

Određivanje antimikrobnog djelovanja i minimalne inhibitorne koncentracije hidrofobnih prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Juričić, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:317578>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Helena Juričić

**ODREĐIVANJE
ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA
I MINIMALNE INHIBITORNE
KONCENTRACIJE
HIDROFOBNIH PRIRODNIH
NISKOTEMPERATURNIH
EUTEKTIČKIH OTAPALA**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za Biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom profesorice dr. sc. Ksenije Markov, uz pomoć dr. sc. Željka Jakopovića.

Rad je izrađen u sklopu projekta „Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otopala za pripremu i formulaciju kiralnih spojeva“ (NADESChiralDrug, IP-2019-04-7712) voditeljice prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković, financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).



TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA I MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE HIDROFOBNIH PRIRODNIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Helena Juričić, univ. bacc. nutr.
0058209286

Sažetak: Razvojem pojačane svijesti o potrebi zaštite okoliša javlja se potreba za razvojem novih tehnologija s manjim utjecajem na okoliš. Jedan od važnih aspekata industrije su otapala, a upravo prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Natural Deep Eutectic Solvent - NADES*) pokazuju potencijal kao nova zelena otapala. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala se pripremaju od dvije ili više komponente prirodnog podrijetla. Ukoliko je jedna od komponenti aktivna tvar dobiva se terapijsko niskotemperaturno eutektičko otapalo (eng. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents - THEDES*). Cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobno djelovanje pripremljenih NADES - a i THEDES - a na bakterije *Escherichia coli* 3014, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* 3112 te kvasac *Candida albicans* 86, disk difuzijskom metodom. Na temelju rezultata disk difuzijske metode određivana je minimalna inhibitorna koncentracija. Rezultati su pokazali osjetljivost svih bakterija i kvasca na sve NADES - e. THEDES je također pokazao djelovanje prema svim test mikroorganizmima.

Ključne riječi: prirodno niskotemperaturno eutektičko otapalo, terapijsko niskotemperaturno eutektičko otapalo, aktivna farmaceutska tvar, bakterije, kvasac

Rad sadrži: 63 stranice, 16 slika, 10 tablica, 129 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: dr. sc. Željko Jakopović

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Markov (mentor)
3. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjenski član)

Datum obrane: 29. rujna, 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study programme: Nutrition

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF HYDROPHOBIC LOW TEMPERATURE NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Helena Juričić, univ. bacc. nutr.

0058209286

Abstract: With increasing awareness of the idea to protect environment, there is need to develop new technologies with less impact. Solvents are important aspect of the industry and Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) show high potential as new green solvents. Natural Low Temperature Deep Eutectic Solvents are prepared from two or more natural components. In case one of the components is active pharmaceutical ingredient, solvent is called Therapeutic Low Temperature Deep Eutectic Solvent (THEDES). Aim of this work was to test the antimicrobial effect of the prepared NADESes and THEDESes on the bacteria strains *Escherichia coli* 3014, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* 3112 and the yeast *Candida albicans* 86 using the disc diffusion method. Based on the results of the disk diffusion method, minimum inhibitory concentration was observed. Results showed sensitivity of all bacteria and yeast to all NADESes. THEDES also showed activity against all test microorganisms.

Keywords: *Natural Low Temperature Deep Eutectic Solvent, Therapeutic Low Temperature Deep Eutectic Solvent, Active Pharmaceutical Ingredient, bacteria, yeast*

Thesis contains: 63 pages, 16 figures, 10 tables, 129 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ksenija Markov, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Željko Jakopović, PhD.

Reviewers:

1. Kristina Radošević, PhD, Associate professor (president)
2. Ksenija Markov, PhD, Full professor (mentor)
3. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full professor (member)
4. Jasna Mrvčić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 29th, 2022

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala..... | 3 |
| 2.2. Fizikalno- kemijska svojstva prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala | 4 |
| 2.3. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala | 5 |
| 2.4. Svojstva komponenti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala..... | 6 |
| 2.4.1. Mentol | 6 |
| 2.4.2. Timol..... | 7 |
| 2.4.3. Kamfor | 8 |
| 2.4.4. Miristinska kiselina..... | 9 |
| 2.4.5. Kaprilna kiselina | 10 |
| 2.4.6. Dekanska kiselina | 11 |
| 2.4.7. Linolna kiselina | 12 |
| 2.5. Terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala | 13 |
| 2.6. Aktivne farmaceutske tvari..... | 14 |
| 2.6.1. Ciprofloksacin | 15 |
| 2.7. Test mikroorganizmi | 16 |
| 2.7.1. <i>Escherichia coli</i> | 16 |
| 2.7.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 17 |
| 2.7.3. <i>Staphylococcus aureus</i> | 18 |
| 2.7.4. <i>Listeria monocytogenes</i> | 19 |
| 2.7.5. <i>Candida albicans</i> | 20 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 22 |
| 3.1. Materijali | 22 |
| 3.1.1. Mikroorganizmi | 22 |
| 3.1.2. Hranjive podloge | 22 |
| 3.1.3. Pribor i aparatura | 23 |
| 3.1.4. Kemikalije | 24 |
| 3.2. Metode rada | 24 |
| 3.2.1. Priprema kultura mikroorganizama i određivanje broja živih stanica | 24 |
| 3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i terapeutskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala..... | 25 |
| 3.2.3. Određivanje antimikrobnog djelovanja prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i terapeutskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala disk difuzijskom metodom | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala | 27 |
| 3.3. Statistička obrada podataka | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 29 |
| 4.1. Antimikrobna aktivnost niskotemperaturnih eutektičkih otapala | 30 |
| 4.2. Minimalna inhibitorna koncentracija niskotemperaturnih eutektičkih otapala | 41 |
| 5. ZAKLJUČCI | 48 |
| 6. LITERATURA | 49 |

1. UVOD

Unazad nekoliko desetljeća postali smo svjedoci drastičnih promjena u našoj okolini. Razvoj novih proizvoda i usluga traži ravnotežu ekonomskih, socijalnih i ekoloških faktora. Većina industrijskih procesa koristi otapala organskog podrijetla koja su toksična te zagađuju tlo, vodu i zrak (Mitar i sur., 2019). Novonastale poteškoće potaknule su brži i uspješniji razvoj zelenih tehnologija sa ciljem umanjenja nastale štete i prevencije potencijalne buduće (Paiva i sur., 2014). Principi zelene kemije nastoje razviti procese koji su sigurni, efektivni i održivi, a kao jednom od najvažnijih komponenti smatraju se otapala (Mišan i sur., 2019).

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES, eng. *Natural Deep Eutectic Solvents*) sve više dobivaju na popularnosti zbog jednostavne i jeftine pripreme, biorazgradivosti te lako dostupnih komponenti koje su definirane kao sigurne za ljudsku upotrebu, a to svojstvo otvara brojne mogućnosti za njihovo korištenje (Mitar i sur., 2019). Dokazano je da eutektička otapala proizvedena od komponenti koje imaju farmakološko djelovanje osim sličnih fizikalno - kemijskih svojstava posjeduju i slično biološko djelovanje (Radošević i sur., 2016). Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala nastaju zbog fenomena pri kojem se dvije ili tri tvari koje su krutina na sobnoj temperaturi miješaju u odgovarajućem molarnom omjeru i grijanjem dolazi do snižavanja njihovog tališta i prelaska u tekuće stanje (Marchel i sur., 2022). Komponente koje se koriste za proizvodnju prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala su šećeri, organske kiseline, aminokiseline ili organske baze, što ih čini neograničeno dostupnim (Vanda i sur., 2018). Zbog razlika u sastavu i lakoj mogućnosti prilagodbe fizikalno - kemijskih svojstava u ovisnosti o industrijskom procesu, svoju primjenu nalaze u nizu različitih industrija (Craveiro i sur., 2016). Osim korištenja za vrijeme tehnološkog procesa, prirodna niskotemperaturna eutektička otapala su obećavajuće komponente za kozmetičke proizvode, hranu, farmakološke pripravke i biomedicinske proizvode (Marchel i sur., 2022).

Sam NADES može biti medij pripravljen od bioaktivnih komponenti ili aktivnih farmaceutskih komponenti (API, eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*), prilikom čega takav pripravak nazivamo terapeutsko niskotemperaturno eutektičko otapalo (THEDES, eng. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*). Takva otapala donose alternativne puteve korištenja eutektičkih otapala u farmaciji i biomedicini, gdje se povećava apsorpcija, propusnost i topljivost lijekova (Silva i sur., 2019a). Pojednim prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima, posebno onima koji sadržavaju organske kiseline dokazano je antimikrobno djelovanje što otvara nove

možnosti borbi protiv infekcija u doba smanjene rezistentnosti populacije na antibiotike i smanjene dostupnosti lijekova (Wikene i sur., 2017). Do sad poznato je više od 150 različitih kombinacija NADES - a, s mnogim novima koji se tek otkrivaju (Vanda i sur., 2018). Možnosti proizvodnje prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala iz različitih bioloških izvora te tisuće mogućih kombinacija, znače da je potrebno provesti još mnoga istraživanja kojima bi se jasnije mogla odrediti njihova svojstva, a samim time proširiti područje njihove primjene (Silva i sur., 2019a).

Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobno djelovanje disk difuzijskom metodom 8 različitih NADES - a, THEDES - a te NADES - a s dodanom aktivnom farmaceutskom komponentom na učestale patogene: gram - negativne bakterije (*Escherichia coli* 3014 i *Pseudomonas aeruginosa* 3024), gram - pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* 3112) i kvasac *Candida albicans* 86. Osim antimikrobnog djelovanja, provedeno je i određivanje minimalne inhibitorne koncentracije otapala za navedene mikroorganizme.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PRIRODNA NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES) su mješavina prirodnih komponenti kao što su organske kiseline i baze, ugljikohidrati, aminokiseline, alkoholi ili viši alkoholi te voda koji se međusobno povezuju vodikovim vezama (Vanda i sur., 2018). Miješanjem dvije ili više navedenih krutih komponenti u pogodnim kombinacijama i određenim molarnim omjerima dolazi do promjene stanja iz krutog u tekuće (Yang i sur., 2018). Pojam NADES - a se prvi put pojavio 2011. godine iako sami NADES - i zapravo nisu nikakva novost te su sveprisutni u okolišu. (Liu i sur., 2018). Usprkos širokoj prisutnosti prirodnih eutektičkih otapala u živim sustavima, jako je malo onih koji su prirodno izolirani zbog toga što ih je izrazito teško prepoznati pa se većina istraživanja temelji na sintetički stvorenim otapalima najčešće od dvije ili tri komponente (Yang i sur., 2018). Smatraju se trećom tekućom fazom u živim organizmima uz vodu i lipide, a sudjeluju u krioprotekciji, reakcijama biosinteze, skladištenja tvari i zaštiti od isušivanja (Wikene i sur. 2017). Dokazano je da mogu biti otapalo za široki spektar tvari od onih topivih u lipidima do tvari topivih u vodi, a željena svojstva se mogu lako prilagođavati ovisno o postotku vode (Wikene i sur., 2017).

Komponente od kojih se proizvode dostupne su u gotovo neograničenim količinama, a čine ih biorazgradivim, održivim i jeftinim otapalima što nudi brojne prednosti sa ekonomskog i ekološkog stajališta (Dai i sur., 2015). Od otkrića aktivno se koriste i istražuju u kemijskim procesima elektrolize, biokatalitičkim procesima, prilikom ekstrakcije i izolacije, te razdvajanja spojeva, a smatraju se obećavajućim otapalima za kozmetičku, farmaceutsku i prehrambenu industriju kao i za biotehnološke procese i u biomedicini (Santos i sur., 2018; Wagle i sur., 2014).

Unatoč općem mišljenju da se radi o prirodnim otapalima što može sugerirati da su u potpunosti sigurna i bezopasna, bitno je naglasiti da je potrebno provoditi daljnja istraživanja o njihovoj toksičnosti i djelovanju (Marchel i sur. 2022).

Unazad nekoliko godina, pojavio se problem rezistentnosti patogenih mikroorganizama na dosad korištene antimikrobne agense što je otvorilo prostor za istraživanje novih. Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala sa potencijalnim antimikrobnim djelovanjem izazivaju poseban interes kao alternativan medij konvencionalnim i do sad korištenim otapalima (Al-Akayaleh i sur., 2022).

2.2. FIZIKALNO - KEMIJSKA SVOJSTVA PRIRODNIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Fizikalno - kemijska svojstva prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala ovise o njihovoj finalnoj namjeni (Dai i sur., 2013; Choi i sur., 2011). Struktura spojeva i vrsta veza koje tvore određuju ponašanje otapala u sustavu (Liu i sur., 2018.). Krajnja fizikalno - kemijska svojstva otapala u velikoj mjeri određuje i udio vode. Određeni udio dodane vode, koja sa komponentama formira vodikove veze utječe na strukturu tekućeg kristala otapala i to tako da poboljšava mobilnost same kristalne rešetke (Dai i sur., 2013). Povišenjem udjela vode snižava se točka taljenja te dolazi do promjene svojstava kao što su viskoznost, polarnost, gustoća, provodljivost i sposobnost otapanja drugih tvari (Aroso i sur., 2016). Potrebno je naglasiti da povišenjem udjela vode iznad 50 % dolazi do slabljenja vodikovih veza između drugih komponenti otapala što uzrokuje narušavanje strukture (Dai i sur., 2015). Umjerena količina vode sa druge strane snižava viskoznost i poboljšava provodljivost za neke NADES - e čak do 100 puta (Mišan i sur., 2019).

Polarnost je svojstvo koje određuje potencijal topivosti svakog otapala (El Achkar i sur., 2021). Većina poznatih prirodnih eutektičkih otapala je hidrofilna sa rangom polarnosti koji varira od 44,81 kcal/ mol, što je usporedivo sa polarnosti vode pa sve do 51,89 kcal /mol što se može usporediti sa polarnosti metanola (Dai i sur., 2013). Na povišenje polarnosti hidrofilnih otapala u određenoj mjeri se može utjecati dodavanjem vode. Otapala bazirana na organskim kiselinama su pokazala najbolji stupanj polarnosti, a nakon njih aminokiseline. Najmanji stupanj polarnosti imaju otapala pripremljena od šećernih alkohola (Dai i sur., 2013). Hidrofilna eutektička otapala su najbolji medij za otapanje polarnih komponenti, ali se mogu primijeniti i za otapanje spojeva koji su slabo topljivi u vodi (Dai i sur., 2013).

Gustoća kao jedno od glavnih karakteristika svake tekućine za većinu eutektičkih otapala ima vrijednost veću od gustoće vode dok određena hidrofobna otapala pokazuju gustoću nižu od vode (Florindo i sur., 2014; Tang i Row, 2013). Temperatura na gustoću djeluje obrnuto proporcionalno te se povišenjem temperature linearno smanjuje gustoća otapala (Cui i sur., 2018).

Viskoznost otapala primarno ovisi o komponentama od kojih se sastoje i to u ovisnosti o broju i jačini vodikovih veza između spojeva (Altamash i sur., 2018). Osim o vodikovim vezama

viskoznost ovisi i o temperaturi. To je promjenjivo svojstvo koje se može prilagoditi svrsi za koje je otapalo namijenjeno. Tako se NADES - i niske viskoznosti preporučaju za korištenje u industrijskim procesima, dok oni visoke viskoznosti pokazuju bolje performanse kod ekstrakcije spojeva kao što su fenoli (Dai i sur., 2015). Većina otapala je na sobnoj temperaturi izrazito viskozna (Zhang i sur., 2012). Hidrofobna otapala imaju niži stupanj viskoznosti od hidrofilnih otapala kao posljedicu nižeg naboja između komponenti koje ih čine. U istraživanju Florinda i sur. (2018). otapala su pripravljena samo od organskih kiselina i to oktanske (C8), nonanske (C9), dekanske (C10) i dodekanske (C12) kiseline. Rezultati su pokazali da su dobivene kombinacije otapala imale najniži stupanj viskoznosti u kategoriji hidrofobnih prirodnih otapala uz gustoću koja je bila niža od gustoće vode. Kontrastno, eutektička otapala najvišeg stupnja viskoznosti su ona koja sadržavaju šećere (Zhang i sur., 2012).

NADES - i su uglavnom termostabilni sa temperaturom razgradnje iznad 200 °C, osim onih proizvedenih od ugljikohidrata koji se razgrađuju pri temperaturi oko 135 °C. Zahvaljujući svojoj termostabilnosti, prirodna niskotemperaturna eutektička otapala imaju važne uloge u biljnim organizmima kao što je zaštita od pothlađivanja (Dai i sur., 2013). Stabilnost tekućeg stanja u širokom rasponu temperature od gotovo 0 °C do 100 °C omogućava njihovu primjenu u različitim industrijskim procesima (Dai i sur., 2013).

Kao posljednje svojstvo ističe se ionska provodljivost koja ovisi o viskoznosti. Kako je viskoznost većine otapala visoka tako je ionska provodljivost obrnuto niska. Provodljivost se može poboljšati povišenjem temperature (Lapeña i sur., 2019; Zhang i sur., 2012). Komponente i omjer donora i akceptora vodikove veze također određuju provodljivost kao i udio vode (Dai i sur., 2015).

2.3. PRIPREMA PRIRODNIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Najčešći način pripreme prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala je vrlo jednostavna metoda zagrijavanja komponenti uz miješanje (Florindo i sur., 2014). Osim sa ekonomskog stajališta, ovom metodom se lako može pratiti temperatura i formiranje samog otapala pogotovo u slučajevima nestabilnih komponenti koje se koriste za njihovu pripremu (Mišan i sur., 2019). Druga vrlo jednostavna metoda je metoda u kojoj se komponente otapaju u odgovarajućem otapalu koje se nakon toga isparava prilikom čega ostaje samo eutektička smjesa (Dai i sur., 2013). Također, često se koristi i liofilizacija, a otapala koja nastaju imaju visoki stupanj

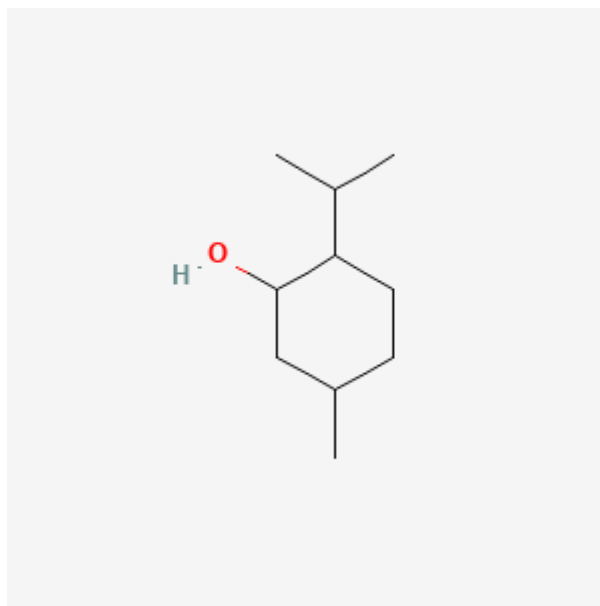
čistoće. Ova metoda se često koristi za hidrofilna otapala (Gutierrez i sur., 2010). Na sobnoj temperaturi je moguće provoditi mljevenje u tarioniku do postizanja homogene tekućine (Florindo i sur., 2014). U određenim slučajevima koristi se i zagrijavanje uz pomoć ultrazvuka do formiranja homogene tekućine (Bajkacz i Adamek, 2017). Posljednja metoda koja se koristi je uz pomoć mikrovalova prilikom čega se komponente nekoliko sekundi izlažu mikrovalovima do formiranja otapala (Gomez i sur., 2018). Kako izbor samih komponenti utječe na finalna svojstva otapala tako i odabirom prave metode za njihovu pripremu dobiva se otapalo željenih fizikalno - kemijskih svojstava (Mišan i sur., 2019).

2.4. SVOJSTVA KOMPONENTI PRIRODNIH NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

2.4.1. Mentol

Mentol (slika 1) je ciklički monoterpenoid dobro poznat po svojim svojstvima hlađenja i prepoznatljivom mirisu. Dominantna je komponenta esencijalnih ulja izoliranih iz limitiranih biljnih vrsta i to pretežito iz roda *Mentha* (Kamatou i sur., 2013). Biljke iz kojih je moguće izolirati mentol su stoljećima poznate po svojem antibakterijskom, antiviralnom, antifungalnom, anestetskom, anelgetičkom, antipruritičkim i antikancerogenom djelovanju. Zahvaljujući svojoj strukturi mentol je jedan od najuspješnijih terpena koji se koriste za poboljšanje transdermalnog prijenosa lijekova (Trivedi i sur., 2015). Zahvaljujući svom antibakterijskom djelovanju sinergistički sa antibioticima djeluje u prevenciji infekcija nekih od najčešćih ljudskih patogena (Kamatou i sur., 2013). Osim u farmaceutske svrhe, koristi se u kozmetičke svrhe, prehrambenoj industriji, u sastavu pesticida i sl. (Patel i sur., 2007).

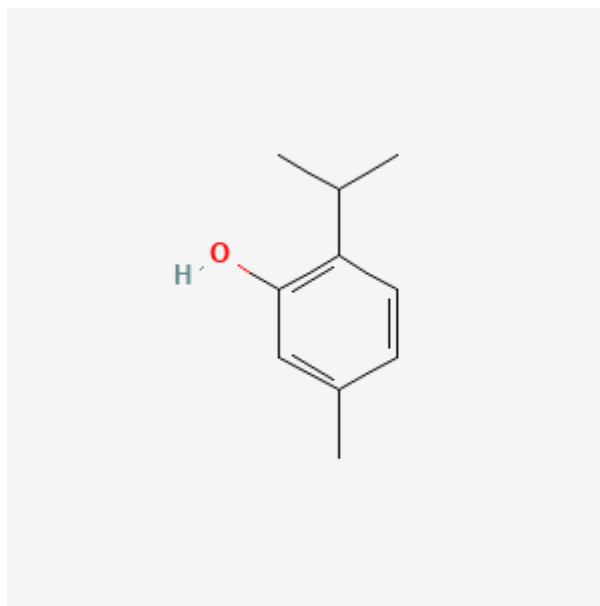
Monoterpeni uključujući i mentol se primarno izoliraju iz biljaka. Većina komercijalnog mentola se pak proizvodi sintetički. Izolati su bijeli ili prozirni kristali točke topljenja oko 41 - 44 °C. Usprkos brojnim dokazanim djelovanjima, mentol je lako hlapiv spoj koja nije u potpunosti topljiv u vodi u kojoj lako kristalizira i teško se miješa što utječe na stabilnost proizvoda sa mentolom i mogućnost njihove primjene (Ribeiro i sur., 2015). Taj problem se može riješiti prevođenjem mentola u tekuće stanje u kojem se hlapivost snižava i povisuje stabilnost (Al- Akayaleh i sur., 2022).



Slika 1. Kemijska struktura mentola (NCBI, 2022a)

2.4.2. Timol

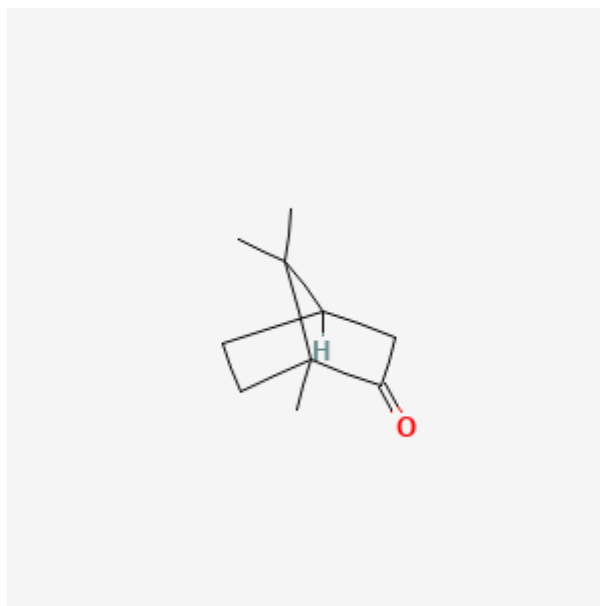
Timol (slika 2) je primarna fenolna komponenta eteričnog ulja timijana (*Thymus vulgaris*). Poznat je po svojem izraženom antimikrobnom i antifungalnom djelovanju (Li i sur., 2017). Pretpostavljeni mehanizam djelovanja timola je da narušava strukturu stanične membrane što uzrokuje curenje staničnih organela i gubitak funkcije stanice (Salehi i sur., 2018). S obzirom da timol ima GRAS (*generaly regarded as safe*) status postoji interes za njegovo korištenje u raznim procesima (Abbaszadeh i sur., 2014). Međutim, korištenje timola je ograničeno s obzirom da je loše topljiv u vodi što onemogućuje homogeno miješanje (Abbaszadeh i sur., 2014). Prevođenjem u tekuće agregatno stanje dobiva se hidrofobno otapalo koje je odličan medij za izolaciju nepolarnih analita (Li i sur., 2020).



Slika 2. Kemijska struktura timola (NCBI, 2022b)

2.4.3. Kamfor

Kamfor (slika 3) je ciklički terpen prirodno prisutan u drvu kamforovac (Zuccarini, 2010). Poznat je po svojem analgetičkom, antiseptičkom i antipruritičkom učinku (Dos Santos i sur., 2021). Široko se koristi u medicinskim preparatima, posebno u topikalnim zahvaljujući blagom lokalnom anestetičkom djelovanju (Zuccarini, 2010). Njegovo specifično djelovanje podrazumijeva simulaciju receptora za hladnoću u nosu, za razliku od dekognestiva koji imaju isključivo mehaničko djelovanje na sluznicu (Burrow i sur., 1983). Kamfor treba koristiti oprezno zbog mogućnosti intoksikacije kod slučajne oralne konzumacije, koja za dojenčad može biti smrtonosna. Posebnu pozornost trebaju obratiti i trudnice zbog mogućnosti prolaska kamfora kroz placentarnu barijeru. Posebnu opasnost predstavlja i za djecu koja imaju povijest epileptičkih napadaja (Zuccarini, 2010). U slučaju opreznog korištenja proizvoda kamfora u propisanim dozama i načinima primjene lako i jednostavno se mogu izbjeći intoksikacije.



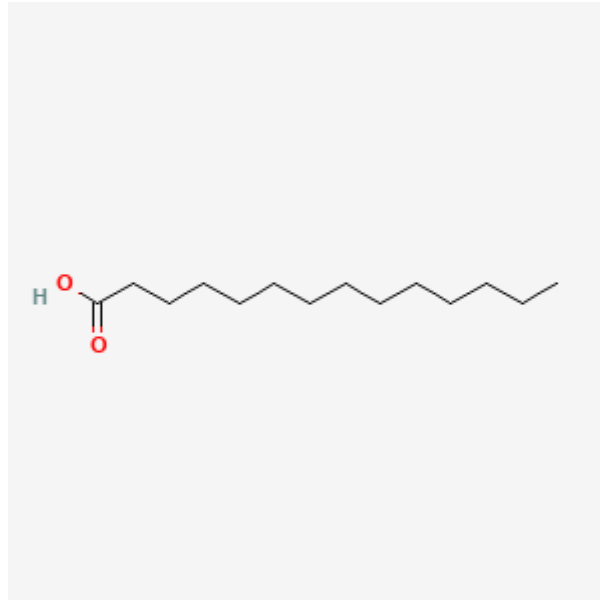
Slika 3. Strukturna formula kamfora (NCBI, 2022c)

2.4.4. Miristinska kiselina

Miristinska kiselina (slika 4) je masna kiselina koja se pronalazi u velikom broju biljnih i životinjskih masti i ulja. Prisutna je i u ljudskom organizmu kao sudionik biokemijskih reakcija, te adipoznom tkivu (Burdock i Carabin, 2007). U prehrambenoj industriji je široko korišten aditiv, pojačivač okusa i sredstvo protiv pjenjenja (Burdock i Carabin, 2007). Miristinska kiselina je zasićena masna kiselina sa 14 C atoma (Burdock i Carabin, 2007). Na sobnoj temperaturi je u obliku bijelih ili žutih kristala sjajnog odsjaja teksture slične vosku. Voštana tekstura omogućuje primjenu ove masne kiseline u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Podršku primjeni u kozmetičkoj industriji pruža i činjenica da ne izaziva kožne iritacije (Anon, 1987). Prema trenutno važećim prehrambenim smjernicama koje donose USDA (U.S Department of Agriculture) i HHS (U.S Department of Health and Human Services) unos zasićenih masnih kiselina pa tako i miristinske treba biti limitiran na preporučeni dnevni unos (Legrand i Rioux, 2015).

Trenutačno je poznata primjena miristinske kiseline u obliku eutektičkog otapala za pohranu solarne toplinske energije. Samostalnu miristinsku kiselinu nije moguće samostalno koristiti u solarnim toplinskim sustavima zbog visoke točke topljenja, ali u eutektičkim sustavima gdje se

najčešće kombinira sa laurinskom kiselinom točka topljenja se snižava sa 56,2 na 30 °C (Alva i sur., 2017).



Slika 4. strukturna formula miristinske kiseline (NCBI, 2022d)

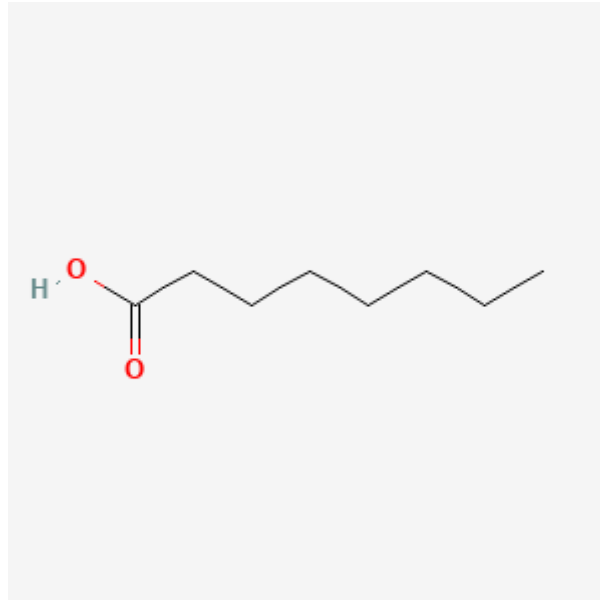
2.4.5. Kaprilna kiselina

Kaprilna kiselina, poznata i kao oktanska kiselina, (slika 5) ima pKa vrijednost 4,89 i slabo je topljiva u vodi (4,85 mmol/L). Topljivost opada pri nižim pH vrijednostima jer je manji udio karboksilnih skupina deprotoniran te dominira hidrofobni karakter alifatskog lanca (Trapp i sur., 2018).

Oktanska kiselina ima svoju primjenu u zdravstvenom sektoru u zaštiti od razvoja bolesti. Koristi se i u kozmetičkoj industriji zahvaljujući neuobičajenim ali vrlo korisnim svojstvima kao što su dobra mazivost, bezbojnost i dobra stabilnost (Swaminathan i Jicha, 2014). Često se dodaje u dodatke prehrani, a pomaže u kontroli tjelesne mase tako da potiče izgaranje suvišnih kalorija. Kaprilna kiselina je masna kiselina kratkog lanca koja je sastojak kokosovog i ulja sjemenki marelice te nekih mliječnih proizvoda.

Zbog poticanja procesa ketoze poboljšava kognitivne procese u osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti (Mungali i sur., 2021). Pokazuje značajno antimikrobno djelovanje, što

otvara prostor za njihovu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao novi način zaštite od patogena (Zheng i sur., 2005).

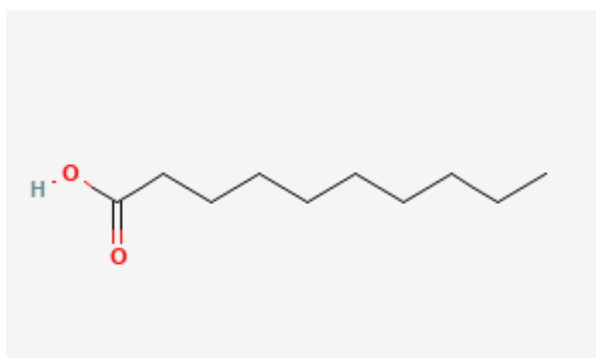


Slika 5. strukturna formula kaprilne kiseline (NCBI, 2022e)

2.4.6. Dekanska kiselina

Dekanska ili kaprinska kiselina (slika 6) je nerazgranata zasićena masna kiselina koja sadržava 10 atoma ugljika. Dokazano joj je snažno baktericidno djelovanje u *in vitro* uvjetima (Desbois i Smith, 2009). Kaprinska kiselina ima značajno antibakterijsko djelovanje prema velikom broju bakterija uključujući i *Propionbacterium acne* koja je uzročnik akni pa svoju primjenu nalazi u kozmetičkoj industriji (Huang i sur., 2014). Kao slobodna masna kiselina ima važnu ulogu u imunološkoj zaštiti organizma, posebno u zaštiti kože i sluznica (Desbois i Smith, 2009). Antimikrobno djelovanje ove masne kiseline ovisi o tome jesu li bakterije gram - negativne ili gram - pozitivne i sadržavaju debeli sloj mureina koji onemogućava ulazak masnih kiselina prema unutarnjim membranama bakterijske stanice (Sun i sur., 2003).

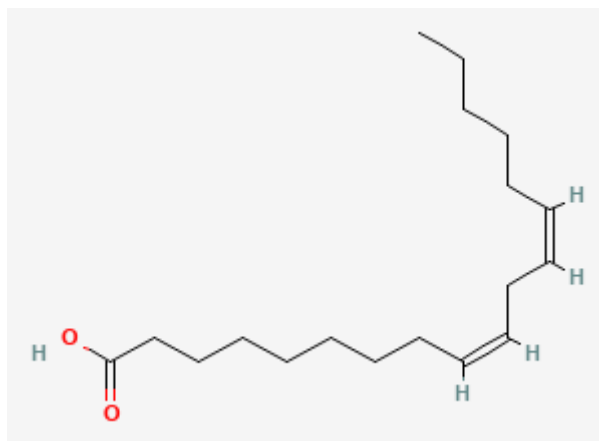
Eutektički sustavi bazirani na masnim kiselinama pružaju brojne mogućnosti farmaceutske primjene zahvaljujući niskoj toksičnosti, kemijskoj stabilnosti te malim promjenama volumena prilikom promjene temperature (Liu i sur., 2015). Dekanska kiselina tvori čvrste vodikove veze sa lijekovima što poboljšava njihovu topivost i stabilnost (Lee i sur., 2016).



Slika 6. Strukturna formula dekanske kiseline (NCBI, 2022f)

2.4.7. Linolna kiselina

Linolna kiselina (slika 7) spada u grupu polinezasićenih masnih kiselina. Sadržava 18C atoma i dvije dvostruke veze. Esencijalna je u ljudskoj prehrani zbog nemogućnosti sinteze unutar organizma. Glavni izvori iz kojih se linolna kiselina može izolirati su biljna ulja, orašasti plodovi, sjemenke, meso i jaja (Whelan i Fritsche, 2013). Zahvaljujući nepolarnom lancu i polarnoj kiselinskoj grupi primjenu nalazi u agronomiji, kozmetičkoj, farmaceutskoj, prehrambenoj industriji te u nutricionizmu i biomedicini (Maximo i sur., 2014). Poznato je da u kombinaciji sa drugim masnim kiselinama ima ulogu u antimikrobnoj samozaštiti kože (Silva i sur., 2019b). Ovo svojstvo omogućava korištenje linolne kiseline u eutektičkim sustavima i potencijalnu primjenu u medicinske svrhe (Silva i sur., 2019b). Svojstva eutektičkih otapala sa masnim kiselinama, čine linolnu kiselinu odličnim nosačem za prijenos aktivnih farmaceutskih komponenti i njihovo korištenje u terapijske svrhe (Silva i sur., 2019b).



Slika 7. strukturna formula linolne kiseline (NCBI, 2022g)

2.5. TERAPEUTSKA NISKOTEMPERATURNNA EUTEKTIČKA OTAPALA

Jedan od glavnih ciljeva farmaceutske industrije je poboljšati dostupnost i iskorištenje postojećih lijekova. Umjesto razvoja novih lijekova koji zahtijevaju puno veće resurse i dugotrajna klinička istraživanja, fokus je stavljen na poboljšanje postojećih i već isprobanih terapija kojima je dokazana djelotvornost (Petrova, 2013). Prilikom pokušaja poboljšanja farmakološke djelotvornosti lijeka, on može proći kroz promjene forme i formulacije, novih načina doziranja i samim time novog administrativnog postupka registracije (Pedro i sur., 2019). Jedan od glavnih ciljeva je poboljšati hidrofilnost postojećih lijekova uzimajući u obzir da oko 40 % odobrenih lijekova nije topljivo u vodi, što vodi do slabe biodostupnosti i apsorpcije (Kalepu i Nekkanti, 2015). Biodostupnost se povećava poboljšanjem topivosti lijeka u gastrointestinalnim sokovima (Petrova, 2013). S ciljem poboljšanja oralne topivosti lijeka došlo je do razvoja krutih disperzija u kojima aktivne farmaceutske komponente čine minimalno jednu od sastojaka (Savjani i sur., 2012). Zbog potencijalne toksičnosti, povišenje doze lijeka nije nikako opcija pa prevođenjem aktivnih farmaceutskih komponenti u eutektičko stanje dolazi do željenog učinka bez rizika za zdravlje pojedinca (Duarte i sur., 2017).

Terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala (eng. *Therapeutic Deep Eutectic Solvents*, THEDES) su vrsta eutektičkih otapala u kojem aktivne farmaceutske komponente čine minimalno jedan od sastojaka otapala (Saha i sur., 2020). Terapeutska otapala se mogu pripremiti tako da se aktivna farmaceutska komponenta prevede u tekuće stanje u određenom molarnom omjeru i bude dio eutektičkog sustava ili se u prethodno pripremljeno eutektičko otapalo otopi kruta aktivna farmaceutska komponenta (Santos i sur., 2018). Aktivne

farmaceutske komponente u eutektičkom sustavu se mogu ponašati i kao donor i kao akceptor vodikove veze pa je pažljivo kombiniranje komponenti od ključne važnosti za formiranje otopala koje bi bilo tekuće na temperaturi ljudskog tijela i paralelno iskazivalo svoje terapijsko djelovanje (Pedro i sur., 2019). Najčešće se u eutektičkim sustavima koriste aktivne farmaceutske komponente (eng. *Active Pharmaceutical Ingredients*, API) kao donori vodikove veze jer ih većina posjeduje amino, karboksilnu ili alkoholnu skupinu (Abbot i sur., 2017). Prevođenje API - a u formu otopala poboljšava kemijsku stabilnost s obzirom da postoji puno mogućih puteva njihove razgradnje. Kao primjer se može navesti aspirin, koji je sklon hidrolizi ukoliko je dugo vremena izložen vlazi (Blessy i sur., 2014). Ovakvi proizvodi omogućavaju bolje iskorištenje lijekova loše topljivosti u vodi (Aroso i sur., 2016).

THEDES - i svoju primjenu pronalaze u poboljšanju topljivosti, propusnosti, stabilnosti i biodostupnosti postojećih lijekova namijenjenih za oralnu primjenu, ali i lijekova za transdermalnu aplikaciju (Pedro i sur., 2019; Aroso i sur., 2016). Eutektičke smjese za oralnu primjenu pokazuju bržu apsorpciju lijeka, koja počinje već u ustima (Pedro i sur., 2019). Za terapijska otopala namijenjena za apsorpciju preko kože često se koriste mentol ili kamfor za poboljšanje permeabilnosti (Duarte i sur., 2017). Osim mentola i kamfora, obećavajuće su se pokazale i masne kiseline koje tvore eutektička otopala sa temperaturom topljenja nižom ili blizu fiziološke temperature ljudskog tijela (Tarate i Bensal, 2015). Eutektička otopala sa farmaceutskim komponentama su se pokazala posebno uspješna pri liječenju lokaliziranih fungalnih infekcija, prilikom čega je omogućen brži transport lijeka u ciljana tkiva, kao i veću apsorpciju (Park i sur., 2012).


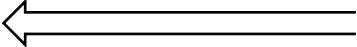
2.6. AKTIVNE FARMACEUTSKE KOMPONENTE

Aktivne farmaceutske komponente su tvari koje posjeduju farmakološku aktivnost te se koriste u kombinaciji s drugim tvarima s ciljem liječenja, dijagnostike i ublažavanja bolesti (Kumar i sur., 2022). Svaki lijek se sastoji od dvije glavne komponente, a to su djelatna tvar lijeka (API) koja kao glavna komponenta ima kemijsku i biološku aktivnost u organizmu i druga komponenta koja nema aktivno djelovanje nego služi za transport i bolju apsorpciju aktivnih tvari (Ternes i Joss, 2006). Same komponente mogu biti prirodnog ili kemijskog sintetičkog podrijetla, a osim u lijekovima namijenjenih liječenju bolesti u ljudi nalaze se i u veterinarskim lijekovima (Kumar i sur., 2022).

Problem sa aktivnim farmaceutskim komponentama danas je u njihovoj slaboj topljivosti u vodenom mediju i propusnosti što rezultira slabom bioaktivnošću (Duarte i sur., 2017). Manipulacijom fiziološkim i morfološkim karakteristikama APIa može se poboljšati njihovo djelovanje (Martín i sur., 2008).

Aktivne farmaceutske komponente se mogu podijeliti u 4 kategorije prema sustavu klasifikacije biofarmaceutika (BCS, eng. *Biofarmaceutics Clasification System*) (tablica 1) na temelju svoje topljivosti i propusnosti (Duarte i sur., 2017; Chavda i sur., 2010). Razred 1 karakterizira visok stupanj topljivosti u tjelesnim tekućinama i visoka permeabilnost odnosno brza apsorpcija u gastrointestinalnom traktu. Razred 2 su lijekovi niske topljivosti, ali visoke permeabilnosti u gastrointestinalnom traktu. Razred 3 opisuje visoka topljivost u tjelesnim tekućinama i niska propusnost kroz probavni sustav, a razred 4 karakterizira i niska topljivost, ali i niska permeabilnost (Chavda i sur., 2010).

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

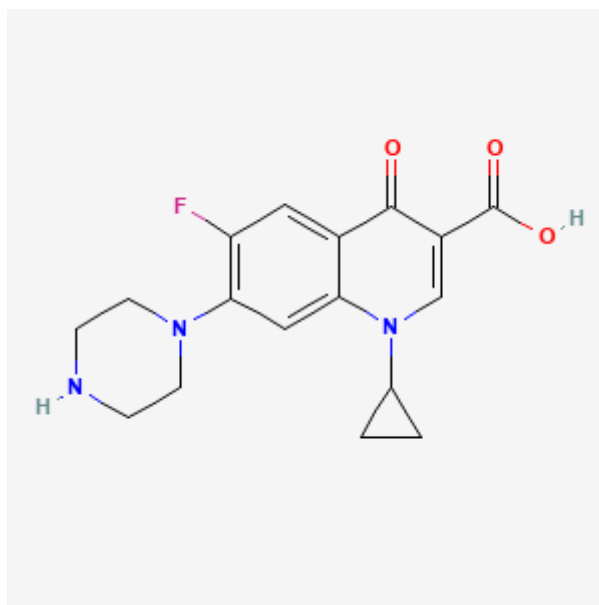
| | | |
|--|---|--|
| RAZRED I. Visoka topljivost Visoka permeabilnost | RAZRED II. Niska topljivost Visoka permeabilnost |  PERMEABILNOST |
| RAZRED III. Niska topljivost Visoka permeabilnost | RAZRED IV. Niska topljivost Niska permeabilnost | |
|  TOPLJIVOST | | |

2.6.1. Ciprofloksacin

Ciprofloksacin (slika 8) je sintetički fluorkinolni antibiotik širokog spektra djelovanja (Zhang i sur., 2018). Antibiotско djelovanje iskazuje prema velikom rasponu bakterija, od kojih su najosjetljivije aerobne štapičaste gram - negativne bakterije kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* i *Shigella*, dok su gram - pozitivne umjereno osjetljive do osjetljive (Sharma i sur., 2010). Karakterističan je po svojem odličnom farmakokinetičkom profilu; dobrom prodoru u tkiva što je posljedica slabih veza koje tvori sa transportnim proteinima, biodostupnosti i

malom broju popratnih nuspojava (Torriero i sur., 2006). U usporedbi s drugim antibioticima širokog spektra djelovanja, jednaku aktivnost iskazuje kada se dozira oralno i intravenozno (Campoli- Richards i sur., 1988).

Antibiotsko djelovanje iskazuje tako da inhibira replikaciju molekule DNA djelujući na enzime bakterijske DNA topoisomerase i DNA giraze (Sharma i sur., 2010). Eutektički oblik ciprofloksacina pokazao je bolje djelovanje na gram - pozitivne i gram - negativne bakterije. Također eutektička smjesa ciprofloksacina pokazala je antibiotsko djelovanje pri dozama gdje pri klasičnom obliku doziranja bakterije razvijaju rezistentnost (Pedro i sur., 2019).



Slika 8. Strukturna formula ciprofloksacina (NCBI, 2022h)

2.7. TEST MIKROORGANIZMI

2.7.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli je jedna od glavnih vrsta bakterija koja živi u simbiozi sa domaćinom u donjem dijelu gastrointestinalnog sustava sisavaca (Gomes i sur., 2016). Ova vrsta pripada porodici *Enterobacteraiceae* (Allocati i sur., 2013). *E. coli* je štapićasta, nesporogena, gram - negativna bakterija koja je fakultativni anaerob (Tenailon i sur., 2010). Sama vrsta kolonizira probavni sustav u prvih nekoliko sati nakon rođenja, gdje uglavnom u simbiozi sa domaćinom živi desetljećima bez ikakvih negativnih posljedica (Kaper i sur., 2004). Zahvaljujući svojoj

možnosti rasta i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima svoju ulogu nalazi u područjima od industrijskog do medicinskog polja, a u tehnologiji rekombinantne DNA je najkorišteniji mikroorganizam (Allocati i sur., 2013).

U probavnom sustavu naseljavaju se komenzalni sojevi koji rijetko izazivaju oboljenja, osim u slučajevima kad je gastrointestinalna barijera narušena (Kaper i sur., 2004). Naseljavaju debelo crijevo i to u mukoznom sloju koji se nalazi na površini epitelnih stanica crijeva (Allocati i sur., 2013). Pretpostavlja se da u probavnom sustavu imaju bitnu ulogu u razgradnji glukonata i sintezi vitamina K te tako pridonose simbiozi sa domaćinom (Kaper i sur., 2004). Osim toga, smatra se da domaćina čuvaju od kolonizacije patogena tako što proizvode bakteriocine (Tenailon i sur., 2010).

Osim kao komenzalni organizam, određeni sojevi su patogeni i izazivaju niz oboljenja uključujući infekcije urinarnog trakta, infekcije probavnog sustava i mekih tkiva, meningitis, upale pluća i bakterijemiju. Sama *Escherichia coli* je prvi uzročnik sepse od svih gram - negativnih bakterija (Jaureguy i sur., 2008). Sam put prijenosa ovog patogena je feko - oralni konzumacijom kontaminirane hrane i vode u uvjetima slabe higijenske prakse (Allocati i sur., 2013).

2.7.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gram - negativna bakterija štapićastog oblika te se pokreće uz pomoć biča (Wu i sur., 2015). Često ju je moguće pronaći u tlu, slatkoj vodi kao i u morskim vodama (Michel-Briand i Bayasse, 2002). Ova sveprisutna bakterija može preživjeti u različitim uvjetima i ponaša se kao oportunistički patogen koji kod ljudi, životinja i biljaka može izazvati infekcije (Wu i sur., 2015).

Uzročnik je niza bolničkih (domicilnih) i izvanbolničkih (nozokomijalnih) infekcija. *P. aeruginosa* može izazvati infekcije probavnog sustava, urinarnog trakta, dišnog sustava, infekcije kostiju i krvi, sluznica, može uzrokovati meningitis i infekcije kože, mekih tkiva, upale uha te izaziva periferni ulcerozni keratitis koji se vezuje uz nošenje kontaktnih leća (Mena i sur., 2009; Driscoll i sur., 2007).

Poseban rizik predstavlja za imuno kompromitirane pacijente kao što su pacijenti oboljeli od raka, cistične fibroze, HIV – a, ali i pacijenti sa teškim opeklinama (Mena i sur., 2009; Lau i sur 2004). Infekcije koje izaziva *P. aeruginosa* su poprilično zahtjevne za tretiranje uzimajući u obzir prirodnu otpornost ove vrste kao i razvijene mehanizme otpornosti na poznate antimikrobne agense (Strateva i Yordanov, 2009). Otpornost na antimikrobne agense leži u slaboj propusnosti vanjske membrane (Strateva i Yordanov, 2009). Osim toga bakterije *P. aeruginosa* formiraju biofilm što olakšava preživljavanje i opskrbu hranom u okolišu (Mena i sur., 2009).

Genom ove bakterije je prilično velik, pa *P. aeruginosa* sadržava gene koji kodiraju za brojne enzime koji joj omogućavaju niz metaboličkih puteva kojim si može opskrbiti potrebnu energiju za rast i razmnožavanje. Značajan postotak gena se odnosi i na regulatorne gene koji omogućavaju bakteriji prilagodbu na promjene uvjeta u okolišu (Wu i sur., 2015).

Većina sojeva *P. aeruginosa* proizvode jedan ili više pigmenata i to piocijanin (plavozelene boje), pioverdin (žutozelena fluorescentna boja) i piorubin (crvenonarančasta boja). Piocijanin je posebno rizičan za pacijente sa cističnom fibrozom jer otežava uklanjanje same bakterije iz pluća, dok štetno djeluje i na ostale stanice tako da interferira sa staničnim funkcijama (Lau i sur., 2004).

2.7.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram - pozitivna nepokretna bakterija kugličastog oblika, te se najčešće nalazi u grozdastim kolonijama specifičnog žutozlatnog odsjaja. Ovaj mikroorganizam može rasti aerobno ili kao fakultativni anaerob na temperaturama od 18 °C do 40 °C (Rasigade i Vandenesch, 2014). Istodobno je i komenzalni organizam i patogen. U čak 30 % populacije *S. aureus* je stanovnik fiziološke flore (Chambers i sur., 2009). Najčešće kolonizira prednji dio nosnica, što pridonosi širenju *S. aureus*. Osim nosnica kolonizira, kožu, gastrointestinalni sustav, prepone i pazušnu jamu, a rizik od infekcije kod osoba koje su kliconoše kod oslabljenog obrambenog mehanizma (Tong i sur., 2015). Put prijenosa je izravnim dodirima sa osobom kliconošom ili oboljelom osobom, iako se ne isključuje mogućnost infekcije preko objekata (Foster, 2002).

Kroz oštećenu kožu može uzrokovati lokalne infekcije kože i potkožnog tkiva, ali i doprijeti do udaljenih tkiva i uzrokovati i po život opasne infekcije kao što su pneumonija, meningitis, bakterijemija i osteomijelitis (Monaco i sur., 2017). Veći rizik za fatalni ishod predstavlja za osobe kod kojih je dio prirodne flore (Chambers i sur., 2009).

Ispoljavanje toksičnog učinka leži u sposobnosti *S. aureus* da stvara biofilm što olakšava kolonizaciju (Krismer i Peschel., 2010). Kolonizaciju olakšavaju i površinski proteini same bakterije koji olakšavaju vezivanje na stanice tkiva domaćina (Otto i sur., 2014). Poseban problem predstavljaju bakterijski enterotoksini što se vezuje uz trovanje namirnicama i toksični šok (Jørgensen i sur., 2005).

Često se spominje i u kontekstu antibiotske rezistencije koja je rezultat horizontalnog prijenosa gena iz vanjskog izvora i kromosomskih mutacija, što rezultira patogenosti ove vrste (Chambers i sur., 2009).

2.7.4. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je nesporogena, štapićasta gram - pozitivna bakterija koju je moguće pronaći u različitim okolišima kao što je tlo, voda, ljudskom i životinjskom organizmu (Hamon i sur., 2006). Stanice mogu formirati kratke lance ili biti u zasebnim jedinicama (Ryser i Marth, 2007). Može se razmnožavati pri temperaturama od 1 do 45 °C i pri relativno visokim koncentracijama soli. *L. monocytogenes* raste na temperaturi hladnjaka pogotovo u namirnicama životinjskog podrijetla kao što su meki sirevi (Wing i sur., 2002). Bakterija posjeduje flagele koje joj omogućuju karakteristično brzo kretanje na temperaturi od 20 do 25 °C, dok na 37 °C kretanje prestaju u potpunosti ili su jako usporene (Ryser i Marth, 2007). Osim sireva i ostalih mliječnih proizvoda, pronalazi se i u procesiranom mesu, svježem mesu i ribi, svježem povrću i jabučnom soku (Wing i sur., 2002).

Smatra se oportunističkom bakterijom koja bolest izaziva većinom kod imunokompromitiranih pojedinaca (Cossart i sur., 2008). Osim za imunokompromitirane osobe rizik predstavlja i za trudnice i novorođenčad. (Hamon i sur., 2006). Najčešće dolazi do gastroenteritisa, meningitisa, encefalitisa, prijenosa infekcije sa majke na plod i sepsu (Hamon i sur., 2006). Infekciju izaziva tako da prolazi kroz intestinalnu barijeru gdje naseljava intestinalni epitel. Bakteriji je tako

omogućen prolazak krvotokom do udaljenih organa. Osim toga, prolazi većinu barijera u ljudskom organizmu pa primjerice prolaskom kroz placentarnu barijeru lako inficira plod (Khelef i sur., 2006). Sustavna listerioza jedna je od najsmrtonosnijih bakterijskih infekcija. Prosječni postotak smrtnosti u liječenih bolesnika iznosi 20-30 %, a u neliječenih je osoba i veći (Vázquez- Boland i sur., 2001).

Sekvencioniranjem genoma *L. monocytogenes* utvrđena je prisutnost velikog broja gena koji kodiraju za površinske proteine, sekretorne proteine, transportne sustave i regulatorne proteine koji omogućuju ovoj bakteriji preživljavanje u različitim uvjetima (Cossart i sur., 2008).

2.7.5. *Candida albicans*

Candida albicans je najpoznatiji ljudski fungalni oportunistički patogen. Kao bezopasni komenzal živi u crijevima, spolno - mokraćnom sustavu i na koži. (Kim i sur., 2011). Karakteristično je da *C. albicans* ima prilagođene mehanizme kolonizacije cijelog gastrointestinalnog trakta u usporedbi sa bakterijama koje većinom koloniziraju određeno područje (Poulain, 2013).

Patogeno djelovanje se iskazuje u uvjetima oslabljenog imuniteta i poremećene bakterijske mikroflore, ali i promjenama u okolini u vidu promjene pH ili sadržaja nutrijenata (Kim i sur., 2011). Same infekcije mogu varirati od bezopasnih i lako rješivih smetnji kao što su kožne infekcije ili oralna i vaginalna kandidijaza do stanja u kojima je ugrožen život (Mayer i sur., 2013). Vaginalne kandidijaze se pojavljuju u 75 % žena minimalno jednom u životu, a u određenom postotku epizode se ponavljaju i utječu na kvalitetu života pacijentice (Poulain, 2013). Do težih komplikacija najčešće dolazi kod pacijenata koji su imuno kompromitirani ili imaju oslabljenu zaštitnu barijeru nakon ugradnje medicinskog uređaja (Calderone i Fonzi, 2001).

Candida albicans ima svojstvo rasta u više različitih morfoloških oblika. Njezini oblici mogu varirati od oblika kvasca do formiranja pseudohifa ili pravih hifa (Sudbery, 2011). Smatra se da je upravo ta mogućnost prelaska iz jednog oblika u drugi odgovorna za virulentnost ove vrste (Mayer i sur., 2013; Sudbery, 2011). Dokazano je da gubitak sposobnosti formiranja hifa utječe

na smanjenje virulentnosti (Sorgo i sur., 2010). *C. albicans* stvara biofilmove miješanih oblika stanica i na taj način se zaštićuje od djelovanja domaćina (Kim i sur., 2011). Biofilmove može stvarati i kombinirano sa bakterijama, gdje dolazi do sinergističkog štetnog djelovanja. Primjer toga je sinergističko djelovanje sa bakterijom *Staphylococcus aureus* gdje su obje vrste otpornije na djelovanje lijekova u formi kombiniranog biofilma, nego kada su odvojene (Morales i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Tijekom izrade ovog rada kao test mikroorganizmi za određivanje antimikrobnih svojstava i minimalne inhibitorne koncentracije prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala korišteni su odabrani sojevi bakterija: *Staphylococcus aureus* 3048 (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* 3112 (ATCC 23074), *Escherichia coli* 3014 (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* 3024 (ATCC 27853) te kvasac *Candida albicans* 86. Navedeni sojevi dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Navedeni bakterijski sojevi čuvaju se u hranjivom bujonu uz dodatak 30 % (v/v) glicerola, a kvasac u sladnom bujonu s 30 % (v/v) glicerola na -20 °C.

3.1.2 Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija *S. aureus* 3048, *L. monocytogenes* 3112, *E. coli* 3014, *P. aeruginosa* 3024 kao i za ispitivanje njihovih minimalnih inhibitornih koncentracija koristio se hranjivi bujon (Biolife, Italija), a za ispitivanje antimikrobnog djelovanja otapala hranjivi agar (Biolife, Italija).

Hranjivi bujon sastava:

- pepton 15 g/L
- mesni ekstrakt 3 g/L
- NaCl 5 g/L
- K₃PO₄ 0,3 g/L

pH vrijednost podloge je 7,3, a hranjivi agar je istog sastava kao i hranjivi bujon samo je u podlogu dodan agar od 18 g/L.

Za uzgoj kvasca *Candida albicans* 86 kao i za određivanje njegove minimalne inhibitorne koncentracije korišten je sladni bujon (Biolife, Italija) dok je za praćenje antimikrobnog djelovanja prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala korišten sladni agar (Biolife, Italija).

Sladni bujon sastava:

- sladni ekstrakt 17 g/L
- pepton 3 g/L

pH vrijednost podloge je 5,5.

Sladni agar sastava:

- maltoza 12,5 g/L
- dekstrin 2,5 g/L
- glicerol 1,0 g/L
- peptokompleks 2,6 g/L
- agar 17 g/L

pH vrijednost podloge je 4,6.

Dehidrirane hranjive podloge resuspendirane su u 1000 mL destilirane vode, nakon čega se otopina zagrijava dok se prah u potpunosti nije rastopio. Podloge su sterilizirane u autoklavu na 121 °C tijekom 15 - 20 minuta.

3.1.3. Pribor i aparatura

Pri provođenju eksperimenata korišteni su sljedeći pribor i aparatura:

- Laboratorijske čaše
- Stalci za epruvete
- Epruvete (16 × 160 mm)
- Safe - lock tube (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)

- Mikrotitarske ploče
- Čitač mikrotitarskih ploča (Tecan, Swizerland)
- Štapići po Drigalskom
- Histološka pinceta
- Diskovi od filter papira (ø 6 mm) (Macherey-Nagel GmbH, Njemačka)
- Bunsenov plamenik
- Pipetman 1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vibromikser Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija)
- Termostat (Sutjeska, Beograd)
- Autoklav (Sutjeska, Beograd)
- Ravnalo
- Mikrobiološka ušica

3.1.4 Kemikalije

- 96 % Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Mentol (Sigma, St. Luis, Mo, SAD)
- Timol (Sigma, St. Luis, Mo, SAD)
- Kamfor (Sigma, St. Luis, Mo, SAD)
- Miristinska kiselina (Sigma, St. Luis, Mo, SAD)
- Linolna kiselina (Sigma, St. Luis, Mo, SAD)
- Dekanska kiselina (Sigma, St. Luis, Mo, SAD)
- Kaprilna kiselina (Sigma, St. Luis, Mo, SAD)
- Ciprofloksacin (Sigma, St. Luis, Mo, SAD)

3.2 METODE RADA

3.2.1. Priprema kultura mikroorganizama i određivanje broja živih stanica

Mikroorganizmi korišteni u ovom radu se čuvaju na -20 °C u hranjivom, odnosno sladnom bujonu uz dodatak 30 % glicerola (v/v), stoga ih je prije upotrebe potrebno revitalizirati u hranjivom bujonu na 37 °C, odnosno u sladnom bujonu na 28 °C tijekom 24 sata. Tako revitalizirane kulture su naciepljene u svježe bujone, i inkubirane na odgovarajućim

temperaturama. Prekonočne kulture mikroorganizma su korištene za određivanje antimikrobne aktivnosti i minimalne inhibitorne koncentracije eutektičkih otapala.

Također, nakon prekonočnog uzgoja, s ciljem određivanja broja živih stanica, pripremljena su decimalna razrjeđenja bakterijskih kultura i kulture kvasca, u omjerima 1: 10. Zatim je po 0,1 mL određenih razrjeđenja svake suspenzije ispitivanih mikroorganizama otpipetiran na odgovarajuću hranjivu podlogu u Petrijevu zdjelicu i ravnomjerno razmazan štapićem po Driglaskom. Nakon inkubacije od 24 sata na 37 °C za bakterije, odnosno 28 °C za kvasac, izbrojane su porasle kolonije koje predstavljaju stvaran broj živih stanica i izražavaju se kao CFU vrijednosti (CFU, eng. *Colony Forming Units*) te su iznosile 10^7 - 10^8 CFU/mL.

3.2.2. Priprema prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Prirodna niskotemperaturna eutektička otapala su pripremljena od komponenti u određenim molarnim omjerima i kombinacijama i to Mentol: Miristinska kiselina (Me: Mya) u omjeru 8: 1, Mentol: Kamfor (Me: Cam) 1: 1, Mentol: Kaprilna kiselina (Me: C8) 1: 1, Mentol: Linolna kiselina (Me: C18: 2) 1: 1, Mentol: Timol (Me: Ty) u omjeru 3: 2, Timol: Kamfor (Ty: Cam) u omjeru 3: 2, Timol: Kaprilna kiselina (Ty: C8) u omjeru 1: 3, Timol: Dekanska kiselina (Ty: C10) u omjeru 1: 1 u koncentracijama 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL i 1 mg/mL za bakterije i koncentracijama 5 mg/mL, 10 mg/mL i 25 mg/mL za *C. albicans*. Kako bi se dobile željene koncentracije otapala ona su razrjeđivana s 96 % etanolom.

Terapeutska niskotemperaturna eutektička otapala (THEDES) pripremljena su na dva načina. Prvi način se odnosi na zagrijavanje izvornih komponenti timola, oktanske kiseline i ciprofloksacina u određenim molarnim omjerima prilikom čega se dobilo otapalo u koncentracijama 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL i 1 mg/mL, a drugi način pripreme uključuje zagrijavanje komponenti timola i oktanske kiseline dok se ne dobije homogeno otapalo u koje se naknadno otopio ciprofloksacin (Ty:C8 + Cip). Otapala su pripremljena u omjeru Cip: Ty: C8 0,03: 1: 3. Dobivena otapala su također u koncentracijama 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL i 1 mg/mL. Kako bi se dobile željene koncentracije otapala, razrjeđivani su s 96 % etanolom.

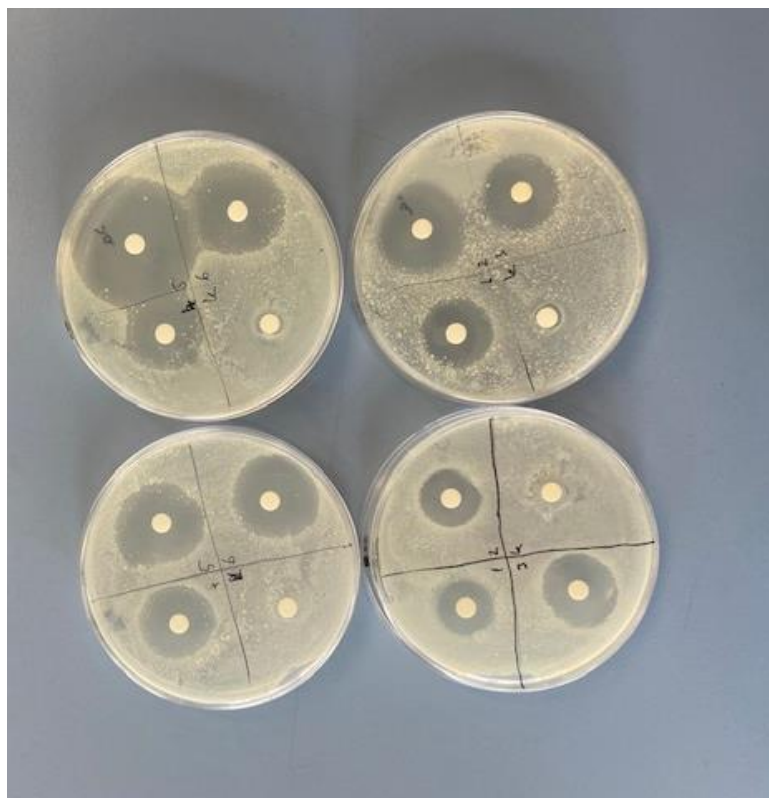
Otapala NADES - a i THEDES - a pripravljena su i pohranjena u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.2.3. Određivanje antimikrobnog djelovanja prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala disk difuzijskom metodom

Istraživanje antimikrobnog djelovanja osam pripremljenih NADES - a i dva pripremljena THEDES - a u 3 koncentracije provedeno je disk difuzijskom metodom, mjerenjem zona inhibicije rasta bakterija i kvasca.

Na odgovarajuće hranjive podloge pipetom je nacijepljeno 100 μ L svakog pripremljenog test mikroorganizma te je svaki pomoću štapića po Drigalskom jednoliko razvučen po površini hranjive podloge razmazivanjem u svim smjerovima kako bi rast mikroorganizama bio ravnomjeran.

Nakon nacijepljivanja, unutar 30 minuta od razmazivanja, na inokulirane hranjive podloge, sterilnom pincetom su dodani filter diskovi prethodno umočeni u otapala željene koncentracije. Pinceta je sterilizirana etanolom i plamenom, a ispitivanje je provedeno u duplikatu za svako otapalo. Diskovi moraju biti dovoljno razmaknuti kako ne bi došlo do preklapanja zona inhibicije, a svaki disk nakon stavljanja na podlogu lagano je pritisnut kako bi se omogućilo bolje prijanjanje i difuzija u okolinu. Ploče s nacijepljenim kulturama i diskovima stavljene su na inkubaciju tijekom 24 sata pri 37 °C za bakterije, odnosno 28 °C za kvasac. Ako je soj osjetljiv na otapalo to je vidljivo kao prozirna zona u kojoj nema rasta mikroorganizma oko diska (slika 9). Promjer zone inhibicije rasta mikroorganizama je nakon 24 sata izmjeren ravnalom.



Slika 9. Zone inhibicije rasta na čvrstim podlogama u Petrijevim zdjelicama (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala i terapijskih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Minimalna inhibitorna koncentracija je najniža koncentracija neke tvari koja inhibira porast mikroorganizama nakon 24 satne inkubacije, a dokazan joj je antimikrobni učinak (Andrews, 2001). Najčešća metoda koja se koristi za određivanje je metoda dilucije (razrjeđenja) u bujonu pomoću mikrotitarske ploče. Metoda dilucije u bujonu bazira se na tome da se u jažice mikrotitarske ploče, najčešće sa 96 polja, pipetira hranjiva podloga sa kulturom ispitivanog mikroorganizma zajedno s otapalom koje se prethodno razrijedi na različite koncentracije (Wiegand i sur., 2008). Ploča se stavlja na inkubaciju u termostatu za bakterije pri temperaturi od 37 °C, a za kvasac 28 °C tijekom 24 sata. Sama inhibicija mikrobnog rasta vidljiva je i golim okom prilikom čega je vidljivo da u toj jažici nije došlo do zamućenja podloge. Danas se pak najčešće koriste uređaji koji olakšavaju očitavanje mikrobnog porasta.

Na temelju dobivenih rezultata inhibicije rasta mikroorganizma disk difuzijskom metodom određeno je pri kojoj najnižoj koncentraciji otapala nije došlo do mikrobnog porasta. Otapalo te koncentracije je potom razrijeđeno 2, 4, 8, 16, 32 i 64 puta s 96 % etanolom. U prvu je tubu otpipetirano 1mL otapala koncentracije pri kojoj je postignuta inhibicija rasta. U ostalih šest tuba je otpipetirano po 0,5 mL 96 % etanola. Iz prve tube u slijedeću je preneseno 0,5 mL početnog otapala prilikom čega je postignuto razrjeđenje 2 puta. Postupak se ponavlja tako da se serijski prenosi po 0,5 mL u slijedeću tubu sve do razrjeđenja od 64 puta.

U jažice mikrotitarske ploče u prvi stupac za svaki mikroorganizam otpipetirano je po 200 μ L hranjivog bujona s kulturom bakterija *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* 3112, *Escherichia coli* 3014, *Pseudomonas aeruginosa* 3024 i sladnog bujona sa kvascem *Candida albicans* 86. Jažice koje sadržavaju kulturu mikroorganizama korištene su kao pozitivna kontrola. U sljedeći stupac otpipetirano je po 100 μ L hranjive podloge i po 100 μ L svakog ispitivanog otapala što je predstavljalo negativnu kontrolu. U ostale jažice otpipetirano je po 100 μ L hranjive podloge sa kulturom mikroorganizma i po 100 μ L svakog ispitivanog otapala razrijeđenog 0, 2, 4, 8, 16, 32 i 64 puta.

Mikrotitarske ploče s bakterijskim kulturama stavljene su na inkubaciju na 37 °C, a ploča s naciepljenom kulturom kvasca na 28 °C. Nakon inkubacije od 24 sata, mjerena je prividna apsorbanacija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Tecan, Swizerland).

3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi pokusi provedeni su u duplikatu. Za pripremu i statističku obradu rezultata dobivenih istraživanjem korišten je program Microsoft Office Excel 2016.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedeno je istraživanje antimikrobnog djelovanja osam novih hidrofobnih prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala: mentol: miristinska kiselina (Me: Mya), mentol: kamfor (Me: Cam), Mentol: Kaprilna kiselina (Me: C8), Mentol: Linolna kiselina (Me: C18: 2), Mentol: Timol (Me: Ty), Timol: Kamfor (Ty: Cam), Timol: Kaprilna kiselina (Ty: C8), Timol: Dekanska kiselina (Ty: C10) u različitim koncentracijama (0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL) prema odabranim test mikroorganizmima, dvjema gram - pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* 3112 te dvjema gram - negativnim bakterijama *Escherichia coli* 3014 i *Pseudomonas aeruginosa* 3024, ali i prema kvascu *Candida albicans* 86. Navedeni mikroorganizmi su česti ljudski patogeni koji izazivaju infekcije brojnih organskih sustava u ljudskom organizmu. Liječenje se odvija korištenjem antibiotika i antimikotika, ali uz rastući problem otpornosti na dosad poznate lijekove, smanjene permeabilnosti i dostupnosti, smanjene iskoristivosti pojavila se potreba za njihovim poboljšanjem. Antimikrobni potencijal ovih otapala određen je disk difuzijskom metodom, gdje je promjer zone inhibicije mjeran u milimetrima. Cilj je bio odrediti koje od navedenih otapala ima najveći antimikrobni potencijal kako bi se potencijalno mogao iskoristiti u industriji lijekova.

Na temelju rezultata dobivenih disk difuzijskom metodom, otapalo Ty: C8 pokazalo je najbolji potencijal za formiranje terapijskog niskotemperaturnog eutektičkog otapala sa ciprofloksacinom. Ciprofloksacin je dodavan na dva načina. Prvi se odnosio na zagrijavanje ciprofloksacina zajedno sa timolom i oktanskom kiselinom tako da se sve komponente prevedu u oblik terapijskog niskotemperaturnog eutektičkog otapala. Druga metoda pripreme je uključivala prethodnu pripremu prirodnog niskotemperaturnog eutektičkog otapala sa timolom i oktanskom kiselinom i naknadno otapanje ciprofloksacina gdje se dobila formulacija. Uspoređivano je koja od navedenih metoda pripreme terapijskog otapala sa ciprofloksacinom pokazuje veći antimikrobni potencijal prema bakterijama. Antimikrobno djelovanje THEDES - a u trima koncentracijama (0,1 mg/mL, 0,5 mg/ mL i 1 mg/mL) također je određeno disk difuzijskom metodom, promjer zone inhibicije mjeran je u milimetrima.

Svi pokusi provedeni u paraleli, a vrijednosti mjerenja zona inhibicije izražena su kao aritmetička sredina dva ponavljanja.

Za sve NADES - e i THEDES - e određena je i minimalna inhibitorna koncentracija metodom razrjeđivanja otapala. Određeno je pri kojoj je to najnižoj koncentraciji otapala (razrijeđeno 2,

4, 8, 16, 32, 64 puta) došlo do inhibicije vidljivog rasta mikroorganizama. Ploče su očitane pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Tecan, Switzerland).

4.1. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST NISKOTEMPERATURNIH PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Kako bi se utvrdila antimikrobna aktivnost NADES - a i THEDES - a pripremljenih u različitim koncentracijama, provedena je disk difuzijska metoda. Rezultati su izraženi u milimetrima zone inhibicije rasta. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama (tablice 2 - 10). Sva otapala su pokazala inhibicijsku aktivnost prema svim mikroorganizmima, a varijacije su u koncentracijama pri kojima dolazi do inhibicije.

Bakterija *S. aureus* (tablica 2) pokazala je osjetljivost pri 0,1 mg/mL za otapala Me: Mya, Me: Ty, Ty: Cam, Ty: C8 i Ty: C10. Pri 0,5 mg/mL bakterija je bila osjetljiva na otapala Me: Cam, Me: C8 i Me: C18:2. Najveća zona inhibicije rasta bakterije *S. aureus* uočena je kod otapala Me: Cam i Me: Mya pri koncentracijama od 0,5 mg/mL, odnosno 1 mg/mL sa zonama inhibicije 9,50 mm te kod otapala Me: Ty u koncentraciji 0,5 mg/mL s najširokom zonom inhibicije od 10 mm što je vidljivo u tablici 2. Prva dva otapala u svom sastavu sadrže mentol kao komponentu pa se može smatrati da je upravo mentol djeluje u sinergiji na inhibiciju rasta bakterije. Prema istraživanju Qiu i sur. (2011), mentol smanjuje ekspresiju ekstracelularnih proteina odgovornih za virulenciju *S. aureus*. Istraživanje je također pokazalo da je djelovanje mentola na bakteriju vezano uz njegovu koncentraciju i pri višim koncentracijama inhibitorno djelovanje se pojačava. Hidrofobni karakter mentola omogućava i djelovanje na staničnu membranu te može izazvati oštećenja membrane i promjenu morfoloških karakteristika bakterijskih stanica. Masne kiseline kao što je miristinska kiselina pokazale su toksičnost prema bakterijskim kulturama koja je izravno vezana uz dozu (Kitahara i sur., 2004). Iz tablice 2 je vidljivo da djelovanje otapala Me:Mya linearno raste s povećanjem koncentracije. Mentol i kaprilna kiselina kao pojedinačne komponente te kao komponente NADES - a pokazali su antimikrobno djelovanje na bakteriju *S. aureus* (Al-Akayaleh i sur., 2022). Kod otapala Me: Ty vidljivo je da povećanjem koncentracije otapala ne dolazi do pojave zone inhibicije, tako je otapalo pri 0,5 mg/mL pokazalo najveći stupanj inhibicije rasta *S. aureus*, a pri 1 mg/mL nije uopće došlo do inhibicije. Ova pojava se potencijalno može pripisati razlici koncentracije otapala i unutarstanične tekućine bakterijske stanice i u okolišu što rezultira fenomenom da otapalo nema antimikrobno djelovanje sa povećanjem koncentracije. Isti slučaj je vidljiv i kod otapala Ty: C8

i Ty: C10. Svim otapalima je zajedničko da sadrže timol pa njegova koncentracija može ispoljavati antimikrobno djelovanje prema ispitivanoj bakteriji.

Listeria monocytogenes (tablica 3) kao još jedna gram - pozitivna bakterija, pokazala je osjetljivost na svih 8 ispitivanih otapala što je vidljivo po većem broju zona inhibicije oko diskova. Sama širina zona za obje bakterije je podjednaka, a ovisna je o koncentraciji otapala što je vidljivo iz tablice 3. Najšira zona inhibicije vidljiva je kod otapala Ty: Cam i ona iznosi 11,5 mm pri koncentraciji otapala od 0,1 mg/mL. Kod čak 5 otapala zone inhibicije nisu bile vidljive pri koncentraciji od 0,1 mg/mL i to za otapala Me: C8, Me: C18: 2, Me: Ty, Ty: C8 i Ty: C10. Za ove NADES - e može se zaključiti kako njihovo antimikrobno djelovanje ovisi o primijenjenoj koncentraciji. Također, bitno je naglasiti da dugolančane masne kiseline pokazuju jače inhibitorno djelovanje prema gram - pozitivnim bakterijama nego prema gram - negativnim pa dobiveni rezultati koji su niži od očekivanih mogu biti posljedica niže koncentracije otapala (Kitahara i sur., 2004). Može se zaključiti da pravilan odabir komponenata koje bi bile donor vodikove veze i akceptor vodikove veze utječe na toksičnost NADES - a (Zhao i sur., 2015).

Tablica 2. Promjeri zona inhibicije rasta bakterije *S. aureus* 3048 u prisutnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|----------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Me: Mya | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | $8,50 \pm 2,12$ |
| | 1 mg/mL | $9,50 \pm 2,12$ |
| Me: Cam | 0,1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0,5 mg/mL | $9,50 \pm 0,71$ |
| | 1 mg/mL | $9,50 \pm 2,12$ |
| Me: C8 | 0,1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0,5 mg/mL | $8,50 \pm 0,71$ |
| | 1 mg/mL | 7 ± 0 |
| Me: C18: 2 | 0,1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 8 ± 0 |
| Me: Ty | 0,1 mg/mL | 8 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 10 ± 0 |
| | 1 mg/mL | nema inhibicije |
| Ty: Cam | 0,1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0,5 mg/mL | 8 ± 0 |
| | 1 mg/mL | $8,50 \pm 0,71$ |
| Ty: C8 | 0,1 mg/mL | 8 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | $8,50 \pm 0,71$ |
| | 1 mg/mL | nema inhibicije |
| Ty: C10 | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | $8,00 \pm 1,41$ |
| | 1 mg/mL | nema inhibicije |

Tablica 3. Promjeri zona inhibicije rasta bakterije *L. monocytogenes* 3112 u prisutnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|----------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Me: Mya | 0, 1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0, 5 mg/mL | 8,50 ± 0,71 |
| | 1 mg/mL | 10,50 ± 0,71 |
| Me: Cam | 0, 1 mg/mL | 6,50 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 8,50 ± 2,12 |
| Me: C8 | 0,1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0,5 mg/mL | 8,50 ± 0,71 |
| | 1 mg/mL | 9 ± 0 |
| Me: C18: 2 | 0,1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 8 ± 0 |
| Me: Ty | 0, 1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0, 5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 10 ± 1,41 |
| Ty: Cam | 0, 1 mg/mL | 11,5 ± 0,71 |
| | 0, 5 mg/mL | 11 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 8 ± 0 |
| Ty: C8 | 0, 1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0, 5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 8 ± 0 |
| Ty: C10 | 0, 1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0, 5 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| | 1 mg/mL | 8,50 ± 0,71 |

Tablica 4. Promjeri zona inhibicije rasta bakterije *E. coli* 3014 u prisutnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|----------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Me: Mya | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| Me: Cam | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| Me: C8 | 0,1 mg/mL | 8 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 11 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 7 ± 0 |
| Me: C18: 2 | 0,1 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 9 ± 0 |
| Me: Ty | 0,1 mg/mL | 8 ± 1,41 |
| | 0,5 mg/mL | 8 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 9,50 ± 0,71 |
| Ty: Cam | 0,1 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 8,50 ± 0,71 |
| Ty: C8 | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| Ty: C10 | 0,1 mg/mL | 10 ± 1,41 |
| | 0,5 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| | 1 mg/mL | 8,50 ± 0,71 |

Tablica 5. Promjeri zona inhibicije rasta bakterije *P. aeruginosa* 3024 u prisutnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|------------|-----------------------|------------------------------|
| Me: Mya | 0,1 mg/mL | $8 \pm 1,41$ |
| | 0,5 mg/mL | $8,50 \pm 2,12$ |
| | 1 mg/mL | 8 ± 0 |
| Me: Cam | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 8 ± 0 |
| Me: C8 | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | $11,50 \pm 2,12$ |
| | 1 mg/mL | $8,50 \pm 0,71$ |
| Me: C18: 2 | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 8 ± 0 |
| | 1 mg/mL | 7 ± 0 |
| Me: Ty | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | $7,50 \pm 0,71$ |
| | 1 mg/mL | 9 ± 0 |
| Ty: Cam | 0,1 mg/mL | 7 ± 0 |
| | 0,5 mg/mL | 8 ± 0 |
| | 1 mg/mL | $8,50 \pm 0,71$ |
| Ty: C8 | 0,1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0,5 mg/mL | $8,50 \pm 0,71$ |
| | 1 mg/mL | $7,50 \pm 0,71$ |
| Ty: C10 | 0,1 mg/mL | nema inhibicije |
| | 0,5 mg/mL | $7,50 \pm 0,71$ |
| | 1 mg/mL | 8 ± 0 |

Rezultati istraživanja pokazali su da kod gram - negativnih bakterija dolazi do pojave zona inhibicija primjenom svih otapala. Kod bakterije *E. coli* (tablica 4) zone su vidljive pri najnižoj koncentraciji od 0,1 mg/mL za sva otapala. Širine zona kreću se u prosjeku oko 7 mm, a najšire zone su vidljive za otapala Ty: C10 pri koncentraciji od 0,1 mg/mL i iznosi 10 mm te za otapalo Me: C8 pri koncentraciji od 0,5 mg/mL prilikom čega je vidljiva zona širine 11 mg/mL. Za Me:

C8 vidljiv je i blagi pad promjera zone inhibicije prilikom povećanja koncentracije otapala na 1 mg/mL što je vidljivo u tablici 4.

Kod bakterije *P. aeruginosa* (tablica 5) također su vidljive zone inhibicije za sva otapala od kojih je najšira zona otapala Me: C8 od 0,5 mg/mL i ona iznosi 11,5 mg/mL. Također, vidljivo je da otapala koja sadrže masne kiseline, a to su Ty: C8, Ty: C10, Me: C18: 2 i Me: C8 povećanjem koncentracije nisu pokazala jači inhibitorni učinak na bakteriju *P. aeruginosa* te je razlika u širini zona pri 0,5 mg/mL i 1 mg/mL minimalna ili su se pojavile uže zone pri većoj koncentraciji.

Dobiveni rezultati za obje bakterije razlikuju se od rezultata koje su dobili Al- Akayleh i sur. (2022) i Silva i sur. (2019b) i prema kojima niti *E. coli* niti *P. aeruginosa* nisu pokazale mikrobnju osjetljivost na oktansku kiselinu. Može se smatrati da se antimikrobno djelovanje masnih kiselina povećava miješanjem s timolom (tablica 4 i 5) koji je prema istraživanju Mathela i sur. (2010) kao samostalna komponenta pokazao antimikrobno djelovanje na *E. coli*. Također, smatra se da je kombinacija srednjelančanih masnih kiselina i timola odgovorna za antimikrobno djelovanje eteričnih ulja (Kim i Rhee, 2016). Gram - negativne bakterije su uglavnom poznate kao otporne na antimikrobno djelovanje masnih kiselina zbog kompleksne strukture plazmatske membrane odnosno zbog prisutnosti lipopolisaharida u vanjskoj membrani koji sprječavaju ulazak vanjskih agensa (Al-Akayaleh i sur., 2022). Međutim, smatra se da je *E. coli* ipak propusnija za ulazak tvari u stanicu zahvaljujući porinama membrane koji omogućavaju ulazak hidrofilnih tvari pasivnom difuzijom, a kod *P. aeruginosa* porini izostaju (Al-Akayaleh i sur., 2022). Istraživanje Radošević i sur. (2018) u kojem je testirano antimikrobno djelovanje hidrofilnih otapala također sugerira da su gram - negativne bakterije otpornije na djelovanje otapala kao posljedica smanjene propusnosti vanjske lipopolisaharidne membrane. Neka istraživanja pokazala su da NADES - i imaju utjecaj na lipidnu membranu eukariotskih stanica prilikom čega joj povećavaju propusnost, ali još nije točno utvrđen utjecaj na membrane bakterijskih stanica i smatra se da djelovanje samog NADES - a ovisi o strukturi membrane bakterije, pH, osmolalnosti i sl. (Wikene i sur., 2017; Hayyan i sur., 2015)

Tablica 6. Promjeri zona inhibicije rasta kvasca *C. albicans* 86 u prisutnosti prirodnih niskotemperaturnih eutektičkih otapala

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|------------|-----------------------|------------------------------|
| Me: Mya | 5 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| | 10 mg/mL | 9 ± 1,41 |
| | 25 mg/mL | 10,50 ± 0,71 |
| Me: Cam | 5 mg/mL | 8 ± 1,41 |
| | 10 mg/mL | 8,50 ± 2,12 |
| | 25 mg/mL | 12 ± 1,41 |
| Me: C8 | 5 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| | 10 mg/mL | 8 ± 0 |
| | 25 mg/mL | 10 ± 1,41 |
| Me: C18: 2 | 5 mg/mL | 8 ± 1,41 |
| | 10 mg/mL | 10,50 ± 2,12 |
| | 25 mg/mL | nema inhibicije |
| Me: Ty | 5 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| | 10 mg/mL | 7,50 ± 0,71 |
| | 25 mg/mL | 13,50 ± 0,71 |
| Ty: Cam | 5 mg/mL | 7 ± 4,24 |
| | 10 mg/mL | 9,50 ± 2,12 |
| | 25 mg/mL | 10 ± 1,41 |
| Ty: C8 | 5 mg/mL | 8 ± 1,41 |
| | 10 mg/mL | 9 ± 1,41 |
| | 25 mg/mL | 9,50 ± 0,71 |
| Ty: C10 | 5 mg/mL | 11,50 ± 2,12 |
| | 10 mg/mL | 8,50 ± 0,71 |
| | 25 mg/mL | 10 ± 1,41 |

Kvasac *Candida albicans* pokazao je osjetljivost za sva otapala pri koncentracijama od 5, 10 i 25 mg/mL, osim otapala Me: C18:2 gdje nije bila vidljiva zona pri najvećoj koncentraciji. Najšire zone su vidljive za otapalo Me: Cam pri 25 mg/mL gdje je širina zone iznosila 12 mm te otapalu Me: Ty, također pri 25 mg/mL sa širinom zone od 13 mm (tablica 6). Također, vidljivo je da kod svih otapala izuzev Me: C18: 2 i Ty: C10 porast koncentracije uzrokuje šire zone oko diskova. Ovi rezultati se poklapaju s rezultatima Silve i sur. (2019b), gdje su

formulacije NADES - a koje su sadržavale masne kiseline ujedno pokazale i dobru inhibitornu aktivnost prema kvascu *C. albicans*. Također, smatra se da *Candida albicans* ima sposobnost prilagodbe stupnja hidrofobnosti svoje membrane kroz životni ciklus. Samim time može se pretpostaviti da se osjetljivost ovog mikroorganizma na hidrofobna otapala može povisiti tako da se otapalo dozira u odgovarajućem ciklusu kada su stanice najosjetljivije i samim time smanjuje virulentnost (Silva i sur., 2019b; Glee i sur., 1995). Također, uže zone mogu biti i rezultat temperature inkubacije jer pri višim temperaturama otapala brže difundiraju (Silva i sur., 2019b). *Candida albicans* pokazala je osjetljivost i na djelovanje masnih kiselina kao samostalnih komponenti (Huang i sur., 2011).

Na temelju rezultata disk difuzijske metode za NADES - e kao najreprezentativnije otapalo prepoznato je otapalo C8: Ty, koje je sa ciprofloksacinom korišteno u formulaciji THEDES - a. Ponovno je provedena disk difuzijska metoda sa THEDES - om i formulacijom NADES - a i ciprofloksacina čiji su rezultati vidljivi u tablicama 7, 8, 9 i 10.

Tablica 7. promjer zona inhibicije bakterije *S. aureus* 3048 u prisutnosti THEDES - a

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|--------------|-----------------------|------------------------------|
| C8: TY + Cip | 0,1 mg/mL | 20 ± 1,41 |
| | 0,5 mg/mL | 25,5 ± 0,71 |
| | 1 mg/mL | 24 ± 2,83 |
| THEDES | 0,1 mg/mL | 21,5 ± 0,71 |
| | 0,5 mg/mL | 32 ± 7,07 |
| | 1 mg/mL | 27 ± 2,83 |

Tablica 8. promjer zona inhibicije bakterije *L. monocytogenes* 3112 u prisutnosti THEDES - a

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|-------------|-----------------------|------------------------------|
| C8:TY + Cip | 0,1 mg/mL | 19,5 ± 2,12 |
| | 0,5 mg/mL | 22 ± 1,41 |
| | 1 mg/mL | 26,5 ± 2,12 |
| THEDES | 0,1 mg/mL | 36 ± 5,66 |
| | 0,5 mg/mL | 46 ± 2,83 |
| | 1 mg/mL | 37,5 ± 3,54 |

Tablica 9. promjer zona inhibicije bakterije *E. coli* 3014 u prisutnosti THEDES-a

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|--------------|-----------------------|------------------------------|
| C8: TY + Cip | 0,1 mg/mL | 34,5 ± 0,70 |
| | 0,5 mg/mL | 28 ± 4,24 |
| | 1 mg/mL | 24,5 ± 0,70 |
| THEDES | 0,1 mg/mL | 30 ± 1,41 |
| | 0,5 mg/mL | 37,5 ± 3,54 |
| | 1 mg/mL | 36,5 ± 4,95 |

Tablica 10. promjer zona inhibicije bakterije *P. aeruginosa* 3024 u prisutnosti THEDES-a

| OTAPALO | koncentracija (mg/mL) | Promjer zone inhibicije (mm) |
|--------------|-----------------------|------------------------------|
| C8: TY + Cip | 0,1 mg/mL | 26 ± 9,8 |
| | 0,5 mg/mL | 30 ± 14,14 |
| | 1 mg/mL | 25 ± 0 |
| THEDES | 0,1 mg/mL | 25,5 ± 0,71 |
| | 0,5 mg/mL | 31,5 ± 2,12 |
| | 1 mg/mL | 30,5 ± 0,70 |

Rezultati pokazuju puno bolje inhibitorno djelovanje THEDES - a u usporedbi s NADES - ima (tablice 7 - 10). Vidljivo je da su i gram-negativne i gram - pozitivne bakterije osjetljive i na sam THEDES i na formulaciju pri svim koncentracijama. Za sve bakterije i kod THEDES - a i kod formulacije vidljiva je pojava gdje dolazi do blagog pada širine zona inhibicije pri koncentraciji od 1 mg/mL izuzev djelovanja formulacije na *L. monocytogenes* gdje je najšira zona vidljiva pri koncentraciji od 1 mg/mL otapala C8: Ty + Cip (tablica 8). Zone su podjednake širine i kod gram - negativnih i kod gram - pozitivnih bakterija, što znači da je ovaj THEDES adekvatan pri inhibiciji rasta svih testiranih vrsta. Aroso i sur. (2016) su također dobili slične rezultate za bakterije *E. coli* i *S. aureus* sa svojim otapalima. U usporedbi širine zona THEDES - a i formulacije vidljivo je da su zone ipak šire primjenom THEDES - a prilikom čega je ciprofloksacin zagrijavan skupa sa ostale dvije primarne komponente. Najšira zona je primijećena kod THEDES - a pri koncentraciji 0,5 mg/mL kod bakterije *L. monocytogenes*.

Također, najuža zona inhibicije od 19,5 mm vidljiva je također za bakteriju *L. monocytogenes* (tablica 8). Eutektička otapala su se pokazala obećavajućima kao nosači aktivnih farmaceutskih komponenti koje imaju smanjenu topljivost, a samim time i djelovanje u dosad korištenim otapalima (Pedro i sur., 2019). Vidljivo je da ciprofloksacin u formi THEDES - a zadržava svoje antibakterijsko djelovanje te se ono i pojačava kad se prevede u otapalo (tablice 7-10). Potrebno je provoditi daljnja istraživanja o toksičnosti eutektičkih otapala na česte patogene, a njihovo korištenje u terapijske svrhe sve više zaokuplja pažnju (Marchel i sur. 2022)

Pažljivim odabirom prirodnih komponenti dobivaju se THEDES - i koji su tekući na sobnoj temperaturi, a dokazano je da poboljšavaju topivost aktivnih farmaceutskih komponenti, a zadržavaju svoje antibakterijsko djelovanje (Aroso i sur. 2016).

Disk difuzijska metoda je brza, jednostavna i jeftina metoda koja se koristi za utvrđivanje antimikrobnog djelovanja tvari, no kod NADES - a treba uzeti u obzir potencijalnu potrebu za prilagodbom u ovisnosti o samom sastavu otapala Tijekom inkubacije, spoj radijalno difundira s diska u hranjivu podlogu. Ukoliko ispitivana tvar inhibira rast mikroorganizma to će biti vidljivo kao svijetla zona u kojoj nema poraslih kolonija. Mjerenjem zone inhibicije (mm) oko diska utvrđuje se osjetljivost mikroorganizma na otapalo, a sama širina zone je proporcionalna osjetljivosti mikroorganizma (Marchel i sur., 2022).

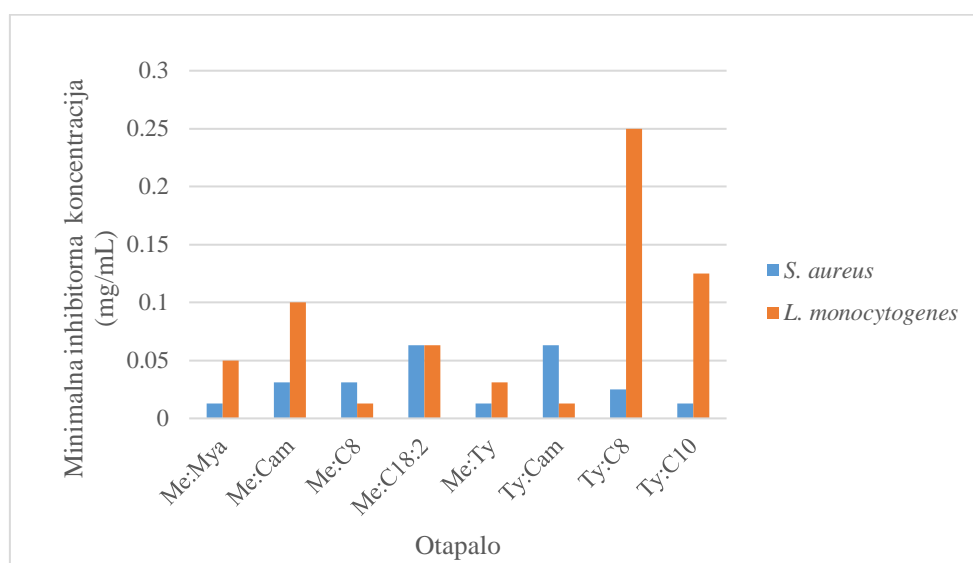
Prije samog određivanja antimikrobnog djelovanja, potrebno je prethodno skupiti informacije o fizikalno - kemijskim svojstvima kako gotovog otapala, tako i korištenih komponenti. Na rezultate utječe viskoznost i gustoća otapala jer oni direktno utječu na mogućnost difuzije otapala sa diska u hranjivu podlogu. Na uspješnost metode utječu i pH otapala, ionizacija, molekulska masa, molekulska struktura te hidrofobnost ili hidrofilnost tvari koji moraju biti povoljni za mikrobni rast (Marchel i sur., 2022). Prilikom difuzije otapala u podlogu nastaje gradijent koncentracije ispitivane tvari. Osjetljivi mikroorganizmi ugibaju već pri malim koncentracijama otapala, dok oni otporniji mogu rasti sve do ruba filter diska.

Važnu ulogu igra pravilan izbor test mikroorganizama, a potrebno je obratiti pažnju i na količinu inokuluma mikroorganizma jer prevelika količina smanjuje zonu inhibicije (Marchel i sur., 2022).

Sama širina zone inhibicije ne može se koristiti kao jedini kriterij pri određivanju antimikrobnog potencijala otapala, ulogu igra i debljina i sastav hranjive podloge. Između nutrijenata i mineralnih tvari hranjive podloge i otapala može doći do unakrsne reakcije koja utječe na mikrobni rast i pH (Torregrosa-Crespo i sur., 2020).

4.2. MINIMALNA INHIBITORNA KONCENTRACIJA NISKOTEMPERATURNIH PRIRODNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA

Na temelju rezultata dobivenih disk difuzijskom metodom provedeno je određivanje minimalne inhibitorne koncentracije metodom razrjeđivanja bujona, a dobivene vrijednosti očitane su na čitaču mikrotitarskih ploča (Tecan, Swizerland). Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije uzima se najniža koncentracija otapala kod koje je vidljiva zona inhibicije rasta test mikroorganizama. Otapalo te koncentracije potom je razrijeđeno 2, 4, 8, 16, 32 i 64 puta te se zajedno s test mikroorganizmom dispergiranim u hranjivom bujonu stavlja u jažice mikrotitarske ploče. Nakon 24 sata rezultati se očitaju na čitaču mikrotitarskih ploča (Tecan, Swizerland) i vidljivi su na slikama 10 - 16.

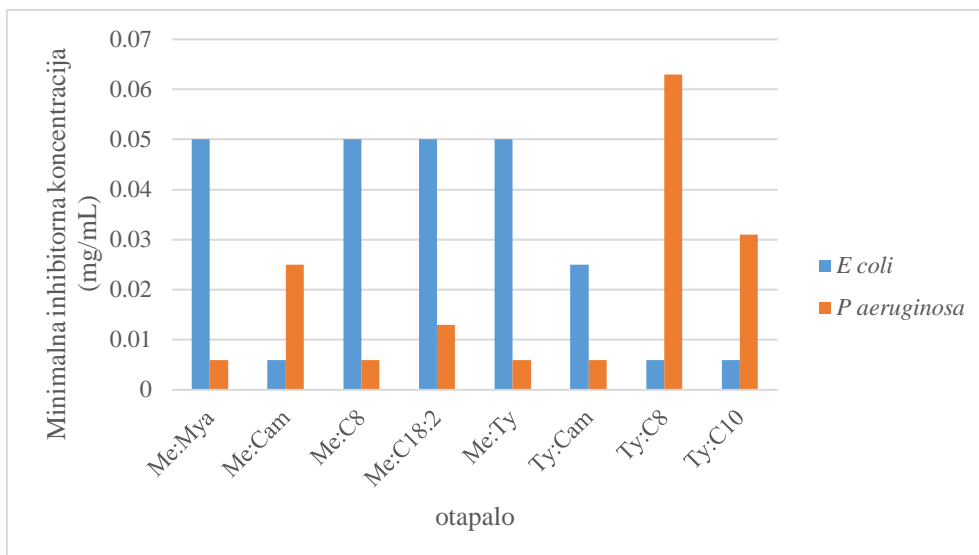


Slika 10. Usporedba minimalne inhibitorne koncentracije NADES - a: mentol: miristinska kiselina (Me: Mya), mentol: kamfor (Me: Cam), mentol: oktanska kiselina (Me: C8), mentol: linolna kiselina (Me: C18: 2), mentol: timol (Me: Ty), timol: kamfor (Ty: Cam), timol: oktanska kiselina (Ty: C8) i timol: dekanska kiselina (Ty: C10) za gram - pozitivne bakterije

Na slici 10 vidljivi su rezultati MIC - a za osam NADES - a gram-pozitivnih bakterija *S. aureus* i *L. monocytogenes*. Za bakteriju *S. aureus* vidljivo je da inhibitorni učinak imaju otapala Me:

Mya, Me: Ty i Ty: C10 i to pri koncentracijama od 0,013 mg/mL. Sva tri otapala razrijeđena su od početne koncentracije od 0,1 mg/mL (tablica 2). Odmah nakon slijede otapalo Ty: C8 s koncentracijom od 0,025 mg/mL te Me: Cam i Me: C8 sa koncentracijom od 0,031 mg/mL. Otapala Me: C18:2 i Ty: Cam s koncentracijom od 0,063 mg/mL su pokazala najslabije antimikrobno djelovanje. Oba otapala su razrijeđena od početne koncentracije od 0,5 mg/mL (tablica 2). Ovi rezultati u skladu su s rezultatima Al- Akayaleh (2022), koji su uočili da je otapalo pripremljeno od mentola i dekanske kiseline pokazalo jako inhibitorno djelovanje na rast bakterije *S. aureus*, a samo djelovanje otapala je bilo jače od djelovanja pojedinačnih komponenti. Osim mentola i dekanske kiseline, timol također odlično djeluje na inhibiciju rasta *S. aureus* (Zarrini i sur., 2010).

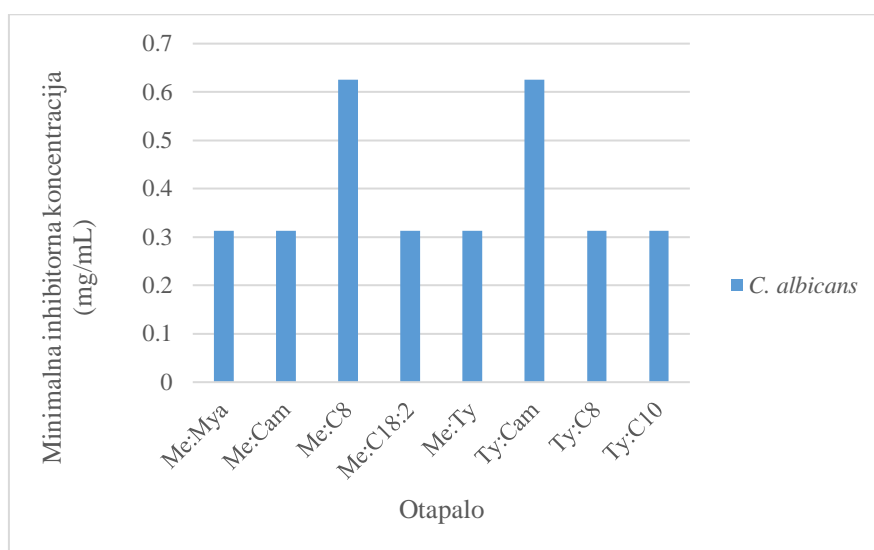
L. monocytogenes najosjetljivija je na djelovanje otapala Me: C8 i Ty: Cam i to pri koncentracijama od 0,013 mg/mL. Otapalo Me: C8 razrijeđeno je od početne koncentracije 0,5 mg/mL, a Ty: Cam od 0,1 mg/mL (tablica 3). Ty: Cam od svih otapala ima najjače inhibitorno djelovanje na *L. monocytogenes*. Odmah nakon slijede Me: Ty sa 0,025 mg/mL i Me: Mya sa 0,050 mg/mL. Najslabije djelovanje su pokazala otapala Ty: C10 i Ty: C8 i to pri koncentracijama 0,125 mg/mL i 0,250 mg/mL. Oba otapala su razrijeđena od početne koncentracije od 0,5 mg/mL (tablica 3). Također, oba sadrže masnu kiselinu i timol. Ovi rezultati se razlikuju od rezultata dobivenih za drugu testiranu gram - pozitivnu bakteriju *S. aureus*, koja je pokazala značajno bolju osjetljivost na navedena otapala (slika 10). Silva i sur. (2019b) su zaključili da na gram-pozitivne bakterije inhibitorno najbolje djeluju masne kiseline srednjeg ili dugačkog lanca. *L. monocytogenes* se pokazala puno manje osjetljivom na djelovanje većine otapala u usporedbi sa *S. aureus*, a poznato je da je *L. monocytogenes* vrlo otporna i na uvjete hlađenja, kao i na većinu poznatih dezinfekcijskih sredstava (Mpundu i sur., 2022).



Slika 11. Usporedba minimalne inhibitorne koncentracije NADES – a: mentol: miristinska kiselina (Me: Mya), mentol: kamfor (Me: Cam), mentol: oktanska kiselina (Me: C8), mentol: linolna kiselina (Me: C18: 2), mentol: timol (Me: Ty), timol: kamfor (Ty: Cam), timol: oktanska kiselina (Ty: C8) i timol: dekanska kiselina (Ty: C10) za gram - negativne bakterije

Slika 11 prikazuje vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije ispitivanih otapala za gram - negativne bakterije *E. coli* i *P. aeruginosa*. Za bakteriju *E. coli* vidljivo je da su najbolji inhibitorni učinak izazvala otapala Me: Cam, Ty:C8 i Ty: C10. Koncentracija pri kojoj dolazi do inhibicije vidljivog rasta za sva tri otapala iznosi 0,006 mg/mL. Također *E. coli* je pokazala osjetljivost na sva otapala pri originalnoj koncentraciji od 0,1 mg/mL (tablica 4). Nešto slabiju inhibiciju izazvalo je otapalo Ty: Cam pri koncentraciji od 0,025 mg/mL. Najslabije su djelovala otapala Me: Mya, Me: C8, Me: C18:2. Me: Ty i to pri koncentracijama od 0,05 mg/mL. Rezultati dobiveni za *E. coli* se razlikuju od rezultata Silve i sur. (2019b) i Singh i sur. (2015). Prema rezultatima ova dva istraživanja *E. coli* nije pokazala osjetljivost na NADES - e koji su sadržavali masne kiseline. Također zaključeno je da su gram - negativne bakterije znatno otpornije na antibakterijsko djelovanje masnih kiselina u usporedbi sa gram - pozitivnim zbog postotka lipopolisaharida u vanjskoj membrani (Al- Akayaleh i sur., 2022). Dobra osjetljivost na otapala koja sadrže oktansku i dekansku kiselinu mogu se pripisati sinergističkom učinku dekanske i oktanske kiseline sa timolom. Smatra se da djelovanje masnih kiselina na mikroorganizam može varirati zbog sposobnosti da izazovu destabilizaciju ili otapanje membrane što omogućuje rašireno djelovanje i smanjen rizik od antimikrobne rezistencije (Desbois i Smith, 2009).

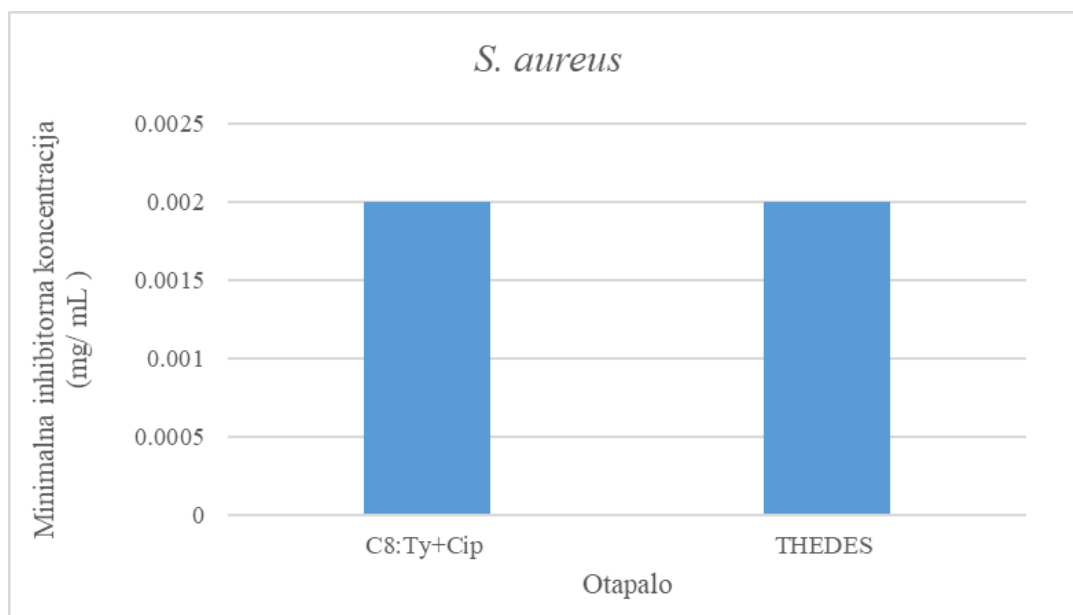
P. aeruginosa je najosjetljivija na 4 otapala i to Me: Mya, Me: C8, Me: Ty i Ty: Cam pri koncentraciji od 0,006 mg/mL. Nešto slabija osjetljivost je na otapala Me: C18: 2 i to sa 0,013 mg/mL i Me: Cam 0,025 mg/mL. Ova bakterija je najotpornija na djelovanje Ty: C10 sa 0,031 mg/mL i Ty: C8 pri 0,063 mg/mL (slika 11). Za otapala pri kojem je dobivena najviša vrijednost MIC - a početna koncentracija koja je razrijeđena je iznosila 0,5 mg/mL (tablica 5). Vidljivo je da sinergistički učinak mentola i masnih kiselina, mentola i timola te timola i kamfora izaziva najbolju inhibiciju rasta. Slični rezultati su vidljivi u istraživanju Al-Akayaleh i sur. (2022) gdje je *P. aeruginosa* pokazala najbolju osjetljivost na slično hidrofobno otapalo konstruirano od mentola i dekanske kiseline. Osim na NADES, istraživanje pokazuje osjetljivost ove bakterije i na pojedinačne komponente mentola i dekanske kiseline. Rezultati odskaču od uvriježenog mišljenja da je *E. coli* propusnija za djelovanje većine tvari zbog posjedovanja porina koji olakšavaju ulazak hidrofilnih tvari, a Al-Akayaleh i sur. (2022) predlažu model gdje stanica *P. aeruginosa* posjeduje hidrofobne porine koji omogućuju bolji prolazak hidrofobnih tvari što ju čini osjetljivijom. Istraživanje Silve i sur., (2019b) pokazalo je da *P. aeruginosa* nije osjetljiva na djelovanje NADES - a konstruiranih iz isključivo masnih kiselina.



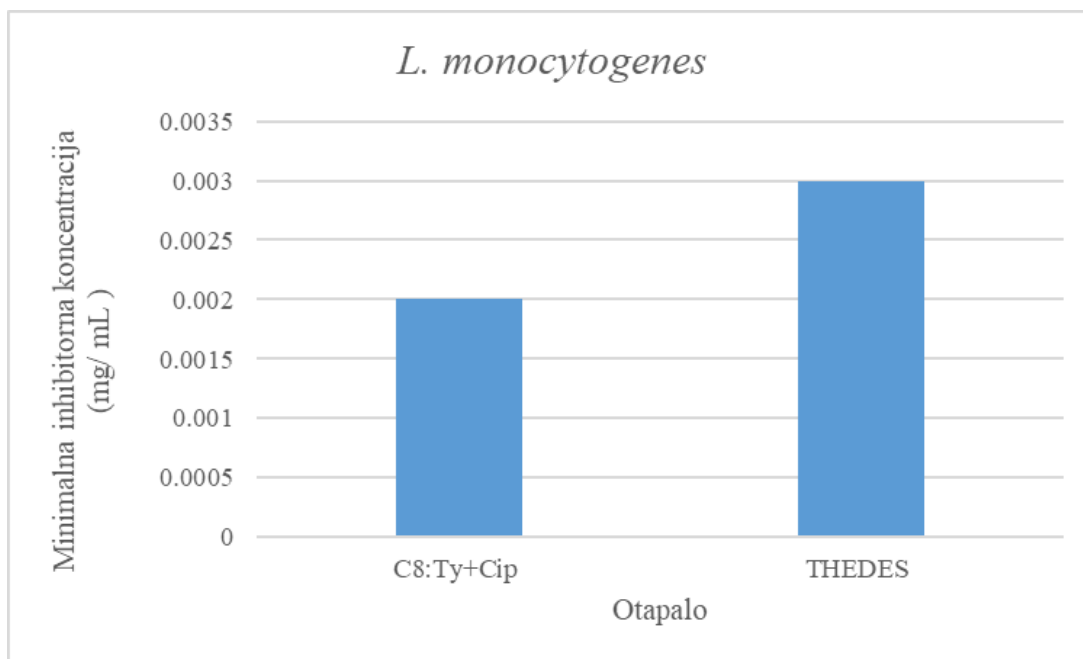
Slika 12. Minimalna inhibitorna koncentracija NADES - a: mentol: miristinska kiselina (Me: Mya), mentol: kamfor (Me: Cam), mentol: oktanska kiselina (Me: C8), mentol: linolna kiselina (Me: C18: 2), mentol: timol (Me: Ty), timol: kamfor (Ty: Cam), timol: oktanska kiselina (Ty: C8) i timol: dekanska kiselina (Ty: C10) za kvasac *C. albicans* 86

C. albicans je podjednako osjetljiva na otapala Me: Mya, Me: Cam, Me: C18: 2, Me: Ty, Ty: C8 i Ty: C10 i to pri 0,313 mg/mL, a slabije je osjetljiva na otapala Me: C8 i Ty: Cam pri 0,625 mg/mL (slika 12). Sva otapala su razrijeđena od početne koncentracije 5 mg/mL (tablica 6). Vidljivo je da sinergistički učinak komponenti otapala pridonosi porastu toksičnosti prema mikroorganizmu (Radošević i sur., 2015). Al-Akayaleh i sur. (2022) iskazuje slične rezultate za NADES koji sadrži mentol i dekansku kiselinu, te otapalo pokazuje bolji inhibitorski učinak od pojedinačnih komponenti. Zaključuje da otapalo ima odličan učinak na *C. albicans*. Silva i sur. (2019b) također zaključuje da NADES - i sastavljeni od masnih kiselina pokazuju dobro antifungalno djelovanje na *C. albicans*. Smatra se da dobra osjetljivost ovog kvasca leži u sposobnosti stanica da mijenjaju stupanj hidrofnosti membrane kroz različite faze rasta (Silva i sur., 2019b).

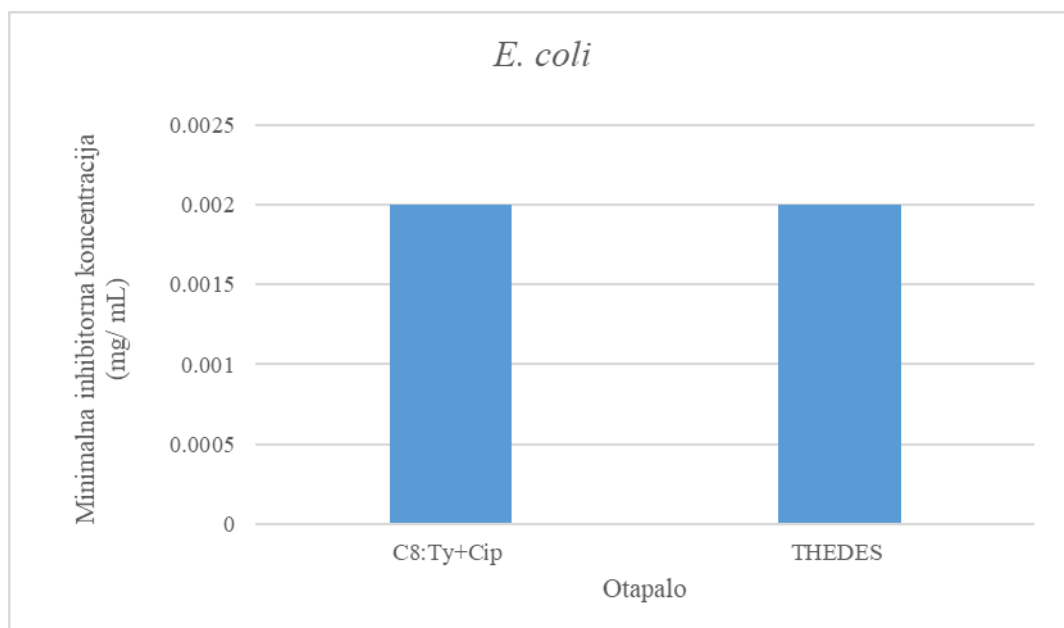
Na slikama 13-16 prikazani su rezultati usporedbe minimalnih inhibitorskih koncentracija THEDES - a i formulacije NADES - a i ciprofloksacina na odabrane gram - pozitivne i gram - negativne bakterije.



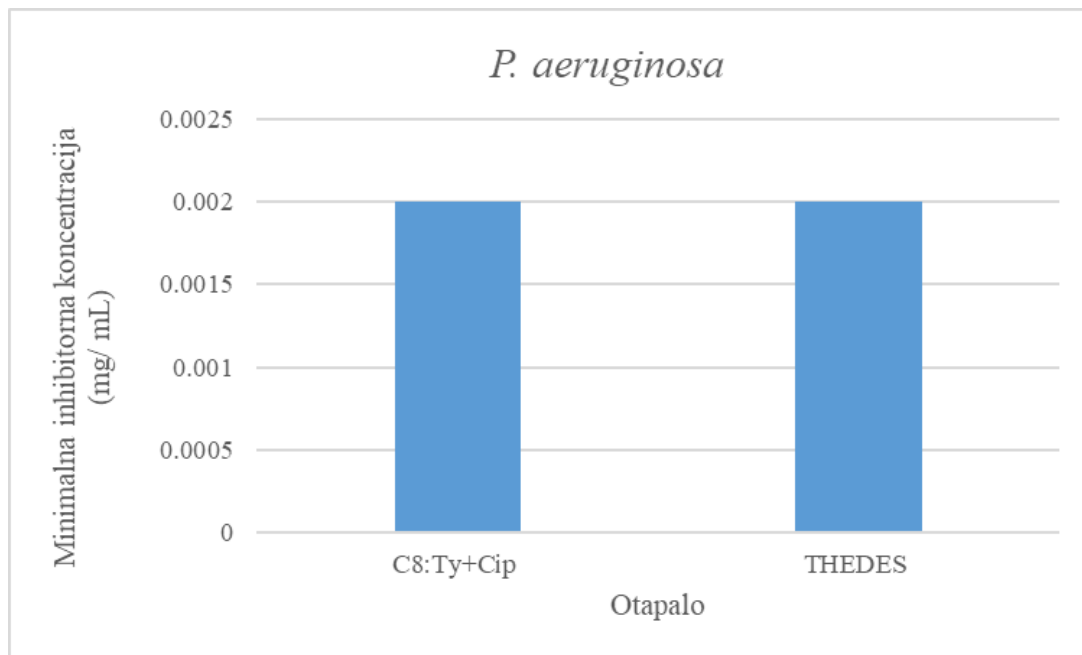
Slika 13. Minimalna inhibitorska koncentracija THEDES – a (oktanska kiselina: timol: ciprofloksacin) i formulacije (oktanska kiselina: timol + ciprofloksacin (C8: Ty + Cip)) za bakteriju *S. aureus* 3048



Slika 14. Minimalna inhibitorna koncentracija THEDES – a (oktanska kiselina: timol: ciprofloksacin) i formulacije (oktanska kiselina: timol + ciprofloksacin (C8: Ty + Cip)) za bakteriju za bakteriju *L. monocytogenes* 3112



Slika 15. Minimalna inhibitorna koncentracija THEDES – a (oktanska kiselina: timol: ciprofloksacin) i formulacije (oktanska kiselina: timol + ciprofloksacin (C8: Ty + Cip)) za bakteriju za bakteriju *E. coli* 3014



Slika 16. Minimalna inhibitorna koncentracija THEDES – a (oktanska kiselina: timol: ciprofloksacin) i formulacije (oktanska kiselina: timol + ciprofloksacin (C8: Ty + Cip)) za bakteriju *P. aeruginosa* 3024

Slike 13-16 prikazuju vrijednosti MIC - a za THEDES i formulaciju C8: Ty+ Cip. Kod bakterija *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (slika 13, 15, 16) vidljivo je da su vrijednosti MIC - a jednake i za THEDES i formulaciju i iznose 0,002 mg/mL. Vrijednosti *L. monocytogenes* se blago razlikuju te je na strani formulacije za koju iznosi 0,002 mg/mL u usporedbi sa THEDES - om za koji iznosi 0,003 mg/mL (slika 14). Iz rezultata se može zaključiti da nema razlike u aktivnosti ciprofloksacina u ovisnosti o načinu pripreme otapala. Ciprofloksacin zadržava svoju aktivnost i pri prevođenju u eutektički oblik i pri otapanju u gotovom NADES - u. Aroso i sur. (2016) također zaključuju da aktivna farmaceutska komponenta zadržava svoje aktivno svojstvo u formi THEDES - a. U usporedbi sa prirodnim niskotemperaturnim eutektičkim otapalima vidljivo je da određena otapala kao što je Me: Ty sa djelovanjem na *P. aeruginosa* (slika 11) pokazuje bolje vrijednosti MIC - a iako ne sadržava aktivnu farmaceutsku komponentu. Iz navedenog se može zaključiti da terapijska niskotemperaturna eutektička otapala imaju odličan potencijal kao poboljšana verzija dosad poznatih lijekova sa boljom iskoristivosti i dostupnosti.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Sva ispitivana prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (NADES) pokazala su antimikrobno djelovanje prema svim test mikroorganizmima.
2. Od svih testiranih bakterija *Escherichia coli* 3014 pokazala je najveću osjetljivost na sva testirana prirodna niskotemperaturna eutektička otapala već pri koncentraciji od 0,1 mg/mL.
3. Na bakteriju *S. aureus* najjače antimikrobno djelovanje je pokazalo otapalo Me:Ty pri koncentraciji od 0,5 mg/mL, a na *L. monocytogenes* Ty: Cam pri koncentraciji 0,1 mg/mL.
4. Na bakterije *E. coli* i *P. aeruginosa* najjače antimikrobno djelovanje je pokazalo otapalo Me:C8 pri koncentraciji od 0,5 mg/mL.
5. Kvasac *C. albicans* je osjetljiv na djelovanje svih otapala, od kojih najviše na otapalo Me:Ty pri 25 mg/mL.
6. Sve testirane bakterije su pokazale veću osjetljivost na THEDES i formulaciju Ty:C8+ Cip u usporedbi sa NADES-om.
7. Uspoređujući antimikrobno djelovanje THEDES-a i formulacije Ty: C8 + Cip, THEDES pokazuje jače antimikrobno djelovanje.
8. THEDES je pokazao najjače antimikrobno djelovanje na *L. monocytogenes* sa širinom zone $46 \pm 2,83$ mm, a formulacija Ty: C8 + Cip na *P. aeruginosa* sa širinom zone $30 \pm 14,14$ mm.
9. Dobiveni rezultati pokazuju da ciprofloksacin zadržava svoje aktivno djelovanje prevođenjem u eutektički sustav.

6. LITERATURA

Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi A, Abbaszadeh A (2014) Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J Mycol Méd* **24**, 51 - 56. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>.

Abbott AP, Ahmed EI, Prasad K, Qader IB, Ryder KS (2017) Liquid pharmaceuticals formulation by eutectic formation. *Fluid Phase Equilib* **448**, 2 - 8. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.05.009>

Al- Akayaleh F, Khalid RM, Hawash Al- Kaissi E, Al- Adham ISI, Jaber N, Al- Remawi M, Collier PJ (2022) Antimicrobial potential of natural deep eutectic solvents. *Lett Appl Microbiol* **74**, 1 - 9. <https://doi.org/10.1111/lam.13699>

Allocati N, Masulli M, Alexyev M. F., Di Ilio C (2013) Escherichia coli in Europe: An Overview. *Int. J. Env. Res. Pub He* **10**, 6235 - 6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>

Altamash T, Nasser MS, Elhamarnah Y, Magzoub M, Ullah R, Qiblawey H, Aparicio S, Atilhan M (2018) Gas solubility and rheological behavior study of betaine and alanine based natural deep eutectic solvents (NADES). *J Mol Liq* **256**, 286 - 95. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.02.049>.

Alva G, Huang X, Liu L, Fang G (2017) Synthesis and characterization of microencapsulated myristic acid–palmitic acid eutectic mixture as phase change material for thermal energy storage. *Appl Energ*, **203**, 677 - 685. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.06.082>.

Andrews J (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journ of Antimicrob Chemother* **48**, 5 - 16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.

Anon (1987) Final report on the safety assessment of oleic acid, lauric acid, palmitic acid, myristic acid, and stearic acid. *J Am Coll of Toxicol* **6**, 321 - 401. <https://doi.org/10.3109/10915818709098563>.

Aroso IM, Silva JC, Mano F, Ferreira AS, Dionísio M, Sá-Nogueira I, Barreiros S, Reis RL, Paiva A, Duarte ARC (2016) Dissolution enhancement of active pharmaceutical ingredients by therapeutic deep eutectic systems. *Eur J Pharm Biopharm* **98**, 57 - 66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.002>.

Bajkacz S, Adamek J (2017) Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta* **168**, 329 - 335. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.065>.

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

Burdock G, Carabin I (2007) Safety assessment of myristic acid as a food ingredient. *Food Chem Toxicol* **45**, 517 - 529. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.10.009>.

Burrow A, Eccles R, Jones A (1983) The Effects of Camphor, Eucalyptus and Menthol Vapour on Nasal Resistance to Airflow and Nasal Sensation. *Acta Oto-Laryngol* **96**, 157 - 161. <https://doi.org/10.3109/00016488309132886>.

Calderone R, Fonzi W (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327 - 335. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02094-7).

Campoli-Richards DM, Monk JP, Price A, Benfield P, Todd PA, Ward A (1988) Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* **35**, 373 - 447. <https://doi.org/10.2165/00003495-198835040-00003>.

Chambers H, DeLeo F (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7**, 629 - 641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>.

Chavda HV, Patel CN, Anand IS (2010) Biopharmaceutics Classification System, *Sys Rev Pharm* **1**, 62 - 69. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.59514>.

Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IW, Witkamp G, Verpoorte R (2011) Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?. *Plant Physiol* **156**, 1701 - 1705. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>.

Cossart P, Toledo- Arana A (2008) *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* **10**, 1041 - 1050. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.043>.

Craveiro R, Aroso I, Flammia V, Carvalho T, Viciosa M, Dionísio M, Barreiros S, Reis R, Duarte A, Paiva A (2016) Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **215**, 534 - 540. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>.

Cui Q, Liu J, Wang L, Kang Y, Meng Y, Jiao J, Fu Y (2018) Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *J Clean Prod* **184**, 826 - 835. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.295>.

Dai Y, van Spronsen J, Witkamp G, Verpoorte R, Choi YH (2013) 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>.

Dai Y, Witkamp G, Verpoorte R, Choi YH (2015) Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem* **187**, 14 - 19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.

Desbois A, Smith V (2009) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biot* **85**, 1629 - 1642. [10.1007/s00253-009-2355-3](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3) <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.019>.

Dos Santos E, Leitão MM, Agüero Ito CN, Silva-Filho SE, Arena AC, Silva-Comar FMDS i sur. (2021) Analgesic and anti-inflammatory articular effects of essential oil and camphor isolated from *Ocimum kilimandscharicum* Gürke leaves. *J Ethnopharmacol* **269**, 113697. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113697>.

Driscoll J, Brody S, Kollef M (2007) The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections. *Drugs* **67**, 351 - 368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>.

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>.

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

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>.

Foster TJ (2002) "Staphylococcus aureus", *Mol Microbiol* **114**, 839 - 888. <https://doi.org/10.1016/b978-012677530-3/50258-0>.

Glee P, Sundstrom P, Hazen K (1995) Expression of surface hydrophobic proteins by Candida albicans in vivo. *Infect Immun* **63**, 1373 - 1379. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1373-1379.1995>.

Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Falcao J, Piazza RMF, Ferreira LC, Martinez MB (2016) Diarrheogenic Escherichia coli. *Braz J Microbiol* **47**, 3 - 30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>.

Gomez FJV, Espino M, Fernandez MA, Silva F (2018) A greener approach to prepare natural deep eutectic solvents. *Chemistryselect* **3**, 6122 – 5. <https://doi.org/10.1002/slct.201800713>.

Gutierrez MC (2010) Bacteria incorporation in deep-eutectic solvents through freeze-drying. *Angew Chem Int Edit* **49**, 2158 – 2162. <https://doi.org/10.1002/anie.200905212>

Hamon M, Bierne H, Cossart P (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* **4**, 423 - 434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1413>.

Hayyan M, Looi CY, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA (2015) *In Vitro* and *In Vivo* Toxicity Profiling of Ammonium-Based Deep Eutectic Solvents. *PLOS ONE* **10**, 0117934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117934>.

Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL (2011) Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* **56**, 650 - 654. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.011>.

Huang W, Tsai T, Chuang L, Li Y, Zouboulis CC, Tsai P (2014) Anti-bacterial and anti-inflammatory properties of capric acid against *Propionibacterium acnes*: A comparative study with lauric acid. *J Dermatol Sci* **73**, 232 - 240. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.10.010>.

Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S (2008) Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>.

Jørgensen HJ, Mørk T, Høgåsen HR, Rørvik LM (2005) Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J Appl Microbiol* **99**, 158 – 166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02569.x>.

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

Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM, Lawrence BM (2013) Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry* **96**, 15 - 25. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic Escherichia coli. *Nature reviews. Microbiology* **2**, 123 – 140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.

Khelef N, Lecuit M, Bierne H, Cossart P (2006) Species Specificity Of The Listeria Monocytogenes Inlb Protein. *Cell Microbiol* **8**: 457 - 470. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00634.x>.

Kim J, Sudbery P (2011) Candida albicans, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* **49**, 171 - 177. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1064-7>.

Kim SA, Rhee MS (2016) Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, β -resorcylic acid, trans -cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against Escherichia coli O157:H7. *Food control* **60**, 447 – 454. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.022>.

Kitahara T, Koyama N, Matsuda J, Aoyama Y, Hirakata Y, Kamihira S, Kohno S, Nakashima M, Sasaki H (2004) Antimicrobial Activity of Saturated Fatty Acids and Fatty Amines against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Biol Bull* **27**, 1321 - 1326. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1321>.

Krismer B, Peschel A (2011) Does Staphylococcus aureus nasal colonization involve biofilm formation?. *Future Microbiol* **6**, 489 - 493. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.37>.

Kumar V, Bansal V, Madhavan A, Kumar M, Sindhur, Awasthi MK, Binod P, Saran S (2022) Active pharmaceutical ingredient (API) chemicals: a critical review of current biotechnological approaches. *Bioengineered* **13**, 4309 - 4327. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2031412>.

Lapeña D, Lomba L, Artal M, Lafuente C, Giner B (2019) Thermophysical characterization of the deep eutectic solvent choline chloride:ethylene glycol and one of its mixtures with water. *Fluid Phase Equilib* **492**, 1 - 9. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.03.018>.

Lau G, Hassett D, Ran H, Kong F (2004) The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. *Trends Mol Med* **10**, 599 - 606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>.

Lee JH, Jo YW, (2016) Antimicrobial effect of a lauric acid on *Streptococcus mutans* biofilm. *Ann Intern Med* **2**, 60 – 64. <https://doi.org/10.21276/aimdr.2016.2.4.21>.

Legrand P, Rioux V (2015) Specific roles of saturated fatty acids: Beyond epidemiological data. *Eur J Lipid Sci Tech* **117**, 1489 – 1499. <https://doi.org/10.3390/foods10030607>.

Li J, Chang JW, Saenger M, Deering A (2017) Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. *Food Chem* **232**, 191 - 197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.147>.

Li K, Jin Y, Jung D, Park K, Kim H, Lee J (2020) In situ formation of thymol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Application to antibiotics analysis in surface water based on liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1614**, 460730. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460730>.

Liu P, Hao J, Mo L, Zhang Z (2015) Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. *RSC Adv* **5**, 48675 - 48704. <https://doi.org/10.1039/c5ra05746a>.

Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen S, Pauli GF (2018) Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod* **81**, 679 - 690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>.

Marchel M, Cieśliński H, Boczkaj G (2022) Deep eutectic solvents microbial toxicity: Current state of art and critical evaluation of testing methods. *J Hazard Mater* **425**, 127963. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127963>.

Martín A, Cocero MJ (2008) Micronization Processes With Supercritical Fluids: Fundamentals And Mechanisms. *Adv Drug Deliver Rev* **60**, 339 - 350. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.01>.

Mathela CS, Singh KK, Gupta VK (2010) Synthesis and *in vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol derivatives. *Acta pol pharm*, **67**, 375 – 380. <https://doi.org/10.1.1.1076.9602>

Maximo GJ, Carareto ND, Costa MC, Dos Santos AO, Cardoso LP, Krähenbühl MA, Meirelles AJ (2014) On the solid–liquid equilibrium of binary mixtures of fatty alcohols and fatty acids, *Fluid Phase Equilib* **366**, 88 - 98. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.01.004>.

Mayer F, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**, 119 - 128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.

Mena K, Gerba C (2009) Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water. *Review Of Environ Cont Toxicol* **201**, 71 - 115. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3.

Michel-Briand Y, Baysse C (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* **84**, 499-510. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01422-0](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01422-0).

Mišan A, Nađpal J, Stupar A, Pojić M, Mandić A, Verpoorte R, Choi YH (2019) The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Crit Rev Food Sci* **60**, 2564 - 2592. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>.

Mitar A, Panić M, Prlić Kardum J, Halambek J, Sander A, Zagajski Kučan A, Radojčić Redovniković I, Radošević K (2019) Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid. *Chem Biochem Eng Q* **33**, 1 – 18. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1454>.

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

Morales D, Hogan D (2010) *Candida albicans* Interactions with Bacteria in the Context of Human Health and Disease. *PLoS Pathog* **6**, e1000886. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000886>.

Mpundu P, Muma JB, Mukumbuta N, Mukubesa AN, Muleya W, Kapila P, Hang'ombe BM, Munyeme M (2022) Isolation, discrimination, and molecular detection of *Listeria* species from

slaughtered cattle in Namwala District, Zambia. *BMC Microbiol*, **22**.
<https://doi.org/10.1186/s12866-022-02570-6>.

Kim J, Sudbery P (2011) *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* **49**, 171 - 177. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819212-2.00011-6>.

NCBI (2022a) PubChem compound summary for CID 1254, Menthol, NCBI- National Center for Biotechnology Information
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Menthol> . pristupljeno 14. srpnja 2022.

NCBI (2022b) PubChem compound summary for CID 6989, Thymol, NCBI- National Center for Biotechnology Information
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymol> . pristupljeno 14. srpnja 2022.

NCBI (2022c) PubChem compound summary for CID 2537, Camphor, NCBI- National Center for Biotechnology Information
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Camphor> . pristupljeno 15. srpnja 2022.

NCBI (2022d) PubChem compound summary for CID 11005, Myristic acid, NCBI- National Center for Biotechnology Information
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myristic-acid> . pristupljeno 15. srpnja 2022.

NCBI (2022e) PubChem compound summary for CID 379, Octanoic acid, NCBI- National Center for Biotechnology Information
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Octanoic-acid> . pristupljeno 17. srpnja 2022.

NCBI (2022f) PubChem compound summary for CID 2969, Decanoic acid, NCBI- National Center for Biotechnology Information
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Decanoic-acid> . pristupljeno 17. srpnja 2022.

NCBI (2022g) PubChem compound summary for CID 5280450, Linoleic acid, NCBI- National Center for Biotechnology Information
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linoleic-acid> . pristupljeno 18. srpnja 2022.

NCBI (2022h) PubChem compound summary for CID 2764, Ciprofloxacin, NCBI- National Center for Biotechnology Information

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin> . pristupljeno 19. srpnja 2022.

Otto M (2014) Staphylococcus aureus toxins. *Curr Opin Microbiol* **17**, 32 - 37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.00>.

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

Park C, Mansour HM, Oh T, Kim J, Ha J, Lee B, Chi S, Rhee Y, Park E (2012) Phase behavior of itraconazole–phenol mixtures and its pharmaceutical applications. *Int J Pharm* **436**, 652 - 658. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.054>.

Patel T, Ishiujji Y, Yosipovitch G (2007) Menthol: A refreshing look at this ancient compound. *J Am Acad Dermatol* **57**, 873 - 878. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.04.008>.

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

Petrova E (2013) Innovation in the Pharmaceutical Industry: The Process of Drug Discovery and Development. *Int S Quant Market*, 19 - 81. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7801-0_2.

Poulain D (2013) Candida albicans, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* **41**, 208 - 217. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.813904>.

Qiu J, Luo M, Dong J, Wang J, Li H, Wang X, Deng Y, Feng H, Deng X (2011) Menthol diminishes Staphylococcus aureus virulence-associated extracellular proteins expression. *Appl Microbiol Biot* **90**, 705 - 712. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3122-9>.

Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Grgas D, Landeka Dragičević T, Radojčić Redovniković I (2015) Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based

deep eutectic solvents. *Ecotox Environ Safe* **112**, 46 - 53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.034>.

Radošević K, Čanak I, Panić M, Markov K, Bubalo MC, Frece J, Gaurina Srček V, Radojčić Redovniković I (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ Sci Pollut R* **25**, 14188 – 14196. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1669-z>.

Radošević K, Čurko N, Gaurina Srček V, Cvjetko Bubalo M, Tomašević M, Kovačević Ganić K, Radojčić Redovniković I (2016) Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity, *LWT- Food Sci Technol* **73**, 45 - 51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>.

Rasigade J, Vandenesch F (2014) Staphylococcus aureus: A pathogen with still unresolved issues. *Infection, Infect Genet Evol* **21**, 510 - 514. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.018>.

Ribeiro BD, Florindo CI, L. C., Coelho MAZ, Marrucho IM (2015) Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. *ACS Sustain Chem Eng* **3**, 2469 - 2477. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00532>.

Ryser ET, Marth EH (2007) *Listeria, listeriosis, and food safety*, 3. izd., Taylor & Francis, London, str. 9 - 11.

Saha M, Rahman S, Hossain N, Raynie DE Halim MA (2020) Molecular and Spectroscopic Insights of a Choline Chloride Based Therapeutic Deep Eutectic Solvent. *J Phys Chem A* **124**, 4690 - 4699. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c00851>.

Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras MDM, Segura-Carretero A, Fathi H, Nasrabadi NN, Kobarfard F, Sharifi-Rad J (2018) Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytother Res* **32**, 1688 - 1706. <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>.

Santos F, Leitão PS, Duarte M, Duarte CA (2018) Properties of Therapeutic Deep Eutectic Solvents of L-Arginine and Ethambutol for Tuberculosis Treatment. *Molecules* **24**, 55. <https://doi.org/10.3390/molecules24010055>.

Savjani K, Gajjar A, Savjani J (2012) Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm* **2012**, 1 - 10. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>.

Sharma PC, Jain A, Jain S, Pahwa R, Yar MS (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>.

Silva JM, Pereira CV, Mano F, Silva E, Castro VIB, Sá-Nogueira I, Reis RL, Paiva A, Matias AA, Duarte ARC (2019a) Therapeutic Role of Deep Eutectic Solvents Based on Menthol and Saturated Fatty Acids on Wound Healing. *ACS Appl Bio Mater* **2**, 4346 - 4355. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00598>.

Silva JM, Silva E, Reis RL, Duarte ARC (2019b) A closer look in the antimicrobial properties of deep eutectic solvents based on fatty acids. *Sust chem pharm* **14**, 100192. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100192>.

Singh R, Shushni MAM, Belkheir A (2015) Antibacterial and antioxidant activities of Mentha piperita. *Arab J Chem* **8**, 322 – 328. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.019>.

Sorgo AG, Heilmann CJ, Dekker HL, Brul S, de Koster CG, Klis FM (2010) Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*. *Yeast* **27**, 661 – 672. <https://doi.org/10.1002/yea.1775>.

Strateva T, Yordanov D (2009) *Pseudomonas aeruginosa*- a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* **58**, 1133 – 1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>.

Sudbery PE (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**, 737 – 748. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2636>.

Sun C, O'Connor C, Robertson A (2003) Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Mic* **36**, 9 - 17. [https://doi.org/10.1016/s0928-8244\(03\)00008-7](https://doi.org/10.1016/s0928-8244(03)00008-7).

Swaminathan A, Jicha G (2014) Nutrition and prevention of Alzheimer s dementia. *Front Aging Neurosci* **6**, 282. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00282>.

Tang B, Row K (2013) Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Chem Mon* **144**, 1427 - 1454. <https://doi.org/10.1007/s00706-013-1050-3>.

Tarate B, Bansal A (2015) Characterization of CoQ 10-lauric acid eutectic system. *Thermochim Acta* **605**, 100 - 106. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2015.01.018>.

Tenaillon O, Skurnik D, Picard B Denamur E (2010) "The population genetics of commensal *Escherichia coli*". *Nat Rev Microbiol*, **8**, 207 - 217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>.

Ternes TA, Joss A (2006) Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances. The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management, 1. izd., IWA Publishing, London.

Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG (2015) *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, **28**, 603 – 661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>.

Torregrosa-Crespo J, Marset X, Guillena G, Ramón DJ, María Martínez-Espinosa R (2020) New guidelines for testing “Deep eutectic solvents” toxicity and their effects on the environment and living beings. *Sci Total Environ* **704**, 135382. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135382>.

Torriero A, Ruizdiaz J, Salinas E, Marchkevsky E, Sanz M, Raba J (2006) Enzymatic rotating biosensor for ciprofloxacin determination. *Talanta* **69**, 691 – 9. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.11.005>.

Trapp A, Faude A, Hörold N, Schubert S, Faust S, Grob T, Schmidt S (2018) Multiple functions of caprylic acid-induced impurity precipitation for process intensification in monoclonal antibody purification. *J Biotechnol* **279**, 13 - 21. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.001>.

Trivedi MK, Patil S, Mishra RK, Jana S (2015) Structural and Physical Properties of Biofield Treated Thymol and Menthol. *J Mol Pharm Org Process Res* **3**, <https://doi.org/127.10.4172/2329-9053.1000127>.

Vanda H, Dai Y, Wilson EG, Verpoorte R, Choi YH (2018) Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *CR Chim* **21**, 628 - 638. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>.

Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J (2001) *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**, 584 - 640. <https://doi.org/10.1128/cmr.14.3.584-640.2001>.

Wagle D, Zhao H, Baker G (2014) Deep Eutectic Solvents: Sustainable Media for Nanoscale and Functional Materials. *Accoun of Chemic Resear* **47**(8), 2299-2308. [10.1021/ar5000488](https://doi.org/10.1021/ar5000488).

Whelan J, Fritsche K (2013) Linoleic Acid. *Adv Nutr* **4**, 311 - 312. <https://doi.org/10.3945/an.113.003772>.

Wiegand I, Hilpert K, Hancock R (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* **3**, 163 - 175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.

Wikene KO, Rukke HV, Bruzell E, Tønnesen HH (2017) Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *J Photoch Photobio B* **171**, 27 - 33. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.030>.

Wing E, Gregory S (2002) *Listeria monocytogenes*: Clinical and Experimental Update. *J Infect Dis* **185**, 18 - 24. <https://doi.org/10.1086/338465>.

Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S (2015) *Pseudomonas aeruginosa* (Chapter 41). U Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J (ured.) *Molecular Medical Microbiology*, 2 izd, Academic press, London, str. 753 – 767.

Yang Z (2018) *Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology*. U Scheper T, Uber R (ured.) *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Springer Nature, str. 31 - 59.

Zarrini G, Delgosha ZB, Moghaddam KM, Shahverdi AR (2010) Post-antibacterial effect of thymol. *Pharm Biol* **48**, 633 - 636. <https://doi.org/10.3109/13880200903229098>.

Zhang G, Liu X, Zhang S, Pan B, Liu M (2018) Ciprofloxacin derivates and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem* **146**, 599 - 612. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.078>.

Zhang Q, De Oliveira VK, Royer S, Jérôme F (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev* **41**, 7108. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>.


Zhao BY, Xu P, Yang FX, Wu H, Zong MH, Lou WY (2015) Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain Chem Eng* **3**, 2746 – 2755. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00619>.

Zheng CJ, Yoo J, Lee T, Cho H, Kim Y, Kim W (2005) Fatty Acid Synthesis Is A Target For Antibacterial Activity Of Unsaturated Fatty Acids. *FEBS Lett* **579**, 5157 - 5162. Wiley, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.028>.

Zuccarini P (2010) Camphor: risks and benefits of a widely used natural product. *J Appl Sci Env Ma* **13**. <https://doi.org/10.4314/jasem.v13i2.55317>.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Helena Juričić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis