

Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala za poboljšanje formulacije ciprofloksacina kao aktivnog farmaceutskog sastojka lijeka

Šintić, Anamaria

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:159:932227>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2021.

Anamaria Šintić

**PRIMJENA
NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA
POBOLJŠANJE FORMULACIJE
CIPROFLOKSACINA
KAO AKTIVNOG
FARMACEUTSKOG SASTOJKA
LIJEKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Kristine Radošević te uz pomoć dr.sc. Manuele Panić.

Diplomski rad izrađen je u sklopu projekta: „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova“ (HRZZ IP-2019-04-7712) pod voditeljstvom prof. dr.sc. Ivane Radojčić Redovniković.

Izvor financiranja: Hrvatska zaklada za znanost

Logo projekta:



Zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Kristini Radošević te dr.sc. Manueli Panić na trudu, uloženom vremenu te savjetima prilikom izrade i pisanja rada. Također, hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci.

Blaž, hvala ti za sve, za svaku riječ potpore i ohrabrenja, za svaki osmijeh i zagrljaj, za sve ove predivne godine. Ono najbolje nam tek dolazi! Do zz, Snoopy!

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

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

PRIMJENA NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA POBOLJŠANJE FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA KAO AKTIVNOG FARMACEUTSKOG SASTOJKA LIJEKA

Anamaria Šintić, univ. bacc. ing. biotechn.
0058209195

Sažetak: Interes znanstvenika za nove i ekološki prihvatljive pristupe u proizvodnji i formulaciji lijekova prvenstveno se odnosi na primjenu prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (NADES) kao medija za biotehnološku pripremu ili kao sredstva za formulaciju lijeka. Cilj ovog rada bio je odabir najpogodnijeg NADES-a za razvoj formulacije antibiotika ciprofloksacina poboljšane topljivosti i permeabilnosti. Pomoću računalnog modela COSMO-RS ispitana je topljivost ciprofloksacina u velikom broju NADES-a. Najbolja topljivost predviđena je u timol:oktanska kiselina, što je potvrđeno tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Praćena je stabilnost ciprofloksacina u referentnom otapalu i NADES-u Ty:C8 tijekom 35 dana pri različitim temperaturama. Nadalje, ispitana je *in vitro* biološka aktivnost formulacije ciprofloksacina i NADES-a na tumorskoj staničnoj liniji Caco-2. Također, provedeno je ispitivanje permeabilnosti formulacije pomoću PAMPA testa propusnosti kroz umjetnu membranu. Razvojem formulacije ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8 postignuto je poboljšanje topljivosti i permeabilnosti ciprofloksacina, uz očuvanje stabilnosti i antimikrobne aktivnosti djelatne tvari, što ukazuje na moguću farmaceutsku primjenu takve formulacije u većem mjerilu.

Ključne riječi: biološka aktivnost, ciprofloksacin, permeabilnost, prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo, topljivost

Rad sadrži: 62 stranice, 18 slika, 5 tablica, 85 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *dr.sc. Manuela Panić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 20. prosinca 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

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

Anamaria Šintić, univ. bacc. ing biotechn.
0058209195

Abstract: Scientific interest in a new and environmentally friendly approaches in development of drug formulations primarily refers to the use of natural deep eutectic solvents (NADES). The aim of this study has been the proper selection of NADES in order to develop formulation of antibiotic ciprofloxacin with improved solubility and permeability. Using a computer predictive model COSMO-RS, solubility of ciprofloxacin in a large number of NADES has been evaluated. The best solubility was achieved in thymol:octanoic acid, which is determined using high performance liquid chromatography. The stability of ciprofloxacin in NADES Ty:C8 has been monitored during 35 days at different temperatures, while *in vitro* biological activity of the formulation was examined using cell line Caco-2. Furthermore, permeability of the formulation has been tested using PAMPA test. Synthesis of ciprofloxacin formulation in Ty:C8 improved solubility and permeability of ciprofloxacin, without affecting its stability and maintaining antimicrobial activity. Therefore, pharmaceutical application of this formulation on a large scale is possible.

Keywords: biological activity, ciprofloxacin, deep eutectic solvents, permeability, solubility

Thesis contains: 62 pages, 18 figures, 5 tables, 85 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Kristina Radošević, Associate professor

Technical support and assistance: PhD. Manuela Panić

Reviewers:

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

Thesis defended: December 20th, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. ZELENA KEMIJA I IMPLEMENTACIJA ZELENIH OTAPALA U INDUSTRIJI	3
2.1.1. Niskotemperaturna eutektička otapala	5
2.1.1.1. <i>Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala</i>	<i>5</i>
2.1.1.2. <i>In vitro biološka aktivnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala</i>	<i>8</i>
2.1.1.3. <i>Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u farmaceutskoj i kemijskoj industriji</i>	<i>10</i>
2.2. PRIMJENA EUTEKTIČKIH OTAPALA U RAZVOJU TERAPEUTSKIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA.....	11
2.3. RAZVOJ TERAPEUTSKIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA POBOLJŠANJE FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA	14
2.3.1. Kemijska struktura i mehanizam djelovanja ciprofloksacina	14
2.3.2. Primjena ciprofloksacina u kliničkom liječenju	17
2.3.3. Razvoj strategije za poboljšanje topljivosti, permeabilnosti i biodostupnosti ciprofloksacina	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. MATERIJALI.....	20
3.1.1. Aktivna farmaceutska tvar ciprofloksacin	20
3.1.2. Kemikalije.....	20
3.1.3. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala	21
3.1.4. Stanična linija Caco-2	21
3.1.5. Uređaji i oprema	21
3.1.6. Softverski programi za obradu podataka	22
3.2. METODE RADA	22
3.2.1. Primjena programa COSMO ^{therm} za procjenu topljivosti antibiotika ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima	22
3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala	24
3.2.3. Eksperimentalno određivanje topljivosti ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.....	25
3.2.3.1. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti</i>	<i>25</i>
3.2.4. Određivanje stabilnosti formulacije ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima.....	27
3.2.5. <i>In vitro</i> biološka aktivnost formulacije ciprofloksacina u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Ty:C8 na Caco-2 staničnoj liniji	27

3.2.5.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	28
3.2.5.2. Ispitivanje biološke aktivnosti primjenom Caco-2 stanične linije pomoću MTS metode	28
3.2.6. Određivanje permeabilnosti lijekova primjenom umjetnih membrana (PAMPA test)	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. PROCJENA TOPLJIVOSTI CIPROFLOKSACINA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA PRIMJENOM PROGRAMA COSMO^{therm}	34
4.2 EKSPERIMENTALNA TOPLJIVOST CIPROFLOKSACINA U ODABRANIM PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	37
4.3. STABILNOST FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA U PRIRODNOM NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU Ty:C8.....	41
4.4. IN VITRO BIOLOŠKA AKTIVNOST FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA U NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU Ty:C8.....	43
4.5. PERMEABILNOST FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA U NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU Ty:C8 KROZ UMJETNU MEMBRANU	46
5. ZAKLJUČCI	51
6. LITERATURA	53

1. UVOD

Farmaceutska industrija jedna je od najbrže rastućih grana industrije proteklih nekoliko desetljeća. Razvitkom znanosti i tehnologije, olakšan je dizajn, karakterizacija i proizvodnja novih lijekova, cjepiva i drugih medicinskih pripravaka. Potreba za proizvodima kemijske i farmaceutske industrije raste svakog dana te su takvi proizvodi postali dio naše svakodnevice. Unatoč prednostima u pogledu poboljšanja zdravlja i kvalitete života, razvoj takvih industrija ima negativan utjecaj na klimu i okoliš. Jedan od glavnih uzroka negativnog učinka je korištenje organskih otapala u brojnim procesima proizvodnje kemikalija i farmaceutika. Otapala imaju važnu ulogu u otapanju krutih komponenti, prijenosu mase i topline te izdvajanju i pročišćavanju produkta. Većina konvencionalnih organskih otapala su hlapljiva, toksična, korozivna te zapaljiva, a neka otapala su klasificirana u skupinu kancerogenih tvari. Njihovo recikliranje te ponovna upotreba vremenski su dugotrajni, energetski zahtjevni te ekonomski neodrživi. Navedeni razlozi glavni su poticaj razvoja zelenih i održivih tehnologija te njihove primjene u različitim granama industrije, s naglaskom na kemijsku i farmaceutsku industriju. Kao ekološki prihvatljiva i prilagodljiva otapala, posljednjih godina intenzivno se istražuju ionske kapljevine, superkritični fluidi te niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents, DES*). Upravo su DES-ovi i niskotemperaturna eutektička otapala sintetizirana iz prirodnih izvora (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*) pronašla svoju primjenu u razvoju farmaceutika, bilo kao sredstva za olakšan transport lijekova do mjesta djelovanja, kao medij za enzimске reakcije ili kao otapalo za razvoj terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents, THEDES*), u cilju poboljšavanja fizikalno-kemijskih svojstava aktivne farmaceutske tvari lijeka (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient, API*).

Unatoč ubrzanom razvoju novih lijekova, farmaceutska industrija susreće se s izazovima smanjene, odnosno ograničene topljivosti i permeabilnosti djelatne farmaceutske tvari u vodenom mediju, što posljedično dovodi do smanjene biodostupnosti, a time i smanjenog terapijskog učinka lijeka. Upravo su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala u središtu istraživanja posljednjih godina jer mogu povoljno djelovati na povećanje topljivosti, poboljšanje permeabilnosti kroz membranske sustave te omogućiti povećanu biodostupnost lijeka na ciljnom mjestu djelovanja.

Ciprofloksacin je lijek koji pripada drugoj generaciji fluorokinolonskih antibiotika, a učinkovit je u liječenju različitih bakterijskih infekcija, posebice onih uzrokovanih Gram-negativnim bakterijama. Patentiran je 1983. od strane farmaceutske kompanije Bayer, a u

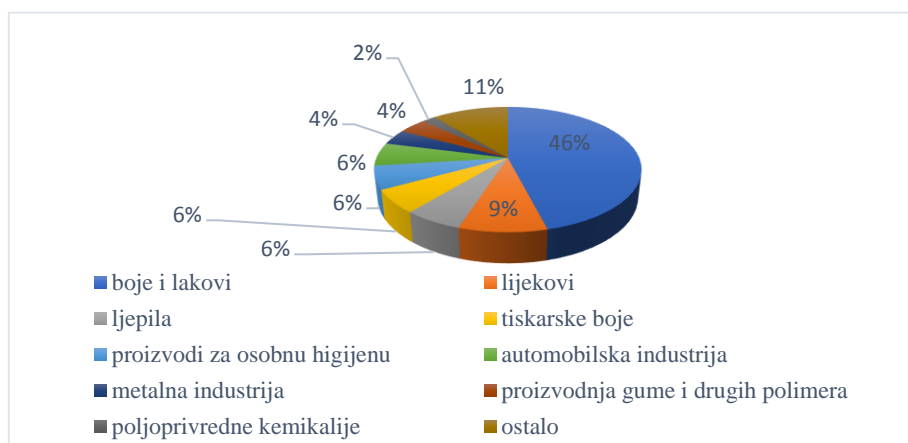
međuvremenu je postao jedan od najčešće korištenih antibiotika u liječenju respiratornih i urinarnih infekcija. Najčešće se primjenjuje *per os*, iako postoje farmaceutski oblici za dermalnu i intravenoznu primjenu. Problem velikog broja lijekova, pa tako i ciprofloksacina, je niska topljivost u vodi, što uzrokuje suboptimalnu isporuku lijeka na ciljno mjesto djelovanja. Prethodno provedena istraživanja pokazala su kako NADES-i mogu utjecati na poboljšanje topljivosti i permeabilnosti različitih API-ja poput nesteroidnih protuupalnih lijekova, antipiretika, ali i nekih nutraceutika. S obzirom na važnost ciprofloksacina u terapiji bakterijskih infekcija, pronalazak odgovarajućeg NADES-a, u kojem bi topljivost i permeabilnost bila veća nego u vodi, vjerojatno bi značajno poboljšalo učinkovitost ovog lijeka.

Cilj ovog diplomskog rada bio je razvoj formulacije ciprofloksacina u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu u cilju poboljšanja topljivosti, permeabilnosti te biodostupnosti formulacije ciprofloksacina, uz istovremeno ispunjavanje sigurnosnih kriterija za ljudsku upotrebu. Kako bismo suzili izbor NADES-a, korišten je softverski program za predviđanje topljivosti COSMO $_{therm}$, a zatim je topljivost ciprofloksacina u odabranom NADES-u provjerena eksperimentalno, primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Osim topljivosti, vrlo važan parametar je stabilnost aktivne farmaceutske tvari lijeka. Iz literaturnih podataka poznato je kako je ciprofloksacin kao API relativno stabilan, stoga je jedan od ključnih uvjeta bio ne narušiti stabilnosti API-ja formiranjem API-DES sustava jer bi degradacijom aktivne tvari došlo do gubitka antimikrobne aktivnosti, odnosno terapijskog djelovanja lijeka. Bilo je nužno provjeriti kako formiranje API-DES sustava utječe na stabilnost ciprofloksacina, u različitim temperaturnim uvjetima, kroz dulji vremenski period. Nadalje, bilo je potrebno ispitati *in vitro* biološku aktivnost NADES-a i API-DES sustava na staničnoj liniji karcinoma debelog crijeva Caco-2 kako bi se istražilo djeluje li odabrani API-DES sustav citotoksično, odnosno inhibicijski na rast tumorskih stanica. Svojstvo zadovoljavajuće permeabilnosti je također bitno za postizanje visoke razine biodostupnosti lijeka na mjestu djelovanja. Stoga je ispitana permeabilnost API-DES formulacije i čistog NADES-a korištenjem standardiziranog PAMPA testa, kako bi se ispitalo u kojoj mjeri prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo, odnosno formulacija API-DES sustava doprinosi poboljšanju permeabilnosti ciprofloksacina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ZELENA KEMIJA I IMPLEMENTACIJA ZELENIH OTAPALA U INDUSTRIJI

Napretkom znanosti i tehnologije te ubrzanim razvojem industrije tijekom posljednjeg stoljeća, čovjeku je omogućeno da živi duže i kvalitetnije. No, ubrzan razvoj industrije ostavlja posljedice na ljudsko zdravlje i okoliš. Emisija štetnih plinova, oštećenje ozona, globalno zatopljenje, posljedice su koje bi trebale potaknuti čovječanstvo na racionalniji odnos prema korištenju neobnovljivih izvora energije te okretanje alternativnim izvorima energije koji bi omogućili održivost industrijskih procesa. Zbog negativnog utjecaja industrije na zdravlje ljudi i okoliš, početkom 90-tih godina 20. stoljeća na inicijativu američke Agencije za zaštitu okoliša (engl. *Environmental Protection Agency*, EPA) razvijen je koncept „zelene kemije“ koji se temelji na dvanaest načela kojima bi trebao težiti svaki proizvodni proces. Načela nalažu primjenu obnovljivih sirovina kad god je to prihvatljivo s ekonomske i tehničke strane, dizajniranje i upotrebu sigurnijih kemikalija i otapala, ekonomičnost tehnoloških procesa, racionalno korištenje energije te upotrebu sirovina koje se nakon završetka procesa mogu biorazgraditi ili pretvoriti u proizvode koji nisu štetni za okoliš. Usvajanjem navedenih načela prilikom razvoja industrijskog procesa moguće je pozitivno utjecati na smanjenje klimatskih promjena. Implementacija načela zelene kemije ponajviše se očituje u farmaceutskoj i kemijskoj industriji (Clark, 2016). Te dvije industrijske grane su veliki generatori opasnog otpada nastalog tijekom proizvodnje kemikalija i farmaceutika. Proteklih godina znanstvenici pridaju najveći interes istraživanju otapala koja će svojim svojstvima zadovoljiti načela zelene kemije, a pritom biti učinkovita zamjena korištenju klasičnih organskih otapala u proizvodnim procesima. Na slici 1 prikazani su udjeli zastupljenosti organskih otapala u različitim proizvodnim procesima.



Slika 1. Upotreba organskih otapala u industrijskim procesima (prema Cseri i sur., 2018)

Proizvodnja farmaceutika i finih kemikalija odvija se u više reakcijskih postupaka i koraka pročišćavanja. Korištenje organskih otapala nužno je u različitim fazama procesa, od sinteze i pročišćavanja do analitičkih metoda detekcije i kvantifikacije spojeva. Osim u navedenim postupcima, organska otapala koriste se i za čišćenje proizvodne opreme i uređaja. Prisutnost organskih otapala omogućuje odvijanje reakcije jer olakšava međusobni kontakt reaktanata, a utječe i na kemo-, regio- i stereospecifičnost reakcije. Velik dio konvencionalnih organskih otapala je hlapljiv, toksičan, i zapaljiv, stoga korištenje takvih otapala ostavlja posljedice na zdravlje i okoliš. Kao posljedica hlapljivosti, otapalo iz tekućeg prelazi u plinovito stanje te se širi zrakom, a dugotrajnim izlaganjem parama otapala može doći do oštećenja unutarnjih organa. S obzirom da su organska otapala većinom lipofilna, olakšan im je prolaz kroz staničnu membranu i barijeru krv-mozak. Staničnim metabolizmom mogu nastati još toksičniji spojevi koji mogu izazvati akutna ili kronična oštećenja na razini DNA molekule (Joshi i Adhikari, 2019).

Voda kao otapalo zadovoljava kriterije netoksičnosti i nezapaljivosti, no slaba topljivost mnogih organskih i organometalnih spojeva u vodi, visoka molarna entalpija isparavanja te visoki energetske zahtjevi potrebni za uklanjanje vode iz procesa, ograničavajući su čimbenici korištenja vode kao otapala u kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Osim toga, lijekovi koji su po kemijskoj strukturi esteri, poput aspirina, nisu stabilni u vodenim otopinama te dolazi do njihove hidrolize (Blessy i sur., 2014). Stoga se u posljednje vrijeme provode intenzivna istraživanja novih, ekološki prihvatljivih pristupa u proizvodnji i formulaciji lijekova. Naglasak je na upotrebi prirodnih eutektičkih otapala kao medija za biotehnošku pripremu lijeka ili kao pomoćnog sredstva za isporuku lijeka kroz pripremu terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala. Prethodnici eutektičkih otapala, ionske kapljevine i superkritični fluidi, također su se istraživali u svrhu poboljšanja fizikalno-kemijskih svojstava API-ja te kao transportni sustavi za teško topljive lijekove. Međutim, takva otapala posjeduju nedostatke poput loše biorazgradivosti, nedostatne biokompatibilnosti te upotrebe obnovljivih izvora u procesu njihove pripreme, stoga je njihova primjena u farmaceutske svrhe ograničena.

Zbog navedenih nedostataka, kao otapala s najvećim potencijalom primjene u farmaceutskoj industriji ističu se niskotemperaturna eutektička otapala sintetizirana iz prirodnih ili obnovljivih izvora. To potvrđuje i činjenica da je u razdoblju od 2005. do 2020. godine objavljeno preko 4500 znanstvenih radova na temu prednosti primjene niskotemperaturnih eutektičkih otapala u različitim područjima kemijske sinteze i formulacije lijekova, biokatalize, biomedicine te izrade nanomaterijala (Radović i sur., 2021).

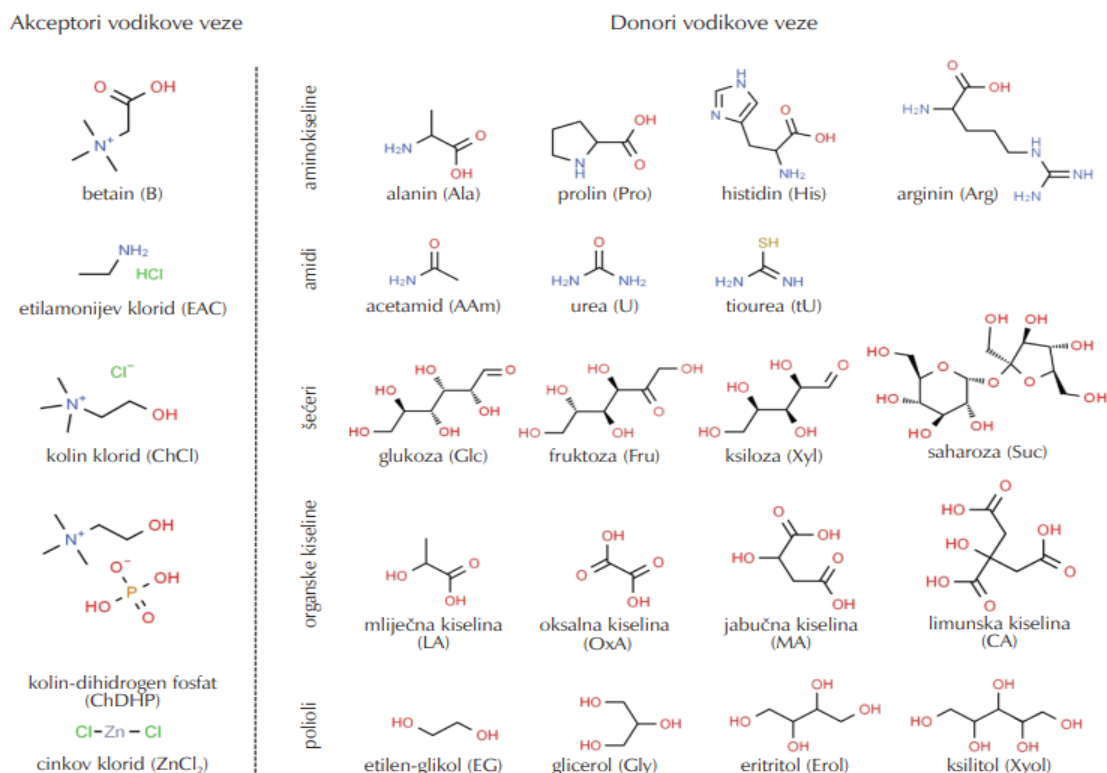
2.1.1. Niskotemperaturna eutektička otapala

2.1.1.1. Fizikalno-kemijska karakterizacija niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Prema smjernicama „zelene kemije“ idealno otapalo definirano je kao kemijski i fizički stabilno, niske hlapljivosti, jednostavno za upotrebu, netoksično, uz mogućnost recikliranja i ponovnog korištenja. Niskotemperaturna eutektička otapala predstavljaju četvrtu generaciju ionskih kapljevine (engl. *Ionic Liquids*, ILs), koja imaju povoljna fizikalno-kemijska i biološka svojstva te jednostavnu i ekonomičnu pripravu. Eutektička otapala prvi put se spominju 2001. godine u radu koji su objavili Abbott i suradnici, a nekoliko godina kasnije, ista grupa znanstvenika objavila je rad u kojem navode koje su prednosti niskotemperaturnih eutektičkih otapala u usporedbi s ionskim tekućinama i konvencionalnim organskim otapalima (Abbott i sur., 2003).

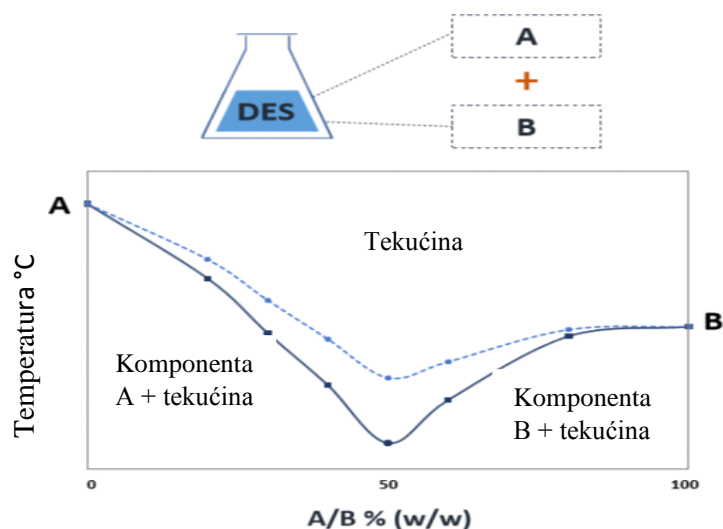
Niskotemperaturnim eutektičkim otapalom smatramo smjesu dviju ili više komponenata u krutom ili tekućem stanju, u određenom molarnom omjeru, koja ima niže talište nego pojedine komponente smjese. Niskotemperaturna eutektička otapala imaju slična fizikalna svojstva kao i ionske kapljevine: niski tlak pare, u tekućem su stanju kroz širok temperaturni raspon, nezapaljiva su, vrlo jednostavna za pripremu te nisu potrebni koraci pročišćavanja nakon sinteze (Lin i Vasam, 2005). Ako eutektičko otapalo izgrađuju široko dostupne prirodne komponente, poput aminokiselina, organskih kiselina, ugljikohidrata ili alkohola, tada se takva otapala nazivaju prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima (engl. *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) (Paiva i sur., 2014). Upravo prirodno porijeklo komponenti omogućuje metaboličku razgradnju u organizmu, stoga su takva otapala visoko kompatibilna.

Niskotemperaturno eutektičko otapalo je smjesa nabijenog akceptora vodika (npr. amonijeve soli) i nenabijenog donora vodika poput šećera, alkohola, amida, vitamina i amina, pri čemu su komponente povezane jakim vodikovim vezama (Gorke i sur., 2010), a neki od primjera često korištenih spojeva za pripremu DES-ova prikazani su na slici 2. S obzirom na brojnost i raznolikost komponenti koje mogu činiti DES, u teoriji je moguće pripremiti više od 10^8 varijacija ovakvih otapala (Radović i sur., 2021).



Slika 2. Primjeri često korištenih akceptora i donora vodikove veze za pripravu niskotemperaturnih eutektičkih otapala (Radović i sur., 2021)

Sniženje tališta smjese u odnosu na talište pojedine komponente posljedica je delokalizacije naboja, uzrokovane intermolekulskim interakcijama (vodikove i ionske veze te van der Waalsove sile). Depresija točke tališta odgovara eutektičkoj točki, a fazni dijagram dvokomponentnog eutektičkog sustava prikazan je na slici 3. Snižavanje temperature tališta ovisi o simetriji prisutnog kationa te o kemijskoj prirodi funkcionalnog bočnog lanca (Abbott i sur., 2004). Prema definiciji, eutektička otapala imaju talište niže od 150 °C, a niskotemperaturna eutektička otapala koja imaju najširu primjenu, imaju temperaturu tališta nižu od 50 °C te su pogodna za korištenje na sobnoj temperaturi. pH vrijednost DES-a ovisi o prirodi komponenti koje ga formiraju, pa su tako otapala s organskom kiselinom kao donorom vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) kisela (pH < 3), dok su otapala koja sadrže amid kao HBD bazična (pH > 8). Niskotemperaturno eutektično otapalo mora biti stabilno, odnosno mora ostati u tekućoj fazi dulje vrijeme, bez formiranja kristalnog taloga. Na stabilnost izrazito utječe kemijska struktura donora i akceptora vodikove veze, odnosno što je veća prisutnost dodatnih hidroksilnih i karboksilnih skupina, to je otapalo stabilnije. Osim toga, na stabilnost utječe molarni omjer komponenata te prostorni raspored skupina unutar molekule (Dai i sur., 2013a).



Slika 3. Prikaz hipotetskog dvokomponentnog (A i B) faznog dijagrama (prema Pedro i sur., 2021)

Većina niskotemperaturnih eutektičkih otapala ima veću gustoću od vode i tradicionalnih organskih otapala, u rasponu $1,1 \text{ g cm}^{-3}$ - $1,4 \text{ g cm}^{-3}$. Viskoznost otapala uvelike ovisi o karakteristikama sirovina iz kojih se otapalo priprema. Primjerice, otapala koja kao donor vodikove veze sadrže šećer imaju najveću viskoznost, dok ona koja sadrže poliole imaju značajno manju viskoznost. Visoka viskoznost posljedica je jakih vodikovih veza te elektrostatskih interakcija između komponenta DES-a, a razina viskoznosti otapala također ovisi o temperaturi te udjelu vode. Često je zbog velike gustoće i viskoznosti, nužna prisutnost određene količine vode u eutektičkom otapalu kako bi ono bilo primjenjivo jer je zbog velike viskoznosti otežan prijenos mase i topline (Pena-Pereira i la Calle, 2019). Upravo su velika viskoznost te nizak tlak para jedni od glavnih nedostataka korištenju ovakvih otapala. Najveći dio do sada okarakteriziranih DES-ova su polarnog karaktera, pri čemu su DES-ovi koji sadrže organsku kiselinu najpolarniji, a posljednjih godina sve veći interes u istraživanjima zauzimaju hidrofobni DES-ovi poput kombinacija mentol:oktanska kiselina ili timol:kumarin (Panić i sur., 2019). Prisutnost vode kao komponente eutektičkog otapala utječe na polarnost DES-a, a ako je volumni udio vode u DES-u veći od 50 % dolazi do narušavanja veza između komponenti DES-a te značajnog utjecaja na njegova fizikalno-kemijska svojstva.

Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala može se provesti na nekoliko načina. Najčešći je miješanjem komponenata donora i akceptora vodikove veze, u određenom molarnom omjeru, pri povišenoj temperaturi, uz kontinuirano miješanje na elektromagnetskoj miješalici do formiranja kapljevine. Ukoliko je zbog velike gustoće i viskoznosti potreban dodatak vode, ona se može dodati tijekom ili nakon pripreme (Aroso i sur., 2015). Ostali načini

imaju isti početni korak miješanja donora i akceptora vodikove veze, ali se razlikuju u narednim koracima pripreme. Tako je moguće primijeniti metodu usitnjavanja komponenata u tarioniku uz miješanje do stvaranja eutektičke smjese. Nadalje, jedna od metoda je priprema vodene otopine komponenata, nakon čega se voda uklanja uparavanjem ili liofilizacijom. Također, moguće je pripremiti niskotemperaturno eutektičko otapalo uz pomoć alternativnih izvora energije, poput ultrazvuka i mikrovalnog zračenja (Florindo i sur., 2014). DES ne nastaje kemijskom reakcijom već formiranjem vodikovih veza između komponenata, pri čemu se postiže 100 %-tna atomska učinkovitost jer se svi atomi supstrata ugrađuju u produkt. Na taj način ne dolazi do stvaranja otpada što proces pripreme niskotemperaturnih eutektičkih otapala čini ekonomičnim te ekološki prihvatljivim (Paiva i sur., 2014). DES-ove zovemo „dizajniranim otapalima“ jer se pravilnim odabirom ishodnih komponenti i molarnih omjera za njihovu pripremu može utjecati na njihova fizikalno-kemijska svojstva te samim time utjecati na uspješnost njihove primjene. S obzirom na ishodne tvari koje se koriste prilikom pripreme niskotemperaturnih eutektičkih otapala, razlikujemo četiri kategorije DES-ova, što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Vrste eutektičkih otapala (prema Sheldon, 2017)

Vrsta	Opis
Tip I	kvaterna sol $Cat+X-$ i halogenid metala poput Zn, Sn, Fe
Tip II	kvaterna sol $Cat+X-$ i halogenid metala poput Cr, Co
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)

2.1.1.2. *In vitro* biološka aktivnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Primjeni nekog novog spoja ili potencijalnog lijeka u terapijske svrhe prethodi provjera biološke aktivnosti *in vitro* na staničnim linijama te na bakterijskim kulturama ako se radi o komponenti koja ima potencijalno antimikrobno djelovanje. NADES-i se po svojoj definiciji sastoje od prirodnih komponenti te se kao takvi smatraju netoksičnima. Međutim, prije bilo kakve industrijske ili kliničke primjene potrebno je ispitati njihov ekotoksikološki

profil, odnosno ispitati postoji li citotoksičan ili genotoksičan učinak na stanice. Tijekom proteklih godina provedeno je niz ispitivanja biološkog učinka eutektskih otapala na različitim mikrobnim kulturama te životinjskim i humanim staničnim linijama. Hayyan i sur. (2013a; 2013b) objavili su rad u kojem navode kako je citotoksičnost DES-ova na staničnoj kulturi larve račića bila veća od citotoksičnosti pojedinih komponenti eutektskog otapala. Kao objašnjenje navodi se mogući sinergistički učinak tvari u DES-u, što je posljedica interakcije između donora i akceptora vodikove veze, a citotoksičnost bi mogla biti i posljedica lošeg prijenosa kisika u hranjivoj podlozi zbog povećane viskoznosti niskotemperaturnog eutektskog otapala. Nadalje, u ispitivanju citotoksičnosti NADES-a koje su proveli Paiva i sur. (2014), pokazano je kako neke organske kiseline imaju negativan utjecaj na vijabilnost stanica, dok su Zhao i sur. (2015) dokazali kako određeni NADES-i koji u svom sastavu sadrže organske kiseline, imaju antibakterijsko djelovanje na različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterijske kulture. Radošević i sur. (2018) proučavali su antimikrobni učinak različitih NADES-a na bakterijama (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*), kvascu (*Candida albicans*) te citotoksični učinak na humanim staničnim linijama (HEK293T, HeLa i MCF-7). Zaključak je da šećeri, šećerni alkoholi, kolin te betain kao komponente NADES-a, nemaju utjecaj na antimikrobnu aktivnost otapala, dok NADES-i koji sadrže organsku kiselinu, posebice limunsku kiselinu, djeluju inhibitorno na rast mikroorganizama. Kao jedno od objašnjenja navodi se kako nizak pH eutektskog otapala uzrokuje oštećenje stanične membrane i membranskih proteina što posljedično dovodi do toksičnog djelovanja.

„*Sola dosis facit venenum*“ izjava je alkemičara i liječnika Paracelsusa, koji je postavio temelje moderne toksikologije i farmacije. On je smatrao kako svaka tvar može biti otrov, a primijenjena doza određuje granicu između ljekovitosti i otrovnosti neke tvari. Iako je tvrdnja iz 16. st. mnogi rezultati ispitivanja toksičnosti prirodnih ili sintetiziranih komponenata potvrđuju ovu tezu jer vrlo često toksičnost spoja ovisi o primijenjenoj koncentraciji, odnosno volumnom udjelu ispitivanog spoja. Iako je bilo očekivano kako će NADES-i biti netoksični, s obzirom da se sastoje od prirodnih komponenti, do sada provedena istraživanja pokazala su kako je ta tvrdnja djelomično točna. U nekim radovima zabilježena je toksičnost NADES-a koja ovisi o vrsti i molarnim omjerima komponenata od kojih se otapalo sastoji, o pH vrijednosti otapala te o volumnom udjelu NADES-a kojim su stanice tretirane. Stoga su *in vitro* testovi citotoksičnosti i određivanje toksikološkog profila nezaobilazni korak u istraživanju i primjeni nekog spoja, bilo da je izoliran iz prirodnih izvora, dobiven kemijskom sintezom ili biotehnološkim postupkom.

2.1.1.3. Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u farmaceutskoj i kemijskoj industriji

Napretkom ljudskog razvoja, porasla je svjesnost o brizi za okoliš i racionalnom raspolaganju prirodnim resursima, posebice neobnovljivim izvorima energije. Razvojem zelene kemije, sve su intenzivnija istraživanja u području prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala koja su se počela primjenjivati u širokom rasponu industrija, od kemijske i farmaceutske do biomedicine. U početku, niskotemperaturna eutektička otapala koristila su se prilikom depoliranja, odnosno površinske obrade i zaštite metala. Danas su DES-ovi postali učinkovita zamjena klasičnim otapalima u organskoj sintezi spojeva i biokatalizi, koriste se u elektrokemiji, proizvodnji biopolimera, nanomaterijala, a vrlo su primjenjivana za ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz biljnih materijala (Paiva i sur., 2014).

Kako bi se smanjila upotreba organskih otapala u procesu ekstrakcije aktivnih komponenata od ostalih tvari, velika je važnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala koja su se pokazala kao vrlo učinkovita, s posebnim naglaskom na ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnih izvora. Efikasnost ekstrakcije ovisi o karakteristikama otapala. Razlog vrlo efikasnoj ekstrakciji fenola pomoću niskotemperaturnih eutektičkih otapala ima kemijsku osnovu, odnosno eutektička otapala mogu biti donor i akceptor elektrona te formirati čvrste i stabilne vodikove i π - π veze između fenolnih spojeva i komponenata otapala (Dai i sur., 2013a). Provedena istraživanja pokazuju kako je efikasnost ekstrakcije fenolnih spojeva znatno veća korištenjem NADES-a u usporedbi s klasičnim otapalima poput vode, etanola ili heksana (Paiva i sur., 2014). Također, ekstrahirani spojevi su vrlo stabilni u DES-ovima što je vrlo važna karakteristika. Osim navedenih svojstava, na učinkovitost ekstrakcije utječe i udio vode u DES-u. Voda je potrebna kako bi se smanjila viskoznost otapala i omogućio bolji prijenos mase između otapala i biljnog izvora.

Niskotemperaturna eutektička otapala imaju svoju primjenu i u biokatalizi. Provedena istraživanja pokazuju kako korištenje DES-ova u biokatalitičkim reakcijama pridonosi stabilnosti reaktanata i produkata, a istovremeno povećava topljivost enzima (Štěpánková i sur., 2014; Juneidi i sur., 2017). Također, upotrebom DES-ova u biokatalitičkim reakcijama dolazi do povećanja enantio- i regioselektivnosti enzima, pri čemu DES djeluje kemijski inertno. Obzirom da prirodna niskotemperaturna eutektička otapala zadovoljavaju načela zelene kemije u pogledu netoksičnosti, biorazgradivosti te biokompatibilnosti, sve je veći interes farmaceutске industrije i biomedicine za implementaciju takvih otapala u formulacije postojećih i novih farmaceutika.

2.2. PRIMJENA EUTEKTIČKIH OTAPALA U RAZVOJU TERAPEUTSKIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Napretkom znanosti i tehnologije omogućen je razvoj velikog broja novih lijekova i drugih medicinskih pripravaka. Međutim, najveći problemi velikog broja lijekova su slaba topljivost u vodi te neučinkovita doprema do ciljnog mjesta djelovanja. Kao prilog tome govore podaci kako je gotovo 40 % lijekova koji su prošli sve faze kliničkog ispitivanja i odobreni su za tržište te 90 % molekula u razvoju, slabo ili potpuno netopljivo u vodi (Kalepu i Nekkanti, 2015). Svaki lijek ima djelatnu farmaceutsku tvar (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API), odnosno biološki aktivnu komponentu koja je odgovorna za postizanje terapijskog učinka. Loša topljivost lijeka posljedično utječe na biodostupnost, odnosno dopremanje aktivne djelatne tvari do mjesta djelovanja. Osim topljivosti, nezanemariv problem novih lijekova često je mala permeabilnost te stabilnost API-ja. Kako bi se prevladali navedeni problemi, vrlo često se koriste velike doze. Kao posljedica takvog pristupa moguć je razvoj sistemske toksičnosti te pojave težih nuspojava. Navedeni razlozi potaknuli su farmaceutsku industriju na traženje inovativnih rješenja kojim bi se unaprijedili nedostaci slabe topljivosti, niske permeabilnosti i biodostupnosti te vrlo često kratkotrajne stabilnosti aktivne tvari. U tome im uvelike pomaže primjena računalnih programa pomoću kojih mogu *in silico* dizajnirati molekulu željenih karakteristika te predvidjeti topljivost takvih molekula u otapalima na temelju kvantne kemije. Posljednjih godina intenzivno se istražuju NADES-i kao potencijalna otapala za otapanje API-ja koji su teško topljivi u vodi. Znanstveni radovi objavljeni na tu tematiku pokazuju kako bi prirodna niskotemperaturna eutektička otapala mogla biti vrlo učinkovita zamjena konvencionalnim otapalima jer su sigurna za okoliš i ljude, a moguće je i prilagoditi njihova fizikalno-kemijska svojstva (Morrison i sur., 2009).

Farmaceutska industrija razvila je strategiju poboljšanja topljivosti aktivne komponente lijeka tvorbom THEDES-a, odnosno prevođenjem krute komponente lijeka u tekuću formulaciju koju čini niskotemperaturno eutektičko otapalo i API. Na taj način snižava se temperatura tališta, što omogućava procesiranje bez degradacije aktivne komponente, a istovremeno tekućim oblikom formulacije spriječen je nastanak kristalnih oblika API-ja, a primijećeno je kako tvorbom takvih sustava često dolazi do povećanja topljivosti i permeabilnosti aktivne tvari. Velika prednost THEDES-a je što nema gubitaka tijekom pripreme, a samim time nema ni potrebe za izdvajanjem i pročišćavanjem jer nastaje produkt 100%-tne čistoće (Paiva i sur., 2014; Duarte i sur., 2017). Nadalje, korištenjem ovakvog procesa olakšan je prijenos u veće mjerilo, što omogućava lakšu implementaciju u industrijski

pogon te smanjuje troškove. Pojam THEDES definiran je još 1998. godine kada su Stott i suradnici razvili terapijski sustav koji se sastojao od ibuprofena i mentola, a cilj je bio poboljšati permeabilnost API-ja. U godinama koje su slijedile THEDES-i su postali jedna od glavnih tema istraživanja.

Jedan od pozitivnih primjera korištenja niskotemperaturnih eutektičkih otapala za otapanje u vodi teško topljivih API-ja prikazan je u radu koji su objavili Morrison i suradnici (2009). U radu je provedeno opsežno ispitivanje topljivosti različitih lijekova poput danazola, koji se koristi u liječenju endometrioze te griseofulvina i itrakonazola koji se koriste za liječenje gljivičnih infekcija, u eutektičkim sustavima urea:kolin-klorid te jabučna kiselina:kolin-klorid. Osim ispitivanja topljivosti u čistom DES-u, topljivost je ispitana u sustavu DES-a i vode, vodenoj otopini pojedinih komponenata DES-a te u vodi kao kontroli. Rezultati pokazuju kako je topljivost API-ja u navedenim DES-ovima povećana za 5 do čak 22000 puta u odnosu na topljivost istih u vodi. Također, pokazano je kako je topljivost API-ja u vodenim otopinama komponenti DES-a te u sustavu DES-a i vode, puno manja u odnosu na topljivost u čistom DES-u, što dovodi do zaključka kako je poboljšanje topljivosti posljedica sinergističkog djelovanja komponenti niskotemperaturnog eutektičkog otapala dok prisutnost vode ima negativni efekt na povećanje topljivosti.

Nadalje, Lu i suradnici (2013) objavili su rad u kojem su ispitivali topljivost nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) u eutektičkim otapalima baziranim na kolin-kloridu kao akceptoru vodikove veze. Lijekovi poput aspirina, ibuprofena, ketoprofena, naproksena i acetaminofena pripadaju u skupinu NSAID-a, a odlikuju se protuupalnim, analgetičkim i antipiretičkim svojstvima. Često se koriste za snižavanje temperature, glavobolje, kod reumatizma i kardiovaskularnih bolesti. Međutim, ovakvi lijekovi su vrlo teško ili gotovo netopljivi u vodi. Primjerice, topljivost aspirina u vodi iznosi 7 mg mL^{-1} , dok je topljivost ibuprofena gotovo 100 puta niža ($0,07 \text{ mg mL}^{-1}$). Analizom rezultata vidljivo je kako je topljivost navedenih API-ja u niskotemperaturnim eutektičkim otapalima veća 17 do 5477 puta od topljivosti u vodi kao referentnom otapalu. Također, vidljivo je kako je topljivost najveća u DES-ovima koji ne sadrže vodu, dok je razina topljivosti u eutektičkim sustavima koji sadrže vodu obrnuto proporcionalno udjelu vode u otapalu. Razlog tome je što dodatkom vode dolazi do povećanja polarnosti eutektičkog otapala te posljedičnog smanjenja topljivosti hidrofobnih lijekova. Unatoč smanjenju razine topljivosti API-ja u DES-ovima koji sadrže vodu, topljivost je i dalje veća u odnosu na topljivost API-ja u vodi. Stoga bi niskotemperaturna eutektička otapala mogla imati ulogu u razvoju tekućih formulacija lijekova, kao svojevrsno kootapalo zajedno s vodom (Lu i sur., 2013).

Još jedan primjer poboljšanja topljivosti API-ja objavili su Cysewski i suradnici (2021). U njihovom radu ispitana je topljivost API-ja teofilina u NADES-ima na bazi kolin-klorida i šećernih alkohola. Teofilin je lijek koji djeluje protuupalno i spazmolitički, a koristi se u liječenju astme, kronične opstruktivne bolesti pluća, plućnog emfizema i sličnih bolesti povezanih s respiratornim sustavom. Iz rezultata je vidljivo kako je topljivost navedenog lijeka višestruko bolja u NADES-u kolin-klorid:glicerol nego u vodi, a zanimljiva je činjenica da ne dolazi do smanjenja topljivosti čak i uz prisustvo vode u NADES-u. Phaechemud i sur. (2012) razvili su formulaciju koju čini niskotemperaturno eutektičko otapalo mentol:kamfor i ibuprofen, pri čemu je topljivost ibuprofena u NADES-u bila oko 30 puta veća od topljivosti čistog ibuprofena u vodi. Druga skupina znanstvenika razvila je formulaciju eutektičkog otapala kolin klorid:askorbinska kiselina i deksametazona. API deksametazon je glukokortikoid koji se koristi za liječenje reumatskih i kožnih bolesti te bolesti probavnih i dišnih organa. Karakteriziran je vrlo slabom topljivošću u vodi (0,23 mM). U obliku THEDES-a značajno mu je povećana topljivost, a zabilježen je i porast permeabilnosti u odnosu na vodenu otopinu čistog deksametazona (Silva i sur., 2018).

Osim topljivosti, vrlo važna karakteristika svake aktivne farmaceutske tvari je stabilnost. Stabilnost se definira kao sposobnost lijeka da zadrži kemijsku strukturu u promjenjivim uvjetima, a ovisna je o različitim eksternim faktorima poput svjetlosti, temperature, pH, oksidacije (Pedro i sur., 2021). Problem velikog broja lijekova, posebice onih male molekulske mase, je kratkotrajna stabilnost u vodenim otopinama. Degradacijom API-ja prije ciljnog mjesta djelovanja lijek ne može postići terapijski učinak ili je učinak značajno smanjen. Mnogi znanstveni radovi ukazuju kako niskotemperaturna eutektička otapala mogu pozitivno utjecati na stabilnost API-ja u odnosu na stabilnost u vodenim otopinama. U radu koji su objavili Lu i suradnici (2013), ispitana je stabilnost aspirina u NADES-u kolin-klorid:polialkohol, a rezultati su pokazali kako je brzina razgradnje aspirina na salicilnu i octenu kiselinu 8,2 puta sporija u eutektičkom otapalu nego u vodenoj otopini. Sljedeći primjer poboljšanja stabilnosti API-ja prikazan je u radu Olivares i suradnika (2018), u kojem je NADES betain:urea poboljšao stabilnost β -laktamskih antibiotika. U vodenim otopinama ovakvih antibiotika dolazi do nukleofilnog ili elektrofilnog napada i otvaranja β -laktamskog prstena, što dovodi do narušavanja stabilnosti i gubitka antimikrobne aktivnosti. U ovom radu produžena je stabilnost klavulinske kiseline u NADES-u betain:urea za otprilike 7 puta u odnosu na stabilnost tog antibiotika u vodenoj otopini.

Osim antibiotika i različitih nesteroidnih protuupalnih lijekova, niskotemperaturna eutektička otapala mogu prevenirati ili smanjiti razinu degradacije terapijskih proteina.

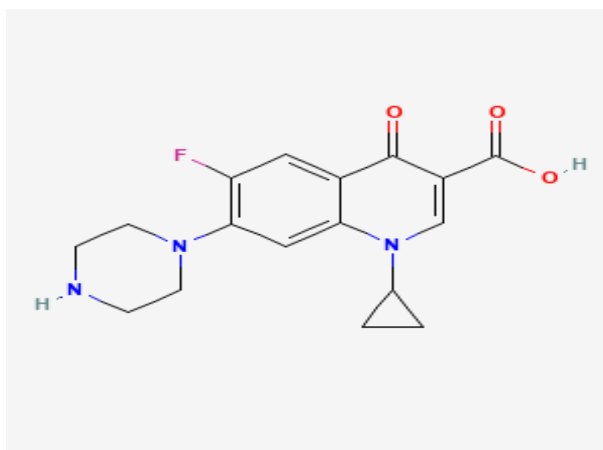
Terapeutski proteini vrlo su osjetljivi na promjenu temperature, stoga je za njihovu distribuciju, skladištenje i manipulaciju nužan lanac kontrolirane temperature, što često ograničava njihovu primjenu i povisuje troškove. U radu koji su objavili Lee i sur. (2018) povećana je stabilnost humanog interferona α (IFN- α 2), koji se koristi u liječenju hepatitisa B i C i leukemije, pomoću eutektičkog otapala kolin-klorid:glukoza (1:1). Analizom je potvrđeno kako je protein zadržao strukturu i aktivnost tijekom tri mjeseca, na temperaturi 37 °C, što je znatno bolje u usporedbi sa stabilnošću IFN- α 2 u fosfatnom puferu.

Iz navedenih istraživanja vidljivo je kako THEDES-i mogu pozitivno utjecati na stabilnost, topljivost i permeabilnost, a time i na bolju biodostupnost i terapeutski učinak lijeka. Posljednjih godina razvoj terapeutskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala provodi se za različite kategorije API-ja, od antifungalnih lijekova, analgetika, protuupalnih nesteroidnih lijekova do antibiotika.

2.3. RAZVOJ TERAPEUTSKIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA ZA POBOLJŠANJE FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA

2.3.1. Kemijska struktura i mehanizam djelovanja ciprofloksacina

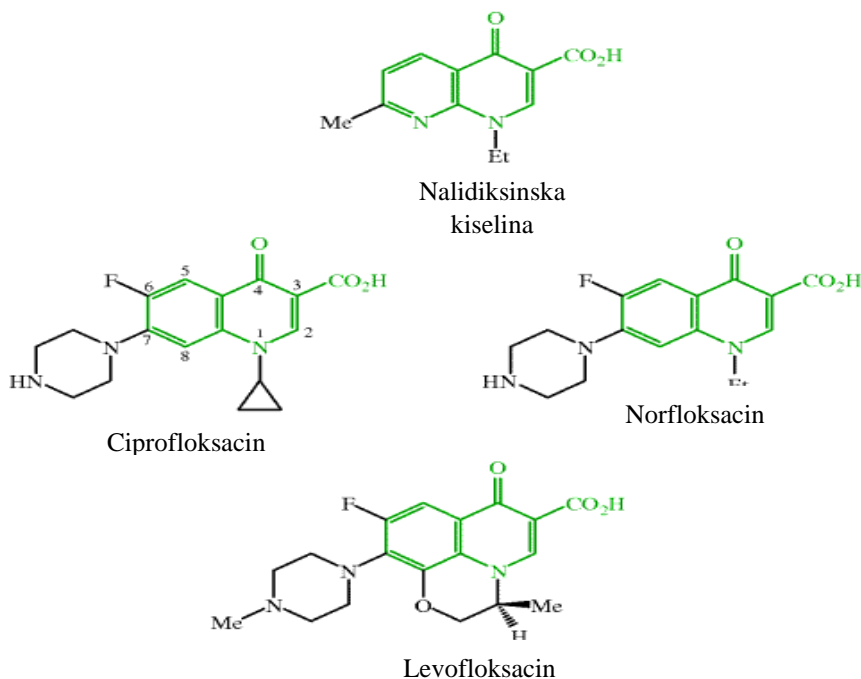
Ciprofloksacin je lijek koji pripada drugoj generaciji fluorokinolonskih antibiotika, a koristi se za liječenje različitih bakterijskih infekcija, uključujući respiratorne i urinarne infekcije. Lijek je patentirala tvrtka Bayer 80-ih godina prošlog stoljeća te je ubrzo postao jedan od najčešće korištenih antibiotika u SAD-u i Europi, a danas je na tržištu prisutan u više od 300 različitih tvorničkih imena (De Almeida i sur., 2007).



Slika 4. Kemijska struktura ciprofloksacina (NCBI, 2021)

Fluorokinolonski antibiotici su skupina sintetskih antibakterijskih lijekova strukturno slični nalidiksinskoj kiselini. Razvoj kinolonskih antibiotika započeo je 1962. otkrićem nalidiksinske kiseline, nusprodukta u sintezi klorokina koji se koristi kao lijek protiv malarije.

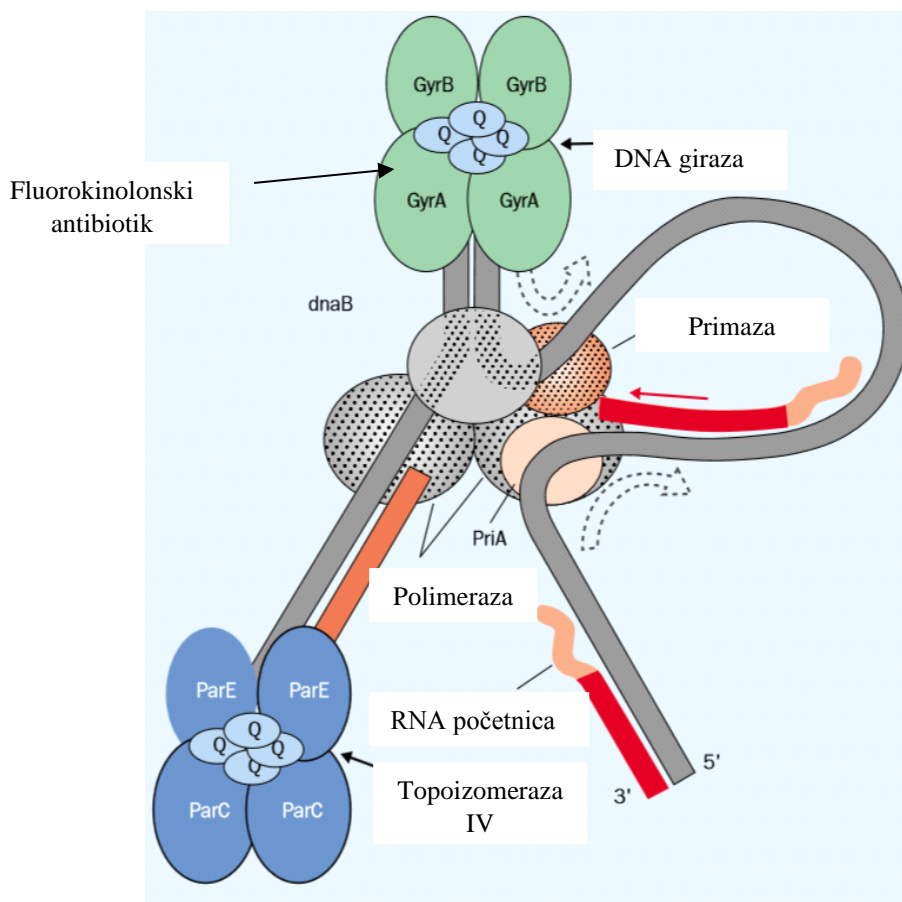
Otkriveno je kako nalidiksinska kiselina ima inhibitorno djelovanje na Gram-negativne organizme, a zatim je u cilju poboljšanja farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava razvijena cijela klasa novih spojeva, derivata 4-kinolona. Međutim, niti jedan od derivata nije pokazivao značajno veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na ishodnu nalidiksinsku kiselinu. Stoga su znanstvenici unaprijedili derivate uvođenjem atoma fluora u molekulu 4-kinolona na poziciju 6 i piperazinskog supstituenta na poziciju 7 čime je nastao fluorokinolon (Emmerson i Jones, 2003). Ovakvi spojevi imaju širi spektar djelovanja, bolji farmakokinetički profil, produljeno vrijeme polueliminacije, poboljšanu distribuciju u tkiva te smanjeno vezanje na proteine plazme. Navedeni derivati čine fluorokinolone druge generacije, među kojima je najpoznatiji ciprofloksacin, a njegova kemijska struktura prikazana je na slici 4. Narednih godina u cilju poboljšanja terapijskih svojstava, razvijeni su spojevi treće i četvrte generacije fluorokinolona (Andriole, 2005), od kojih su neki prikazani na slici 5.



Slika 5. Kemijska struktura fluorokinolona različitih generacija (prema Aldred i sur., 2014)

Ciprofloksacin se primjenjuje *per os* u obliku bijelog praha, gorkog okusa, a moguća je primjena intravenozno i dermalno. Kako bi se spriječila fotolitički inducirana degradacija potrebno ga je skladištiti na tamnom mjestu pri temperaturi od 4 °C. Ciprofloksacin je dobro topljiv u octenoj kiselini, a slabo topljiv u vodi i organskim otapalima metanolu, etanolu i acetonu. Temperatura taljenja je 313-315 °C, a u molekuli ciprofloksacina prisutne su dvije ionizirajuće grupe: 6-karboksilna skupina i 4-N pozicija piperidinskog supstituenta (Sharma i sur., 2010). Općeniti mehanizam djelovanja fluorokinolonskih antibiotika temelji se na

inhibiciji sinteze bakterijske DNA, posredstvom inhibicije enzima iz skupine topoizomeraza II, koje imaju ulogu u replikaciji, transkripciji, rekombinaciji i popravku bakterijske DNA (Hawkey, 2003). Enzimi DNA giraza i topoizomeraza IV su heterotetramerne molekule koje se sastoje od dvije kopije Gyr A i GyrB te dvije kopije ParC i ParE podjedinica (Redgrave i sur., 2014). Kako bi započeo proces replikacije potrebno je razdvajanje dvostruke uzvojnice DNA. Enzim DNA giraza je bakterijska topoizomeraza tipa II koja katalizira negativno superuvijanje uzvojnice kružne molekule DNA, odnosno katalizira cijepanje veze šećer-fosfat u oba lanca DNA te na taj način onemogućuje superuvijanje DNA. Još jedan važan enzim iz iste skupine je topoizomeraza IV čija je uloga razdvajanje lanaca DNA nakon replikacije. Fluorokinoloni imaju ulogu inhibitora topoizomeraza jer formiraju ternarne komplekse s podjedinicama enzima i molekulom DNA, što dovodi do prekida replikacije, cijepanja bakterijske DNA i smrti bakterije. Na slici 6 shematski je prikazan mehanizam djelovanja fluorokinolonskih antibiotika.



Slika 6. Shematski prikaz formiranja ternarnog kompleksa između fluorokinolona, DNA giraze/ topoizomeraze IV i molekule DNA bakterije (prema Hooper, 2002)

2.3.2. Primjena ciprofloksacina u kliničkom liječenju

Prema klasifikaciji Agencije za hranu i lijekove SAD-a (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), kinolonski antibiotici dijele se u četiri generacije s obzirom na antimikrobni spektar djelovanja. Druga generacija fluorokinolona, u koju pripada i ciprofloksacin, djeluje na širi spektar Gram-negativnih bakterija kao što su *Escherichia coli*, bakterije iz rodova *Salmonella* i *Shigella*, a djeluje i na neke Gram-pozitivne poput *S. aureus*, *S. pneumoniae* te na određene sojeve mikobakterija. Ciprofloksacin je jedan od najčešće upotrebljivanih fluorokinolona. Širok antibakterijski spektar djelovanja omogućuje primjenu ciprofloksacina u liječenju gastrointestinalnih i urinarnih infekcija, spolno prenosivih bolesti i kožnih infekcija. Ciprofloksacin koriste i pacijenti oboljeli od cistične fibroze, koji se bore s kroničnim plućnim bakterijskim infekcijama. Zbog dobre apsorpcije u kosti, ciprofloksacin nalazi svoju primjenu u liječenju osteomijelitisa (King i sur., 2000).

2.3.3. Razvoj strategije za poboljšanje topljivosti, permeabilnosti i biodostupnosti ciprofloksacina

Topljivost tvari u otapalu, permeabilnost kroz membrane stanica te biodostupnost na ciljnom mjestu djelovanja, parametri su koji definiraju svaku aktivnu farmaceutsku tvar, odnosno lijek. Prema klasifikacijskom sustavu biofarmaceutika (engl. *Biopharmaceutical classification system*, BCS), ciprofloksacin pripada u skupinu IV koju karakterizira niska topljivost u vodi i slaba permeabilnost. Literaturni podaci pokazuju kako je topljivost ciprofloksacina u vodi oko $0,067 \text{ mg mL}^{-1}$ pri pH 7,5 i 25 °C. Topljivost ciprofloksacina ovisna je o pH vrijednosti i temperaturi. Ispod pH 5 i iznad pH 10 ciprofloksacin je topljiviji, dok je pri neutralnom pH topljivost vrlo niska (Caco i sur., 2008). Obzirom da se ciprofloksacin može primjenjivati oralno, dermalno i intravenozno, odnosno terapija se može provoditi lokalno i sistemski, ciprofloksacin se nalazi u različitim farmaceutskim oblicima, od filmom obloženih tableta, oralnih suspenzija do otopina za intravenoznu primjenu. Unatoč različitim načinima terapijske primjene ciprofloksacina, istraživanja pokazuju kako je njegova biodostupnost 56-77 % (Olivera i sur., 2011).

Najveći izazov farmaceutske industrije je poboljšanje topljivosti i permeabilnosti postojećih API-ja i molekula u razvoju. Stoga su znanstvenici tijekom godina istraživali različite modele i metode kako poboljšati topljivost i permeabilnost ciprofloksacina. Jedna od najčešće korištenih strategija je razvoj filmom obloženih tableta u kojima je ciprofloksacin prisutan u obliku hidrokloridne soli. Zbog prisutnosti hidrokloridne skupine dolazi do

protoniranja amino skupine unutar molekule ciprofloksacina te nastanka Cl^- iona. Posljedica toga je jačanje ionskih i vodikovih veza između molekule vode i molekule ciprofloksacina te povećana topljivost. Analizom literature vidljivo je kako je topljivost formulacije ciprofloksacin:HCl u vodi oko 30 mg mL^{-1} , što je gotovo 500 puta više od topljivosti čistog ciprofloksacina u vodi (Varanda i sur., 2006; Caco i sur., 2008). Sljedeći pristup u poboljšanju topljivosti ciprofloksacina je korištenje nanovlakana kao transportnih nosača. Nanočestice su strukture koje imaju veliki odnos površine naspram volumena što omogućava da velika količina lijeka dođe u kontakt s medijem koji ga okružuje. Na taj način dolazi do povećanja brzine otapanja što dovodi do povećanja topljivosti i permeabilnosti. Trenutno se provode različita istraživanja u kojima se pokušava razviti formulacija ciprofloksacina u sklopu nanočestica.

U radu koji su objavili Uhljar i sur. (2021) razvijena je formulacija u kojoj je ciprofloksacin imobiliziran nanovlaknima na bazi polimera polivinil-pirolidona (PVP) za potencijalnu *per os* primjenu. PVP je biokompatibilni polimer dobro topljiv u vodi, stoga ne predstavlja prepreku u potencijalnoj kliničkoj primjeni ovakve formulacije. Dobiveni rezultati pokazuju kako je inkorporacijom ciprofloksacina u PVP nanovlakna topljivost u vodi povećana 12 puta, dok je topljivost u PBS puferu povećana 6,4 puta u odnosu na topljivost slobodnog ciprofloksacina u navedenim otapalima. Inkorporacija ciprofloksacina u PVP nanovlakna omogućila je poboljšanje fizikalno-kemijskih svojstava API-ja, što dovodi do zaključka kako bi ovakva tehnologija u budućnosti mogla omogućiti razvoj formulacije koja će imati svoju kliničku primjenu. Ashtiani i sur. (2021) objavili su rad u kojem su razvili sustav nanočestica temeljenih na biopolimeru kitozanu te cijanokobalaminu, unutar kojih je inkorporiran ciprofloksacin, čime je poboljšana njegova biodostupnost i omogućeno je kontrolirano otpuštanje lijeka.

Osim za oralnu primjenu, ciprofloksacin postoji i u oblicima koji se koriste za dermalnu upotrebu, odnosno liječenje kožnih bakterijskih infekcija. Zbog slabe dermalne apsorpcije lijeka teško je postići terapijsku koncentraciju aktivne farmaceutske tvari na ciljnom mjestu djelovanja. Kao vrlo obećavajući pristup poboljšanja biodostupnosti lijekova za dermalnu primjenu, razvijeni su različiti transportni sustavi koji se temelje na lipidnim vezikulama. Takav sustav je pogodan zato što je biokompatibilan, odnosno nije toksičan, a moguća je inkorporacija hidrofилnih i hidrofobnih API-ja zbog amfipatskih svojstava fosfolipida. Susanta i sur. (2021) razvili su formulaciju koju čine liposomi formirani od fosfatidilkolina i kolesterola unutar kojih je inkorporiran ciprofloksacin. Inkorporacijom liposoma u hidrogel matrice povećana je viskoznost, što utječe na povećano vrijeme zadržavanja na mjestu djelovanja. Iako do sada takva formulacija nije pronašla kliničku primjenu, ciprofloksacin u obliku liposomalnog

hidrogela ima poboljšanu permeabilnost kroz epitel kože te povećanu biodostupnost lijeka na mjestu djelovanja.

Fizikalno-kemijske karakteristike topljivosti i permeabilnosti API-ja utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka. Oralna biodostupnost je važan farmakokinetički parametar, a izražava se kao frakcija ukupne primijenjene doze koja dospije u sistemsku krvnu cirkulaciju. Ona ovisi o brzini topljivosti u vodenom mediju dok intestinalna permeabilnost ovisi o topljivosti lijeka u lipidima, odnosno o razini lipofilnosti API-ja, stoga je za efikasnu apsorpciju nužna dinamička ravnoteža (Lipinski i sur., 2001). Snažne intermolekularne Van der Waalsove i vodikove veze omogućuju gusto pakiranje molekula ciprofloksacina u kristalnu strukturu, a to utječe na smanjenje topljivosti u vodenom mediju. Jedan od pristupa povećanja topljivosti ciprofloksacina je sinteza derivata čiji je cilj desrupcija kristalne rešetke ciprofloksacina kako bi se postigla fleksibilnija molekularna struktura i time potencijalno dovelo do povećanja topljivosti u vodenom mediju. Assali i sur. (2016) objavili su istraživanje u kojem su unaprijedili farmakokinetiku ciprofloksacina razvojem API-ja u obliku prolijeka. Strategija se temelji na sintezi prolijeka, čija će aktivacija biti potaknuta enzimskim putem nakon unosa u organizam. Sintetizirani prolijek sadrži derivate etilen-glikola povezane esterskom vezom s molekulom ciprofloksacina. Hidrolizom esterske veze, pomoću prirodno prisutnih esteraza, u organizmu se oslobađa i aktivira ciprofloksacin. Rezultati su pokazali povećanu topljivost kod sva tri derivata u odnosu na slobodni ciprofloksacin, a osim topljivosti došlo je do povećanja antimikrobne aktivnosti prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.

Iz navedenih primjera vidljivo je kako se proteklih godina razvijaju različite strategije poboljšanja fizikalno-kemijskih svojstava ciprofloksacina, prvenstveno topljivosti i permeabilnosti kako bi se utjecalo na poboljšanje biodostupnosti ovog lijeka. U ovom radu primijenjen je relativno novi pristup korištenja prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala za razvoj terapijskog API-DES sustava, s ciljem poboljšanja navedenih svojstava, uz istovremeno zadržavanje stabilnosti i antimikrobnog djelovanja ciprofloksacina.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Aktivna farmaceutska tvar

U ovom diplomskom radu kao API korišten je antibiotik ciprofloksacin, 98 %, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD.

3.1.2. Kemikalije

- Acetonitril, >99.9 %, Honeywell, Riedel-de Haen, Njemačka
- Deionizirana voda
- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka
- DMSO (dimetilsulfoksid), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- D-(+)- glukoza, Acros Organics, New Jersey, SAD
- 96 % etilni alkohol (etanol), Kefo, Ljubljana, Slovenija
- FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Glicerol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Lecitin, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Limunska kiselina monohidrat, p.a., T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- L- α -fosfatidilkolin, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium], Promega, SAD
- n-dodekan, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- Oktanska kiselina, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- PBS pufer, GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland
- Timol, 99 %, Acros Organics, New Jersey, SAD
- Tripin plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD
- 0,25 % Tripsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Kemikalije korištene u ovom radu su analitičke čistoće te su primjerene za provođenje HPLC analiza, a voda korištena za pripremu niskotemperaturnih eutektičkih otapala je destilirana i deionizirana.

3.1.3. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala

U sklopu ovog rada korištena su tri prirodna niskotemperaturna eutektička otapala: timol:oktanska kiselina (Ty:C8), limunska kiselina:glukoza (CA:Glc) i glicerol:glukoza (Gly:Glc). NADES-i su pripremljeni u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije PBF-a.

3.1.4. Stanična linija Caco-2

U ovom radu korištena je Caco-2 stanična linija za ispitivanje biološke aktivnosti prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala timol:oktanska kiselina i API-DES sustava baziranog na istom eutektičkom otapalu, koji kao komponentu sadrži antibiotik ciprofloksacin. S obzirom da ispitujemo utjecaj API-ja koji se unosi oralno, stanična linija Caco-2 primjereni je izbor jer vrlo učinkovito imitira intestinalni epitel. Caco-2 (**C**ancer **c**oli-2) je stanična linija uspostavljena 1970-ih, a izolirao ju je znanstvenik Jurgen Fogh iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma. Tijekom rasta Caco-2 stanice prolaze proces proliferacije i diferencijacije, pri čemu zbog svojih morfoloških karakteristika postaju vrlo slične enterocitima, odnosno epitelnim stanicama tankog crijeva (Lea, 2015). Caco-2 stanice eksprimiraju većinu receptora, transportera i metabolizirajućih enzima koji su prisutni u intestinalnom epitelu organizma. Proučavanjem Caco-2 stanične linije znanstvenici su uvidjeli kako postoji korelacija između permeabilnosti lijekova kroz monosloj Caco-2 stanica i permeabilnosti lijekova kroz humanu intestinalnu mukozu. Stoga je Caco-2 stanična linija predložena kao prediktivni model oralne apsorpcije lijekova kod ljudi (Van Breemen i Li, 2005). Tijekom posljednja dva desetljeća zabilježen je značajan porast korištenja Caco-2 stanične linije u „*in vitro screeningu*“ farmaceutskih tvari kojim se ispituje intestinalna apsorpcija, transport i metabolizam tvari. U sklopu ovog rada, navedena stanična linija korištena je samo za ispitivanje biološkog utjecaja, odnosno određivanja toksikološkog profila NADES-a i API-DES formulacije.

3.1.5. Uređaji i oprema

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Analitički HPLC uređaj, 1260 Infinity II, Agilent Infinitylab, SAD
- Centrifuga mrc, MRC- Laboratory Equipment & Instruments, Izrael
- Čitač ploča, Tecan, Mannedorf, Švicarska
- Homogenizator s regulacijom temperature, Eppendorf ThermoMixer C, Njemačka

- Hladnjak (4 °C), Gorenje, Slovenija
- Komora za sterilni rad, Kambič, Slovenija
- Laboratorijski pribor (mikropipete, nastavci za mikropipete, Petrijeve zdjelice, laboratorijsko posuđe)
- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka
- Neubauer komorica za brojanje stanica, Reichert, NY, SAD
- Petrijeve zdjelice za uzgoj stanica, Thermo Fisher Scientific, Drive Rochester, NY, SAD
- Ploče s 96 jažica, Corning, SAD
- Ploče s 96-akceptorskih/donorskih jažica s filterima, MerckMilipore, SAD
- Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

3.1.6. Softverski programi za obradu podataka

- COSM*O*therm
- Microsoft Excel

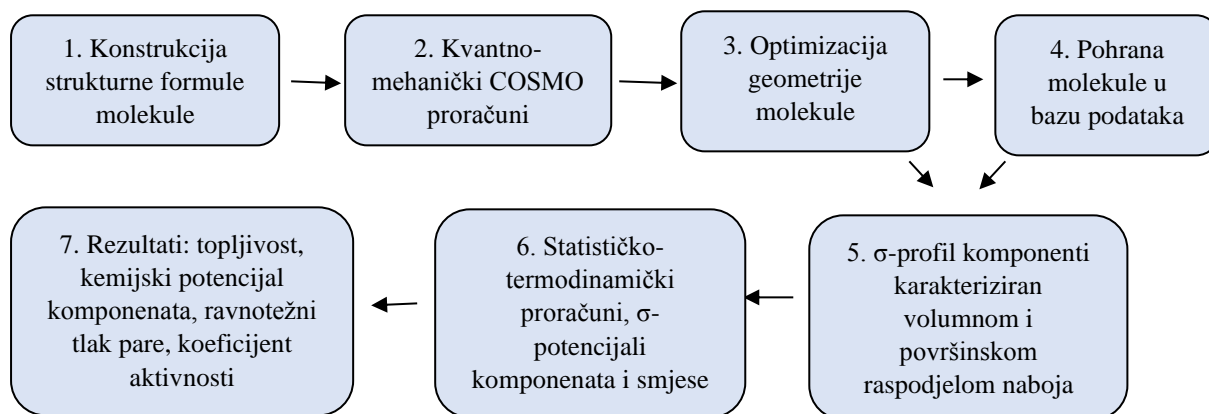
3.2. METODE RADA

3.2.1. Primjena programa COSM*O*therm za procjenu topljivosti antibiotika ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Odabir najpogodnijeg NADES-a za određeni reakcijski sustav ili terapijsku formulaciju u počecima se temeljio na empirijskom pristupu pokušaja i pogrešaka, što često dovodi do povećanja troškova materijala i kemikalija, ali i gubitka vremena. Sistematsko istraživanje u kojem bi se utvrdio odnos strukture i svojstava NADES-a primjenom odgovarajućih matematičkih modela te razvoj prediktivnog modela za dizajniranje THEDES-a s optimalnim svojstvima topljivosti i bioraspodivnosti API-ija, omogućio bi bržu primjenu takvih formulacija u industrijskim procesima. Cilj ovog rada bio je pravilnim odabirom NADES-a pripremiti formulaciju aktivne farmaceutske tvari ciprofloksacina, u cilju povećanja njegove topljivosti i permeabilnosti, što je ključno u postizanju bolje biodostupnosti. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala korištena za predikciju topljivosti, prethodno su pripremljena i okarakterizirana u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Kako bi se smanjila potreba za

eksperimentalnim radom, odnosno ispitivanjem topljivosti API-ja u svakom pojedinačnom eutektičkom otapalu, korišten je računalni softver COSMO-RS. Model COSMO-RS (engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*) koristi se za računalno predviđanje eutektičke točke i topljivosti komponenata u eutektičkom otapalu, a njegovom primjenom dolazi do višestruke uštede vremena, ali i laboratorijskih materijala i opreme potrebne za eksperimentalno određivanje. Ovaj model razvio je znanstvenik Andreas Klamt za potrebe farmaceutske tvrtke Bayer AG, tijekom godina model je unaprjeđivan, a danas se smatra jednim od najtočnijih računalnih modela za predviđanje topljivosti.

Model se temelji na kvantno-mehaničkim metodama pomoću kojih se može izračunati prostorna raspodjela električnog naboja molekula otapala i otopljene tvari, a posljedično se može iskazati površinska raspodjela naboja. Ukupna površinska energija međudjelovanja molekula otapala i otopljene tvari može se odrediti pomoću metoda statističke termodinamike kao vrijednost kemijskog potencijala, iz čega se može procijeniti topljivost tvari u otapalu (Klamt i sur., 1998). Prvi korak ovog modela je konstrukcija molekule za koju se provodi proračun na način da molekula bude optimalne geometrije, odnosno u stanju minimalne energije, a konstrukcija je omogućena korištenjem programskog softvera TMoleX. Molekula je karakterizirana optimalnom geometrijom te volumnom i površinskom raspodjelom električnog naboja što zajedno čini tzv. σ -profil. Ova se geometrija u pravilu razlikuje od geometrije u plinskom stanju, a iako su ovakvi proračuni vremenski zahtjevni, provode se samo jednom te se pohranjuju kao izlazna datoteka COSMO-proračuna, tzv. σ -profil. Pomoću programskog paketa COSMOtherm σ -profili se statističko-termodinamičkim proračunima prevode u σ -potencijale i odgovarajuće kemijske potencijale, a zatim se izračunavaju izvedena svojstva. Kako bi se predvidjela topljivost API-ja u otapalu, u COSMOtherm program unosi se .cosmo datoteka ciprofloksacina te molekule ispitivanog otapala. Datoteke se mogu unijeti opcijom *From database*, pri čemu se koriste molekule dostupne u prethodno pripremljenoj bazi podataka, ili opcijom *From File*, prilikom koje se koriste molekule optimirane u programu TmoleX. U softveru COSMOtherm nakon unosa datoteke molekule čija se topljivost želi ispitati te unosa molekule otapala, potrebno je definirati temperaturu pri kojoj se ispituje topljivost te sastav smjese, odnosno udio akceptora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA), donora vodikove veze (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD) te ispitivane tvari. Kao rezultat proračuna dobije se logaritam koeficijenta aktivnosti, $\ln(\gamma)$, koji govori o topljivosti ispitivanog spoja u ispitivanom otapalu. Veći koeficijent aktivnosti tvari znači njezinu manju topljivost u promatranom otapalu. Shematski prikaz dijagrama toka proračuna prikazan je na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz dijagrama toka proračuna, unutar programa TMoleX i COSMOtherm

Osim za predviđanje topljivosti ključnih komponenta u NADES-u, COSMO-RS model koristi se i za predviđanje drugih termodinamičkih i fizikalno-kemijskih svojstava otapala, poput koeficijenta aktivnosti, ravnotežnoga tlaka para, koeficijenta raspodjele. Razvojem novih sustava poput prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i ionskih kapljevin, COSMO-RS pokazao se korisnim u modeliranju termodinamičke ravnoteže takvih sustava. U ovom radu korišten je programski paket BIOVIA COSMOtherm 2020 Version 20.0.0 kako bi se predvidjela topljivost API-ja ciprofloksacina u odabranim NADES-ima.

3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Upotrebom softverskog programa COSMO-RS za predviđanje topljivosti aktivne farmaceutske tvari ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, kao rezultat odabrana su tri NADES-a s najnižim koeficijentom aktivnosti za koje se smatra da će topljivost API-ja ciprofloksacina u tim otapalima biti najveća. Nakon provedene računalne analize bilo je potrebno pripremiti odabrana prirodna niskotemperaturna eutektička otapala, prikazana u tablici 2.

Tablica 2. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala korištena u ovom radu

NADES	Kratice	Molarni omjer	Udio vode
Timol:oktanska kiselina	Ty:C8	1:3	0 %
Limunska kiselina:glukoza	CA:Glc	1:1	10 %
Glicerol:glukoza	Gly:Glc	2:1	10 %

Priprema niskotemperaturnih eutektičkih otapala provedena je na način da je u tikvicu s okruglim dnom dodana prethodno izračunata masa, odnosno volumen komponenta, ovisno

o zadanim molarnim omjerima, te je dodan odgovarajući volumen vode. NADES Ty:C8 je hidrofobnog karaktera te za njegovu pripremu nije potreban dodatak vode, dok je za uspješnu pripremu druga dva NADES-a potrebno dodati 10 % (v/v) deionizirane vode. U tikvicu je dodan magnet za miješanje te je tikvica sa smjesom stavljena na elektromagnetsku miješalicu. Tikvica je miješana pri temperaturi od 50 °C tijekom 2 sata dok nije dobivena bezbojna, homogena i prozirna tekućina bez mirisa.

3.2.3. Eksperimentalno određivanje topljivosti ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Postupak određivanja topljivosti ciprofloksacina u referentnom otapalu, odnosno odgovarajućem NADES-u, proveden je prema metodi opisanoj u radu koji su objavili Palmelund i sur. (2019). Kako bi se ispitala topljivost ciprofloksacina u konvencionalnom otapalu (voda uz dodatak 2 % 36 % HCl-a) i prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima u kojima je predviđena najveća topljivost antibiotika, u Eppendorf kivetu dodano je po 100 µL svakog NADES-a i 4 mg ispitivane tvari, odnosno ciprofloksacina u praškastom obliku. Smjesa je stavljena na homogenizator koji ima mogućnost regulacije temperature prilikom miješanja. S obzirom da je topljivost API-ja u eutektičkom otapalu timol:oktanska kiselina veća od 40 mg mL⁻¹, što je vidljivo po odsutnosti taloga u kiveti, aktivna tvar je dodavana sve do postizanja prezasićene otopine, što je vidljivo po prisutnosti taloga u kiveti. Takva smjesa stavljena je na homogenizator na 25 °C tijekom 24 h. Nakon proteklog vremena kivete su stavljene na centrifugu pri 11400 rpm tijekom 10 min, kako bi došlo do odvajanja supernatanta od taloga. Koncentracija ciprofloksacina, odnosno maksimalna postignuta topljivost ciprofloksacina, određena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV detektorom.

3.2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

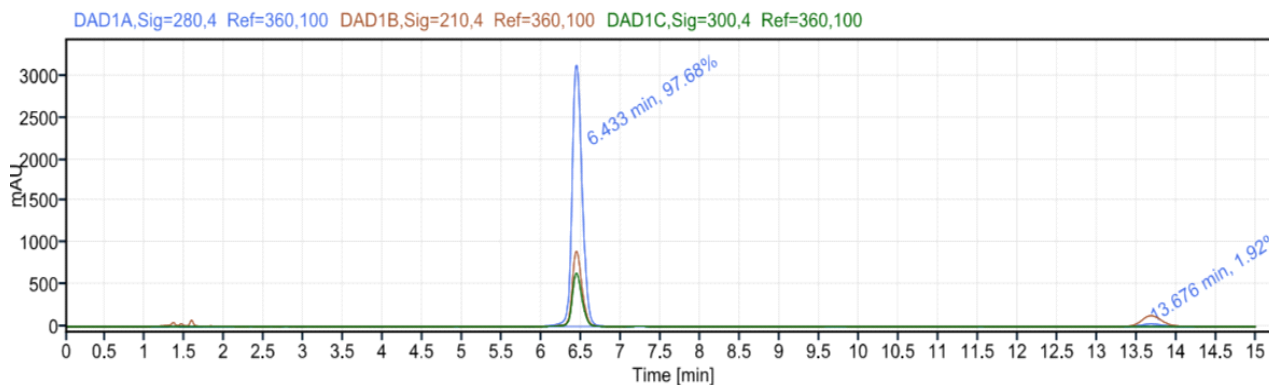
Supernatant je nakon odvajanja od taloga razrijeđen 100 puta vodom te je volumen od 150 µL stavljen u vijale kako bi se provela kromatografska analiza. Prethodnim razvojem kromatografske metode za razdvajanje i detekciju API-ja ciprofloksacina određeno je kako mobilnu fazu čine A: 0,1 % otopina klorovodične kiseline u vodi i B: 80 % acetonitril.

Kromatografska analiza:

Kromatografski uvjeti:

- Kolona: AgilentProshell 120 2,1 x 150mm
- Pokretna faza: A- 0,1 % otopina klorovodične kiseline u vodi
B- 80 % acetonitril
- Eluiranje: izokratsko – 84 % otapala A i 16 % B
- Injektirani volumen: 5 μL
- Temperatura injektiranja: 25 $^{\circ}\text{C}$
- Protok: 0,35 mL min^{-1}
- Temperatura kolone: 25 $^{\circ}\text{C}$
- Vrijeme analize: 7 min
- Detektor: DAD

Nakon završene kromatografske analize provedena je identifikacija i kvantifikacija kromatograma ciprofloksacina pri 280 nm. Usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda te usporedbom UV spektara potvrđeno je da je u uzorku prisutan API ciprofloksacin. Na slici 8 prikazan je tipični kromatogram ciprofloksacina u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Ty:C8, a retencijsko vrijeme ciprofloksacina pri navedenim uvjetima kromatografske analize je 6.5 min.



Slika 8. Kromatogram ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8

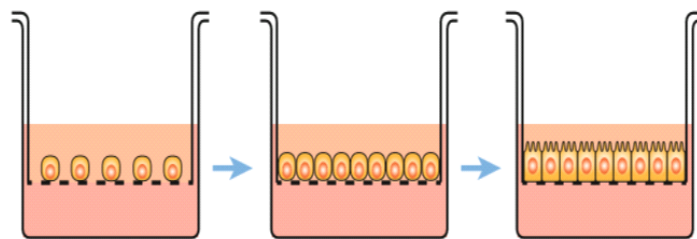
Korištenjem metode vanjskog standarda ciprofloksacina provedena je kvantifikacija analiziranih spojeva. Prethodno je potrebno napraviti baždarni pravac na način da su u odabranom NADES-u otopljene točno određene mase ciprofloksacina, čime su priređene standardne otopine poznatih koncentracija, u rasponu od 0,0125 mg mL^{-1} do 1 mg mL^{-1} . Otopine standarda analizirane su HPLC metodom te su površine pikova i masene koncentracije postavljene kao ovisne veličine, čime je konstruiran baždarni pravac. Pomoću jednadžbe pravca izračunata je koncentracija otopljenog ciprofloksacina u tri odabrana NADES-a.

3.2.4. Određivanje stabilnosti formulacije ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima

Osim poboljšane topljivosti vrlo je važna stabilnost aktivne farmaceutske tvari u prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu. Ukoliko dođe do razgradnje, odnosno raspada API-ja prouzrokovanog utjecajem NADES-a, doći će do gubitka terapijskog djelovanja lijeka. Stabilnost antibiotika ciprofloksacina ispitana je u referentnom otapalu (voda s 2 % 36 % HCl-a) te u NADES-ima u kojima je prethodno potvrđena najbolja topljivost djelatne tvari. Stabilnost je praćena na sobnoj temperaturi od 25 °C te na temperaturi od 4 °C kroz vremenski period od 35 dana. U određenim vremenskim intervalima provedena je kromatografska analiza uzoraka prema prethodno opisanoj metodi u poglavlju #3.2.3.1. Rezultat stabilnosti prikazan je kao graf ovisnosti omjera apsorbancije (izmjerene na određeni dan i apsorbancije izmjerene prvog dana praćenja stabilnosti, A/A_0) o vremenu u kojem je stabilnost praćena.

3.2.5. *In vitro* biološka aktivnost formulacije ciprofloksacina u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu Ty:C8 na Caco-2 staničnoj liniji

Za potrebu provođenja *in vitro* testiranja pripravljene formulacije ciprofloksacina na stanicama, provedena je kultivacija Caco-2 stanične linije. Caco-2 stanice čuvaju se u mediju za zamrzavanje na temperaturi -70 °C. Ampula sa stanicama uroni se u vodenu kupelj temperiranu na 37 °C kako bi se stanice odmrzule nakon čega je potrebno provesti centrifugiranje pri 1000 okretaja min^{-1} kako bi uklonili medij za zamrzavanje prisutan u supernatantu. Talog sa stanicama se resuspendira u svježem mediju za uzgoj uz dodatak 10 % (v/v) FBS. Uzgoj stanica provodi se u T-bocama ili Petrijevim zdjelicama, u inkubatoru s kontroliranom atmosferom koja sadrži 5 % CO_2 i 95 % zraka, na temperaturi od 37 °C. Brojnost stanica, morfologija te adhezija za podlogu kontrolira se pod inverznim mikroskopom. Stanice je potrebno precjepljivati svakih nekoliko dana kako ne bi došlo do prerastanja podloge te kako bi se stanice održale u eksponencijalnoj fazi rasta. Prilikom pasažiranja potrebno je ukloniti stari medij u kojem se nalaze produkti metabolizma koji mogu narušiti pH stanica te nadopuniti svježim medijem za uzgoj. Tijekom rasta Caco-2 stanica dolazi do njihove spontane diferencijacije u stanice vrlo slične enterocitima, odnosno epitelnim stanicama tankog crijeva (slika 9).



Slika 9. Shematski prikaz rasta, postizanja konfluentnog sloja te spontane diferencijacije Caco-2 stanica (Lea, 2015)

3.2.5.1. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

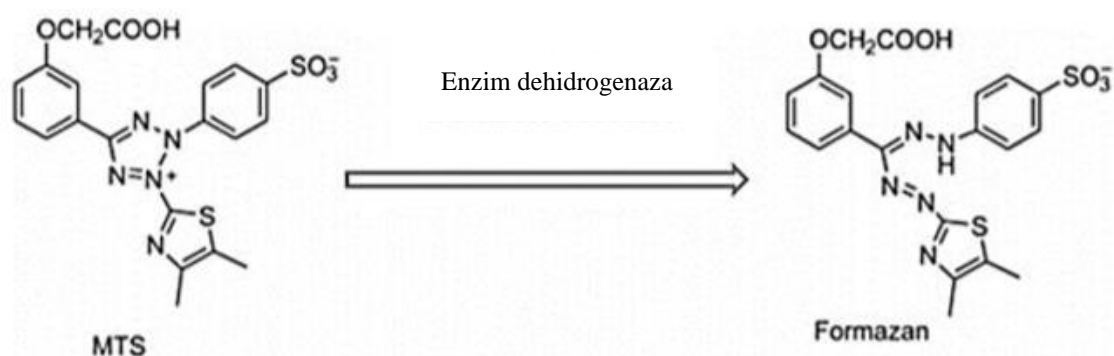
Nakon što se ukloni hranjivi medij iz posude u kojoj je provedena kultivacija stanica, dodaje se 1 mL prethodno zagrijane otopine tripsina. Stanice se vraćaju u termostatorirani inkubator na nekoliko minuta kako bi došlo do tripsinizacije, odnosno odvajanja stanica od podloge. Proces odvajanja provjerava se pod inverznim mikroskopom, a kada se stanice zaokruže dodaje se medij sa serumom koji zaustavlja djelovanje tripsina jer sadrži inhibitore proteaza. Stanice se zatim dobro resuspendiraju te se izuzme alikvot suspenzije stanica (10 μL) koji se pomiješa s bojom tripan plavo (10 μL). Volumen od 10 μL nanosi se u Neubauerovu komoricu za brojanje koja se sastoji od četiri velika kvadrata, a unutar svakog se nalazi po 16 malih kvadrata. Ukupan broj stanica računa se iz navedenog izraza:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{zbroj stanica u četiri velika kvadrata} \times 5000 \quad [1]$$

3.2.5.2. Ispitivanje biološke aktivnosti primjenom Caco-2 stanične linije pomoću MTS metode

Stanice su tripsinizirane u eksponencijalnoj fazi rasta, određen je broj stanica po mL korištenjem metode tripan-plavo te su Caco-2 stanice naciepljene u ploču s 96 jažica u početnoj koncentraciji 3×10^4 , a u svaku jažicu je dodano 100 μL suspenzije stanica. Računalnim predviđanjem te eksperimentalnom provjerom utvrđeno je kako je najveća topljivost ispitivanog API-ja ciprofloksacina postignuta u NADES-u timol:oktanska kiselina, molarnog omjera 1:3. Stoga su pripremljene standardne otopine ciprofloksacina u navedenom otapalu u rasponu koncentracija od 0,1 mg mL^{-1} do 50 mg mL^{-1} . Nakon 24 h od naciepljivanja u jažice, stanice su tretirane API-DES formulacijama različitih koncentracija. Osim formulacije, stanice su tretirane i određenim volumnim udjelima čistog NADES-a bez aktivne farmaceutske tvari. Kontrolne jažice nisu tretirane, a za svaku koncentraciju formulacije postavljene su četiri paralele. Stanice su vraćene na inkubaciju na 37 °C tijekom 72 sata, nakon čega je određen

učinak formulacija API-DES i čistog NADES-a na stanice primjenom MTS metode. MTS je kolorimetrijska metoda koja se koristi za analizu citotoksičnosti spojeva te određivanje antitijela koja inhibiraju rast. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS reagens koji se sastoji od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] i PES [fenazinetosulfat]. U živim stanicama MTS se reducira pomoću mitohondrijskih dehidrogenaza u ljubičasto obojeni produkt formazan koji je topljiv u staničnom mediju. U reakciji sudjeluje koenzim NADPH ili NADH koji se djelovanjem dehidrogenaze oksidira u NADP⁺ ili NAD⁺. Struktura MTS reagensa i produkt formazan prikazani su na slici 10.



Slika 10. Struktura reagensa MTS i reduciranog produkta formazana (prema Kuete i sur., 2017)

Nakon 72 sata inkubacije stanica uklonjen je medij s ispitivanom tvari te je u svaku jažicu dodano po 100 μ L svježeg medija s MTS reagensom (10 % v/v). Ploča s jažicama je vraćena na inkubaciju sljedeća 4 sata. Apsorbancija se određuje pomoću čitača mikrotitarskih pločica na valnoj duljini od 490 nm, pri čemu je vrijednost apsorbancije proporcionalna količini nastalog formazana, odnosno broju živih stanica u jažici. Preživljenje stanica izražava se kao postotak omjera apsorbancije tretiranih stanica i kontrole, a računa se prema navedenom izrazu:

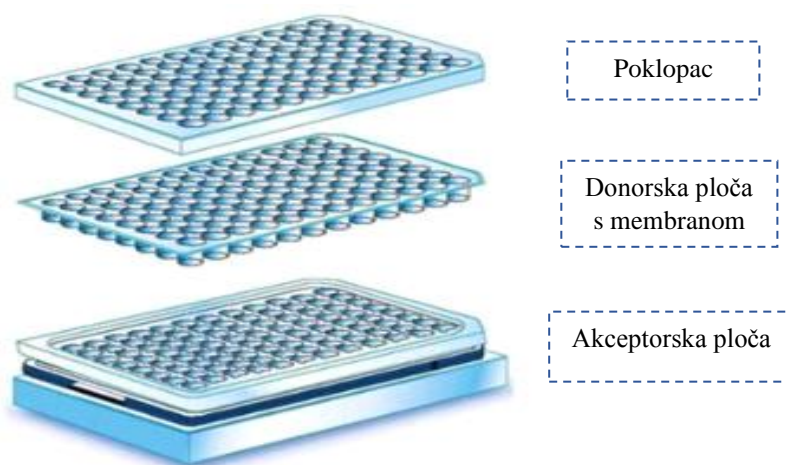
$$\text{preživljenje stanica} = \frac{\text{srednja vrijednost } A_{490} \text{ tretiranih stanica}}{\text{srednja vrijednost } A_{490} \text{ kontrole}} \times 100 \quad [2]$$

3.2.6. Određivanje permeabilnosti lijekova primjenom umjetnih membrana (PAMPA test)

Permeabilnost lijeka je svojstvo koje opisuje apsorpciju aktivne tvari kroz membranu, odnosno postotak prijenosa mase aktivne tvari kroz membranski fosfolipidni dvosloj. Jedna od najčešće korištenih metoda za *in vitro screening* permeabilnosti molekula u ranoj fazi razvoja je PAMPA test. Metoda se temelji na imitaciji stanične membrane pomoću različitih filtera s

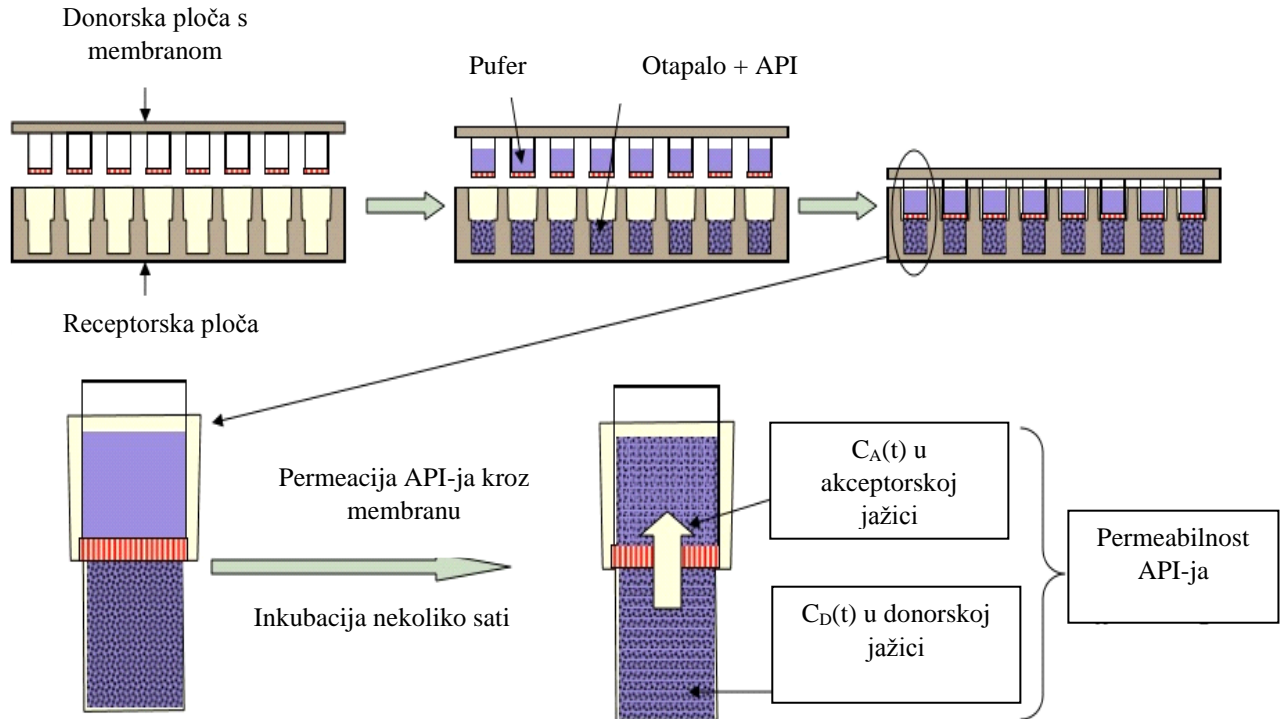
lipidima, čime se žele oponašati *in vivo* uvjeti, a transport molekula kroz umjetne membrane odvija se pasivnom difuzijom.

U sklopu ovog rada proveden je klasični PAMPA test prema dostupnoj znanstvenoj literaturi, a u svrhu ispitivanja permeabilnosti API-ja ciprofloksacina u referentnom otapalu i dobivenim formulacijama API-DES. Kao nosač se koriste umjetne membrane u donorskim jažicama u kombinaciji s akceptorskom pločom s 96 jažica, što je prikazano na slici 11.



Slika 11. Shematski prikaz sustava ploča za provedbu PAMPA testa (Creative Bioarray, 2021)

Metoda je provedena na način da je na filtere u svaku jažicu donorske ploče nanosena otopina L-fosfatidilkolina u n-dodekanu (1 % m/v) te je ostavljeno tijekom 24 sata da se osuši. Akceptorska ploča je prethodno napunjena s 300 μ L pufera (PBS, pH = 7,4), a potom je donorska ploča postavljena na akceptorsku, pri čemu je dno membrane u kontaktu s puferom u akceptorskoj jažici. Zatim je u svaku jažicu donorske ploče dodano 150 μ L otopine formulacije (Ty:C8:Cip), 150 μ L formulacije razrijeđene 1:1 s 10 % (v/v) DMSO u PBS-u, 150 μ L čistog API-ja ciprofloksacina otopljenog u 20 % (v/v) DMSO u PBS-u te 150 μ L čistog DES-a Ty:C8. Ciprofloksacin u navedenim otapalima iz donorske jažice pasivnom difuzijom prolazi umjetnu membranu i ulazi u akceptorsku jažicu. Svaki uzorak nanosen je u tri paralele. Sustav s pločama prekriven je plastičnim poklopcem te omotan parafilmom kako bi se spriječilo isparavanje. Inkubiran je 24 sata uz lagano miješanje na tresilici. Nakon inkubacije izmjeren je volumen u akceptorskoj i donorskoj jažici, a koncentracije API-ja ciprofloksacina u jažicama akceptorske ploče, kao i u početnim otopinama, određene su pomoću prethodno opisane HPLC metode za određivanje ciprofloksacina. Shematski prikaz provedbe PAMPA testa za određivanje permeabilnosti API-ja prikazan je na slici 12.



Slika 12. Shematski prikaz provedbe PAMPA testa za određivanje permeabilnosti API-ja
(prema Portsmouth, 2017)

Na temelju određenih volumena tekućine u akceptorskoj i donorskoj jažici te određenih koncentracija API-ja u istima, a prema formuli [3] i [4] objavljenoj u radu (Nožinić i sur., 2010) određuje se prividna permeabilnost [nm s^{-1}]:

$$P_{\text{app}} = -C \times \ln \left(1 - \frac{[\text{API}]_{A, \text{kraj}}}{[\text{API}]_{\text{eq}}} \right) \times 10^7 \quad [3]$$

$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times \text{površina} \times t} \quad [4]$$

pri čemu je P_{app} prividna permeabilnost [nm s^{-1}],

$[\text{API}]_{A, \text{kraj}}$ je koncentracija ispitivane tvari u akceptorskoj jažici na kraju pokusa,

$[\text{API}]_{\text{eq}}$ je koncentracija ispitivane tvari u teorijskoj ravnoteži,

V_D je volumen otopine s ispitivanom tvari u donorskoj jažici [cm^3],

V_A je volumen otopine s ispitivanom tvari u akceptorskoj jažici [cm^3],

površina predstavlja aktivnu površinu membrane koja je standardizirana veličina i iznosi $0,24 \text{ cm}^2$, a t predstavlja inkubacijsko vrijeme [s].

4. REZULTATI I RASPRAVA

Novi trendovi u farmaceutskoj i kemijskoj industriji nalažu uvođenje principa zelene kemije u proizvodni proces. Ekološka i ekonomska održivost, visoka učinkovitost procesa te briga za ljudsko zdravlje postali su temelj poslovanja navedenih industrija. U prethodnim desetljećima nije se pretjerano brinulo o posljedicama prekomjernog iskorištavanja neobnovljivih izvora energije te kroničnom učinku pojedinih tvari koje se koriste u kemijskoj i farmaceutskoj proizvodnji. Razvojem znanosti, posebice u području toksikologije i molekularne biologije, povećala se svijest o učinku određenih tvari, posebice često korištenih organskih otapala, na ljudsko zdravlje i okoliš. Jedan od postulata zelene kemije ističe važnost upotrebe sigurnijih otapala u proizvodnom procesu. Kao potencijalna zamjena za štetna organska otapala poput benzena, toluena, heksana, u posljednjim desetljećima intenzivno se istražuju prirodna niskotemperaturna eutektička otapala.

Jedan od najvećih problema farmaceutske industrije je razvoj velikog broja novih lijekova koji su teško topljivi u vodi. Slaba topljivost posljedično dovodi do slabe permeabilnosti te slabe biodostupnosti lijeka na ciljnom mjestu djelovanja, čime taj lijek ne može postići terapijsko djelovanje i kao takav je smanjene učinkovitosti. Iako znanstvenici širom svijeta svakodnevno razvijaju nove metode i formulacije u cilju poboljšanja navedenih svojstava, mnoga dostignuća još uvijek nisu ušla u kliničku primjenu jer su potrebna dodatna istraživanja u budućnosti. Posljednje desetljeće istražuju se prirodna niskotemperaturna eutektička otapala kao jedno od potencijalnih rješenja za poboljšanje topljivosti, permeabilnosti i biodostupnosti API-ja. Formiranjem API-DES sustava, odnosno formulacija unutar koje je aktivna tvar otopljena u NADES-u, moguće je poboljšati navedena svojstva. S obzirom da se NADES-i klasificiraju kao nehlapivi i netoksični, moguća je klinička primjena terapijika u obliku API-DES sustava.

Ciprofloksacin je aktivna djelatna tvar, odnosno antibiotik koji se koristi za liječenje različitih respiratornih, kožnih i probavnih bakterijskih infekcija. Pripada drugoj generaciji fluorokinolonskih antibiotika, a općeniti mehanizam djelovanja temelji se na inhibiciji enzima iz skupine topoizomeraza, točnije DNA giraze i topoizomeraze IV, pri čemu dolazi do inhibicije replikacije, cijepanja DNA i smrti bakterijske stanice. Najveći problem pri terapijskoj primjeni ciprofloksacina, kao i većine lijekova, je njegova slaba topljivost u vodi. Literaturni podaci pokazuju kako je topljivost čistog ciprofloksacina u vodi manja od $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, dok je topljivost u DMSO manja od 1 mg mL^{-1} . Stoga je pronalazak alternativnog otapala, koje će

osim poboljšanja topljivosti biti i ekološki prihvatljivo te primjereno za ljudsku upotrebu od velikog interesa.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pronaći prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo u kojem će topljivost ciprofloksacina biti veća nego u referentnom otapalu, odnosno vodi. Između više desetaka NADES-a koja su prethodno pripremljena i okarakterizirana u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, pomoću računalnog modela COSMO $_{therm}$ za predviđanje topljivosti, odabrana su tri NADES-a u kojima je predviđena najveća topljivost ciprofloksacina. Zatim su pripremljeni odabrani NADES-i te je eksperimentalno ispitana topljivost ciprofloksacina u istima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Na temelju rezultata odabrana su dva NADES-a u kojima je postignuta najveća topljivost te su oni korišteni u daljnjem eksperimentu praćenja stabilnosti ciprofloksacina u NADES-u i referentnom otapalu tijekom mjesec dana na različitim temperaturama. Nadalje, bilo je potrebno ispitati *in vitro* biološku aktivnost čistog ciprofloksacina te dobivenih API-DES formulacija kako bi se istražilo imaju li dobivene formulacije potencijalno citotoksično djelovanje ili potiču rast i diferencijaciju stanica. Osim biološke aktivnosti na kulturama stanica, bilo je potrebno ispitati antimikrobnu aktivnost dobivenih API-DES formulacija te usporediti rezultate s antimikrobnom aktivnošću čistog ciprofloksacina na nekoliko različitih bakterijskih sojeva. Ovaj eksperiment proveden je kao dio završnog rada studentice Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu Mirne Nakić (2021). U slučaju narušavanja antimikrobnog djelovanja ciprofloksacina zbog prisutnosti NADES-a u formulaciji, daljnja istraživanja ne bi imala smisla jer je cilj rada bio poboljšanje topljivosti uz zadržavanje iste ili povećanje antimikrobne aktivnosti ciprofloksacina. Osim topljivosti i stabilnosti, vrlo važan parametar u klasifikaciji svake farmaceutske aktivne tvari je njegova permeabilnost. Stoga je bilo potrebno ispitati permeabilnost odabranog API-DES sustava te ju usporediti s permeabilnošću čistog ciprofloksacina. U tu svrhu korišten je standardizirani PAMPA test koji se temelji na primjeni umjetnih membrana, sastavljenih od filtera i lipida, a kojima se u *in vitro* uvjetima oponašaju stanične membrane.

4.1. PROCJENA TOPLJIVOSTI CIPROFLOKSACINA U PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA PRIMJENOM PROGRAMA COSMOtherm

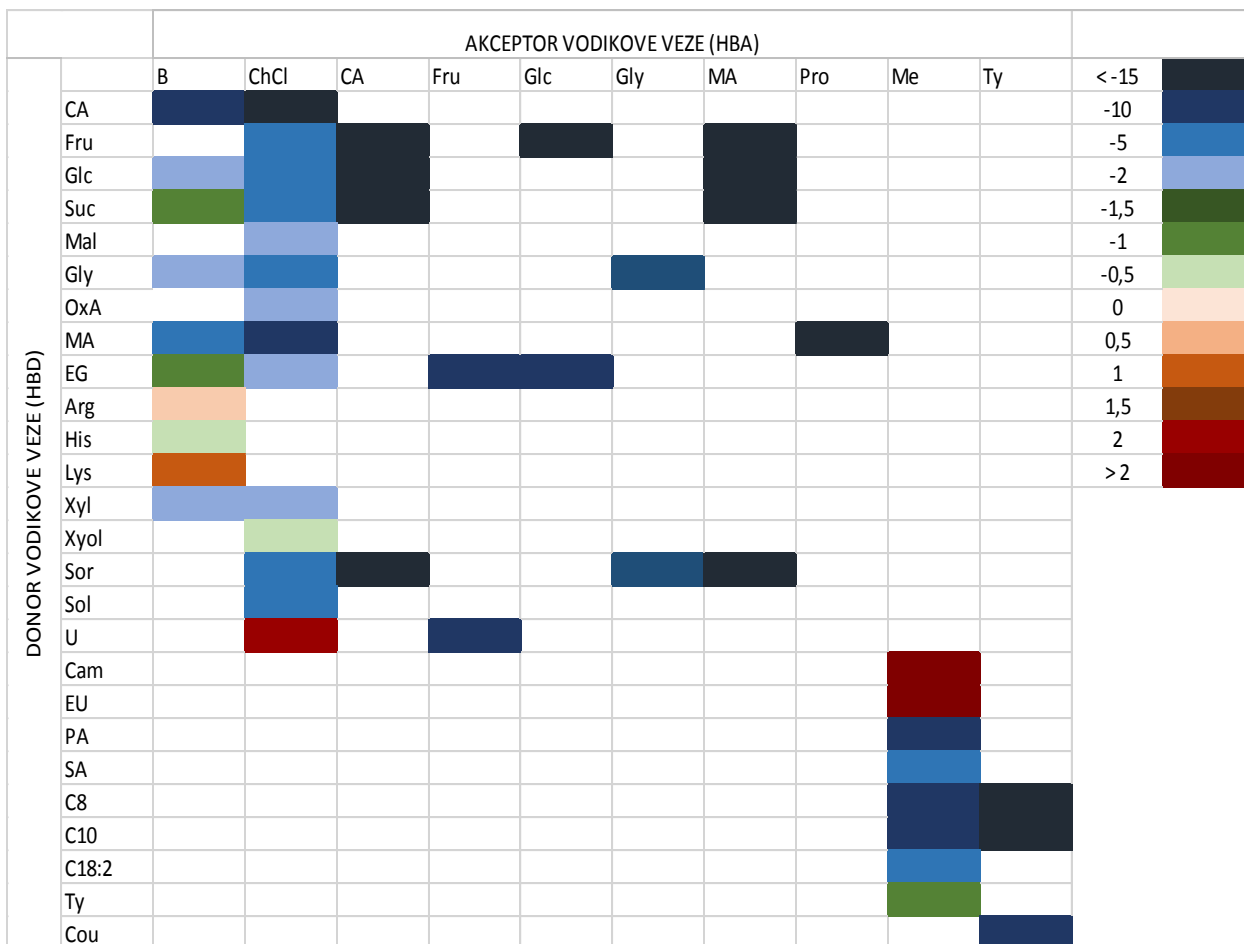
Kako bi se smanjila potreba za eksperimentalnim radom, odnosno ispitivanjem topljivosti API-ja u svakom pojedinačnom prirodnom niskotemperaturnom eutektičkom otapalu, korišten je računalni softver COSMO-RS. Određeni su logaritmi koeficijenta aktivnosti $\ln(\gamma)$ koji pokazuju kakva je topljivost ciprofloksacina u određenom NADES-u. Što je negativniji logaritam koeficijenta aktivnosti, to je veća topljivost ciprofloksacina u ispitivanom NADES-u. U tablici 3 prikazani su NADES-i i molarni odnosi njihovih komponenata, koji su korišteni u računalnoj predikciji topljivosti, a na slici 13 grafički su prikazani rezultati topljivosti ciprofloksacina u navedenim otapalima dobiveni korištenjem COSMO-RS sustava za predikciju topljivosti.

Tablica 3. Molarni omjeri komponenti NADES-a koji su korišteni za ispitivanje topljivosti ciprofloksacina pomoću programa COSMOtherm

NADES	MOLARNI OMJER	NADES	MOLARNI OMJER
B:CA	1:1	CA:Fru:Gly	1:1:1
B:Glc	1:1	CA:Glc	1:1
B:Gly	1:2	CA:Glc:Gly	1:1:1
B:OxA:Gly	1:2:1	CA:Sor	2:3
B:Ma	1:1	CA:Suc	1:1
B:Ma:Glc	1:1:1	Fru:EG	1:2
B:Ma:Pro	1:1:1	Fru:Glc:U	1:1:2
B:EG	1:1	Glc:EG	1:2
B:EG	1:2	Glc:Fru	1:1
B:Arg	1:1	Glc:Fru:EG	1:1:2
B:His	1:1	Gly:Glc	2:1
B:Lys	1:1	Gly:Sol	2:1
B:Xyl	1:1	Ma:Fru	1:1
B:Suc	4:1	Ma:Fru:Gly	1:1:1
ChCl:CA	2:1	Ma:Glc	1:1
ChCl:CA	1:1	Ma:Glc:Gly	1:1:1
ChCl:EG	1:2	Ma:Sor:Gly	1:1:2
ChCl:EG	2:1	Ma:Suc	2:1
ChCl:Fru	1:1	Pro:Glc:Gly	1:1:1
ChCl:Glc	2:1	Pro:Ma	1:1

Tablica 3. Molarni omjeri komponenti NADES-a koji su korišteni za ispitivanje topljivosti ciprofloksacina pomoću programa COSMOtherm- nastavak

ChCl:Glc	1:1	Suc:EG	1:2
ChCl:Gly	1:2	Suc:Glc:Fru	1:1:1
ChCh:Ma	1:1	Suc:Glc:U	1:1:2
ChCh:Mal	4:1	Sor:EG	1:2
ChCl:OxA	1:1	Sol:EG	1:2
ChCl:Pro:Ma	1:1:1	Xyl:EG	1:2
ChCl:Suc	2:1	Me:Cam	1:1
ChCl:Sol	1:1	Me:Cam	4:1
ChCl:Sol	2:3	Me:EU	1:1
ChCl:Sor	1:1	Me:PA	1:1
ChCl:U	1:2	Me:SA	4:1
ChCl:U	2:1	Me:C8	1:1
ChCl:U:EG	1:2:2	Me:C10	1:1
ChCl:U:Gly	1:2:2	Me:C18:2	1:1
ChCl:Xyl	2:1	Ty:Cou	3:2
ChCl:Xyol	5:2	Ty:C8	1:3
CA:Fru	1:1	Ty:C10	1:1



Slika 13. Grafički prikaz vrijednosti $\ln(\gamma)$ za ciprofloksacin u odabranim NADES-ima bez dodatka vode

Popis kratica za komponente otapala navedene u Tablici 3 i na Slici 13: 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.

Korištenje programa COSMO $therm$ omogućava sužavanje izbora NADES-a koji će se koristiti u daljnjem ispitivanju. Vrijednost logaritma koeficijenta aktivnosti $\ln(\gamma)$ određuje razinu topljivosti API-ja u određenom NADES-u. Rezultati predikcije korištenjem softverskog programa COSMO $therm$ pokazali su kako je ciprofloksacin potencijalno dobro topljiv u NADES-ima koji se sastoje od limunske ili jabučne kiseline kao akceptora vodikove veze, i različitih šećera poput glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze te sorboze, koji imaju ulogu donora vodikove veze (HBD). Analiza rezultata pokazuje kako bi ciprofloksacin mogao biti dobro topljiv i u hidrofobnim NADES-ima poput timola i oktanske kiseline ili timola i kumarina. Tijekom godina, većina istraživanja topljivosti aktivnih farmaceutskih tvari temeljila se na

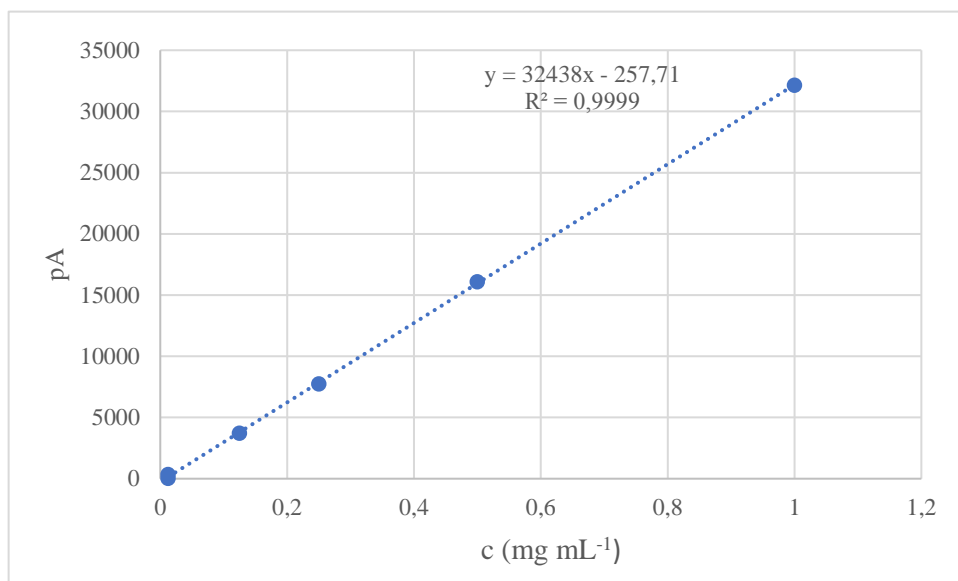
hidrofilnim NADES-ima, dok je koncept hidrofobnog eutektičkog otapala predstavljen 2015. u radu van Oscha i sur., koji su istraživali DES-ove pripremljene od dekanske kiseline kao donora te kvarternih amonijevih soli kao akceptora vodikove veze. U narednim godinama sve su češća istraživanja primjene hidrofobnih NADES-a u razvoju lijekova i drugih terapijskih pripravaka. U sklopu ovog rada odabrana su tri prirodna niskotemperaturna eutektična otapala s vrlo negativnim koeficijentom aktivnosti $\ln(\gamma)$ što ukazuje na potencijalno vrlo dobru topljivost ciprofloksacina. NADES-i odabrani i korišteni u eksperimentalnoj provjeri topljivosti su:

- Limunska kiselina: glukoza (CA:Glc) = 1:1, 10 % H₂O
- Timol: oktanska kiselina (Ty:C8) = 1:3, 0 % H₂O
- Glicerol: glukoza (Gly:Glc) = 2:1, 10 % H₂O

Prilikom pripreme NADES-a CA:Glc i Gly:Glc bilo je potrebno dodati 10 % vode jer nije moguće pripremiti navedena otapala bez prisutnosti vode. Otapalo Ty:C8 je hidrofobnog karaktera, stoga se njegova priprema provodi bez prisutnosti vode.

4.2. EKSPERIMENTALNA TOPLJIVOST CIPROFLOKSACINA U ODABRANIM PRIRODNIM NISKOTEMPERATURNIM EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Za učinkovito terapijsko djelovanje aktivne farmaceutske tvari nužna je dobra topljivost kako bi se postigla dovoljno visoka koncentracija API-ja koja omogućuje učinak na ciljnom mjestu djelovanja. Iz literaturnih podataka vidljivo je kako ciprofloksacin ima vrlo slabu topljivost u vodenom mediju te prema BSC sustavu pripada u klasu IV (slaba topljivost, slaba permeabilnost). Stoga je cilj rada bio pronaći alternativno otapalo u kojem će topljivost ciprofloksacina biti veća od topljivosti u referentnom otapalu, a istovremeno otapalo ne smije biti toksično, niti smije narušavati stabilnost i antimikrobnu aktivnost samog API-ja. Nakon odabira tri NADES-a pomoću softverskog programa *COSMOtherm*, provedena je eksperimentalna provjera topljivosti ciprofloksacina u tim otapalima. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti korištena je za identifikaciju i kvantifikaciju, odnosno određivanje koncentracije otopljenog ciprofloksacina u NADES-ima. Prethodno je bilo potrebno konstruirati baždarni pravac (slika 14) u kojem su površine pikova i masene koncentracije postavljene kao ovisne veličine.



Slika 14. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ciprofloksacina

Pomoću jednadžbe pravca izračunata je koncentracija otopljenog ciprofloksacina u odabranom NADES-u, a rezultati provedenog ispitivanja topljivosti prikazani su u tablici 4. Računalnim probirom NADES-a te eksperimentalnom potvrdom povećanja topljivosti ciprofloksacina u odnosu na referentno otapalo, odabran je NADES u kojem je potvrđena najveća topljivost ciprofloksacina. Odabrani NADES čine timol i oktanska kiselina (Ty:C8) u molarnom omjeru 1:3, a topljivost API-ja u navedenom NADES-u iznosi 399,6 mg mL⁻¹. U svim odabranim NADES-ima postignuta je veća topljivost ciprofloksacina u odnosu na topljivost u vodi, no najznačajnije povećanje zabilježeno je upravo u NADES-u Ty:C8, u kojem je topljivost 100 i više puta bolja nego u preostala dva ispitana NADES-a. Osim toga, ostala dva NADES-a karakterizira vrlo velika viskoznost, što otežava primjenu tih NADES-a te provođenje analiza stabilnosti, permeabilnosti te biološke aktivnosti. Važno je istaknuti kako su rezultati topljivosti dobiveni eksperimentalno u korelaciji s vrijednostima $\ln(\gamma)$, odnosno predviđenim rezultatima topljivosti dobivenim COSMO $therm$ sustavom za predikciju. To je potvrda vrijednosti i značaja COSMO-RS računalnog modela, čijom primjenom je uvelike smanjeno vrijeme potrebno za probir odgovarajućeg NADES-a te financijska i materijalna sredstva potrebna za odabir najoptimalnijeg otapala. Postignutim rezultatima zadovoljen je glavni cilj ovog rada, odnosno pronađeno je prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo u kojem je topljivost ispitivane tvari višestruko veća od topljivosti te tvari u vodi kao referentnom otapalu.

Tablica 4. Rezultati topljivosti ciprofloksacina u NADES-ima

PRIRODNO NISKOTEMPERATURNO EUTEKTIČNO OTAPALO	TOPLJIVOST CIPROFLOKSACINA (mg mL ⁻¹)
CA:Glc	3,627
Gly:Glc	3,509
Ty:C8	399,6

Komponente odabranog NADES-a izolirane su iz prirodnih izvora, a otapalo karakterizira hidrofobnost, stoga za njegovu pripremu nije potreban dodatak vode. Timol, odnosno 2-izopropil-5-metilfenol prema IUPAC nomenklaturi, pripada u skupinu monoterpenkih fenola koji su prisutni u eteričnim uljima biljaka iz porodice Labiateae: *Thymus vulgaris* (vrtni timijan, prava majčina dušica) i *Origanum vulgare* (vranilova trava). Timol je glavna djelatna tvar navedenih biljaka te ima višestruku primjenu u humanoj i veterinarskoj medicini. Timol ima širok antimikrobni spektar djelovanja prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, pri čemu se mehanizam djelovanja temelji na blokiranju staničnog disanja inhibicijom enzima koji sudjeluju u procesu respiracije, čime dolazi do smrti bakterije (Fizur i sur., 2017). Timol se koristi za liječenje različitih površinskih oboljenja kože, za inhalaciju prilikom respiratornih smetnji te u pripravcima za održavanje dentalne higijene. Osim za humanu upotrebu, farmaceutski pripravci na bazi timola koriste se i u veterinarskoj medicini za liječenje različitih respiratornih infekcija gornjih dišnih puteva, poput bronhitisa i pneumonija. Timol se može primjenjivati peroralno, topikalno i inhalatorno, u obliku suhih ekstrakata i čajeva, ili eteričnih ulja koji ulaze u sastav farmaceutskih oblika poput masti i sirupa. Timol je prirodna tvar, sigurna za upotrebu jer ima GRAS status (engl. *Generally Recognized as Safe*), stoga nije potrebno utvrđivati najveće dopuštene koncentracije rezidua ovog spoja. Unatoč tome, provedeno je više *in vitro* i *in vivo* studija učinka timola te je utvrđeno kako timol ne pokazuje kancerogeni ili mutageni učinak na stanice (Fizur i sur., 2017). Oktanska ili kaprilna kiselina je zasićena monokarboksilna ravnolančana kiselina. Bezbojna do svijetlo žuta tekućina neugodnog, užeglog mirisa. Prirodno je prisutna u mlijeku sisavaca te kao jedna od komponenti palminog i kokosovog ulja. Prirodni je produkt ljudskog metabolizma, a nastaje i kao produkt metabolizma *E. coli*. Kao i timol, oktanska kiselina posjeduje GRAS status čime je klasificirana kao netoksična i sigurna za upotrebu. Istraživanja su pokazala kako oktanska kiselina posjeduje antimikrobnu aktivnost prema bakterijama iz roda *Streptococcus* i *Staphylococcus aureus* te može djelovati kao alternativa ili dodatak antibioticima u tretmanu bakterijskih infekcija kod životinja te na taj način smanjiti upotrebu antibiotika prilikom

proizvodnje hrane (Nair i sur., 2005). Dakle, odabrani NADES timol:oktanska kiselina zadovoljava načela zelene kemije u pogledu netoksičnosti za zdravlje čovjeka i okoliša, nezapaljivosti i nehlapljivosti, a istovremeno je topljivost antibiotika u takvom otapalu stotruko povećana. U prethodnim istraživanjima pokazano je da pojedine komponente NADES-a, timol i oktanska kiselina, posjeduju vlastitu antimikrobnu aktivnost, stoga se ne očekuje narušavanje antimikrobnog djelovanja ciprofloksacina formiranjem navedenog API-DES sustava, što je i potvrđeno u zavšnom radu Nakić (2021).

Kao što je prethodno navedeno, ciprofloksacin je vrlo teško topljiv u vodi i organskim otapalima poput etanola i acetona. U radu koji su objavili Caco i sur. (2008) ispitana je topljivost čistog ciprofloksacina u vodi, etanolu, acetonu i propan-2-olu pri različitim temperaturama, a rezultati su prikazani u tablici 5.

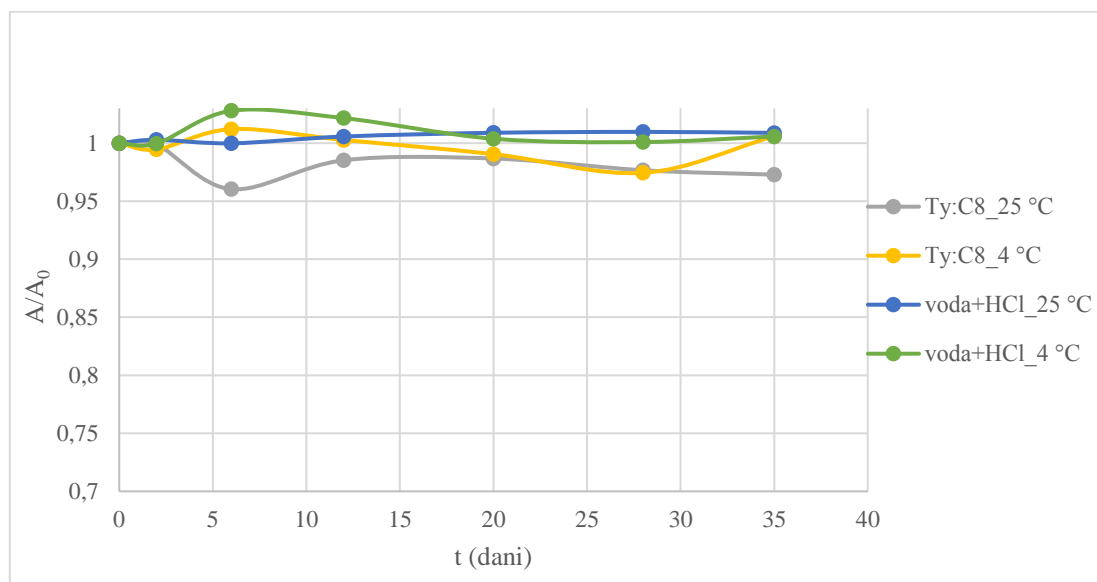
Tablica 5. Vrijednosti topljivosti čistog ciprofloksacina u vodi i različitim organskim otapalima (prema Caco i sur., 2008)

TOPLJIVOST CIPROFLOKSACINA (mg mL ⁻¹)				
otapalo/temperatura	T = 293,15 K	T = 303,15 K	T = 313,15 K	T = 323,15 K
voda	0,067	0,080	0,120	0,158
etanol	0,046	0,079	0,112	0,185
propan-2-ol	0,055	0,092	0,139	0,176
aceton	0,107	0,164	0,333	0,542

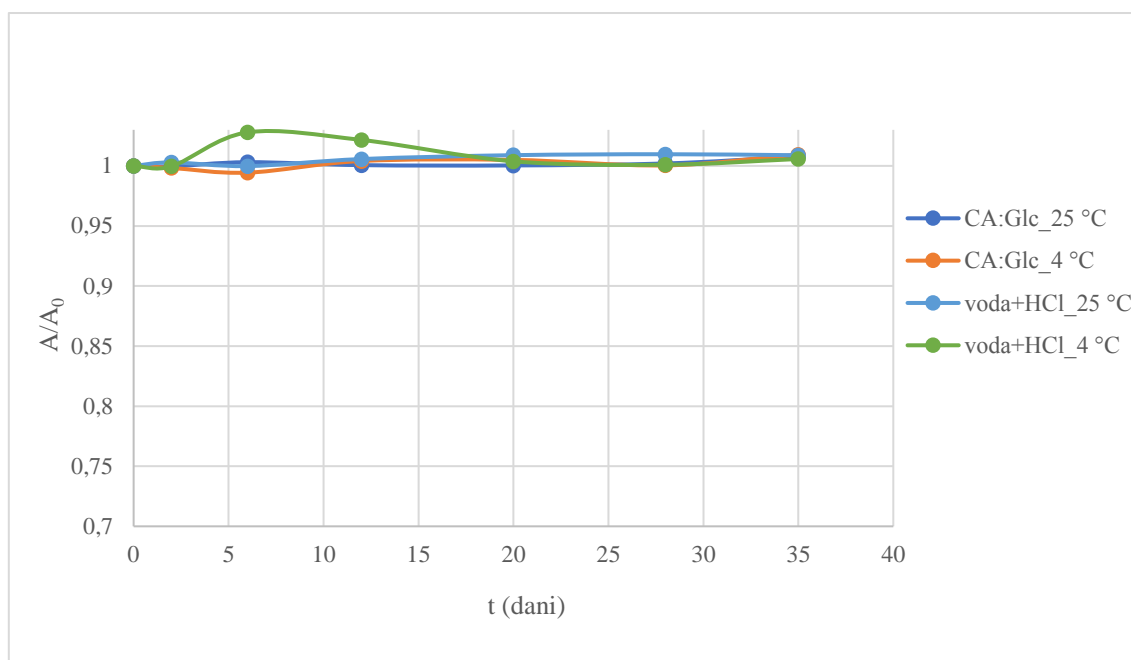
Iz rezultata je vidljivo kako povećanjem temperature dolazi do povećanja topljivosti API-ja u svim ispitivanim otapalima, međutim povećanje nije značajno. Ista skupina znanstvenika provela je ispitivanje topljivosti ciprofloksacina u obliku hidrokloridne soli (ciprofloksacin:HCl), u vodi i prethodno navedenim organskim otapalima, pri različitim temperaturama. Formulacijom ciprofloksacina u obliku hidrokloridne soli dolazi do značajnijeg povećanja topljivosti u odnosu na topljivost čistog ciprofloksacina. Najveća je topljivost postignuta je u vodi (30 mg mL⁻¹ do 91,5 mg mL⁻¹), a vrijednosti rastu povećanjem temperature, no maksimalno povećanje postignuto na taj način i dalje je znatno niže od topljivosti koja je ostvarena otapanjem ciprofloksacina u odabranom NADES-u, koji se time pokazao kao zaista superiorno otapalo za poboljšanje topljivosti navedenog API-ja.

4.3. STABILNOST FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA U PRIRODNOM NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU Ty:C8

Stabilnost aktivne farmaceutske tvari jedna je od ključnih karakteristika za učinkovito terapijsko djelovanje tvari. Praćenje stabilnosti nužno je kako bi se ispunile smjernice propisane od strane WHO-a koje nalažu potvrdu kvalitete aktivne farmaceutske tvari pod utjecajem okolišnih čimbenika (npr. temperatura, svjetlost) tijekom određenog vremenskog perioda. Karakteristika ciprofloksacina je dobra stabilnost u vodi, stoga je bilo nužno ne narušiti stabilnost tvari formulacijom API-DES sustava. Ispitivanje stabilnosti ciprofloksacina provedeno je u dva NADES-a u kojima je postignuta najveća topljivost te u referentnom otapalu, odnosno vodi uz dodatak 2 % (v/v) HCl-a. Stabilnost API-ja praćena je tijekom 35 dana, a uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi pri 25 °C i u hladnjaku na 4 °C na tamnom mjestu bez utjecaja svjetlosti. Kako bi empirijski provjerili utječe li formiranje API-DES sustava na stabilnost ciprofloksacina, mjerena je apsorbancija otopine ciprofloksacina u navedenim NADES-ima i referentnom otapalu u određenim vremenskim intervalima. Rezultati su prikazani na slici 15 i 16 u obliku grafa ovisnosti omjera apsorbancije (mjerene određeni dan kad je izuziman uzorak za praćenje stabilnosti i apsorbancije mjerene na početku pokusa), o vremenu unutar kojeg je ispitivanje stabilnosti provedeno.



Slika 15. Grafički prikaz stabilnosti ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8 (1:3) i referentnom otapalu (H₂O+HCl) pri 25 °C i 4 °C tijekom 35 dana



Slika 16. Grafički prikaz stabilnosti ciprofloksacina u NADES-u CA:Glc (1:1, 10 % H₂O) i referentnom otapalu (H₂O+HCl) pri 25 °C i 4°C tijekom 35 dana

Analizom rezultata može se uočiti kako formulacijom API-DES sustava ne dolazi do narušavanja stabilnosti djelatne tvari u odnosu na stabilnost tvari u referentnom otapalu. Stabilnost ciprofloksacina u referentnom otapalu (voda uz dodatak 2 % HCl-a) i NADES-u CA:Glc (1:1, +10 % H₂O) postojana je tijekom cijelog perioda ispitivanja, na obje temperature, dok je stabilnost ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8 (1:3) neznatno smanjena za ne više od 5 % u odnosu na početnu vrijednost, a nakon vremenskog perioda od 35 dana.

Hubicka i sur. (2008) objavili su rad u kojem su ispitivali stabilnost ciprofloksacina u vodi uz dodatak HCl-a, tijekom vremenskog perioda od 35 dana, pri temperaturama 22 °C, 50 °C, 90 °C. Pri najnižoj temperaturi u potpunosti je očuvana stabilnost tijekom cijelog perioda ispitivanja, dok je pri 50 °C i 90 °C zabilježen minimalni postotak degradacije nakon 96 sati. Nadalje, Kussmann i suradnici (2019) proveli su ispitivanje stabilnosti ciprofloksacina u pet različitih peritonealnih dijalitičkih tekućina koje se koriste prilikom provođenja dijalize, a čini ih vodena otopina šećera, soli i minerala. U svim ispitanim otapalima ciprofloksacin je zadržao stabilnost tijekom cijelog perioda ispitivanja (14 dana), pri temperaturama 6 °C i 37 °C kao i u vodi kao kontrolnom otapalu. U radu koji su objavili Pedro i sur. (2019) pokazano je kako određeni NADES-i osim što djeluju pozitivno na topljivost aktivne tvari, mogu djelovati pozitivno i na kemijsku stabilnost istih. Rezultati dobiveni u ovom radu u skladu su s prethodno provedenim istraživanjima te dostupnim literaturnim podacima o stabilnosti ciprofloksacina. U

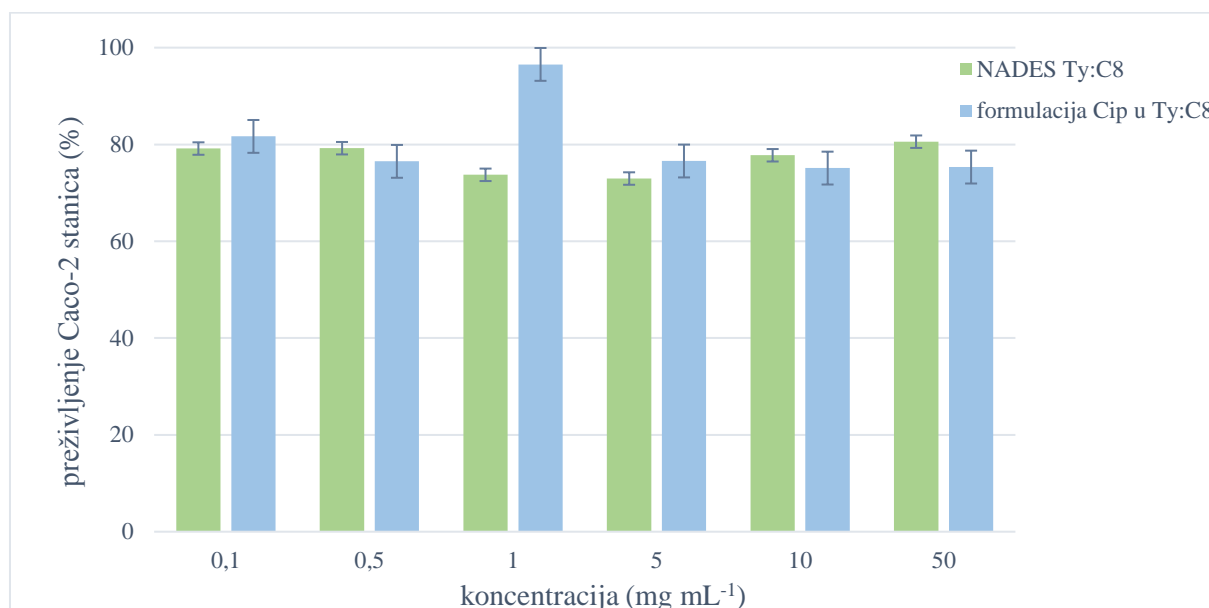
konačnici možemo zaključiti kako je formulacija API-DES sustava kojeg čine ciprofloksacin kao API te Ty:C8 kao NADES, odličan izbor za nastavak istraživanja jer zadovoljava uvjete poboljšanja topljivosti API-ja, a pritom ne narušava stabilnost istog.

4.4. IN VITRO BIOLOŠKA AKTIVNOST FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA U NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU Ty:C8

Određivanje *in vitro* biološke aktivnosti pojedine farmaceutske tvari prvi je korak prilikom razvoja i implementacije iste u klinička istraživanja na pacijentima. Iako iz same definicije NADES-a proizlazi da su prirodna niskotemperaturna eutektička otapala nastala iz prirodnih komponenti *a priori* netoksična, prilikom njihove primjene nužno je odrediti toksikološki profil svake komponente u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. U istraživanju koje su proveli Hayyan i sur. (2013a) pokazano je kako određena prirodna niskotemperaturna eutektička otapala imaju veću toksičnost od vodene otopine pojedinih komponenti otapala. Ovaj sinergistički utjecaj eutektičkog otapala objašnjen je delokalizacijom naboja do kojeg dolazi zbog stvaranja vodikovih veza između organske soli i donora vodikove veze. Takvi rezultati dovode do zaključka kako nastanak vodikove veze prilikom formiranja eutektičkog otapala utječe ne samo na fizikalna svojstva čistih komponenti, već i na kemijsku strukturu spoja (Hayyan i sur., 2013b). Stoga se pretpostavka o netoksičnosti prirodnih eutektičkih otapala pokazala samo djelomično točnom te je potrebno provesti detaljnu analizu citotoksičnosti NADES-a/THEDES-a i pojedinih komponenti koje ih čine. Što se tiče biološke aktivnosti ciprofloksacina, osim antimikrobnog učinka, znanstvenici su pokazali kako ovaj antibiotik može imati i potencijalno anti-tumorsko djelovanje što bi se moglo iskoristiti prilikom liječenja različitih oblika karcinoma.

U sklopu ovog rada provedeno je *in vitro* ispitivanje utjecaja formulacije ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8 i samog NADES-a Ty:C8 na tumorsku staničnu liniju Caco-2. Nakon naciepljivanja stanica u Petrijeve zdjelice te 24-satne inkubacije, stanice su tretirane prethodno pripremljenim formulacijama API-DES Ty:C8:Cip u rasponu koncentracija od 0,1 mg mL⁻¹ do 50 mg mL⁻¹. Formulacije za tretman stanica pripremljene su iz ishodne API-DES formulacije u kojoj je postignuta maksimalna topljivost ciprofloksacina u koncentraciji 399,6 mg mL⁻¹. Formulacija je sterilno profiltrirana, a zatim su napravljena razrjeđenja ishodne formulacije pomoću medija za uzgoj sa 10 % (v/v) FBS-a, također u sterilnim uvjetima. Osim formulacije, stanice su tretirane i ekvivalentnim volumnim udjelima čistog NADES-a bez aktivne

farmaceutske tvari. Na slici 17 prikazani su rezultati preživljenja Caco-2 stanične linije nakon tretmana različitim koncentracijama ciprofloksacina u API-DES formulaciji i NADES-om Ty:C8.



Slika 17. Preživljenje Caco-2 stanične linije nakon tretmana API-DES formulacijom Ty:C8:Cip i čistim NADES-om Ty:C8

Nakon 72 sata tretmana Caco-2 stanica s API:DES formulacijom Ty:C8:Cip u rasponu koncentracija 0,1 mg mL⁻¹ do 50 mg mL⁻¹, vidljivo je smanjenje preživljenja stanica za 20-tak %, koje nije ovisno o primjenjenoj dozi, odnosno koncentraciji ciprofloksacina kojom su Caco-2 stanice tretirane. Maksimalan inhibitorski učinak prisutan je kod najveće ispitivane koncentracije ciprofloksacina u API-DES formulaciji (50 mg mL⁻¹) pri kojoj preživljenje iznosi 75,32 %. Također, ispitan je utjecaj samog NADES-a Ty:C8, bez prisutnosti aktivne tvari. Analizom rezultata vidljivo je kako eutektičko otapalo Ty:C8 otprilike jednako djeluje na preživljenje Caco-2 stanica kao i ispitana formulacija. Najveći inhibitorski učinak na rast stanica vidljiv je pri koncentraciji 5 mg mL⁻¹, s preživljenjem od 72,96 %. Inhibitorsko djelovanje ciprofloksacina na rast stanica karcinoma mjehura te poticanje apoptoze prikazano je u radu koji su objavili Ebisuno i sur. (1997). Nekoliko godina kasnije Herold i sur. (2002) proveli su istraživanje utjecaja ciprofloksacina u rasponu koncentracija 0,1 mg mL⁻¹ do 0,5 mg mL⁻¹ na nekoliko tumorskih kolorektalnih staničnih linija. Rezultati su pokazali kako ciprofloksacin djeluje inhibitorski na rast te potiče apoptozu stanica, a procesi su ovisni o dozi i vremenu izlaganja stanica ispitivanoj tvari. Zaustavljanje staničnog ciklusa posredovano je inhibicijom sinteze DNA te oštećenjem mitohondrija što dovodi do apoptoze i smrti stanice. Nadalje, timol, koji je jedna od komponenti korištenog NADES-a, uz svoja antimikrobna svojstva pokazuje i

potencijal antitumorskog djelovanja prema različitim tumorskim staničnim linijama kao što su MCF-7, HepG2 i HeL-a. Mehanizam antitumorskog djelovanja timola očituje se u indukciji apoptoze, inhibiciji proliferacije i angiogeneze te moduliranju aktivnosti tumorskih metaboličkih enzima (Fizur i sur., 2017; Horvathova i sur., 2014). Unatoč literaturnim navodima koji ukazuju na antitumorski potencijal ciprofloksacina i timola kao pojedinačnih komponenti, na staničnim linijama karcinoma mjehura, debelog crijeva, MCF-7 staničnoj liniji karcinoma dojke te HepG2 stanicama jetre, u ovom eksperimentu nije zabilježeno značajnije citotoksično djelovanje NADES-a Ty:C8 te API-DES formulacije Ty:C8:Cip na tumorsku staničnu liniju debelog crijeva Caco-2. No obzirom na cilj ovog rada, rezultati niske citotoksičnosti ispitivane formulacije i NADES-a spram Caco-2 stanica su zadovoljavajući jer je naglasak na razvoju poboljšane formulacije ciprofloksacina koja bi se prvenstveno koristila za liječenje bakterijskih infekcija.

Osim biološke aktivnosti djelovanja na Caco-2 stanice, bilo je potrebno ispitati antimikrobnu aktivnost dobivenih API-DES formulacija te usporediti rezultate s antimikrobnom aktivnošću čistog ciprofloksacina na nekoliko bakterijskih sojeva. Ispitivanje je provedeno kao dio završnog rada studentice Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Mirne Nakić, u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica. Cilj je bio istražiti utječe li tvorba API-DES sustava Ty:C8:Cip na antimikrobnu aktivnost ciprofloksacina. Uzorci za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljeni su u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije. Korišteni test-mikroorganizmi su bakterije *Escherichia coli* 3014, *Staphylococcus aureus* 3048 te *Pseudomonas aeruginosa* 3024, a ispitivanje je provedeno disk-difuzijskom metodom. Uzorci komponenti koji tvore API-DES formulaciju te sami API-DES sustav ispitani su u tri koncentracije: 0,1 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹ i 1 mg mL⁻¹.

Rezultati su pokazali kako timol ima antibakterijsko djelovanje prema *Staphylococcus aureus* 3048 u koncentracijama 0,1 mg mL⁻¹ i 1 mg mL⁻¹ te prema *P. aeruginosa* 3024 u svim ispitivanim koncentracijama. Nadalje, NADES Ty:C8 pokazao je antibakterijski učinak prema *Escherichia coli* 3014, što ukazuje na mogućnost sinergističkog antimikrobnog učinka oktanske kiseline i timola, jer nije uočena inhibicija rasta bakterije u prisutnosti pojedinih komponenti NADES-a. Sa stajališta pripreme poboljšane formulacije ciprofloksacina primjenom NADES-a najvažnije je istaknuti da je vidljivo antimikrobno djelovanje formulacije ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8 na sve test-mikroorganizme, što je potvrda da je ovakvom formulacijom antibiotika sačuvana antimikrobna aktivnost ciprofloksacina (Nakić, 2021).

4.5. PERMEABILNOST FORMULACIJE CIPROFLOKSACINA U NISKOTEMPERATURNOM EUTEKTIČKOM OTAPALU Ty:C8 KROZ UMJETNU MEMBRANU

Permeabilnost tvari kroz intestinalni epitel ključna je karakteristika koja određuje razinu apsorpcije i biodostupnosti lijeka na ciljnom mjestu djelovanja. Danas postoje različite standardizirane *in vitro* i *in vivo* metode određivanja permeabilnosti tvari u farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Uglavnom se radi o *in vitro* metodama koje se dijele na stanične i nestanične. Stanične metode uključuju primjenu standardizirane Caco-2 stanične linije koje u *in vitro* uvjetima oponašaju epitel gastrointestinalnog sustava. Stanični modeli imaju mnogo prednosti, poput velike sličnosti sa staničnom morfologijom gastrointestinalnog sustava te ekspresije različitih proteina koji imaju ulogu transportnih sustava. Međutim, takav način istraživanja permeabilnosti API-ja je često dugotrajan, ali i skup jer zahtjeva kultivaciju i održavanje stanica. Kao alternativa pojavili su se nestanični modeli bazirani na umjetnim membranama. Upotreba umjetnih membrana kao modela za simulaciju membranskih sustava gastrointestinalnog trakta, u cilju procjene permeabilnosti i apsorpcije API-ja, temelji se na činjenici da se većina tvari apsorbira djelomičnim ili potpunim pasivnim transportom, odnosno difuzijom. Na pasivnu difuziju uveliko utječu strukturne značajke molekule, lipofilnost te molekulska masa. Stoga korelacija permeabilnosti kroz umjetnu membranu, koja oponaša pasivni unutarstanični transport, daje dobru smjernicu o apsorpcijskom potencijalu djelatne tvari (Zhu i sur., 2002).

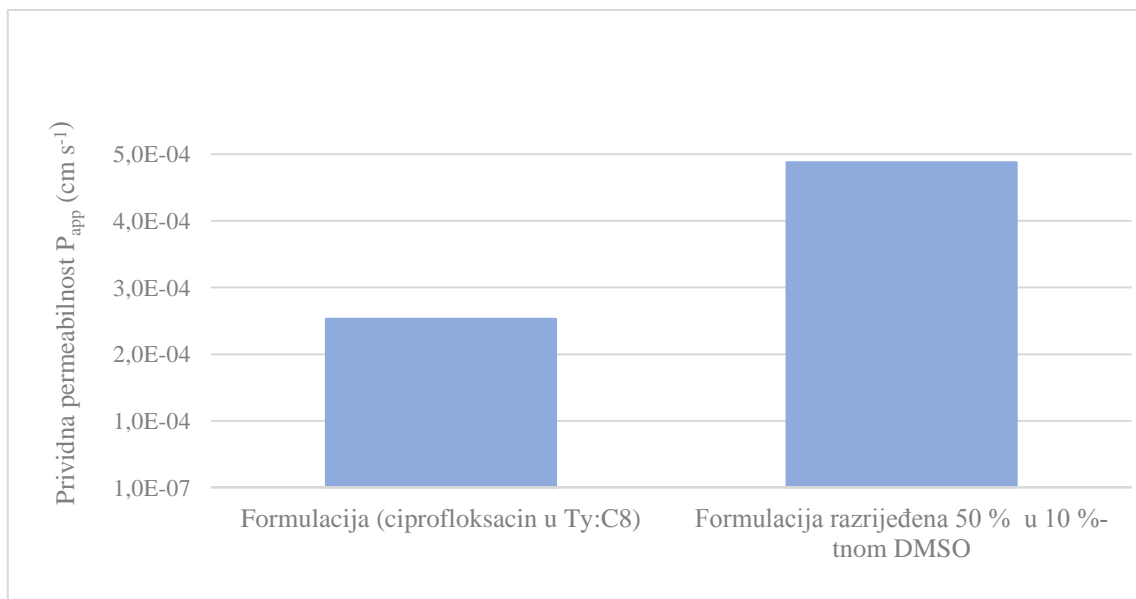
Tijekom godina razvijene su različite izvedenice nestaničnih modela za određivanje permeabilnosti lijekova, a najpoznatiji su test propusnosti kroz umjetnu membranu (engl. *Parallel artificial membrane permeability assay*, PAMPA) i metoda ispitivanja propusnosti spojeva kroz fosfolipidne vezikule (engl. *Phospholipid vesicle-based permeation assay*, PVPA). Ovakvi modeli prikladni su za ispitivanje pasivnog načina transporta, koji se prvenstveno odnosi na lijekove teško topljive u vodi i staničnim tekućinama. Nestanične metode su relativno jeftine te je moguć veći kapacitet protoka u odnosu na stanične metode za ispitivanje permeabilnosti (Buckley i sur., 2012).

PAMPA test predstavlja jednostavan, brz te široko dostupan model za rani *screening* apsorpcije i distribucije novih kemijskih molekula, imitirajući pritom staničnu membranu umjetnim membranama sastavljenim od filtera i lipida. Metodu su predstavili Kansy i suradnici daleke 1998. a do danas je višestruko modificirana pa tako postoje različite izvedenice koje se razlikuju ovisno o sastavu lipida i pufera. Primjerice, *GIT-PAMPA* je test kojim se pokušava predvidjeti apsorpcija tvari u gastrointestinalnom traktu. *BBB-PAMPA* metodom određuje se

permeabilnost API-ja kroz krvno-moždanu barijeru, dok se *Skin-PAMPA* koristi za predikciju transdermalne permeabilnosti lijeka (Bujard i sur., 2017). Danas je PAMPA test jedan od glavnih metoda za predviđanje permeabilnosti tvari u farmaceutskoj industriji, prvenstveno zahvaljujući brzini i mogućnosti analiziranja više tvari istovremeno.

Glavni nedostaci ovakvog pristupa ispitivanja permeabilnosti je nemogućnost istraživanja permeabilnosti spojeva aktivnim transportom zbog nedostatka transportnih proteina kao i nemogućnost analize permeabilnosti hidrofилnih spojeva male molekulske mase. Nadalje, rezultati permeabilnosti za neki spoj mogu se razlikovati ovisno o kombinacijama i koncentracijama lipida koji čine umjetnu membranu, stoga je potrebno optimizirati komponente te udjele lipida kako bi se postigla što bolja korelacija vrijednosti permeabilnosti određena u *in vivo* uvjetima. Također, u radu koji su objavili Schmidt i Lynch (2003) navodi se kako je potrebno optimizirati i vrijeme provođenja eksperimenta. Primjerice, kod nisko permeabilnih spojeva, vrijednost permeabilnosti se značajno razlikuje nakon 4 i 48 sati provođenja PAMPA testa, dok se kod visoko i srednje permeabilnih spojeva vrijednosti nisu mnogo razlikovale. Prema BCS sustavu klasifikacije lijekova ciprofloksacin se ubraja u skupinu IV koju karakterizira slaba topljivost i niska permeabilnost kroz stanične membrane. Prema smjernicama FDA i WHO-a određeni lijek može se klasificirati kao visoko permeabilan ako je 85-90 % frakcije lijeka apsorbirano kroz membrane (WHO, 2005).

U sklopu ovog rada ispitana je permeabilnost formulacije ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8 u koncentraciji 5 mg mL^{-1} te permeabilnost formulacije razrijeđene u omjeru 1:1 s 10 % (v/v) DMSO u PBS-u kako bi se utvrdio utjecaj otapala na permeabilnost aktivne farmaceutske tvari. Eksperimentalna provedba metode te obrada podataka izvršena je prema protokolu objavljenom u radu Nožinić i sur. (2010), a rezultati su prikazani u obliku prividne permeabilnosti P_{app} (cm s^{-1}). Koncentracija ciprofloksacina u akceptorskoj jažici određena je pomoću HPLC metode prema prethodno opisanom protokolu. Postupak provedbe PAMPA testa naveden je u podpoglavlju 3.2. metoda rada, a rezultati su prikazani na slici 18.



Slika 18. Prividna permeabilnost ciprofoksacina unutar formulacije s NADES-om Ty:C8 određena PAMPA testom

Jedan od ciljeva ovog rada bio je razvoj formulacije ciprofloksacina koja će imati bolju permeabilnost aktivne tvari u odnosu na permeabilnost u vodi. Analizom rezultata provedene PAMPA metode vidljivo je kako je formiranjem API-DES sustava između ciprofloksacina i Ty:C8 došlo do značajnog povećanja permeabilnosti API-ja. Vrijednost permeabilnosti ciprofloksacina (P_{app}) unutar formulacije s NADES-om Ty:C8 iznosi $253,33 \pm 37,24 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, dok je prividna permeabilnost formulacije razrijeđene 50 % sa 10 % DMSO u PBS-u $488,10 \times 10^{-6} \pm 11,5 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$. U radu koji su objavili Bermejo i sur. (2004) ispitana je permeabilnost ciprofloksacina PAMPA metodom, a rezultati pokazuju kako je vrijednost efektivne permeabilnosti ciprofloksacina $2,38 \pm 0,18 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ pri pH 7. Neki noviji znanstveni radovi pokazuju kako je permeabilnost ciprofloksacina manja od $1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. Primjerice, u radu koji su objavili Mesallati i sur. (2017) permeabilnost ciprofloksacina određena je PAMPA metodom, a vrijednost iste je $0,56 \pm 0,06 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. Sugano (2012) navodi kako se svi spojevi s prividnom permeabilnošću manjom od $1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ klasificiraju kao slabo permeabilni. Rezultati objavljeni u radu Mesallati i sur. (2017) potvrđuju ispravnu klasifikaciju ciprofloksacina kao slabo topljivog API-ja.

U radu koji je objavila Volpe (2004) ispitana je permeabilnost nekoliko fluorokinolonskih antibiotika, među kojima je i ciprofloksacin, pomoću stanične Caco-2 metode. Prema rezultatima ciprofloksacin je smješten u skupinu slabo permeabilnih fluorokinolona jer razina permeabilnosti ovog API-ja pri koncentraciji $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ iznosi $0,42$

$\pm 0,06 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. Fluorokinoloni levofloksacin i ofloksacin smatraju se visoko permeabilnim s vrijednošću permeabilnosti većom od $10 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. Procjena razine permeabilnosti provodi se u odnosu na standarde poznate permeabilnosti.

Kao objašnjenje slabe permeabilnosti navodi se činjenica da je ciprofloksacin pri neutralnom pH u obliku *zwitter-iona* što mu otežava difuziju kroz lipidne membrane, za razliku od neioniziranih molekula koje vrlo lako difundiraju. *Zwitter*-ionski oblik molekule ciprofloksacina sadrži pozitivno nabijenu amino skupinu u piperizinskom prstenu te negativno nabijenu karboksilnu skupinu. U vodenim otopinama *zwitter* molekule ciprofloksacina ulaze u međusobne interakcije „glava-rep“ što rezultira smanjenjem elektrostatskog potencijala. Takve strukture su dodatno stabilizirane vodikovim vezama s molekulama vode, što dodatno otežava pasivni transport kroz membrane. Međutim, smatra se kako se velik dio *zwitter* molekula transformira u neioniziran oblik u blizini membrane, zahvaljujući transportu protona, čime se omogućava pasivna difuzija (Mesallati i sur., 2017). Bermejo i sur. (2004) proveli su usporedbu permeabilnosti fluorokinolona pomoću PAMPA metode, Caco-2 stanične metode te *in vivo* metode na laboratorijskim štakorima. Dobiveni rezultati za ciprofloksacin pokazuju vrlo dobru korelaciju između vrijednosti dobivenih PAMPA testom te *in vivo* ispitivanjem ($r^2 = 0,87$), dok je korelacija između Caco-2 i PAMPA testa nešto niža ($r^2 = 0,82$).

U radu Dahan i Miller (2012) navodi se problematika povezanosti topljivosti i permeabilnosti tvari. Naime, zahvaljujući različitim tehnikama koje se koriste prilikom razvoja formulacija tvari poboljšane topljivosti, omogućeno je poboljšanje topljivosti tvari, no istovremeno se vrlo često narušava permeabilnost tvari jer dolazi do smanjenja lipofilnosti. Lipofilnost je značajno fizikalno-kemijsko svojstvo tvari koje označava sposobnost tvari da se otapa u nepolarnim otapalima, uljima i mastima, a utječe na razinu permeabilnosti tvari kroz membranu. Efikasna apsorpcija i zadovoljavajuća biološka raspoloživost ovise o ravnoteži između lipofilnosti i hidrofilnosti spoja. Lipofilnost lijeka je u obrnuto proporcionalnom odnosu prema topljivosti, odnosno veća lipofilnost dovodi do niže topljivosti u vodenom mediju. Viša razina lipofilnosti omogućuje jače interakcije spoja s lipidnim komponentama stanične membrane, a utječe i na dulje vrijeme zadržavanja u tkivu, međutim jako hidrofobni lijekovi mogu imati nisku bioraspoloživost zbog njihove apsorpcije u masne čestice u crijevima, što utječe na smanjenje udjela slobodnog lijeka (Czyrski, 2021).

Prilikom klasifikacije lijeka, važno je odrediti lipofilnost tog lijeka jer to svojstvo utječe na farmakokinetiku i farmakodinamiku, odnosno na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje lijeka. Uobičajeno se izražava logaritmom koeficijenta raspodjele ($\log P$) kojim se opisuju ravnoteža raspodjele ispitivanog spoja između organskog otapala oktanol i vode.

Pozitivna vrijednost $\log P$ označava veći afinitet spoja za lipidnu fazu, dok negativna vrijednost označava relativni afinitet za vodu. Iz literaturnih podataka vidljivo je kako koeficijent raspodjele za ciprofloksacin pri pH 7 manji od 1 te iznosi 0,509 (Sharma i sur., 2010; Czyrski i sur. 2021). S obzirom na navedenu vrijednost koeficijenta raspodjele, ciprofloksacin se smatra blago hidrofilnim, međutim nedovoljno topljivim u vodenom mediju. Razvojem formulacije ciprofloksacina u hidrofobnom NADES-u Ty:C8 došlo je do značajnog povećanja permeabilnosti. Razlog tome mogao bi biti u povećanju lipofilnosti API-ja zbog utjecaja hidrofobnog otapala.

U konačnici, možemo zaključiti kako je razvoj formulacije ciprofloksacina primjenom NADES-a kao novih otapala koji se istražuju za farmaceutsku primjenu bio uspješan jer smo istovremeno postigli značajno, otprilike za 100 puta, povećanje topljivosti i permeabilnosti aktivne tvari, uz istovremeno očuvanje stabilnosti i antimikrobnog djelovanja lijeka.

5. ZAKLJUČCI

1. Primjenom računalnog programa COSMO $therm$ predviđena je topljivost ciprofloksacina u prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima. Pretpostavljeno je da je ciprofloksacin dobro topljiv u NADES-ima koji se sastoje od limunske ili jabučne kiseline i različitih šećera poput glukoze, fruktoze, saharoze. Osim u hidrofilnim NADES-ima, ciprofloksacin bi mogao biti dobro topljiv i u hidrofobnim NADES-ima poput timola i oktanske kiseline ili timola i kumarina.
2. Odabrana su i pripremljena tri NADES-a u kojima je predviđena najveća topljivost ciprofloksacina. Rezultati topljivosti dobiveni eksperimentalno u korelaciji s vrijednostima $\ln(\gamma)$, odnosno predviđenim rezultatima topljivosti dobivenim COSMO $therm$ sustavom za predikciju. Takvim pristupom je u kratkom vremenu i uz manji utrošak financijskih sredstava pronađeno prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo u kojem je topljivost ciprofloksacina oko 100 puta veća od topljivosti u vodi kao referentnom otapalu.
3. Formiranjem API-DES sustava kojeg čini ciprofloksacin te NADES Ty:C8 ne dolazi do značajnijeg pada stabilnosti djelatne tvari u odnosu na stabilnost API-ja u referentnom otapalu (voda uz dodatak 2 % HCl-a). Stabilnost je postojana tijekom perioda od 35 dana, na obje temperature.
4. Formulacija ciprofloksacina u NADES-u timol:oktanska kiselina djeluje blago inhibitorno na rast Caco-2 stanica pri svim ispitivanim koncentracijama, međutim nije vidljiva korelacija između inhibitornog učinka i koncentracije ciprofloksacina kojom su stanice tretirane. Relativno niska citotoksičnost ispitivane formulacije i NADES-a spram Caco-2 stanica je ohrabrujući rezultat, jer je naglasak na razvoju poboljšane formulacije ciprofloksacina koja bi se prvenstveno koristila za *per os* primjenu prilikom liječenja bakterijskih infekcija.
5. Permeabilnost formulacije ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8 određena je PAMPA metodom, pri čemu je zapaženo značajno povećanje permeabilnosti API-ja u odnosu na permeabilnost u vodi, čija je vrijednost poznata iz literaturnih podataka. Međutim, za konačnu potvrdu poboljšanja permeabilnosti ciprofloksacina formiranjem API-

DES sustava s NADES-om Ty:C8 svakako je potrebno provesti staničnu te *in vivo* metodu ispitivanja permeabilnosti.

6. Formulacijom ciprofloksacina u NADES-u Ty:C8 ostvareno je iznimo značajno poboljšanje topljivosti i permeabilnosti ciprofloksacina, uz istovremeno očuvanje stabilnosti i antimikrobne aktivnosti djelatne tvari. S obzirom da odabrani NADES zadovoljava kriterije netoksičnosti i biokompatibilnosti, uz sva navedena poboljšanja karakteristika aktivne tvari, ovakav pristup odabira i primjene NADES-a kao otapala za API-je je vrlo obećavajući te se može očekivati farmaceutska primjena takve formulacije u većem mjerilu u budućnosti.

6. LITERATURA

Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed R (2004) Deep eutectic solvents formed between cholin chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc* **29**, 9142-9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>

Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N (2014) Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochem* **53**, 1565–1574. <https://dx.doi.org/10.1021%2Fbi5000564>

Andriole VT (2005) The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis* **41**, 113–119. <https://doi.org/10.1086/428051>

Antonio DD, Piccolomini R, Iacone A, Fioritoni G, Parruti G, Betti S, i sur. (1994) Comparison of ciprofloxacin, ofloxacin and pefloxacin for the prevention of the bacterial infection in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* **33**, 837–844. <https://doi.org/10.1093/jac/33.4.837>

Aroso IM, Craveiro R, Rocha Â, Dionísio M, Barreiros S, Reis RL, Paiva A, Duarte ARC (2015) Design of controlled release systems for THEDES - Therapeutic deep eutectic solvents, using supercritical fluid technology. *Int J Pharm* **492**, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.038>

Assali M, Joulani M, Awwad R, Assad M, Almasri M, Kittana N, Zaid A (2016) Facile Synthesis of Ciprofloxacin Prodrug Analogues to Improve its Water Solubility and Antibacterial Activity. *Med Chem* **6**, 1132 – 1135. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201600091>

Ashtiani NH, Tadjarodi A, Zare-Dorabei R (2021) Low molecular weight chitosan-cyanocobalamin nanoparticles for controlled delivery of ciprofloxacin: Preparation and evaluation. *Int J Biol Macromol* **176**, 459-467. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.093>

Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK (2014) Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review. *J Pharm Anal* **4**, 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>

Blondeau JM (1999) Expanded Activity and Utility of the New Fluoroquinolones: A Review . *Clin Ther* **21**, 3-40. [https://doi.org/10.1016/s0149-2918\(00\)88266-1](https://doi.org/10.1016/s0149-2918(00)88266-1)

Buckley ST, Fischer SM, Fricker G, Brandl M (2012) In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. *Eur J Pharm Sci* **45**, 235-250. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.12.007>

Bujard A, Petit C, Carrupt PA, Rudaz S, Schappler J (2017) HDM-PAMPA to predict gastrointestinal absorption, binding percentage, equilibrium and kinetics constants with human serum albumin and using 2 end-point measurements. *Eur J Pharm Sci* **97**, 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.11.001>

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

Clark JH (2016) Green and Sustainable Chemistry: An Introduction. U: Summerton L, Sneddon HF, Jones LC, Clark JH (ured.) Green and Sustainable Medicinal Chemistry: Methods, Tools and Strategies for the 21st Century Pharmaceutical Industry, 1 izd., Royal Society of Chemistry Publishing, New York, str. 1-11.

Creative Bioarray (2021) Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA). [online] <https://www.creative-bioarray.com/Services/pampa-assay.htm> Pristupljeno 15. rujna 2021.

Cseri L, Razali M, Pogany P, Szekely B (2018) Organic Solvents in Sustainable Synthesis and Engineering. U: Török B, Dransfield T (ured.) Green Chemistry, 1 izd., Elsevier Inc., str. 513-553.

Cysewski P, Jelinski P, Cymerman T, Przybyłek M (2021) Solvent Screening for Solubility Enhancement of Theophylline in Neat, Binary and Ternary NADES Solvents: New Measurements and Ensemble Machine Learning. *Int J Mol Sci* **22**, 7347. <https://doi.org/10.3390/ijms22147347>

Czyrski A (2021) The spectrophotometric determination of lipophilicity and dissociation constants of ciprofloxacin and levofloxacin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **265**, 120343. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120343>

Dahan A, Miller J (2012) The Solubility–Permeability Interplay and Its Implications in Formulation Design and Development for Poorly Soluble Drugs. *AAPS J* **14**, 244-251. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9337-6>

Dai Y, Van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013a) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **766**, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>

D'Antonio D, Piccolomini R, Iacone A, Fioritoni G, Parruti G, Betti S, Quaglietta AM, Accorsi P, Dell'Isola M, Favalli M (1994) Comparison of ciprofloxacin, ofloxacin and pefloxacin for the prevention of the bacterial infection in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* **33**, 837-844. <https://doi.org/10.1093/jac/33.4.837>

De Almeida MV, Saraiva MF, De Souza MVN, Da Costa CF, Vincente FRC, Lourenco MC (2007) Synthesis and antitubercular activity of lipophilic moxifloxacin and gatifloxacin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 5661–5664. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.07.073>

Duarte ARC, Ferreira ASD, Barreiros S, Cabrita E, Reis RL, Paiva A (2017) A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *Eur J Pharm Biopharm* **114**, 296-304. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.02.003>

Ebisuno S, Inagaki T, Kohjimoto Y, Ohkawa T (1997) The cytotoxic effect of fleroxacin and ciprofloxacin on transitional cell carcinoma in vitro. *Cancer* **80**, 2263-2267. PMID: 9404703.

Emmerson AM, Jones AM (2003) The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* **51**, 13-20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg208>

Farhi D, Dupin N (2008) The rise of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Swiss Med Wkly* **138**, 223–225. PMID: 18431696

Fizur NM, Javed H, Al Tae H, Sheikh A, Ojha SK (2017) Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front Pharmacol* **8**, 380. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00380>

Florindo C, Oliveira FS, Rebelo LPN, Fernandes AM, Marrucho IM (2014) Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustain Chem Eng* **2**, 2416– 2425. <https://doi.org/10.1021/sc500439w>

Gorke JT (2010) Application of deep eutectic solvents and ionic liquids to hydrolase-catalyzed reactions (doktorska disertacija), Sveučilište u Minnesoti, Minnesota SAD

Hayyan M, Hashim MA, Hayyan A, Al-Saadi MA, AlNashef IM, Mirghani ME, Saheed O K (2013a) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **99**, 2193-2195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.004>

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

Hawkey PM (2003) Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemoth* **51**, 29-35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg207>

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

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

Horvathova E, Navarova J, Galova E, Sevcovicova A, Chodakova L, Snahnicanova Z (2014) Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. *J Agric Food Chem* **62**, 6632–6639. <https://doi.org/10.1021/jf501006y>

Hubicka U, Krzek J, Walczak M (2010) Stability of ciprofloxacin and norfloxacin in the presence and absence of metal ions in acidic solution. *Pharm Dev Technol* **15**, 532–544. <https://doi.org/10.3109/10837450903338379>

Juneidi I, Hayyan M, Ali OM (2016) Toxicity profile of choline chloride based deep eutectic solvents for fungi and *Cyprinus carpio* fish. *Environ Sci Pollut Res* **23**, 7648–7659. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6003-4>

Juneidi I, Hayyan M, Hashim MA, Hayyan A (2017) Pure and aqueous deep eutectic solvents for a lipase-catalysed hydrolysis reaction. *Biochem Eng J* **117**, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.003>

Joshi RD, Adhikari N (2019) An overview on common organic solvents and their toxicity. *J Pharm Res Intern* **28**, 1-18. <https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v28i330203>

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

King DE, Malone R, Lilley SH (2000) New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *Am Fam Physician* **61**, 2741-2748. PMID: 10821154.

Klamt A, Jonas V, Bürger T, Lohrenz JCV (1998) Refinement and Parametrization of COSMO-RS. *J Phys Chem A* **26**, 5074–5085. <https://doi.org/10.1021/jp980017s>

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

Kussmann M, Ferth A, Obermüller M, Pichler P, Zeitlinger M, Wiesholzer M i sur. (2019) Compatibility of ciprofloxacin with commercial peritoneal dialysis solution. *Nature* **9**, 6512. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42854-y>

Lea T (2015) Caco-2 Cell Line. U: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H (ured.) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, 2. izd., Springer, New York, str. 103-111.

Lin IB, Vasam, CS (2005) Metal – containing ionic liquids and ionic liquid crystals based on imidazolium moiety. *J Org Chem* **690**, 3498-3512. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jorganchem.2005.03.007>

Lipinski AC, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* **46**, 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)

Lobenberg R, Amidon GL (2000) Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm* **50**, 3-12. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(00\)00091-6](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(00)00091-6)

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. <https://doi.org/10.1039/C5MD00551E>

Mesallati H, Conroya D, Hudson S, Tajber L (2017) Preparation and characterization of amorphous ciprofloxacin-amino acid salts. *Eur J Pharm Biopharm* **121**, 73-89. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.09.009>

Mizuuchi H, Jaitely V, Murdan S, Florence AT (2008) Room temperature ionic liquids and their mixtures: potential pharmaceutical solvents. *Eur J Pharm Sci* **33**, 326-331. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.01.002>

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

Nair MK, Joy J, Vasudevan P, Hinckley L (2005) Antibacterial Effect of Caprylic Acid and Monocaprylin on Major Bacterial Mastitis Pathogens *J Dairy Sci* **88**, 3488-3495. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73033-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2)

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

NCBI (2021) PubChem Compound Summary for CID 2764, Ciprofloxacin, NCBI- National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>. Pristupljeno 10. rujna 2021.

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

Olivera ME, Manzo RH, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM (2011) Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ciprofloxacin Hydrochloride. *J Pharm Sci* **100**, 22–33. <https://doi.org/10.1002/jps.22259>

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

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

Panić M, Gunjević V, Cravotto G, Radojčić Redovniković I (2019) Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES, *Food Chem* **300**, 125185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125185>

Paul S, Paul AB, Majumdar S, Roy T, Chandra S, Chowdhury VR (2021) Formulation and Evaluation Ciprofloxacin Hydrochloride Encapsulated Liposomal Hydrogel for Dermal Administration. *Int J Pharm Sci* **12**, 3249-3256. <https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232>

Pedro SN, Freire CR, Silvestre AJ, Freire MG (2021) Deep Eutectic Solvents and Pharmaceuticals. *Encyclopedia* **1**, 942–963. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1030072>

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

Pena-Pereira F, la Calle I (2019) Solvents and Eutectic Solvents. U: Worsfold P, Poole C, Townshend A, Miró M, (ured.) *Encyclopedia of Analytical Science*, 3. izd. Elsevier, Španjolska, str. 184-190.

Pham TD, Ziora ZM, Blaskovich MA (2019) Quinolone antibiotics. *Med Chem Comm* **10**, 1719-1739. <https://doi.org/10.1039/C9MD00120D>

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. <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0459-x>

Portsmouth M (2017) Validation of a PAMPA permeability assay. <https://www.linkedin.com/pulse/validation-pampa-permeability-assay-mark-portsmouth>.
Pristupljeno 20. rujna 2021.

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

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. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>

Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LV (2014) Fluoroquinolone resistance: mechanism, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* **22**, 428-445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>

Sharma PC, Jain A, Jain S, Pahwa R, Shahar M (2010) Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects, *J Enzym Inhib Med Ch* **25**, 577-589. <https://doi.org/10.3109/14756360903373350>

Sheldon RA (2017) The E factor 25 years on: The rise of green chemistry and sustainability. *Green Chem* **19**, 18–43. <https://doi.org/10.1039/C6GC02157C>

Silva JM, Reis RL, Paiva A, Duarte ARC (2018) Design of Functional Therapeutic Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride and Ascorbic Acid. *ACS Sustain Chem Eng* **6**, 10355–10363. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01687>

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

Sugano K (2012) Permeability of a drug, in: *Biopharm. Model. Simulations Theory, Practice Methods and Applications*, 1.izd, John Wiley&Sons, New Jersey, str. 170.

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. <https://doi.org/10.1039/C4GC00117F>

Taberner A, Martin Del Valle EM, Galan MA (2012) Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling. *Chem Eng Process* **60**, 9-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2012.06.004>

Uhljar LE, Kan SY, Radacsi N, Koutsos V, Szabo-Revesz P, Ambrus R (2021) In Vitro Drug Release, Permeability, and Structural Test of Ciprofloxacin-Loaded Nanofibers. *Pharm* **13**, 556. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics13040556>

Tehler U, Fagerberg JH, Svensson R, Larhed M, Artursson P, Bergström CS (2013) Optimizing Solubility and Permeability of a Biopharmaceutics Classification System (BCS) Class 4 Antibiotic Drug Using Lipophilic Fragments Disturbing the Crystal Lattice. *J Med Chem* **56**, 2690–2694. <https://doi.org/10.1021/jm301721e>

Van Breemen RB, Li Y (2005) Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**, 175-185. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>

Van Osch, DJ, Zubeir L, van den Bruinhorst A, Rocha M A, Kroon M C (2015) Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chem* **17**, 4518-4521. <https://doi.org/10.1039/C5GC01451D>

Varanda F, Pratas de Melo M, Caco AI, Dohrn R, Foteini A, Makrydaki M, Voutsas E, Tassios D, Marrucho IM (2006) Solubility of Antibiotics in Different Solvents. 1. Hydrochloride Forms of Tetracycline, Moxifloxacin, and Ciprofloxacin. *Ind Eng Chem Res* **45**, 6368-6374. <https://doi.org/10.1021/IE060055V>

Volpe D (2004) Permeability Classification of Representative Fluoroquinolones by a Cell Culture Method. *AAPS Pharm Sci* **6**, 1-6. <https://dx.doi.org/10.1208%2Fps060213>

Wimer SM, Schoonover L, Garrison MW (1998) Levofloxacin: a therapeutic review. *Clin Ther* **20**, 1049–1068. [https://doi.org/10.1016/s0149-2918\(98\)80104-5](https://doi.org/10.1016/s0149-2918(98)80104-5)

World Health Organization (2009) Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. *WHO Tech Rep Ser* **953**, 87-123.

Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK (2002) A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem* **37**, 399-407. [https://doi.org/10.1016/s0223-5234\(02\)01360-0](https://doi.org/10.1016/s0223-5234(02)01360-0)

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Anamaria Šintić 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