur., 2003). Podijeljeno je na pet strukturnih jedinica: periferno mjesto na ulazu u ždrijelo, mjesto vezanja kolina, acilni džep, oksianionska šupljina i na dnu ždrijela je estersko mjesto koje čini

katalitička trijada histidin-glutaminska kiselina-serin (Taylor i Radić, 1994). AChE je od iznimne važnosti za očuvanje homeostaze organizma budući da je njezin fiziološki supstrat, acetilkolin, jedan od prijenosnika živčanih impulsa. Hidrolizom acetilkolina AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkim sinapsama centralnog i perifernog živčanog sustava (Stryer, 1991; Taylor i Radić, 1994).

U organizmu postoji i strukturno sličan enzim, butirilkolinesteraza (BChE, EC 3.1.1.8). Iako njegova uloga još nije do kraja razjašnjena, zna se da sudjeluje u biotransformaciji i aktivaciji raznih ksenobiotika, može hidrolizirati i acetilkolin, a djeluje i kao biološko čistilo organizma od OP spojeva (koji također ireverzibilno inhibiraju BChE) te se na taj način štiti AChE od inhibicije (Chatonnet i Lockridge, 1989; Cokugras, 2003).

Akutna toksičnost OP spojeva rezultat je ireverzibilne inhibicije AChE zbog stvaranja kovalentne veze između OP spoja i serina katalitičke trijade AChE, čime ovaj esencijalni enzim gubi svoju fiziološku ulogu u organizmu (Holmstedt, 2000). Posljedično dolazi do nakupljanja acetilkolina u sinapsama perifernog i središnjeg živčanog sustava te prekomjerne stimulacije nikotinskih i muskarinskih membranskih receptora, što se manifestira simptomima trovanja (tzv. kolinergička kriza), koji sežu od blagih (suženje zjenica, suženje očiju, slinjenje, glavobolje...) do onih ozbiljnih kao što su grčevi, paraliza mišića te u konačnici i dijafragme, što može rezultirati smrću uslijed gušenja (Weiner i Hoffman, 2004; Maček Hrvat i Kovarik, 2019). Kronične posljedice izlaganja OP spoju odražavaju se na središnji živčani sustav, imunosni i reproduktivni sustav, a posljedice se vide i na nekim organima te u vidu mutagene toksičnosti (Etemad i sur., 2014). Procjenjuje se da je broj otrovanja OP spojevima, uglavnom pesticidima, oko 3 000 000 godišnje te da je broj smrtnih slučajeva oko 300 000 godišnje (Eyer, 2003). Zbog svega navedenog, zadnjih sedam desetljeća istraživanja su usmjerena prema pronalasku učinkovitih reaktivatora inhibirane AChE, koji djeluju kao antidoti u slučaju izloženosti OP spoju.

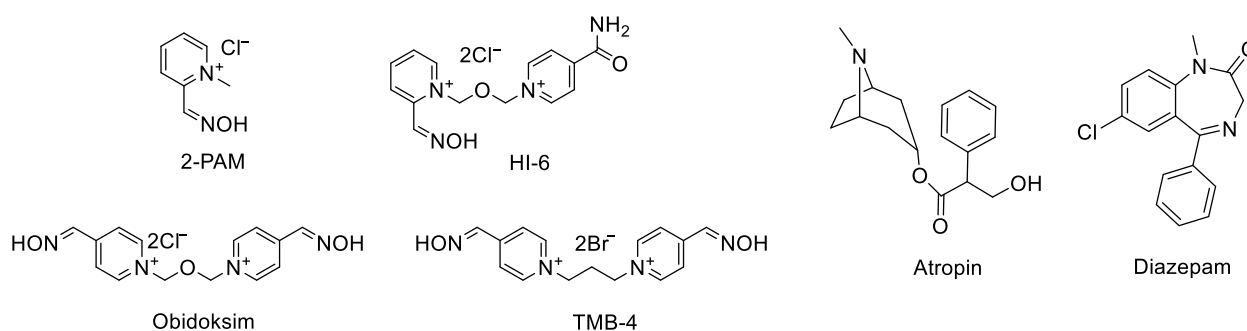
### 2.3.2. Reaktivatori fosfilirane AChE

Nakon inhibicije AChE moguće su tri reakcije: regeneracija fosfilirane AChE vodom (koja je jako spora), reaktivacija inhibiranog enzima oksimom ili dealkilacija fosfilirane AChE (tzv. starenje) čime enzim ostaje trajno inhibiran i gubi svoju katalitičku aktivnost u potpunosti (Hobbiger, 1963; Holmstedt, 2000; Masson i sur., 2010).

Budući da se na regeneraciju AChE hidrolizom ne može računati, za vraćanje enzimske aktivnosti istražuju se reaktivatori odnosno spojevi koji su jači nukleofili od vode, kao što su

oksimi. To su heteroaromatski spojevi s kvaternim dušikom i oksimskom skupinom (CH = NOH) koji mogu vratiti aktivnost fosfilirane AChE prije nego što enzim „ostari“. Nukleofilnim napadom oksimatnog aniona na atom fosfora fosfiliranog katalitičkog serina AChE raskida se kovalentna veza između OP-AChE konjugata. Produkti ove reakcije su fosfilirani oksim i katalitički aktivna AChE (Hobbiger, 1963). Na ovom saznanju utemeljen je razvoj antidota.

Terapija, da bi bila učinkovita mora biti primjenjena u što kraćem vremenu nakon izloženosti OP spoju. U slučaju otrovanja OP spojem terapija se sastoji od atropina, oksimskog reaktivatora inhibirane AChE i, po potrebi, antikonvulzanta kao što je diazepam (Slika 5).



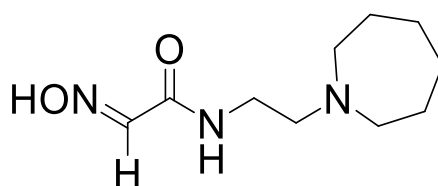
Slika 5. Standardni oksimi odobreni za korištenje kao antidoti, antimuskarinik atropin i antikonvulzant diazepam koji se koriste u terapiji otrovanja OP spojevima

Atropin je antagonist muskarinskih receptora i ne djeluje na ublažavanje simptoma koji su posljedica prekomjerne stimulacije nikotinskih receptora. Standardni oksimi koji su odobreni i koriste se trenutno u terapiji su 2-PAM, HI-6, obidoksim i TMB-4 (Slika 5). Međutim, njihova učinkovitost se razlikuje ovisno o OP spoju kojim je AChE inhibirana i ograničena je na periferni živčani sustav, budući da ovi nabijeni spojevi ne mogu prijeći krvno-moždanu barijeru u dovoljnoj koncentraciji za uspješnu reaktivaciju sinaptičke AChE (Antonijević i Stojiljković, 2007; Lorke i sur., 2008; Thiermann i sur., 2013). Također, oksimi ne mogu reaktivirati ostarjelu AChE, mogu biti toksični te o tome ovisi njihova terapijska doza, a sami spojevi su reverzibilni inhibitori AChE (de Jong i Wolring, 1984; Dawson, 1994; Worek i sur., 2004; Lucić Vrdoljak i sur., 2006; Odžak i sur., 2007; Kovarik i sur., 2008; Katalinić i sur., 2017).

Posljednjih nekoliko godina interes je usmjeren prema tzv. centralno aktivnim reaktivatorima odnosno oksimima koji nemaju trajni naboj, što bi im omogućilo difuziju kroz krvno-moždanu barijeru, a s obzirom da su sklони protonaciji, nakon uspostavljanja pH

ravnoteže u mozgu protonirani oblik bi mogao reaktivirati fosfiliranu sinaptičku AChE (Mercey i sur., 2011; Sit i sur., 2011; Zorbaz i sur., 2018).

Između velikog broja sintetiziranih potencijalnih centralno aktivnih reaktivatora, zwitterionski hidroksiimino-acetamido alkilaminski oksim RS-194B (Slika 6) pokazao se vrlo perspektivnim. Vrlo uspješna *in vitro* reaktivacija AChE inhibirane VX-om, sarinom, ciklosarinom i paraoksonom (metabolit pesticida parationa), niska toksičnost, obećavajuća farmakokinetička svojstva te dobra *in vivo* učinkovitost u terapiji miševa i makaki majmuna izloženih različitim OP spojevima potvrđuju potencijal ovog oksima kao antidota u terapiji otrovanja OP spojevima (Radić i sur., 2012a; Radić i sur., 2012b; Sit i sur., 2018).



Slika 6. Centralno-aktivni reaktivator fosfilirane AChE, oksim RS-194B  
(N-(2-(-azepan-1-il) etil)-2-(hidroksiimino) acetamid)

Međutim, problem kod oksima koji nemaju naboj je njihova slaba topljivost u vodi - za ljude netoksičnom otapalu, a samim time i otapanje spoja u većoj koncentraciji pogodnoj za pripremu antidota, što ograničava njihovu potencijalnu primjenu. Zbog ovog razloga, potrebno je naći otapalo koje će osigurati dobru topljivost spoja te će ujedno biti netoksično za ljudsku primjenu. Također, dodatni pozitivni učinci otapala kao što su antioksidacijska svojstva i povoljan utjecaj na permeabilnost krvno-moždane barijere su poželjna. Upravo se NADES-i, kao netoksična otapala pogodna za otapanje u vodi teško topljivih spojeva i prilagodljivih fizikalno-kemijskih karakteristika, nameću kao potencijalna otapala za pripremu antidota.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

- Organofosforni spojevi, sarin (GB, O-izopropil metifosfonofluoridat) i VX (O-etil S-2-diizopropilaminoetil metil fosfonotiolat), NC Laboratory Spiez, Švicarska
- Acetiltiokolin jodid (ATCh), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD
- 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD
- Albumin govedeg seruma (BSA) Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, SAD
- Oksim RS-194B (N-(2-(azepan-1-il)etil)-2-(hidroksiimino)acetamid) je pripremljen kako je opisano u radu- Radić i suradnici (2012a) i dar je prof. Palmera Taylora.
- HCl, 36 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Izopropanol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Limunska kiselina monohidrat, p.a., T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- D- fruktoza, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka
- D(+)- glukoza, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Jabučna kiselina, 99 %, Acros Organica, New Jersey, SAD
- Deionizirana voda
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Zagreb
- Natrijev hidrogenfosfat bezvodni, Kemika, Zagreb

##### 3.1.2. Enzim

Humana rekombinanta acetilkolinesteraza (AChE), divljeg tipa, pripremljena je kako je opisano u radu- Cochran i suradnici (2011). Dar je profesora Palmera Taylora.

##### 3.1.3. Oprema

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Hladnjak (4 °C), Gorenje, Slovenija
- Analitički HPLC uređaj, 1260 Infinity II, Agilent Infinitylab, SAD

- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka
- Homogenizator- IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Orbitalni homogenizator/inkubator ES-20/60, Biosan, Riga, Latvija
- Tecan Infinite M200PRO čitač mikrotitarskih pločica, Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austrija
- CARY 300 spektrofotometar s termostatiranim kućištem, Varian Inc., Mulgrave, Australija
- MobiSpin G-50 kolonice za centrifugu, MoBiTech GmbH, Goettingen, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo AX205 Delta Range, Ohio, SAD

#### 3.1.4. Obrada podataka

- Microsoft Excel
- GraphPad Prism (verzija 6, GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD)

### 3.2. METODE RADA

#### 3.2.1. Sinteza prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES)

U ovom eksperimentu korišteno je 5 prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala navedenih u Tablici 1, koji su prethodno sintetizirani u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a.

Tablica 1. NADES-i sintetizirani i korišteni u ovom radu

<b>Prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo</b>	<b>Kratice</b>	<b>Omjer komponenti</b>	<b>Udio vode</b>
<b>Jabučna kiselina:fruktoza</b>	Ma:Fru	1:1	0 %
<b>D, L-mentol:kamfor</b>	D, L-men:Ca	1:1	0 %
<b>Kolin klorid:etilenglikol</b>	Ch:EG	1:2	30 %
<b>Betain:etilenglikol</b>	B:EG	1:2	0 %
<b>Limunska kiselina:glukoza</b>	Cit:Glc	1:1	30 %

U laboratorijsku bocu pomiješane su mase komponenti za sintezu NADES-a u određenom molarnom omjeru te odgovarajući volumen vode. Boca se stavi u orbitalni homogenizator/inkubator s miješanjem na 50 °C kroz 2 h. Nakon pripreme dobivena je homogena, bezbojna i prozirna smjesa. Sintetizirana otapala čuvana su na sobnoj temperaturi u zatvorenoj boci na tamnijem mjestu.

### 3.2.2. Procjena topljivosti oksima u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima korištenjem programa COSMO $therm$

Model COSMO-RS (*eng.* Conductor-like Screening Model for Real Solvents) smatra se jednom od najtočnijih računalnih *ab initio* metoda dostupnih za svrstavanje otapala. COSMO-RS je kvantno-kemijska metoda koja omogućava predviđanje kemijskog potencijala i termodinamičkih svojstava tekućih sustava, a bazirana je na strukturnim informacijama o komponentama (Eckert i Klamt, 2002) te se može primijeniti na bilo kojem organskom sustavu otopljenom tvar-otapalo (Sicaire i sur., 2018). Predstavlja kombinaciju elektrostatičke teorije i statističke termodinamičke obrade interaktivnih površina (Palmelund i sur., 2019). U izračunavanju optimalne geometrije molekula koristi se programski paket TmoleX i model COSMO. Pomoću programskog paketa COSMO $therm$  i odgovarajućih  $\sigma$ -profila dobivaju se  $\sigma$ -potencijali komponenta ili njihovih smjesa te kemijski potencijali, koji se dalje koriste u programu radi dobivanja svojstava kao što su koeficijent aktivnosti, ravnotežni tlak para, koeficijent raspodjele, topljivost te fazni dijagram. COSMO-RS pokazao se kao korisna metoda u modeliranju termodinamičke ravnoteže novih, složenih sustava kao što su ionske kapljevine ili eutektički sustavi (Diedenhofen i Klamt, 2010; Bezold i sur., 2017; Jelinski i Cysewski, 2018; Ozturk i sur., 2018; Ozutrk i Gonzalez-Miquel, 2019). COSMO-RS se može primjenjivati za predviđanje termodinamičkih svojstava otapala, drugih fizikalno-kemijskih svojstva otapala i otopljenih tvari kao i za predviđanje topljivosti molekula u NADES-u.

U softveru COSMO $therm$  prvo je potrebno unijeti .cosmo datoteku molekule čija se topljivost želi ispitati te molekule otapala opcijom *From database*, ako molekule već postoje u bazi podataka, ili *From File*, ako su molekule prethodno nacrtane i njihova geometrija optimirana u programu TmoleX.

Nakon unosa svih molekula odabire se opcija *Activity Coefficient* pod sekcijom *Properties*. Odabirom te opcije otvara se prozor u kojem se definira temperatura pri kojoj se ispituje topljivost. Definira se i sastav smjese, odnosno udio akceptora vodikove veze (*engl. Hydrogen Bond Acceptor*, HBA), donora vodikove veze (*engl. Hydrogen Bond Donor*, HBD)

te ispitivane tvari. Nakon toga odabire se *Add te Run Job local*. Kao rezultat proračuna dobije se logaritam koeficijenta aktivnosti,  $\ln(\gamma)$ , koji govori o topljivosti ispitivanog spoja u ispitivanom otapalu. Suma svih udjela mora biti jednaka 1. Ukoliko se kao udio odabere 0, izračunava se koeficijent aktivnosti te tvari (odnosno njegov logaritam) pri beskonačnom razrjeđenju. Veći koeficijent aktivnosti tvari znači njemu manju topljivost u promatranom otapalu.

### 3.2.3. Eksperimentalna provjera topljivosti

Topljivost oksima u konvencionalnom otapalu (voda uz dodatak 4 % 36 %-tnog HCl-a) i prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima ispitana je dodatkom 2,5 mg oksima u vodu s HCl-om te u 50  $\mu\text{L}$  svakog NADES-a koji se ispitivao. Smjesa je stavljena na homogenizator s regulacijom temperature na 24 °C kroz 24 sata radi miješanja. Nakon homogenizacije, smjesa se centrifugirala te razrijedila 100 puta s vodom. Koncentracija oksima RS-194B u otapalima kvantificirala se pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV detekcijom.

### 3.2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC metoda)

Kvantitativna i kvalitativna analiza oksima u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima provedena je upotrebom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV-DAD detektorom. Identifikacija i kvantifikacija provedena je metodom vanjskog standarda.

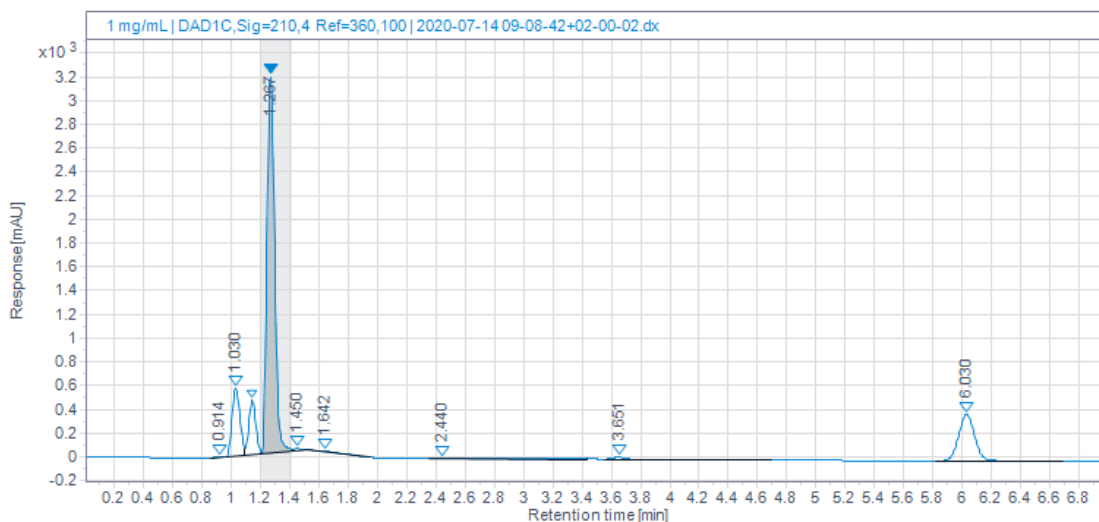
Kromatografski uvjeti:

- Kolona: Poroshell 120 EC-C18, Agilent InfinityLab, 2,1x150mm 4-Micron
- Pokretna faza: 80 % A- 0,1 % otopina HCl  
20 % B- acetonitril
- Eluiranje: izokratsko
- Vrijeme analize: 7 min
- Injektirani volumen: 5  $\mu\text{L}$
- Protok: 0,300 mL min<sup>-1</sup>
- Temperatura pećnice: 30 °C
- Detektor: Photodiode Array

Kromatogrami oksima RS194B određeni su na 210 nm, a spektrofotometrom su tijekom analiza određivani spektri u UV-VIS području (200-600 nm).

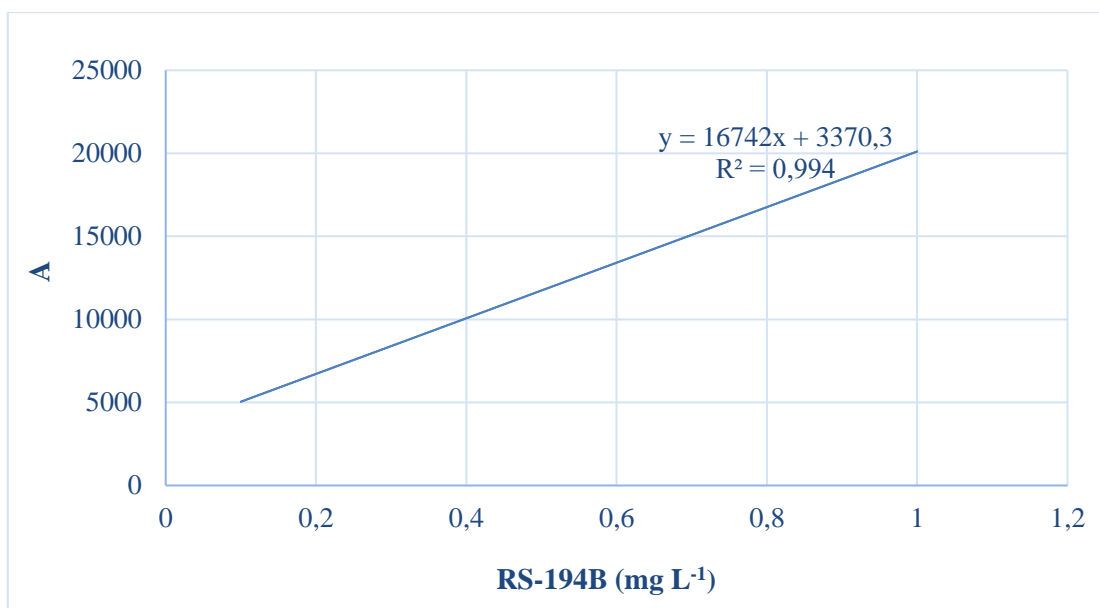


Identifikacija spoja provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva -s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom UV-spektara. Na Slici 7 prikazan je tipični kromatogram oksima RS-194B u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu.



Slika 7. Kromatogram oksima RS-194B u NADES-u

Kvantifikacija analiziranog spoja provedena je metodom vanjskog standarda oksima RS-194B: N-(2-(azepan-1-il)etil)-2-(hidroksiimino)acetamid. Površina pikova i masena koncentracija su postavljene kao ovisne veličine te je nacrtan baždarni pravac s pripadajućom jednadžbom (Slika 8). Iz jednadžbe pravca izračunata je koncentracija oksima.



Slika 8. Baždarni pravac za određivanje koncentracije oksima RS-194B

### 3.2.5. Stabilnost oksima

Stabilnost ispitivanog spoja, oksima RS-194B, ispitala se u NADES-u u kojem je oksim pokazao najbolju topljivost, te u vodi s 4 % 36 %-tnog HCl-a – kao referentnom otapalu oksima. Stabilnost se pratila kroz 30 dana na temperaturi od 4 °C i 25 °C. U određenim vremenskim intervalima mjerena je apsorbancija oksima. Rezultat se prikazuje kao graf ovisnosti omjera apsorbancije (mjerene na određeni dan i apsorbancije mjerene na početku,  $A/A_0$ ) o vremenu.

### 3.2.6. Provjera učinka formulacije oksima u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu na kinetiku acetilkolinesteraze

Prije svega je ispitan učinak NADES-a na aktivnost acetilkolinesteraze. Nadalje, kako bi se provjerilo djelovanje oksima otopljenog u prirodnim niskotemperaturnom eutektičnom otapalu na AChE i reaktivacijska učinkovitost ove formulacije oksima određeni su kinetički parametri reverzibilne inhibicije AChE i reaktivacije AChE inhibirane sarinom i VX-om te su uspoređeni s onima određenim za oksim otopljen u vodi.

#### 3.2.6.1. Određivanje aktivnosti AChE metodom po Ellmanu

Aktivnost AChE određena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu (Ellman i sur., 1961) pri 25 °C uz acetiltiokolin jodid (ATCh) kao supstrat i DTNB kao reagens. Hidrolizom ATCh nastaje tiokolin koji zatim reagira s tiolnim reagensom DTNB-om, a nastali anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline daje žuto obojenje reakcijskoj smjesi koje se može pratiti spektrofotometrijski. Porast apsorbancije odgovara intenzitetu obojenja, a prati se pri valnoj duljini od 412 nm i proporcionalan je aktivnosti enzima. Za mjerenja aktivnosti Ellmanovom metodom korišten je spektrofotometar CARY 300 (Varian Inc., Australija) s termostatiranim kućištem i kivete s optičkim putem od 1 cm ili Tecan Infinite M200PRO čitač mikrotitarskih pločica (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austrija).

Tijekom mjerenja aktivnosti kolinesteraza, promjena apsorbancije kod svih uzoraka bila je linearna s vremenom, odnosno mjerenja su provedena u uvjetima nepromjenjivosti početne koncentracije supstrata.

#### 3.2.6.2. Određivanje aktivnosti AChE u prisutnosti prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala

Utjecaj prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala na aktivnost enzima pratila se mjerenjem aktivnosti AChE u prisutnosti 0,02 do 5,0 % otapala u reakcijskoj smjesi. Za potrebe ovog mjerenja NADES je razrijeđen u vodi, a alikvoti NADES-a su resuspendirani u

reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 0,1 mol L<sup>-1</sup> natrij fosfatni puferi (pH 7,4) AChE i 0,3 mmol L<sup>-1</sup> DTNB, a reakcija je pokrenuta dodatkom supstrata ATCh (1 mmol L<sup>-1</sup> u reakcijskoj smjesi). Mjerenje enzimske aktivnosti provodilo se prema Ellmanovoj metodi (Ellman i sur., 1961) na 412 nm pri 25 °C na uređaju Tecan Infinite M200 Pro čitač mikrotitarskih pločica (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austrija), a podaci su obrađeni pomoću programa GraphPad Prism (verzija 6, GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD).

### 3.2.6.3. Reverzibilna inhibicija AChE

Kako bi se odredila konstanta disocijacije enzim-oksim kompleksa ( $K_i$ ) čija recipročna vrijednost ( $1/K_i$ ) je mjera afiniteta enzima za oksim te ispitalo da li je riječ o kompetitivnoj ili nekompetitivnoj inhibiciji enzima, mjerila se aktivnost AChE uz različite koncentracije inhibitora i raspon koncentracija supstrata.

Konstanta inhibicije određena je za inhibiciju AChE oksimom otopljenim u vodi (uz dodatak 36 % HCl i NaOH - RS-194B/H<sub>2</sub>O) i NADES-u (radna otopina RS-194B pripremljena je iz ishodne otopine RS-194B u NADES-u razrjeđivanjem iste u vodi - RS-194B/NADES). Koncentracije oksima odabrane su tako da osiguraju 20-80 %-tnu inhibiciju AChE, u odnosu na aktivnost kontrole (neinhibirana AChE). Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti AChE volumena 300 μL sadržavala je 0,1 mol L<sup>-1</sup> natrij fosfatni pufer, 0,3 mmol L<sup>-1</sup> DTNB, AChE, oksim/vodu/NADES (ovisno da li se radi o inhibiciji ili kontroli) te supstrat ATCh čijim je dodatkom započeto mjerenje. Kada je reverzibilna inhibicija rađena s RS-194B/NADES u kontrolu je dodan odgovarajući volumen NADES-a, a volumni udio NADES-a u reakcijskoj smjesi bio je ispod 0,2 % kako bi se izbjegao njegov inhibitorni učinak na AChE. Neenzimska reakcijska smjesa od svega nabrojanog nije sadržavala AChE. Sastav reakcijskih smjesa u pokusu reverzibilne inhibicije prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Reakcijske smjese u pokusu reverzibilne inhibicije AChE

<b>Reakcijska smjesa</b>	<b>Komponente reakcijske smjese</b>	<b>Ukupni volumen u reakcijskoj smjesi (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Konačna koncentracija</b>
<b>Inhibicija</b>	DTNB + AChE + 0,01 % BSA	130	0,3 mmol L <sup>-1</sup> DTNB 3 000 000 x razrijeđena AChE
	Na-fosfatni pufer + 100 mmol L <sup>-1</sup> RS-194B/H <sub>2</sub> O ili 100 mmol L <sup>-1</sup> RS-194B/NADES	120	0,1; 0,3; 0,5; 0,8 mmol L <sup>-1</sup> oksim RS-194B
	ATCh	50	0,1; 0,3; 0,5; 0,8 mmol L <sup>-1</sup>
<b>Kontrola</b>	DTNB + AChE + 0,01 % BSA	130	0,3 mmol L <sup>-1</sup> DTNB 3 000 000 x razrijeđena AChE
	Na-fosfatni pufer + H <sub>2</sub> O ili NADES	120	0,02; 0,06; 0,1; 0,16 % NADES
	ATCh	50	0,1; 0,3; 0,5; 0,8 mmol L <sup>-1</sup>
<b>Neenzimska reakcija</b>	DTNB + 0,01 % BSA	130	0,3 mM DTNB
	Na-fosfatni pufer + 100 mmol L <sup>-1</sup> RS-194B/H <sub>2</sub> O ili 100 mmol L <sup>-1</sup> RS-194B/NADES	120	0,1; 0,3; 0,5; 0,8 mmol L <sup>-1</sup> oksim RS-194B
	ATCh	50	0,1; 0,3; 0,5; 0,8 mmol L <sup>-1</sup>

Aktivnost enzima metodom po Ellmanu određivala se u pločici s 96 jažica na uređaju Tecan Infinite M200 Pro čitač mikrotitarskih pločica (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austrija). Vrijeme mjerenja za inhibicijsku i kontrolnu reakcijsku smjesu bilo je 3 minute, a za

neenzimsku reakciju 15 minuta. Vrijednosti određene za inhibiciju umanjene su za neenzimsku reakciju.

Iz dobivenih eksperimentalnih podataka o utjecaju koncentracije supstrata na stupanj inhibicije izračunata je prividna konstanta inhibicije enzima za određenu koncentraciju supstrata ( $K_{iapp}$ ) koja je definirana jednadžbom:

$$K_{iapp} = \frac{v_i * I}{v_0 - v_i} \quad [1]$$

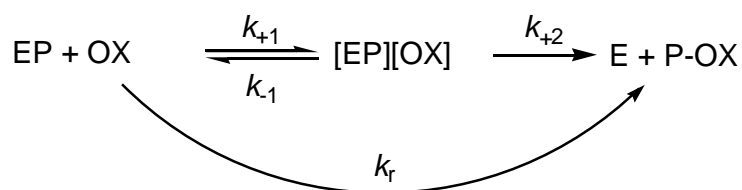
Gdje je  $v_0$  enzimska aktivnost u odsustvu inhibitora,  $v_i$  enzimska aktivnost uz inhibitor, a  $I$  je koncentracija inhibitora (oksima) u reakcijskoj smjesi. Konstanta disocijacije enzim-oksima kompleksa ( $K_i$ ) procijenjena je iz Hunter-Downs prikaza odvisnosti koncentracije supstrata i prividne konstante inhibicije  $K_{iapp}$ .

Podaci dobiveni eksperimentom su obrađeni u Microsoft Excelu i GraphPad Prism programu (verzija 6, GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD).

#### 3.2.6.4. Reaktivacija inhibirane AChE pomoću oksima RS-194B

Reaktivacija AChE inhibirane sarinom i VX-om određena je praćenjem vremenskog tijeka povratka aktivnosti fosfilirane AChE u prisutnosti oksima RS-194B/H<sub>2</sub>O i RS-194B/NADES.

Reaktivacija fosfilirane AChE oksimom opisana je na Slici 9.



Slika 9. Reakcija reaktivacije fosfilirane AChE oksimom

EP predstavlja fosfilirani enzim,  $[\text{EP}][\text{OX}]$  reverzibilni kompleks Michaelis-Menteninog tipa između EP i oksima (OX), E je slobodni enzim, P-OX fosfilirani oksim,  $k_{+1}$  i  $k_{-1}$  predstavljaju konstante brzina reakcije asocijacije, odnosno disocijacije  $[\text{E}][\text{OX}]$  kompleksa,  $k_{+2}$  je konstanta brzine reaktivacije prvog reda (odnosno konstanta brzine nukleofilnog uklanjanja vezanog inhibitora) a  $k_r$  ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda.

Reakcija reaktivacije (Slika 9) opisana je jednadžbom:

$$\ln \frac{[EP]_0}{[EP]_t} = \frac{k_{+2} * [OX]}{K_{OX} + [OX]} * t = k_{obs} * t \quad [2]$$

gdje su  $[EP]_0$  i  $[EP]_t$  koncentracije fosfiliranog enzima u vremenu 0 odnosno u vremenu  $t$ ,  $K_{OX}$  odgovara omjeru  $(k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$  te predstavlja disocijacijsku konstantu  $[EP][OX]$  kompleksa,  $k_{obs}$  je prividna konstanta brzine reaktivacije prvog reda za određenu koncentraciju oksima.

Rezultati mjerenja izraženi su kao maksimalni postotak reaktivacije enzima ( $Reakt_{max}$ ):

$$Reakt_{max} = \frac{v_{(EP+OX)_t}}{v_{(E+OX)}} * 100\% \quad [3]$$

gdje je  $v_{(EP+OX)_t}$  aktivnost reaktiviranog enzima oksimom u vremenu  $t$  dok je  $v_{(E+OX)}$  aktivnost neinhibiranog enzima u prisutnosti oksima (kontrolna aktivnost).

Prividna konstanta brzine reaktivacije prvog reda za određenu koncentraciju oksima ( $k_{obs}$ ) određena je nelinearnom regresijom prema jednadžbi:

$$Reakt = Reakt_{max} * (1 - e^{-k_{obs} * t}) \quad [4]$$

Ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda,  $k_r$ , izražena je kao omjer:

$$k_r = \frac{k_{+2}}{K_{OX}} \quad [5]$$

Za potrebe pokusa korištena je ishodna otopina AChE razrijeđena 400 puta u 1 % BSA. Kroz pokus je razrijeđena u nekoliko koraka da bi u reakcijskoj smjesi za određivanje aktivnosti AChE metodom po Ellmanu bila razrijeđena 3 000 000 puta, odnosno koliko je potrebno da aktivnost neinhibiranog enzima bude oko  $\Delta A/\text{min} = 0,1$ .

Pokus je započet 60-minutnim inkubiranjem enzima s 10 puta većom koncentracijom OP spoja da se postigne 95-100 % inhibicije. Inhibirani enzim je zatim profiltriran kroz MobiSpin Sephadex G-50 kolonicu prema uputama proizvođača kako bi se uklonio višak nekonjugiranog OP spoja. Budući da je kapacitet kolonice 50  $\mu\text{L}$  korišten je koncentriraniji enzim. Nakon filtracije, a prije početka same reaktivacije, enzim je razrijeđen do potrebne mjere u 0,1 %-tnoj otopini BSA u natrij fosfatnom puferu. Reaktivacija je započeta inkubacijom alikvota tako razrijeđenog inhibiranog enzima s odgovarajućom koncentracijom oksima (Tablica 3) u natrij fosfatnom puferu (reaktivacijski miks). Time je enzim razrijeđen još 10 puta. U različitim vremenskim intervalima od početka reaktivacije uzimani su alikvoti reaktivacijskog miksa te su razrijeđeni još 100 puta u reakcijskoj smjesi za mjerenje aktivnosti enzima metodom po Ellmanu, ukupnog volumena 1 mL, koja je sadržavala natrij fosfatni pufer i 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  DTNB. Mjerenje aktivnosti trajalo je 1,5 min i započeto je dodatkom ATCh (konačne koncentracije 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ ).

Tablica 3. Raspon koncentracija oksima korišten u reaktivaciji sarinom i VX-om inhibirane AChE

OP spoj	RS-194B/H <sub>2</sub> O ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	RS-194B/NADES ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
Sarin	0,5-5	0,05-5
VX	0,1-20	0,1-5

Na identičan način, istovremeno je kroz paralelnu Mobi Spin Sephadex G-50 kolonicu profiltriran neinhibirani uzorak enzima (umjesto OP spoja sadržavao je određeni volumen natrij fosfatnog pufera) koji je također razrijeđen do iste mjere kao i inhibirani enzim te je alikvot inkubiran u natrij fosfatnom puferu s istom koncentracijom oksima koja je korištena u reaktivaciji. Uzimanjem alikvota iz tog kontrolnog uzorka i daljnjim razrjeđivanjem u reakcijskoj smjesi za mjerenje aktivnosti enzima, izmjerena je kontrolna aktivnost neinhibiranog enzima u prisutnosti oksima.

Aktivnost enzima određena kod reaktivacije kao i kontrolna aktivnost umanjene su za vrijednost neenzimske reakcije između oksima i ATCh. Vrijednost neenzimske reakcije izmjerena je dodavanjem miksa koji je umjesto enzima ili inhibiranog enzima sadržavao natrij fosfatni pufer u reakcijsku smjesu za određivanje aktivnosti enzima po Ellmanu. Mjerenje se provodilo 3 min.

Iz dobivenih rezultata nacrtan je graf ovisnosti postotka reaktivacije dobiven za pojedinu koncentraciju oksima ( $Reakt_{max}$ , jednažba 3) o vremenu reaktivacije  $t$ . Prema jednažbi 4 određena je  $k_{obs}$ , te iz grafa ovisnosti  $k_{obs}$  o koncentraciji oksima parametri  $k_{+2}$  i  $K_{OX}$ , a  $k_r$ , je izračunat prema jednažbi 5.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Razvoj visokoučinkovitih i održivih procesa, u kemijskoj i prehrambenoj industriji te u području farmacije i biomedicine, posljednjih je godina postao predmet mnogih znanstvenih istraživanja. Krajem prošlog stoljeća definirano je novo područje istraživanja koje se naziva zelena kemija, kojim se nastoje razvijati novi neštetni sustavi i procesi te ako je moguće postojeće postupke učiniti „zelenijima“ primjenom novih znanja i tehnologija. Jedan od principa zelene kemije ističe potrebu za izborom sigurnijeg otapala, kako za ljude koji rade u proizvodnim procesima u kojima se koriste organska otapala, tako i za okoliš. Stoga se prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, nova generacija nehlapljivih i netoksičnih otapala, intenzivno istražuju kao zamjena za uobičajeno korištena štetna organska otapala.

Poboljšanje učinkovitosti lijekova koji su već u upotrebi glavni je interes farmaceutske industrije, a to poboljšanje se može postići, među ostalim, poboljšanjem topljivosti djelatne farmaceutske tvari koja čini osnovu lijeka. Iako je puno strategija predloženo u literaturi (Ahmed i Safaa, 2011), poboljšanje topljivosti, permeabilnosti i biodostupnosti djelatnih farmaceutskih tvari i dalje ostaje najveći izazov u razvoju lijekova. Zbog mogućnosti da otope tvari koje su teško topljive u vodi, NADES-i pokazuju veliki potencijal za primjenu u farmaceutskoj industriji. Osim utjecaja na topljivost, dokazano je kako NADES-i povoljno utječu i na stabilnost, permeabilnost i biodostupnost djelatnih farmaceutskih tvari (Wang i sur., 2014; Duarte i sur., 2017; Olivares i sur., 2018), posebice kada se tvori API-DES sustav, odnosno, terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo.

Antidoti kao djelatne tvari bitni su u sprječavanju akutnih i/ili kroničnih oblika otrovanja. Organofosforni (OP) spojevi, kao pesticidi ili živčani bojni otrovi, ireverzibilno inhibiraju esencijalni enzim, acetilkolinesterazu (AChE). Poznato je da spojevi s oksimskom skupinom djeluju kao antidoti u slučaju inhibicije AChE OP spojevima i koriste se u terapiji otrovanja istima. Budući da su oksimi koji su trenutno dozvoljeni za upotrebu nabijeni spojevi koji slabo prolaze krvno-moždanu barijeru, a njihova učinkovitost u perifernom živčanom sustavu varira s OP spojem konjugiranim s AChE, razvoj novih učinkovitih reaktivatora od velikog je interesa. U posljednje vrijeme istraživanja su usmjerena na tzv. centralno aktivne reaktivatore, molekule bez naboja, sklone protonaciji uslijed uspostavljanja pH ravnoteže, kao što je oksim RS-194B (Sit i sur., 2011; Radić i sur., 2012a; Radić i sur., 2012b). Antidotski potencijal ovog oksima pokazan je i *in vivo* u slučaju izloženosti miševa i makaki majmuna različitim OP spojevima (Rosenberg i sur., 2017; Rosenberg i sur., 2018; Sit i sur., 2018). Međutim, problem je njegova

slaba topljivost u vodi kao netoksičnom otapalu pogodnom za ljudsku upotrebu pa je pronalazak alternativnog otapala za pripremu formulacije RS-194B oksima od velikog interesa.

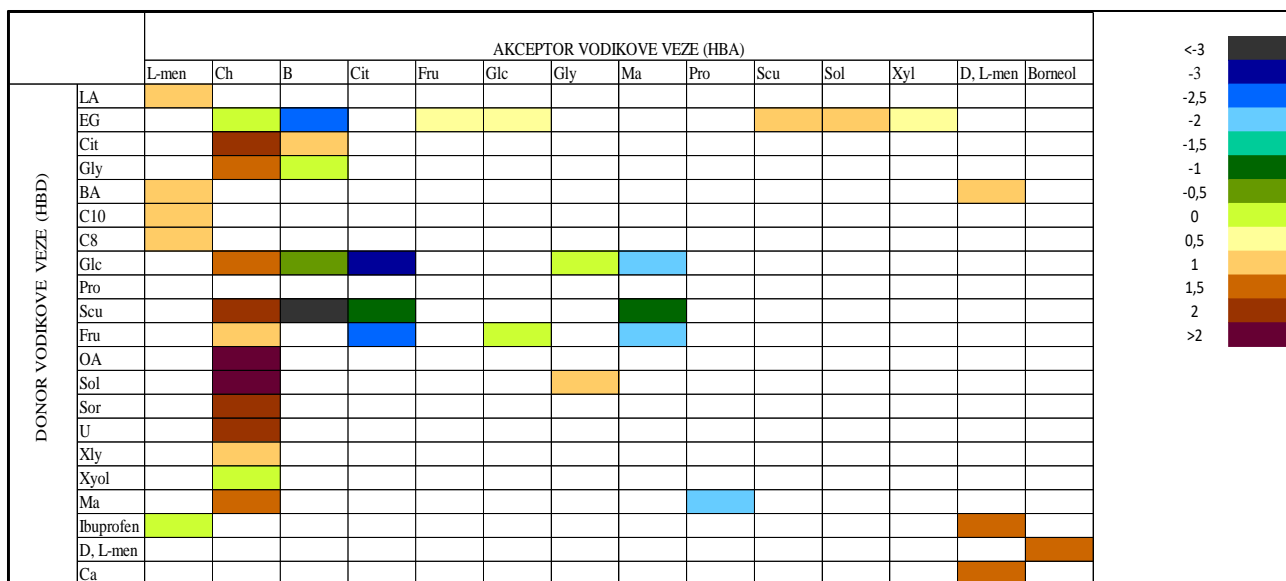
Ispitivanje NADES-a kao mogućih otapala za rješavanje problema topljivosti oksima RS-194B te u razvoju formulacije istog postavljeno je kao cilj ovog diplomskog rada. U svrhu toga, korišten je računalni model COSMO-RS za predviđanje topljivosti oksima RS-194B u nekoliko desetaka NADES-a nakon čega je s pet izabranih i eksperimentalno ispitana topljivost oksima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Na temelju rezultata topljivosti i usporedbom s topljivošću u dosad korištenom otapalu, vodi uz dodatak HCl-a, odabran je jedan NADES, koji je korišten u daljnjim eksperimentima praćenja stabilnosti oksima u NADES-u i referentnom otapalu pri različitim temperaturama tijekom mjesec dana. Ispitano je djelovanje odabranog NADES-a na aktivnost AChE i određen je inhibicijski učinak formulacije RS-194B/NADES i uspoređen s RS-194B otopljenim u vodi te je procijenjen afinitet acetilkolinesteraze za pojedinu formulaciju oksima. Kako bi se ispitaio reaktivacijski učinak RS-194B/NADES u odnosu na RS-194B/H<sub>2</sub>O određeni su kinetički parametri reaktivacije AChE inhibirane živčanim bojnim otrovima sarinom i VX-om.

#### 4.1.PROCJENA TOPLJIVOST OKSIMA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA POMOĆU PROGRAMA COSMOtherm

Predviđanje topljivosti oksima RS-194B u različitim NADES-ima provedeno je koristeći program COSMOtherm. Pomoću programa određeni su logaritmi koeficijenta aktivnosti,  $\ln(\gamma)$ , koji govore o topljivosti oksima u ispitanom prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu. Što je veći logaritam aktivnosti, to je manja topljivost oksima u odabranom otapalu. Molarni omjeri komponenti NADES-a s udjelom vode 0 % nalaze se u Tablici 4, a na Slici 10 navedeni su rezultati ispitivanja topljivosti RS-194B u istim. Procjena predviđene topljivosti napravljena je dodatno i za još NADES-a, čiji je udio vode bio 30 %, međutim, prikazani su rezultati samo za postotak vode od 0 %.

Tablica 4. Molarni omjeri komponenti NADES-a s udjelom vode 0 % za koje je ispitana topljivost oksima RS-194B primjenom programa COSMOtherm

NADES	MOLARNI OMJER	NADES	MOLARNI OMJER
L-men: LA	1:1	Ch:EG	1:2
Ch:Cit	2:1	B:EG	1:2
B:Gly	1:2	Ch:Gly	1:2
L-men:BA	3:1	L-men: C10	1:1
L-men:C8	1:1	B:Cit	1:1
B:Gly	1:2	B:Ma	1:1
B:Scu	4:1	Ch:EG	1:2
Ch:Fru	1:1	Ch:Glc	1:1
Ch:Gly	1:2	Ch:Ma	1:1
Ch:OA	1:1	Ch:Scu	2:1
Ch:Sol	2:3	Ch:Sor	1:1
Ch:U	1:2	Ch:Xyl	2:1
Ch:Xyol	5:2	Cit:Fru	1:1
Cit:Glc	1:1	Cit:Scu	1:1
Fru:EG	1:2	Glc:EG	1:2
Glc:Fru	1:1	Gly:Glc	2:1
Gly:Sol	2:1	Ma:Fru	1:1
Ma:Glc	1:1	Ma:Scu	2:1
Pro:Ma	1:1	Scu:EG	1:2
Sol:EG	1:2	Xyl:EG	1:2
D, L-men:BA	3:1	D, L-men:ibuprofen	3:1
L-men:ibuprofen	1:1	Borneol:D, L-men	1:3
D, L-men:kamfor	1:1		



Slika 10. Prikaz vrijednosti  $\ln(\gamma)$  za oksim RS-194B u različitim NADES-ima s 0 % vode

Popis kratica za komponente otapala navedene u Tablici 5 i na Slici 10: B: betain, BA: benzojeva kiselina, C10: dekanska kiselina, C8: oktanska kiselina, Ca: kamfor, Ch: kolin klorid, Cit: limunska kiselina, D, L-men: D, L- mentol, EG: etilenglikol, Fru: fruktoza, Glc: glukoza, Gly: glicerol, L- men: L- mentol, LA: linolna kiselina, Ma: jabučna kiselina, OA: oksalna kiselina, Pro: prolin, Scu: saharoza, Sol: sorbitol, Sor: sorboza, U: urea, Xyl: ksiloza, Xyol: ksilitol.

Nakon predviđanja topljivosti u NADES-ima primjenom programa COSMO $_{therm}$ , odabrano je pet prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala, tri otapala s dobrom predviđenom topljivošću oksima te dva s lošijom predviđenom topljivošću oksima. Odabrana otapala su:

- Jabučna kiselina: fruktoza (Ma:Fru)= 1:1, 0 % vode
- D, L-mentol: kamfor (D, L-men:Ca) =1:1, 0 % vode
- Kolin klorid: etilenglikol (Ch:EG)=1:2, 30 % vode
- Betain: etilenglikol (B:EG) =1:2, 0 % vode
- Limunska kiselina: glukoza (Cit:Glc) =1:1, 0 % vode

Navedena otapala su sintetizirana kako bi se u njima eksperimentalno odredila topljivost oksima RS-194B. S obzirom da se NADES limunska kiselina:glukoza=1:1 s 0 %-tnim udjelom vode nije mogao uspješno sintetizirati, dodana je voda te je udio vode u ovom otapalu 30 %.

#### 4.2. TOPLJIVOST OKSIMA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Mogućnost NADES-a da otope široki opseg tvari vrlo je zanimljiva u razvoju strategija formulacije API-ja, posebice onih koji su teško topljivi u vodenim medijima, kao što je oksim RS-194B. Kako bi određena formulacija bila djelotvorna, API mora biti otopljen u dostatnoj koncentraciji kako bi se postigao željeni terapijski učinak. Nakon probira pet NADES-a u kojima je predviđena topljivost pomoću programa COSMO $_{therm}$ , eksperimentalno je određena topljivost oksima. Kvalitativna i kvantitativna analiza oksima RS-194B otopljenog u odabranim otapalima provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti te su rezultati analize prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Topljivost oksima RS-194B u NADES-ima

<b>PRIRODNO NISKOTEMPERATURNO EUTEKTIČKO OTAPALO</b>	<b>TOPLJIVOST OKSIMA RS-194B (mg mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>Ma:Fru</b>	50
<b>D, L-men:Ca</b>	13,06
<b>Ch:EG</b>	13,43
<b>B:EG</b>	18,45
<b>Cit:Glc</b>	110

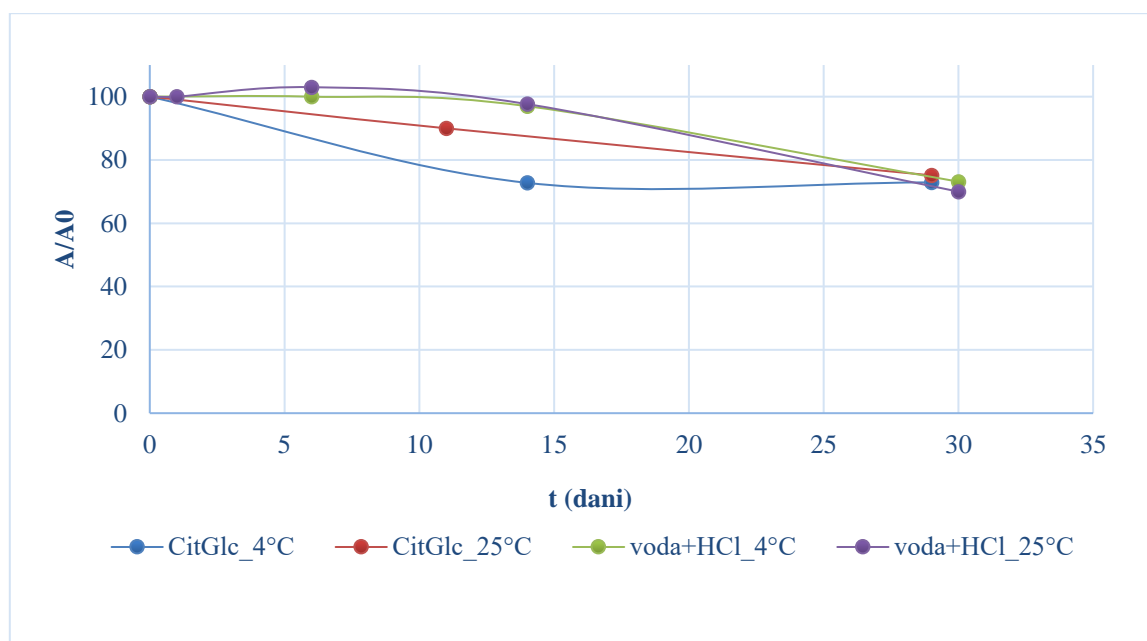
DMSO (dimetil sulfoksid) je organsko otapalo u kojem je oksim RS-194B dobro topljiv, međutim, zbog inhibicijskog učinka ovog otapala na AChE za potrebe *in vivo* istraživanja se koristi voda ili fiziološka otopina uz dodatak 36 %-tnog HCl-a i NaOH (radi korekcije pH vrijednosti) te je topljivost oksima RS-194B u takvoj otopini 50 mg mL<sup>-1</sup>. Iz rezultata dobivenih HPLC analizom vidljivo je kako je najveća topljivost oksima RS-194B zabilježena u NADES-u limunska kiselina:glukoza=1:1 s udjelom vode 30 % (*w/w*) i iznosi 110 mg mL<sup>-1</sup> (515 mmol L<sup>-1</sup>) te je 2,2 puta veća od topljivosti oksima RS-194B u referentnom otapalu. U navedenom otapalu eksperimentalna je topljivost bila najveća i u odnosu na ostala četiri ispitana NADES-a.

Odabir odgovarajućeg otapala za formulaciju djelatnih tvari rezultat je zadovoljavanja što je moguće više čimbenika koje čine dobro otapalo. Otapalo prije svega treba biti netoksično te iskazivati dobru topljivost djelatne tvari, a po mogućnosti imati i ostale povoljne učinke kao što su poboljšanje permeabilnosti, stabilnosti te omogućiti učinkovitu dostavu lijeka do ciljnog

mjesta. Nadalje, neštetnost za okoliš i zdravlje, nehlapljivost i nezapaljivost poželjne su karakteristike koje mogu zadovoljiti održivost procesa. NADES-i, kao zelena otapala, iskazuju neke od navedenih karakteristika te je za ispitivanje potencijalne formulacije oksima RS-194B u NADES-ima, odabrano otapalo limunska kiselina:glukoza =1:1 s udjelom vode 30 %.

#### 4.3. STABILNOST OKSIMA

Stabilnost API-ja jedan je od glavnih kriterija u razvoju formulacije i proizvodnji lijeka (Wu i sur., 2018). Osim povoljnog utjecaja na topljivost djelatnih tvari, NADES-i mogu imati pozitivan učinak na njihovu kemijsku stabilnost (Pedro i sur., 2019). Kako bi se ispitala stabilnost oksima RS-194B otopljenog u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Cit:Glc=1:1 s 30 %-tnim udjelom vode, mjerena je apsorbancija otopine oksima čuvane na 4 °C i 25 °C u određenim vremenskim intervalima (Slika 11). Rezultati su prikazani kao graf ovisnosti omjera apsorbancije (mjerene na određeni dan i apsorbancije mjerene na početku,  $A/A_0$ ) o vremenu.



Slika 11. Grafički prikaz stabilnosti oksima RS-194B otopljenog u Cit:Glc=1:1, 30 % vode i referentnom otapalu pri 4 °C i 25 °C tijekom 30 dana

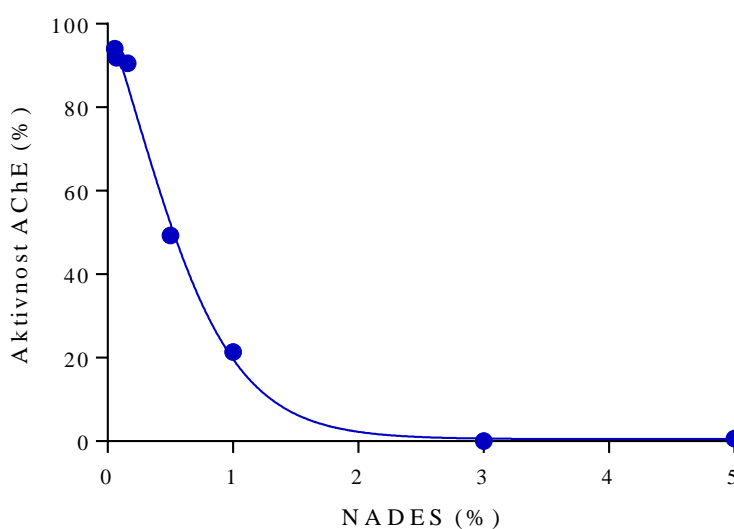
Osim pozitivnog utjecaja na topljivost, nedavno je ustanovljeno kako DES-ovi povoljno utječu i na kemijsku stabilnost API-ja (Pedro i sur., 2019). Zabilježen je povoljan utjecaj na stabilnost aspirina tako što se uspoređuje njegova hidroliza (Lu i sur., 2013) te na stabilnost  $\beta$ -laktamskih antibiotika (Olivares i sur., 2018).

Stabilnost oksima RS-194B u Cit:Glc=1:1, 30 % vode lošija je pri obje temperature čuvanja u odnosu na otopinu oksima u referentnom otapalu (voda s dodatkom 4 % 36 %-tnog HCl-a). Međutim, nakon otprilike 15 dana stabilnost oksima u vodi s dodatkom HCl-a opada te su pri isteku 30.-tog dana omjeri apsorbancija skoro jednaki za otopinu oksima u NADES-u i referentnom otapalu. Također, treba istaknuti da je 515 mmol L<sup>-1</sup> otopina oksima RS-194B u nerazrijeđenom NADES-u precipitirala unutar 24 sata na 4 °C, međutim razrjeđivanje 515 mM RS-194B (otopljenog u NADES-u) u vodi do 100 mmol L<sup>-1</sup> postignuta je stabilnost otopine na toj temperaturi. Određena pH vrijednost 100 mmol L<sup>-1</sup> otopine oksima RS-194B/NADES je oko 4, dok je pH oksima otopljenog u vodi uz dodatak HCl korigiran s NaOH do vrijednosti oko 5.

#### 4.4.UTJECAJ PRIRODNOG NISKOTEMPERATURNOG EUTEKTIČKOG OTAPALA NA KINETIKU ACETILKOLINESTERAZE

##### 4.4.1. Aktivnost enzima AChE u prisutnosti prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala

Osim što osiguravaju „zelene“ uvjete sustava u kojima se koriste, NADES-i imaju i utjecaja na kinetičke parametre sustava čiji su enzimi sastavni dio. Stoga je potrebno ispitati učinak otapala na ciljani enzim. U tu svrhu određena je aktivnost AChE uz prisutnost 0,02-5,0 % NADES-a limunska kiselina:glukoza =1:1 s udjelom vode 30 % u kojem je pripremljena RS-194B/NADES formulacija. Rezultati su prikazani na Slici 12.



Slika 12. Utjecaj NADES-a Cit:Glc=1:1, 30 % vode, na aktivnosti enzima AChE

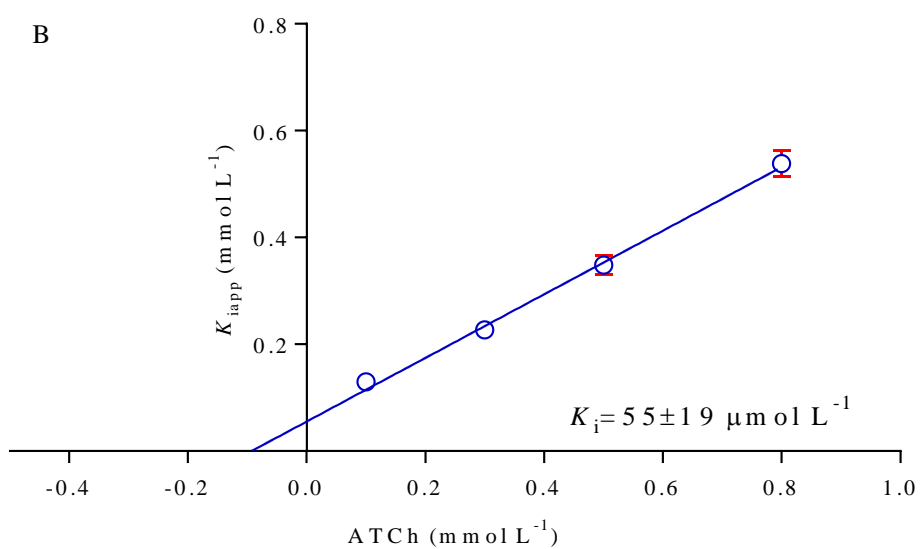
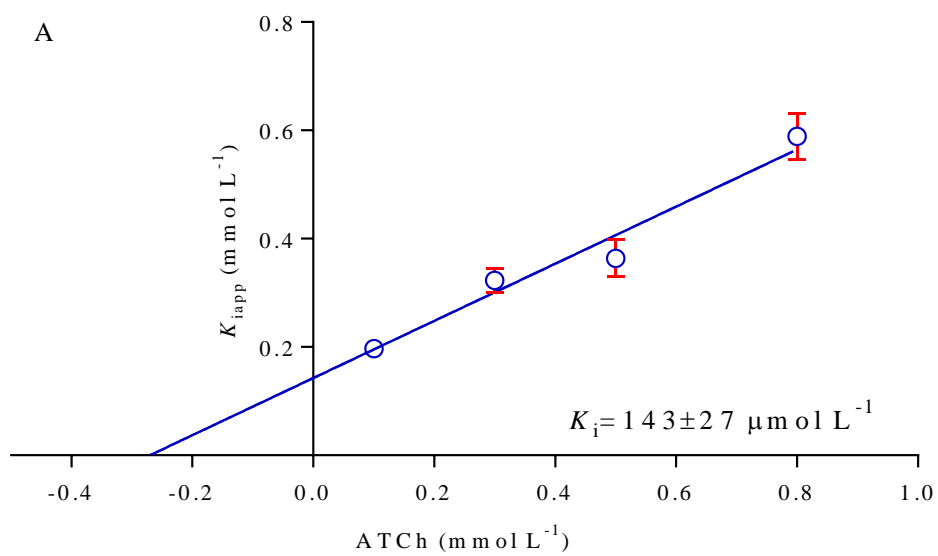
Iz grafa je vidljivo kako Cit:Glc=1:1, 30 % vode, u postotku iznad 2 % inhibira AChE u potpunosti. Dakle, koncentracija NADES-a u daljnjim pokusima mora se održavati ispod tog postotka. Odnosno, da bi enzim zadržao 90 % svoje aktivnosti udio NADES-a u reakcijskoj smjesi za određivanje aktivnosti enzima mora biti manji od 0,2 % (Slika 12). To znači da se ishodna 515 mmol L<sup>-1</sup> otopina RS-194B oksima pripremljena u NADES-u- mora razrijediti u vodi (kako bi se smanjio udio NADES-a) do odgovarajuće koncentracije jer bi korištenje formulacije oksima u čistom NADES otapalu rezultiralo gubitkom aktivnosti AChE.

#### 4.4.2. Reverzibilna inhibicija AChE

Oksimi djeluju i kao reverzibilni inhibitori kolinesteraza pa osim što mogu reaktivirati inhibiranu AChE, mogu je i štititi od inhibicije OP spojem zbog izravne konkurencije između oksima i OP spoja za stvaranje interakcija s AChE (Eckert i sur., 2006; Odžak i sur., 2007; Kovarik i sur., 2008). U ovom radu određena je konstanta inhibicije enzim-oksim kompleksa ( $K_i$ ) koja označava koncentraciju oksima pri kojoj će AChE biti 50 % inhibirana, a njena recipročna vrijednost ( $1/K_i$ ) govori o afinitetu enzima za vezanje oksima. Rezultati su prikazani Hunter-Downs grafom (Slika 13).

Iz grafa je vidljivo da se u oba slučaja, RS-194B/NADES i RS-194B/H<sub>2</sub>O radi o kompetitivnim inhibitorima koji se vežu u aktivno mjesto AChE. Bez obzira na otapalo, RS-194B oksim se može svrstati u umjerene (mikromolarne) inhibitore AChE i u rangu je oksima 2-PAM i HI-6 (Kovarik i sur., 2006; Maček Hrvat i sur., 2020). Za RS-194B/NADES određen je  $K_i = 55 \pm 19 \mu\text{mol L}^{-1}$ , a za RS-194B/H<sub>2</sub>O  $K_i = 143 \pm 27 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Vidljivo je da AChE ima oko 2,5 puta veći afinitet za vezanje RS-194B/NADES što može upućivati na utjecaj NADES-a na promjenu dinamike i konformacije enzima čime se olakšava vezanje RS-194B/NADES u aktivno mjesto AChE kao što je već pokazano za druge spojeve u prisutnosti nekog otapala (Pietsch i sur., 2009).

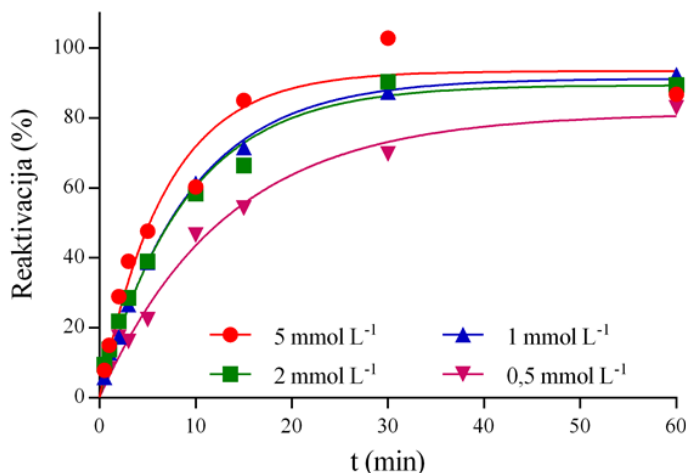




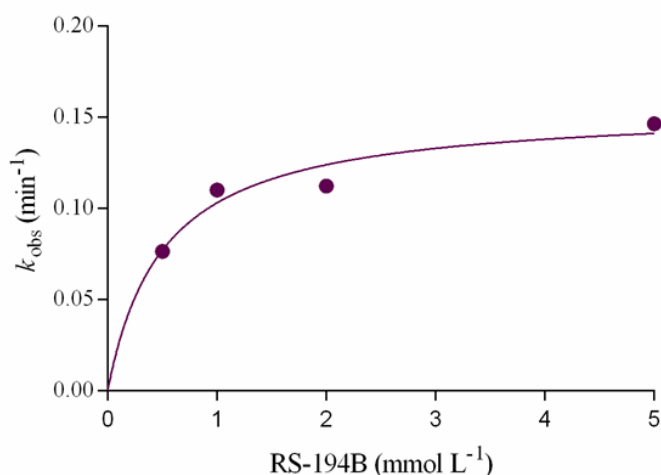
Slika 13. Reverzibilna inhibicija AChE: A) otopinom RS-194B u vodi; B) otopinom RS-194B u NADES-u

#### 4.4.3. Reaktivacija AChE inhibirane sarinom i VX-om

Reaktivacija inhibirane AChE glavni je korak u liječenju otrovanja OP spojevima. U ovom radu ispitan je reaktivacijski učinak RS-194B oksima otopljenog u NADES-u i uspoređena s učinkom oksima otopljenog u vodi. Detaljna kinetika reaktivacije sarinom i VX-om inhibirane AChE praćena je uz nekoliko koncentracija oksima. Reprezentativni prikaz određivanja parametara reaktivacije nalazi se na Slici 14.



	RS-194B			
	5 mmol L <sup>-1</sup>	2 mmol L <sup>-1</sup>	1 mmol L <sup>-1</sup>	0,5 mmol L <sup>-1</sup>
React <sub>max</sub> (%)	92,20	89,40	91,24	81,31
$k_{obs}$ (min <sup>-1</sup> )	0,1498	0,1123	0,1100	0,07649
Standardna pogreška				
React <sub>max</sub> (%)	4,569	3,279	1,328	3,658
$k_{obs}$ (min <sup>-1</sup> )	0,02182	0,01128	0,004358	0,008541



Kinetički parametri reaktivacije AChE određeni iz grafa ovisnosti  $k_{obs}$  o koncentraciji oksima.

$k_{+2}$ (min <sup>-1</sup> )	0,1554
$K_{OX}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	0,5081
$k_r$ (L mol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0,3057
Std. Error Mean (SEM)	
$K_{+2}$ (min <sup>-1</sup> )	0,01350
$K_{OX}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	0,1695
$k_r$ (L mol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0,08053

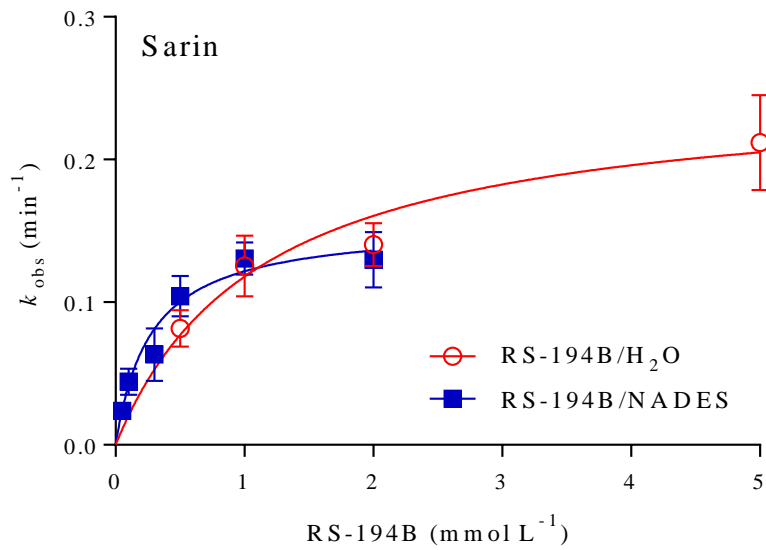
Slika 14. Reprezentativni primjer određivanja parametara reaktivacije ljudske AChE inhibirane živčanim bojnim otrovom sarinom pomoću oksima RS-194B/H<sub>2</sub>O.

Povrat aktivnosti AChE praćen je do 90 min te su određene prividne konstante brzine za svaku koncentraciju oksima,  $k_{obs}$ . Zatim su iz ovisnosti  $k_{obs}$  o koncentraciji oksima određeni kinetički parametri (Tablica 6): maksimalna konstanta brzine reaktivacije prvog reda ( $k_{+2}$ ), konstanta disocijacije fosfilirani enzim-oksim kompleksa ( $K_{OX}$ ) i ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda ( $k_r$ ) te maksimalni postignut postotak reaktivacije ( $Reakt_{max}$ ) i vrijeme u kojem je postignut (t).

Tablica 6. Parametri reaktivacije ljudske AChE inhibirane sarinom i VX-om pomoću oksima RS-194B/H<sub>2</sub>O i RS-194B/NADES. Suma pet ili više pokusa ± standardna pogreška (SEM).

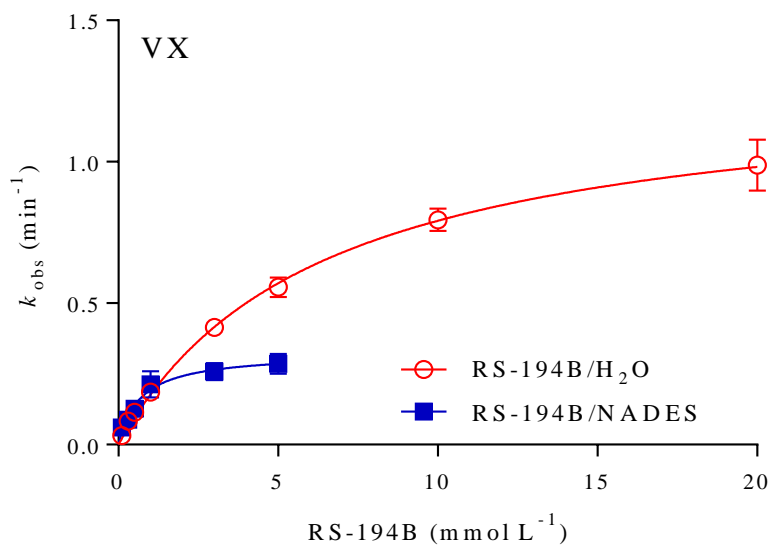
	Sarin		VX	
	RS-194B/H <sub>2</sub> O (0,5-5 mmol L <sup>-1</sup> )	RS-194B/NADES (0,05-2 mmol L <sup>-1</sup> )	RS-194B/H <sub>2</sub> O (0,1-20 mmol L <sup>-1</sup> )	RS-194B/NADES (0,1-5 mmol L <sup>-1</sup> )
$k_{+2}$ (min <sup>-1</sup> )	0,25±0,04	0,15±0,02	1,29±0,07	0,32±0,03
$K_{OX}$ (mmol L <sup>-1</sup> )	1,14±0,54	0,27±0,13	6,34±0,84	0,68±0,22
$k_r$ (L mol <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	222±74	567±204	204±16	480±116
React <sub>max</sub> (%)	95	85	95	95
t (min)	25	30	10	15

Maksimalni postotak reaktivacije ( $Reakt_{max}$ ) sarinom inhibirane AChE s RS-194B/H<sub>2</sub>O i RS-194B/NADES oksimom je sličan, ali je  $Reakt_{max}$  postignut nešto ranije s oksimom otopljenim u vodi (Tablica 6). Brzina reaktivacije  $k_{+2}$  (brzina nukleofilnog uklanjanja konjugiranog OP spoja) je 1,7 puta veća s RS-194B/H<sub>2</sub>O, u odnosu na RS-194B/NADES. Međutim, afinitet sarinom inhibirane AChE za oksim RS-194B/NADES je 4 puta veći nego za oksim RS-194B/H<sub>2</sub>O, što u konačnici rezultira 2,5 puta većom ukupnom brzinom reaktivacije ( $k_r$ ) sarin-AChE konjugata s oksimom otopljenim u NADES-u (Slika 15, Tablica 6).



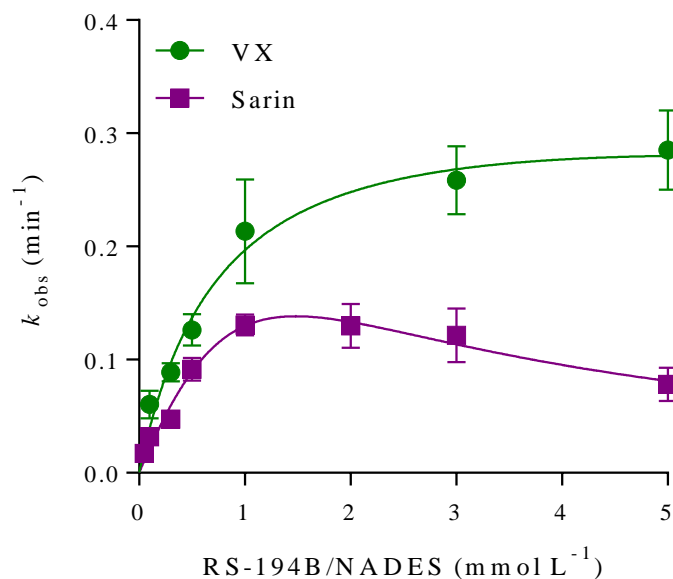
Slika 15. Ovisnost brzine reaktivacije sarinom inhibirane AChE o koncentraciji oksima (srednja vrijednost i standardna pogreška najmanje 5 pokusa)

U slučaju reaktivacije VX-AChE konjugata s RS-194B/ $\text{H}_2\text{O}$  i RS-194B/NADES vraćeno je 95 % aktivnosti AChE ( $\text{Reakt}_{\text{max}}$ ) za 10, odnosno 15 minuta (Tablica 6). VX-AChE je 4 puta brže reaktiviran s RS-194B/ $\text{H}_2\text{O}$  nego s RS-194B/NADES, ali je afinitet konjugata VX-AChE za RS-194B/NADES 9 puta veći nego afinitet za RS-194B/ $\text{H}_2\text{O}$ , stoga je ukupna brzina reaktivacije ( $k_r$ ) konjugata VX-AChE 2,4 puta veća uz oksim RS-194B/NADES (Slika 16, Tablica 6).



Slika 16. Ovisnost brzine reaktivacije VX-om inhibirane AChE o koncentraciji oksima (srednja vrijednost i standardna pogreška najmanje 5 pokusa)

Zanimljivo je primjetiti da u slučaju reaktivacije sarinom inhibirane AChE kod koncentracija RS-194B/NADES viših od oko 2 mmol L<sup>-1</sup> dolazi do inhibicije reaktivirane AChE, što nije slučaj kod reaktivacije VX-om inhibirane AChE (Slika 17). Moguće je da u prvom slučaju dolazi do inhibicije reaktivirane AChE fosfiliranim oksimom kao što je već pokazano u nekim drugim slučajevima (Harvey i sur., 1986).



Slika 17. Utjecaj koncentracije RS-194B/NADES na reaktivaciju VX-om i sarinom inhibirane AChE (srednja vrijednost i standardna pogreška najmanje 5 pokusa)

U konačnici, ako usporedimo uspješnost reaktivacije sarinom i VX-om inhibirane AChE RS-194B oksimom možemo zaključiti da je RS-194B (neovisno o otapalu) bolji reaktivator VX-om inhibirane AChE, što je u skladu s ranije objavljenim rezultatima (Radić i sur., 2012a; Radić i sur., 2012b; Sit i sur., 2018). Naime, u kraćem vremenu, tj. većom brzinom defosfilacije OP spoja ( $k_{+2}$ ) nego u slučaju inhibicije sarinom, reaktivirano je 95 % VX-om inhibirane AChE (Tablica 6).

Uspješnost reaktivacije AChE inhibirane OP spojevima ovisi o strukturi oksima i konjugiranog OP spoja (Millard i sur., 1999; Worek i sur., 2004; Katalinić i sur., 2018; Kovarik i sur., 2019). Da bi došlo do uspješnog nukleofilnog napada oksimske skupine na fosfilirani katalitički serin AChE oksimska skupina mora biti orijentirana prema i smještena u blizinu fosfiliranog serina (Kovarik i sur., 2004; Worek i sur., 2004; Maček Hrvat i sur., 2020). Oksim će se vezati u aktivno mjesto tvoreći nekovalentne interakcije (vodikove veze, slane mostove,  $\pi$ - $\pi$  interakcije...) s aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta čiji položaj je podložan promjenama izazvanim vezanjem OP spoja. Samo otapalo također utječe na položaj aminokiselinskih ostataka (dinamiku enzima) u aktivnom mjestu, na što upućuju i rezultati - afinitet fosfilirane (ali i neinhibirane) AChE za RS-194B/NADES je veći u odnosu na afinitet za RS-194B/H<sub>2</sub>O. Teži se sintezi oksima za čije će vezanje u aktivno mjesto AChE imati dobar, ali opet ne prevelik (fmol L<sup>-1</sup>) afinitet jer su takvi oksimi prejak inhibitori AChE (Krasinski i

sur., 2005). Bolji afinitet znači i stvaranje većeg broja interakcija enzima s oksimom što bi moglo značiti i uspješniju reaktivaciju, međutim ne nužno jer oksim može biti pozicioniran u nepovoljnom položaju da bi došlo do reaktivacije (predaleko od, ili oksimske skupine orijentirane od fosfiliranog katalitičkog serina) te je takav oksim onda loš reaktivator (Ekström i sur., 2006; Maček Hrvat i sur., 2020). Slično se dogodilo i u slučaju RS-194B/NADES oksima gdje je, bez obzira na bolji afinitet fosfilirane AChE za tu formulaciju oksima, brzina nukleofilnog uklanjanja vezanog inhibitora ( $k_{+2}$ ) veća u slučaju reaktivacije s oksimom otopljenim u vodi što upravo upućuje na nepovoljnije pozicioniranje i orijentaciju RS-194B/NADES u aktivnom mjestu fosfilirane AChE u usporedbi s RS-194B/H<sub>2</sub>O.

U konačnici, obzirom da prema našim saznanjima u literaturi do sada nisu opisana istraživanja NADES-a kao otapala za reaktivatore AChE, ovaj rad i dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost primjene prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za ovu namjenu te bi svakako u nastavku istraživanja bilo vrijedno ispitati utjecaj drugih NADES-a na enzim AChE te učinkovitost reaktivacije inhibirane AChE formulacijom oksima u nekom potencijalno za *in vivo* upotrebu pogodnijem NADES-u.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Predviđena je topljivost oksima RS-194B u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (NADES) pomoću programa COSMO $_{therm}$ . Na temelju tog modela odabrano je i sintetizirano pet otapala u kojima je eksperimentalno određena topljivost oksima RS-194B.
2. Na temelju kvantitativne HPLC analize između pet NADES-a sintetiziranih i korištenih za otapanje oksima RS-194B za daljnja ispitivanja odabran je NADES sastava limunska kiselina:glukoza=1:1, s udjelom vode 30 %, kao najbolji kandidat za razvoj formulacije oksima RS-194B.
3. Usporedbom stabilnosti oksima RS-194B u Cit:Glc, 30% vode i vodi (s dodatkom HCl-a) kao referentnim otapalom, kroz određeni vremenski period i pri temperaturama 4 °C i 25 °C nije uočena značajna razlika u stabilnosti tih dviju formulacija.
4. NADES limunska kiselina:glukoza=1:1 s 30 % vode inhibira acetilkolinesterazu, a da bi enzim zadržao više od 90 % aktivnosti, udio NADES-a mora biti manji od 0,2 %.
5. Afinitet acetilkolinesteraze veći je za RS-194B/NADES nego za RS-194B/H<sub>2</sub>O.
6. Fosfilirana AChE također ima veći afinitet za vezanje RS-194B/NADES formulacije oksima što upućuje da samo otapalo utječe na dinamiku enzima i dovodi do konformacijskih promjena u aktivnom mjestu koje olakšavaju vezanje oksima.
7. Pozicioniranje i/ili orijentacija RS-194B/NADES u aktivnom mjestu i sarinom i VX-om inhibirane acetilkolinesteraze manje je povoljno u odnosu na RS-194B/H<sub>2</sub>O te je brzina reaktivacije, tj defosfilacije katalitičkog serina AChE veća s RS194B/H<sub>2</sub>O.
8. Oksim RS-194B bolji je reaktivator VX-om nego sarinom inhibirane AChE bez obzira na otapalo.
9. Unatoč postignutoj boljoj topljivosti oksima RS-194B u formulaciji Cit:Glc=1:1 s 30 % vode nego u referentnom otapalu i relativno povoljnim kinetičkim parametrima, odabrani NADES nije povoljan izbor za otapanje oksima RS-194B zbog njegove viskoznosti i niskog pH, inhibicije acetilkolinesteraze, te precipitacije formulacije oksima u NADES-u na 4 °C.



10. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala svakako imaju potencijala za pripravu antidota, no za *in vivo* primjenu potrebno je istražiti formulacije oksima RS-194B u drugim NADES-ima.

## 6. LITERATURA

- Ahlrichs, R., Bär, M., Häser, M., Horn, H., Kölmel, C. (1989) Electronic structure calculations on workstation computers: The program system turbomole. *Chem. Phys. Lett.* **162**, 165–169.
- Ahmed, N. A., Safaa S. El gamal, V. F. N. (2011) Bioavailability: A Pharmaceutical Review. *Int. J. Pharm. Biotechnol.* **1**, 80–96.
- Anastas P. T., Warner J. C. (1998) Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York.
- Anastas, P., Eghbali, N. (2010) Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301-312.
- Anselmo, A.C., Mitragotri, S. (2015) A review of clinical translation of inorganic nanoparticles. *AAPS J.* **17**, 1041–54.
- Antonijević, B., Stojiljković, M. P. (2007) Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *J. Clin. Med. Res.* **5**, 71–82.
- Aroso, I. M., Craveiro, R., Rocha, Â., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C. (2015) Design of controlled release systems for THEDES - Therapeutic deep eutectic solvents, using supercritical fluid technology. *Int. J. Pharm.* **492**, 73–79.
- Aroso, I. M., Silva, J. C., Mano, F., Ferreira, A. S., Dionisio, M., Sa- Nogueira, I., Barreiros, S., Reis, R. L., Paiva, A., Duarte, A. R. C. (2016) Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **98**, 57-66.
- Barros, A. A., Silva, J., Craveiro, R., Paiva, A., Reis, R. L., Duarte, A. R. C. (2017) Green solvents for enhanced impregnation processes in biomedicine. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **5**, 82-87.
- Bezold, F., Weinberger, M. E., Minceva, M. (2017) Assessing Solute Partitioning in Deep Eutectic Solvent-Based Biphasic Systems Using the Predictive Thermodynamic Model COSMO-RS. *Fluid Phase Equilib.* **437**, 23–33.

- Biswas, A., Shogren, R. L., Stevenson, D. G., Willett, J. L., Bhowmik, P. K. (2006) Ionic liquids as solvents for biopolymers: Acylation of starch and zein protein. *Carbohydr. Polym.* **66**, 546–550.
- Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N., Agrawal, Y. K. (2014) Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs — A review. *J. Pharm. Anal.* **4**, 159–165.
- Bosak, A., Katalinić, M., Kovarik, Z. (2011) Cholinesterases: structure, role, and inhibition. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62**, 175-190.
- Carlsen L. (2019) After Salisbury nerve agents revised. *Mol Inform.* **38**, e1800106.
- Carranza, A., Perez-Garcia, M. G., Song, K., Jeha, G. M., Diao, Z., Jin, R., Bogdanchikova, N., Soltero, A. F., Terrones, M., Wu, Q. (2016) Deep-Eutectic Solvents as MWCNT Delivery Vehicles in the Synthesis of Functional Poly (HIPE) Nanocomposites for Applications as Selective Sorbents. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **8**, 31295-31303.
- Chambers, J. E., Chambers, H. W., Meek, E. C., Pringle, R. B. (2013) Testing of novel brain-penetrating oxime reactivators of acetylcholinesterase inhibited by nerve agent surrogates. *Chem Biol Interact.* **203**, 135–8.
- Chambers, J., Patricia, E. L. (1992) Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects, Academic Press Inc, New York.
- Chatonnet, A., Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J.* **260**, 625–34.
- Chemat, F., Vian, M. A. (2014) Alternative Solvents for Natural Products Extraction, Springer-Verlag, Berlin.
- Clarke, C. J., Tu, W. C., Lever, O., Bröhl, A., Hallet, J. P. (2018) Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. *Chem. Rev.* **118**, 747–800.
- Cochran, R., Kalisiak, J., Küçükılınç, T., Radić, Z., Garcia, E., Zhang, L., Ho, K.-Y., Amitai, G., Kovarik, Z., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Taylor, P. (2011) Oxime-assisted Acetylcholinesterase Catalytic Scavengers of Organophosphates That Resist Aging. *J. Biol. Chem.* **286**, 29718–29724.

Çokuğras, A. N. (2003) Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk. J. Biochem.* **2**, 54–61.

COSMOtherm, v. 20.0.0., BIOVIA COSMOtherm, Dassault Systems, Vélizy-Villacoublay, France, 2020, dostupno na: <<https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/solvation-chemistry/cosmotherm/>> Pristupljeno ožujak 2021.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S. (2015) Green solvents for green technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **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.

Dawson, R. M. (1994) Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.* **14**, 317–31.

de Jong, L. P., Wolring, G. Z. (1984) Stereospecific reactivation by some Hagedorn-oximes of acetylcholinesterases from various species including man, inhibited by soman. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1119–25.

Delfino, R. T., Ribeiro, T. S., Figueroa-Villar, J. D. (2009) Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *J. Braz. Chem. Soc.* **20**, 407–28.

Diedenhofen, M., Klamt, A. (2010) COSMO-RS as a Tool for Property Prediction of IL Mixtures- A Review. *Fluid Phase Equilib.* **294**, 31–38.

Dolgin, E. (2013) Syrian gas attack reinforces need for better anti-sarin drugs. *Nat. Med.* **19**, 1194–5.

Dolzhenko, A. V., Dolzhenko, A. (2015) Green Solvents for Eco-friendly Synthesis of Bioactive Heterocyclic Compounds. U: Green Synthetic Approaches for Biologically Relevant Heterocycles (Brahmachari, G., ured.), Elsevier Inc, Amsterdam, str. 101–139.

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 S., Eyer P., Muckter H., Worek F. (2006) Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 344-357.

Eckert, F., Klamt, A. (2002) Fast solvent screening via quantum chemistry: COSMO-RS approach. *AIChE J.* **48**, 369-385.

Ekström, F., Pang, Y. P., Boman, M., Artursson, E., Akfur, C., Börjegen, S. (2006) Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, Ortho-7 and obidoxime: Structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 597–607.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., Featherstone, R. M. (1961) New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95.

Etemad, L., Moshiri M., Moallem, S. A. (2014) Chronic Toxicity of Organophosphorus Compounds. U: Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds, (Balali-Mood, M., Abdollahi, M., ured.), Springer, London, str. 79-118.

Eyer, P. (2003) The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* **22**, 165-290.

Faggian, M., Sut, S., Perissutti, B., Baldan, V., Grabnar, I., Dall'Acqua, S. (2016) Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as a tool for bioavailability improvement: Pharmacokinetics of rutin dissolved in proline/glycine after oral administration in rats: Possible application in nutraceuticals. *Molecules.* **21**, 1–11.

Gauniya, A., Das, S., Mallick, S., Basu, S. (2010) Comparative bioavailability studies of citric acid and malonic acid based aspirin effervescent tablets. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **2**, 118–120.

GraphPad Prism, v. 6, GraphPad Software, San Diego, California, dostupno na: <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>. Pristupljeno ožujak 2021.

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.

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

- Hackl, K., Kunz, W. (2018) Some aspects of green solvents. *C. R. Chimie.* **21**, 572-580.
- Harvey, B., Scott, R. P., Sellers, D. J., Watts, P. (1986) In vitro studies on the reactivation by oximes of phosphorylated acetylcholinesterase—I: On the reactions of P2S with various organophosphates and the properties of the resultant phosphorylated oximes. *Biochem. Pharm.* **35**, 737-744.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Al-Saadi, M. A., Hayyan, A., AlNashef, I. M., Mirghani M. E. (2013) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium based deep eutectic solvents. *Chemosphere.* **93**, 455–459.
- Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A., Al-Saadi, M. A., AlNashef, I. M., Mirghani, M. E. S., Saheed, O. K. (2012) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere.* **90**, 2193–2195.
- 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.
- Hobbiger F. (1963) Reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase. U: Cholinesterases and anticholinesterase agents, Handbook of experimental pharmacology, (Koelle, G., B., ured.), Springer, Berlin, Heidelberg, str. 921-988.
- Holmstedt B. (2000) Cholinesterase inhibitors: an introduction. U: Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, (Giacobini, E., ured.), Martin Dunitz Ltd, London str. 1–8.
- 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**, e59145.
- Jeliński, T., Cysewski, P. (2018) Application of a Computational Model of Natural Deep Eutectic Solvents Utilizing the COSMO-RS Approach for Screening of Solvents with High Solubility of Rutin. *J. Mol. Model.* **24**, 1–17.
- Juneidi, I., Hayyan, M., Ali, O. M. (2016) Toxicity profile of choline chloride based deep eutectic solvents for fungi and *Cyprinus carpio* fish. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 7648–7659.
- Juneidi, I., Hayyan, M., Hashim, M. A., Hayyan, A. (2017) Pure and aqueous deep eutectic solvents for a lipase-catalysed hydrolysis reaction. *Biochem. Eng. J.* **117**, 129–138.
- Kalepu, S., Nekkanti, V. (2015) Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta. Pharm. Sin B.* **5**, 442-453.

Katalinić, M., Maček Hrvat, N., Baumann, K., Morasi Piperčić, S., Makarić, S., Tomić, S., Jović, O., Hrenar, T., Miličević, A., Jelić, D., Žunec, S., Primožić, I., Kovarik, Z. (2016) A comprehensive evaluation of novel oximes in creation of butyrylcholinesterase-based nerve agent bioscavengers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **310**, 195-204.

Katalinić, M., Šinko, G., Maček Hrvat, N., Zorbaz, T., Bosak, A., Kovarik, Z. (2018) Oxime-assisted reactivation of tabun inhibited acetylcholinesterase analysed by active site mutations. *Toxicology*. 406–407, 104–113.

Katalinić, M., Zandona, A., Ramić, A., Zorbaz, T., Primožić, I., Kovarik, Z. (2017) New cinchona oximes evaluated as reactivators of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Molecules*. **22**, 1234.

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

Kobrova, T., Korabecny, J., Soukup, O. (2019) Current approaches to enhancing oxime reactivator delivery into the brain. *Toxicology*. **423**, 75-83.

Kovacs, A., Neyts, E. C., Wijnants, M., Cornet, I., Biellen, P. (2020) Modeling the Physicochemical Properties of Natural Deep Eutectic Solvents- A Review. *Chem. Sus. Chem.* **13**, 3789-3804.

Kovarik, Z., Cibán, N., Radić, Z., Simeon-Rudolf, V., Taylor, P. (2006) Active site mutant acetylcholinesterase interactions with 2-PAM, HI-6, and DDVP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 973-978.

Kovarik, Z., Čalić, M., Šinko, G., Bosak, A., Berend, S., Lucić Vrdoljak, A., Radić, B. (2008) Oximes: reactivators of phosphorylated acetylcholinesterase and antidotes in therapy against tabun poisoning. *Chem.-Biol. Interact.* **175**, 173-179.

Kovarik, Z., Kalisiak, J., Maček Hrvat, N., Katalinić, M., Zorbaz, T., Žunec, S., Green, C., Radić, Z., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Taylor, P. (2019) Reversal of tabun toxicity enabled by a triazole annulated oxime library-reactivators of acetylcholinesterase. *Chem. Eur. J.* **25**, 4100–4114.

- Kovarik, Z., Maček, N., Sit, R. K., Radić, Z., Fokin, V. V., Sharpless K. B., Taylor, P. (2013) Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chem. Biol. Interact.* **203**, 77–80.
- Kovarik, Z., Radić, Z., Berman, H. A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., Taylor, P. (2004) Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphorylated conjugates. *Biochemistry.* **43**, 3222–3229.
- Krasinski, A., Radić, Z., Manetsch, R., Raushel, J., Taylor, P., Sharpless, K. B., Kolb, H. C. (2005) In situ selection of lead compounds by click chemistry: target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6686-6692.
- Li, Z., Lee, P. I. (2016) Investigation on drug solubility enhancement using deep eutectic solvents and their derivatives. *Int. J. Pharm.* **505**, 283–288.
- Little, P. J., Scimeca, J. A., and Martin, B. R. (1988) Distribution of [3H]diisopropylfluorophosphate, [3H]soman, [3H]sarin and their metabolites in mouse brain. *Drug Metab. Dispos.* **16**, 515–520.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S.-N., Pauli, G. F. (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J. Nat. Prod.* **81**, 679-690.
- Lorke, D. E., Kalasz, H., Petroianu, G. A., Tekes, K. (2008) Entry of oximes into the brain: a review. *Curr. Med. Chem.* **15**, 743–53.
- Lu, C., Cao, J., Wang, N., Su, E. (2013) Significantly improving the solubility of non-steroidal anti-inflammatory drugs in deep eutectic solvents for potential non-aqueous liquid administration. *Med. Chem. Comm.* **7**, 955-959.
- Lucić Vrdoljak, A., Čalić, M., Radić, B., Berend, S., Jun, D., Kuča, K., Kovarik, Z. (2006) Pretreatment with pyridinium oximes improves antidotal therapy against tabun poisoning. *Toxicology.* **228**, 41–50.
- Maček Hrvat, M., Sit, R. K., Kovarik, Z., Žunec, S., Green, C., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Radić, Z., Taylor, P. (2018) RS194B pharmacokinetics and antidotal potential in mice exposed to VX and sarin. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **69**, A32-A43.
- Maček Hrvat, N. (2015) Kolinesteraze i oksimi kao pseudokatalitička čistila živčanih bojnih otrova (doktorski rad), Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.



- Maček Hrvat, N., Kalisiak, J., Šinko, G., Radić, Z., Sharpless, K., Taylor, P. Kovarik, Z. (2020) Evaluation of high-affinity phenyltetrahydroisoquinoline aldoximes, linked through anti-triazoles, as reactivators of phosphorylated cholinesterases. *Toxicol. Lett.* **321**, 83-89.
- Maček Hrvat, N., Kovarik, Z. (2019) Counteracting poisoning with chemical warfare nerve agents. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **71**, 266-284.
- Masson, P., Nachon, F., Lockridge, O. (2010) Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases. *Chem. Biol. Interac.* **187**, 157–62.
- Mbous, Y. P., Hayyan, M., Wong, W.F., Looi, C. Y., Hashim, M. A. (2017) Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems. *Sci Rep.* **7**, 41257.
- Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., Looi, C. L. (2016) Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering- Promises and challenges. *Biotechnol. Adv.* **35**, 105-134.
- Mercey, G., Verdelet, T., Saint-André, G., Gillon, E., Wagner, A., Baati, R., Jean, L., Nachon, F., Renard, P. -Y. (2011) First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chem. Commun.* **47**, 5295–7.
- Millard, C. B., Koellner, G., Ordentlich, A., Shafferman, A., Silman, I., Sussman, J. L. (1999) Reaction products of acetylcholinesterase and VX reveal a mobile histidine in the catalytic triad. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9883-9884.
- Monhemi, H., Housaindokht, M. R., Moosavi-Movahedi, A. A., Bozorgmehr, M. R. (2014) How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of candida antarctica lipase b in urea : choline chloride deep eutectic solvent. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 14882.
- 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.
- Nachon, F., Masson, P., Nicolet, Y., Lockridge, O., Fontecilla-Camps, J. C. (2003) Comparison of structures of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. U: Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors, (Giacobini, E., ured.), Martin Dunitz Ltd., London, str. 39.

- Odžak, R., Čalić, M., Hrenar, T., Primožič, I., Kovarik, Z. (2007) Evaluation of mono-quaternary pyridinium oximes potency to reactivate tabun-inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicology*. **233**, 85–96.
- Olivares, B., Martínez, F., Rivas, L., Calde, C., Munita, J. M., Campodonico, P. R. (2018) A Natural Deep Eutectic Solvent Formulated to Stabilize  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Sci. Rep.* **8**, 14900.
- Ozturk, B., Esteban, J., Gonzalez-Miquel, M. (2018) Deterpenation of Citrus Essential Oils Using Glycerol-Based Deep Eutectic Solvents. *J. Chem. Eng. Data*. **63**, 2384–2393.
- Ozturk, B., Gonzalez-Miquel, M. (2019) Alkanediol-Based Deep Eutectic Solvents for Isolation of Terpenoids from Citrus Essential Oil: Experimental Evaluation and COSMO-RS Studies. *Sep. Purif. Technol.* **227**, 115707.
- 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., Boyd, B. J., Rantanen, J., Lobmann, K. (2019) Tailor-made solvents for pharmaceutical use? Experimental and computational approach for determining solubility in deep eutectic solvents (DES). *Int. J. Pharm.* **1**, 100034.
- Pedro, S. N., Freire, M. G., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. (2019) Deep eutectic solvents comprising active pharmaceutical ingredients in the development of drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **16**, 497-506.
- Pena-Pereira, F., Namiesnik, J. (2014) Ionic liquids and deep eutectic mixtures: sustainable solvents for extraction processes. *Chem. Sus. Chem.* **7**, 1784-1800.
- 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.* **9**, 14926.
- Phaechamud, T., Tuntarawongsa, S., Charoensuksai, P. (2016) Evaporation Behavior and Characterization of Eutectic Solvent and Ibuprofen Eutectic Solution. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **17**, 1213–1220.
- Pietsch, M., Christian, L., Inhester, T., Petzold, S., Gütschow, M. (2009) Kinetics of inhibition of acetylcholinesterase in the presence of acetonitrile. *FEBS J.* **276**, 2292-2307.

- Radić, Z., Sit, R. K., Kovarik, Z., Berend, S., Garcia, E., Zhang, L., Amitai, G., Green, C., Radić, B., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Taylor, P. (2012a) Refinement of Structural Leads for Centrally Acting Oximes Reactivators of Phosphorylated Cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **287**, 11798-11809.
- Radić, Z., Sit, R. K., Garcia, E., Zhang, L., Berend, S., Kovarik, Z., Amitai, G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Taylor, P. (2012b) Mechanism of interaction of novel uncharged, centrally active reactivators with OP-hAChE conjugates. *Chem. Biol. Interact.* **203**, 67-71.
- Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Radojčić Redovniković, I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **112**, 46–53.
- 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 eutektska otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kem. Ind.* (rad prihvaćen za objavljivanje)
- Rosenberg, Y. J., Mao, L., Jiang, X., Lees, J., Zhang, L., Radić, Z., Taylor, P. (2017) Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reverses early and advanced symptoms in macaques exposed to sarin vapor. *Chem. Biol. Interact.* **274**, 50–7.
- Rosenberg, Y. J., Wang, J., Ooms, T., Rajendran, N., Mao, L., Jiang, X., Lees, J., Urban, L., Momper, J. D., Sepulveda, Y., Shyong, Y. J., Taylor, P. (2018) Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reactivates and reverses advanced symptoms of lethal inhaled paraoxon in macaques. *Toxicol. Lett.* **293**, 229–34.
- Schultheiss, N., Newman, A. (2009) Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Cryst. Growth Des.* **9**, 2950–2967.
- Shekaari, H., Zafarani-moattar, M. T. (2017) Solubility, volumetric and compressibility properties of acetaminophen in some aqueous solutions of choline based deep eutectic solvents at T=(288.15 to 318.15) K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **109**, 121-130.

- Sicaire, A.-G., Filly, A., Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Chemat, F. (2018) Cosmo-RS-Assisted Solvent Screening for Green Extraction of Natural Products. U: Handbook of Green Chemistry (Anastas, P. T., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, str. 117–138.
- Silman, I., Sussman, J. (2000) Structural studies on acetylcholinesterase. U: Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, (Giacobini, E., ured.), Martin Dunitz, London, str. 9-26.
- 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.
- Sit, R. K., Kovarik, Z, Maček Hrvat, N., Žunec, S, Green, C., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Radić, Z., Taylor, P. (2018) Pharmacology, pharmacokinetics, and tissue disposition of zwitterionic hydroxyiminoacetamido alkylamines as reactivating antidotes for organophosphate exposure. *J Pharmacol. Exp. Ther.* **367**, 363–72.
- Sit, R. K., Radić, Z., Gerardi, V., Zhang, L., Garcia, E., Katalinić, M., Amitai, G., Kovarik, Z., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Taylor, P. (2011) New Structural Scaffolds for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphylated Cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **286**, 19422-19430.
- Smith, E. L., Abbott, A. Ryder, K. S. (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem. Rev.* **114**, 11060-11082.
- Soreq, H., Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 294–302.
- Sperry J., Garcia-Alvarez J. (2016) Special Issue: “Organic Reactions in Green Solvents”. *Molecules.* **21**, 1527.
- Stojiljković, M. P., Jakanović, M. (2006) Pyridinium oximes: Rationale for their selection as causal antidotes against organophosphate poisonings and current solutions for auto-injectors. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **57**, 435–443.
- Stone, R. (2018) U.K. attack puts nerve agent in the spotlight. *Science.* **359**, 1314–5.
- 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.

Stratford, M., Plumridge, A., Nebe-von-Caron, G., Archer, D. B. (2009) Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 37–43.

Stryer, L. (1991) Biokemija, 2. izd. (preveli Vuk-Pavlović, S. i sur.) Školska knjiga, Zagreb.

Sut, S., Faggian, M., Baldan, V., Poloniato, G., Castagliuolo, I., Grabnar, I., Perissutti, B., Brun, P., Maggi, F., Voinovich, D., Peron, G., Dall'Acqua, S. (2017) Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) to Enhance Berberine Absorption: An In Vivo Pharmacokinetic Study. *Molecules.* **22**, 1921.

Štěpánková, V., Vanacek, P., Damborsky, J., Chaloupkova, R. (2014) Comparison of catalysis by haloalkane dehalogenases in aqueous solutions of deep eutectic and organic solvents. *Green Chem.* **16**, 2754–2761.

Takagi, T., Ramachandran, C., Bermejo, M., Yamashita, S., Yu, L. X., Amidon, G. L. (2006) A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drugs in the United States, Great Britain, Spain and Japan. *Mol. Pharm.* **3**, 631-643.

Tang, B., Row, K. H. (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatsh. Chem.* **144**, 1427-1454.

Tao J. A., Kazlauskas R. J. (2011) Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development, John Wiley & Sons, Ltd, New Jersey.

Taylor, P., Radić, Z. (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 281-320.

Thiermann, H., Worek, F., Kehe, K. (2013) Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chem. Biol. Interact.* **206**, 435–43.

Tuntarawongsa, S., Phaechamud, T. (2012) Polymeric eutectic drug delivery system. *J. Met., Mater. Miner.* **22**, 27–32.

Wagle, D. V., Zhao, H., Baker, G. A. (2014) Deep eutectic solvents: sustainable media for nanoscale and functional materials. *Acc. Chem. Res.* **47**, 2299-2308.

Wang, H., Gurau, G., Shamshina, J., Cojocar, O. A., Janikowski, J., MacFarlane, D. R., Davis, J. H. Jr., Rogers, R. D. (2014) Simultaneous membrane transport of two active pharmaceutical ingredients by charge assisted hydrogen bond complex formation. *Chem. Sci.* **5**, 3449–3456.

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.

Wiener, S. W., Hoffman, R. S. (2004) Nerve agents: a comprehensive review. *J. Intensive Care Med.* **19**, 22–37.

Wikene, K. O., Rukke, H. V., Bruzell, E., Tønnesen, H. H. (2017) Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* **171**, 27–33.

Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P. (2004) Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2237–48.

Worek, F., Thiermann, H., Wille, T. (2016) Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chem. Biol. Interact.* **259**, 93–98.

Wu, B. P., Wen, Q., Xu, H., Yang, Z. (2014) Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *J. Mol. Cat. B. Enzym.* **101**, 101–107.

Wu, Z. (2018) Drug stability testing and formulation strategies. *Pharm. Dev. Technol.* **23**, 941–941.

Yang, Z. (2018) Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. U: Applications of Ionic Liquids in Biotechnology, (Itoh, T., Koo, Y. M., ured.), Springer International Publishing, New York, str. 31-59.

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.

Zorbaz, T., Braiki, A., Maraković, N., Renou, J., de la Mora, E., Maček Hrvat, N., Katalinić, M., Silman, I., Sussman, J. L., Mercey, G., Gomez, C., Mougeot, R., Pérez, B., Baati, R., Nachon, F., Weik, M., Jean, L., Kovarik, Z., Renard, P. -Y. (2018) Potent 3-hydroxy-2-pyridine

aldoxime reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases with predicted blood-brain barrier penetration. *Chem. Eur. J.* **24**, 9675–91.

## 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:



---

Marina Štokić