

Procjena toksičnosti niskotemperaturnih eutektskih otapala za razvoj formulacije ciprofloksacina

Brdarević, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:541455>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Katarina Brdarević

7653/BT

**PROCJENA TOKSIČNOSTI NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA RAZVOJ FORMULACIJE
CIPROFLOKSACINA
ZAVRŠNI RAD**

Projekt: HRZZ IP-2019-04-7712 Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova

Mentor: dr.sc. Manuela Panić

Zagreb, 2021.

*Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc Manuli Panić na srdačnosti i pomoći pri izradi ovog rada.
Veliko hvala i izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević na prenesenom znanju te pomoći i vodstvu u
eksperimentalnom radu.*

Hvala mojoj obitelji i bližnjima na ljubavi i podršci koju mi pružaju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

**Procjena toksičnosti niskotemperaturnih eutektičkih otapala za razvoj
formulacije ciprofloksacina**

Katarina Brdarević, 7653/BT

Sažetak: Eutektička otapala zelena su otapala sastavljena od donora i akceptora vodikove veze koja u određenom molarnom omjeru imaju temperaturu tališta nižu od pojedinačnih komponenti pa su najčešće pri sobnoj temperaturi u tekućem agregacijskom stanju. Komponente od kojih se pripremaju eutektička otapala nisu toksične, no potrebno je ispitati njihov sinergijski učinak kako bi se procijenio njihov utjecaj na ljude i okoliš. U ovom radu ispitana je citotoksičnost triju različitih eutektičkih otapala (limunska kiselina: glukoza, betain: jabučna kiselina: glukoza, glicerol: glukoza) kao i terapijskog eutektičkog otapala (limunska kiselina: glukoza: ciprofloksacin) na Caco-2 i HeLa staničnu liniju MTS metodom. Otapala nisu pokazala inhibitoran učinak na rast stanica pa se mogu smatrati netoksičnim otapalima.

Ključne riječi: Caco-2 stanična linija, citotoksičnost, ciprofloksacin, eutektička otapala

Rad sadrži: 27 stranica, 11 slika, 1 tablicu, 21 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: dr.sc. Manuela Panić

Pomoć pri izradi: izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević

Datum obrane: 16. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTARY CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering

Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Assessment of toxicity deep eutectic solvents for formulation development of ciprofloxacin

Katarina Brdarević, 7653/BT

Abstract: Deep eutectic solvents are green solvents, formed by a donor and an acceptor of hydrogen bond. At room temperatures they are usually liquids, due to the fact that in certain molar ratios their melting point is lower than a melting points of each forming compound. DESs forming compounds are considered to be non-toxic, but before their application it is necessary to determine synergic effect of forming compounds and to assess their impact on human and the environment. In this thesis, the impact of three DESs (citric acid:glucose, betaine:malic acid:glucose, glycerol:glucose) and one THEDES (citric acid: glucose: ciprofloxacin) on Caco-2 and HeLa cell line was examined using MTS method. Solvents did not show inhibitory effect on cell growth and can be considered noncytotoxic.

Keywords: Caco-2 cell line, ciprofloxacin, cytotoxicity, deep eutectic solvents

Thesis contains: 27 pages, 11 figures, 1 table, 21 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Manuela Panić

Technical support and assistance: PhD Kristina Radošević, Associate Professor

Defence date: 16th September 2021.

Sadržaj

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | UVOD | 1 |
| 2 | TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1 | Topljivost i permeabilnost aktivnih djelatnih tvari | 2 |
| 2.1.1 | Topljivost aktivnih djelatnih tvari | 3 |
| 2.1.2 | Permeabilnost aktivnih djelatnih tvari..... | 5 |
| 2.1.3 | Toksičnost niskotemperaturnih eutektskih otapala | 7 |
| 2.1.4 | Primjena niskotemperaturnih eutektskih otapala | 7 |
| 3 | EKSPERIMENTALNI DIO | 9 |
| 3.1 | Materijali..... | 9 |
| 3.1.1 | Kemikalije | 9 |
| 3.1.2 | Otopine i puferi | 9 |
| 3.1.3 | Caco-2 i HeLa stanice..... | 10 |
| 3.1.4 | Prirodna niskotemperaturna eutektska otapala..... | 12 |
| 3.1.5 | Uređaji i oprema..... | 13 |
| 3.2 | Metode | 14 |
| 3.2.1 | Uzgoj stanica i određivanje broja stanica dodatkom boje tripan-plavo..... | 14 |
| 3.2.2 | Nacijepljivanje stanica i tretman niskotemperaturnim eutektskim otapalima | 15 |
| 3.2.3 | MTS metoda za određivanje preživljenja stanica | 16 |
| 3.2.4 | Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto | 16 |
| 4 | REZULTATI I RASPRAVA..... | 17 |
| 4.1 | Utjecaj niskotemperaturnih eutektskih otapala na Caco-2 i HeLa staničnu liniju..... | 17 |
| 4.2 | Morfologija Caco-2 i HeLa stanica tretiranih niskotemperaturnim eutektskim otapalima..... | 20 |
| 4.3 | Učinak terapijskog eutektskog otapala na Caco-2 stanice | 22 |
| 5 | ZAKLJUČCI | 23 |

1 UVOD

U mnogim procesima kao što su separacija, ekstrakcija i sinteza primjenjuju se organska otapala. Njihova upotreba je štetna za zdravlje radnika i sigurnost procesa zbog toksičnosti, eksplozivnosti i lake zapaljivosti. Kako organska otapala ne zadovoljavaju načela zelene kemije zadatak je pronaći zadovoljavajuću alternativu i razviti nova zelena otapala. Eutektička otapala nazivaju se zelenima jer se sastoje od amonijevih soli i donora vodikovih veza (šećeri, alkoholi, karboksilne kiseline, amidi, amini), a spojevi sami po sebi nisu toksični i štetni za okoliš (Dai i sur.,2013).

Niskotemperaturna eutektička otapala definirana su kao smjesa dvaju ili više komponenti koje su povezane vodikovim vezama pri čemu dolazi do sniženja temperature tališta pa se otapala nalaze u tekućem stanju (Paiva i sur., 2014). Jedan od glavnih problema farmaceutske industrije je topljivost lijekova, a potencijal za otapanje polarnih i nepolarnih spojeva pokazuju eutektička otapala (Pedro i sur., 2019). U radu Tuntarawongsa i Phaechamud (2012) utvrđeno je kako se topljivost aktivnog sastojka (ibuprofena) povećava između 5 i 22 000 puta otapanjem u terapijskom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu.

Iako eutektička otapala zadovoljavaju načela zelene kemije, njihov ekotoksikološki profil nije u potpunosti poznat pa je potrebno prije upotrebe u industriji provesti ekotoksikološka istraživanja na staničnim linijama. U ovom radu ispitano je djelovanje triju niskotemperaturnih eutektičkih otapala (limunska kiselina: glukoza, betain:jabučna kiselina:glukoza, glicerol:glukoza) u svrhu bolje topljivosti antibiotika ciprofloksacina kao i terapijskog eutektičkog otapala (limunska kiselina:glukoza:ciprofloksacin)

2 TEORIJSKI DIO

2.1 TOPLJIVOST I PERMEABILNOST AKTIVNIH DJELATNIH TVARI

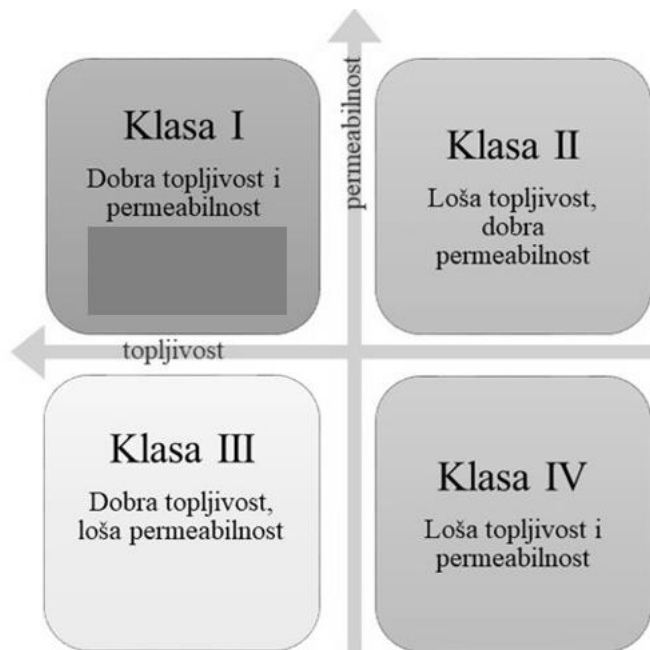
Farmaceutska industrija često se suočava s problemom slabe topljivosti i permeabilnosti lijekova što rezultira neodgovarajućom farmakokinetikom i slabom bioraspoloživosti aktivne djelatne tvari (eng. *Active pharmaceutical ingredient, API*) koji je odgovoran za učinkovito djelovanje lijeka (Duarte i sur., 2017).

Prema biofarmaceutskom klasifikacijskom sustavu (eng. *Biopharmaceutical classification system, BCS*) lijekovi se mogu klasificirati u četiri skupine ovisno o topljivosti u tjelesnim tekućinama i permeabilnosti u probavnom sustavu (Slika 1.). Aktivne tvari koje ulaze u skupinu I pokazuju dobru topljivost i permeabilnost, tj. brzo se apsorbiraju preko stijenke gastrointestinalnoga sustava te imaju dobru topljivost u tjelesnim tekućinama. Aktivne tvari iz skupine II imaju veliku sposobnost permeabilnosti, ali pokazuju slabiju topljivost. U suprotnosti od djelatnih tvari skupine II, djelatne tvari skupine III pokazuju dobru topljivost, ali lošu permeabilnost zbog čega se u konačnici izluče iz organizma. U tom slučaju, budući da ne dolazi do apsorpcije, nema ni željenog farmakokinetičkog djelovanja. Djelatne tvari iz skupine IV predstavljaju veći izazov za farmaceutsku industriju jer uz lošu permeabilnost te tvari imaju i lošu sposobnost otapanja.

Prema radu Heimbach i sur. (2007) procjenjuje se da je 40 % aktivnih tvari u razvoju (eng. *New chemical entities, NCE*) slabo topljivo u vodi. U posljednje vrijeme, u farmaceutskoj industriji, nastoje se poboljšati takvi nedostaci kod već postojećih lijekova nego razviti nove lijekovi, što zahtijeva dugotrajna klinička ispitivanja, stoga se modifikacije lijekova mogu odnositi na oblik i formulaciju, a može se mijenjati i sam način primjene. Modifikacije se izvršavaju posebno kod biofarmaceutika iz klase II koji imaju veliku sposobnost permeabilnosti kroz stijenke gastrointestinalnog sustava, no slabije su topljivosti u tjelesnim tekućinama (Pedro i sur., 2019).

BCS sustav je nerijetko povezan s topljivosti u simuliranim tjelesnim tekućinama i gastrointestinalnom permeabilnosti jer se njime klasificiraju najčešće lijekovi oralne primjene. Usvojeni su *in vitro* modeli kojima se određuje permeabilnost lijekova u sintetičkim membranama koje oponašaju učinak tkiva. Slaba topljivost i/ili permeabilnost API-ja često se

nadoknađuje većim dozama lijeka kako bi se osigurala djelatna koncentracija na ciljnom mjestu, analogno tome može doći do sistematske toksičnosti ili različitih neželjenih učinaka kao posljedica (Duarte i sur., 2017). Bez obzira na već opisane pristupe u literaturi, poboljšanje topljivosti lijekova ostaje velik izazov u farmaceutskoj industriji.



Slika 1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije (prilagođeno prema Duarte i sur., 2017)

2.1.1 Topljivost aktivnih djelatnih tvari

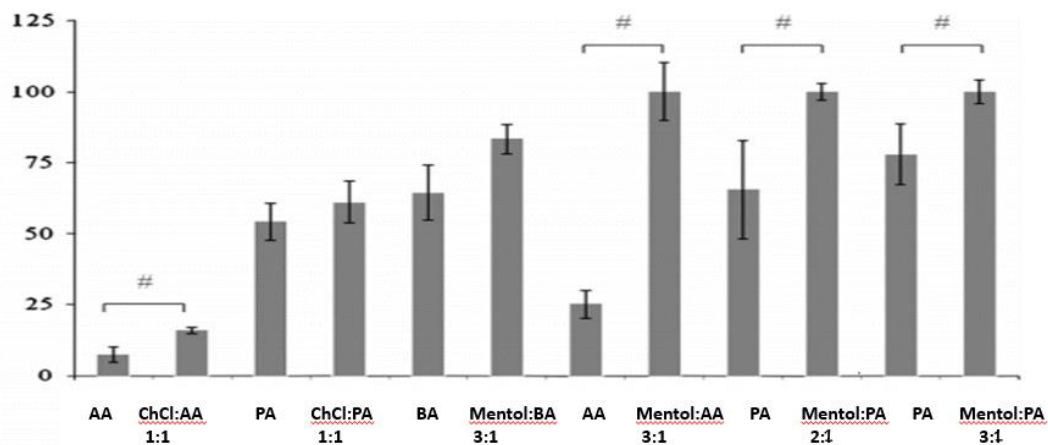
Topljivost bilo koje tvari može se definirati kao količina tvari koja je nakon postizanja ravnoteže između otopine i otopljene tvari prešla u otopinu pri određenim uvjetima tlaka i temperature. Bilo koji lijek koji se apsorbira mora biti otopljen u mediju na mjestu apsorpcije, pa tako postoje različite metode za poboljšanje topljivosti slabo topljivih aktivnih tvari. Metode uključuju kemijske i fizikalne modifikacije kao i neke druge modifikacije koje su: smanjenje veličine čestica, kristalno inženjerstvo, kompleksiranje, stvaranje soli, upotreba surfaktanata i dr. te se metoda odabire ovisno o svojstvu lijeka, mjestu apsorpcije i potrebnim karakteristikama doziranja.

Činjenica da se API najčešće nalazi u čvrstom stanju, ograničava napredak u poboljšavanju učinkovitosti lijekova. Opcija je prevođenje API-ja u tekuće agregacijsko stanje koje pokazuje

bolju topljivost i terapijsku učinkovitost. Ova promjena mora biti izvedena tako da ne ugrožava stabilnost, efikasnost i sigurnost konačnog proizvoda (Pedro i sur., 2019). Lijek ili aktivni farmaceutski sastojak smatra se dobro topljivim u vodi ako se najjača doza može otopiti u volumenu od 250 mL vodenoga medija u određenom pH rasponu. Volumen od 250 mL izabran je jer se upravo ta količina vode konzumira prilikom oralne primjene lijeka. Uvjeti temperature pri kojoj se topljivost lijeka ispituje su 37 ± 1 °C, dok je pH raspon 1-7.5 prema USFDA-u (eng. *United States Food and Drug Administration, USFDA*), prema WHO (eng. *World Health Organisation, WHO*) je 1.2-6.8 , a prema Europskoj agenciji za procjenu lijekova (eng. *European Medicines Evaluation Agency, EMEA*) je 1-8. Kako je širok raspon pH-vrijednosti postoji mogućnost degradacije aktivne tvari i iz tog razloga potrebno je promatrati topljivost aktivne tvari u što širem rasponu pH-vrijednosti (Chavda i sur., 2009).

Niskotemperaturna eutektička otapala

U novije doba, pažnju akademskih znanstvenika kao i onih iz odjela istraživanja i razvoja farmaceutskih kompanija, privukla su niskotemperaturna eutektička otapala, kao jedno rješenje za poboljšanu topljivost aktivnih djelatnih tvari. Postoji mogućnost sinteze niskotemperaturnih eutektičkih otapala u kojima je jedna od sastavnih komponenti API. Ovakve smjese nazivaju se terapijskim eutektičkim otapalima (eng. *Therapeutic deep eutectic system, THEDES*) (Aroso i sur., 2016). Tuntarawongsa i Phaechamud (2012) utvrdili su kako se povećava topljivost ibuprofena između 5 i 22 000 puta otapanjem u terapijskom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu koje sadrži :mentol, kamfor i API (ibuprofen). Ukoliko nema dobre topljivosti nema ni bioraspoloživosti pa su Aroso i sur. (2016) u svome radu ispitivali razlike u topljivosti tri aktivna sastojka: acetilsalicilne (AA), benzojeve (BA) i fenilacetilne kiseline (PA) korištenjem THEDES-a sa mentolom i kolin-kloridom i te razlike u topljivosti prikazane su na slici 2. Dokazana je bolja topljivost aktivnih sastojaka kada su u formulaciji THEDES-a, nego u čistoj vodenoj otopini aktivne tvari. Iz grafa se vidi kako sve tri aktivne tvari : AA, PA i BA pokazuju bolje otapanje u THEDES-u s mentolom, nego s kolin-kloridom. Slijedom navedenog mnoga su istraživanja provedena s mentolom te je zaključeno kako se aktivna tvar različito ponaša ako je u smjesi s drugim tvarima kao mentol i kolin klorid. Ibuprofen koji je već spomenut kao djelatna tvar pripada klasi II , no u smjesi s mentolom ima povećanu permeabilnost i topljivost te tim poboljšanjem prelazi u klasu I. Benzojeva kiselina kao samostalan aktivni sastojak pripada klasi III, no ako je u smjesi sa mentolom u omjeru mentola i benzojeve kiseline 3:1 povećava joj se permeabilnost i topljivost pa pokazuje svojstva klase I (Duarte i sur., 2017).



Slika 2. Grafički prikaz otapanja čistih farmaceutski aktivnih tvari u etanolu i u DES-u nakon 7 h, prilagođeno prema radu (Aroso i sur., 2016)

Mentol (*eng. Menthol*), ChCl (kolin klorid), AA (acetilsalicilna kiselina), BA (benzojeva kiselina), PA (fenilacetilna kiselina)

2.1.2 Permeabilnost aktivnih djelatnih tvari

Permeabilnost je veličina za određivanje sposobnosti transporta ljekovitih tvari kroz membranu gastrointestinalnoga sustava, presudna je i za pravilnu raspodjelu lijeka u farmakološki ciljne organe i stanice. Zbog toga se često koristi u otkrivanju i razvoju lijekova (Wang i sur., 2014).

Za određivanje permeabilnosti novih farmaceutski aktivnih tvari koriste se *in vitro* metode koje se dijele na stanične i nestanične. U staničnim metodama primjenjuju se kulture stanica, dok se kod nestaničnih metoda koriste umjetne membrane koje simuliraju membranu u gastrointestinalnome sustavu. Umjetne membrane koje se koriste za procjenu apsorpcije API-ja dobro opisuju apsorpcijski potencijal lijeka jer se većina tvari apsorbira potpuno ili djelomično pasivnim transportom kroz umjetnu membranu koja oponaša pasivni unutarstanični transport (Zhu i sur., 2002). Stanična *in vitro* metoda koja se danas koristi kao standard u istraživanju intestinalne permeabilnosti je primjena Caco-2 stanične linije (Artursson i sur., 2001). Caco-2 su epitelne stanice tumora debeloga crijeva koje se koriste kao model za spomenuta istraživanja (Press i Grandi, 2008). Još 1983. godine Pinto i sur.

otkrili su sposobnost Caco-2 stanica da diferenciraju u epitelne stanice crijeva koja ima veliku primjenu u procjeni permeabilnosti. Niskotemperaturna eutektička otapala

Posljednjih godina razvijaju se ekološki prihvatljivija otapala ili tzv. zelena otapala koja moraju zadovoljiti zahtjeve kao što su: energetski nezahtjevna i jednostavna sinteza, dostupnost, biorazgradivost, niske cijene, mogućnost ponovne upotrebe, nezapaljivost, mala hlapljivost i niska toksičnost (Zang i sur., 2012).

Niskotemperaturna eutektička otapala su zelena otapala koja nastaju miješanjem dva ili više metabolita u definiranom molarnom omjeru te pri definiranoj temperaturi koja se povezuju vodikovim vezama (Martins i sur., 2019). Ime ovih otapala dolazi od grčke riječi $\epsilon\upsilon$ (eu) i $\tau\eta\chi\iota\varsigma$ (teksis) što u prijevodu znači lako topljenje, dakle otapala imaju svojstvo eutektičnosti, dok niskotemperaturna označava pad temperature tališta smjese u odnosu na temperaturu tališta ishodnih komponenti (Paiva i sur., 2014).

Struktura niskotemperaturnih eutektičkih otapala prema radu Smith i sur. iz 2014 godine može se opisati općom formulom $Cat^+X^+Z^-Y^-$, Cat^+ predstavlja fosfonijev, amonijev ili sulfonijev kation, halogenid X^- je Lewisova baza, dok Y^- predstavlja Lewis-ovu ili Brønsted-ovu kiselinu.

Cat^+X^- dio formule predstavlja akceptora vodikove veze (eng. *hydrogen bond acceptor*, HBA), s kojim tvori kompleks kao donor vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor*, HBD), a Z^- označava broj Y^- molekula u kompleksu. Prema navedenom niskotemperaturna eutektička otapala dijele se u četiri skupine:

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

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

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

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

Nakon razvoja DES-ova među kojima su najzastupljenija bila ona bazirana na kolin-kloridu (ChCl), organskim kiselinama, šećerima, polialkoholima, aminokiselinama i dr. (Carriazo i sur., 2012), Dai i sur. (2013) uveli su novu vrstu niskotemperaturnih eutektičkih otapala koju su nazvali NADES (eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) koja po svim karakteristikama zadovoljavaju načela zelene kemije; nehlapljivost, toplinska kemijska i elektrokemijska stabilnost, biorazgradivost, nizak tlak pare, nezapaljivost, netoksičnost, veća viskoznost od vode i klasičnih organskih otapala, nemiješanje sa mnogim organskim otapalima.

2.1.3 Toksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Bez obzira što postoji mogućnost široke upotrebe DES-ova u području zelenih tehnologija, prije primjene u industriji potrebno je detaljno provjeriti njihovu toksičnost. Glavni cilj ispitivanja citotoksičnosti *in vitro* je unapređenje zaštite okoliša i ljudskoj zdravlja ranijom identifikacijom kemijskih tvari koje su potencijalno toksične (Hayyan i sur., 2015).

Prema radu Radošević i sur. (2015) u sintezi niskotemperaturnih eutektičkih otapala od velike je važnosti izbor donora vodikove veze. Naime u radu je ispitana je citotoksičnost na ribljaj (CCO) i humanoj staničnoj liniji (MCF-7), fitotoksičnost na pšenici i biorazgradivost pomoću mikroorganizama iz otpadnih voda. U istraživanju korištena su tri niskotemperaturna eutektička otapala na bazi kolin-klorida uz glukozu, glicerol i oksalnu kiselinu, koji imaju ulogu donora vodikove veze. Utvrđeno je da kombinacija kolin-klorid sa glukozom ili glicerolom pokazuje nisku razinu citotoksičnosti, dok kolin-klorid uz oksalnu kiselinu rezultira toksičnim otapalom. Sva otapala karakterizirana su kao biorazgradiva i ta spoznaja dovodi do zaključka kako su DES-ovi na bazi kolin-klorida perspektivni za široku primjenu u različitim industrijama. Hayyan i sur. (2013a, 2013b) također su u svome istraživanju potvrdili rezultate o netoksičnosti eutektičkih otapala s kolin-kloridom koristeći larve račića i bakterije, te je zaključeno da toksičnost i citotoksičnost ovisi o sastavu i primijenjenoj koncentraciji.

U radu Rodrigues i sur. (2021) ispitana su fizikalno-kemijska i toksikološka svojstva DES-ova sa betainom uz različite udjele vode u otapalu, za procjenu ovakvih eutektičkih otapala toksičnost se ispitivala na humanim intestinalnim stanicama epitelnog tkiva (Caco-2), bakterijama i sjemenkama pšenice. Općenito toksičnost otapala bila je manja kako se udio vode u otapalu povećavao kod Caco-2, ali i bakterijskih stanica. Također kod sjemenaka pšenice uočeno je kako se i dalje mogu razvijati i rasti uz DES-ove pa se ova otapala smatraju niske fitotoksičnosti.

2.1.4 Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Komponente prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala široko su rasprostranjene u prirodi. Njihov naziv ne opisuje samo podrijetlo već i njihovu pretpostavljenu ulogu u živim organizmima pa imaju potencijal kao medij za skladištenje, otapanje i transport metabolita koji nisu topljivi u vodi i mastima. Naime velik je broj kombinacija ishodnih molekula koje

formiraju NADES što otvara mogućnosti sinteze novih NADES koja imaju svojstva za točno određenu primjenu npr. u proizvodnji funkcionalne hrane (Dai i sur., 2013).

Eutektička otapala smatraju se dobrom alternativom otapala za široku primjenu u kemijskim procesima kao što su: ekstrakcija, (bio)kataliza, organska sinteza, elektrokemija i mnoge druge (Rodrigues i sur., 2021). Nadalje DES-ovi imaju svoju primjenu i u ekstrakciji, pročišćavanju i izolaciji sekundarnih metabolita koja posjeduju biološku aktivnost, upravo ta aktivnost može biti korisna i primjenjiva u liječenju ili prevenciji bolesti kod ljudi. U posljednjih 10 godina ta se otapala intenzivno proučavaju i sve više pronalaze svoju primjenu. Naprimjer u ekstrakciji zbog svoje sposobnosti otapanja organskih i anorganskih spojeva pa se uz niskotemperaturno eutektičko otapalo ChCl:U (kolin klorid:urea) vrši ekstrakcija proteina keratina iz prirodnih izvora. Niskotemperaturna eutektička otapala koriste se i u obradi biomase, otapalo ChCl:AA (kolin klorid:octena kiselina) koristi se za otapanje celuloze. Svoju primjenu niskotemperaturna eutektička otapala pronašla su i u elektrokemiji zbog električne provodljivosti i sposobnosti otapanja različitih metalnih soli i oksida pa se otapalo ChCl:U (kolin klorid:urea) koristi u proizvodnji nanočestica (Ag) (Radović i sur., 2021)

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Kemikalije

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- FBS (Fetal Bovine Serum), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- 0,25% Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK
- Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH
- MTS[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij], Promega, NY, SAD
- Etanol, Kemika, Zagreb, RH
- Niskotemperaturna eutektička otopala: limunska kiselina:glukoza (Ca:Glc), glicerol:glukoza (Gly:Glc), betain:jabučna kiselina: glukoza (B:Ma:Glc), Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF, Zagreb, RH

3.1.2 Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4)

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 8,0 g |
| KCl | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,44 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,24 g |

Destilirana voda do 1000 mL

0,4% otopina tripan-plavo

| | |
|-------------------|--------|
| Boja tripan-plavo | 0,04 g |
| PBS pufer do | 10 mL |

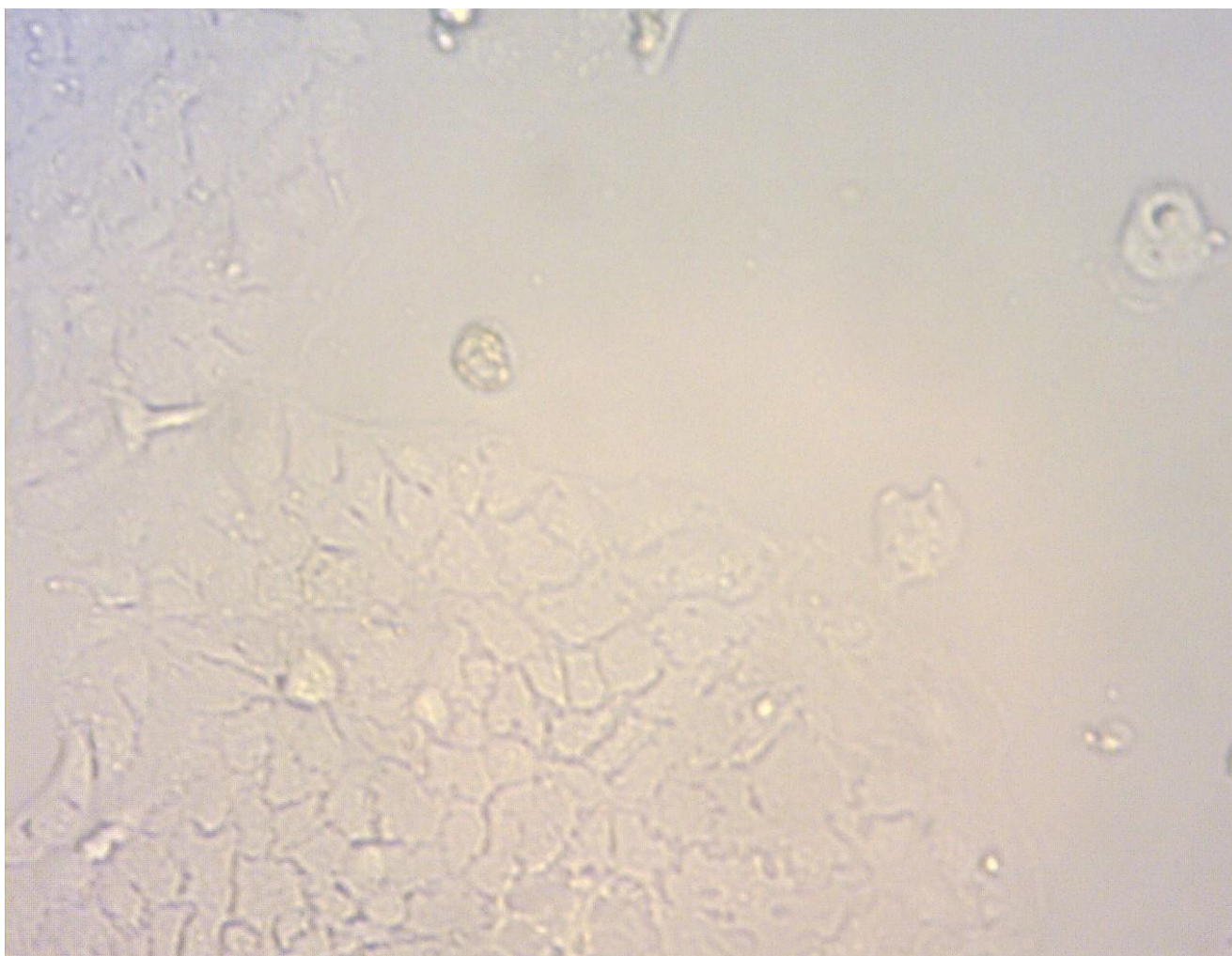
0,2% otopina kristal-ljubičasto

Boja kristal-ljubičasto 0,02 g

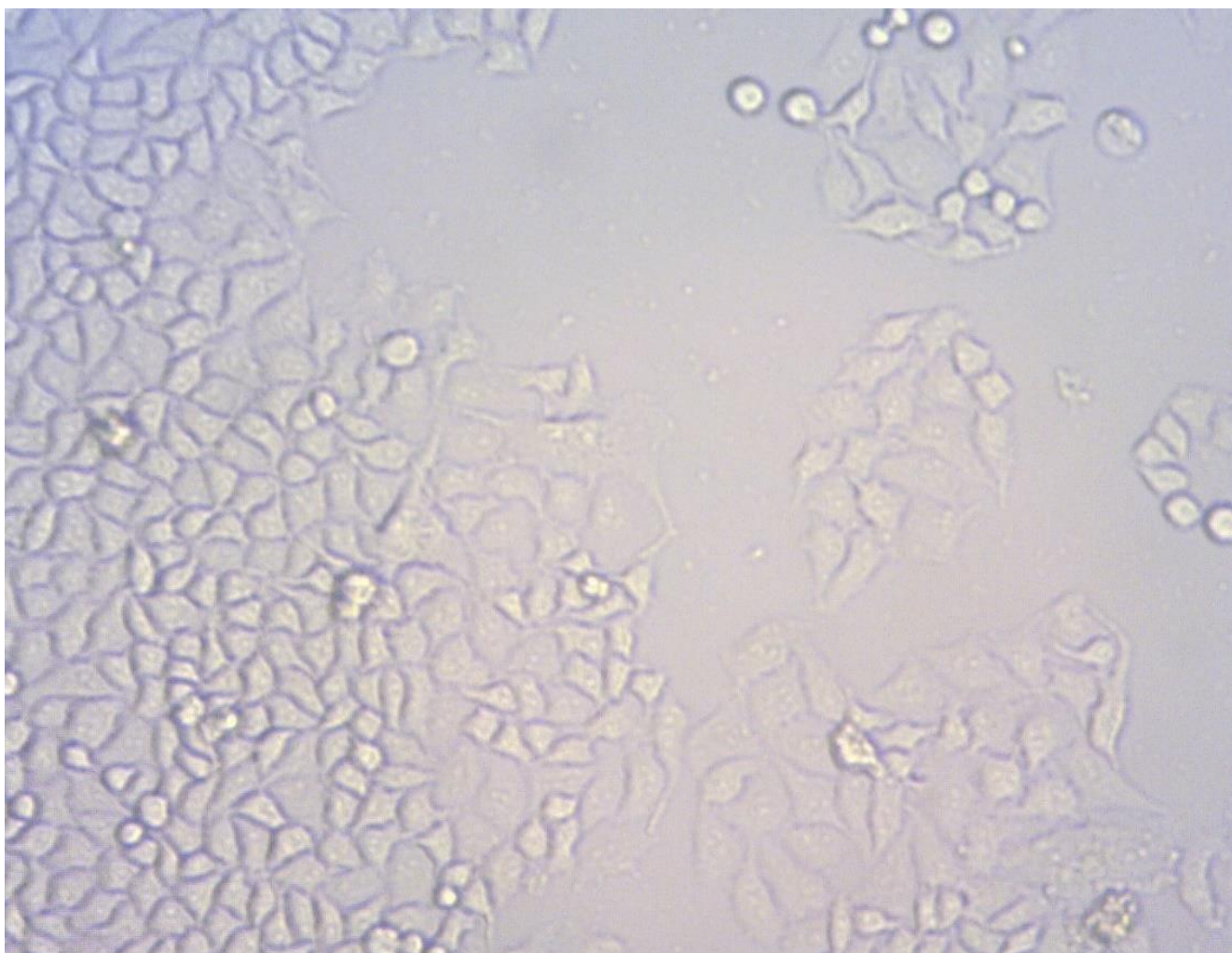
2% etanol do 10 mL

3.1.3 Caco-2 i HeLa stanice

U ovom radu korištena je Caco-2 humana stanična linija iz CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germany) banke stanica prikazana na slici 3. Caco-2 je besmrtna stanična linija ljudske stanice kolorektalnog andenokarcinoma. Primarno se koristi kao model crijevne epitelne barijere. Stanice Caco-2 u kulturi spontano diferenciraju u heterogenu smjesu crijevnih epitelnih stanica, odnosno morfološki i funkcionalno podsjećaju na enterocite koji oblažu tanko crijevo. Za usporedbu korištena je i HeLa stanična linija koja je izolirana iz tumora vrata maternice i koristi se kao izuzetno dobar biološki model za različita *in vitro* istraživanja. HeLa stanična linija iz CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germany) radne banke stanica, prikazana je na slici 4. Obje stanične linije su adherentne, a morfološki epitelne i uzgajaju se u inkubatoru s atmosferom koja sadrži 95% zraka i 5% CO₂ te pri temperaturi od 37 °C. Uzgoj stanica provodi se u petrijevim zdjelicama ili u ploči s jažicama prilikom postavljanja eksperimenata ispitivanja citotoksičnosti eutektskih otapala.



Slika 3. Mikroskopska slika Caco-2 stanične linije (vlastita fotografija)



Slika 4. Mikroskopska slika HeLa stanične linije (vlastita fotografija)

3.1.4 Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala korištena u ovom radu sintetizirana su u Laboratoriju za tehnologiju, primjenu stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta u Zagrebu miješanjem u Tablici 1.

Tablica 1. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala korištena u radu

| Prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo | Molarni omjer | Kratica |
|------------------------------------------------------|----------------------|----------------|
| limunska kiselina: glukoza | 1:1 | Ca:Glc |
| betain:jabučna kiselina:glukoza | 2:1 | B:Ma:Glc |
| glicerol:glukoza | 2:1 | Gly:Glc |
| limunska kiselina:glukoza:ciprofloksacin | 1:1:0.3 | Ca:Glc:CIP |

3.1.5 Uređaji i oprema

- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija
- Inverzni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka
- Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Ploče s 24 jažice, Corning, SAD
- Čitač ploča, Tecan, Mannendorf, Švicarska
- Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija
- Hladnjak (-75 °C), TT 80 FRYKA, Njemačka
- Digitalna vaga, Boeco, Njemačka
- Neubauerova komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD

- Laboratorijski pribor (mikropipete, nastavci za mikropipete, petrijeve zdjelice, laboratorijsko posuđe)

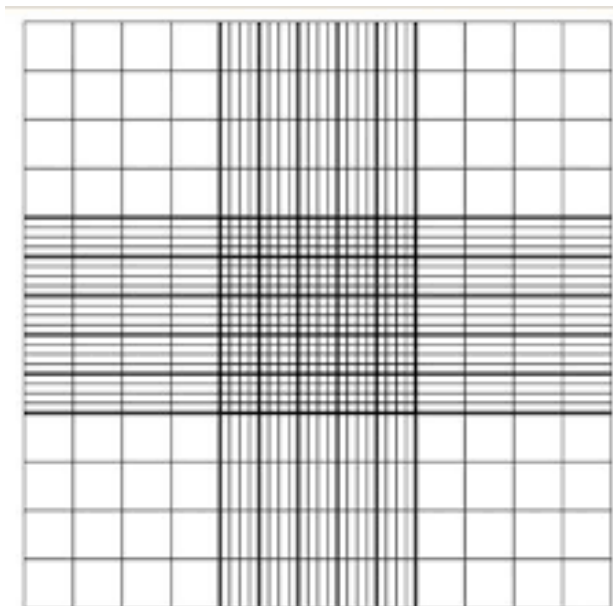
3.2 METODE

Rad sa staničnim linijama zahtjeva aseptične uvjete kao i korištenje steriliziranog laboratorijskog pribora. Tijekom ovog istraživanja sve manipulacije sa Caco-2 i HeLa stanicama odrađene su u laminaru, također kako bi se spriječila kontaminacija, ruke i radna površina prije rada prebrisana je 70%-tnim etanolom.

3.2.1 Uzgoj stanica i određivanje broja stanica dodatkom boje tripan-plavo

Caco-2 i HeLa stanice čuvane su u ampulama na -70 °C. Ampule je potrebno prvo odmrznuti uranjanjem u vodenu kupelj te se tamo stanice u mediju za zamrzavanje zagrijavaju na 37°C, nakon odmrzavanja suspenzija se podlaže centrifugiranju i uklanja se medij za zamrzavanje. Talog se resuspendira u svježem mediju za uzgoj uz dodatak 10 % seruma. Stanice se čuvaju u inkubatoru i kontroliranim uvjetima, pri 37 °C u atmosferi koja sadrži 5 % ugljikovog dioksida. Obe stanične linije su adherentnog tipa te ih je prije precjepljivanja potrebno tretirati tripsinom kako bi se odvojile od podloge za rast. Prvo se uklanja medij za uzgoj, stanice se ispiru PBS puferom te se dodaje tripsin. Nakon dodavanja tripsina petrijeva zdjelica u kojoj su stanice odlaže se u inkubator na 37 °C dok se stanice ne odvoje od podloge. Odvajanje stanica pratimo pod inverznim mikroskopom. Kad se stanice odvoje, što je vidljivo pod mikroskopom, zaustavlja se djelovanje tripsina dodatkom svježeg medija. Alikvot pomiješan sa bojom tripan-plavo koristi se za određivanje broja stanica. Broj stanica određuje se pomoću Neubauerove komorice. Komorica za brojanje sadrži mrežu od jednog velikog kvadrata unutar kojeg se nalazi 9 manjih kvadrata. Stanice se broje u četiri rubna kvadrata koja su podijeljena na 16 kvadratića (4x4) (Slika 5.). Broj stanica u mililitru suspenzije određen je prema formuli (1):

$$\frac{\text{broj stanica}}{\text{mL suspenzije}} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} * 5000 \quad (1)$$



Slika 5. Mreža Neubauerove komorice

3.2.2 Nacjepljivanje stanica i tretman niskotemperaturnim eutektskim otapalima

Kada se odredi broj stanica u mL suspenzije računa se volumen suspenzije potreban za nacjepljivanje ploča sa 96 jažica. Koncentracija stanica koja se nacjepljuje je 3×10^4 stanica po mL. U svaku jažicu nacjepljuje se 100 μ L pripremljene i razrijeđene suspenzije te se ploča s jažicama odlaže 24h u inkubator na 37 °C. U tom razdoblju stanice se prihvaćaju za podlogu, dijele se i rastu. Obje stanične linije tretirane su sa 8 različitih koncentracija (5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 mg L⁻¹ pripremljenih niskotemperaturnih eutektskih otapala (Ca:Glc, B:Ma:Glc, Gly:Glc). Caco-2 stanična linija tretirana je irazličitim koncentracijama (10, 25, 50, 100 mg L⁻¹) formulacije ciprofloksacina (Ca:Glc:CIP). Za svaku koncentraciju postavljene su tri paralele, dok kontrolne stanice nisu tretirane. Nakon dodatka niskotemperaturnih eutektskih otapala i formulacije ciprofloksacina stanice su inkubirane na temperaturi od 37 °C tijekom 72 sata nakon čega je određen učinak otapala na stanice MTS metodom.

3.2.3 MTS metoda za određivanje preživljenja stanica

U istraživanjima toksičnosti koristi se MTS metoda, ova metoda je kolorimetrijska i pomoću nje se određuje broj vijabilnih stanica. The CellTiter 96® AQueous One Solution reagens sadržava tetrazolijevu sol MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij i PES (fenazin etosulfat) koji poboljšava stabilnost reagensa. MTS sol se u stanicama reducira do ljubičasto obojenog produkta, formazana koji je topljiv u staničnom mediju. Reakcija redukcije odvija se u prisutnosti NADH ili NADPH koji nastaju djelovanjem enzima dehidrogenaza metabolički aktivnih stanica. Nakon tretmana niskotemperaturnim eutektičkim otapalima uklanja se medij te se u svaku jažicu dodaje svježi medij s MTS reagensom (10% v/v). Ploče se vraćaju na inkubaciju na 37 °C u vremenskom periodu 1-4 sata. Intenzitet razvijene boje mjeri se spektrofotometrijski čitačem ploča te je izražen kao apsorbancija pri valnoj duljini od 490 nm. Apsorbancija koja je izmjerena proporcionalna je količini nastalog formazana, kao i broju živih stanica. Postotak preživljenja stanica izračunava se množenjem omjera apsorbancije tretiranih i kontrolnih stanica sa 100, tj. prema formuli (2):

$$\text{Preživljenje stanica (\%)} = \frac{\text{apsorbancija tretiranih stanica}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.4 Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Kako bi se uočile eventualne morfološke promjene, obje stranične linije promatrane su svakodnevno pod inverznim mikroskopom. Zbog vidljivosti na fotografijama stanice su obojane bojom kristal-ljubičasto. U ploču sa 24 jažice naci jepljeno je 0,5 mL suspenzije stanica početne koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} te su stanice tretirane različitim koncentracijama eutektičkog otapala. Ploča s jažicama stavljena je u inkubator na 72 sata. Nakon inkubacije uklonjen je medij, stanice su isprane PBS puferom i u svaku jažicu dodano je 300 μL otopine boje kristal-ljubičasto. Ploča je nakon dodatka boje vraćena u inkubator na 10-15 minuta, boja je uklonjena te su stanice još jednom isprane PBS puferom. Na poslijetku obojene stanice slikane su Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom.

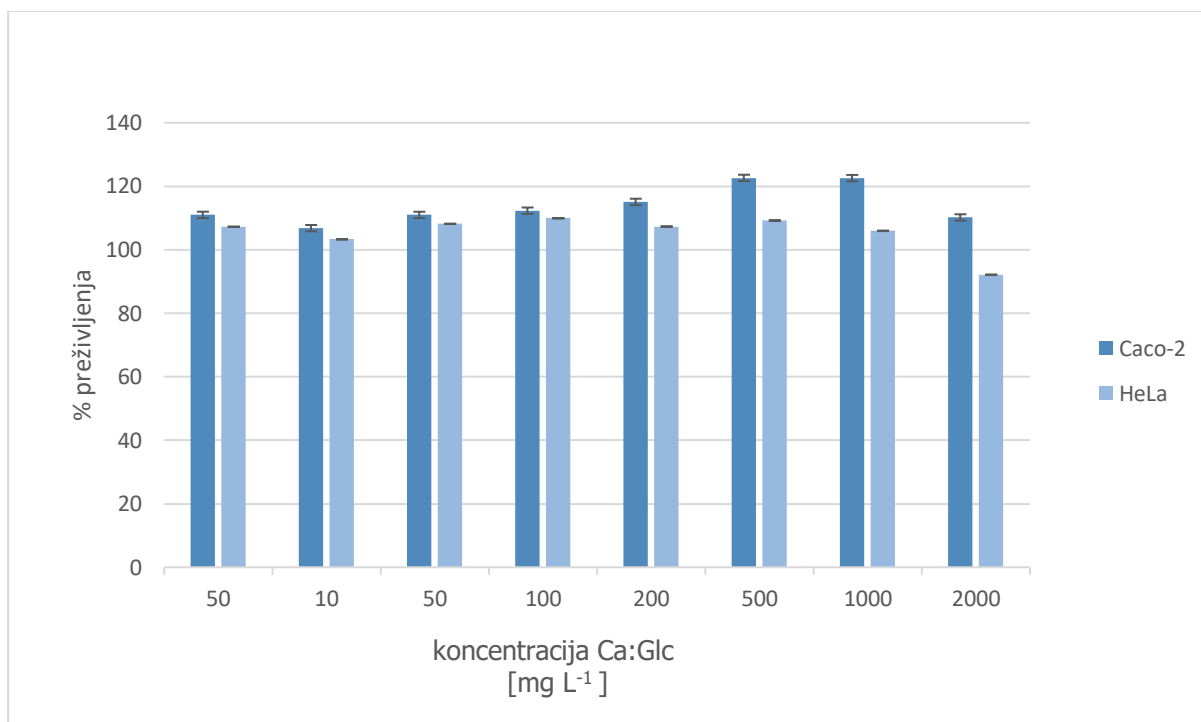
4 REZULTATI I RASPRAVA

Proporcionalno s rastom svjesnosti društva i pojedinaca o zaštiti okoliša i održivom razvoju raste i zahtjev za dizajniranjem farmaceutskih, biotehnoloških i kemijskih proizvoda koji smanjuju ili isključuju u potpunosti nastajanje štetnih tvari za žive organizme i okoliš. Niskotemperaturna eutektična otapala pokazala su potencijal zbog svojstava kao što su netoksičnost, biorazgradivost, nezapaljivost, nehlapljivost, mogućnost dizajniranja otapala za željenu primjenu i dr. pozitivnih svojstava u raznim industrijama. U farmaceutskoj industriji eutektička otapala koja kao komponentu sadrže aktivnu (djelatnu) tvar ili djeluju kao otapalo za njega pokazala su se kao obećavajuća alternativa za poboljšanje terapijske učinkovitosti.

Svrha ovoga istraživanja je ispitati citotoksično djelovanje triju niskotemperaturna eutektička otapala sintetiziranih u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, PBF-a na Caco-2 i HeLa staničnoj liniji i terapeutskog eutektičkog otapala na Caco-2 staničnoj liniji. Za ispitivanje toksičnosti Caco-2 i HeLa stanice naciyepljene su na ploču sa 96 jažica te tretirane različitim koncentracijama eutektičkih otapala: limunska kiselina:glukoza, betain: jabučna kiselina: glukoza, glicerol: glukoza te limunska kiselina: glukoza: ciprofloksacin. Caco-2 stanična linija najčešći je *in vitro* model u istraživanjima apsorpcije lijekova u probavnom traktu, stanice se diferenciraju i polariziraju tako da funkcionalno i morfološki podsjećaju na enterocite koji oblažu tanko crijevo. Paralelno s istraživanjem na Caco-2 stanicama, citotoksično djelovanje ispitano je i na HeLa staničnoj liniji koja je ranije korištena u mnogim ispitivanjima učinaka DES-ova. Za uzgoj je korišten DMEM hranjivi medij uz dodatak FBS-a, tretman eutektičkim otapalima trajao je 72 sata, dok je preživljenje stanica određeno MTS metodom.

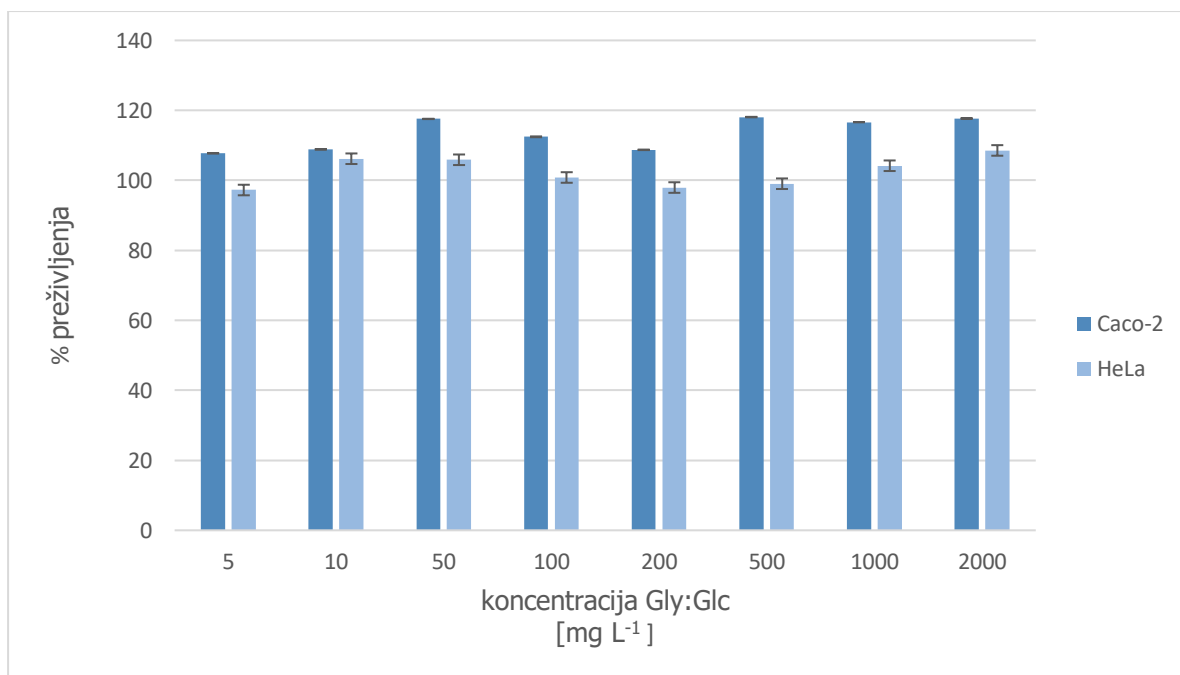
4.1 UTJECAJ NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA NA CACO-2 I HELA STANIČNU LINIJU

Caco-2 i HeLa stanice početne koncentracije 3×10^4 stanica mL^{-1} naciyepljene su na ploču 96 jažica i inkubirane 24 sata na 37°C . Nakon inkubacije stanice su tretirane niskotemperaturnim eutektičkim otapalima: Ca:Glc, B:Ma:Glc, Gly:Glc u rasponu koncentracija od 5 do 2000 mg L^{-1} . Ploča je vraćena u inkubator na 72 sata nakon se MTS kolorimetrijskom metodom odredio postotak preživljenja Caco-2 i HeLa stanica tretiranih DES-ovima u odnosu na kontrolne, netretirane stanice. Rezultati su prikazani na slikama 6-8.



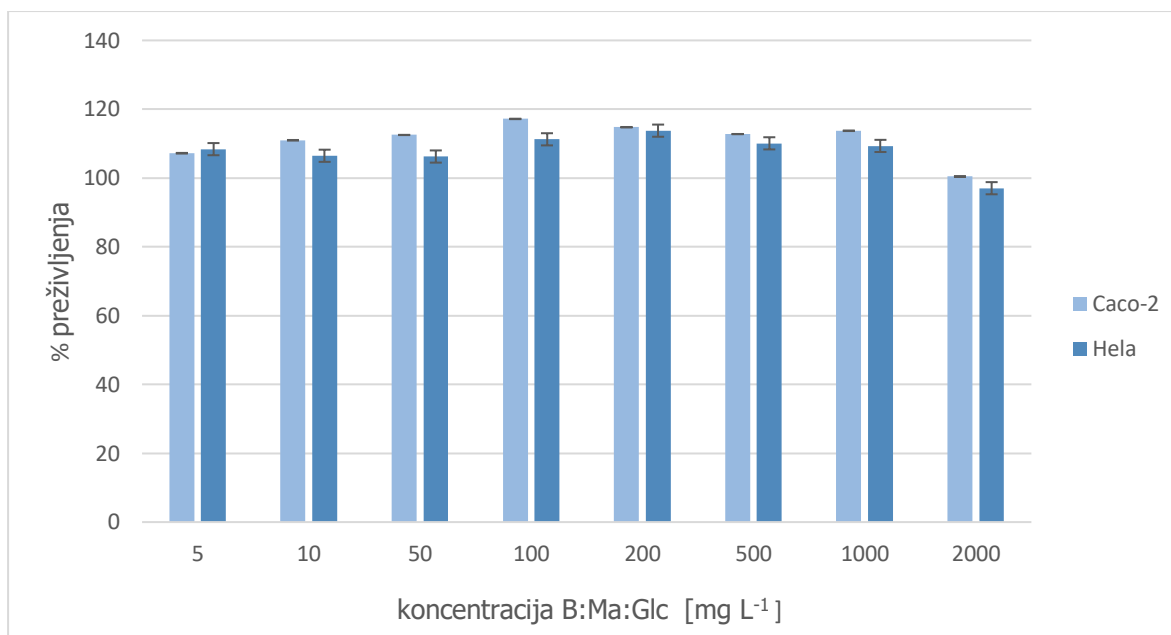
Slika 6. Utjecaj niskotemperaturnog eutektičkog otapala Ca:Glc na Caco-2 i HeLa stanične linije

Iz rezultata na slici 6 vidljivo je da ispitivano eutektičko otapalo nema citotoksični učinak na Caco-2 i HeLa staničnu liniju pri ispitivanim koncentracijama.



Slika 7. Utjecaj niskotemperaturnog eutektičkog otapala Gly:Glc na Caco-2 i HeLa stanične linije

Rezultati sa slike 7. pokazuju da niti kod ovog eutektičkog otapala nije znatno smanjeno preživljenje tretiranih Caco-2 i HeLa stanica te se može zaključiti da je citotoksični profil tog otapala dobar i da je sigurno za primjenu. Slični zaključak za eutektička otapala na bazi poliola i šećera jabučna kiselina:glukoza i jabučna kiselina:glukoza:glicerol donjeli su Mitar i sur. (2019) ispitivanjem citotoksičnosti na HEK-293T, HeLa, i MCF-7 staničnim linijama. U ispitanom rasponu od 1-2000 mg mL⁻¹ otapala nisu pokazala citotoksični učinak



Slika 8. Utjecaj niskotemperaturnog eutektičkog otapala B:Ma:Glc na Caco-2 i HeLa stanične linije

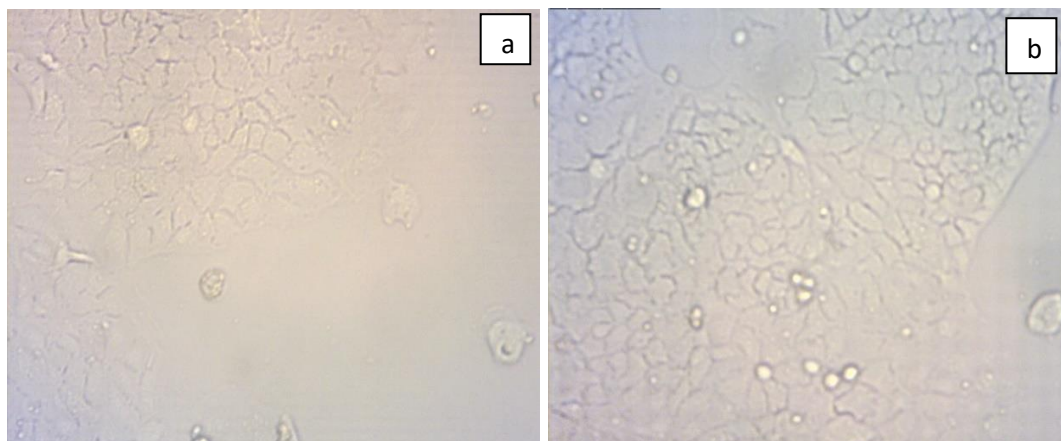
Djelovanje B:Ma:Glc otapala također nije inhibiralo rast Caco-2 stanične linije kao i na kontrolne stanice HeLa, dakle nije citotoksično. Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako ispitivana niskotemperaturna eutektička otapala nemaju citotoksično djelovanje na Caco-2 stanice što ih čini sigurnima za primjenu.

Citotoksični utjecaj hidrofilnih eutektičkih otapala na HeLa stanične linije već je ranije ispitan ((Hayyan et al., 2016; Radošević et al., 2018)). U istraživanju Radošević i sur. (2018) primijećeno je da je EC₅₀ vrijednost otapala B:Ma:Glc na HeLa staničnu liniju bila < 2000 mg L⁻¹ čime je zaključeno da je HeLa stanice pokazuju veliku toleranciju na otapala.

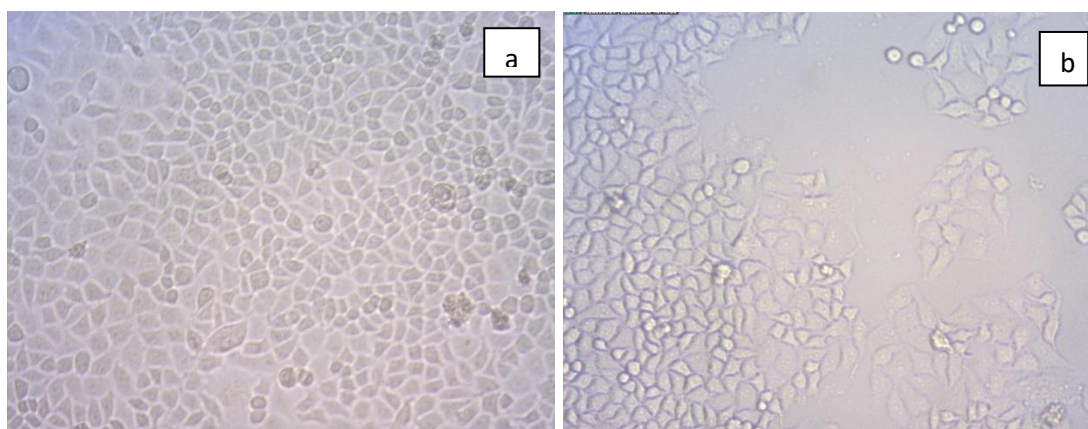
4.2 MORFOLOGIJA CACO-2 I HELA STANICA TRETIRANIH NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČNIM OTAPALIMA

Potencijalna toksičnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala na Caco-2 i HeLa stanice može se očitovati promjenama izgleda stanica. Tijekom ispitivanja citotoksičnosti eutektičkih otapala, stanice su promatrane i pomoću svjetlosnog mikroskopa. Praćena je brojnost kao i

izgled stanica. Kako ni jedno od ispitivanih otapala nije imalo citotoksični učinak primjenom MTS-metode, za morfološka ispitivanja, odabrano je jedno od 3 otapala B:Ma:Glc. Na slici 9. prikazane su Caco-2 kontrolne stanice i stanice tretirane niskotemperaturnim eutektičkim otapalom B:Ma:Glc. Na slici 10. prikazane su HeLa kontrolne stanice i stanice tretirane otapalom B:Ma:Glc.



Slika 9. Caco-2 stanična linija fotografirana pod svjetlosnim mikroskopom: a) Caco-2 kontrolne stanice b) stanice tretirane s 2000 mg L⁻¹ B:Ma:Glc

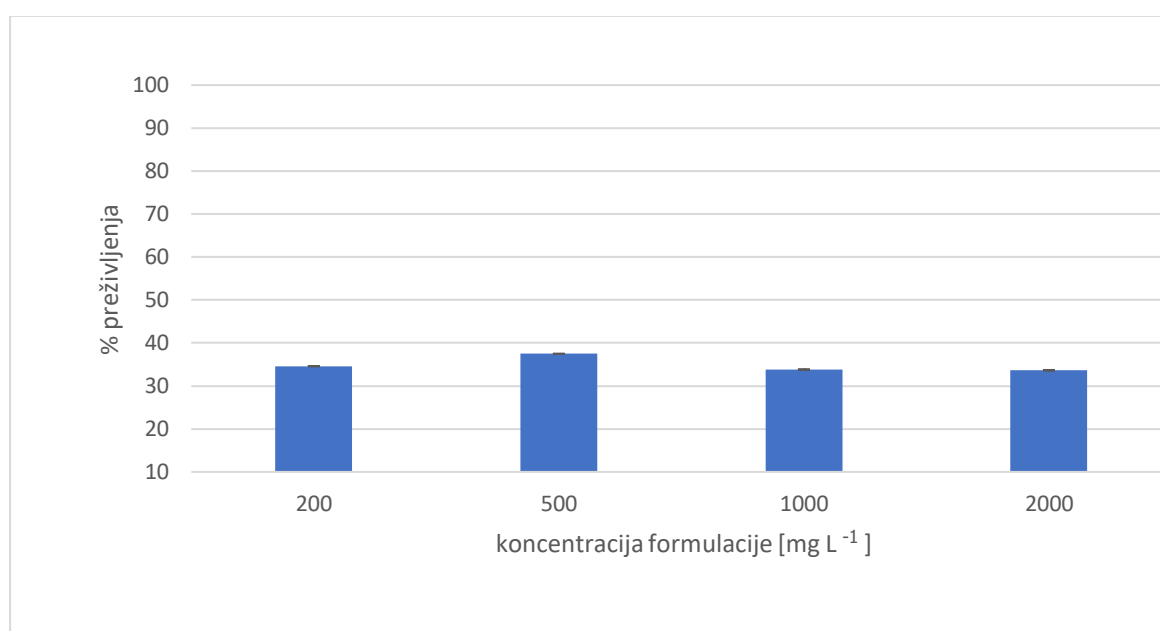


Slika 10. HeLa stanična linija fotografirana pod svjetlosnim mikroskopom: a) kontrolne stanice b) stanice tretirane s 2000 mg L⁻¹ B:Ma:Glc

Iz slika 9 i 10 vidljivo je kako niskotemperaturno eutektičko otapalo B:Ma:Glc nema učinak na rast Caco-2 i HeLa stanica, morfologija i brojnost tretiranih stanica potvrđuje rezultate MTS metode, odnosno da ispitivana niskotemperaturna eutektička otapala nemaju citotoksičan učinak na Caco-2 staničnu liniju.

4.3 UČINAK TERAPEUTSKOG EUTEKTIČKOG OTAPALA NA CACO-2 STANICE

Učinak niskotemperaturnog eutektičkog otapala Ca:Glc:CIP ispitan je u ovom radu kao sastavni dio formulacije ciprofloksacina. Ciprofloksacin je antibiotik koji pripada skupini fluorokinolona. Ciprofloksacin djeluje inhibitorno na bakterije koje uzrokuju infekcije probavnog sustava kao i mnoge druge. Djelovanje sintetiziranoga THEDES-a limunska kiselina: glukoza: ciprofloksacin ispitano je na stanicama ljudskog karcinoma kolona odnosno Caco-2 staničnoj liniji i dobiveni su rezultati prikazani na slici 11.



Slika 11. Utjecaj terapeutske eutektičke otopine Ca:Glc:CIP na Caco-2 stanice

Terapeutsko eutektičko otapalo Ca:Glc:CIP inhibiralo je rast Caco-2 stanica u cijelom području ispitivanja. Inhibiran je rast više od 50 % stanica te je citotoksični učinak vidljiv u cijelom području. Može se zaključiti da formulacija ciprofloksacina ima toksično djelovanje na Caco-2 stanice. Prema dostupnim literaturnim podacima, do sada nije ispitano citotoksično djelovanje formulacije Ca:Glc:CIP na CaCO-2 staničnu liniju te su podaci dobiveni u ovom dijelu istraživanja vrijedni za nastavak projekta Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova.

5 ZAKLJUČCI

Iz rezultata prikazanih u ovom radu proizlaze sljedeći zaključci:

1. Niskotemperaturna eutektička otapala limunska kiselina: glukoza, betain: jabučna kiselina: glukoza i glicerol: glukoza u ispitanom rasponu koncentracija (5-2000 mg L⁻¹) nemaju citotoksično djelovanje na Caco-2 staničnu liniju
2. Niskotemperaturna eutektička otapala (Ca:Glc, B:Ma:Glc, Gly:Glc) u ispitanim koncentracijama (5-2000 mg L⁻¹) nemaju citotoksično djelovanje na HeLa staničnu liniju i smatraju se sigurnima za primjenu.
3. Niskotemperaturno eutektičko otapalo B:Ma:Glc ne uzrokuje morfološke promjene na Caco-2 i HeLa staničnim linijama.
4. Terapeutsko eutektično otapalo limunska kiselina:glukoza:ciprofloksacin pokazuje citotoksično djelovanje na Caco-2 stanice u ispitivanim koncentracijama (200-2000 mg L⁻¹).

6 LITERATURA

Aroso I. M., Silva J. C., Mano F., Ferreira A. S. D., Dionísio M., Sá-Nogueira I., Barreiros S., Reis R. L., Paiva A., Duarte A. R. C. (2016) Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **98**: 57–66.

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

Carriazo D., Serrano M. C., Gutierrez M. C., Ferrer M. L., del Monte F. (2012) Deep-eutectic solvents playing multiple roles in the synthesis of polymers and related materials. *Chemical Society Reviews* **41**(14): 4996–5014

Chavda, H. V., Patel, C. N., Amand, I. S. (2009) Biopharmaceutic Classification System. *Sys Rev Pharm.* **1**, 62-69.

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

Duarte A. R. C., Ferreira A. S. D., Barreiros S., Cabrita E., Reis R. L., Paiva A. (2017) A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **114**: 296–304.

Hayyan, M., Hashim, M.A., Al-Saadi, M.A., Hayyan, A., Alnashef, I.M., Mirghani, M.E., (2013b) Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents, *Chemosphere* **93**, 455-459.

Hayyan, M., Hashim, M.A., Hayyan, A., Al-Saadi, M.A., Alnashef, I.M., Mirghani, M.E., Saheed, O.K. (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**, 2193- 2195.

Hayyan, M., Looi, C. Y., Hayyan, A., Wong, W. F., Ali Hashim, M. (2015) In Vitro and In Vivo Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. *PLoS One* **10**, e0117934.

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

Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis L. R., Duarte, A. R. C. (2014) Natural deep eutectic solvents-Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry Engineering* **2**(5): 1063-1071

Pedro S. N., Freire C. S. R., Freire M. G., Silvestre A. J. D. (2019) Deep eutectic solvents comprising active pharmaceutical ingredients in the development of drug delivery systems. *Journal Expert Opinion on Drug Delivery* **16**(5): 497-506

Press, B., di Grandi D. (2008) Permeability for intestinal absorption: Caco – 2 assay and related issues. *Curr Drug Metab.* **9**, 893-900.

Radošević K., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srček V., Grgas D., Landeka Dragičević T., Redovniković R. I. (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **112**: 46–53.

Radošević, K., Čanak, I., Panić, M., Markov, K., Cvjetko Bubalo, M., Frece, J., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ Sci Pollut Res.* **25**, 14188-14196.

Radović, M., Panić, M., Radošević, K., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I. (2021) Niskotemperaturna eutektička otapala – racionalnim dizajnom do zelenog otapala budućnosti. *Kemija u industriji* (rad prihvaćen za objavljivanje)

Rodrigues L.A., Cardeira M., Leonardo C.I., Gaspar B.F., Radojčić Redovniković I., Duarte A.R.C., Paiva A., Matias A.A. (2021) Deep eutectic systems from betaine and polyols – Physicochemical and toxicological properties **335**: 116201

Tuntarawongsa, S., Phaechamud, T. (2012) Menthol, borneol, camphor and WS-3 eutectic mixture. *Biomater Appl.* **506**, 355-358.

Wang, H., Gurau, G., Shamshina, J., Cojocar, O. A., Janilowski, J., MacFarlane, D. R., Davis, J.H., Rogers, R. D. (2014) Simultaneous membrane transport of two active pharmaceutical ingredients by charge assisted hydrogen bond complex formation. *Chem. Sci.* **5**, 3449 – 3459.

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

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

Izjava o izvornosti

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

Katarina Budarević

ime i prezime studenta

