

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Dyscyplina naukowa: Technologia żywności i żywienia



mgr inż. Hubert Iwiński

Analiza właściwości przeciwpasożytniczych i przeciwprzewrotniakowych wybranych ekstraktów ziołowych

Analysis of the antiparasitic and antiprotozoal properties of selected
herbal extracts

Rozprawa doktorska

promotor:

prof. dr hab. inż. Antoni Szumny

opiekun pomocniczy:

dr n. biol. Henryk Różański

Praca doktorska zrealizowana w ramach II edycji programu „Doktorat Wdrożeniowy”
finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

This study is supported by Ministry of Education and Science
Implementation Doctorates Project II edition

Wrocław 2023

PODZIĘKOWANIA

*Chciałbym serdecznie podziękować moim promotorom
prof. dr hab. inż. Antoniemu Szumnemu oraz dr n. biol. Henrykowi Różańskiemu,
za ich ogromne wsparcie i cierpliwość.*

*dr inż. Karolinie A. Chodkowskiej, dr Karolinie Wódz, dr Jackowi Łyczko,
mgr inż. Natalii Pachura, dr. Tomaszowi Nowakowi, dr Tomaszowi Gębarowskiemu
za współpracę i nieocenioną pomoc w badaniach.*

*Firmie AdiFeed Sp. z o.o. za umożliwienie mi realizacji
doktoratu w ramach projektu Doktorat Wdrożeniowy.*

*Na koniec chciałbym podziękować najważniejszym osobom,
bez których powstanie tej pracy nie byłoby możliwe, mojej rodzinie.
Mojej żonie, mojemu synowi, moim rodzicom i mojemu rodzeństwu.*

Dziękuję!

Spis treści

ABSTRACT	6
STRESZCZENIE.....	9
1. WSTĘP	12
2. CELE I HIPOTEZY	18
3. WYNIKI I DYSKUSJA.....	20
3.1. Publikacja 1.....	21
3.2. Publikacja 2.....	45
3.3. Publikacja 3.....	66
3.4. TESTY TOKSYCZNOŚCI	90
3.5. Patent 1	91
3.6. Patent 2.....	120
3.7. Patent 3	121
3.8. Patent 4.....	122
3.9. Patent 5	123
3.10. Patent 6	124
4. WDROŻENIE.....	125
5. WNIOSKI.....	141
6. OŚWIADCZENIA	143
7. DOROBEK NAUKOWY	159
8. LITERATURA	162

ABSTRACT

Increasing microbial resistance is a key issue in both public health and animal husbandry. One of the main causes is the excessive use of antibiotics in medicine, veterinary medicine and animal husbandry. This is an extremely important aspect, both in terms of quality and safety of animal products. Reducing the amount or being able to completely eliminate antibiotics in the production of eggs or meat makes it possible to obtain premium quality products. What is more, it is characterised by better quality parameters due to the use of alternative products, most often of natural origin, showing a number of positive side effects such as a reduction in fat in the pectoral muscle or a more favourable fatty acid profile.

These activities generated the need to find an effective alternative to the antibiotics. The search for effective solutions, i.e. preparations based on substances of natural origin, including those of plant origin, has become one of the main directions of research. The results so far allow us to conclude that the use, both preventive and curative, of extracts, essential oils or micronised herbs can be an effective alternative to antibiotics. Consequently, the proposed solutions of natural substitutes for antibiotics could lead to foods characterised not only by zero antibiotic content, but also by no lesser quality and consumer acceptance.

One of the biggest problems facing companies in the meat industry are diseases caused by protozoa such as *Eimeria* spp, *Histomonas melagridis* (e.g. coccidiosis, black head disease) or bacteria such as *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* (necrotic enteritis, salmonellosis or colibacteriosis). They are responsible for the largest production losses of several to several billion dollars per year. There is currently a very high demand in the food market for natural preparations as an effective alternative to the antibiotics used to date. The demand includes products that are characterised by the simultaneous fulfilment of three characteristics: efficacy in low concentrations; natural origin of the active substances; and a realistic, for economic conditions, price. During the PhD dissertation, a series of studies and implementation work was carried out, which ultimately led to the development of manufacturing technology and the creation of three finished products (currently produced by AdiFeed) with effective antimicrobial properties.

Initially, selected extracts and distillates of e.g. common barberry, empress tree, yellow horned poppy and others were investigated. However, despite their effectiveness, due to the limited availability (on an industrial scale) in 2020 and the strongly increasing price of this raw

material, as well as technological difficulties (e.g. in standardising the extracts), it was decided to use other, i.e. essential oil-based mixtures. Further research work within the framework of the implementation doctorate made it possible to analyse the antiprotozoal properties of new compositions based on essential oils from eucalyptus, cedar lavender and tea tree. Their high efficacy against *Euglena gracilis*, *Gregarina blattarum*, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum*, *Pentatrichomonas hominis* of 0.001-0.009% was demonstrated. (**Antibiotics 2022a** Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures). The efficacy of clove, cinnamon, rosemary and garlic oils in combination with metals and acids was proven in **Molecules 2023**, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. At the same time, it was proven the lack of toxicity against human fibroblast cell lines (NHFD). An additional important element described in the above publication was the development of standardised garlic distillates based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry. It has been shown that the gas chromatography-mass spectrometry coupled technique used to date for volatile sulphur compounds does not quantify the actual composition. A cheap and simple solution was proposed to standardise the composition of the mixture, i.e. NMR measurement and integration of the chemical shifts of the protons of the allylic groups of the corresponding mono-, di-, tri-, tetra- and pentasulphides.

These studies enabled the creation of the first formulation versions of the complex preparation. The resulting formulations were subjected to further analyses of their antimicrobial properties. The compound formulation, containing, among others, methyl salicylate, 1,8-cyneol and *trans*-anethole, exhibited antibacterial efficacy against multidrug-resistant serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and Kentucky. The high efficacy of the preparation was maintained even against the Kentucky serotype, which has resistance genes to 18 different antibiotics belonging to five different classes. The proposed mixtures have been proven to have high efficacy against pathogens present and transmitted through food (**Antibiotics 2022b** In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phyto-biotics Mixture on *Salmonella* spp. Isolated from Chicken Broiler).

The obtained research results based on mixtures of essential oils, selected organic acids and metal ions resulted in **6 patent applications** and consequently in obtaining patent protection for them in the territory of the RP (DB.P.434642.7, DB.P.434643.5, DB.P.434644.5, DB.P.434645.13, DB.P.434646.7, DB.P.434647.7).

The most important, implementation effect of the doctoral thesis is the implementation into production at AdiFeed Sp. z o.o. of a series of preparations, i.e. **adiBiotic**[®], **naturBiotic**[®], **adiNext**[®], based on mixtures of natural phytoncides, obtained in the experiments of the implementation part of the PhD.

STRESZCZENIE

Narastająca oporność mikroorganizmów jest obecnie kluczowym zagadnieniem zarówno zdrowia publicznego, jak i chowu zwierząt. Jedną z głównych przyczyn jest nadmierne stosowanie antybiotyków w medycynie, weterynarii i chowie zwierząt. Jest to niezwykle istotny aspekt, zarówno pod względem jakości, jak i bezpieczeństwa produktów pochodzenia zwierzęcego. Zmniejszenie ilości lub możliwość całkowitego wyeliminowania antybiotyków w produkcji jaj czy mięsa pozwala na uzyskanie produktów o jakości premium. Co więcej, charakteryzującej się lepszymi parametrami jakościowymi ze względu na stosowanie alternatywnych produktów, najczęściej pochodzenia naturalnego, wykazujących szereg pozytywnych efektów ubocznych jak m.in. zmniejszenie tłuszczu w mięśniu piersiowym czy korzystniejszego profilu kwasów tłuszczowych.

Działania te wygenerowały potrzebę znalezienia skutecznej alternatywy dla dotychczas stosowanych antybiotyków. Jednym z głównych kierunków badań stało się poszukiwanie skutecznych rozwiązań, tj. preparatach opartych na substancjach pochodzenia naturalnego w tym pochodzenia roślinnego. Dotychczasowe wyniki pozwalają stwierdzić, iż wykorzystanie, zarówno prewencyjne jak i lecznicze, ekstraktów, olejków eterycznych czy też zmikronizowanych ziół może stanowić skuteczną alternatywę dla antybiotyków. W konsekwencji proponowane rozwiązania mogą prowadzić do powstania żywności cechującej się nie tylko zerową zawartością antybiotyków, ale też porównywalną jakością o wyższej akceptacji konsumenckiej.

Jednym z największych problemów z którymi spotykają się przedsiębiorstwa w branży mięsnej, są choroby wywoływane przez pierwotniaki m.in. *Eimeria* spp, *Histomonas melagridis* (np. kokcydioza, czarna główka) czy też bakterie takie jak *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. oraz *Escherichia coli* (nekrotyczne zapalenie jelit, salmonelloza czy kolibakterioza). Odpowiadają one za największe straty produkcyjne na poziomie od kilku do kilkunastu miliardów dolarów rocznie. W chwili obecnej na rynku spożywczym istnieje bardzo duże zapotrzebowanie na naturalne preparaty, będące skuteczną alternatywą dla dotychczas stosowanych antybiotyków. Zapotrzebowanie obejmuje produkty, które charakteryzują się spełnieniem jednocześnie trzech cech: skuteczność w niskich stężeniach; naturalne pochodzenie substancji aktywnych oraz realna, dla warunków ekonomicznych, cena. W trakcie realizacji doktoratu wykonano szereg badań i prac wdrożeniowych, które ostatecznie doprowadziły do opracowania **technologii wytwarzania** oraz powstania **trzech wyrobów**

gotowych (produkowanych w chwili obecnej przez firmę AdiFeed) o skutecznych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Początkowo przebadano wybrane ekstrakty i destylaty m.in. berberysu zwyczajnego paulownii omszonej, siwca żółtego i innych. Jednak pomimo ich skuteczności, ze względu na ograniczoną w roku 2020 dostępność (na skalę przemysłową) i silnie wzrastającą cenę tego surowca oraz trudności technologiczne (m.in. w standaryzacji ekstraktów) zdecydowano się na wykorzystanie innych, tj. opartych na olejkach eterycznych mieszaninach. Dalsze prace badawcze w ramach doktoratu wdrożeniowego pozwoliły na dokonanie analizy właściwości przeciwpierwotniaczych nowych kompozycji opartych na olejkach eterycznych z eukaliptusa, lawendy cedru i drzewa herbacianego. Udowodniono ich wysoką skuteczność wobec *Euglena gracilis*, *Gregarina blattarum*, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum*, *Pentatrichomonas hominis* wynoszącą w dawkach 0.001–0.009%. (publikacja **Antibiotics 2022a** Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures). Skuteczność olejków: goździkowego, cynamonowego, rozmarynowego i czosnkowego w połączeniu z metalami i kwasami przedstawiono w pracy **Molecules 2023**, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. Jednocześnie udowodniono ich brak toksyczności wobec linii komórkowych ludzkich fibroblastów (NHFD). Dodatkowym istotnym elementem opisanych w powyższej publikacji było opracowanie standaryzacji destylatów czosnkowych, opartych na spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Udowodniono, że stosowana do tej pory technika chromatografii gazowej, sprzężonej ze spektrometrią mas w przypadku lotnych związków siarki nie oddaje ilościowo faktycznego składu. W standaryzacji składu mieszaniny zaproponowano tanie i proste rozwiązanie, tj. pomiar NMR i integracja przesunięć chemicznych protonów grup allilowych odpowiednich mono-, di-, tri-, tetra- i pentasiarczków.

Badania te umożliwiły stworzenie pierwszych wersji receptur preparatu złożonego. Uzyskane formułacje poddano dalszym analizom ich właściwości przeciwbakteryjnych. Kompozycja złożona, zawierająca m.in. salicylanu metylu, 1,8-cyneol i *trans*-anetol, wykazywała skuteczność bójczą wobec wielolekoopornych serotypów *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium i Kentucky. Wysoka skuteczność preparatu została zachowana nawet w przypadku serotypu Kentucky, posiadającego geny oporności na 18 różnych antybiotyków należących do 5 różnych klas. Udowodniono, że zaproponowane mieszaniny charakteryzują się wysoką skutecznością wobec patogenów obecnych i przenoszonych poprzez żywność (publikacja **Antibiotics 2022b** In Vitro Evaluation of

Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler).

Uzyskane wyniki badań oparte na mieszaninach olejków eterycznych, wybranych kwasów organicznych oraz jonów metali, zaowocowały powstaniem **6 zgłoszeń patentowych**, a w konsekwencji uzyskaniem ochrony patentowej dla nich na terytorium RP tj. (DB.P.434642.7, DB.P.434643.5, DB.P.434644.5, DB.P.434645.13, DB.P.434646.7, DB.P.434647.7)

Najważniejszym, wdrożeniowym efektem doktoratu jest wprowadzenie do produkcji w firmie AdiFeed Sp. z o.o. serii preparatów tj. **adiBiotic®**, **naturBiotic®**, **adiNext®** bazujących na mieszaninach naturalnych fitoncydów, uzyskanych w doświadczeniach części doktoratu. wdrożeniowego.

1. WSTĘP

Nadmierne stosowanie antybiotyków zarówno w medycynie, weterynarii jak i żywieniu zwierząt spowodowało znaczny wzrost oporności mikroorganizmów. Drobnoustroje charakteryzujące się narastającą lekoopornością stały się jednym z czterech głównych, obok gruźlicy, HIV i grypy, głównych zagadnień zdrowia publicznego. Wymusiło to podjęcie zdecydowanych działań mających na celu ograniczenie stosowania antybiotyków u ludzi, ale w głównej mierze w żywieniu zwierząt. Wykazano bowiem, iż leczenie opornych szczepów staje się mało efektywne, a dotychczas stosowane kuracje z wykorzystaniem antybiotyków nieskuteczne. Dlatego też, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wraz z Unią Europejską i Agencją Żywności i Leków (FDA) podjęły szereg działań i programów mających na celu ochronę antybiotyków i ich skuteczności. Należą do nich między innymi Health 2020, Światowy plan w zakresie oporności na środki przeciwbakteryjne (Global action plan on antimicrobial resistance), Narodowy plan zwalczania antybiotykoopornych bakterii (National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria), a także narodowe programy, w tym Polski - Narodowy Program Ochrony Antybiotyków (NPOA). Zmiany legislacyjne zabraniają obecnie profilaktycznego stosowania antybiotyków do paszy dla zwierząt, a ich pozostałości w mięsie są szczegółowo analizowane i kontrolowane. Wszystkie te czynniki wygenerowały potrzebę znalezienia alternatywnych preparatów zapewniających wysoką skuteczność przy jednoczesnym braku negatywnych skutków dla zwierząt i zachowaniu ekonomicznego uzasadnienia stosowania.

Obecnie kokcydioza wywołana przez *Eimeria* spp oraz histomonoza, nazywana również czarną główką, powodowana przez *Histomonas meleagridis*, stanowią jedne z podstawowych problemów w chowie drobiu. Obie jednostki chorobowe powodują rokrocznie ogromne straty w branży. W przypadku kokcydiozy są to ponad 3 miliardy dolarów w skali całego świata [1]. Dotychczas skuteczną metodą walki z kokcydiozą było stosowanie specjalnej grupy antybiotyków, nazywanej kokcydiostatykami. Dzieli się one na jonoforowe i chemiczne. W ostatnich latach obserwuje się jednak wzrastającą oporność *Eimerii* spp., stąd też wprowadzono programy rotacyjne oparte na wymiennym stosowaniu kokcydiostatyków chemicznych i jonoforowych, czy też zastosowanie żywych szczepionek. Początkowo przyniosło to pożądaną efekt, jednakże zaobserwowano znacznie szybsze narastanie oporności względem chemicznych kokcydiostatyków, spowodowało to wydłużanie okresu ich odstawienia na dłuższy czas. Niemniej jednak, liczba kokcydiostatyków jest ograniczona, co więcej trwają obecnie prace nad zaklasyfikowaniem ich jako specjalnej grupy antybiotyków, co wyeliminuje możliwość ich stosowania w chowach bez antybiotykowych. Poza narastająca

opornością bardzo istotnym elementem jest również okres karencji charakterystyczny dla każdego antybiotyku. W wielu przypadkach wystąpienie choroby w końcowym etapie tuczu eliminuje możliwość zastosowania niektórych preparatów. Innym czynnikiem odgrywającym coraz większą rolę jest świadomość i preferencje konsumenta. W opinii konsumentów mięso drobiowe produkowane bez antybiotyków charakteryzuje się lepszymi właściwościami sensorycznymi jak i postrzegane jest jako produkt zdrowszy i lepszy dla organizmu, w porównaniu do drobiu pochodzącego ze standardowego chowu. Wcześniej wspomnianą alternatywą są żywe szczepionki przeciw kokcydiozie. Jednakże podobnie jak inne formy prewencji czy leczenia niosą one za sobą również negatywne konsekwencje. Wywołanie reakcji immunologicznej, a w dalszej perspektywie nabycie odporności czy też pamięci immunologicznej, odbywa się w tym przypadku poprzez wprowadzenie żywych *Eimerii* do organizmu i ich namnożeniu. Może to doprowadzić do uszkodzenia nabłonka jelit, a co za tym idzie koinfekcji wywołanej np. przez bakterie *Clostridium perfringens*. Bakteria ta jest odpowiedzialna za martwicze zapalenie jelit (*necrotic enteritis*) i zaraz obok kokcydiozy jest jednym z głównych problemów w chowie drobiu. Szacuje się, że w skali globalnej martwicze zapalenie jelit ze względu na straty produkcyjne, leczenie i zapobieganie wystąpieniu choroby generuje roczne koszty na poziomie 6 miliardów dolarów. Są one generowane głównie przez biegunki i ich bezpośredni wpływ na przyrosty masy ciała, wydajność produkcyjną, współczynnik konwersji paszy (feed conversion ratio) i co najistotniejsze poprzez radykalny wzrost śmiertelności [2,3].

Obecnie obserwowane preferencje konsumentów dotyczące mięsa bez antybiotyków powodują wywieranie coraz to większej presji na hodowcach. Przekłada się to bezpośrednio na cenę mięsa i jego jakość, a jednocześnie na opłacalność produkcji. Niemniej jednak, stosowanie alternatywnych preparatów i wyeliminowanie nadużywania antybiotyków prowadzi do ograniczenia rozwoju lekoopornych patogenów. Co ważne, jest to bardzo istotne w aspekcie bezpieczeństwa żywności. Zgodnie z raportem z 2021 r. Systemu wczesnego ostrzegania o niebezpiecznej żywności i paszach (Rapid Alert System for Food and Feed) ilość zdarzeń związanych z żywnością wzrosła o prawie 20% w stosunku do roku poprzedniego. Wiodące problemy dotyczyły obecności pestycydów i mikroorganizmów patogennych. 863 zgłoszenia dotyczyły obecności mikroorganizmów chorobotwórczych, z czego aż 641 dotyczyło *Salmonelli*. Należy również nadmienić, że 284 takie incydenty zostały wykryte w mięsie pochodzącym z Polski. O tym z jak istotny to problemem świadczy również fakt, że w zestawieniu tym Polska jest liderem pod względem ilości zgłoszeń – 381 [4].

Zagadnienie tak dużej ilości incydentów jest pośrednio wynikiem stosowania nadmiernych ilości antybiotyków. Szczepy *Salmonella* wykazują bardzo wysoką lekooporność, przez co ich zwalczanie jest niezwykle trudne i wielokrotnie nieskuteczne, a to natomiast prowadzi do szybkiego rozprzestrzeniania. Sprzyja temu również zaburzenie naturalnego mikrobiomu zwierząt hodowlanych. Narastająca lekooporność oraz brak naturalnej konkurencji ze strony innych mikroorganizmów znajdujących się w mikrobiocie, spowodowały że obecnie występujące szczepy *Salmonelli* czy *Escherichia coli* są niezwykle trudne do zwalczenia [5].

Dlatego też, tak istotne stało się znalezienie alternatywnych i skutecznych rozwiązań. Znane są liczne przykłady roślinnych metabolitów wtórnych, które charakteryzują się silną aktywnością przeciwdrobnoustrojową, w tym przeciwpierwotniaczą. Należą do m.in. polifenole [6,7] i związki fenolowe [8] terpenoidowe saponiny [9-11], alkaloidy [12-14] (w tym terpenoidowe), triterpenoidy [15,16], lignany [17]. Szczególne miejsce w tej grupie zajmują produkty destylacji materiału roślinnego z wodą lub parą wodną, tj. olejki eteryczne. Spośród kilkuset otrzymywanych na skalę przemysłową lub półprzemysłową, duża ich część posiada szerokie spektrum aktywności biologicznych. Znane są publikacje przedstawiające ich efekt przeciwpierwotniaczy [18-21].

Również obecnie na rynku znane są preparaty stosowane w prewencji kokcydiozy, w skład których wchodzi olejki eteryczne, np. z oregano, cynamon, mięta, goździki itd. Jednak wykazują one szereg problemów praktycznych. Są to m.in.:

- a) niedostateczna skuteczność;
- b) konieczność stosowania bardzo wysokich stężeń (tj. do 1 L na 1 m³ wody lub 1t paszy);
- c) w związku z dużymi stężeniami wysoka cena preparatu w przeliczeniu na 1 kg mięsa;
- d) obecność pozostałości zapachowych komponentów w mięsie; wynikająca ze stosowania wysokich dawek preparatów
- e) narastanie oporności w czasie;
- f) brak rozpuszczalności w wodzie lub powstawanie bardzo nietrwałych emulsji, powodujących zapychanie linii pojącej;

Firma AdiFeed obecna na rynku od ponad 15 lat, jest jednym z liderów produkcji mieszanek paszowych, dodatków do żywności i suplementów diety bazujących na komponentach pochodzenia naturalnego. Ze względu na trend produkcji mięsa, ograniczający zastosowanie antybiotyków lub ich całkowitą eliminację, firma AdiFeed zdecydowała się na rozwój technologii prowadzącej do powstania produktów nowej generacji. Krok ten był

odpowiedzią na oczekiwania hodowców drobiu co do możliwości zakupu preparatu wolnego od wad opisanych w punktach a-f. Decyzją władz firmy rozpoczęto badania nad wytypowaniem potencjalnych składników, opracowaniem formulacji, technologii produkcji preparatu i ostatecznie komercjalizacji wyrobu gotowego stanowiącego alternatywę dla antybiotyków w hodowli drobiu i trzody.

Obiecujące badania wstępne, przeprowadzone w latach 2017-18 z zastosowaniem mieszanin olejków eterycznych z wybranymi dodatkami stanowiły podstawę do aplikowania do programu Doktorat Wdrożeniowy II Edycja. W roku 2018 zostało ono przyznane w ramach konkursu.

Na podstawie najnowszych doniesień literaturowych jak i doświadczenia pracowników firmy AdiFeed wytypowano 6 roślin o największym potencjale przeciwpierwotniaczym, a zarazem posiadających różne klasy substancji aktywnych. W początkowym etapie badań skupiono się na analizie właściwości ekstraktów, pozyskanych z następujących roślin: berberys zwyczajny (*Berberis vulgaris* L.), cząber ogrodowy (*Satureja hortensis* L.), tatarak zwyczajny (*Acorus calamus* L.), katalpa zwyczajna (*Catalpa bignonioides* Walter), paulownia omszona (*Paulownia tomentosa* (Thunberg) Steudel), wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare* L.). Do wcześniej wyselekcjonowanych roślin dodano również siwiec żółty (*Glaucium flavum* Cr.) i oman wielki (*Inula helenium* L.). Materiał roślinny poddano następnie ekstrakcji z wykorzystaniem zmodyfikowanego protokołu Dragendorffa. Susz roślinny został poddany ekstrakcji kolejno ekstrahentami: eter naftowy 40/60 → eter dietylowy → izopropanol → izopropanol (70%) → woda alkaliczna → woda kwaśna, jak również każdą z cieczy z osobna. Surowce zawierające olejki eteryczne (cząber ogrodowy, tatarak zwyczajny, wrotycz pospolity oraz oman wielki) poddane zostały również procesowi destylacji z parą wodną. Tak przygotowane ekstrakty i olejki eteryczne poddane zostały następnie analizom z wykorzystaniem metod chromatograficznych: TLC oraz GC-MS. Uzyskane wyniki pokazały, iż stężenie substancji aktywnych różniło się diametralnie w zależności od zastosowanego ekstrahenta, ale także wartości pH. W kolejnym etapie prac badawczych uzyskane ekstrakty analizowano pod kątem pierwotniakobójczym. Uzyskano wyniki porównywalne lub nieznacznie gorsze od testowanych wzorcowych antybiotyków – chloramfenikolu i metronidazolu. Ze względu jednak na zmniejszoną dostępność surowca i jego wzrost ceny zdecydowano się na zmianę komponentu aktywnego. Była ona również spowodowana trudnościami w opracowaniu certyfikatów jakości produktu i jego standaryzacji. Dokumenty te

są niezbędne do zapewnienia ciągłości systemów jakości, wymaganych w procesie sprzedaży (rynek UE) i rejestracji (kraje poza UE).

Zaobserwowano jednak, iż największym potencjałem przeciwdrobnoustrojowym charakteryzowały się ekstrakty pozyskane z roślin zawierających olejki eteryczne oraz uzyskane z nich destylaty. Jednocześnie opanowano proces szybkiej analizy jakościowej i ilościowej analizy substancji aktywnych, w laboratorium analitycznym firmy AdiFeed. Posłużono się przy tym opracowaną, przy współudziale z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu techniką ilościowej analizy GC-MS. Procedury te wdrożone zostały do standardowych metod analitycznych w firmie AdiFeed. W związku z powyższym podjęto decyzję o kontynuowaniu prac badawczych z wykorzystaniem, olejków eterycznych jako najbardziej obiecującej grupy substancji aktywnych wykazujących działanie przeciwpierwotniacze. Zastosowanie połączeń metali, kwasów i roślinnych metabolitów wtórnych było kontynuacją wcześniejszych badań wstępnych prowadzonych przez autora i promotorów pracy. Uzyskane metodą destylacji z parą wodną oraz dostępne komercyjnie olejki eteryczne i niektóre z substancji aktywnych, poddano reakcjom z kwasami organicznymi w obecności jonów metali. Otrzymane wyniki w ramach realizacji Doktoratu Wdrożeniowego zostały zastrzeżone w Urzędzie Patentowym RP w postaci zgłoszeń patentowych. Na dzień 28 marca 2023 6 z nich uzyskało pełną ochronę, 6 kolejnych jest w trakcie weryfikacji przez Urząd Patentowy RP. Co więcej, kolejne 6 zgłoszeń patentowych jest obecnie w trakcie procesu zastrzegania patentowego. Wyniki przeprowadzonych badań zostały także opisane w czterech publikacjach.

2. CELE I HIPOTEZY

Celem prac badawczych zrealizowanych ramach doktoratu wdrożeniowego było opracowanie składu, formulacji i ostatecznie wdrożenie do produkcji preparatów o właściwości przeciwpasożytniczych i przeciwpierwotniaczych opartych na wybranych składnikach pochodzenia roślinnego. Przeprowadzone badania w początkowej fazie skupiały się na różnych grupach substancji aktywnych pozyskiwanych poprzez ekstrakcję z wykorzystaniem ekstrahentów o różnych polarnościach. Po doświadczeniach fazy wstępnej badań, wytypowano wybrane olejki eteryczne i ich mieszaniny z kwasami organicznymi i jonami metali, jako najbardziej optymalne we wdrożeniu. Pod uwagę brano odpowiednio:

- skuteczność bójczą wobec pierwotniaków;
- brak skutków ubocznych dla zwierząt;
- pozostałości składników aktywnych, w tym zapachowych w mięsie;
- dostępność komponentów do jego produkcji;
- powtarzalność składu surowca;
- cenę jednostkową surowca;
- prawne aspekty wprowadzenia na rynek;
- stabilność otrzymanych formulacji;

Powyższe cele zostały zrealizowane poprzez:

- Przegląd literaturowy skuteczności poszczególnych surowców;
- Przegląd komercyjnej dostępności (cena, czas dostawy, jednorodność) surowca;
- Badanie właściwości przeciwpierwotniaczych i przeciwbakteryjnych wybranych ekstraktów zielarskich, w celu wytypowania tych o największym potencjale działania
- Analiza *in vitro* oraz *in vivo* wybranych mieszanin pod kątem ich właściwości przeciwpierwotniaczych i wpływu na organy wewnętrzne
- Stworzenie skutecznego preparatu o działaniu wspierającym profilaktykę i zwalczanie pasożytów i pierwotniaków, znajdującego zastosowanie zarówno u zwierząt, jak i u ludzi.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

3.1. Publikacja 1

TYTUŁ:

Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures

AUTORZY:

Hubert Iwiński, Jacek Łyczko, Henryk Różański, Antoni Szumny

CZASOPISMO:

Antibiotics, 2022, 11, 913.

doi.org/10.3390/antibiotics11070913

Article

Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures

Hubert Iwiński^{1,2,*} , Jacek Łyczko¹ , Henryk Różański^{2,3} and Antoni Szumny¹ 

¹ Department of Food Chemistry and Biocatalysis, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland; jacek.lyczko@upwr.edu.pl (J.Ł.); antoni.szumny@upwr.edu.pl (A.S.)

² AdiFeed Sp. z o.o., Opaczewska, 02-201 Warsaw, Poland; rozanski@rozanski.ch

³ Laboratory of Industrial and Experimental Biology, Institute for Health and Economics, Carpathian State College in Krosno, Rynek, 38-400 Krosno, Poland

* Correspondence: hubert.iwinski@upwr.edu.pl

Abstract: Antimicrobial resistance (AMR) is becoming more common in both bacteria and pathogenic protozoa. Therefore, new solutions are being sought as alternatives to currently used agents. There are many new ideas and solutions, especially compounds of natural origin, including essential oils. In the present study, the antiprotozoal activity of a mixture of essential oils (eucalyptus, lavender, cedar and tea tree), organic acids (acetic acid, propionic acid and lactic acid) and metal ions (Cu, Zn, Mn) were tested. As a model, protozoans were selected: *Euglena gracilis*, *Gregarina blattarum*, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum*, *Pentatrichomonas hominis*. The tested concentrations of mixtures were in the range of 0.001–1.5%. The analyses show unexpected, very strong protozoicidal activity of combinations, presenting the synergy of compounds via determination of LD₅₀ and LD₁₀₀ values. Obtained mixtures showed significantly higher activity against protozoans, compared to chloramphenicol and metronidazole. Most of the analyzed samples show high antiprotozoal activity at very low concentration, in the range of 0.001–0.009%. The most effective combinations for all analyzed protozoans were the cedar essential oil and tea tree essential oil with a mixture of acids and manganese or zinc ions. Innovative combinations of essential oils, organic acids and metal ions are characterized by very high antiprotozoal activity at low doses, which, after further investigation, can be applicable for control of protozoan pathogens.

Keywords: antiprotozoal; antiparasitic activity; essential oils; LD₅₀; phytochemistry; bioactivity; terpenes; phytoncides



Citation: Iwiński, H.; Łyczko, J.; Różański, H.; Szumny, A. Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures. *Antibiotics* **2022**, *11*, 913. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070913>

Academic Editors: Riccardo Petrelli, Filippo Maggi and Marcello Iriti

Received: 2 June 2022

Accepted: 2 July 2022

Published: 7 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Each year, more than 15 million people die worldwide due to infectious diseases caused by various pathogens including bacteria, protozoa, viruses or fungi [1]. One of the main causes of death, besides bacterial and viral diseases, are diseases caused by protozoa such as *Plasmodium spp.*, *Cryptosporidium spp.*, *Leishmania spp.* and *Trypanosoma spp.* [2].

The most deadly diseases caused by protozoa undoubtedly include malaria, human African trypanosomiasis (HAT, sleeping sickness), Chagas disease, Visceral leishmaniasis (VL, kala azar), toxoplasmosis, Naegleriasis (PAM—primary amoebic meningoencephalitis), babesiosis or cryptosporidiosis [2–4]. The most common signs of protozoan infection include diarrhea, fever, malaise or hepatosplenomegaly [2,5].

Currently, there are three main methods of controlling protozoan parasites: prevention and containment of protozoan vectors, vaccination and antibiotic-based pharmacotherapy [2,6]. Based on the example of malaria, we know that the primary and so far most effective weapon in the fight against parasitic protozoa is prevention and elimination of vectors, which are most often mosquitoes, ticks or bedbugs. To reduce the risk of infection, many international and national guidelines recommend the use of insecticide-treated bed nets (ITNs), long-lasting insecticidal nets (LLINs), indoor residual spraying (IRS) or both

methods together. Moreover, control of vector abundance also contributes significantly to reduce the spread of pathogens. The most commonly used method of controlling protozoa is the use of pharmaceuticals. Most often, these are single active substances that show antimicrobial activity. These include nifurtimox, pentamidine, quinine sulfate, fexinidazoles, benznidazoles, artemisinin derivatives and chloroquine, among others. However, most of them have been marketed for completely different purposes and medical indications. Mixed therapies combining two or more pharmacological agents, for example, nifurtimox-eflornithine (NECT), artemether-lumefantrine or quinine sulfate with doxycycline, tetracycline or clindamycin are also commonly used to optimize effects [5,7–11].

Mixed therapies are also a response to increasing resistance of microorganisms to available antibiotics. This is currently a significant problem that affects people all over the world. Its genesis is very complex and is influenced, among others, by high mobility and the possibility of movement all over the world, inadequate hygienic and sanitary conditions or the excessive use of antibiotics both in humans and animals [12,13]. As mentioned above, reducing pathogenic protozoa, especially those showing resistance, is through combination therapy. However, without clinical trials using similar combinations, it is very difficult to estimate their cytotoxicity and interaction in the body.

The lack of new and effective antibiotics causes the need for another alternative. This leads very often to developing an effective method to fight protozoa. The object of interest of researchers around the world are currently natural compounds extracted or obtained from plants [14–16]. Compounds showing antimicrobial activity include phenolic compounds, terpenes, sulfur glycosides or alkaloids [17].

Essential oils are characterized by a very high antimicrobial and antiprotozoal potential [18–20]. They are volatile mixtures, most of which are scented, of various substances of mainly plant origin. They are obtained via steam distillation from various fragments of plant leaves, flowers, fruits, buds, bark, seeds and even roots. They are usually stored in glandulars [21]. The growing interest in natural solutions, being an alternative to the currently used, generates new studies and reports in the literature. Papers or patents present that EOs are characterized by great antimicrobial potential. In vitro studies performed show very strong antiprotozoal activity of, e.g., tea tree oil (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) [22], lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) [23], thyme (*Thymus vulgaris* L.) [24], catnip (*Nepeta cataria* L.) [25], yarrow (*Achillea millefolium* L.), clove (*Syzygium aromaticum* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) [18], *Lippia* sp. [26], peppermint (*Mentha piperita* L.) [27] and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) [28]. The current interest in natural alternatives to the available therapies is generating an increasing amount of scientific research. A growing number of studies are also investigating the antiprotozoal properties of individual components of essential oils, such as monoterpenoids and sesquiterpenoids as well as their alcohol, ester or ketone derivatives [29].

Organic acids are commonly known compounds used in food, cosmetic, feed and pharmaceutical markets as acidifiers, stabilizers, acidity regulators or preservatives. The last feature has been used widely through the ages for food prevention. That property is mainly based on the lowering of the pH, which results in the inhibition of microbials. Organic acids show very good results in broilers and fish production, by their antibacterial and antiprotozoal properties [30–33].

The combination of metals, e.g., iron, cobalt, nickel, gallium, copper, gold or silver with drugs are well known and very effective. Complex of Ru(II) chloroquine was one of the first tested antiprotozoal drugs combined with metal ions and showed a much better result than chloroquine itself. Other examples tested and evaluated for their antiprotozoal properties can be auranofin, triethylphosphine gold(I) chloride, cisplatin, 2-mercaptopyridine N-oxide complexes with Pt(II), Au(I) and Pd(II), or one of the most efficient for organometallic compounds, ferroquine [34–36]. Moreover, not only do the combining synthetic drugs and metals have great potential. Natural compounds such as essential oils, alkaloids and phenols in combination with metal ions are also investigated by researchers [37].

The mode of action of metal ions, mostly, is to impair the proper function of the cell membrane. They may be incorporated with the cell membrane, modulate ion channels, disrupt proton transfer or electrostatically interact with charges on the membrane surface. Metal ions can also affect various cell processes within cytoplasm such as inhibition of enzymes and proteins, catalyze the n of oxygen and hydroperoxide radicals and interrupt nutrient uptake [37–39].

The aim of this study was to investigate antiprotozoal properties of an innovative mixture of essential oils (eucalyptus, lavender, cedar and tea tree), organic acids (acetic, propionic, lactic) and metal ions (Cu, Zn and Mn). Previous research and scientific papers showed antiprotozoal properties of all components, but there were no scientific data about the proposed combinations.

2. Results

2.1. Antiprotozoal Activity

In the study, antiprotozoal properties were analyzed for single components of the mixtures: 48 combinations (4 essential oils with 3 metals and 3 organic acids and their mixtures). All obtained combinations are presented in Table 1. Chloramphenicol and metronidazole were used as standard substances. The obtained results are presented in Tables 2–9. They are characterized by variable efficiency depending on the combination used and the protozoan species. The combinations containing an essential oil, a single acid and one of the selected metals showed much stronger antiprotozoal properties than the single components, and in some cases, than the antibiotics used for comparison. Among these combinations, the combination of tea tree essential oil, with propionic acid and manganese (TPMn) showed the highest potential. TPMn showed LD₅₀, at a very low amount—0.01%. That result is much better than the reference antibiotics—chloramphenicol and metronidazole. It was also observed that the strongest activity independently of the used oil was observed for propionic acid and manganese ions.

Table 1. Combinations obtained during the research.

Essential Oil	Acetic Acid (A)			Propionic Acid (P)			Lactic Acid (L)			Mixture of Acids (M)		
	Cu	Mn	Zn	Cu	Mn	Zn	Cu	Mn	Zn	Cu	Mn	Zn
Eucalyptus essential oil (<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.) (E)	EACu	EAMn	EAZn	EPCu	EPMn	EPZn	ELCu	ELMn	ELZn	EMCu	EMMn	EMZn
Tea tree essential oil (<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel) (T)	TACu	TAMn	TAZn	TPCu	TPMn	TPZn	TLCu	TLMn	TLZn	TMCu	TMMn	TMZn
Cedar essential oil (<i>Cedrus</i> sp.) (C)	CACu	CAMn	CAZn	CPCu	CPMn	CPZn	CLCu	CLMn	CLZn	CMCu	CMMn	CMZn
Lavender essential oil (<i>Lavandula angustifolia</i> Miller) (L)	LACu	LAMn	LAZn	LPCu	LPMn	LPZn	LLCu	LLMn	LLZn	LMCu	LMMn	LMZn

Table 2. LD₅₀, LD₁₀₀ values of eucalyptus essential oil (*Eucalyptus globulus* Labill.) and the components used in the study.

Protozoa	CH ^a	M ^b	Acetic Acid	Propionic Acid	Lactic Acid	Mixture of Acids ^c	Manganese (II) Chloride Solution ^d	Copper (II) Carbonate Hydroxide Solution ^e	Zinc Carbonate Solution ^f	Catalyst Solution ^g	Eucalyptus Essential Oil (<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.09%	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.6% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.9%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.7%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.1%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.4% LD ₁₀₀ : 0.7%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.7% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.5%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.07% LD ₁₀₀ : 0.15%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.6% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.4%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.7%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.001% LD ₁₀₀ : 0.006%	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.14%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%

^a—chloramphenicol, ^b—metronidazole, ^c—in rate 1:1:1, ^d—10% solution, ^e—10% solution, ^f—10% solution, ^g—5% solution, n.t—not tested.

Table 3. LD₅₀, LD₁₀₀ values for the tested mixtures of eucalyptus essential oil (*Eucalyptus globulus* Labill.) (E), organic acids (Acetic acid—A, Propionic acid—P, Lactic acid—L, Mixture of acids—M) and metal ion against selected protozoa.

Protozoa	Eucalyptus Essential Oil (<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	EACu	EAMn	EAZn	EPCu	EP Mn	EP Zn	ELCu	EL Mn	EL Zn	EMCu	EM Mn	EM Zn
<i>Euglena gracilis</i> ¹	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 ab	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.015 b	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.038 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.028 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 ab	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.102 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.038 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.028 ab	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.102 a
	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.068 abc	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.058 abcd	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 abc	LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.025 d	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.078 a	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.070 ab	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.069 abc	LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.032 bcd	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.080 a	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.088 a	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 abc	LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.030 cd
<i>Gregarina blattarum</i> ¹	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.038 a LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.045 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.034 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 a LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.060 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.034 a LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.038 b	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.040 a LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.031 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.028 a LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.028 a LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 b	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 a LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.049 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.035 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.248 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.025 a LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.056 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.035 a LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.041 b
	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.028 c LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.045 abc LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.076 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.052 abc LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.082 a	LD ₅₀ : 0.07% ± 0.065 ab LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 c LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 bc LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.080 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.049 abc LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.085 a	LD ₅₀ : 0.07% ± 0.072 a LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.082 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.031 c LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.055 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.045 abc LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.082 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.050 abc LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.078 a	LD ₅₀ : 0.07% ± 0.070 ab LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 a
<i>Paramecium caudatum</i> ¹	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.020 a LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.070 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.040 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 a LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 a LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.071 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 a LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.024 a LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.065 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.024 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.069 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.032 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 a LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.078 a

Table 3. Cont.

Protozoa	Eucalyptus Essential Oil (<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	EACu	EAMn	EAZn	EPCu	EPMn	EPZn	ELCu	ELMn	ELZn	EMCu	EMMn	EMZn
<i>Pentatrichomonas hominis</i> ¹	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.050 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.040 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.030 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.035 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.040 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.048 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.024 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.052 a
	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 ab	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.045 b	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.085 ab	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 b	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 ab	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.050 b	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.085 ab	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.035 b	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 ab	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 b	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.125 a	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.040 b

¹ Values followed by the same letter within a row are not significantly different ($p > 0.05$, Tukey's test), ^a—in rate 1:1:1, ^b—10% solution, ^c—10% solution, ^d—10% solution, EACu, EAMn, EAZn—Eucalyptus essential oil (E) with acetic acid (A) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; EPCu, EPMn, EPZn—Eucalyptus essential oil (E) with propionic acid (P) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; ELCu, ELMn, ELZn—Eucalyptus essential oil (E) with lactic acid (L) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; EMCu, EMMn, EMZn—Eucalyptus essential oil (E) with mixture of acids (M) and Cu, Mn, Zn ions, respectively.

Table 4. LD₅₀, LD₁₀₀ values of tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) and the components used in the study.

Protozoa	CH ^a	M ^b	Acetic Acid	Propionic Acid	Lactic Acid	Mixture of Acids ^c	Manganese (II) Chloride Solution ^d	Copper (II) Carbonate Hydroxide Solution ^e	Zinc Carbonate Solution ^f	Catalyst Solution ^g	Tea Tree Essential Oil (<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.09%	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.6% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.9%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.7%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.1%	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.1%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.4% LD ₁₀₀ : 0.7%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.7% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.25% LD ₁₀₀ : 0.3%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.07% LD ₁₀₀ : 0.15%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.6% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.4%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.001% LD ₁₀₀ : 0.006%	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.25%
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.14%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.08% LD ₁₀₀ : 0.1%

^a—chloramphenicol, ^b—metronidazole, ^c—in rate 1:1:1, ^d—10% solution, ^e—10% solution, ^f—10% solution, ^g—5% solution, n.t—not tested.

Table 5. LD₅₀, LD₁₀₀ values of tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) (T), organic acids (Acetic acid—A, Propionic acid—P, Lactic acid—L, Mixture of acids—M) and metal ion against selected protozoa.

Protozoa	Tea Tree Essential Oil (<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	TACu	TAMn	TAZn	TPCu	TPMn	TPZn	TLCu	TLMn	TLZn	TMCu	TMMn	TMZn
<i>Euglena gracilis</i> ¹	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.052 abc	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.026 a	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.0134 ab	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.020 ab	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.021 ab	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 ab	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 ab	LD ₅₀ : 0.001% ± 0.001 b	LD ₅₀ : 0.001% ± 0.001 b	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.002 b
	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.059 ab	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 a	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 abc	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.035 bcd	LD ₁₀₀ : 0.02% ± 0.018 de	LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.028 cde	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.038 bcd	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 abcd	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 abc	LD ₁₀₀ : 0.003% ± 0.002 e	LD ₁₀₀ : 0.002% ± 0.002 e	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 e
<i>Gregarina blattarum</i> ¹	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.038 b	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.036 b	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 b	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.036 b	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.048 b	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.051 b	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.031 b	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.049 b	LD ₅₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₅₀ : 0.004% ± 0.004 c	LD ₅₀ : 0.004% ± 0.004 c	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.002 c
	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 b	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 bcd	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.060 b	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.058 bc	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.078 b	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 b	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.038 bcd	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 b	LD ₁₀₀ : 0.15% ± 0.138 a	LD ₁₀₀ : 0.006% ± 0.006 d	LD ₁₀₀ : 0.007% ± 0.007 cd	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.004 d
<i>Amoeba proteus</i> ¹	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.038 bc	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.035 cd	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 bc	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 bc	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.014 de	LD ₅₀ : 0.07% ± 0.072 a	LD ₅₀ : 0.06% ± 0.058 ab	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.012 e	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.016 de	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 e	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 e	LD ₅₀ : 0.001% ± 0.001 e
	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 bc	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.064 bc	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 abc	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 abc	LD ₁₀₀ : 0.01% ± 0.014 de	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.092 a	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.082 ab	LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.028 d	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 c	LD ₁₀₀ : 0.003% ± 0.004 de	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.003 e	LD ₁₀₀ : 0.002% ± 0.002 e
<i>Paramecium caudatum</i> ¹	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 abcd	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.020 abcd	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 abcd	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 ab	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.012 bcd	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.050 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.049 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.035 abc	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.024 abcd	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 cd	LD ₅₀ : 0.001% ± 0.001 d	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.003 cd
	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 bcd	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.045 cde	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 abc	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 ab	LD ₁₀₀ : 0.02% ± 0.022 ef	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.085 a	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 abc	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 cde	LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.032 de	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.005 f	LD ₁₀₀ : 0.002% ± 0.002 f	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.005 f
<i>Pentatrachomonas hominis</i> ¹	LD ₅₀ : 0.09% ± 0.085 a	LD ₅₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₅₀ : 0.07% ± 0.065 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 cd	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.012 de	LD ₅₀ : 0.07% ± 0.065 ab	LD ₅₀ : 0.025% ± 0.025 cde	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 bc	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.020 cde	LD ₅₀ : 0.004% ± 0.004 e	LD ₅₀ : 0.007% ± 0.007 de	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 e
	LD ₁₀₀ : 0.35% ± 0.362 a	LD ₁₀₀ : 0.2% ± 0.238 a	LD ₁₀₀ : 0.25% ± 0.238 a	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.045 b	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.035 b	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.088 b	LD ₁₀₀ : 0.045% ± 0.046 b	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 b	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.045 b	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 b	LD ₁₀₀ : 0.009% ± 0.008 b	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.002 b

¹ Values followed by the same letter within a row are not significantly different ($p > 0.05$, Tukey's test), ^a—in rate 1:1:1, ^b—10% solution, ^c—10% solution, ^d—10% solution, TACu, TAMn, TAZn—Tea tree essential oil (T) with acetic acid (A) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; TPCu, TPMn, TPZn—Tea tree essential oil (T) with propionic acid (P) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; TLCu, TLMn, TLZn—Tea tree essential oil (T) with lactic acid (L) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; TMCu, TMMn, TMZn—Tea tree essential oil (T) with mixture of acids (M) and Cu, Mn, Zn ions, respectively.

Table 6. LD₅₀, LD₁₀₀ values of cedar essential oil (*Cedrus sp.*) and the components used in the study.

Protozoa	CH ^a	M ^b	Acetic Acid	Propionic Acid	Lactic Acid	Mixture of Acids ^c	Manganese (II) Chloride Solution ^d	Copper (II) Carbonate Hydroxide Solution ^e	Zinc Carbonate Solution ^f	Catalyst Solution ^g	Cedar Essential Oil (<i>Cedrus sp.</i>)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.09%	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.6% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.9%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.7%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.1%	LD ₅₀ : 0.7% LD ₁₀₀ : 0.9%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.4% LD ₁₀₀ : 0.7%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.7% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.7% LD ₁₀₀ : 0.9%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.07% LD ₁₀₀ : 0.15%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.6% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.4%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.4% LD ₁₀₀ : 0.6%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.001% LD ₁₀₀ : 0.006%	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.25%
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.14%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%

^a—chloramphenicol, ^b—metronidazole, ^c—in rate 1:1:1, ^d—10% solution, ^e—10% solution, ^f—10% solution, ^g—5% solution, n.t—not tested.

Table 7. LD₅₀, LD₁₀₀ values of cedar essential oil (*Cedrus sp.*) (C), organic acids (Acetic acid—A, Propionic acid—P, Lactic acid—L, Mixture of acids—M) and metal ion against selected protozoa.

Protozoa	Cedar Essential Oil (<i>Cedrus sp.</i>)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	CACu	CAMn	CAZn	CPCu	CPMn	CPZn	CLCu	CLMn	CLZn	CMCu	CMMn	CMZn
<i>Euglena gracilis</i> ¹	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.033 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.026 a	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.014 ab	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.020 ab	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.014 ab	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.023 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.025 a	LD ₅₀ : 0.001% ± 0.001 b	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 b	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.003 b
	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.079 a	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 abc	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 ab	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.048 bcd	LD ₁₀₀ : 0.02% ± 0.018 fg	LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.028 def	LD ₁₀₀ : 0.02% ± 0.023 efg	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.043 cde	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.055 bc	LD ₁₀₀ : 0.002% ± 0.002 g	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 g	LD ₁₀₀ : 0.006% ± 0.007 fg
<i>Gregarina blattarum</i> ¹	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 ab	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.034 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.033 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.031 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.031 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 ab	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.043 a	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.003 b	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 b	LD ₅₀ : 0.004% ± 0.004 b
	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 abc	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 bc	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.082 a	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 c	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.070 ab	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 bc	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.038 c	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.049 bc	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.045 bc	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 d	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.005 d	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.005 d
<i>Amoeba proteus</i> ¹	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.038 ab	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.052 a	LD ₅₀ : 0.06% ± 0.062 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 ab	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 ab	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.038 ab	LD ₅₀ : 0.06% ± 0.058 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 ab	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.019 bc	LD ₅₀ : 0.006% ± 0.006 c	LD ₅₀ : 0.005% ± 0.005 c	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 c
	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 b	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.076 ab	LD ₁₀₀ : 0.01% ± 0.014 c	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 ab	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.078 ab	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.058 ab	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.082 a	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 ab	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 b	LD ₁₀₀ : 0.008% ± 0.008 c	LD ₁₀₀ : 0.007% ± 0.007 c	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.005 c

Table 7. Cont.

Protozoa	Cedar Essential Oil (<i>Cedrus sp.</i>)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	CACu	CAMn	CAZn	CPCu	CPMn	CPZn	CLCu	CLMn	CLZn	CMCu	CMMn	CMZn
<i>Paramecium caudatum</i> ¹	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.025 ab LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.082 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.040 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.048 a LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 a LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 a LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.060 abc	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.040 a LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.030 ab LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 bc	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.035 a LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.078 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.024 ab LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.035 cd	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.002 b LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 e	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.002 b LD ₁₀₀ : 0.008% ± 0.008 de	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 b LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 e
<i>Pentatrachomonas hominis</i> ¹	LD ₅₀ : 0.09% ± 0.085 a LD ₁₀₀ : 0.15% ± 0.150 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.020 bc LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 bcde	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.040 b LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 b	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 b LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.058 bc	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.025 bc LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.040 bcde	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.025 bc LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.048 bcd	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 b LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 bcde	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 bc LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.025 cde	LD ₅₀ : 0.025% ± 0.026 bc LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 b	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.002 c LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 e	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 c LD ₁₀₀ : 0.003% ± 0.002 e	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 c LD ₁₀₀ : 0.007% ± 0.006 de

¹ Values followed by the same letter within a row are not significantly different ($p > 0.05$, Tukey's test), ^a—in rate 1:1:1, ^b—10% solution, ^c—10% solution, ^d—10% solution; CACu, CAMn, CAZn—Cedar essential oil (C) with acetic acid (A) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; CPCu, CPMn, CPZn—Cedar essential oil (C) with propionic acid (P) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; CLCu, CLMn, CLZn—Cedar essential oil (C) with lactic acid (L) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; CMCu, CMMn, CMZn—Cedar essential oil (C) with mixture of acids (M) and Cu, Mn, Zn ions, respectively.

Table 8. LD₅₀, LD₁₀₀ values of lavender essential oil (*Lavandula angustifolia* Miller) and the components used in the study.

Protozoa	CH ^a	M ^b	Acetic Acid	Propionic Acid	Lactic Acid	Mixture of Acids ^c	Manganese (II) Chloride Solution ^d	Copper (II) Carbonate Hydroxide Solution ^e	Zinc Carbonate Solution ^f	Catalyst Solution ^g	Lavender Essential Oil (<i>Lavandula angustifolia</i> Miller)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.09%	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.6% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.9%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.7%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.1%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 0.9%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.4% LD ₁₀₀ : 0.7%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.7% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.7% LD ₁₀₀ : 0.8%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.07% LD ₁₀₀ : 0.15%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.6% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.4%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.2%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.5% LD ₁₀₀ : 0.8%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.001% LD ₁₀₀ : 0.006%	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.3% LD ₁₀₀ : 0.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.2%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.25%
<i>Pentatrachomonas hominis</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.05% LD ₁₀₀ : 0.14%	LD ₅₀ : 1.0% LD ₁₀₀ : 1.5%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.3%	LD ₅₀ : 0.8% LD ₁₀₀ : 1.0%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.1% LD ₁₀₀ : 0.3%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%	LD ₅₀ : 0.9% LD ₁₀₀ : 1.1%	LD ₅₀ : 0.2% LD ₁₀₀ : 0.4%

^a—chloramphenicol, ^b—metronidazole, ^c—in rate 1:1:1, ^d—10% solution, ^e—10% solution, ^f—10% solution, ^g—5% solution, n.t—not tested.

Table 9. LD₅₀, LD₁₀₀ values of lavender essential oil (*Lavandula angustifolia* Miller) (L), organic acids (Acetic acid—A, Propionic acid—P, Lactic acid—L, Mixture of acids—M) and metal ion against selected protozoal.

Protozoa	Lavender Essential Oil (<i>Lavandula angustifolia</i> Miller)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	LACu	LAMn	LAZn	LPCu	LPMn	LPZn	LLCu	LLMn	LLZn	LMCu	LMMn	LMZn
<i>Euglena gracilis</i> ¹	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 ab	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.024 bcd	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 a	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.026 abc	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.014 cde	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.028 abc	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.016 bcde	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.025 abc	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.025 abc	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 e	LD ₅₀ : 0.001% ± 0.001 e	LD ₅₀ : 0.004% ± 0.004 de
	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.059 ab	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.035 cd	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.078 a	LD ₁₀₀ : 0.045% ± 0.046 bcd	LD ₁₀₀ : 0.03% ± 0.025 de	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.050 bc	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 bcd	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.045 bcd	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 bc	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 e	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.004 e	LD ₁₀₀ : 0.006% ± 0.006 e
<i>Gregarina blattarum</i> ¹	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 abc	LD ₅₀ : 0.01% ± 0.011 cd	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 abc	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.034 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 abc	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.036 ab	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.049 a	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.022 bcd	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 a	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.003 d	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 d	LD ₅₀ : 0.004% ± 0.004 d
	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 ab	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.040 b	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.082 a	LD ₁₀₀ : 0.045% ± 0.044 b	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.060 ab	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.052 b	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.065 ab	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 b	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.085 a	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 c	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.005 c	LD ₁₀₀ : 0.006% ± 0.006 c
<i>Amoeba proteus</i> ¹	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.052 ab	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.052 ab	LD ₅₀ : 0.06% ± 0.062 a	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 abc	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 ab	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.038 abc	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.016 cd	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.042 abc	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.026 bcd	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.003 d	LD ₅₀ : 0.002% ± 0.002 d	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.002 d
	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.055 b	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.074 ab	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.085 a	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.060 ab	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.070 ab	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.068 ab	LD ₁₀₀ : 0.05% ± 0.049 b	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 ab	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.055 b	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 c	LD ₁₀₀ : 0.004% ± 0.004 c	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.005 c
<i>Paramecium caudatum</i> ¹	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.050 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.048 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 abc	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.045 ab	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.032 abc	LD ₅₀ : 0.03% ± 0.030 bc	LD ₅₀ : 0.02% ± 0.018 cd	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.039 ab	LD ₅₀ : 0.04% ± 0.035 abc	LD ₅₀ : 0.006% ± 0.006 d	LD ₅₀ : 0.005% ± 0.005 d	LD ₅₀ : 0.004% ± 0.004 d
	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.082 a	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 a	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 a	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.060 ab	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.080 a	LD ₁₀₀ : 0.04% ± 0.042 b	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 a	LD ₁₀₀ : 0.06% ± 0.062 ab	LD ₁₀₀ : 0.008% ± 0.008 c	LD ₁₀₀ : 0.008% ± 0.008 c	LD ₁₀₀ : 0.006% ± 0.006 c
<i>Pentatrichomonas hominis</i> ¹	LD ₅₀ : 0.07% ± 0.070 ab	LD ₅₀ : 0.07% ± 0.072 ab	LD ₅₀ : 0.06% ± 0.040 cd	LD ₅₀ : 0.08% ± 0.075 ab	LD ₅₀ : 0.06% ± 0.025 de	LD ₅₀ : 0.08% ± 0.080 a	LD ₅₀ : 0.05% ± 0.048 bcd	LD ₅₀ : 0.08% ± 0.075 ab	LD ₅₀ : 0.055% ± 0.054 abc	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.002 e	LD ₅₀ : 0.003% ± 0.002 e	LD ₅₀ : 0.004% ± 0.004 e
	LD ₁₀₀ : 0.1% ± 0.125 a	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.085 bc	LD ₁₀₀ : 0.08% ± 0.075 bc	LD ₁₀₀ : 0.1% ± 0.098 abc	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.092 abc	LD ₁₀₀ : 0.1% ± 0.110 ab	LD ₁₀₀ : 0.07% ± 0.072 c	LD ₁₀₀ : 0.1% ± 0.110 ab	LD ₁₀₀ : 0.09% ± 0.088 bc	LD ₁₀₀ : 0.005% ± 0.005 d	LD ₁₀₀ : 0.007% ± 0.006 d	LD ₁₀₀ : 0.008% ± 0.008 d

¹ Values followed by the same letter within a row are not significantly different ($p > 0.05$, Tukey's test), ^a—in rate 1:1:1, ^b—10% solution, ^c—10% solution, ^d—10% solution; LACu, LAMn, LAZn—Lavender essential oil (L) with acetic acid (A) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; LPCu, LPMn, LPZn—Lavender essential oil (L) with propionic acid (P) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; LLCu, LLMn, LLZn—Lavender essential oil (L) with lactic acid (L) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; LMCu, LMMn, LMZn—Lavender essential oil (L) with mixture of acids (M) and Cu, Mn, Zn ions, respectively.

The lowest antiprotozoal values against analyzed protozoa were obtained for innovative combinations of essential oil with the mixture of organic acids and selected metal. They showed an activity almost ten times stronger than that of analogous mixtures containing a single organic acid and an activity almost a hundred times stronger than that of single essential oils. Many of the proposed combinations showed activity against protozoa in the lowest tested concentration—0.001%. Most of the mixtures were very effective against *Euglena gracilis*. This protozoa was the most vulnerable form of all tested organisms. The concentration 0.001% was equal LD₅₀ for 4 combinations, tea tree essential oil, mixture of acids and copper (TMCu); tea tree essential oil, mixture of acids and manganese (TMMn); cedar essential oil, mixture of acids and copper (CMCu); lavender essential oil, mixture of acids and manganese (LMMn). The highest concentration for the essential oil, mixture of acids and metal ions was obtained for the tea tree essential oil, mixture of acids and manganese (TMMn)—0.009%. Nevertheless, all the combinations with manganese ions showed the best results for all protozoans. However, it should be noted that the worst result for the combination of essential oil, mixture of acids and metal, is more than 10 times better than for the reference substance, which in this case is metronidazole. The values obtained for the remaining combinations were characterized by significantly lower effective doses than the reference substances, chloramphenicol or metronidazole. The mixtures with highest potential and lowest LD₅₀ and LD₁₀₀ values can be found in Table 10. Comparison between the most effective compositions, analysis of variance (ANOVA) using Tukey's test, are presented in the Supplementary Materials.

Table 10. The most efficient combination against tested protozoan.

Protozoa	LD ₅₀	LD ₁₀₀ :
<i>Euglena gracilis</i>	TMCu, TMMn, CMCu, LMMn	TMMn, CMCu
<i>Gregarina blattarum</i>	CMMn, LMMn	CMCu, LMCu
<i>Amoeba proteus</i>	TMZn	TMZn
<i>Paramecium caudatum</i>	TMMn	TMMn
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	TMZn, CMMn, CMZn	CMMn

2.2. GC-MS Analysis of the Compositions

The chromatograms (presented in Supplementary Materials Figures S1–S4) show the chemical composition of the four essential oils used. Presented in Tables S1–S4 proves the typical mixtures for these essential oils' composition. Predominated compounds for lavender EOs are linalyl acetate, linalool, 1-terpinen-4-ol and eucalyptol. In case of eucalyptus oil, 80.7% of the sum of the investigated compounds is an 1,8-cineol (eucalyptol) together with p-cymene 9.8%. Tea tree oil was rich in terpineols (mainly 1-terpinen-4-ol ~40%) with corresponding terpinenes (respectively γ -15.4% and α -9%). Finally, cedar oil was himachalene chemotype (β -isomer, 27.3% and α , with 9.1% content) together with sesquiterpenoid atlantone (isomer Z, 12.3% and trans- α 9.6%).

Detailed composition of investigated EOs are presented in Tables S1–S4.

3. Discussion

The results of the in vitro studies presented below confirm the antiprotozoal properties of blends which contained in their composition essential oils (eucalyptus, cedar, lavender or tea tree) with organic acids (acetic, propionic, lactic) and metal ions (Cu, Zn, Mn).

The combination containing essential oils, organic acids and metal ions was a concept that occurred after several years of research on natural alternatives for antibiotics. Moreover, and what is very important, all of the used components are allowed to be used in food and feed. The idea corresponds strongly with the scientific results obtained by other researchers. Components used in this study were chosen by their antiprotozoal activity and different polarity [20,40–42].

To the best of our knowledge, presented in this paper, combinations of EOs, acids and metal ions were tested for the first time. The object of investigations that have been conducted, are usually combinations of two or more essential oils [43], metals [38,42], antibiotics [44,45], organic acids [46], active compounds occurring in essential oil [22], essential oils with other compounds of natural origin [47] or other compounds of plant origin e.g., alkaloids [48–50], triterpene saponins [51] or chalcones and flavonoids [41]. The proposed combination is characterized by innovation and, most importantly, high efficiency.

Eucalyptus oil is very well known and used worldwide. Its properties have been widely described in the literature, with particular emphasis on antibacterial and anti-inflammatory properties [52,53]. However, very little information can be found on its antiprotozoal activity. These properties were proved in the following study. Eucalyptus oil showed the same properties as the other tested combinations. It does not change the fact that its effectiveness in combination with acids and metal ions was very high at low concentrations.

Another essential oil analyzed was tea tree essential oil. For years, it has not only been the subject of research, but also an ingredient in many antifungal products [54,55]. It is also undoubtedly effective against *Trichomonas vaginalis* [56]. A human trial showed that a dose of 0.4% tea tree essential oil was as effective as metronidazole treatment [22]. Similar results were obtained in the following work. However, another study showed a 100% antiprotozoal efficacy of tea tree oil at 455 $\mu\text{L/L}$ [57]. Similar results were obtained in the following work. Baldissera et al. showed a much higher effective concentration, 1–2%, in their study [58]. Other tests also showed its high antiprotozoal efficacy, but also high selectivity of the main component of tea tree oil—terpinen-4-ol [59]. The composition containing tea tree oil, together with a mixture of organic acids and metal ions, had the best antiprotozoal properties among the combinations tested. It exhibited a mostly lethal effect, against 50% of the population, at concentrations in the range of 0.001–0.004%.

Cedar essential oil shows very strong antibacterial, antiviral, insecticidal and antiprotozoal properties [60–63]. Studies have shown that in its pure form, it has efficacy levels of $\text{LD}_{50} = 0.04\text{--}1\%$ and $\text{LD}_{100} = 0.06\text{--}0.25\%$ against analyzed protozoa. Obtained concentrations were very low. Unlike the *C. deodara* species, *Cedrus libani* did not show antiprotozoal properties against *Leishmania major* [64]. Nisha et al. showed similar activity and effective concentration against the adult form of *Setaria digitata* [65]. In their study, Kar et al. showed a significant enhancement of the effect of cedrol, one of the major components of cedar essential oil, as a cedrol-loaded nano-structured lipid carrier [66]. In our studies, the combination of cedar oil with a mixture of acids and metal ions showed very good antiprotozoal properties in the range of 0.001–0.008% against the analyzed protozoa. Compared to the values obtained for cedar essential oil, it is 40 times and more than 30 times more potent, LD_{50} and LD_{100} , respectively.

Many studies present the high activity effects of lavender oil against microorganisms [67]. However, there are few reports in the literature on its antiprotozoal activity. The results presented in this paper allow us to conclude that lavender oil, especially in the proposed combinations, show very good antiprotozoal properties. The values for pure lavender oil were promising, while the combinations performed only confirmed this. All analyzed variants of lavender essential oil, mixture of acids and Cu, Mn, Zn ions (LMCu, LMMn and LMZn) showed strong protozoicidal activity at the level of 0.001–0.008%.

This article shows the very good antiprotozoal properties of the innovative combinations. The results obtained in this research are often even a hundred times stronger than those of standard antibiotics.

It is necessary to conduct further tests with using the analyzed mixtures. The obligatory element is undoubtedly the analysis of the toxicity of the combination and its direct influence on organs, as well as accumulation in tissues. However, the mixtures obtained have a very high potential and can be used not only in medicine and pharmacy, but also in the prophylaxis of diseases caused by protozoa, both in humans and animals.

4. Materials and Methods

4.1. Maintenance of Parasite Cultures and Evaluation of Antiprotozoal Activity

Five organisms representing the taxonomic groups to which the pathogenic protozoa belong were selected for in vitro studies of the antiprotozoal activity of the mixtures:

1. *Amoeba proteus*—*Chaos diffluens*—a protozoan of the order *Euamoebida*, belonging to the phylum *Amoebozoa*, living in water.
2. *Paramecium caudatum*—a paramecium representing aquatic ciliates.
3. *Gregarina blattarum*—gregarines were isolated from cockroaches, representing the type *Apicomplexa*, living in the digestive tracts or body cavities of invertebrates.
4. *Euglena gracilis*—a protozoan living in water, representing the flagellates—*Mastigophora*, family *Euglenaceae*.
5. *Pentatrichomonas hominis*—a protozoan that lives in the human colon, representing the *Trichomonadidae*.

The *Amoeba*, *Paramecium* and *Euglena* studied in this work were isolated from the freshwater river in Krosno (river Bado, 49°39'59.8' N 21°46'28.1' E, Krosno, Subcarpathian Voivodeship, Poland).

Amoeba proteus was cultivated in the Prescott medium and was fed with ciliates, for example, *Tetrahymena* and *Chilomonas* [68,69]. *Paramecium* was cultivated in hay infusion [70–72]. *Euglena* was cultivated in solution according to Wu [73]. *Pentatrichomonas hominis* was isolated from stool samples and kept in Pahm solution according to Chomicz et al. [74]

The gregarines were isolated from cockroaches and treated with the mixtures at different concentrations after being placed on a watch glass in Ringer's solution. Each sample included ten individuals. The isolation of gregarine from cockroaches was carried out according to the method of isolation of gregarines from beetles proposed by J. Moraczewski [75].

Amoeba, *Paramecium* and *Euglena* were observed microscopically on a watch glass with viscose wool fibers (to facilitate observation) in a drop of culture water, from which they originated. Different concentrations of the combinations were introduced into the test samples, establishing an LD₅₀ dose (50% mortality) and an LD₁₀₀ dose (100% mortality). For determining LD₅₀, the Reed–Muench method was used. In all cases, four-fold replicates of the test were used along with a blank test. The lethal concentration of the substance LD₅₀ and LD₁₀₀ within 3 and 5 min was determined.

Identification of individual protozoa was made on the basis of their descriptions and drawings after W. A. Dogiel [76] and J. Hempel-Zawitkowska [35,77].

The obtained mixtures of phytoncides with metals and single phytoncides were dissolved in an aqueous solution of polysorbate 80 (0.05%) before being applied to a watch glass. No biocidal effect of polysorbate 80 was observed at the above concentrations. Chloramphenicol and metronidazole were used as standard substances to control protozoa. Concentration of the antibiotics were 5 mg/mL and the dilutions were prepared from the stock to reach LD₅₀ and LD₁₀₀.

4.2. Essential Oils

Essential oils were ordered from two companies. Eucalyptus and tea tree were purchased from Food Base Kft. (Gödöllő, Hungary), cedar essential oil from Synthite Industries Pvt., Ltd. (Kolenchery, Kerala, India) and lavender essential oil from De Monchy Aromatics Ltd. (Poole, Dorset, UK)

4.3. Chemicals and Reagents

Organic acids (acetic acid 99%, propionic acid 99.5% and lactic acid 85%) and other chemical reagents purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) comply with FCC and FG standards. The purity and percentage composition, according to the supplier's specification, was minimum $\geq 95\%$.

4.4. Phytoncides Mixture Preparation

Essential oils (100 mL) were added in the same amount to organic acids (100 mL) or mixture of acids (ratio 1:1:1) and 5 g of copper (II) carbonate hydroxide (2.87 g of ions Cu^{2+}) or 5 g zinc carbonate (2.61 g of ions Zn^{2+}) or 5 g manganese (II) chloride (2.18 g of ions Mn^{2+}). The entire mixture was heated until the color changed. The mixture was then allowed to cool to obtain a clear solution (one, two or three phases). After this time, the mixture was filtered through a paper filter. The combination was diluted: 1.5% to 0.001%; after that, the protozoa were placed in each dilution.

4.5. GC-MS Analysis

The profile of the essential oils investigated was assessed using the GC-MS technique according to the protocol [78]. Identification of all volatile constituents was based on comparison of experimentally obtained compound's mass spectra with mass spectra available in the NIST20 database. Additionally, the retention indices (RI) obtained experimentally, calculated using macro [79], were compared with the RI available in the NIST20 database and the data from the literature [80]. Shimadzu software GCMS Postrun Analysis (Shimadzu Company, Kyoto, Japan) and ACD/Spectrum Processor (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada) were used to process the data. The quantification of identified constituents was performed by calculation based on the amount of added internal standard and expressed as a percentage of integrated peaks' area. Analysis was performed using the Shimadzu 2020 apparatus (Varian, Walnut Creek, CA, USA) equipped with a Zebron ZB-5 MSI (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The temperature of the GC oven was programmed from 50 °C to 250 °C at a rate of 3.0 °C and kept for 3 min. Scanning was performed from 35 to 550 m/z in electronic impact (EI) at 70 eV and ion source temperature 250 °C. Samples were injected at split ratio 1:10 and gas helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min.

4.6. Statistical Analysis

The data, from LD₅₀ and LD₁₀₀ evaluation, were subjected to the analysis of variance (ANOVA) using Tukey's test ($p < 0.05$) using the STATISTICA 13.3 software for Windows (StatSoft, Krakow, Poland).

5. Conclusions

In the presented work, a hitherto unused combination of three types of compounds: essential oils, organic acids and metal ions, was used. It has been proved that the proposed combinations show very strong antiprotozoal activity. Studies conducted so far allow to conclude the synergistic effect of these combinations and obtain protozoicidal results much better than standard antibiotics—chloramphenicol or metronidazole. Very high effectiveness against all of the analyzed protozoans was found in the combinations of tea tree, cedar and lavender essential oils, mixture of acids and all of the ions. The LD₅₀ and LD₁₀₀ values were in the range 0.001–0.009%. The highest antiprotozoal properties were obtained in the combination with cedar and tea tree essential oils, mixture of acids and manganese or zinc ions. The proposed combinations may find application in eradication of protozoan diseases both in humans and animals. However, further steps should be taken to analyze the antiprotozoal effect on model protozoa such as *Cryptosporidium spp.*, *Leishmania spp.* and *Trypanosoma spp.* as well as toxicological studies of the effective concentrations.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11070913/s1>, Figure S1: GC-MS chromatogram of tea tree essential oil, Figure S2: GC-MS chromatogram of cedar essential oil, Figure S3: GC-MS chromatogram of eucalyptus essential oil, Figure S4: GC-MS chromatogram of lavender oil, Table S1: Composition of tea tree essential oil, Table S2: Composition of cedar essential oil, Table S3: Composition of eucalyptus essential oil, Table S4: Composition of lavender essential oil.

Author Contributions: Conceptualization, H.I., H.R. and A.S.; methodology, H.I., H.R. and A.S.; investigation, H.I., H.R., A.S. and J.L.; data curation, H.I., H.R. and A.S.; validation H.I., H.R. and A.S.; writing—original draft preparation, H.I., H.R. and A.S.; writing—review and editing, H.I., J.L. and A.S.; visualization, H.I. and A.S.; supervision, H.R. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study is supported by Ministry of Education and Science (Implementation Doctorates Project 2nd edition—Doktorat Wdrożeniowy).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Kalt, M.-M.; Schuehly, W.; Saf, R.; Ochensberger, S.; Solnier, J.; Bucar, F.; Kaiser, M.; Presser, A. Palladium-catalysed synthesis of aryl naphthoquinones as antiprotozoal and antimycobacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *207*, 112837. [CrossRef]
2. Korpe, P.S.; Ravdin, J.I.; Petri, W.A. 271—Introduction to Protozoal Diseases. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th ed.; Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J., Eds.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2020; pp. 3270–3272. [CrossRef]
3. Mitra, A.K.; Mawson, A.R. Neglected Tropical Diseases: Epidemiology and Global Burden. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2017**, *2*, 36. [CrossRef] [PubMed]
4. Benítez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Arrambide, G.; Navarro, M.; Costa Pessoa, J.; Garat, B.; Gambino, D. Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 609–616. [CrossRef] [PubMed]
5. Fairhurst, R.; Wellems, T. Plasmodium species (Malaria). *Princ. Pract. Infect. Dis.* **2014**, *2*, 3437–3462. [CrossRef]
6. Andrews, K.T.; Fisher, G.; Skinner-Adams, T.S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2014**, *4*, 95–111. [CrossRef]
7. CDC. How Can Malaria Cases and Deaths Be Reduced? Available online: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/index.html (accessed on 3 May 2022).
8. WHO. *Guideline WHO Guidelines for Malaria, 16 February 2021*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021.
9. WHO. *WHO Interim Guidelines for the Treatment of Gambiense Human African Trypanosomiasis*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019.
10. PAHO. *Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas Disease*; Pan American Health Organization: Washington, DC, USA, 2019.
11. Lindner, A.K.; Lejon, V.; Chappuis, F.; Seixas, J.; Kazumba, L.; Barrett, M.P.; Mwamba, E.; Erphas, O.; Akl, E.A.; Villanueva, G.; et al. New WHO guidelines for treatment of gambiense human African trypanosomiasis including fexinidazole: Substantial changes for clinical practice. *Lancet. Infect. Dis.* **2020**, *20*, e38–e46. [CrossRef]
12. Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M.I.; Khurshid, M.; Muzammil, S.; Rasool, M.H.; Nisar, M.A.; Alvi, R.F.; Aslam, M.A.; Qamar, M.U.; et al. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist* **2018**, *11*, 1645–1658. [CrossRef]
13. Rolta, R.; Sharma, A.; Sourirajan, A.; Mallikarjunan, P.K.; Dev, K. Combination between antibacterial and antifungal antibiotics with phytochemicals of *Artemisia annua* L: A strategy to control drug resistance pathogens. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *266*, 113420. [CrossRef]
14. Abou Baker, D.H.; Al-Moghazy, M.; ElSayed, A.A.A. The in vitro cytotoxicity, antioxidant and antibacterial potential of *Satureja hortensis* L. essential oil cultivated in Egypt. *Bioorganic Chem.* **2020**, *95*, 103559. [CrossRef]
15. Gavanji, S.; Zaker, S.R.; Nejad, Z.G.; Bakhtari, A.; Bidabadi, E.S.; Larki, B. Comparative efficacy of herbal essences with amphotericin B and ketoconazole on *Candida albicans* in the in vitro condition. *Integr. Med. Res.* **2015**, *4*, 112–118. [CrossRef]
16. Derda, M.; Hadaś, E. The use of phytotherapy in diseases caused by parasitic protozoa. *Acta Parasitol.* **2014**, *60*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
17. Van Zyl, R.L.; Seathlo, S.T.; Viljoen, A.M. Pharmacological interactions of essential oil constituents on the in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *S. Afr. J. Bot.* **2010**, *76*, 662–667. [CrossRef]
18. Santoro, G.F.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.L.; Mendonça, L.Z.; Soares, M.J. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **2007**, *116*, 283–290. [CrossRef] [PubMed]
19. Rodrigues Goulart, H.; Kimura Emília, A.; Peres Valnice, J.; Couto Alicia, S.; Aquino Duarte Fulgencio, A.; Katzin Alejandro, M. Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2502–2509. [CrossRef]

20. Monzote, L.; Alarcón, O.; Setzer, W. Antiprotozoal Activity of Essential Oils. *Agric. Conspec. Sci.* **2012**, *77*, 167–175.
21. Carson, C.F.; Hammer, K.A. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*; Thormar, H., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 203–238. [[CrossRef](#)]
22. Lam, N.S.; Long, X.; Su, X.-Z.; Lu, F. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its monoterpene constituents in treating protozoan and helminthic infections. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *130*, 110624. [[CrossRef](#)]
23. Moon, T.; Wilkinson, J.; Cavanagh, H. Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol. Res.* **2006**, *99*, 722–728. [[CrossRef](#)]
24. Behnia, M.; Haghighi, A.; Komeylizadeh, H.; Tabaei, S.J.; Abadi, A. Inhibitory effects of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. *Korean J. Parasitol.* **2008**, *46*, 153–156. [[CrossRef](#)]
25. Saeidnia, S.; Gohari, A.; Hadjiakhoondi, A. Trypanocidal oil of the young leaves of *Nepeta cataria* L., obtained by solvent extraction. *J. Med. Plants* **2008**, *7*, 54–57.
26. De Melo, A.R.B.; Maciel Higino, T.M.; da Rocha Oliveira, A.D.P.; Fontes, A.; da Silva, D.C.N.; de Castro, M.C.A.B.; Dantas Lopes, J.A.; de Figueiredo, R.C.B.Q. *Lippia sidoides* and *Lippia organoides* essential oils affect the viability, motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Micron* **2020**, *129*, 102781. [[CrossRef](#)]
27. Ferreira, L.C.; Cruz, M.G.d.; Lima, T.B.C.; Serra, B.N.V.; Chaves, F.C.M.; Chagas, E.C.; Ventura, A.S.; Jerônimo, G.T. Antiparasitic activity of *Mentha piperita* (Lamiaceae) essential oil against *Piscinoodinium pillulare* and its physiological effects on *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* **2019**, *512*, 734343. [[CrossRef](#)]
28. Anacarso, I.; Sabia, C.; de Niederhäusern, S.; Iseppi, R.; Condò, C.; Bondi, M.; Messi, P. In vitro evaluation of the amoebicidal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and cloves (*Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry) essential oils against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 606–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. van Zyl, R.L.; Seatlholo, S.T.; van Vuuren, S.F.; Viljoen, A.M. The Biological Activities of 20 Nature Identical Essential Oil Constituents. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, *18*, 129–133. [[CrossRef](#)]
30. Hauser, C.; Thielmann, J.; Muranyi, P. Chapter 46—Organic Acids: Usage and Potential in Antimicrobial Packaging. In *Antimicrobial Food Packaging*; Barros-Velázquez, J., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2016; pp. 563–580. [[CrossRef](#)]
31. Meira-Filho, M.R.C.; Ramirez, J.R.B.; Vianna, R.T.; Júnior, J.P. Efficacy of glacial acetic acid in the control of *Trichodina* sp. and *Apiosoma* sp. associated with *Mugil liza*. *Aquaculture* **2017**, *479*, 7–12. [[CrossRef](#)]
32. Surve, A.N.; Sherikar, A.T.; Bhilegaonkar, K.N.; Karkare, U.D. Preservative effect of combinations of acetic acid with lactic or propionic acid on buffalo meat stored at refrigeration temperature. *Meat Sci.* **1991**, *29*, 309–322. [[CrossRef](#)]
33. Aljumaah, M.R.; Alkhulaifi, M.M.; Abudabos, A.M.; Alabdullatifb, A.; El-Mubarak, A.H.; Al Suliman, A.R.; Stanley, D. Organic acid blend supplementation increases butyrate and acetate production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium challenged broilers. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232831. [[CrossRef](#)]
34. Marcelino, P.R.F.; Moreira, M.B.; Lacerda, T.M.; da Silva, S.S. Metal-Based Drugs for Treatment of Malaria. *Biomed. Appl. Met.* **2017**, 167–193. [[CrossRef](#)]
35. Navarro, M.; Gabbiani, P.; Messori, L.; Gambino, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and perspectives. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 1070–1078. [[CrossRef](#)]
36. Wani, W.A.; Jameel, E.; Baig, U.; Mumtazuddin, S.; Hun, L.T. Ferroquine and its derivatives: New generation of antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 534–551. [[CrossRef](#)]
37. Low, W.-L.; Kenward, K.; Britland, S.T.; Amin, M.C.; Martin, C. Essential oils and metal ions as alternative antimicrobial agents: A focus on tea tree oil and silver. *Int. Wound J.* **2017**, *14*, 369–384. [[CrossRef](#)]
38. Low, W.L.; Martin, C.; Hill, D.J.; Kenward, M.A. Antimicrobial efficacy of silver ions in combination with tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *37*, 162–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kiss, T.; Osipenko, O. Metal ion-induced permeability changes in cell membranes: A minireview. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1994**, *14*, 781–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ed-Dra, A.; Filali, F.R.; Lo Presti, V.; Zekkori, B.; Nalbone, L.; Bouymajane, A.; Trabelsi, N.; Lamberta, F.; Bentayeb, A.; Giuffrida, A.; et al. Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial action of five Moroccan essential oils against *Listeria monocytogenes* and different serotypes of *Salmonella enterica*. *Microb. Pathog.* **2020**, *149*, 104510. [[CrossRef](#)]
41. Sen, R.; Chatterjee, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 1056–1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ahmad, A.; Viljoen, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon essential* oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 657–665. [[CrossRef](#)]
43. Zenner, L.; Callait, M.P.; Granier, C.; Chauve, C. In vitro effect of essential oils from *Cinnamomum aromaticum*, *Citrus limon* and *Allium sativum* on two intestinal flagellates of poultry, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. *Parasite* **2003**, *10*, 153–157. [[CrossRef](#)]
44. Jugreet, B.S.; Mahomoodally, M.F. Reprint of: Essential oils from 9 exotic and endemic medicinal plants from Mauritius shows in vitro antibacterial and antibiotic potentiating activities. *S. Afr. J. Bot.* **2021**, *140*, 478–485. [[CrossRef](#)]
45. Mazoir, N.; Dakir, M.; Tebbaa, M.; Loughzail, M.; Benharref, A. Aromatization of (Z) and (E)- α -atlantones isolated from *Cedrus atlantica* essential oil followed by condensation with thiosemicarbazide: Synthesis of new thiadiazolines derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 278–280. [[CrossRef](#)]

46. Zhang, S.; Shen, Y.R.; Wu, S.; Xiao, Y.Q.; He, Q.; Shi, S.R. The dietary combination of essential oils and organic acids reduces *Salmonella enteritidis* in challenged chicks. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 6349–6355. [[CrossRef](#)]
47. Katopodi, A.; Detsi, A. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2021**, *630*, 127529. [[CrossRef](#)]
48. Sahu, A.; Agrawal, R.K.; Pandey, R. Synthesis and systemic toxicity assessment of quinine-triazole scaffold with antiprotozoal potency. *Bioorganic Chem.* **2019**, *88*, 102939. [[CrossRef](#)]
49. Nair, J.J.; van Staden, J. Antiprotozoal alkaloid principles of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 126642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Cimanga Kanyanga, R.; Kikweta Munduku, C.; Nsaka Lumpu, S.; Tshodi Ehata, M.; Makila Bool-Miting, F.; Kambu Kabangu, O.; Mbamu Maya, B.; Cos, P.; Maes, L.; Vlietinck, A.J.; et al. Isolation and structure elucidation of two antiprotozoal bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Triclisia gillettii* stem bark. *Phytochem. Lett.* **2018**, *28*, 19–23. [[CrossRef](#)]
51. Mostafa, A.E.; El-Hela, A.A.; Mohammad, A.-E.I.; Cutler, S.J.; Ross, S.A. New triterpenoidal saponins from *Koeleruteria paniculata*. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 213–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Bello, M.; Jiddah-kazeem, B.; Fatoki, T.H.; Ibukun, E.O.; Akinmoladun, A.C. Antioxidant property of *Eucalyptus globulus* Labill. Extracts and inhibitory activities on carbohydrate metabolizing enzymes related to type-2 diabetes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2021**, *36*, 102111. [[CrossRef](#)]
53. Aleksic Sabo, V.; Knezevic, P. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, *132*, 413–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhang, J.; Wu, H.; Jiang, D.; Yang, Y.; Tang, W.; Xu, K. The antifungal activity of essential oil from *Melaleuca leucadendra* (L.) L. grown in China and its synergistic effects with conventional antibiotics against *Candida*. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 2545–2548. [[CrossRef](#)]
55. Murray, M.T. 91—*Melaleuca alternifolia* (Tea Tree). In *Textbook of Natural Medicine*, 5th ed.; Pizzorno, J.E., Murray, M.T., Eds.; Churchill Livingstone: St. Louis, MO, USA, 2020; pp. 693–696. [[CrossRef](#)]
56. Carson, C.F.; Hammer, K.A.; Riley, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 50–62. [[CrossRef](#)]
57. Valladão, G.M.R.; Gallani, S.U.; Ikefuti, C.V.; da Cruz, C.; Levy-Pereira, N.; Rodrigues, M.V.N.; Pilarski, F. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): Special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *J. Fish Dis.* **2016**, *39*, 1143–1152. [[CrossRef](#)]
58. Baldissera, M.D.; Da Silva, A.S.; Oliveira, C.B.; Santos, R.C.V.; Vaucher, R.A.; Raffin, R.P.; Gomes, P.; Dambros, M.G.C.; Miletti, L.C.; Boligon, A.A.; et al. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* in vitro and in vivo used mice as experimental model. *Exp. Parasitol.* **2014**, *141*, 21–27. [[CrossRef](#)]
59. Mikus, J.; Harkenthal, M.; Steverding, D.; Reichling, J. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 366–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Ainane, A.; Khammour, F.; Charaf, S.; Elabboubi, M.; Elkouali, M.; Talbi, M.; Benhima, R.; Cherroud, S.; Ainane, T. Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: *Cedrus atlantica*, *Citrus limonum*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globules*. *Mater. Today Proc.* **2019**, *13*, 474–485. [[CrossRef](#)]
61. Chaudhary, A.K.; Ahmad, S.; Mazumder, A. *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud.: A Review on its Ethnobotany, Phytochemical and Pharmacological Profile. *Pharmacogn. J.* **2011**, *3*, 12–17. [[CrossRef](#)]
62. Saab, A.M.; Gambari, R.; Sacchetti, G.; Guerrini, A.; Lampronti, I.; Tacchini, M.; El Samrani, A.; Medawar, S.; Makhlof, H.; Tannoury, M.; et al. Phytochemical and pharmacological properties of essential oils from *Cedrus* species. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 1415–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Bisht, A.; Jain, S.; Misra, A.; Dwivedi, J.; Paliwal, S.; Sharma, S. *Cedrus deodara* (Roxb. ex D.Don) G.Don: A review of traditional use, phytochemical composition and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *279*, 114361. [[CrossRef](#)]
64. Motazedian, M.H.; Mikaeili, F.; Mohebbi, M.; Miri, R.; Habibi, P.; Kamarloie, S. The antileishmanial effects of *Lawsonia inermis* and *Cedrus libani* on *Leishmania major* promastigotes: An in vitro study. *J. Parasit. Dis.* **2017**, *41*, 375–379. [[CrossRef](#)]
65. Nisha, M.; Kalyanasundaram, M.; Paily, K.P.; Abidha; Vanamail, P.; Balaraman, K. In vitro screening of medicinal plant extracts for macrofilaricidal activity. *Parasitol. Res.* **2007**, *100*, 575–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kar, N.; Chakraborty, S.; De, A.K.; Ghosh, S.; Bera, T. Development and evaluation of a cedrol-loaded nanostructured lipid carrier system for in vitro and in vivo susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania donovani* amastigotes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *104*, 196–211. [[CrossRef](#)]
67. Kazemi, M.; Mohammadifar, M.; Aghadavoud, E.; Vakili, Z.; Aarabi, M.H.; Talaei, S.A. Deep skin wound healing potential of lavender essential oil and licorice extract in a nanoemulsion form: Biochemical, histopathological and gene expression evidences. *J. Tissue Viability* **2020**, *29*, 116–124. [[CrossRef](#)]
68. Yudin, A.L. Amoeba and Other Protozoa. In *Animal Species for Developmental Studies: Volume 1 Invertebrates*; Dettlaff, T.A., Vassetzky, S.G., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1990; pp. 1–11. [[CrossRef](#)]
69. Demin, S.Y.; Berdieva, M.A.; Podlipaeva, Y.I.; Goodkov, A.V. Karyotypic instability of endoprophase and mitotic cells of *Amoeba* sp. strain Cont from the “proteus-type” group (*Amoebozoa*, *Euamoebida*, *Amoebida*). *Eur. J. Protistol.* **2020**, *74*, 125691. [[CrossRef](#)]

70. Pawlaczyk-Szpilowa, M. *Ćwiczenia z Mikrobiologii Wody i Ścieków*; PWN: Warszawa, Poland, 1980.
71. Sonneborn, T.M. Chapter 12 Methods in Paramecium Research. In *Methods in Cell Biology*; Prescott, D.M., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1970; Volume 4, pp. 241–339.
72. Feng, J.; Zhu, H.; Lukeš, J.; Korabečná, M.; Fohlerová, Z.; Mei, T.; Chang, H.; Neužil, P. Nanowatt simple microcalorimetry for dynamically monitoring the defense mechanism of *Paramecium caudatum*. *Sens. Actuators A Phys.* **2021**, *323*, 112643. [[CrossRef](#)]
73. Wu, M.; Qin, H.; Deng, J.; Liu, Y.; Lei, A.; Zhu, H.; Hu, Z.; Wang, J. A new pilot-scale fermentation mode enhances *Euglena gracilis* biomass and paramylon (β -1,3-glucan) production. *J. Clean. Prod.* **2021**, *321*, 128996. [[CrossRef](#)]
74. Chomicz, L.; Padzik, M.; Laudy, A.; Kozłowska, M.; Pietruczuk, A.; Piekarczyk, J.; Godineau, N.; Ołędzka, G.; Kazimierczuk, Z. Anti-Pentatrichomonas hominis activity of newly synthesized benzimidazole derivatives—In vitro studies. *Acta Parasitol.* **2009**, *54*, 165–171. [[CrossRef](#)]
75. Moraczewski, J. *Ćwiczenia z zoologii bezkręgowców. Wydanie I*; PWN: Warszawa, Poland, 1974; pp. 285–292.
76. Dogiel, W.A. *Zoologia Bezkręgowców. Wydanie III*; Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne: Warszawa, Poland, 1972.
77. Hempel-Zawitkowska, J. *Zoologia dla uczelni rolniczych*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, Poland, 2006.
78. Łyczko, J.; Pawlak, A.; Augustyński, I.; Okińczyc, P.; Szperlik, J.; Kulma, A.; Różański, H.; Obmińska-Mrukowicz, B.; Szumny, A. Chemical profiling and cytotoxic activity of 150-year old original sample of Jerusalem Balsam. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *138*, 111183. [[CrossRef](#)]
79. Lucero, M.; Estell, R.; Tellez, M.; Fredrickson, E. A retention index calculator simplifies identification of plant volatile organic compounds. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 378–384. [[CrossRef](#)]
80. Adams, R.P. *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2012.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Novel formula of antiprotozoal mixtures

Hubert Iwiński ^{1,3*}, Jacek Łyczko¹, Henryk Rózański ^{2,3} and Antoni Szumny ¹

Table of content

Figure S1. GC-MS chromatogram of tea tree essential oil	1
Table S1. Composition of tea tree essential oil	1
Figure S2. GC-MS chromatogram of cedar essential oil	3
Table S2 Composition of Cedar essential oil	3
Figure S3. GC-MS chromatogram of eucalyptus essential oil.....	4
Table S3 Composition of eucalyptus essential oil.....	4
Figure S4. GC-MS chromatogram of lavender oil	5
Table S4. Composition of lavender essential oil	5

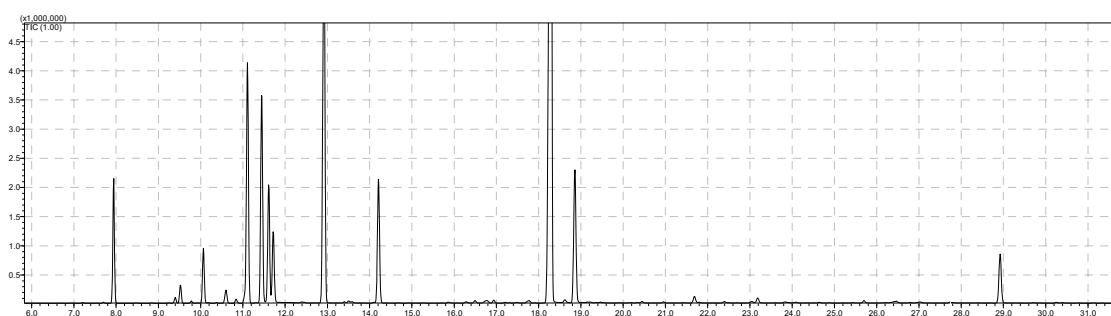


Figure S1. GC-MS chromatogram of tea tree essential oil

Table S1. Composition of tea tree essential oil

No.	Peak Name	tR (min)	KI exp.	KI Adams	KI NIST	CAS	Area (%)
1	Hexadienol	7.208	915		916	17102-64-6	0.032
2	α -Thujene	7.700	931		929	2867-05-2	0.03
3	α -Pinene	7.950	938	939	938	80-56-8	3.835
4	Sabinene	9.400	977		974	3387-41-5	0.189
5	β -Pinene	9.533	980	979	979	127-91-3	0.606
6	p-Menth-2-ene	9.775	986		984	5256-65-5	0.084
7	β -Myrcene	10.058	992		991	123-35-3	1.77
8	Carene < δ -2->	10.383	999		1001	554-61-0	0.035
9	α -Phellandrene	10.600	1005		1005	99-83-2	0.518
10	3-Carene	10.842	1012		1010	498-15-7	0.159
11	α -Terpinene	11.108	1019		1017	99-86-5	8.994
12	p-Cymene	11.442	1028		1024	99-87-6	7.624
13	Limonene	11.608	1032		1031	5989-27-5	3.966
14	Eucalyptol	11.725	1035		1032	470-82-6	2.263

15	Ocimene	12.392	1051		1050	3779-61-1	0.062
16	γ -Terpinene	12.917	1063		1060	99-85-4	15.384
17	p-Mentha-3,8-diene	13.400	1073		1075	586-67-4	0.033
18	cis-Linalool oxide	13.508	1075		1069	5989 - 33 - 3	0.053
19	Cresol <para->	13.583	1077		1073	106 - 44 - 5	0.02
20	p-Mentha-2,4(8)-diene	14.100	1088		1085	586-63-0	0.013
21	Terpinolene	14.208	1090		1086	586 - 62 - 9	4.827
22	Dihydrocitronellal	15.858	1128		1125	5988 - 91 - 0	0.053
23	Terpin-3-en-1-ol	16.283	1138		1136	586 - 82 - 3	0.067
24	cis-b-Terpineol	16.492	1142		1140	7299-41-4	0.112
25	Camphor	16.775	1149		1144	464-49-3	0.186
26	Isopulegol	16.942	1152		1150	7786-67-6	0.121
27	unknown	17.208	1158				0.036
28	Isoborneol	17.500	1164		1165	10385 - 78 - 1	0.046
29	Thujol	17.775	1170		1169	21653 - 20 - 3	0.157
30	1-Terpinen-4-ol	18.250	1180		1177	562-74-3	39.239
31	Cymen-8-ol	18.625	1188		1189	1197 - 01 - 9	0.134
32	γ -Terpineol	18.858	1192		1197	586-81-2	5.576
33	trans-Dihydro carvone	19.167	1198	1201	1200	147-86-02	0.054
34	unknown	19.467	1205				0.038
35	neoiso-Dihydro carveol	20.450	1229		1230	18675 - 34 - 8	0.089
36	Isobornyl formate	20.958	1240		1240	1200 - 67 - 5	0.054
37	Cinnamyl alcohol<Z->	21.683	1257		1261	4510 - 34 - 3	0.253
38	Carvone oxide<cis->	21.800	1259		1262	18383 - 49 - 8	0.014
39	Isopulegyl acetate	22.400	1272		1273	89 - 49 - 6	0.094
40	neo-Isopulegyl acetate	23.042	1286		1278	109010 - 10 - 8	0.061
41	Isobornyl acetate	23.183	1289		1287	125 - 12 - 2	0.214
42	Terpinyl acetate <trans-dihydro- α ->	23.833	1302		1300	20777-41-7	0.068
43	a-Terpinyl formate	24.083	1308		1306	2153 - 26 - 6	0.04
44	Dihydrocarvyl acetate	24.642	1322		1325	20405 - 60 - 1	0.03
45	a-Terpinyl acetate	25.700	1347		1349	80 - 26 - 2	0.13
46	Cyclosativene	26.467	1365		1367	30541 - 92 - 5	0.205
47	Longicyclene	27.033	1377		1372	1137 - 12 - 8	0.076
48	7-Epi-Sesquithujene	27.742	1393		1389	159407 - 35 - 9	0.081
49	Caryophyllene	28.933	1422		1419	87-44-5	2.235
50	Humulene	30.258	1455		1454	6753-98-6	0.039

tR – retention time; KI exp.– Kovats index experimental, KI Adams– Kovats index according to Adams library, KI NIST – Kovats index according to NIST library

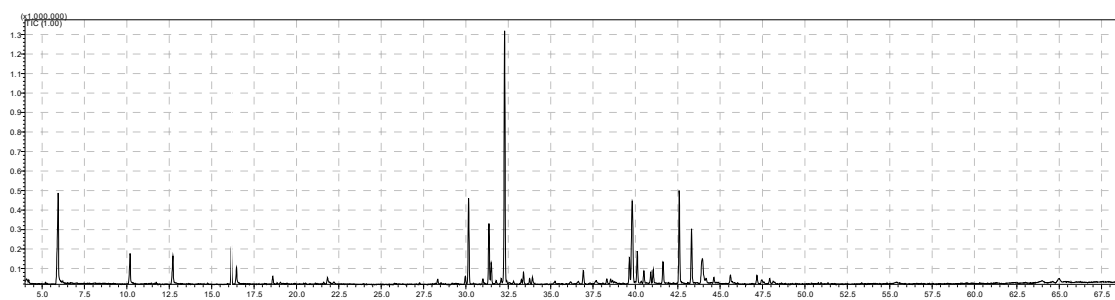


Figure S2. GC-MS chromatogram of cedar essential oil

Table S2 Composition of Cedar essential oil

No.	Peak Name	tR (min)	KI exp.	KI Adams	KI NIST	CAS	Area (%)
1	Limona ketone	16.167	1135	1131	1137	6090-09-1	3.656
2	cia-b-terpineol	16.467	1142	1144	1144	7299-41-4	2.072
3	Melilotal	18.608	1187	1188	1183	122 - 00 - 9	0.887
4	<i>trans</i> -Myrtanol	21.833	1260		1262	15358-91-5	0.687
5	Vestitenone	29.967	1448		1448	69401-36-1	0.859
6	α -Himachalene	30.158	1452		1499	3853-83-6	9.072
7	Thujopsadiene <cis->	31.000	1473		1467	51446 - 91 - 4	0.456
8	Himachalene <gamma-	31.492	1484		1484	53111 - 25 - 4	1.859
9	b-Himachalene	32.283	1502		1500	1461-03-6	27.350
10	Himachalene <alpha-dehydro-ar->	32.808	1517		1517	78204 - 62 - 3	0.354
11	Himachalene <gamma-dehydro-ar->	33.400	1532		1530	51766 - 65 - 5	1.148
12	g-Vetivenene	33.758	1541		1532	28908 - 26 - 1	0.638
13	Bisabolene <(E)-, alpha->	33.925	1546		1541	25532 - 79 - 0	0.936
14	Himachalene epoxide	35.258	1579		1579	64825 - 84 - 9	0.183
15	b-Himachalene oxide	36.925	1623		1619	57819 - 73 - 5	1.733
16	Cedren-13-ol<8->	39.642	1695		1689	18319 - 40 - 9	2.234
17	Atlantone<(Z)-gamma->	39.808	1699		1694	108549 - 48 - 0	12.261
18	Atlantone<(E)-gamma->	40.108	1708		1707	108549 - 47 - 9	3.222
19	Atlantone <(Z)-alpha->	40.500	1720		1716	56192 - 70 - 2	1.363
20	Eremophilone	40.908	1731		1733	562 - 23 - 2	1.126
21	Tumerone	41.050	1735		1734	180315-67-7	1.463
22	Cyclocolorenone	41.625	1752		1757	489 - 45 - 2	2.564
23	Atlantone <trans-, alpha->	42.583	1778		1775	32207 - 08 - 2	9.638
24	Acetoxyelemol<8-alpha->	43.308	1798		1793	256332 - 39 - 5	6.188
25	Longifolol acetate	43.950	1818		1820	205697 - 15 - 0	4.841
26	Khusinol acetate	44.433	1835		1828	78405 - 34 - 2	0.620
27	Flourensadiol	45.608	1867		1670	55812 - 89 - 0	0.796
28	Farnesyl acetone	47.167	1913		1913	1117-52-8	1.135
29	Acetoxyudesman-4-alpha-ol <11->	47.925	1937		1940	67996 - 33 - 2	0.658

tR – retention time; KI exp.– Kovats index experimental, KI Adams– Kovats index according to Adams library, KI NIST – Kovats index according to NIST library

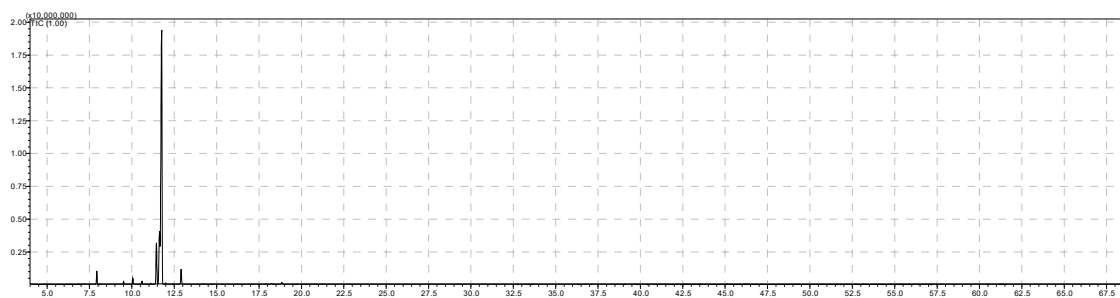


Figure S3. GC-MS chromatogram of eucalyptus essential oil

Table S3 Composition of eucalyptus essential oil

No.	Peak Name	tR (min)	KI exp.	KI Adams	KI NIST	CAS	Area (%)
1	α -Pinene	7.950	938	939	938	80-56-8	2.522
2	b-Pinene	9.533	980	979	979	127-91-3	0.576
3	β -Myrcene	10.058	992		991	123-35-3	1.203
4	α -Phellandrene	10.600	1005		1005	99-83-2	0.715
5	α -Terpinene	11.100	1019		1017	99-86-5	0.184
6	p-Cymene	11.450	1028		1025	99-87-6	9.831
7	Eucalyptol	11.725	1035		1032	470-82-6	80.665
8	trans- β -Ocimene	12.442	1052		1049	3779-61-1	0.091
9	γ -Terpinene	12.908	1062		1060	99-85-4	3.367
10	trans-Linalool oxide (furanoid)	14.225	1090		1086	34995-77-2	0.142
11	1-Terpinen-4-ol	18.250	1180		1177	562-74-3	0.218
12	γ -Terpineol	18.858	1192		1197	586-81-2	0.486

tR – retention time; KI exp.– Kovats index experimental, KI Adams– Kovats index according to Adams library, KI NIST – Kovats index according to NIST library

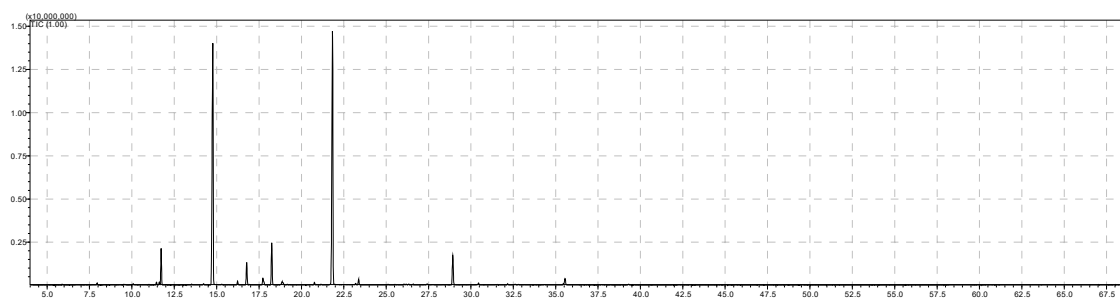


Figure S4. GC-MS chromatogram of lavender oil

Table S4. Composition of lavender essential oil

No.	Peak Name	tR (min)	KI exp.	KI Adams	KI NIST	CAS	Area (%)
1	α -Pinene	7.95	938	939	938	80-56-8	0.196
2	b-Pinene	9.533	980	979	979	127-91-3	0.063
3	p-Cymene	11.45	1028		1025	99-87-6	0.312
4	Limonene	11.617	1032		1030	138-86-3	0.249
5	Eucalyptol	11.725	1035		1032	470-82-6	4.029
6	cis-Linalool oxide	13.525	1076		1074	5989-33-3	0.166
7	trans-Linalool oxide (furanoid)	14.225	1090		1086	34995-77-2	0.156
8	Linalool	14.775	1101		1099	78-70-6	37.262
9	1-Octen-3-yl-acetate	15.292	1114		1111	2442-10-6	0.098
10	1,2-Dihydrolinalool	16.233	1136	1135	1120	18479-51-1	0.498
11	Camphor	16.775	1149		1144	464-49-3	2.955
12	Borneol	17.725	1169		1166	464-45-9	1.271
13	1-Terpinen-4-ol	18.25	1180		1177	562-74-3	5.461
14	γ -Terpineol	18.858	1192		1197	586-81-2	0.531
15	trans-Dihydro carvone	19.167	1198	1201	1200	09.04.5948	0.09
16	Fenchyl acetate	20.767	1236	1234	1234	13851-11-1	0.312
17	Butanoic acid, 3-methyl-, hexyl ester	21.158	1245	1244	1244	10032-13-0	0.096
18	Linalyl acetate	21.833	1260		1257	115-95-7	38.875
19	Isopulegol acetate	23.2	1289		1285	57576-09-7	0.206
20	Lavandulol acetate	23.375	1292		1290	25905-14-0	0.728
21	Hexyl tiglate	25.117	1334		1330	16930-96-4	0.101
22	8-Hydroxylinalool*	25.508	1343		1361	64142-78-5	0.089
23	unknown	26.05	1355				0.104
24	Neryl acetate	26.583	1367		1364	141-12-8	0.087
25	Geranyl acetate	27.417	1386		1382	105-87-3	0.178
26	Caryophyllene	28.933	1422		1419	87-44-5	4.244
27	(E)- β -Farnesene	30.45	1459		1457	18794-84-8	0.227
28	Bicyclogermacrene	32.158	1499		1500	24703-35-3	0.164
29	Lavandulyl isovalerate	32.608	1511		1508	51117-21-6	0.138
30	γ -Cadinene	32.808	1517		1514	39029-41-9	0.084
31	Germacrene B	34.35	1557		1559	15423-57-1	0.094
32	Caryophyllene oxide	35.55	1586		1581	1139-30-6	0.729
33	tau-Cadinol	37.733	1645		1642	147-47-90	0.071
34	α -Bisabolol	39.3	1686		1684	515-69-5	0.136

tR – retention time; KI exp.– Kovats index experimental, KI Adams– Kovats index according to Adams library, KI NIST – Kovats index according to NIST librar

3.2. Publikacja 2

TYTUŁ:

In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on
Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler

AUTORZY:

Hubert Iwiński, Karolina Wódz, Karolina Chodkowska, Tomasz Nowak, Henryk
Różański


CZASOPISMO:

Antibiotics 2022, 11, 868.

doi.org/10.3390/antibiotics11070868

Article

In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on *Salmonella* spp. Isolated from Chicken Broiler

Hubert Iwiński ^{1,2,*} , Karolina Wódz ³, Karolina Chodkowska ^{2,4}, Tomasz Nowak ³ and Henryk Różański ^{2,5}

¹ Department of Chemistry, the Faculty of Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland

² AdiFeed Sp. z o.o., Opaczewska, 02-201 Warszawa, Poland; k.chodkowska@jkrzyzanowski.pl (K.C.); rozanski@rozanski.ch (H.R.)

³ Laboratory of Molecular Biology, Vet-Lab Brudzew, Turkowska 58c, 62-720 Brudzew, Poland; karolina.wodz@labbrudzew.pl (K.W.); tomasz@labbrudzew.pl (T.N.)

⁴ Krzyzanowski Partners Spółka z o.o., Zakładowa 7, 26-670 Pionki, Poland

⁵ Laboratory of Industrial and Experimental Biology, Institute for Health and Economics, Carpathian State College in Krosno, Rynek 1, 38-400 Krosno, Poland

* Correspondence: hubert.iwinski@upwr.edu.pl

Abstract: Background: The identification of natural antibacterial agents from various sources that can act effectively against disease-causing foodborne bacteria is one of the major concerns throughout the world. In the present study, a unique phytobiotics mixture containing thymol, menthol, linalool, *trans*-anethole, methyl salicylate, 1,8-cineole, and *p*-cymene was evaluated for antibacterial activity against selected strains of *Salmonella* spp. Results: The phytobiotics mixture was effective against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Kentucky. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of this unique mixture for these three pathogens were 1:256. Among these three strains, one *S. Kentucky* presented the most extensive resistance profiles to 18 antibiotics belonging to 5 classes of antibiotics. One of *S. Typhimurium* presents extensive resistance profiles to 14 antibiotics belonging to 5 classes of antibiotics. Conclusions: The results suggest that the phytobiotics mixture used in the experiment can be used as a strong natural antibacterial agent against Gram-negative foodborne pathogens such as *S. Typhimurium*, *S. Kentucky*, and *S. Enteritidis*. This is a preliminary analysis of the effectiveness of a phytobiotic product in an in vitro model, which may be the starting point for further studies, including in vivo animal models.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium; *Salmonella* Enteritidis; phytobiotics; antimicrobial resistance; MIC; chicken broiler; resistance genes; thymol; 1,8-cineole



Citation: Iwiński, H.; Wódz, K.; Chodkowska, K.; Nowak, T.; Różański, H. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on *Salmonella* spp. Isolated from Chicken Broiler. *Antibiotics* **2022**, *11*, 868. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070868>

Academic Editors: Marc Maresca, Anahi Bucchini and Laura Giamperi

Received: 7 June 2022

Accepted: 23 June 2022

Published: 28 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Salmonellosis is the second most common zoonotic disease after campylobacteriosis in the European Union (EU), mostly related to eggs and raw meat from poultry production. Each year in Europe and North America there are 7–10 cases of foodborne illness (per 100,000 of the population) related to non-typhoid *Salmonella*. It causes 16 million cases of inflammatory fever including salmonellosis, 1.3 billion cases of gastroenteritis, and 3 million deaths from *Salmonella* worldwide each year. An increase in the confirmed human salmonellosis cases noticed in the last decade in the EU necessitated the search for a possible effective *Salmonella* control in broiler chicken flocks using various methods, including substances obtained from plants.

For several years, national *Salmonella* control programs (also in Poland) in broiler flocks have shown that the problem is not disappearing and is even becoming one of the main microbiological threats in poultry production. This, together with the increasing antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. (mostly in humans), forced the necessity to

undertake work on alternative methods of controlling and eradicating *Salmonella* in poultry production using promising antibiotic alternatives including probiotics, prebiotics, symbiotics, organic acids, essential oils, cinnamaldehyde, chitosan, phages, nanoparticles, and vaccines.

Antimicrobial resistance (AMR) is a global growing health threat in both human and veterinary medicine. Poultry production is one of the fastest and most dynamically developing animal productions in the world. This, together with the various conditions of poultry farming such as ineffective biosecurity, a high stocking density, or the increasing threat of viral diseases causing immunosuppression, significantly contributes to the increase in the use of antibiotics in veterinary medicine, and indirectly to the overall increased antibiotic resistance. The latest analysis showed that more than 70% of global antimicrobials produced on Earth are used in food-animal production [1]. Data about AMR transmission pathways and finding about how its spread in different part of the world, can be found in Table 1.

Table 1. Overview of antimicrobial resistance (AMR) of *Salmonella* transmission pathways originating from poultry production (based on [2]).

Country	AMR Transmission Pathway(s)	Findings
Kenya	Indirect transmission to backyard poultry.	<i>Salmonella</i> spp. were isolated and detected the presence of class 1 integrons beta-lactamase genes from backyard chicken feces.
Vietnam	Intensive chicken farming Occupational exposure.	Demonstrated an association with AMR <i>Salmonella</i> spp. in farmers and intensively farmed poultry. Human and food-production animals had a moderate to high prevalence of <i>E. coli</i> and <i>Salmonella</i> resistant to ampicillin, tetracyclines, and sulfonamides, a high to extremely high resistance to fluoroquinolones in <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , and <i>Campylobacter</i> recovered from humans, broilers, fattening turkeys, and poultry carcasses/meat, and low levels of bacteria resistant to colistin in food-producing animals. Multiple drug resistance (MDR) <i>Salmonella enterica</i> serotype Infantis recovered from broilers.
EU	Zoonotic.	Moderate levels of <i>Salmonella</i> resistant to ciprofloxacin associated to direct and indirect contact with animal feces. MDR <i>Salmonella enterica</i> serotype Infantis recovered from broiler's meat. Whole-genome sequencing revealed that this strain was identified from sick people returning from South America, and it is rapidly spreading among people and animal populations.
USA	Zoonotic.	

The antibiotics used in animals should be selected from those the World Health Organization (WHO) has listed as being “least important” to human health, and not from those classified and mentioned above as “highest priority critically important”. These antibiotics are often the last line, or one of limited treatments, available to treat serious bacterial infections in humans.

In 2019, WHO identified 32 antibiotics in clinical development that address the WHO list of priority pathogens. However, only six of them were classified as innovative. New antimicrobials agents, not only as classic antibiotics but also any alternatives (for, e.g., plant origin), are urgently needed in both human and veterinary medicine [3].

According to the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) 2020 Annual report, the most incidents came from “accidental or environmental contamination” (30 incidents, 133 notifications), followed by “hazardous or unauthorized composition” (14 incidents, 42 notifications), and “foodborne outbreak” (9 incidents, 43 notifications). Among pathogenic microorganism groups related to the food sector analysed in the RASFF system, 788 notifications were related

to—*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Norovirus*, and *E. coli*. The biggest number of *Salmonella* notifications (273) associated with poultry meat and poultry meat products was detected in Poland as a country of origin. Approximately half of these concerned *Salmonella* Enteritidis (149 notifications), for which a food safety criterion is set for fresh poultry. Sixteen operators were identified as recurrent. Number of notifications caused by *Salmonella*, associated to poultry meat and poultry meat products, divided to the by countries can be found in Table 2. These data clearly indicate that the problem of *Salmonella* in food of animal origin, in particular in poultry meat and its products, is still valid despite the introduction of many solutions both at the farm, slaughterhouse, and production plant level. [4].

Table 2. Number of notifications counted for each combination of hazard/product category/notifying country.

Hazard	Product Category	Notifying Country	Notification
<i>Salmonella</i>	Poultry meat and poultry meat products.	Poland	70
<i>Salmonella</i>	Poultry meat and poultry meat products.	Lithuania	63
<i>Salmonella</i>	Poultry meat and poultry meat products.	France	50
<i>Salmonella</i>	Poultry meat and poultry meat products.	Italy	44

The increasing resistance of microorganisms has generated the need to search for novel and, most importantly, effective solutions. As evidenced by current research, an effective alternative are substances produced by higher plants—phytoncides, phytoalexins, phytoanticipins, and other secondary metabolites. The term “phytoncide” was coined for the first time by the Soviet scientist B. P. Tokin [5]. This term describes substances secreted and excreted by telomeric plants that have antibacterial, antiprotozoal, and antifungal properties.

At the same time, scientists were also working on substances excreted by bacteria and fungi, trying to understand the mechanism of action and synthesize them. The milestone and first step to the “Golden Age” of antibiotics development was the discovery of penicillin by Alexander Fleming in 1928. On the other hand, the Second World War caused a huge demand for the substances with antimicrobial properties that can be easily used on the battlefield and prevent wounds infection. That reason forced the development of synthetic solutions over research on natural solutions. In the next 20 years, more than 25 antibiotics were discovered, and they dominated for the next decades [6,7]. Figure 1 shows the timeline and development of antibiotics in comparison to natural solutions.

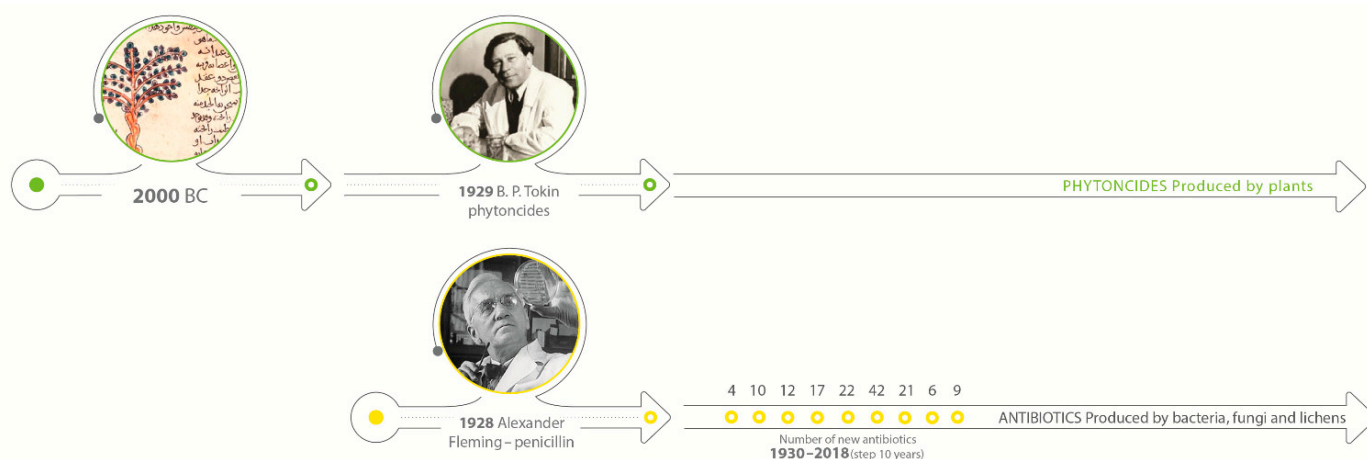


Figure 1. Timeline of antibacterial natural and synthetic compounds development.

The most recent term to describe plant secondary metabolites possessing antimicrobial properties is phytoanticipins. It was introduced by van Etten et al. and describes low-molecular-weight compounds characterized by antimicrobial properties, which are present in the plant before the appearance of the elicitor, while at the time of pathogen

attack they are released or constitute the main component of their synthesis [8]. Such compounds include glucosinolates commonly found in Brassicaceae plants [9–12] or saponins exemplified by avenacins and α -tomatine [9,12].

Research is currently being conducted on the use of the antimicrobial properties of, i.a. alkaloids [13–15], saponins [16–18], flavonoids [19,20], and essential oils [21–23]. In this article we will focus on essential oils, more precisely on their constituents. Essential oils are volatile, poorly water-soluble, lipophilic natural substances. They are used in many industries such as food, cosmetics, medicine, and pharmaceuticals [24]. Essential oils are natural volatile substances obtained from almost every part of plants, including the leaves, buds, flowers, bark, seeds, roots, rhizomes, stems, and fruits by steam distillation, supercritical fluid extraction, and solvent extraction [25–27].

Chemically they are mainly mixtures of terpenes (mono-, di-, and sesqui-), terpenoids, phenylpropanoids, isoprenoids, phthalides, and phenolic compounds [25–29].

Figure 2 presents some of the proposed potential mechanisms of antimicrobial action have been observed against bacteria in general, but it is suspected that they may be consistent with those observed for *Salmonella* spp.

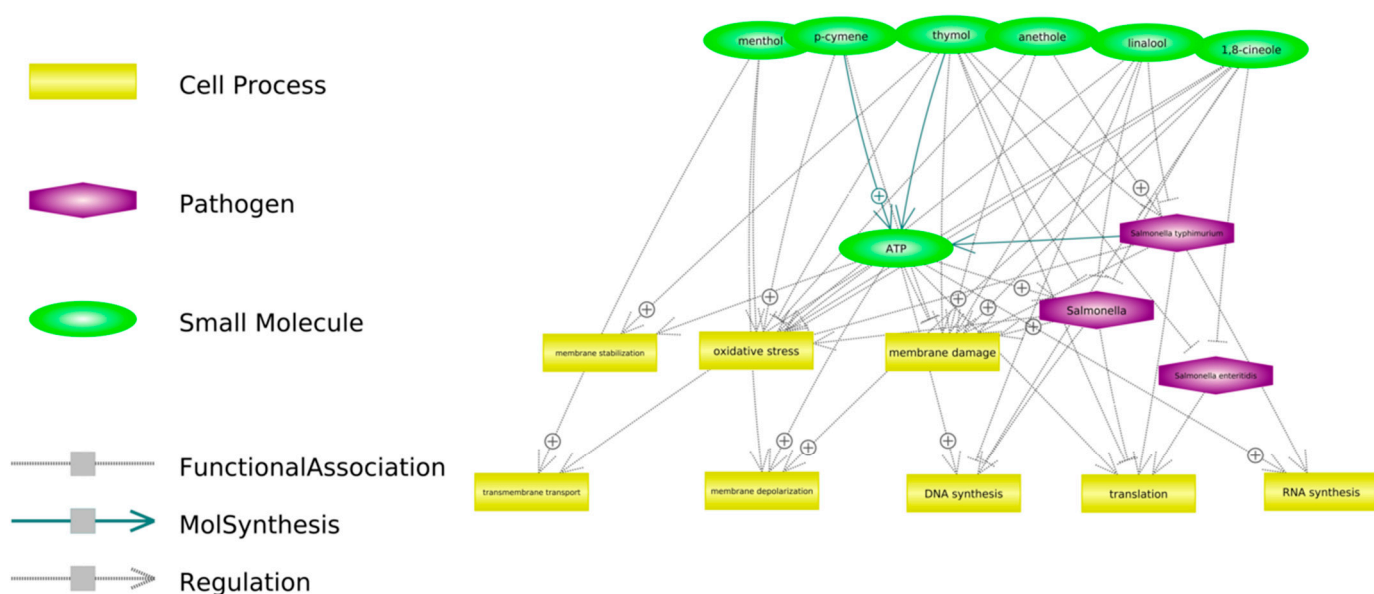


Figure 2. Potential antibacterial activity of selected components of phytobiotics mixture used in the study. The links were created in the Pathway Studio Web (USA) software on the basis of available publications.

The aim of the present study was to determine the antibacterial activity of phytoncides mixture (thymol, menthol, linalool, anethole, methyl salicylate, 1,8 cineole, and *p*-cymene) in vitro against *Salmonella* spp. isolated from broiler farms.

2. Results

The chemical composition of menthol, 1,8-cineole, thymol, *p*-cymene, anethole, linalool, and methyl salicylate was effective against *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, and *S. Kentucky*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of this unique mixture for all serotypes of these three pathogens were 1:256. In seven strains, those dilutions were even lower, reaching 1:512. Moreover, MBC for the liver *Salmonella* Enteritidis was 1:1024. Table 3. shows the dilution which was effective against analysed *Salmonella* spp. Figures S1–S4 show the evaluation of the MIC of the phytoncides mixtures on the analysed *Salmonella* spp. and the negative control.

Table 3. MIC of analyzed mixture.

Salmonella Strains	Sample Source	Dilution											
		1:2	1:4	1:16	1:32	1:64	1:118	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192
<i>Salmonella</i> Typhimurium (BO4)	Boot swabs	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium (BO4)	Boot swabs	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium (BO4)	Boot swabs	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium (BO4)	Boot swabs	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Kentucky (CO8)	Boot swabs	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Kentucky (CO8)	Dust	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DO9)	Intestines	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DO9)	Liver	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DO9)	Spleen	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DO9)	Boot swabs	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DO9)	Boot swabs	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DO9)	Boot swabs	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+

“–” —dilution was not effective against analysed bacteria, “+” —dilution was effective against analysed bacteria.

2.1. Antimicrobial Resistance Profile

The isolates were subjected to antibiotic susceptibility tests against 33 antibiotics belonging to 10 different classes using the MIC method Merlin MICRONAUT (MERLIN Diagnostika GmbH, Niemcy, Germany) and the AST-GN 96 CARD and the VITEK2 system (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). All *Salmonella* strains of the isolated species belong to 12 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and represented 3 serotypes (Typhimurium, Kentucky, Enteritidis). Antibiotic susceptibility testing conducted on the *Salmonella* strains showed that only two strains *S. Typhimurium* had resistance to two classes of antibiotics (CFX-CPH-GEN-NEO-STR) whereas other strains were resistant to three or more of the tested antibiotics. All isolated *Salmonella* were sensitive to imipenem (IMP) and colistin (COL)/polymyxin B (PB), cefequinome (CFQ), and trimethoprim/sulfamethoxazole (TR/SMX). Surprisingly, we detected that 100% of the *Salmonella* strains were phenotypically resistant to streptomycin and gentamycin. Amongst the resistant strains, only two resistance profiles were identical: CFX-CPH-GEN-NEO-STR (*S. Typhimurium*). *S. Kentucky* presented the most extensive resistance profiles to 18 antibiotics (AMP-AMX-AMX/CL-CFX-CFT-CPH-CFP-GEN-NEO-STR-ENR-UB-MRB-NOR-DOX-OXY-TET-LIN/SP) belonging to 5 classes of antibiotics. One of *S. Typhimurium* presents extensive resistance profiles to 14 antibiotics (AMP-AMX-CFX-CFT-CPH-CFT-CFP-GEN-STR-ENR-UB-MRB-FLR-LIN/SP) belonging to 5 classes of antibiotics. The classes to which it presented the highest resistance were β -lactams (AMP, AMX) and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination (AMX/CL), I generation cefalexin (CFX-CFT-CPH), III generation cefalexin (CFT, CFP), aminoglycosides (GEN-NEO-STR), fluoroquinolones (ENR-UB-MRB-NOR), and tetracyclines (DOX-OXY-TET). For individual serovars of *Salmonella* spp., Table 4 presents several multi antibiotic resistance patterns.

2.2. Prevalence of Multiple Drug Resistance

In our study, four of the isolates showed a multiple antibiotic resistance index (MAR index) greater than 0.3, whereas eight (all *S. Enteritidis* and two *S. Typhimurium*) showed a MAR index above 0.5. We observed a high prevalence of multiple antibiotic resistance amongst the isolates where four of the isolates were MDR, with resistance to five different classes of antibiotics.

Table 4. Multiple antibiotic resistance index (MAR index) and phenotype pattern of *Salmonella enterica* spp. *Enterica*, all identified serovars isolates from samples of poultry.

<i>Salmonella</i> Strains	Sample Source	Phenotypic Antimicrobial Resistance Profile	MAR Index
<i>Salmonella</i> Typhimurium (BO4)	Boot swabs	CFX-CPH-GEN-NEO-STR	0.2
	Boot swabs	AMP-AMX-CFX-CFT-CPH-CFT-CFP-GEN-STR-ENR-UB-MRB-FLR-LIN/SP	0.56
	Boot swabs	CFX-CPH-GEN-NEO-STR-ENR-MRB-FLR-LIN/SP	0.36
	Boot swabs	CFX-CPH-GEN-NEO-STR	0.2
	Boot swabs	AMP-AMX-AMX/CL-CFX-CFT-CPH-CFP-GEN-NEO-STR-ENR-UB-MRB-NOR-DOX-OXY-TET-LIN/SP	0.72
<i>Salmonella</i> Kentucky (CO8)	Dust	AMP-AMX-CFX-CFT-CPH-CFP-GEN-STR-ENR-UB-MRB-DOX-OXY-TET	0.56
	Intestines	CPH-GEN-STR-DOX-OXY-TET	0.24
	Liver	GEN-STR-UB-LIN/SP	0.16
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DO9)	Spleen	CPH-GEN-NEO-STR-UB	0.2
	Boot swabs	CPH-GEN-STR-UB	0.16
	Boot swabs	CFX-CPH-GEN-NEO-STR-UB	0.24
	Boot swabs	CPH-GEN-STR-LIN/SP	0.16

Letter abbreviations correspond to the individual antibiotics according to list: ampicillin (AMP), amoxicillin (AMX), amoxicillin and clavulanic acid (AMX/CL), cephalixin (CFX), cefalotin (CFT), cefapirin (CPH), cefoperazone (CFP), gentamicin (GEN), neomycin (NEO), streptomycin (STR), enrofloxacin (ENR), flumequine (UB), marbofloxacin (MRB), norfloxacin (NOR), docycycline (DOX), oxytetracycline (OXY), tetracycline (TET), florfenicol (FLR), and lincomycin/specinacin (LIN/SP).

2.3. Detection of Antibiotic Resistance Genes (ARGs)

Based on the antibiogram data, all isolates were studied for the presence of antibiotic resistance genes. The overall prevalence of ARGs amongst the investigated *Salmonella* isolates with their resistance phenotype is shown in Table 5. All the isolates were positive for at least one AMR gene. The gene *bla*_{CMY2}, which confers resistance to ceftiofur (CFTI)/cefoperazone (CFP), was detected in four strains. However, the *Salmonella* Enteritidis strain did not exhibit phenotypic resistance to III generation cephalosporin. The genes *aadA* and *strA/strB* that confer resistance to streptomycin, were detected in all strains. The gene *aadB* was not detected in the strains. However, all *Salmonella* spp. strains were phenotypically resistant to gentamicin (GEN). All of the neomycin-resistant strains carried *aphA1* and *aphA2* genes. The *tetA* and *tetB* genes were detected in all strains resistant to doxycycline and oxytetracycline. The gene *floR* that confers resistance to florfenicol was detected in all strains resistant to florfenicol. The distribution of the various resistance genes and the prevalence of the corresponding serovars are shown in Table 5.

Table 5. Distribution of resistance genes amongst *Salmonella* isolates.

<i>Salmonella</i> Strains	Sample Source	Resistance Phenotype	Resistance Genes
<i>Salmonella</i> Typhimurium (BO4)	Boot swabs	CFX-CPH-GEN-NEO-STR	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>aphA2</i>
	Boot swabs	AMP-AMX-CFX-CFT-CPH-CFP-CFTI-GEN-STR-ENR-UB-MRB-FLR-LIN/SP	<i>bla</i> _{CMY2} , <i>bla</i> _{PSE-1} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>floR</i>
	Boot swabs	CFX-CPH-GEN-NEO-STR-ENR-MRB-FLR-LIN/SP	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>aphA2</i> , <i>floR</i>
	Boot swabs	CFX-CPH-GEN-NEO-STR	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>aphA2</i>

Table 5. Cont.

<i>Salmonella</i> Strains	Sample Source	Resistance Phenotype	Resistance Genes
<i>Salmonella</i> Kentucky (CO8)	Boot swabs	AMP-AMX-AMX/CL-CFX-CFT-CPH-CFP-GEN-NEO-STR-ENR-UB-MRB-NOR-DOX-OXY-TET-LIN/SP	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{PSE-1} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>aphA2</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i>
	Dust	AMP-AMX-CFX-CFT-CPH-CFP-GEN-STR-ENR-UB-MRB-DOX-OXY-TET-LIN/SP	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{PSE-1} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i>
	Intestines	CPH-GEN-STR-DOX-OXY-TET	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis (DO9)	Liver	GEN-STR-UB-LIN/SP	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i>
	Spleen	CPH-GEN-NEO-STR-UB	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>aphA2</i>
	Boot swabs	CPH-GEN-STR-UB	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i>
	Boot swabs	CFX-CPH-GEN-NEO-STR-UB	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i> , <i>aphA1</i> , <i>aphA2</i>
	Boot swabs	CPH-GEN-STR-LIN/SP	<i>aadA</i> , <i>strA/strB</i>

3. Discussion

The results of the present study illustrated that the unique phytobiotic mixtures containing menthol, thymol, linalool, 1,8-cineole (eucalyptol), *p*-cymen, anethole, and methyl salicylate are effective against three *Salmonella* serotypes isolated from infected materials (birds, dust, and boot swabs) in an in vitro environment. To our best knowledge, there are no scientific reports showing bactericidal effects on *Salmonella* spp. of similar natural compounds composition.

The previous trend of studies related to searching for possible antibiotic alternatives (also used as antibiotic growth promoters) in animal production, so far has mostly focused on single components or mixtures of 2 to 3 active substances [30,31]. There are also reports with promising results, in the *Salmonella* spp. Control, with probiotics as an alternative for AGPs [32,33]. Analyzing the history of antibiotics from the discovery of penicillin in 1928 until today, when both human and veterinary medicine face the increasing drug resistance of many dangerous bacteria (including *Salmonella* spp.) and the lack of new, safe, and effective antibiotics, one should look at the dynamic development of phytobiotics. Phytobiotics, which include a wide range of plant-derived products such as essential oils, herbs, and other bioactive compounds, were first described in 1929 by Russian biochemist Boris Tokin who noticed that certain trees and plants release very active preservatives. This author conducted a number of studies in the 1950s, but only in the last 20 years have we observed a dynamic development of research on the potential effects of single phytobiotics or in simple combinations. Many recent studies show that the antimicrobial mechanism of action of phytobiotics is similar to the action of classic antibiotics [34,35], with the extremely important difference that in the case of phytobiotics, the phenomena of drug resistance and temporary accumulation of active substances in tissues (withdrawal period and antibiotic residues in products of origin) are not observed.

In our study, the sensitivity to 25 antibiotics were assessed. Penicillins (cloxacillin, penicillin G, and nafcillin), macrolides (erythromycin and tylvalosin), lincomycin, tiamulin, and tylvalosin were excluded from analysis, due to a natural lack of activity against *Salmonella*.

The results of the antibiotic resistance indicated that the *Salmonella* spp. strains isolated from birds could be categorized as resistant to MDR, that is, bacteria exhibiting resistance to one or more antibiotics from three or more classes of antibiotics. Phenotypic and genotypic profiles of resistance analysis showed that amongst these three strains, *S. Kentucky* presented the most extensive resistance profiles to 18 antibiotics belonging to 5 classes of antibiotics. One of *S. Typhimurium* presents extensive resistance profiles to 14 antibiotics belonging to 5 classes of antibiotics. These bacteria were resistant to β -lactams, aminoglycosides, cephalosporins, fluoroquinolones, and tetracyclines. All strains were resistant to gentamicin, which is one of the major antibiotics used in the treatment of urinary infections in humans, and to streptomycin. Although streptomycin, an aminoglycoside, is not used for *Salmonella* treatment, streptomycin resistance has been widely used as an epidemiological marker [36]. For this reason, the results obtained in this study, indicating the antibacterial activity of the mixture of phytobiotics also

against *Salmonella* Kentucky, seem to be extremely interesting and promising not only in terms of the control of salmonellosis in broiler breeding, but also due to the indirect reduction of resistance among this type of bacteria.

Finally, because these antibiotic phenotypes could be conferred by several ARGs, the detection of resistance genes was performed in order to confirm phenotypic antimicrobial resistance profiles.

In *Salmonella*, the main mechanism of resistance to β -lactams is encoded by the *bla* genes. The gene *bla*_{CMY2}, encoding an extended-spectrum beta-lactamase that is responsible for resistance to ceftiofur (CFTI)/cefoperazone (CFP), was detected in four strains. However, the *Salmonella* Enteritidis strain did not exhibit phenotypic resistance to this antibiotic.

In our study, one *S. Typhimurium* and two *S. Kentucky* demonstrated the presence of the genes *bla*_{PSE-1} and *bla*_{TEM} that encode beta-lactamases and confer resistance to ampicillin. The genes *aadA* and *strA/strB* that confer resistance to streptomycin were detected in all strains. The gene *aadB* was not detected in the strains. However, all *Salmonella* spp. strains were phenotypically resistant to gentamicin. This resistance may be mediated by other resistance genes, which were not assessed in this study.

The proposed composition shows unexpected and very high antibacterial properties against *Salmonella* spp. The composition was prepared based on experience of the authors with natural compounds and their uses in feed. All the components are allowed to be used as a feed additive according to Regulation (EC) no. 1831/2003 of the European Parliament and of The Council, Appendix I [37]. The composition based also on the scientific data provided by researchers about the used mentioned compounds against microorganisms. [38–41]. Similar trends have been reported by Kollanoor Johnny et al. in their work on the plant-derived molecules trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol [42]. However, their results test was conducted only on single compounds, not their mixtures and this might have been the reason for the lower efficacy of thymol. The synergistic effect of essential oils compositions was reported by Thanissery et al. The results show stronger antibacterial properties of a thyme–oregano blend against *Salmonella*, than both essential oils separately [43]. Mixtures with other natural compounds such as organic acids and surfactants present a very good effect against *Salmonella* spp. [44].

Our findings support the Aljumaah et al. hypothesis that supplementation of phyto-biotic feed additives could be very effective in growth promotion, meat quality, and composition and what is most important, *S. Typhimurium* control [45].

The results obtained in this study, indicate that the antibacterial activity of the mixture of phyto-biotics seems to be extremely interesting and promising not only in terms of the control of salmonellosis in broiler breeding, but also due to the indirect reduction of resistance among this type of bacteria.

4. Materials and Methods

4.1. Phytoncides Mixture

Seven common phytoncides were selected for the tests—thymol, menthol, linalool, *trans*-anethole, methyl salicylate, 1,8-cineole, and *p*-cymene. All compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) compliant to FCC and FG standards. Purity and percentage composition, according to supplier specification, was minimum $\geq 95\%$.

All phytoncides were mixed in equivalent amounts, heated, and left overnight. The prepared mixture was then mixed with an emulsifier (Polysorbat 80, Sigma-Aldrich) for easier dissolution in aqueous solutions and culture media.

4.2. *Salmonella* spp. Isolation and Identification

Salmonella spp. from environmental samples were isolated in accordance with PN-EN ISO 6579-1:2017-04. Microbiology of the food chain—horizontal method for the detection, enumeration, and serotyping of *Salmonella*—Part 1: Detection of *Salmonella* spp. Samples were taken from several infected broiler farms from different places (boot swabs and dust)

and internal organs (intestines, liver, and spleen). Then, samples were suspended in 225 mL buffered peptone water (BPW GRASO, Starogard, Poland) in sterile stomacher bags for pre-enrichment (Whirl-Pak, NASco, Madison, WI, USA). The selective proliferation of *Salmonella* spp. was carried out using modified semisolid Rappaport–Vassiliadis (MSRV) agar (GRASO). Two selective enrichment media, xylose lysine deoxycholate agar (XLD, GRASO) and brilliant green agar (BGA, GRASO), were used as described [46]. *Salmonella* suspect colonies were transferred to nonselective nutrient agar (GRASO) to obtain the pure culture for testing flagellar antigens. Serotyping was performed by direct agglutination with commercial H poly antisera for verification of the genus *Salmonella* enterica (IBSS Biomed, Kraków, Poland), O group antisera to determine O group (IBSS Biomed, Kraków, Poland), and H phase and H factor antisera to determine H phase and H factor (IBSS Biomed, Kraków, Poland, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), according to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. Pure cultures were used for further biochemical and molecular tests.

4.3. Biochemical Strain Identification

Colonies showing morphology typical for *Salmonella* spp. on selective agars were subjected to biochemical identification using two commercially available tests: API 20E (BioMérieux, Craponne, France) and a VITEK2 COMPACT automated system for bacterial identification. VITEK[®] 2 GN cards (BioMérieux, Craponne, France) with reference strains for *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, and *Salmonella* Kentucky ATCC 9263 served as a quality control. Both tests were used according to the manufacturer's instructions.

4.4. Confirmation of *Salmonella* Identification with Molecular Biology Methods

A real-Time PCR method based on the detection of genes specific for *Salmonella* spp. was used to confirm biochemical identification. DNA for Real-time PCR was extracted from bacterial cells using an automated method (AutoPure96, Wuxi, China). For detection of *Salmonella* spp., a commercial Kylt[®] *Salmonella* spp. (Anicon, Emstek, Germany) kit was used. For simultaneous detection of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium, a commercial Spp-Se-St PCR (BioChek, Reeuwijk, The Netherlands) kit was used. Both real-time PCR tests were performed according to the manufacturer's instructions using an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo, Waltham, MA, USA).

4.5. Phytoncides Mixture Test by Broth Microdilution Method

The antimicrobial activity of the phytoncides mixture was tested using the broth microdilution method described in ISO 20776-1:2006. In sterile vials, two-fold serial dilutions of the phytoncides mixture were prepared in Mueller Hinton II Broth (M-H Broth) with a final volume of 2 mL per vial. Next, fresh inoculum of each bacterial isolate was prepared by suspending colonies from an overnight culture on sheep blood agar in sterile saline (0.9% NaCl) and adjusting the turbidity 0.5 McFarland standard. Subsequently, the suspensions were diluted a hundredfold in M-H Broth by transferring 110 µL of the suspension into 11 mL M-H Broth. Then, 1 mL of this inoculum was transferred into each vial containing 1 mL of diluted product, resulting in the following test dilutions of the product, per row: 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096, and 8192. Vials containing 1 mL of M-H Broth only, without product, and 1 mL of inoculum were used as positive growth controls. Wells containing 1 mL of diluted product (a two-fold dilution series) and 1 mL of M-H Broth without any of the bacterial isolates were used as negative controls. Vials were incubated at 35 ± 1 °C for 21 ± 3 h. After incubation, the lowest concentration (the highest dilution) of the product that completely inhibits visible growth was recorded; the minimum inhibitory concentration (MIC). To check for purity after inoculation of the vials, bacterial suspensions made in saline were streaked onto Columbia agar with 5% sheep blood agar. Following overnight incubation at 37 °C, cultures were checked for morphologically characteristic colonies.

4.6. Antibiotic Resistance Test

The 8 classes of antimicrobials agents (β -lactams, aminoglycosides, polymyxins, fluoroquinolones, tetracyclines, macrolides, lincosamides, and sulfonamide) as well as florfenicol, tiamulin, and tylvalosin were used for the antimicrobial susceptibility test.

Antimicrobial susceptibility was assessed by determining the MIC values using a 96 well MICRONAUT Special Plates with antimicrobials: amoxicillin and clavulanic acid (AMX/CL), amoxicillin (AMX), cefquinome (CFQ), ceftiofur (CFTI), cephalixin (CFX), cloxacillin (CLO), colistin (COL), cefapiryna (CPH), docycycline (DOX), enrofloxacin (ENR), erythromycin (ERY), florfenicol (FLR), gentamicin (GEN), lincomycin (LIN), lincomycin/specinacin (LIN/SP), nafcillin (NAF), neomycin (NEO), norfloxacin (NOR), oxytetracycline (OXY), benzylpenicillin (PG), streptomycin (STR), trimethoprim-sulfamethoxazole (TR/SMX), tiamulin (TIA), tylosin (TYL), and tylvalosin (TYLV) (MERLIN Diagnostika GmbH, Bremen, Germany) was used. The MICs were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and FDA breakpoints [47].

Simultaneously, antimicrobial susceptibility was assessed by determining the MIC values using a VITEK[®] 2 System and AST-GN96 cards for Gram-negative bacteria (BioMérieux). The AST card is essentially a miniaturized and abbreviated version of the doubling dilution technique for MICs determined by the microdilution method [46]. With using AST-GN96 susceptibility for amoxicillin/clavulanic acid (AMX/CL); ampicillin (AM), cephalixin (CFX), cephalotin (CF), ceftriaxone (CFP), cefepime (CFE), ceftiofur (CFTI), enrofloxacin (ENR), florfenicol (FLR), flumequine (UB), gentamicin (GEN), imipenem (IPM), marbofloxacin (MRB), neomycin (NEO), polymyxin B (PB), tetracycline (TE), and trimethoprim/sulfamethoxazole (TR/SMX) and additional antibiotics, ampicillin (AM), cefalotin (CF), cefoperazone (CFP), imipenem (IPM), flumequine (UB), marbofloxacin (MRB), tetracycline (TE), polymyxin B (PB), and trimethoprim/sulfamethoxazole (TR/SMX) was assessed.

The isolates were subjected to antibiotic susceptibility tests against 33 antibiotics belonging to 13 different classes using MIC method Merlin MICRONAUT (MERLIN Diagnostika GmbH, Germany) and AST-GN 96 CARD and VITEK2 system (Biomérieux, France). The AST card is essentially a miniaturized and abbreviated version of the doubling dilution technique for MICs determined by the microdilution method [48]. The multiple antibiotic resistance (MAR) phenotypes were performed for isolates showing resistance to more than two antibiotics [49]. MAR index was using the formula:

$$\text{MAR} = \frac{\text{Number of resistance to antibiotics}}{\text{Total number of antibiotics tested}}$$

4.7. Detection of Antimicrobial Resistance Genes by Multiplex PCR

Bacterial DNA isolation was performed using an automated method (AutoPure96, China). Fourteen resistance genes (*aadA*, *strA/strB*, *aphA1*, *aphA2*, *aadB*, *tetA*, *tetB*, *sul1*, *sul2*, *floR*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CMY-2}*, and *bla_{PSE-1}*) were analyzed by conventional PCR using specific primer pairs in multiplex or single PCR reaction. The primer sequences predicted PCR product sizes and references shown in Table 6.

Table 6. Primers sequences for detection of antimicrobial resistance genes in the *Salmonella* spp. isolate and multiplex PCR annealing temperature (based on [50]).

Multiplex PCR	Gene/Antibiotic	Primer Sequences 5'-3'	Annealing Temperature	Product Size (bp)
Multiplex 1	<i>aadA</i> streptomycin	F-GTG GAT GGC GGC CTG AAG CC R-AAT GCC CAG TCG GCA GCG	63 °C	525 bp
Multiplex 1	<i>strA/strB</i> streptomycin	F-ATG GTG GAC CCT AAA ACT CT R-CGT CTA GGA TCG AGA CAA AG	63 °C	893 bp
Multiplex 2	<i>aphA1</i> neomycin	F-ATG GGC TCG CGA TAA TGT C R-CTC ACC GAG GCA GTT CCA T	55 °C	634 bp

Table 6. Cont.

Multiplex PCR	Gene/Antibiotic	Primer Sequences 5'–3'	Annealing Temperature	Product Size (bp)
Multiplex 2	<i>aphA2</i> neomycin	F-GAT TGA ACA AGA TGG ATT GCR-CCA TGA TGG ATA CTT TCT CG	55 °C	347 bp
Multiplex 2	<i>aadB</i> gentamicin	F-GAG GAG TTG GAC TATGGA TT R-CTT CAT CGG CAT AGT AAA AG	55 °C	208 bp
Multiplex 3	<i>tetA</i> tetracycline	F-GGC GGT CTT CTT CAT CAT GC R-CGG CAG GCA GAG CAA GTA GA	63 °C	502 bp
Multiplex 3	<i>tetB</i> tetracycline	F-CGC CCA GTG CTG TTG TTG TC R-CGC GTT GAG AAG CTG AGG TG	63 °C	173 bp
Multiplex 4	<i>sul1</i> sulfamethoxazole	F-CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG R-GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG	66 °C	433 bp
Multiplex 4	<i>sul2</i> sulfamethoxazole	F-CGG CAT CGT CAA CAT AAC CT R-TGT GCG GAT GAA GTC AGC TC	66 °C	721 bp
Single PCR	<i>floR</i> florfenicol	F-CACGTTGAGCCTCTATATGG R-ATGCAGAAGTAGAACGCGAC	61 °C	888 bp
Multiplex 5	<i>bla_{TEM}</i> ampicillin	F-TTAACTGGCGAACTACTTAC R-GTCTATTTTCGTTTCATCCATA	55 °C	247 bp
Multiplex 5	<i>bla_{SHV}</i> ceftiofur	F-AGGATTGACTGCCTTTTTG R-ATTTGCTGATTTTCGCTCG	55 °C	393 bp
Multiplex 5	<i>bla_{CMY-2}</i> ceftiofur	F-GACAGCCTCTTTCTCCACA R-TGGACACGAAGGCTACGTA	55 °C	1000 bp
Single PCR	<i>bla_{PSE-1}</i> ampicillin	F-GCAAGTAGGGCAGGCAATCA R-GAGCTAGATAGATGCTCACA	60 °C	461 bp

Abbreviations: bp—base pairs.

5. Conclusions

Our results show the antibacterial effect (in vitro) of a unique mixture of phytobiotics on selected *Salmonella* strains isolated from material collected from flocks where *Salmonella* infection has been confirmed, as well as on classic reference strains used in the routine diagnosis of *Salmonella* in broiler chicken flocks. This is the first study where this unique phytobiotics mixture was used.

These promising observations are extremely important not only for poultry production, but also for the current situation in human and animal medicine related to increasing antibiotics resistance. In addition, due to the legal prohibition of treating *Salmonella* in broiler flocks in a classic way—with the use of antibiotics, the tested mixture of phytobiotics may potentially support the control and spread of this type of bacteria (as a part of non-antibiotic strategy), and ultimately reduce the incidence of infections in humans related to the consumption of poultry products. Therefore, the reduction of *Salmonella* from the farm seems to be crucial to contribute to food safety. What is also important is that the use of phytobiotics as an antibiotics alternative (also based on our results) seems to be essential in protecting the therapeutic effect of antibiotics and indirectly reducing (preventing) the growing antibiotics resistance.

In summary, our pilot observations on the in vitro model provide valuable information on new potentially effective solutions for the control of *Salmonella* in poultry production. Due to the fact that these are in vitro observations, the next step in assessing the effectiveness of this unique mixture of phytobiotics should include an in vivo model experiment, taking into account not only the potential antibacterial activity, but also (due to the rich composition of the mixture and the multidirectional action of phytobiotics) on production parameters and meat quality.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11070868/s1>, Table S1: A summary of the results of biochemical reactions for the strain of *Salmonella* isolated from different samples. Figures S1–S4: MIC evaluation of the phytonicdes composition dilutions.

Author Contributions: Conceptualization, H.I., K.W., K.C. and H.R.; methodology, H.I., K.W., K.C. and H.R.; validation, H.I., K.W. and K.C.; formal analysis, H.I., K.W. and K.C.; investigation, H.I., K.W. and K.C.; data curation, H.I., K.W. and K.C.; writing—original draft preparation, H.I., K.W. and K.C.; writing—review and editing, H.I., K.W., K.C., T.N. and H.R.; visualization H.I., K.W. and K.C.; supervision, H.I., K.W., K.C. and H.R.; project administration, H.I., K.W. and K.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Danuta Kukulka for her help in preparing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Van Boeckel, T.P.; Pires, J.; Silvester, R.; Zhao, C.; Song, J.; Criscuolo, N.G.; Gilbert, M.; Bonhoeffer, S.; Laxminarayan, R. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science* **2019**, *365*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hedman, H.D.; Vasco, K.A.; Zhang, L. A Review of Antimicrobial Resistance in Poultry Farming within Low-Resource Settings. *Animals* **2020**, *10*, 1264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. World Health Organization. *2019 Antibacterial Agents in Clinical Development: An Analysis of the Antibacterial Clinical Development Pipeline*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019.
4. European Commission RASFF—The Rapid Alert System for Food and Feed—Annual Report 2020. 2021. Available online: https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-08/rasff_pub_annual-report_2020.pdf (accessed on 6 May 2022).
5. Duka, R.; Ardelean, D. Phytoncides and phytoalexins—Vegetal antibiotics. *J. Med. Arad.* **2010**, *XIII*, 19–25.
6. Katoch, R.; Rajagopalan, S. Warfare Injuries: History, Triage, Transport and Field Hospital Setup in the Armed Forces. *Med. J. Armed Forces India* **2010**, *66*, 304–308. [[CrossRef](#)]
7. Hutchings, M.I.; Truman, A.W.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80. [[CrossRef](#)]
8. VanEtten, H.D.; Mansfield, J.W.; Bailey, J.A.; Farmer, E.E. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins”. *Plant Cell* **1994**, *6*, 1191–1192. [[CrossRef](#)]
9. González-Lamothe, R.; Mitchell, G.; Gattuso, M.; Diarra, M.S.; Malouin, F.; Bouarab, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3400–3419. [[CrossRef](#)]
10. Chen, F.; Zhang, X.; Du, X.; Yang, L.; Zu, Y.; Yang, F. A new approach for obtaining trans-resveratrol from tree peony seed oil extracted residues using ionic liquid-based enzymatic hydrolysis in situ extraction. *Sep. Purif. Technol.* **2016**, *170*, 294–305. [[CrossRef](#)]
11. Parama, D.; Girisa, S.; Khatoon, E.; Kumar, A.; Alqahtani, M.S.; Abbas, M.; Sethi, G.; Kunnumakkara, A.B. An overview of the pharmacological activities of scopoletin against different chronic diseases. *Pharmacol. Res.* **2022**, *179*, 106202. [[CrossRef](#)]
12. Piasecka, A.; Jedrzejczak-Rey, N.; Bednarek, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: Conserved function of divergent chemicals. *New Phytol.* **2015**, *206*, 948–964. [[CrossRef](#)]
13. Dahmer, J.; Marangon, P.; Adolpho, L.O.; Reis, F.L.; Maldaner, G.; Burrow, R.A.; Mostardeiro, M.A.; Dalcol, I.I.; Morel, A.F. Alkaloids from the stem barks of *Scutia buxifolia* Reissek (Rhamnaceae): Structures and antimicrobial evaluation. *Phytochemistry* **2022**, *196*, 113071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Long, L.N.; Kang, B.J.; Jiang, Q.; Chen, J.S. Effects of dietary *Lycium barbarum* polysaccharides on growth performance, digestive enzyme activities, antioxidant status, and immunity of broiler chickens. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 744–751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Fan, K.; Ding, C.-F.; Deng, S.-Y.; Gao, W.; Tan, B.-Y.; Wu, H.; Guo, Y.; Song, J.-F.; Zhang, L.-C.; Zhang, R.-P.; et al. Monoterpene indole N-oxide alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa* and their antimicrobial activity. *Fitoterapia* **2022**, *158*, 105178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sharma, P.; Tyagi, A.; Bhansali, P.; Pareek, S.; Singh, V.; Ilyas, A.; Mishra, R.; Poddar, N.K. Saponins: Extraction, bio-medicinal properties and way forward to anti-viral representatives. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *150*, 112075. [[CrossRef](#)]
17. Zaiter, A.; Becker, L.; Baudelaire, E.; Dicko, A. Optimum polyphenol and triterpene contents of *Hedera helix* (L.) and *Scrophularia nodosa* (L.): The role of powder particle size. *Microchem. J.* **2018**, *137*, 168–173. [[CrossRef](#)]

18. Saboora, A.; Sajjadi, S.-T.; Mohammadi, P.; Fallahi, Z. Antibacterial activity of different composition of aglycone and glycosidic saponins from tuber of *Cyclamen coum* Miller. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *140*, 111662. [[CrossRef](#)]
19. Bączek, K.B.; Kosakowska, O.; Przybył, J.L.; Pióro-Jabrucka, E.; Costa, R.; Mondello, L.; Gniewosz, M.; Synowiec, A.; Węglarz, Z. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Ind. Crops Prod.* **2017**, *102*, 154–163. [[CrossRef](#)]
20. Vieira, V.; Pereira, C.; Pires, T.C.S.P.; Calhelha, R.C.; Alves, M.J.; Ferreira, O.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Phenolic profile, antioxidant and antibacterial properties of *Juglans regia* L. (walnut) leaves from the Northeast of Portugal. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *134*, 347–355. [[CrossRef](#)]
21. Kachur, K.; Suntres, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 3042–3053. [[CrossRef](#)]
22. Chidi, F.; Bouhoudan, A.; Khaddor, M. Antifungal effect of the tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium verrucosum*. *J. King Saud Univ. Sci.* **2020**, *32*, 2041–2045. [[CrossRef](#)]
23. Mangalagiri, N.P.; Panditi, S.K.; Jeevignunta, N.L.L. Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. *Heliyon* **2021**, *7*, e06835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ríos, J.-L. Chapter 1—Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; Preedy, V.R., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2016; pp. 3–10.
25. Tariq, S.; Wani, S.; Rasool, W.; Shafi, K.; Bhat, M.A.; Prabhakar, A.; Shalla, A.H.; Rather, M.A. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb. Pathog.* **2019**, *134*, 103580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Carson, C.F.; Hammer, K.A. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*; Thormar, H., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 203–238.
27. Valdivieso-Ugarte, M.; Plaza-Díaz, J.; Gomez-Llorente, C.; Lucas Gómez, E.; Sabés-Alsina, M.; Gil, Á. In vitro examination of antibacterial and immunomodulatory activities of cinnamon, white thyme, and clove essential oils. *J. Funct. Foods* **2021**, *81*, 104436. [[CrossRef](#)]
28. Srivastava, S.; Lal, R.K.; Yadav, K.; Pant, Y.; Bawitlung, L.; Kumar, P.; Mishra, A.; Gupta, P.; Pal, A.; Rout, P.K.; et al. Chemical composition of phenylpropanoid rich chemotypes of *Ocimum basilicum* L. and their antimicrobial activities. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *183*, 114978. [[CrossRef](#)]
29. Yan, J.; Wang, H.; Wang, Y.; Xu, S.; Wan, Y.; He, L.; Yu, L.; Zhu, W. Integrated metabolome and transcriptome analysis reveals candidate genes involved in metabolism of terpenoids and phthalides in celery seeds. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *172*, 114011. [[CrossRef](#)]
30. Aljumaah, M.R.; Alkhulaifi, M.M.; Abudabos, A.M.; Alabdullatifb, A.; El-Mubarak, A.H.; Al Suliman, A.R.; Stanley, D. Organic acid blend supplementation increases butyrate and acetate production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium challenged broilers. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ruvalcaba-Gómez, J.M.; Villagrán, Z.; Valdez-Alarcón, J.J.; Martínez-Núñez, M.; Gomez-Godínez, L.J.; Ruesga-Gutiérrez, E.; Anaya-Esparza, L.M.; Arteaga-Garibay, R.I.; Villarruel-López, A. Non-Antibiotics Strategies to Control *Salmonella* Infection in Poultry. *Animals* **2022**, *12*, 102. [[CrossRef](#)]
32. Adhikari, B.; Hernandez-Patlan, D.; Solis-Cruz, B.; Kwon, Y.M.; Arreguin, M.A.; Latorre, J.D.; Hernandez-Velasco, X.; Hargis, B.M.; Tellez-Isaias, G. Evaluation of the Antimicrobial and Anti-inflammatory Properties of Bacillus-DFM (Norum™) in Broiler Chickens Infected With *Salmonella* *Kentucky*. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 282. [[CrossRef](#)]
33. Aljumaah, M.R.; Alkhulaifi, M.M.; Abudabos, A.M. In vitro Antibacterial Efficacy of Non-Antibiotic Growth Promoters in Poultry Industry. *J. Poult. Sci.* **2020**, *57*, 45–54. [[CrossRef](#)]
34. Balta, I.; Linton, M.; Pinkerton, L.; Kelly, C.; Stef, L.; Pet, I.; Stef, D.; Criste, A.; Gundogdu, O.; Corcionivoschi, N. The effect of natural antimicrobials against *Campylobacter* spp. and its similarities to *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., *Clostridium* spp. and *Staphylococcus* spp. *Food Control* **2021**, *121*, 107745. [[CrossRef](#)]
35. da Silva, A.P.S.A.; Nascimento da Silva, L.C.; Martins da Fonseca, C.S.; de Araújo, J.M.; Correia, M.T.D.S.; Cavalcanti, M.d.S.; Lima, V.L.d.M. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Organic Extracts from *Cleome spinosa* Jacq. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Doran, G.; NiChulain, M.; DeLappe, N.; O'Hare, C.; Corbett-Feeney, G.; Cormican, M. Interpreting streptomycin susceptibility test results for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27*, 538–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. European Union, Regulation (EC). No. 1831/2003 of the European Parliament and the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Commun.* **2003**, *1*, 29.
38. El-Ashram, S.; Abdelhafez, G.A. Effects of phytogetic supplementation on productive performance of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* **2020**, *29*, 852–862. [[CrossRef](#)]
39. Kim, D.K.; Lillehoj, H.S.; Lee, S.H.; Jang, S.I.; Park, M.S.; Min, W.; Lillehoj, E.P.; Bravo, D. Immune effects of dietary anethole on *Eimeria acervulina* infection. *Poult. Sci.* **2013**, *92*, 2625–2634. [[CrossRef](#)]
40. Moharreri, M.; Vakili, R.; Oskoueian, E.; Rajabzadeh, G. Effects of microencapsulated essential oils on growth performance and biomarkers of inflammation in broiler chickens challenged with *salmonella enteritidis*. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2022**, *21*, 349–357. [[CrossRef](#)]

41. Ed-Dra, A.; Filali, F.R.; Lo Presti, V.; Zekkori, B.; Nalbone, L.; Bouymajane, A.; Trabelsi, N.; Lamberta, F.; Bentayeb, A.; Giuffrida, A.; et al. Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial action of five Moroccan essential oils against *Listeria monocytogenes* and different serotypes of *Salmonella enterica*. *Microb. Pathog.* **2020**, *149*, 104510. [[CrossRef](#)]
42. Kollanoor Johny, A.; Darre, M.J.; Donoghue, A.M.; Donoghue, D.J.; Venkitanarayanan, K. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on *Salmonella Enteritidis* and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents in vitro. 1Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee or warranty by the USDA and does not imply its approval to the exclusion of other products that are suitable. *J. Appl. Poult. Res.* **2010**, *19*, 237–244. [[CrossRef](#)]
43. Thanissery, R.; Kathariou, S.; Smith, D.P. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* in vitro. *J. Appl. Poult. Res.* **2014**, *23*, 221–227. [[CrossRef](#)]
44. Lu, Y.; Wu, C. Reductions of *Salmonella enterica* on chicken breast by thymol, acetic acid, sodium dodecyl sulfate or hydrogen peroxide combinations as compared to chlorine wash. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *152*, 31–34. [[CrossRef](#)]
45. Aljumaah, M.R.; Suliman, G.M.; Abdullatif, A.A.; Abudabos, A.M. Effects of phytobiotic feed additives on growth traits, blood biochemistry, and meat characteristics of broiler chickens exposed to *Salmonella typhimurium*. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 5744–5751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Pławińska-Czarnak, J.; Wódz, K.; Piechowicz, L.; Tokarska-Pietrzak, E.; Bełkot, Z.; Bogdan, J.; Wiśniewski, J.; Kwieciński, P.; Kwieciński, A.; Anusz, K. Wild Duck (*Anas platyrhynchos*) as a Source of Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* O58—The First Report in Poland. *Antibiotics* **2022**, *11*, 530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th ed.; CLSI Supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
48. Ramtahal, M.A.; Somboro, A.M.; Amoako, D.G.; Abia, A.L.K.; Perrett, K.; Bester, L.A.; Essack, S.Y. Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* in Poultry in South Africa Using the Farm-to-Fork Approach. *Int. J. Microbiol.* **2022**, *2022*, 5121273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Akinola, S.A.; Mwanza, M.; Ateba, C.N. Occurrence, Genetic Diversities And Antibiotic Resistance Profiles Of *Salmonella* Serovars Isolated From Chickens. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 3327–3342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kozak, G.K.; Boerlin, P.; Janecko, N.; Reid-Smith, R.J.; Jardine, C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 559–566. [[CrossRef](#)]

SUPPLEMENTARY MATERIALS

In vitro evaluation of antimicrobial effect of phytobiotics mixture on *Salmonella* spp. isolated from chicken broiler.

Hubert Iwiński^{1,5*}, Karolina Wódz², Karolina Chodkowska^{3,5}, Tomasz Nowak², Henryk Różański^{4,5},

¹ Department of Chemistry, The Faculty of Food Science, Wrocław University Of Environmental And Life Sciences, C.K. Norwida 25,50-375 Wrocław, Poland; hubert.iwinski@upwr.edu.pl (H.I.)

² Laboratory of Molecular Biology, Vet-Lab Brudzew, Turkowska 58c, 62-720 Brudzew, Poland; karolina.wodz@labbrudzew.pl (K.W.); tomasz@labbrudzew.pl (T.N.)

³ Krzyżanowski Partners Spółka z o.o., Zakładowa 7,26-670 Pionki, Poland; k.chodkowska@jkrzyzanowski.pl (K.Ch.)

⁴ Laboratory of Industrial and Experimental Biology, Institute for Health and Economics, Carpathian State College in Krosno, Rynek 1, 38-400 Krosno, Poland; rozanski@rozanski.ch (H.R.)

⁵ AdiFeed Sp. z o.o., Opaczewska 02-201 Warszawa

* Correspondence: hubert.iwinski@upwr.edu.pl

Table of content

Table S1. A summary of the results of biochemical reactions for the strain of <i>Salmonella</i> isolated from different samples.....	1
Figure S1. MIC evaluation of <i>S. Typhimurium</i>	3
Figure S2. MIC evaluation of <i>S. Enteritidis</i>	4
Figure S3. MIC evaluation of <i>S. Kentucky</i>	4
Figure S4. Negative control.....	5

Table S1. A summary of the results of biochemical reactions for the strain of *Salmonella* isolated from different samples.

REACTIONS/ENZYMES	VITEK2 <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> 1/2/3/4	VITEK2 <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> <i>Salmonella</i> <i>Kentucky</i> 1/2	VITEK2 <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> <i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i> 1/2/3/4/5/6
APPA	-/-/-/-	-/-	-/-/-/-/-/-
ADO	-/-/-/-	-/-	-/-/-/-/-/-
PyrA	+/-/-/-	-/-	-/-/-/-/+/-
IARL	-/-/-/-	-/-	-/-/-/-/-/-

dCEL	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
BGAL	+/-/-	+/+	-/-/-/-/+
H2S	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
BNAG	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
AGLTp	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
dGLU	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
GGT	+/+/-	-/-	+/+/-/-/+
OFF	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
BGLU	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
dMAL	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
dMAN	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
dMNE	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
BXYL	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
BAlap	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
ProA	+/-/-	-/-	+/-/-/-/-
LIP	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
PLE	-/+/-	-/-	-/-/-/-/-
TyrA	+/+/-	-/-	-/+/-/-/-
URE	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
dSOR	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
SAC	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
dTAG	+/+/+	-/-	+/+/+/+/-
dTRE	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
CIT	+/+/+	-/+	+/+/+/+/+
MNT	-/-/-	-/+	-/+/-/-/-
5KG	-/-	-/-	-/-/-/-/-
ILATk	+/-/-	-/-	-/-/-/-/-
AGLU	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
SUCT	+/-/-	-/-	-/-/-/-/+
NAGA	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
AGAL	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
PHOS	-/++/+	-/-	-/+/-/-/-
GlyA	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
ODC	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
LDC	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
IHISa	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
CMT	+/+/+	+/+	+/+/+/+/+
BGUR	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
O129R	+/-+/-	+/-	+/-/-/-/-
GGAA	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
IMLTa	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
ELLM	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-
ILATa	-/-/-	-/-	-/-/-/-/-

Common reaction for VITEK, API 20 E and Lab-made tests: BGAL/ONPG - beta-galactosidase, H2S - H2S production, dGLU/GLU - D-glucose, dMAN/MAN - D-mannitol, URE – urease, dSOR/SOR - D-sorbitol (not

includet Lab-made), SAC - saccharose/sucrose, CIT - citrate (sodium), ODC - ornithine decarboxylase (not includet Lab-made), LDC - lysine decarboxylase, **VITEK**: APPA - Ala-Phe-Pro-arylamidase, ADO – adonitol, PyrA - L-pyrrolydonyl-arylamidase, IARL - L-arabitol, dCEL - D-cellobiose, BNAG - beta-n-acetyl-glucosaminidase, AGLTp - Glutamyl Arylamidase pNA, GGT - gamma-glutamyl-transferase, OFF - fermentation/ glucose, BGLU - beta-glucosidase, dMAL - D-maltose, dMNE - D-mannose, BXYL - beta-xylosidase, BALap - beta-alanine arylamidase pNA, PrpA - L-Proline arylamidase, LIP – lipase, PLE – palatinose, TyrA - Tyrosine arylamidase, dTAG - D-tagatose, dTRE - D-trehalose, MNT – malonate, 5KG - 5-keto-d-gluconate, ILATk - L-lactate alkalisation, AGLU - alpha-glucosidase, SUCT - succinate alkalisation, NAGA - beta-N-acetyl-galactosaminidase, AGAL - alpha-galactosidase, PHOS – phosphatase, GlyA - glycine arylamidase, IHISa - L-histidine assimilation, CMT – coumarate, BGUR - beta-glucuronidase, O129R - O/129 resistance (comp.vibrio.), GGAA - Glu-Gly-Arg-arylamidase, IMLTa - L-malate assimilation, ELLM – ellman, ILATa - L-lactate assimilation **API 20E**: ADH - arginine dihydrolase, TDA - tryptophane deaminase, IND - indole production, VP - acetoin production (Voges Proskauer), GEL – gelatinase, INO – inositol, RHA – rhamnose, MEL – melibiose, AMY - amygdalin, ARA – arabinose

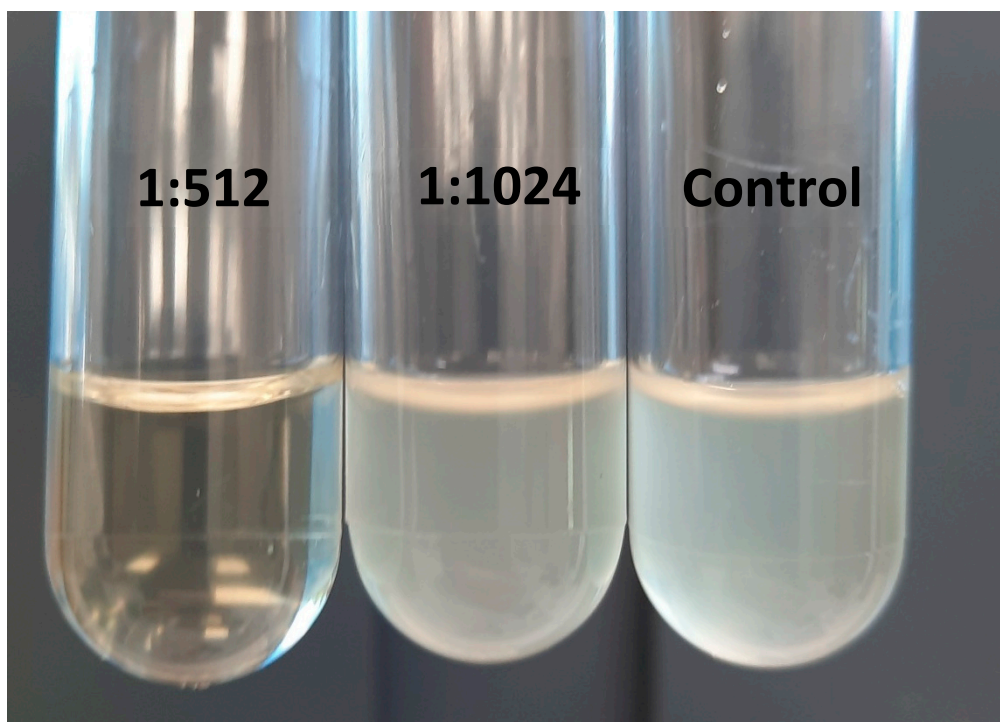


Figure S1. MIC evaluation of *S. Typhimurium*

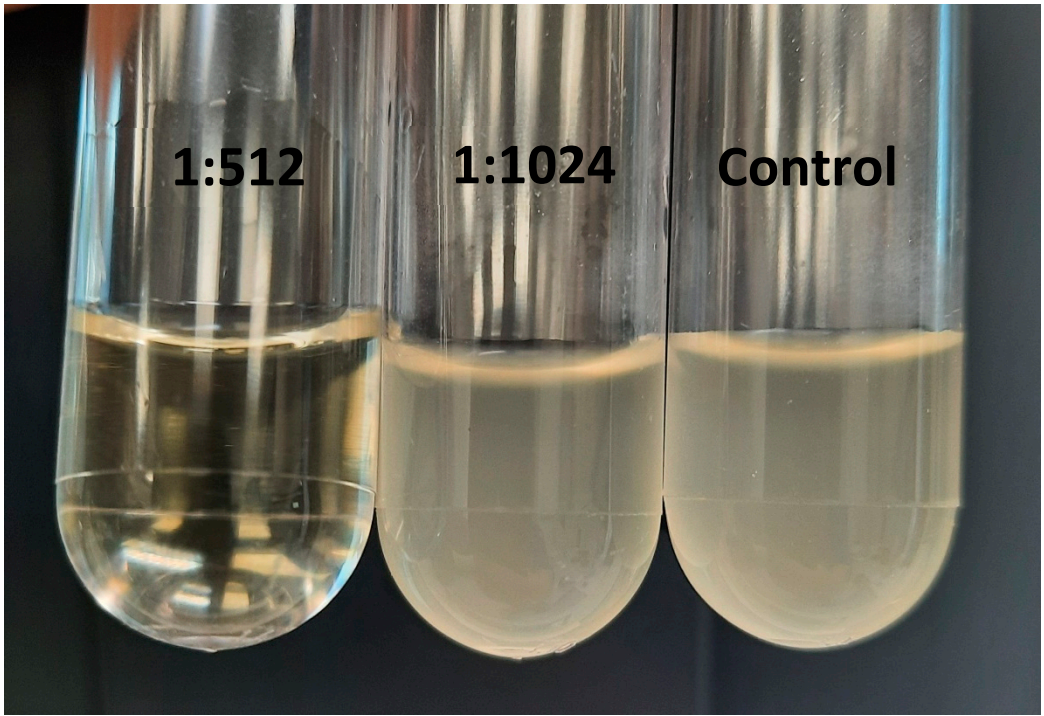


Figure S2. MIC evaluation of *S. Enteritidis*

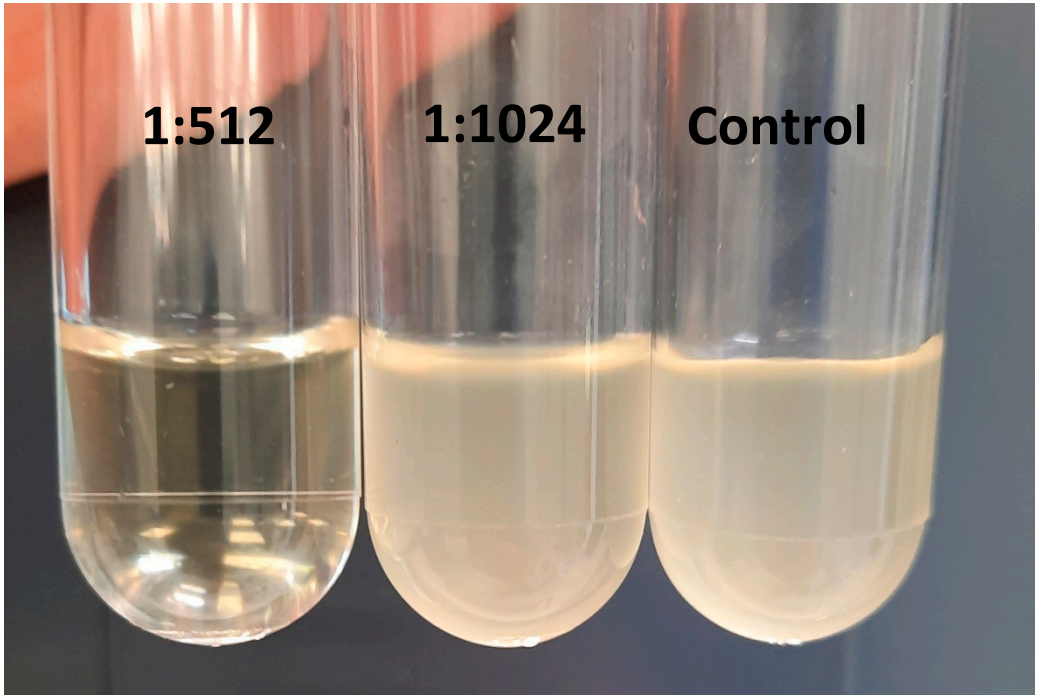


Figure S3. MIC evaluation of *S. Kentucky*

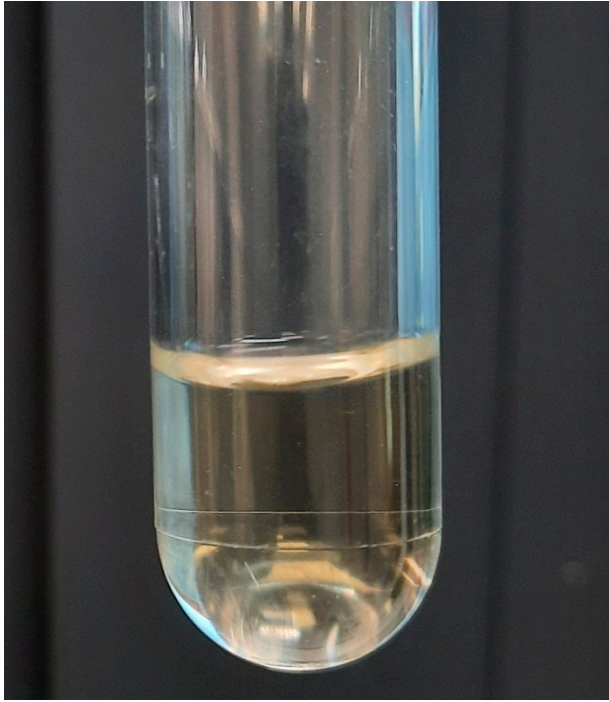


Figure S4. Negative control

3.3. Publikacja 3

TYTUŁ:

In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-oil Based Phytoncide Mixtures

AUTORZY:

Hubert Iwiński, Henryk Różański, Natalia Pachura, Aleksandra Wojciechowska,
Tomasz Gębarowski, Antoni Szumny





CZASOPISMO:

Molecules 2023, 28, 1395.

doi.org/10.3390/molecules28031395

Article

In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures

Hubert Iwiński ^{1,2,*} , Henryk Róžański ^{2,3,*}, Natalia Pachura ¹ , Aleksandra Wojciechowska ⁴, Tomasz Gębarowski ⁵  and Antoni Szumny ¹ 

¹ Department of Food Chemistry and Biocatalysis, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-375 Wrocław, Poland

² AdiFeed Sp. z o.o., Opaczewska, 02-201 Warsaw, Poland

³ Laboratory of Industrial and Experimental Biology, Institute for Health and Economics, Carpathian State College in Krosno, 38-400 Krosno, Poland

⁴ Independent Scholar, 02-201 Warsaw, Poland

⁵ Department of Biostructure and Animal Physiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-375 Wrocław, Poland

* Correspondence: hubert.iwinski@upwr.edu.pl (H.I.); rozanski@rozanski.ch (H.R.); Tel.: +48-507-135-305 (H.I.)

Abstract: Protozoa, in both humans and animals, are one of the leading causes of disease. International programmes introduced in many countries have helped reduce the incidence of disease. However, it has recently become increasingly difficult to achieve the goals set for the coming years. One of the main reasons for this, as with other pathogenic organisms, such as bacteria and fungi, is the increasing resistance to current methods of treating and preventing infection. Therefore, new therapies with high efficacy are needed. In the present study, the novel mixtures of essential oils (EOs), clove, garlic, Ceylon cinnamon, and rosemary with organic acids (acetic, propionic, lactic) and metal ions (Cu, Mn, Zn) were tested against five selected model protozoa (*Euglena gracilis*, *Gregarina blattarum*, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum*, *Pentatrichomonas hominis*). The cytotoxicity and potential anticancer activity of the obtained combinations were tested on the human fibroblasts (NHDF) and human cancer cell lines (A549, MCF7, LoVo, HT29). All of the mixtures showed very good antiprotozoal properties. The most efficient were the combination of clove and rosemary essential oils, mixtures of acids, and Mn ions. The LD₅₀ values were in the range of 0.001–0.006% and the LD₁₀₀ values were 0.002–0.008%. All of the tested mixtures did not show cytotoxicity against normal cells, but did show growth inhibition against cancer cell lines. The most cytotoxic against cancer cells were combinations with cinnamon essential oil. Nevertheless, the proposed combinations containing essential oils, organic acids, and metal ions have high antiprotozoal activity, with low toxicity to healthy human cells.

Keywords: phytoncides; antiprotozoal; cytotoxicity; essential oils; LD₅₀; NMR; GC-MS; antiparasitic activity; anticancer



Citation: Iwiński, H.; Róžański, H.; Pachura, N.; Wojciechowska, A.; Gębarowski, T.; Szumny, A. In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. *Molecules* **2023**, *28*, 1395. <https://doi.org/10.3390/molecules28031395>

Academic Editor: Riccardo Petrelli

Received: 1 January 2023

Revised: 25 January 2023

Accepted: 25 January 2023

Published: 1 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Protozoa-caused diseases are a significant problem that affect millions of people around the world, directly and indirectly. The most spread and deadliest are malaria, babesiosis, human African trypanosomiasis Chagas disease and toxoplasmosis. In 2021, malaria caused 619,000 deaths globally, 95% of which were in 29 countries [1]. COVID-19, the pandemic spread all over the world, caused a long period of isolation in many countries, and between December 2019 and January 2023, caused more than 6.7 million deaths globally [2]. Diseases caused by protozoa are also a challenge in animal husbandry, such as broiler chickens, laying hens or swine, at every stage of life. Each year, there are

more than 14 billion-USD losses in the broiler chicken industry alone [3–5]. Moreover, some protozoa can be transmitted from animals to humans. These zoonotic diseases cause a more significant problem [5,6].

The existing methods used for protozoa control and prevention are becoming ineffective. This is due to their increasing resistance to the chemotherapeutics used [7,8]. One of the main reasons is the overuse and misuse of antibiotics, both in animal production and in medicine. Another very important element is the use of preventive chemotherapy. With preventive therapy, it is possible to control the development of a pathogen and, thus, its spread. Unfortunately, this also has negative consequences. Continuous exposure of the microorganism to chemotherapeutics can lead to a more rapid development of resistance [7]. For example, in recent years, *Plasmodium falciparum* has had a narrative resistance of *Plasmodium falciparum* to artemisinin derivatives and almost complete resistance to quinolones [9]. Today, the most effective form of treatment is the so-called ‘combination therapies’, or “combination drug”, which involves merging two or more substances to achieve a synergistic effect [10,11]. In the case of *Plasmodium falciparum*, these include artemether-lumefantrine, artesunate-mefloquine or artesunate-pyronaridine [12]. Other examples of combination drugs used against *Trypanosoma brucei* are temozolomide-eflornithine and temozolomide-melarsoprol [10]. The most common combinations are of the available and used active ingredients used for certain diseases. This is due to the potentially shorter time needed to obtain marketing authorisation for a drug containing active pharmaceutical ingredients (APIs) that are already present on the market.

Promising results have been obtained with substances of plant origin. Essential oils, alkaloids or saponins, among others, have been shown to have very potent effects [13–16].

As shown in the WHO’s data and scientific publications, such combinations are an effective alternative, but it should be noted that they can exhibit cytotoxic properties [17].

Many essential oils are currently the subject of research by scientists due to their anticancer properties. Research is being conducted not only on essential oils, but also on the compounds found in them, such as carvacrol, eugenol, linalool and citral. The analyses carried out prove the effectiveness of the use of preparations containing essential oils or active compounds of them [18–22]. The mode of action is not known for all essential oils. However, the properties are the result of necrosis, apoptosis, the lack of the proper functioning of cell organelles, the inhibition of angiogenesis, or cell cycle arrest. These mechanisms are primarily a consequence of their cytotoxicity and the increased permeability of the cell membrane. However, it could also be based on a change in the concentration gradient between the environment and the cell; reduced ATP production or decreased mitochondrial potential may also be responsible for their anticancer properties [23–25]. The importance of studying the properties and cytotoxicity of plant-derived products is shown by the example of *Acorus calamus*. In the 1980s, the Food and Drug Administration (FDA) banned the use of calamus in food due to its β -asarone content and potential carcinogenic effects [26]. However, as studies on calamus products and β -asarone show, it may have just the opposite properties and exhibit anticancer effects [27–30]. Furthermore, the combination of essential oils with metal ions or current anticancer therapies may prove to be a much better solution, not only because it is more effective, but also because it reduces the negative consequences of the current treatment or its cytotoxicity towards healthy cells [23,31,32].

The aim of the present study was to determine the activity of mixtures containing essential oil (clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry), garlic (*Allium sativum* L.), cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) or rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)) with metal ions (Zn, Cu and Mn) and organic acids (acetic, propionic and lactic). Due to the fact that the proposed phytoncidal mixtures could be used in practice, e.g., in animal breeding, we decided to carry out, in addition to the main antiprotozoal activity, an evaluation of their safety and cytotoxic activity. The proposed mixtures are novel, and there is no indication of any predictable effect on cell lines. Potential cytotoxic activity against healthy human cell lines would be limiting to their practical use. We chose cytotoxicity assays toward human

epithelial fibroblasts and several human cancer cell lines as a widely used model.

2. Results

2.1. Activity against Selected Protozoa

The LD₅₀ and LD₁₀₀ values of 48 different combinations were determined against the selected protozoa. Each composition is shown in the Table 1. Two common antibiotics, chloramphenicol and metronidazole, were used as reference substances. The essential oils used in the study, without organic acid or mineral salts, showed very promising results in some of the analyses, comparable to the effectiveness of antibiotics. The most promising and strongest antiprotozoal activity was obtained for clove oil. However, the other essential oils also showed potential for further research.

Table 1. Combinations obtained during the research.

Essential Oil	Acetic Acid (A)			Propionic Acid (P)			Lactic Acid (L)			Mixture of Acids (M)		
	Cu	Mn	Zn	Cu	Mn	Zn	Cu	Mn	Zn	Cu	Mn	Zn
Clove (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. and Perry) (S)	SACu	SAMn	SAZn	SPCu	SPMn	SPZn	SLCu	SLMn	SLZn	SMCu	SMMn	SMZn
Garlic (<i>Allium sativum</i> L.) (G)	GACu	GAMn	GAZn	GPCu	GPMn	GPZn	GLCu	GLMn	GLZn	GMCu	GMMn	GMZn
Ceylon cinnamon (<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl) (C)	CACu	CAMn	CAZn	CPCu	CPMn	CPZn	CLCu	CLMn	CLZn	CMCu	CMMn	CMZn
Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) (R)	RACu	RAMn	RAZn	RPCu	RPMn	RPZn	RLCu	RLMn	RLZn	RMCu	RMMn	RMZn

The mixtures containing an essential oil, a single acid and a metal ion were characterized by significantly better antiprotozoal efficacy than essential oils alone. As can be observed, the effective antiprotozoal concentration was much lower than LD₅₀ and LD₁₀₀ for the pure essential oils. What is more important, they were lower than LD₅₀ and LD₁₀₀ values obtained for the antibiotics used as a reference substances. This fact can be observed regardless of the essential oil. In compositions containing essential oil, metal ions and a single organic acid, as in the case of a single essential oil, the strongest antiprotozoal properties were shown by all of the combinations containing clove essential oil. For LD₅₀, it was 0.01–0.02%, while LD₁₀₀ was 0.015–0.03%. However, for the other essential oils and their combinations with acids, the LD₅₀ and LD₁₀₀ values were 0.01–0.05% and 0.02–0.07%, respectively. Combinations containing garlic, cinnamon and rosemary oils, in contrast to the clove essential oil mixtures, showed relatively weak antiprotozoal activity against *Pentatrichomonas hominis*. The best antiprotozoal properties against all of the tested organisms were observed for combinations with lactic acid and Mn ions, for all of the essential oils used.

However, regardless of the essential oil used, the best results were obtained for the composition containing a mixture of organic acids. The combinations that presented the most powerful antiprotozoal properties were those that included clove essential oil. The LD₅₀ and LD₁₀₀ values for the SMMn and SMZn were in the range of 0.001–0.003% and 0.002–0.005%, respectively. The SMCu mixture shows slightly weaker properties, with LD₅₀: 0.001–0.004% and LD₁₀₀: 0.003–0.006%. Very good antiprotozoal activity was shown in all three combinations with rosemary essential oil (RMCu, RMMn and RMZn). The LD₅₀ values were very promising (0.001–0.003%); however, further tests showed that to reach LD₁₀₀ values, much more concentrated solutions were needed (0.004–0.009%). The remaining essential oils obtained results that were not as promising as the previous two; nevertheless, they also showed very good antiprotozoal activity, higher than that of the antibiotics currently used. Two combinations containing manganese ions (GMMn and CMMn) showed the lowest LD₅₀ and LD₁₀₀ values for garlic and cinnamon essential oils. All of the results are presented in Tables 2–9.

Table 2. LD₅₀, LD₁₀₀ values [%] of clove essential oil (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) and the components used in the study.

Protozoa	CH ^a	M ^b	Acetic Acid	Propionic Acid	Lactic Acid	Mixture of Acids ^c	MnCl ₂ Solution ^d	CH ₂ Cu ₂ O ₅ Solution ^e	ZnCO ₃ Solution ^f	Catalyst Solution ^g	Clove Essential Oil (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. and Perry)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.09	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.9	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.9	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.7	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.1	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.3
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.4 LD ₁₀₀ : 0.7	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.7 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.07 LD ₁₀₀ : 0.15	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.4	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.3
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.14	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2

^a—chloramphenicol, ^b—metronidazole, ^c—in rate 1:1:1, ^d—Manganese (II) chloride 10% solution, ^e—Copper (II) carbonate hydroxide 10% solution, ^f—Zinc carbonate 10% solution, ^g—5% solution, n.t—not tested.

Table 3. LD₅₀, LD₁₀₀ values [%], for the tested mixtures of clove essential oil (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) (S), organic acids (Acetic acid—A, Propionic acid—P, Lactic acid—L, Mixture of acids—M) and metal ion against selected protozoa.

Protozoa	Clove Essential Oil (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. and Perry)												
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a			
	Cu ^b		Mn ^c	Cu ^b		Mn ^c	Cu ^b		Mn ^c	Cu ^b		Mn ^c	Zn ^d
	SACu	SAMn	SAZn	SPCu	SPMn	SPZn	SLCu	SLMn	SLZn	SMCu	SMMn	SMZn	
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.003	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.005	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.002	
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.015	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.025	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.004	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.003	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.005	
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.015	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.015	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.004	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.002	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.004	
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.025	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.004	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.005	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.005	
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.004 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.005	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.004	

^a—in rate 1:1:1, ^b—10% solution, ^c—10% solution, ^d—10% solution, SACu, SAMn, SAZn—Clove essential oil (S) with acetic acid (A) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; SPCu, SPMn, SPZn—Clove essential oil (S) with propionic acid (P) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; SLCu, SLMn, SLZn—Clove essential oil (S) with lactic acid (L) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; SMCu, SMMn, SMZn—Clove essential oil (S) with mixture of acids (M) and Cu, Mn, Zn ions, respectively.

Table 4. LD₅₀, LD₁₀₀ values [%] of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) and the components used in the study.

Protozoa	CH ^a	M ^b	Acetic Acid	Propionic Acid	Lactic Acid	Mixture of Acids ^c	MnCl ₂ Solution ^d	CH ₂ Cu ₂ O ₅ Solution ^e	ZnCO ₃ Solution ^f	Catalyst Solution ^g	Garlic Essential Oil (<i>Allium sativum</i> L.)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.09	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.9	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.7	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.1	LD ₅₀ : 0.4 LD ₁₀₀ : 0.7
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.4 LD ₁₀₀ : 0.7	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.7 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.7
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.07 LD ₁₀₀ : 0.15	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.4	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.4 LD ₁₀₀ : 0.6
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.7
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.14	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 0.8

^a—chloramphenicol, ^b—metronidazole, ^c—in rate 1:1:1, ^d—Manganese (II) chloride 10% solution, ^e—Copper (II) carbonate hydroxide 10% solution, ^f—Zinc carbonate 10% solution, ^g—5% solution, n.t—not tested.

Table 5. LD₅₀, LD₁₀₀ values [%] for the tested mixtures of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) (G), organic acids (Acetic acid—A, Propionic acid—P, Lactic acid—L, Mixture of acids—M) and metal ion against selected protozoa.

Protozoa	Garlic Essential Oil (<i>Allium sativum</i> L.) (G)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	GACu	GAMn	GAZn	GPCu	GPMn	GPZn	GLCu	GLMn	GLZn	GMCu	GMMn	GMZn
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.005 LD ₁₀₀ : 0.007	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.005	LD ₅₀ : 0.004 LD ₁₀₀ : 0.006
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.005	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.006
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.004 LD ₁₀₀ : 0.005	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.003	LD ₅₀ : 0.004 LD ₁₀₀ : 0.006
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.004 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.004	LD ₅₀ : 0.004 LD ₁₀₀ : 0.007
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.065	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.07	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.004

^a—in rate 1:1:1, ^b—10% solution, ^c—10% solution, ^d—10% solution, GACu, GAMn, GAZn—Garlic essential oil (G) with acetic acid (A) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; GPCu, GPMn, GPZn—Garlic essential oil (G) with propionic acid (P) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; GLCu, GLMn, GLZn—Garlic essential oil (G) with lactic acid (L) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; GMCu, GMMn, GMZn—Garlic essential oil (G) with mixture of acids (M) and Cu, Mn, Zn ions, respectively.

Table 6. LD₅₀, LD₁₀₀ values [%] of Ceylon cinnamon essential oil (*Cinnamomum verum* J. Presl) and the components used in the study.

Protozoa	CH ^a	M ^b	Acetic Acid	Propionic Acid	Lactic Acid	Mixture of Acids ^c	MnCl ₂ Solution ^d	CH ₂ Cu ₂ O ₅ Solution ^e	ZnCO ₃ Solution ^f	Catalyst Solution ^g	Ceylon Cinnamon Essential Oil (<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.09	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.9	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.7	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.1	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.3
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.4 LD ₁₀₀ : 0.7	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.7 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.35
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.07 LD ₁₀₀ : 0.15	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.4	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.6
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.45
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.14	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.7

^a—chloramphenicol, ^b—metronidazole, ^c—in rate 1:1:1, ^d—Manganese (II) chloride 10% solution, ^e—Copper (II) carbonate hydroxide 10% solution, ^f—Zinc carbonate 10% solution, ^g—5% solution, n.t—not tested.

Table 7. LD₅₀, LD₁₀₀ values [%] for the tested mixtures of Ceylon cinnamon essential oil (*Cinnamomum verum* J. Presl) (C), organic acids (Acetic acid—A, Propionic acid—P, Lactic acid—L, Mixture of acids—M) and metal ion against selected protozoa.

Protozoa	Ceylon Cinnamon Essential Oil (<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl) (C)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	CACu	CAMn	CAZn	CPCu	CPMn	CPZn	CLCu	CLMn	CLZn	CMCu	CMMn	CMZn
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.005 LD ₁₀₀ : 0.007	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.003	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.006
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.035	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.005 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.005
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.055	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ : 0.005	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.003	LD ₅₀ : 0.004 LD ₁₀₀ : 0.006
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.045	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ : 0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ : 0.02	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.004	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : 0.004 LD ₁₀₀ : 0.007
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0.06 LD ₁₀₀ : 0.07	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.065	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.055	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.07	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.06	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ : 0.05	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ : 0.055

^a—in rate 1:1:1, ^b—10% solution, ^c—10% solution, ^d—10% solution, CACu, CAMn, CAZn—Ceylon cinnamon essential oil (C) with acetic acid (A) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; CPCu, CPMn, CPZn—Ceylon cinnamon essential oil (C) with propionic acid (P) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; CLCu, CLMn, CLZn—Ceylon cinnamon essential oil (C) with lactic acid (L) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; CMCu, CMMn, CMZn—Ceylon cinnamon essential oil (C) with mixture of acids (M) and Cu, Mn, Zn ions, respectively.

Table 8. LD₅₀, LD₁₀₀ values [%] of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and the components used in the study.

Protozoa	CH ^a	M ^b	Acetic Acid	Propionic Acid	Lactic Acid	Mixture of Acids ^c	MnCl ₂ Solution ^d	CH ₂ Cu ₂ O ₅ Solution ^e	ZnCO ₃ Solution ^f	Catalyst Solution ^g	Rosemary Essential Oil (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.09	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.9	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.7	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 0.1	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.6
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.4 LD ₁₀₀ : 0.7	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.7 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.4
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.07 LD ₁₀₀ : 0.15	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.6 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.4	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.2	LD ₅₀ : 0.5 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ : 0.006	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.2	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.5
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : n.t LD ₁₀₀ : n.t	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ : 0.14	LD ₅₀ : 1.0 LD ₁₀₀ : 1.5	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.3	LD ₅₀ : 0.8 LD ₁₀₀ : 1.0	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.1 LD ₁₀₀ : 0.3	LD ₅₀ : 0.2 LD ₁₀₀ : 0.4	LD ₅₀ : 0.9 LD ₁₀₀ : 1.1	LD ₅₀ : 0.3 LD ₁₀₀ : 0.55

^a—chloramphenicol, ^b—metronidazole, ^c—in rate 1:1:1, ^d—Manganese (II) chloride 10% solution, ^e—Copper (II) carbonate hydroxide 10% solution, ^f—Zinc carbonate 10% solution, ^g—5% solution, n.t—not tested.

Table 9. LD₅₀, LD₁₀₀ values [%] for the tested mixtures of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.), organic acids (Acetic acid—A, Propionic acid—P, Lactic acid—L, Mixture of acids—M) and metal ion against selected protozoa.

Protozoa	Rosemary Essential Oil (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)											
	Acetic Acid			Propionic Acid			Lactic Acid			Mixture of Acids ^a		
	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d	Cu ^b	Mn ^c	Zn ^d
	RACu	RAMn	RAZn	RPCu	RPMn	RPZn	RLCu	RLMn	RLZn	RMCu	RMMn	RMZn
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.06	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.045	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ :0.005	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ :0.004	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ :0.004
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ :0.02	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ :0.004	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ :0.003	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ :0.005
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ :0.004	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ :0.005	LD ₅₀ : 0.003 LD ₁₀₀ :0.004
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.01 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.02 LD ₁₀₀ :0.03	LD ₅₀ : 0.001 LD ₁₀₀ :0.004	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ :0.005	LD ₅₀ : 0.002 LD ₁₀₀ :0.005
<i>Pentatrichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.05 LD ₁₀₀ :0.055	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ :0.06	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.04 LD ₁₀₀ :0.05	LD ₅₀ : 0.03 LD ₁₀₀ :0.04	LD ₅₀ : 0.007 LD ₁₀₀ :0.009	LD ₅₀ : 0.006 LD ₁₀₀ :0.008	LD ₅₀ : 0.005 LD ₁₀₀ :0.008

^a—in rate 1:1:1, ^b—10% solution, ^c—10% solution, ^d—10% solution, RACu, RAMn, RAZn—Rosemary essential oil (R) with acetic acid (A) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; RPCu, RPMn, RPZn—Rosemary essential oil (R) with propionic acid (P) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; RLCu, RLMn, RLZn—Rosemary essential oil (R) with lactic acid (L) and Cu, Mn, Zn ions, respectively; RMCu, RMMn, RMZn—Rosemary essential oil (R) with mixture of acids (M) and Cu, Mn, Zn ions, respectively.

2.2. Compositions Analysis (GC-MS)

Tables 10 and 11 show that the compositions contained typical compounds for clove and garlic essential oils compared to the retention indices from the Adams and NIST databases. Table 12 presents the results of NMR (^1H and ^{13}C) analyses. Composition of Ceylon cinnamon and rosemary essential oils are presented in Tables 13 and 14.

2.2.1. Clove Essential Oil

Two of the essential oils used, clove and cinnamon, were characterized by a relatively high dominance of one main compound in the composition. In the case of the clove bud essential oil, eugenol accounted for more than 70% of the content. This composition was complemented by caryophyllene (14%) eugenyl acetate (9.1%) and humulene (3.4%).

Table 10. GC-MS profile of clove essential oil.

No.	Peak Name	KI Exp. ¹	KI Adams ²	KI NIST ³	CAS ⁴	Content [%] ⁵	Identification
1	Chavicol	1258		1255	501-92-8	0.03	S, MS, KI
2	Eugenol	1364	1359	1357	97-53-0	71.45	S, MS, KI
3	α -Copaene	1379	1375	1376	3856-25-5	0.10	MS, KI
4	<i>trans</i> -Caryophyllene	1423	1419	1419	13877-93-5	14.08	S, MS, KI
5	α -Humulene	1457	1454	1454	6753-98-6	3.45	S, MS, KI
6	Zonarene	1527	1529	1527	41929-05-9	0.53	MS, KI
7	Eugenyl acetate	1532		1524	93-28-7	9.11	S, MS, KI
8	Unknown	1557				0.29	-
9	Caryophyllene oxide	1587	1583	1581	1139-30-6	0.96	S, MS, KI

¹ Experimental retention indices calculated against n-alkanes. ² Retention indices according to the Adams database. ³ Retention indices according to the NIST20 database. ⁴ Chemical Abstracts Service. ⁵ % calculated from Total Ion Chromatogram (TIC). The MS spectrum is presented as S1; Identification based on: S—standard compound available; MS—mass spectrum; KI—Kovats indices.

2.2.2. Garlic Essential Oil

The garlic essential oil did not contain a single main compound and its composition of individual molecules are relatively evenly distributed among several of them. It contained the vast majority of allicin derivatives. These were, respectively, diallyl disulphide (30.7%), diallyl trisulfide (25%) and diallyl tetrasulfide (14.5%).

Although there are many publications that describe the composition of essential oils extracted from garlic by gas chromatography, there are many doubts about the actual accuracy of such a measurement [33]. The thermal degradation of diallyl disulphides at about 150 °C (CG condition) to mono-, tri-, and terta-disulphides, as well as their rearrangement to heterocyclic thiopyranes, trithiolane or tetrathianes, has been demonstrated [34,35]. We decided to carry out a comparative analysis of garlic EO, using the mildest method, which was nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). This technique does not require exposure to high temperatures and allows for the unambiguous determination of the presence of mono- and oligothio-derivatives of diallyl compounds. The methylene group of the allyl fragment was very well separated on the ^1H NMR spectrum in the 3.1 to 3.65 ppm region. The ^{13}C , as well as the correlative spectra, confirmed the unequivocal identification of the compounds. We obtained different values from those presented in Table 12 for the proportion of diallyl derivatives. As a predominate, we found diallyl disulphide, which was presented in nearly 50% of the EO. Tri- and hexa-allyl disulfides were the next compounds present in the mix, which were higher than 10%. Contrary to the GC-MS profile, diallyl tetrasulfide was detected bellow the quantification limit. The share of the latter compound in the chromatographic analysis was as high as 14%. As there are no reports describing the chemical shifts of diallyl heptasulphide, we assumed the presence

of this compound in the EO. Additionally, there are no EI-MS spectra or RI values in the NIST databases. NMR spectra's are presented at Figures 1 and 2.

Table 11. GC-MS profile of garlic essential oil.

No.	Peak Name	KI Exp. ¹	KI NIST ²	CAS ³	Content [%] ⁴
1	Diallyl sulfide	860	861	592-88-1	2.62
2	Disulfide, methyl 2-propenyl	923	920	2179-58-0	0.6
3	3H-1,2-Dithiole	949	952	288-26-6	0.9
4	Diallyl disulphide	1081	1081	2444-49-7	35.2
5	Trisulfide, methyl 2-propenyl	1140	1142	34135-85-8	1.18
6	4-Methyl-1,2,3-trithiolane	1154	1154	116664-29-0	6.21
7	4H-1,2,3-Trithiine	1202	1202	290-30-2	0.25
8	Trisulfide, di-2-propenyl	1300	1297	2050-87-5	28.75
9	5-Methyl-1,2,3,4-tetrathiane	1364	1364	116664-30-3	3.72
10	1-(1-(Methylthio)propyl)-2-propyl-disulfane	1440	1431	126876-22-0	0.53
11	Diallyl tetrasulfide	1542	1540	2444-49-7	16.59
12	Disulfide, 1-(1-propenylthio)propyl propyl	1585	1592	143193-11-7	0.66
13	1-Allyl-2-(1-(allylthio)propan-2-yl)disulfane	1594	1597	116664-22-3	1.54
14	1,2,3,5-Tetrathiane, 4,6-diethyl-, trans-	1641	1640	137363-93-0	1.25

¹ Experimental retention indices calculated against n-alkanes. ² Retention indices according to the NIST20 database. ³ Chemical Abstracts Service. ⁴ % calculated from Total Ion Chromatogram (TIC). All compounds were identified on the basis of mass spectra.

Table 12. Composition of garlic EO according to ¹H analysis.

	Percentage ^a	¹ H Multiplet (ppm)	¹³ C (ppm)	Reference
DA monosulphide	8.8	3.12 (dt, $J = 7.1, 1.1$ Hz, 2H)	33.35	[34]
DA disulphide	49.0	3.36 (dt, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 2H)	42.33	[35]
DA trisulphide	24.5	3.53 (dt, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 2H)	42.12	[35]
DA tetrasulphide	- ^b	3.58 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H)	-	[35]
DA pentasulphide	2.9	3.36 (dt, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 2H)	42.50	[35]
DA hexasulphide	11.8	3.61 (dt, $J = 7.3, 1.0$ Hz, 2H)	42.47	[35]
DA heptasulphide ^c	2.9	3.64 (dt, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 2H)	42.62	-

^a according to ¹H methylene group integration; ^b below limit of quantification; ^c tentatively identified.

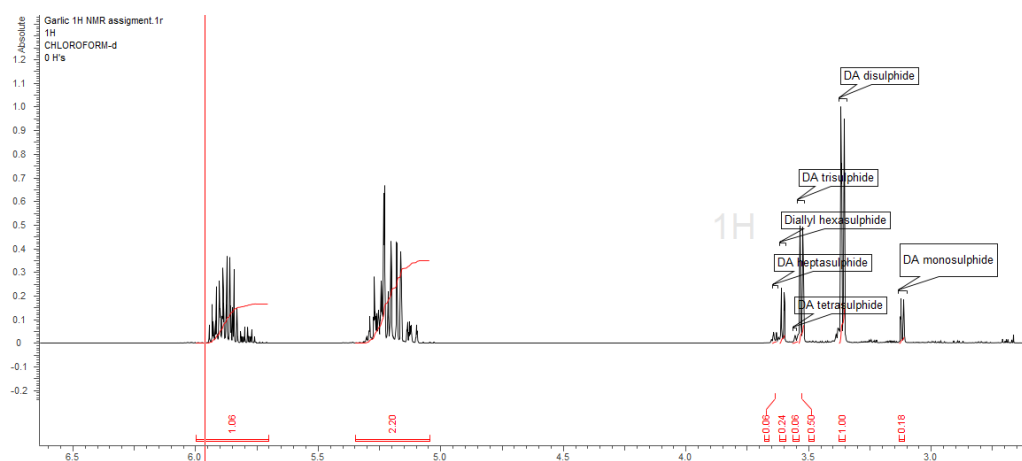


Figure 1. Garlic essential oil ¹H NMR spectrum.

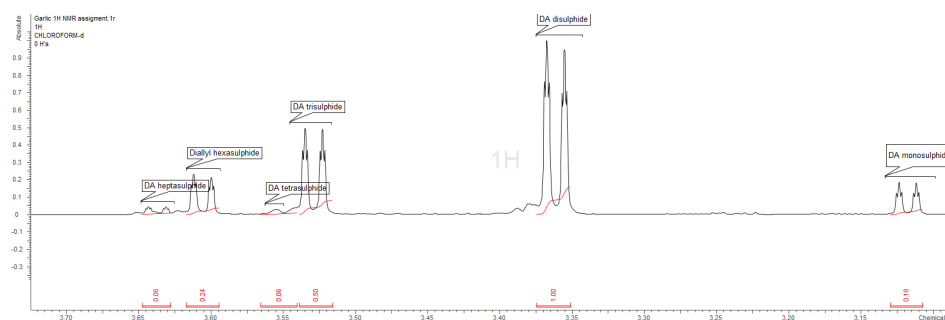


Figure 2. Fragment of garlic essential oil ^1H NMR spectrum.

2.2.3. Ceylon Cinnamon Essential Oil

In the case of the second essential oil, cinnamon, its main component was *trans*-cinnamaldehyde (54.7%). Other compounds with the highest contribution were linalool (5.5%), cinnamyl acetate (4.3%) and *trans*-caryophyllene (4.1%).

Table 13. GC-MS profile of Ceylon cinnamon essential oil.

No.	Peak Name	KI Exp. ¹	KI Adams ²	KI NIST ³	CAS ⁴	Content [%] ⁵	Identification
1	α -Pinene	939	939	937	80-56-8	1.44	S, MS, KI
2	Benzaldehyde	966	960	962	100-52-7	0.88	S, MS, KI
3	β -Pinene	980	979	979	127-91-3	0.68	S, MS, KI
4	<i>p</i> -Cymene	1028	1024	1025	99-87-6	2.23	S, MS, KI
5	Limonene	1032	1029	1030	138-86-3	0.68	S, MS, KI
6	Eucalyptol	1035	1031	1034	470-82-6	3.49	S, MS, KI
7	γ -Terpinene	1063	1059	1060	99-85-4	1.83	S, MS, KI
8	Terpinolene	1090	1088	1088	586-62-9	0.87	S, MS, KI
9	Linalool	1100	1090	1099	78-70-6	5.50	S, MS, KI
10	Phenethyl alcohol	1116		1116	60-12-8	1.26	S, MS, KI
11	Terpinen-4-ol	1180	1177	1177	562-74-3	0.71	S, MS, KI
12	α -Terpineol	1192	1188	1189	98-55-5	2.94	S, MS, KI
13	γ -Terpineol	1198	1199	1197	586-81-2	0.21	S, MS, KI
14	<i>cis</i> -Cinnamaldehyde	1224	1219	1219	57194-69-1	0.22	S, MS, KI
15	Geraniol	1259	1252	1255	106-24-1	0.58	S, MS, KI
16	2-Phenethyl acetate	1261		1258	103-45-7	1.42	S, MS, KI
17	<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	1277	1270	1270	14371-10-9	54.70	S, MS, KI
18	<i>trans</i> -Anethole	1289	1284	1284	104-46-1	2.44	S, MS, KI
19	<i>trans</i> -Cinnamyl alcohol	1308	1304	1312	4407-36-7	0.44	S, MS, KI
20	Limonenal	1329	1326		6784-13-0	0.16	MS, KI
21	α -Terpinyl acetate	1353	1349	1350	80-26-2	1.66	S, MS, KI
22	α -Longipinene	1355	1352	1353	5989-08-2	0.15	MS, KI
23	Eugenol	1362	1359	1357	97-53-0	3.20	S, MS, KI
24	α -Copaene	1379	1376	1376	3856-25-5	1.37	S, MS, KI
25	<i>trans</i> -Caryophyllene	1422	1419	1419	87-44-5	4.14	S, MS, KI
26	α - <i>trans</i> -Bergamotene	1439	1432	1435	13474-59-4	0.57	S, MS, KI
27	<i>trans</i> -Cinnamyl acetate	1449	1446	1446	21040-45-9	4.27	MS, KI
28	α -Humulene	1457	1454	1454	6753-98-6	0.23	S, MS, KI
29	Chavibetol acetate	1532	1525		61499-22-7	0.17	MS, KI
30	γ - <i>trans</i> -Bisabolene	1546	1531	1533	70286-32-7	0.24	MS, KI
31	Caryophyllene oxide	1587	1583	1581	1139-30-6	0.18	S, MS, KI
32	Benzyl benzoate	1769	1760	1762	120-51-4	1.14	S, MS, KI

¹ Experimental retention indices calculated against n-alkanes. ² Retention indices according to the Adams database. ³ Retention indices according to the NIST20 database. ⁴ Chemical Abstracts Service. ⁵ % calculated from Total Ion Chromatogram (TIC). Identification based on: S—standard compound available; MS—mass spectrum; KI—Kovats indices.

2.2.4. Rosemary Essential Oil

The rosemary essential oil was characterized by the presence of four main compounds, accounting for more than 70% of its composition. Unfortunately, the relative proximity of the peaks resulting from the KI values (1032 and 1035) for limonene and eucalyptol, respectively, prevented their effective separation and verification of their intrinsic validity. However, collectively, they account for 47.9% of the composition of the essential oil of rosemary. Other constituents included in the composition of this essential oil were α -pinene (13.1%) and camphor (11.75%).

Table 14. GC-MS profile of rosemary essential oil.

No.	Peak Name	KI Exp. ¹	KI Adams ²	KI NIST ³	CAS ⁴	Content [%] ⁵	Identification
1	Tricyclene	926		925	508-32-7	0.13	S, MS, KI
2	α -Thujene	932	930	929	2867-05-2	0.15	S, MS, KI
3	α -Pinene	939	939	937	80-56-8	13.09	S, MS, KI
4	Camphene	954	954	952	79-92-5	5.09	S, MS, KI
5	Benzaldehyde	960	960	962	100-52-7	0.00	S, MS, KI
6	Sabinene	977	975	974	3387-41-5	0.01	S, MS, KI
7	β -Pinene	980	979	979	127-91-3	6.51	S, MS, KI
8	β -Myrcene	993	990	991	123-35-3	1.07	S, MS, KI
9	α -Fellandrene	1006	1002	1005	99-83-2	0.17	S, MS, KI
10	3-Carene	1013	1011	1011	13466-78-9	0.03	S, MS, KI
11	α -Terpinene	1020	1017	1017	99-86-5	0.47	S, MS, KI
12	<i>p</i> -Cymene	1028	1024	1025	99-87-6	2.31	S, MS, KI
13	Limonene + Eucalyptol	1036	1029/1031	1030/1032	138-86-3	47.93	S, MS, KI
14	γ -Terpinene	1063	1059	1060	99-85-4	0.52	S, MS, KI
15	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1071	1070	1070	17699-16-0	0.04	MS, KI
16	Terpinolene	1091	1088	1088	586-62-9	0.30	S, MS, KI
17	Linalool	1100	1096	1099	78-70-6	0.82	S, MS, KI
18	Fenchol	1116	1116	1113	1632-73-1	0.04	S, MS, KI
19	<i>trans</i> -Sabinol	1143	1142	1142	471-16-9	0.05	MS, KI
20	Camphor	1148	1146	1144	464-49-3	11.75	S, MS, KI
21	Isoborneol	1160	1160	1157	124-76-5	0.17	MS, KI
22	endo-Borneol	1169	1169	1167	507-70-0	2.55	MS, KI
23	Terpinen-4-ol	1180	1177	1177	562-74-3	0.40	S, MS, KI
24	α -Terpineol	1192	1188	1189	98-55-5	1.22	S, MS, KI
25	Verbenone	1211	1205	1205	80-57-9	0.11	S, MS, KI
26	Bornyl acetate	1287	1285	1285	76-49-3	0.63	S, MS, KI
27	α -Copaene	1380	1375	1376	3856-25-5	0.27	MS, KI
28	β - <i>trans</i> -Caryophyllene	1424	1417	1419	87-44-5	3.30	S, MS, KI
29	Aromandendrene	1444	1441	1440	489-39-4	0.05	MS, KI
30	Humulene	1458	1454	1454	6753-98-6	0.26	S, MS, KI
31	γ -Muuroleone	1480	1479	1477	30021-74-0	0.20	MS, KI
32	γ -Cadinene	1517	1513	1513	39029-41-9	0.12	MS, KI
33	δ -Cadinene	1526	1523	1524	483-76-1	0.25	MS, KI

¹ Experimental retention indices calculated against n-alkanes. ² Retention indices according to the Adams database. ³ Retention indices according to the NIST20 database. ⁴ Chemical Abstracts Service. ⁵ % calculated from Total Ion Chromatogram (TIC). Identification based on: S—standard compound available; MS—mass spectrum; KI—Kovats indices.

2.3. Evaluation of Biological Activity In Vitro

The assessment of the impact on cell cultures was performed using the sulforhodamine B (SRB) assay. This test is a good tool for preliminary studies. From the results of the test,

both the cytotoxic and cytostatic effects of the tested compounds can be determined. The test measures both the effects on the basis of the amount of protein, and the result is not influenced by the inhibition or generation of free radicals by the compounds. The compounds tested are oils. Cancer cells, including those used in the tests, have a simplified morphological structure and physiology adapted to rapid cell division. The test compounds, oils, are, due to their nature, easily penetrated into the cells. Tumors cells, by virtue of their physiology, are unable to metabolize such compounds. This usually results in the inhibition of cell growth and, to a lesser extent, apoptosis or cytotoxicity.

As a result of the study, no cytotoxicity of the tested compounds was found in the tested concentration range. A decrease in the amount of protein was observed in the test cultures below the amount at the beginning of the test. Such effects are seen in the case of cytostatics or other compounds with strong toxicity. Example photographs of cell cultures are included in the supplementary materials (Figure S2).

Tables 15–18 show the IC₅₀ values for the four oils tested, together with their modifications, for normal fibroblast (NHDF) cultures and the selected tumor lines. The results obtained indicate a cytostatic effect of the tested oils. The tests showed a higher sensitivity of the tumor cells compared to the fibroblast cultures. The greatest differences in activity, seen in Table 15, are for cinnamon oil. The weakest activity was found for rosemary oil. In the case of this oil, the use of additives achieved the inhibition of cancer cell growth (Table 18). The garlic (Table 16) and clove (Table 17) oils also showed strong effects on cancer cells and weaker effects on normal cells.

Table 15. IC₅₀ values against normal and tumour lines incubated for 48 h with essential oil of Ceylon cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) and the components used in the study.

Cell Lines	Mixture of Acids	+MnCl ₂	+CH ₂ Cu ₂ O ₅	+ZnCO ₃
NHDF	1.43 (±0.16)	0.54 (±0.2)	19.28 (±1.3)	0.73 (±0.16)
A549	0.12 (±0.03)	0.10 (±0.01)	0.15 (±0.02)	0.07 (±0.01)
MCF7	0.34 (±0.09)	0.70 (±0.09)	0.67 (±0.15)	0.15 (±0.03)
LOVO	0.14 (±0.03)	0.06 (±0.01)	0.09 (±0.01)	0.07 (±0.01)
HT29	1.43 (±0.16)	0.54 (±0.2)	19.28 (±1.3)	0.73 (±0.16)

Table 16. IC₅₀ values against normal and tumour lines incubated for 48 h with garlic essential oil (*Allium sativum* L.) and the components used in the study.

Cell Lines	Mixture of Acids	+MnCl ₂	+CH ₂ Cu ₂ O ₅	+ZnCO ₃
NHDF	0.62 (±0.11)	0.91 (±0.07)	0.92 (±0.13)	1.17 (±0.14)
A549	0.40 (±0.07)	0.46 (±0.)	NA	NA
MCF7	0.13 (±0.03)	0.07 (±0.)	0.13 (±0.03)	0.11 (±0.01)
LOVO	NA	0.39 (±0.)	0.31 (±0.15)	NA
HT29	0.46 (±0.12)	0.06 (±0.01)	NA	NA

NA—not active.

Table 17. IC₅₀ values against normal and tumour lines incubated for 48 h with clove essential oil (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) and the components used in the study.

Cell Lines	Mixture of Acids	+MnCl ₂	+CH ₂ Cu ₂ O ₅	+ZnCO ₃
NHDF	0.51 (±0.22)	0.71 (±0.12)	0.38 (±0.12)	0.71 (±0.21)
A549	0.38 (±0.10)	0.22 (±0.02)	NA	0.13 (±0.03)
MCF7	0.22 (±0.06)	0.13 (±0.02)	NA	0.05 (±0.01)
LOVO	0.37 (±0.01)	0.13 (±0.03)	0.08 (±0.02)	0.05 (±0.01)
HT29	NA	NA	NA	0.15 (±0.03)

NA—not active.

Table 18. IC50 values against normal and tumour lines incubated for 48 h with rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) and the components used in the study.

Cell Lines	Mixture of Acids	+MnCl ₂	+CH ₂ Cu ₂ O ₅	+ZnCO ₃
NHDF	1.28 (±0.21)	1.51 (±0.31)	1.24 (±0.21)	NA
A549	NA	0.15 (±0.03)	NA	0.07 (±0.02)
MCF7	NA	0.11 (±0.01)	0.35 (±0.03)	NA
LOVO	NA	NA	NA	0.07 (±0.01)
HT29	NA	NA	NA	NA

NA—not active.

3. Discussion

The presented tests, with combinations containing an essential oil (clove, Ceylon cinnamon, garlic or rosemary), organic acid or its mixture (acetic, propionic and lactic acid) and metal ions (Cu, Mn or Zn), revealed antiprotozoal properties. The idea of preparing a complexed mixture was based on our previous research and test. Many scientific reports demonstrate the antiprotozoal activity of essential oils or even mixtures containing two constituents, but there is a lack of data regarding compositions containing essential oils, organic acid and metal ions. [36–39].

The combinations with clove essential oil had the best antiprotozoal properties of all the mixtures used. The clove essential oil also has very good antiprotozoal properties [40]. The obtained LD₅₀ and LD₁₀₀ values were between 0.1–0.3%. Santoro et al., observed significantly better properties against the various stages of the development of *Trypanosoma cruzi* than with eugenol alone [39]. A similar situation occurred in our study, where more unexpected values were reached for the combinations with organic acids and metal ions. The LD₅₀ and LD₁₀₀ were 0.001–0.04% and 0.001–0.005%, respectively. This suggests a synergistic effect between the components used. The GC-MS analysis proved that the clove essential oil used was derived from buds. This is evidenced by the content of eugenol (71.4%), *trans*-caryophyllene (14%) and, most importantly, the presence of eugenyl acetate (9.1%) [41–43].

Other very promising results were obtained for the Ceylon cinnamon essential oil. The pure essential oil was very effective. However, further tests, with combinations containing acids and metal ions, were not as exceptional as had been expected. The GC-MS analyses showed the content of the main compound, *trans*-cinnamaldehyde, was 54.7%. This is a relatively low content of the head compound of cinnamon essential oil, which is in the range 65–75% [44–46]. In the case of the tested sample, the results were comparable with those presented by Martiniaková et al. The *trans*-cinnamaldehyde content was similar, but the other compounds were present in comparable amounts [47].

The mixtures containing garlic essential oils showed good results. The best antiprotozoal results for the combinations with this oil were obtained against *Amoeba proteus*. The same results and conclusions were suggested by Behnia et al. [48]; in their studies against *Entamoeba histolical*, they demonstrated the anti-amoeba properties of different extracts and garlic essential oil. The activity was time-dependent and the exposure for the solutions was 24 h and 48 h. These findings correspond to the results presented in our studies. Further tests showed that combinations with garlic essential oil had good antiprotozoal properties, but the lowest from the analyzed samples.

At the initial stage of the study, the rosemary essential oil did not show the best antiprotozoal properties of the tested essential oils. The values of LD₅₀ and LD₁₀₀ were at the level of 0.1–0.3% and 0.4–0.6%, respectively. The situation was similar for its combination with single acids. However, the combination with a mixture of acids proved to be very effective against all of the protozoa tested, reaching LD₅₀: 0.001–0.007% and LD₁₀₀: 0.003–0.009% values.

At present, many literature reports can be found on combining various types of compounds and essential oils with metal ions. In these studies, a definite enhancement

were ciliates, used as an example feed for *Amoeba proteus*, and were cultivated in Prescott medium [63,64]. Only one protozoa was not cultivated and was isolated from the cockroaches. Gregarines, after isolation, proposed by J. Moraczewski [65], were placed in Ringer solution on a watch glass.

To determine the LD₅₀ and LD₁₀₀ values, different combinations and their concentrations were tested. Each time, four-fold replicates and blank were used. The Reed-Muench method was used for determining the LD₅₀ and LD₁₀₀ values. The protozoa were treated with different concentrations of the samples and observed on a watch glass, for 3 to 5 min.

The resulting phytoncide-metal mixture and phytoncide alone were dissolved in an aqueous solution of polysorbate 80 (0.05%) and applied to the watch glass. No biocidal activity of polysorbate 80 was observed at these concentrations. Chloramphenicol and metronidazole were used as standard substances for the control of protozoa. Antibiotics were used at a concentration of 5 mg/mL and diluted from stock solutions to achieve LD₅₀ and LD₁₀₀.

4.2. Essential Oils

The essential oils were purchased from three companies. The cinnamon essential oil was provided by Food Base Kft. (Gödöllő, Hungary); the garlic essential oil from Synthite Industries Pvt., Ltd. (Kolenchery, Kerala, India); the rosemary and clove essential oil from De Monchy Aromatics Ltd. (Poole, Dorset, UK).

4.3. Chemicals and Reagents

The organic acids (acetic acid 99%, propionic acid 99.5% and lactic acid 85%) and other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and comply with FCC and FG standards. The standards for chromatographical analyses were bought in Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), UQF (Wrocław, Poland) and Metasci (Toronto, ON, Canada), as well as our own collection of chemicals in the Department of Food Chemistry and Biocatalysis. The purity and percentage composition, according to the supplier's specification, was minimum $\geq 95\%$.

4.4. Phytoncides Mixture Preparation

Organic acids and essential oils were mixed in the same amount (100 mL). The mixture of organic acids was prepared in ratio 1:1:1. The composition was mixed, and mineral salts were added in the amount of 5 g. The salts were: manganese (II) chloride (2.18 g of ions Mn²⁺), copper (II) carbonate hydroxide (2.87 g of ions Cu²⁺) and zinc carbonate (2.61 g of ions Zn²⁺). The composition was heated and then left to cool overnight. After that time, the solution of one, two or three phases was filtered through paper filter. The composition was diluted to prepare a solution in the range of 0.001% to 1.5%.

4.5. GC-MS Analysis

The profile of the essential oils investigated was evaluated using the GC-MS technique, according to the protocol [66]. The identification of all of the volatile components was based on a comparison of the mass spectra with the mass spectra of the compound obtained experimentally, available in the NIST20 database. Additionally, the retention indices (RI), obtained experimentally, were calculated using macro [67] and were compared with the RI available in the NIST20 database and the data from the literature [68]. GCMS Post-run analysis software version 4.45 (Shimadzu Company, Kyoto, Japan) and ACD/Spectrum Processor (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada) were used to process the data. The quantification of the identified constituents was performed by calculation based on the amount of added internal standard and expressed as a percentage of the integrated peaks' area. Analysis was performed using the Shimadzu 2020 apparatus (Varian, Walnut Creek, CA, USA) equipped with a Zebron ZB-5 MSI column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The temperature of the GC oven was programmed from 50 °C to 250 °C at a rate of 3.0 °C and kept for

of their effect can be observed [32,49]. The following results confirm that the use of the addition of metal ions and organic acids increases the antiprotozoal properties of the essential oils.

One of the most serious problems arising from the use of new substances, whether in pharmaceuticals, medicine or human and animal nutrition, is the lack of data on the toxicology of new compounds, their composition or metabolites. New formulations with very promising results have often not been used in a wider context due to side effects and toxicity. The situation is similar in the case of essential oils, where sufficiently high concentrations can cause adverse reactions or toxic effects. For example, clove essential oil may act as an irritant. On the other hand, some essential oils and their main constituents, such as *Rosmarinus officinalis* (camphor), *Eucalyptus globulus* (1,8-cineole) and *Mentha* species (menthone and menthol), and, in particular, *Mentha pulegium* (pulegone), may cause hepatic damage, convulsions and hallucinations. They are also forbidden in pregnancy due to their abortifacient effect [50,51]. In our study, the toxic effect of the prepared mixtures was tested on several cell lines and cancer cell lines, for example, NHDF (normal human dermal fibroblasts), A549 (lung cancer) or MCF7 (human breast cancer). All of the essential oils used in this study have been reported as potential anticancer agents [32,52–55].

The results indicate the low toxicity of the tested oils towards normal cells and the inhibition of cancer cell growth. There were no results indicating strong cytotoxicity of the tested compounds, the main effect being the inhibition of cell growth. This confirms the safety of the tested oils. The results obtained may be indicative of their chemopreventive properties. Due to their volatile properties, the tested oils can easily work in the respiratory tract or digestive tract when applied indoors, in the same way as with pollutants reaching our body. The results obtained show a selective action of the oils against cancer cells, with the best effect seen for cinnamon oil (4–12 × stronger effect). Modification, through the addition of metals to the oils, also resulted in an improved anticancer effect. The addition of Zn significantly improved the activity of cinnamon oil (1.7–2.2 × potent, depending on the line tested) and is also important for its protective effect against upper respiratory tract infections.

All of the obtained results are very promising in terms of either their antiprotozoal activity or low cytotoxicity and their possession of good anticancer properties. Low cytotoxicity is the first step to determine the safety of the combinations for human and animals. Unfortunately, heavy metals can accumulate in tissues and organs and can cause several disorders. Moreover, some essential oils can cause allergic reactions and organic acids can cause skin and mucosal irritation. The wider use of the mixtures, for diseases caused by protozoa or cancer treatments, requires more tests and further investigation, e.g., in vivo trials. In vivo trials performed on animals, which would include intentional infection, require special ethic approval of the Local Ethics Committee.

4. Materials and Methods

4.1. Maintenance of Parasite Cultures and Evaluation of Antiprotozoal Activity

For the further tests, five different protozoa were chosen. They belong to the same taxonomic groups as the most widespread pathogenic protozoa. Three of them, *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum* and *Euglena gracilis*, represent aquatic protozoa, while *Gregarina blattarum*, *Pentatrachomonas hominis* live in the digestive track of cockroaches and humans, respectively.

The aquatic protozoa were isolated in Krosno from the freshwater river (river Badoń, 49°39′59.8″ N 21°46′28.1″ E, Krosno, Subcarpathian Voivodeship, Poland). The identification of the protozoa was performed on the descriptions and drawings of W. A. Dogiel [56] and J. Hempel-Zawitkowska [57].

All of the analyzed protozoa were cultivated under different conditions. Hay infusion was the medium for the cultivation of *Paramecium* [58–60]. For *Euglena*, the solution was used according to Wu et al. [61]. *Pentatrachomonas hominis* was kept in solution according to Chomicz et al. after it was isolated from stool samples [62]. *Tetrahymena* and *Chilomonas*

3 min. Scanning was performed from 35 to 550 m/z in electronic impact (EI) at 70 eV and ion source temperature 250 °C. Samples were injected at split ratio 1:10 and gas helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. Garlic and rosemary Eos were analyzed on Varian CP-3800/Saturn 2000 apparatus (Varian, Walnut Creek, CA, USA) and compounds were separated by on Zebron ZB-5MSi (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) column. GC temperature program: initially 50 °C, then to 180 °C at 4.0 °C/min ratio, and finally to 250 °C at 10 °C/min ratio. As a carrier gas helium with linear velocity 35.0 cm/s; split ratio 1:10 was used. MS operational conditions: ion source temperature 250 °C; electron impact (EI) ionization at 70 eV; scanning range between 35 and 300 m/z .

4.6. NMR Measurement

The ^1H NMR and ^{13}C spectra of EOs were recorded in a CDCl_3 solution on a Bruker Avance™ 600 MHz spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA). Two different measurements, that is 25 μL (for ^1H measurement) or 250 μL for ^{13}C and correlative spectra), of essential oil were dissolved in 600 μL of CDCl_3 to record the spectra. The data were processed on the ACD Spectrus Processor 2021.2.1, Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, ON, Canada.

4.7. Cell Culture

Normal cell lines—dermal fibroblasts (NHDF) purchased from LONZA (Verviers, Belgium) and cancer cell lines A549 (lung cancer), MCF7 (breast cancer) and LOVO and HT29 (colorectal adenocarcinomas) were used in the study. Tumour lines were purchased from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). The cells were cultured under standard 37 °C and 5% CO_2 conditions. The cell lines were thawed for a minimum of 2 weeks prior to the start of the study and passaged after reaching full confluence. The cells were cultured in medium supplemented with 10% FBS and appropriate NHDF, HT29-DMEM, A549 and MCF7-EMEM, LOVO-DMEM/F12 media. The media were supplemented with antibiotics and L-glutamine. All of the reagents were purchased from Biological Industries—now part of Sartorius (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Materials for culture bottles, plates, tubes were purchased from SPL Life Sciences (Pocheon, Korea).

4.8. Evaluation of Biological Activity on Cell Cultures

The activity assessment was performed according to the National Cancer Institute guidelines for screening human tumour lines and based on the basis of our own studies [69]. Tumour cell lines and normal human cells cultured in a suitable medium containing 5% fetal serum were used for the study. To prepare the cells for the experiment, the medium was harvested and inactivated with trypsin. Trypsin has the effect of detaching cells from the medium. A portion of the cells were then collected into tubes and trypsin inactivated with the medium. The quality and viability of the cells used in the study was measured using a NucleoCounter® NC-200 reader (Chemometec, Denmark). Cell viability is measured using dedicated cassettes containing acridine orange (AO) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

The cells were counted in line NC200 (Chemometec, Allerød, Denmark) and the final cell count after inoculation in a 96-well plate was approximately 1 million cells (1×10^4 cells per well). After inoculation, the plates were incubated at 37 °C, 5% CO_2 and 100% relative humidity for 24 h before phytoncides were added. After 24 h of incubation, one plate from each cell line was fixed with 50% (w/v) TCA to represent cell population measurements for each tumour line at the time of oil addition (T0). The oils were prepared at a concentration of 10 mg/mL and the volume added to each microtiter well was 1 mg/mL, 0.5 mg/mL and 0.1 mg/mL, respectively. The plates were then incubated for an additional 48 h at 37 °C, 5% CO_2 , 95% air and 100% relative humidity. After this time, the contents of the wells were fixed by adding 30 μL of 50% (w/v) TCA and incubated for 60 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the plates were washed five times with tap water and

air-dried. To each well, 100 μ L of a 0.4% (*w/v*) solution of sulforhodamine B (SRB) in 1% acetic acid was added and plates were incubated for 10 min at room temperature. After staining, the unbound dye was removed by washing five times with 1% acetic acid and the plates were air-dried. Doxorubicin was used as the positive control, in final concentration 10 μ M. The bound dye was dissolved in 10 mM Trisima Base and the absorbance was read on a MultiscanGo reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 515 nm.

The absorption results obtained were compared with those of the control and the T0 control. In the case of absorbance values below the T0 control, such a result provided information on the cytotoxic properties of the tested compounds. If the results were between T0 and the control value, the result indicated an inhibitory effect on cell growth.

5. Conclusions

The proposed new mixtures containing essential oils, organic acids and metal ions have not yet been obtained and described in the scientific literature. Those combinations containing three different active substances showed very high antiprotozoal efficacy at very low concentrations. The most effective combinations turned out to be solutions containing, in addition to essential oil and metal ions, a mixture of organic acids. The most effective combinations against the analyzed protozoa were those containing clove essential oil. Very similar results were also obtained for rosemary essential oil. A slightly lower effectiveness was characterized by mixtures with garlic and ceylon cinnamon essential oils. However, it should be noted that even the least effective combinations, in most cases, were significantly more effective than the reference substances, chloramphenicol and metronidazole. Moreover, the analyses of the cytotoxic effect against human cancer cell lines showed a very promising effect. The tests performed on normal human cell lines showed low toxic effects. However, on the other hand, the tested compositions inhibited the growth of cancer cells. The highest anticancer, or more precisely, chemopreventive properties, were obtained for the cinnamon essential oil mixtures and combinations containing zinc ions.

The collected data allow us to conclude that the discovered combinations, under *in vitro* conditions, have very good antiprotozoal properties and, importantly, they have low toxicity against healthy human cell lines and inhibit the growth of cancer cell lines. Further studies should be conducted to determine their potential side effects, metabolism and accumulation in tissues under *in vivo* conditions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28031395/s1>, links for the NMR spectra and GC-MS chromatograms Figure S1: MS spectrum of an unknown compound (nr 8) in clove EO; Figure S2. Evaluation of cytotoxicity of test oils (1 mg/mL) to normal human fibroblasts after 48 h of incubation.

Author Contributions: Conceptualization, H.I., H.R. and A.S.; methodology, H.I., H.R., N.P., T.G. and A.S.; investigation, H.I., H.R., N.P., T.G. and A.S.; data curation, H.I., N.P., A.W., T.G. and A.S.; writing—original draft preparation, H.I., H.R. and A.S.; writing—review and editing, H.I., H.R., N.P., A.W., T.G. and A.S.; visualization, H.I., N.P., A.W., T.G. and A.S.; supervision, H.I. and A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Work financed from Ministry of Science and Higher Education budgetary funds for science in 2018–2022, as a project under the “Implementation doctorate” II edition program.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the tables and supplementary materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. *World Malaria Report 2022*; WHO: Geneva, Switzerland, 2022; Volume 2022, p. 372.
2. WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 23 January 2023).
3. Adams, D.S.; Kulkarni, R.R.; Mohammed, J.P.; Crespo, R. A flow cytometric method for enumeration and speciation of coccidia affecting broiler chickens. *Vet. Parasitol.* **2022**, *301*, 109634. [[CrossRef](#)]
4. de Andrade, R.M.; Pagnussatt, H.; Talian, L.E.; Santo, A.D.; Ribeiro, A.B.; Leite, F.; Mis, G.; Hoinoski, G.; Aniecevski, E.; Fabiani, L.M.; et al. Interaction between live vaccines for coccidiosis and phytochemical compounds in the diet of broilers. *Parasitol. Int.* **2022**, *89*, 102584. [[CrossRef](#)]
5. Su, R.; Jiang, N.; Lu, Y.; Jian, F.; Wang, H.; Zhang, G.; Zhang, L.; Yang, Y. Low prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in swine from slaughter houses in the central of China. *Parasitol. Int.* **2020**, *76*, 102090. [[CrossRef](#)]
6. Chomel, B.B. Control and prevention of emerging parasitic zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **2008**, *38*, 1211–1217. [[CrossRef](#)]
7. Pramanik, P.K.; Alam, M.N.; Roy Chowdhury, D.; Chakraborti, T. Drug Resistance in Protozoan Parasites: An Incessant Wrestle for Survival. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, *18*, 1–11. [[CrossRef](#)]
8. Sato, D.; Kobayashi, S.; Yasui, H.; Shibata, N.; Toru, T.; Yamamoto, M.; Tokoro, G.; Ali, V.; Soga, T.; Takeuchi, T.; et al. Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine against the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 56–61. [[CrossRef](#)]
9. World Health Organization. *Strategy to Respond to Antimalarial Drug Resistance in Africa*; WHO: Geneva, Switzerland, 2022.
10. Steverding, D.; Rushworth, S.A. Front-line glioblastoma chemotherapeutic temozolomide is toxic to *Trypanosoma brucei* and potentially enhances melarsoprol and eflornithine. *Exp. Parasitol.* **2017**, *178*, 45–50. [[CrossRef](#)]
11. Vandekerckhove, S.; D'hooghe, M. Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23*, 5098–5119. [[CrossRef](#)]
12. WHO. *WHO Guidelines for Malaria*; WHO: Geneva, Switzerland, 2022; p. 240.
13. Pérez, S.; Ramos-Lopez, M.; Sánchez-Miranda, E.; Fresán-Orozco, M.; Pérez-Ramos, J. Antiprotozoa activity of some essential oils. *J. Med. Plant Res.* **2012**, *6*, 2901–2908.
14. van Zyl, R.L.; Seatlholo, S.T.; van Vuuren, S.F.; Viljoen, A.M. The Biological Activities of 20 Nature Identical Essential Oil Constituents. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, *18*, 129–133. [[CrossRef](#)]
15. Valerino-Díaz, A.B.; Zanatta, A.C.; Gamiotea-Turro, D.; Candido, A.C.B.B.; Magalhães, L.G.; Vilegas, W.; Santos, L.C.d. An enquiry into antileishmanial activity and quantitative analysis of polyhydroxylated steroidal saponins from *Solanum paniculatum* L. leaves. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *191*, 113635. [[CrossRef](#)]
16. Sahu, A.; Agrawal, R.K.; Pandey, R. Synthesis and systemic toxicity assessment of quinine-triazole scaffold with antiprotozoal potency. *Bioorganic Chem.* **2019**, *88*, 102939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ávila Brustolin, A.; Fernandes Herculano Ramos-Mílaré, Á.C.; Perles de Mello, T.F.; Alessi Aristides, S.M.; Campana Lonardoní, M.V.; Verzignassi Silveira, T.G. In vitro activity of cinnamaldehyde on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Exp. Parasitol.* **2022**, *236–237*, 108244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Elgendy, E.M.; Semeih, M.Y. Phyto—Monoterpene linalool as precursor to synthesis epoxides and hydroperoxides as anti carcinogenic agents via thermal and photo chemical oxidation reactions. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 966–973. [[CrossRef](#)]
19. Manikandan, P.; Vinothini, G.; Vidya Priyadarsini, R.; Prathiba, D.; Nagini, S. Eugenol inhibits cell proliferation via NF- κ B suppression in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Investig. New Drugs* **2011**, *29*, 110–117. [[CrossRef](#)]
20. Jamali, T.; Kavooosi, G.; Safavi, M.; Ardestani, S.K. In-vitro evaluation of apoptotic effect of OEO and thymol in 2D and 3D cell cultures and the study of their interaction mode with DNA. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Khan, I.; Bahuguna, A.; Kumar, P.; Bajpai, V.K.; Kang, S.C. In vitro and in vivo antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mohd Izhah, M.N.; Hussin, Y.; Aziz, M.N.M.; Yeap, S.K.; Rahman, H.S.; Masarudin, M.J.; Mohamad, N.E.; Abdullah, R.; Alitheen, N.B. Preparation and Characterization of Self Nano-Emulsifying Drug Delivery System Loaded with Citraland Its Antiproliferative Effect on Colorectal Cells In Vitro. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1028. [[CrossRef](#)]
23. Sharma, M.; Grewal, K.; Jandrotia, R.; Batish, D.R.; Singh, H.P.; Kohli, R.K. Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *146*, 112514. [[CrossRef](#)]
24. Kavaz, D.; Idris, M.; Onyebuchi, C. Physicochemical characterization, antioxidative, anticancer cells proliferation and food pathogens antibacterial activity of chitosan nanoparticles loaded with *Cyperus articulatus* rhizome essential oils. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 837–845. [[CrossRef](#)]
25. Das, B.K.; Swamy, A.H.M.V.; Koti, B.C.; Gadad, P.C. Experimental evidence for use of *Acorus calamus* (asarone) for cancer chemoprevention. *Heliyon* **2019**, *5*, e01585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ravindran, P.N.; S Pillai, G.; Babu, K. Under-utilized herbs and spices. In *Handbook Herbs Spices*; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2004; Volume 2, pp. 53–103.
27. Rahamooz Haghghi, S.; Asadi, M.H.; Akrami, H.; Baghizadeh, A. Anti-carcinogenic and anti-angiogenic properties of the extracts of *Acorus calamus* on gastric cancer cells. *Avicenna J. Phytomedicine* **2017**, *7*, 145–156.

28. Bains, J.S.; Dhuna, V.; Singh, J.; Kamboj, S.S.; Nijjar, K.K.; Agrewala, J.N. Novel lectins from rhizomes of two *Acorus* species with mitogenic activity and inhibitory potential towards murine cancer cell lines. *Int. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 1470–1478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Liu, L.; Wang, J.; Shi, L.; Zhang, W.; Du, X.; Wang, Z.; Zhang, Y. β -Asarone induces senescence in colorectal cancer cells by inducing lamin B1 expression. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 512–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Koca, H.; Koken, T.; Ozkurt, M.; Kuş, G.; Kus, G.; Erkasap, N.; Çolak, Ö. Effects of *Acorus calamus* plant extract on prostate cancer cell culture. *Anatol. J. Bot.* **2018**, *2*, 46–51. [[CrossRef](#)]
31. Vijayakumar, S.; Malaikozhundan, B.; Saravanakumar, K.; Durán-Lara, E.F.; Wang, M.-H.; Vaseeharan, B. Garlic clove extract assisted silver nanoparticle—Antibacterial, antibiofilm, antihelminthic, anti-inflammatory, anticancer and ecotoxicity assessment. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, *198*, 111558. [[CrossRef](#)]
32. Salim, A.A.; Bakhtiar, H.; Dawood, D.A.S.; Ghoshal, S.K. Anticancer and cytotoxicity evaluation of silver-cinnamon nanoshells. *Mater. Lett.* **2023**, *334*, 133671. [[CrossRef](#)]
33. Block, E. Flavor artifacts. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 692. [[CrossRef](#)]
34. Baker, A.; Graz, M.; Saunders, R.; Evans, G.J.S.; Kaul, S.; Wirth, T. Flow Synthesis of Symmetrical Di- and Trisulfides Using Phase-Transfer Catalysis. *J. Flow Chem.* **2013**, *3*, 118–121. [[CrossRef](#)]
35. Bhattacharjee, D.; Sufian, A.; Mahato, S.K.; Begum, S.; Banerjee, K.; De, S.; Srivastava, H.K.; Bhabak, K.P. Trisulfides over disulfides: Highly selective synthetic strategies, anti-proliferative activities and sustained H₂S release profiles. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 13534–13537. [[CrossRef](#)]
36. Al-Khodir, F.A.I.; Refat, M.S. Investigation of coordination ability of Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), and Cu(II) with metronidazole, the antiprotozoal drug, in alkaline media: Synthesis and spectroscopic studies. *Russ. J. Gen. Chem.* **2017**, *87*, 873–879. [[CrossRef](#)]
37. Becco, L.; Rodríguez, A.; Bravo, M.E.; Prieto, M.J.; Ruiz-Azuara, L.; Garat, B.; Moreno, V.; Gambino, D. New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas[®]: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *109*, 49–56. [[CrossRef](#)]
38. Monzote, L.; Alarcón, O.; Setzer, W. Antiprotozoal Activity of Essential Oils. *Agric. Conspec. Sci.* **2012**, *77*, 167–175.
39. Santoro, G.F.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.L.; Mendonça, L.Z.; Soares, M.J. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **2007**, *116*, 283–290. [[CrossRef](#)]
40. Islamuddin, M.; Sahal, D.; Afrin, F. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 74–85. [[CrossRef](#)]
41. Kaur, K.; Kaushal, S.; Rani, R. Chemical Composition, Antioxidant and Antifungal Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) Essential Oil, its Major Compound and its Derivatives. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2019**, *22*, 1195–1217. [[CrossRef](#)]
42. Pino, J.A.; Marbot, R.; Agüero, J.; Fuentes, V. Essential Oil from Buds and Leaves of Clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry) Grown in Cuba. *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 278–279. [[CrossRef](#)]
43. Amelia, B.; Saepudin, E.; Cahyana, A.H.; Rahayu, D.U.; Sulistyoningrum, A.S.; Haib, J. GC-MS analysis of clove (*Syzygium aromaticum*) bud essential oil from Java and Manado. *AIP Conf. Proc.* **2017**, *1862*, 030082. [[CrossRef](#)]
44. Pepeljnjak, S. Antimicrobial and Antitumor Properties of Medicinal and Spice Plants from Croatia. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **2020**, *31*, 24029–24032. [[CrossRef](#)]
45. Mócziz, Á.M.; Horváth, G.; Böszörményi, A.; Ott, P.G. Detection and Identification of Antibacterial and Antioxidant Components of Essential Oils by TLC-Biodetection and GC-MS. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1934578X1601101120. [[CrossRef](#)]
46. Li, Y.-q.; Kong, D.-x.; Wu, H. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *41*, 269–278. [[CrossRef](#)]
47. Martiniaková, S.; Ácsová, A.; Hojerová, J.; Krepsová, Z.; Kreps, F. Ceylon cinnamon and clove essential oils as promising free radical scavengers for skin care products. *Acta Chim. Slovaca* **2022**, *15*, 1–11. [[CrossRef](#)]
48. Behnia, M.; Haghighi, A.; Komeilizadeh, H.; Tabaei, S.J.S.; Abadi, A. In Vitro Antiamoebic Activity of Iranian *Allium sativum* in Comparison with Metronidazole against *Entamoeba histolytica*. *Iran. J. Parasitol.* **2008**, *3*, 32–38.
49. Navarro, M.; Gabbiani, C.; Messori, L.; Gambino, D. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and perspectives. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 1070–1078. [[CrossRef](#)]
50. Vigan, M. Essential oils: Renewal of interest and toxicity. *Eur. J. Dermatol. EJD* **2010**, *20*, 685–692. [[CrossRef](#)]
51. Raut, J.S.; Karuppaiyl, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *62*, 250–264. [[CrossRef](#)]
52. Eid, A.M.; Jaradat, N.; Issa, L.; Abu-Hasan, A.; Salah, N.; Dalal, M.; Mousa, A.; Zarour, A. Evaluation of anticancer, antimicrobial, and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) essential oil and its Nanoemulgel. *Eur. J. Integr. Med.* **2022**, *55*, 102175. [[CrossRef](#)]
53. Kaushal, S.; Rashmi. Chapter 27—Composition and functionality of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil. In *Clove (Syzygium aromaticum)*; Ramadan, M.F., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 461–483.
54. Haase, H.; Hieke, N.; Plum, L.M.; Gruhlke, M.C.H.; Slusarenko, A.J.; Rink, L. Impact of allicin on macrophage activity. *Food Chem.* **2012**, *134*, 141–148. [[CrossRef](#)]
55. De Greef, D.; Barton, E.M.; Sandberg, E.N.; Croley, C.R.; Pumarol, J.; Wong, T.L.; Das, N.; Bishayee, A. Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: A systematic and comprehensive review. *Semin. Cancer Biol.* **2021**, *73*, 219–264. [[CrossRef](#)]

56. Dogiel, W.A. *Zoologia Bezkręgowców*, 3rd ed.; Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne: Warsaw, Poland, 1972.
57. Hempel-Zawitkowska, J. *Zoologia dla Uczelni Rolniczych*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warsaw, Poland, 2006.
58. Pawlaczyk-Szpilowa, M. *Ćwiczenia z Mikrobiologii Wody i Ścieków*; PWN: Warszawa, Poland, 1980.
59. Feng, J.; Zhu, H.; Lukeš, J.; Korabečná, M.; Fohlerová, Z.; Mei, T.; Chang, H.; Neužil, P. Nanowatt simple microcalorimetry for dynamically monitoring the defense mechanism of *Paramecium caudatum*. *Sens. Actuators A Phys.* **2021**, *323*, 112643. [[CrossRef](#)]
60. Sonneborn, T.M. Chapter 12 Methods in Paramecium Research. In *Methods in Cell Biology*; Prescott, D.M., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1970; Volume 4, pp. 241–339.
61. Wu, M.; Qin, H.; Deng, J.; Liu, Y.; Lei, A.; Zhu, H.; Hu, Z.; Wang, J. A new pilot-scale fermentation mode enhances *Euglena gracilis* biomass and paramylon (β -1,3-glucan) production. *J. Clean. Prod.* **2021**, *321*, 128996. [[CrossRef](#)]
62. Chomicz, L.; Padzik, M.; Laudy, A.; Kozłowska, M.; Pietruczuk, A.; Piekarczyk, J.; Godineau, N.; Olędzka, G.; Kazimierczuk, Z. Anti-Pentatricomonas hominis activity of newly synthesized benzimidazole derivatives—In vitro studies. *Acta Parasitol.* **2009**, *54*, 165–171. [[CrossRef](#)]
63. Yudin, A.L. Amoeba and Other Protozoa. In *Animal Species for Developmental Studies: Volume 1 Invertebrates*; Dettlaff, T.A., Vassetzky, S.G., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1990; pp. 1–11.
64. Demin, S.Y.; Berdieva, M.A.; Podlipaeva, Y.I.; Goodkov, A.V. Karyotypic instability of endoprophase and mitotic cells of *Amoeba* sp. strain Cont from the “proteus-type” group (Amoebozoa, Euamoebida, Amoebidae). *Eur. J. Protistol.* **2020**, *74*, 125691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Moraczewski, J. *Ćwiczenia z Zoologii Bezkręgowców*, 1st ed.; PWN: Warsaw, Poland, 1974; Volume 29–31, pp. 285–292.
66. Łyczko, J.; Pawlak, A.; Augustyński, I.; Okińczyc, P.; Szperlik, J.; Kulma, A.; Róžański, H.; Obmińska-Mrukowicz, B.; Szumny, A. Chemical profiling and cytotoxic activity of 150-year old original sample of Jerusalem Balsam. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *138*, 111183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lucero, M.; Estell, R.; Tellez, M.; Fredrickson, E. A retention index calculator simplifies identification of plant volatile organic compounds. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 378–384. [[CrossRef](#)]
68. Adams, R.P. *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2012.
69. Arendt-Pindel, A.; Marszałek-Harych, A.; Gębarowska, E.; Gębarowski, T.; Jędrzkiewicz, D.; Płaskowska, E.; Zalewski, D.; Gulia, N.; Szafert, S.; Ejfler, J. Design and functionalization of bioactive benzoxazines. An unexpected ortho-substitution effect. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 12042–12053. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures

Table of content

Figure S1. MS Spectrum of unknown compound (nr 8) in clove EO:1

Figure S2. Evaluation of cytotoxicity of test oils (1 mg/mL) to normal human fibroblasts after 48 h incubation, 2

All presented in the publication GC-MS chromatograms are available under following link:

https://drive.google.com/file/d/1LfmYecuE3QSYoeVn43-ccu0O2s_UcS-L/view?usp=share_link

The NMR spectra presented in publication are available under following link:

https://drive.google.com/file/d/1zkAnN77n6CRTGrYKynBj8GmKxt3H45I9/view?usp=share_link

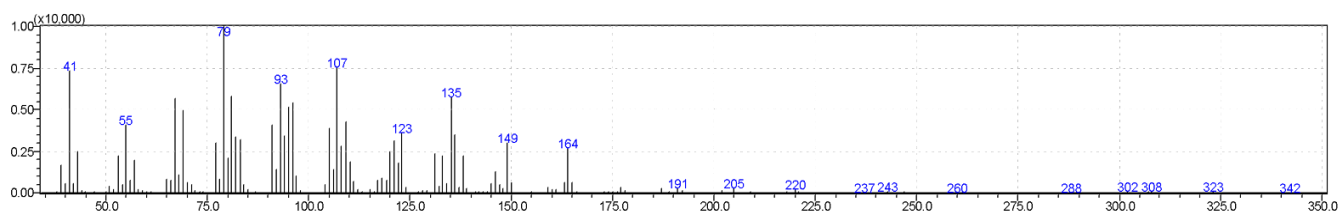
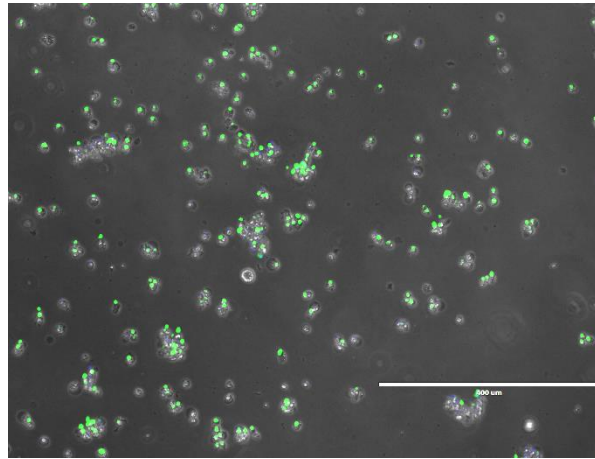
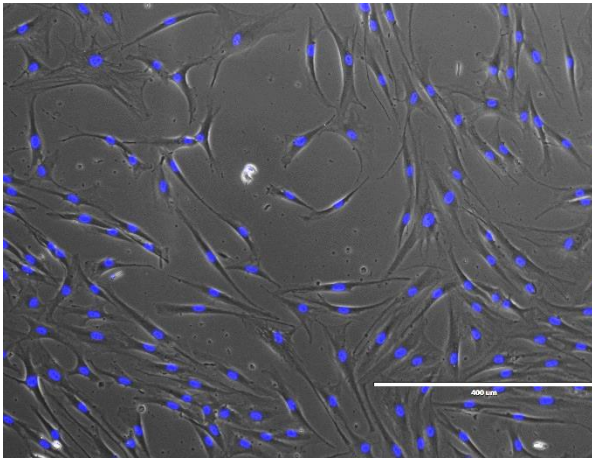


Figure S1. MS Spectrum of unknown compound (nr 8) in clove EO:.

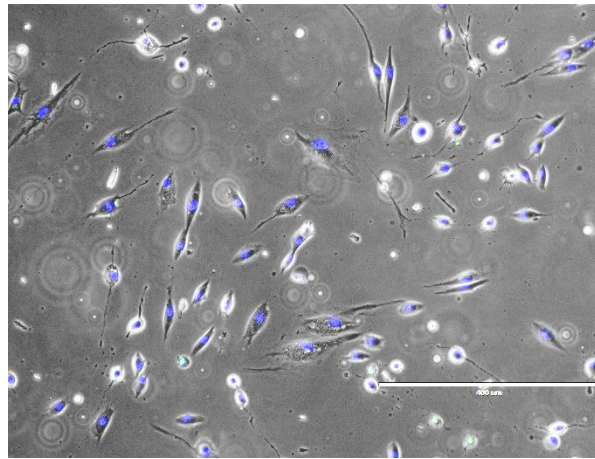
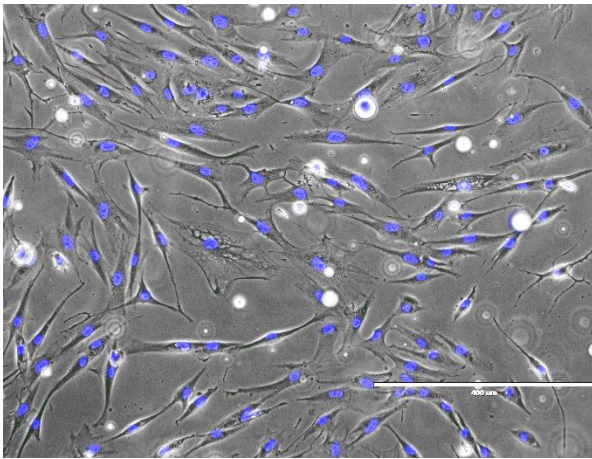
CONTROL

CONTROL +H₂O₂ (2mM)



essential oil of Ceylon cinnamon

essential oil garlic essential oil



clove essential oil

rosemary essential oil

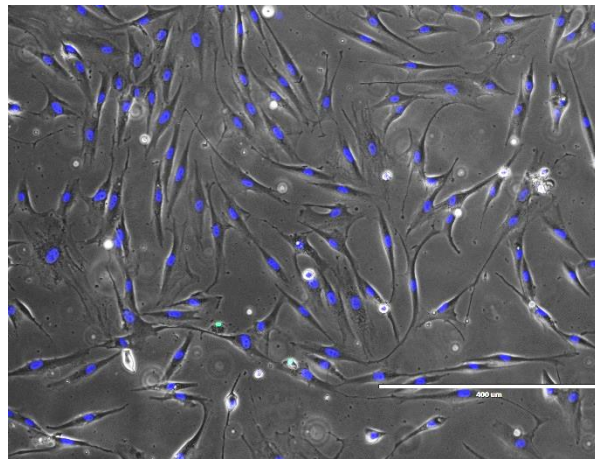
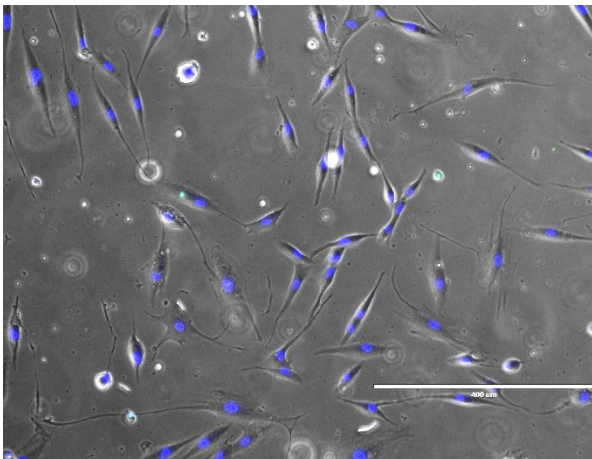


Figure S2. Evaluation of cytotoxicity of test oils (1 mg/mL) to normal human fibroblasts after 48 h incubation, live-dead staining, staining kit: ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green, blue - live, green - dead cells. Evos FL microscope, objective magnification 10x, fluorescence: DAPI: Ex: 357/44 Em: 447/60; GFP: Ex: 482/25 Em: 524/24.

3.4. TESTY TOKSYCZNOŚCI

Produkt mający trafić do komercyjnej sprzedaży poddany został analizie potencjalnego negatywnego wpływu, wynikającego z zastosowania znacznie zawyżonych dawek tj. pięcio-, dziesięcio- i dwudziestokrotnie wyższych aniżeli zalecane. Uzyskane próbki tkanek i organów poddano analizie histopatologicznej oraz badaniu na obecności pozostałości. Podanie produktu miało miejsce czterokrotnie przez 24 h w trakcie prowadzenia tuczu. Uzyskane wyniki potwierdziły brak negatywnego wpływu na organy wewnętrzne brojlerów kurzych, co więcej osiągnięte parametry produkcyjne w grupach testowych charakteryzowały się lepszymi wynikami aniżeli grupa kontrolna.

Wyniki przeprowadzonych badań (*The Impact of New Plant Phytobiotic Mixture on The Broiler Chicken Health and Meat Safety*, **Hubert Iwiński**, Karolina Chodkowska, Kamil Drabik, Justyna Batkowska, Małgorzata Karwowska, Piotr Kuropka, Adam Szumowski, Antoni Szumny and Henryk Rózański) są obecnie w trakcie odpowiedzi dla recenzentów czasopiśmie *Animals*.

3.5. Patent 1

Kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek cedrowy, sposób jej wytwarzania oraz jej zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek cedrowy, sposób jej wytwarzania oraz jej zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi.

Literatura przedmiotu wskazuje, że niektóre metabolity wtórne roślin, takie jak fitoncydy oraz fitoaleksyny posiadają potencjalne właściwości bójcze i statyczne wobec pierwotniaków, bakterii, wirusów i grzybów.

Fitoncydy (gr. fiton – roślina; cyd – sylaba oznaczająca właściwości bójcze) po raz pierwszy zostały wykryte przez radzieckich badaczy w latach 1928–1930. Największe osiągnięcia nad badaniem fitoncydów mają: G.I. Niłow, B. P. Tokin (1900–1984), A. Fiłatow i I. Toropcew. Termin i definicję fitoncyd zostały wprowadzone przez B.P. Tokina. Fitoncydy to substancje wydzielane i wydalane przez rośliny wyższe (*Cormophyta*) o działaniu antybakteryjnym, pierwotniakobójczym i grzybobójczym. Fitoncydy są odpowiednikiem antybiotyków, wytwarzanych przez bakterie, grzyby i porosty (Tariq, S., S. Wani, W. Rasool, K. Shafi, M. A. Bhat, A. Prabhakar, A. H. Shalla and M. A. Rather (2019). "A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens." *Microbial Pathogenesis* 134: 103580).

Pod względem chemicznym są bardzo zróżnicowane. Fitoncydy są w postaci gazowej, krystalicznej i ciekłej. Sporo z nich ulega sublimacji i wrze w niskich temperaturach, rzędu 30 °C. Według B.M. Kozo-Polianskiego lotne frakcje fitoncydów są pierwszą linią obrony rośliny, drugą linią obrony są nielotne fitoncydy tkankowe. W literaturze istnieje zamieszanie w terminologii związków chemicznych uczestniczących w procesach odporności roślin na choroby. Z zagadnieniem fitoncydów związane jest pojęcie fitoaleksyn, prohibityny, inhibityny i postinhibityny. W 1960 r. Cruickshank i Perrin po raz pierwszy wyizolowali z *Pisum sativum* (grochu) i zidentyfikowali fitoaleksynę – pizatynę (pisatin). J. L. Ingham w 1973 r. opublikował ciekawy podział czynników odporności roślin wyższych na infekcje (J.L. Ingham J. L., *Disease*

resistance in higher plants. The concept of pre-infectious and post-infectious resistance, "Phytopath. Z." 1973, 78, s. 314–335):

Prohibityny to metabolity ograniczające lub całkowicie hamujące rozwój mikroorganizmów. Istnieją stale w tkankach roślinnych w niezmiennym stężeniu, np. berberyna (alkaloid), izoflawony, katechiny.

Inhibityny są metabolitami, których zawartość w komórkach wzrasta po infekcji, np. kwas chlorogenowy, kumaryny.

Postinhibityny są substancjami powstałymi z istniejących, ale nieaktywnych fitoncydowo związków, np. wskutek hydrolizy, utlenienia. Należą tutaj glikozydy cyjanogenne (np. prunazy w czeremchach, sambunigrina w bzie czarnym), tulipozydy, glukozynolaty czosnku i cebuli. Koncepcja Inghama definicji fitoaleksyn nie jest do końca słuszna. Dla przykładu kwas benzoesowy, alkohol koniferylowy, skopoletyna, resweratrol, safinol zaliczane są do typowych fitoaleksyn. Zgodnie z hipotezą Inghama substancje te powstają de novo, po zetknięciu się z patogenem. Tymczasem wiele roślin posiada te związki stale w swoim składzie chemicznym, bez względu na to, czy są zainfekowane, czy też nie, np. *Myroxylon balsamum (L.) Harm.* Prohibityny, inhibityny i postinhibityny są obecne zarówno w roślinach zdrowych jak i zaatakowanych przez mikroorganizmy chorobotwórcze, dzięki czemu możliwe jest wyodrębnienie tych składników z surowców roślinnych i wprowadzenie ich do preparatów dla zwierząt oraz ludzi. Koncepcję fitoaleksyn opracowali w 1941 r. K.O. Müller i H. Börger. Wg niej fitoaleksyną jest związek, który hamuje rozwój patogenu (*Guest, D. I. (2017). Phytoalexins, Natural Plant Protection. Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition). B. Thomas, B. G. Murray and D. J. Murphy. Oxford, Academic Press: 124-128.*

Czynnik hamujący jest odosobnionym związkiem chemicznym, produktem komórki gospodarza. Fitoaleksyna jest związkiem niespecyficznym w swoim toksycznym oddziaływaniu na patogen, jednakże organizmy chorobotwórcze mogą wykazywać zróżnicowaną wrażliwość na ten związek. Do fitoaleksyn należą substancje o różnorodnej budowie chemicznej, np. resweratrol (stylben), sulfotlenek cyklobrossyniny, momilakton A (diterpen), safinol (poliacetylen), skopoletyna (kumaryna), 7-hydroksykalamenen (seskwiterpen). Nie każdy fitoncyd jest jednocześnie fitoaleksyną (nie spełnia reguł Müllera i Börgera), jednakże każda fitoaleksyna jest fitoncydem. Obecnie zwrócono uwagę na fitoaleksyny ze względu na ich silne właściwości przeciwnowotworowe, np. brassynina, resweratrol. Najprostszą fitoaleksyną jest kwas benzoesowy, wytwarzany przez wiele roślin

w obliczu wtargnięcia patogenów do tkanek. Fitoaleksyny, prohibityny i inhibitory pełnią rolę obronną u roślin przed patogenami, podobnie jak przeciwciała i interferon u ludzi i zwierząt. Gdy odkryto fitoncydy, a potem fitoaleksyny, od razu rozpoczęto prace zmierzające do ich wyodrębnienia, stabilizacji i zastosowania w leczeniu. W dużej mierze przeszkodziły temu intensywnie rozwijane badania nad antybiotykami i sulfonamidami. Hodowle bakterii i grzybów wytwarzających antybiotyki oraz synteza sulfonamidów były niewątpliwie prostsze i tańsze oraz bardziej dostępne technologicznie od fitoncydów oraz fitoaleksyn. Z uwagi jednak na coraz większy problem z narastającą opornością bakterii i pierwotniaków na powszechnie używane chemioterapeutyki, obecnie w niektórych krajach (Szwajcaria, Niemcy, USA, Francja) ponownie wrócono do koncepcji wykorzystania fitoncydów w medycynie. Przy okazji poznano nowe właściwości lecznicze tych związków, np. przeciwmiażdżycowe, hipotensyjne, hipoglikemiczne, onkostatyczne i estrogenne. Już w latach 50. i 60. XX wieku w wielu badaniach stwierdzono, że fitoncydy siarkowe działają silniej i szybciej przeciwbakteryjnie na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne niż niektóre znane antybiotyki (np. bacytracyna, neomycyna). Dodatkowo fitoncydy siarkowe i izosiarkocyjanowe działają rozkurczowo, żółciopędnie, żółciotwórczo i hipotensyjnie (obniżają podwyższone ciśnienie krwi). Wzmagają przenikanie składników pokarmowych z jelit do krwi. Hamują rozwój bakterii gnilnych i grzybów chorobotwórczych. Wywierają wpływ pierwotniakobójczy. Pobudzają wydzielanie soków trawiennych, wzmagają apetyt, obniżają stężenie cholesterolu i glukozy we krwi. Ajoeny (olejki czosnkowe) hamują agregację krwinek, zapobiegając zakrzepicy. Lotny fitoncyd kopytnika, omanu, aksamitki, glistnika, czosnku lub nasturcji zabija prątki gruźlicze w ciągu 3 minut, czyli szybciej niż kwas karbolowy (fenol). Fitoncyd stylbenowy resweratrol wywiera wpływ przeciwnowotworowy, zmniejsza ryzyko zawału mięśnia sercowego, poprawia krążenie wieńcowe i hamuje agregację krwinek oraz tworzenie płytek miażdżycowych. Dodatkowo hamuje rozwój bakterii i grzybów oraz obniża podwyższony poziom glukozy we krwi (*H. Różański, J. Kilar, M. Ruda, Wpływ roślin fitoncydowych na utrzymanie zdrowotności zwierząt jeleniowatych w ekologicznej hodowli fermowej. LXXV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego. Materiały konferencyjne, Poznań 2011, s. 209; E. Strzelec, R. Niżnikowski, H. Różański, M. Klockiewicz, K. Głowacz, G. Czub, A. Darkowska, K. Szymański, A. Pokrop, Effect of use of herbal feed additive on coccidian invasion level and performance traits in goats, „Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW Animal Science” 2011, nr 49, s. 11–20*).

Wraz z rozwojem chemii analitycznej i fitochemii w XIX i w XX wieku odkrywano nowe związki naturalne o działaniu przeciwpasożytniczym, w tym pierwotniakobójczym. Wprowadzono wówczas do lecznictwa chininę, berberynę, pelleterynę, alantolakton, askaridol, santoninę i inne, najczęściej w postaci soli z kwasami nieorganicznymi (*Skowroński W., Farmakologia. Nakładem Polskiego Towarzystwa „Bratnia pomoc” Studentów Akademii Medycyny Weterynaryjnej, Lwów 1932, s. 183-191*).

W II połowie XX wieku zaczęto wykorzystywać sulfonamidy w leczeniu chorób pierwotniakowych. Niestety wraz z coraz częstszym stosowaniem leków chemicznych, szczególnie syntetycznych obserwowano narastanie oporności pasożytów na podawane leki. Fitoncydy i fitoaleksyny mogą stanowić pełnowartościową alternatywę dla antybiotyków i sulfonamidów. Będą więc tutaj należeć prohibityny, inhibityny, postinhibityny i właściwe fitoaleksyny, ponadto metabolity wtórne roślin, które wywierają działanie przeciwdrobnoustrojowe, odkażające, antyseptyczne in vivo i in vitro, w tym również związki nie zaliczane (na obecnym etapie badań) do czynników odporności typu fitoaleksyn. Początkowo fitoncydy określano jako antybiotyki wytwarzane przez rośliny wyższe (*B. Czerwiecki, Lexicon specificorum, FIWNIA Warszawa 1950, s. 320–323*).

Silne fitoncydy wytwarzają m.in. krwiściąg – *Sanguisorba*, piołun – *Artemisia Absinthium L.*, pokrzywa – *Urtica*, burak – *Beta*, cebula – *Allium cepa L.*, kukurydza – *Zea*, czosnek – *Allium sativum L.* lub *Allium ursinum L.*, gorczyca – *Sinapis*, barszcz – *Heracleum*, pieprz turecki – *Capsicum annuum L.*, czeremcha – *Prunus padus L.*, grab – *Carpinus*, topola – *Populus*, dąb – *Quercus*, jaśmin – *Jasminus*, dereń – *Cornus*, cis – *Taxus*, rzodkiew – *Raphanus*, brzoza – *Betula*, chrzan – *Cochlearia armoracia L.*, jałowiec – *Juniperus communis L.* Lotny fitoncyd czosnku zabija prątki gruźlicy w ciągu 3–5 minut, zatem szybciej niż kwas karbolowy. Fitoncydy stanowią potężny czynnik zmieniający skład mikroflor w atmosferze i glebie. Według B.P. Tokina i G.I. Nilowa 1 hektar jałowca wydziela w ciągu doby 3 kg lotnych fitoncydów; ilość ta wystarcza na wyjałowienie obszaru dużego miasta (*A. Danysz, Farmakologia i receptura, Ministerstwo Obrony Narodowej, Warszawa 1955, s. 41–46*). Rozwój badań biologów radzieckich nad fitoncydami datuje się od 1928 r. Najwięcej badań nad fitoncydami przeprowadził Borys Tokin, profesor biologii, autor wydanej w 1942 roku pracy pt. „Baktericydy rastitelnowo proischożdenia (fitoncydy)” oraz opublikowanej w 1948 r. pracy „Fitoncydy”, a także „Lecznicze środki roślinne (fitoncydy)” w 1949 r.

W ostatnich latach poszukiwanie nowych substancji przeciw drobnoustrojowym doprowadziło do znaczącego wzrostu zainteresowania związkami pochodzenia roślinnego. Przeglądowe opracowania dotyczące zastosowania fitoncydów w ostatnich latach zostały przedstawione w pracach: Degtyarik i in., Duka i Ardelean, Ahuja i in. (Degtyarik S. M., Slobodnitskaya, G. V., Grebneva, E. I., Benetskaya, N. A., Macksimyuk, E. V., & Bepalyi, A. V. (2017). *Effect of phytoncides of plants on viability and virulence of etiologic agents of bacterial infections in fish.* *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук*; Duka, R., & Ardelean, D. (2010). *Phytoncides and phytoalexins—vegetal antibiotics.* *Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal)*, 13(3), 19-25; Ahuja, I., R. Kissen and A. M. Bones (2012). *"Phytoalexins in defense against pathogens."* *Trends in Plant Science* 17(2): 73-90).

Zaobserwować można również znaczny wzrost prac przeglądowych i badawczych dotyczących zastosowanie olejków eterycznych. Dotyczą one wielokierunkowego ich zastosowania, począwszy od praktyki weterynaryjnej i wykorzystaniu w poprawie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób bakteryjnych i pasożytniczych, przez zabezpieczanie żywności, a skończywszy na wykorzystaniu ich właściwości leczniczych i bakteriobójczych (Aleksic Sabo, V. and P. Knezevic (2019). *"Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis Dehn. plant extracts and essential oils: A review."* *Industrial Crops and Products* 132: 413-429; Vergis, J., G. Palanisamy, R. Agarwal and A. Kumar (2013). *"Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review."* *Critical reviews in food science and nutrition* 55; Singh, A., A. K. Dwivedy, V. K. Singh, N. Upadhyay, A. K. Chaudhari, S. Das and N. K. Dubey (2019). *"Essential oils-based formulations as safe preservatives for stored plant masticatories against fungal and mycotoxin contamination: A review."* *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 17: 313-317; Pateiro, M., F. J. Barba, R. Domínguez, A. S. Sant'Ana, A. Mousavi Khaneghah, M. Gavahian, B. Gómez and J. M. Lorenzo (2018). *"Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review."* *Food Research International* 113: 156-166; Raut, J. S. and S. M. Karuppayil (2014). *"A status review on the medicinal properties of essential oils."* *Industrial Crops and Products* 62: 250-264; Nerio, L. S., J. Olivero-Verbel and E. Stashenko (2010). *"Repellent activity of essential oils: A review."* *Bioresource Technology* 101(1): 372-378; Deyno, S., A. G. Mtewa, A. Abebe, A. Hymete, E. Makonnen, J. Bazira and P. E. Alele (2019). *"Essential oils as topical anti-infective agents: A systematic review and meta-analysis."* *Complementary Therapies in Medicine* 47: 102224).

W rozporządzeniu (WE) nr 1831/2003 utrzymano kokcydiostatyki i wprowadzono histomonostatyki jako nową kategorię dodatków paszowych, przy jednoczesnym ustanowieniu

wycofania istniejących antybiotyków ze stosowania (i wprowadzania do obrotu) jako dodatki paszowe od dnia 1 stycznia 2006 r., biorąc pod uwagę, że stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych jako stymulatorów wzrostu wiąże się z ryzykiem selekcji szczepów bakteryjnych opornych na leki stosowane w leczeniu ludzi lub zwierząt. Ta kwestia była ściśle związana z Narodowym Programem Ochrony Antybiotyków w Polsce na lata 2006–2010, nadzorowany przez Ministerstwo Zdrowia. Zgodnie z wytycznymi Programu, aby chronić skuteczność terapeutyczną antybiotyków, należy również szczególną kontrolą objąć antybiotykoterapię weterynaryjną, której stosowanie powinno być poddane regulacjom analogicznym do wprowadzanych w medycynie. Antybiotyki stosowane w hodowli zwierząt sprzyjają powstawaniu selekcji i rozprzestrzenianiu się oporności wśród drobnoustrojów tam bytujących.

Lekooporne szczepy mogą przemieszczać się drogą łańcucha żywnościowego i zasiedlać przewód pokarmowy człowieka, tworząc rezerwuary potencjalnych patogenów, w tym również genów oporności, np. *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, które następnie mogą być przekazywane czynnikom etiologicznym zakażeń u ludzi (H. Różański, W. Drymel, *Preparaty ziołowe w profilaktyce zespołu zaburzonego wchłaniania i marskości wątroby u zwierząt. Polskie Drobiarstwo, cz. I 6/2010, s. 44-46; cz. II 7/2010, s. 28-30; cz. III 8/2010, s. 43-44*).

Niektóre oficjalne kokcydiostatyki mają również charakter antybiotyku o działaniu przeciwbakteryjnym, np. lasalocid jest polieterelem jonoforowym o działaniu antykokcydiowym i antybakteryjnym, wyizolowanym z *Streptomyces lasaliensis* w 1951 r. Również monenzyna (antybiotyk jonoforowy) wyodrębniona w 1967 r. z *Streptomyces cinnamonensis* posiada właściwości kokcydiostatyczne oraz antybakteryjne. Maduramycyna wytwarzana przez *Actinomadura rubra*, hamuje dodatkowo rozwój bakterii gram dodatnich. Antybiotyki te, pomimo, że były uzyskiwane z myślą o zastosowaniu w medycynie ludzkiej, nie znalazły w niej zastosowania z uwagi na toksyczność i działania uboczne, przewyższające wartość terapeutyczną. Pomimo ich wiadomej toksyczności i możliwości tworzenia oporności krzyżowej z innymi antybiotykami oraz kumulacji w produktach pochodzenia zwierzęcego w razie niewłaściwego użycia, EFSA nie zebrała do tej pory dostatecznych dowodów pozwalających na wycofanie ich z produkcji zwierzęcej. Niemniej jednak dyskusje na ten temat trwają i są co pewien czas podsycane przez protesty rozmaitych organizacji konsumenckich i ekologicznych (Różański H., Drymel W.: *Adicox jako źródło fitoaleksyn i fitoncydów. Polskie Drobiarstwo. 12/2010, s. 17-20*).

Podstawowym problemem ograniczającym skuteczność antybiotyków, sulfonamidów i antybiotykowych stymulatorów wzrostu jest antybiotyko- i sulfonamidooporność, czyli uodpornienie się drobnoustrojów na statyczne lub bójcze działanie chemioterapeutyków. Nabywanie oporności przez bakterie (również grzyby i pierwotniaki patogenne) powstaje wskutek selekcji lub adaptacji. Uodpornianie się drobnoustrojów może polegać na zmianach ich metabolizmu, w wyniku czego zostaje ominięta „zablokowana” przez chemioterapeutyk droga przemiany lub na wytwarzaniu enzymów rozkładających leki przeciwdrobnoustrojowe, np. penicylinooporny szczep gronkowca złocistego wytwarza enzym – penicylinazę, rozkładającą penicylinę. Jest to odporność chromosomalna. Odporność na chemioterapeutyki (np. fluorochinolony, antybiotyki, sulfonamidy) może być wywołana zahamowaniem przenikania leku do wnętrza komórki patogenu, np. w przypadku tetracyklin. Oporność na ogólnie stosowane chemioterapeutyki jest również przekazywana między drobnoustrojami na drodze pozachromosomalnej (plazmidy). Antybiotyko- sulfonamido-, czy fluorochinolonooporność jest właściwością drobnoustrojów, przekazywaną następnym pokoleniom, przy czym często jest to tzw. oporność krzyżowa, tzn. patogen oporny na jeden chemioterapeutyk staje się równocześnie oporny na wiele innych, najczęściej o podobnym mechanizmie działania. Oporność krzyżową stwierdza się np. w stosunku do tetracyklin, częściowo do penicylin i cefalosporyn, do antybiotyków makrolidowych (A. Danysz, W. Buczko, *Kompendium farmakologii i farmakoterapii*, Urban i Partner, Wrocław-Warszawa 2008).

W związku z wprowadzeniem i niekontrolowanym stosowaniem powszechnie coraz większego asortymentu i często w sposób nieprawidłowy chemioterapeutyków narasta niebezpieczeństwo związane z zakażeniami grzybiczymi, wirusowymi oraz wywołanymi przez *Actinobacter* czy *Chlamydia*. Drugim niebezpieczeństwem chemioterapii są enzymy inaktywujące leki przeciwdrobnoustrojowe i antyparazytyczne. Poza beta-laktamazą i dehydropeptydazą I wykryto enzymy unieczynniające aminoglikozydy. Większość antybiotyków stosowanych w leczeniu wywiera niekorzystny (immunosupresyjny) wpływ na układ odpornościowy. W związku z tym powstała idea zastosowania w chemioterapii zakażeń dodatkowo środków immunostymulujących (A. Danysz, *Kompendium farmakologii i farmakoterapii. Volumed*, Wrocław 1994, s. 110).

Wiele fitoncydów posiada równocześnie działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwpasożytnicze i immunostymulujące, np. laktony seskwiterpenowe Tanacetum, kapsaicyna, piperyna, czy latreozyd z *Lathraea* (H. Różański, *Dzieje badań i stosowania*

w medycynie krajowych roślin pasożytniczych z rodziny *Scrophulariaceae* oraz *Cuscutaceae*, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań 2004; W. Roeske, *Zarys fitoterapii. Farmakologia i receptura ziół leczniczych*, PZWL Warszawa 1955, s. 76–78; D. Korniewicz, H. Różański, *Effectiveness of active substances of plant origin in pigs feeding*, „Mag. Wet.”, Supl. Świnie, 2006, 22–24).

Świadczą o tym ostatnie niepokojące doniesienia o szczególnej zjadliwości niektórych szczepów *E. coli* oraz *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* są odporne na wankomycynę (VRE), „antybiotyk ostatniej szansy”, wytwarzany przez *Amycolatopsis orientalis*. Enterokokowe geny oporności na antybiotyki trafiają do innych bakterii, np. gronkowców i pałeczek okrężnicy. W XX wieku odkryto linezolid – syntetyczny antybiotyk hamujący syntezę białka u bakterii. Jednak wśród wankomycynoopornych szczepów VRE już się pojawiły szczepy odporne na linezolid. Udokumentowano oporność kliniczną na metronidazol pierwotniaków, np. rzęsistka pochwowego, lamblii, ponadto wielu bakterii beztlenowych. In vitro spostrzeżono również narastanie oporności wśród trofozoitów pełzaka czerwonej wskutek stopniowego podwyższania dawek metronidazolu (Brunton L.L., Lazo J., S., Parker K.L., *Farmkologia Goodmana and Gilmana, tom II*. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2007, s. 1127-1129).

Fitoncydy mogą pomóc w rozwiązaniu problemu oporności na chemioterapeutyki nie tylko bakterii, ale również pierwotniaków.

W produkcji zwierzęcej niebezpieczna stała się chemioprophylaktyka. Przy właściwym wskazaniu może być przydatna i wartościowa, jednakże w wielu przypadkach jest bezużyteczna, a nawet niebezpieczna (zakażenie bakteriami i pierwotniakami lekoopornymi, zamaskowanie objawów chorobowych). Nie należy stosować chemioprophylaktyki w okolicznościach zaniedbań zootechnicznych i żywieniowych, bowiem niewątpliwie prowadzi to do pograżania chemioterapii weterynaryjnej i ludzkiej.

Największy problem stwarza wyodrębnianie z surowców roślinnych fitoncydów oraz ich identyfikacja i stabilizacja. Do tej pory wykonano niewiele badań nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi czystych form chemicznych fitoncydów. Właściwości przeciwbakteryjne i fungistatyczne fitoncydów utożsamiane są z całymi frakcjami substancji lub ekstraktami z roślin leczniczych, a nie z konkretnymi związkami (R. Niżnikowski, E. Strzelec, H. Różański, M. Klockiewicz, K. Głowacz, G. Czub, A. Darkowska, K. Szymański, A. Pokrop: *The effect of addition of phytoncides treatment to concentrate on growth performance and dairy traits in goats*. IDF International Symposium on Sheep, Goat and other

non-Cow Milk, Athens, May 2011; W. Drymel, H. Róžański, Wykorzystywanie fitoaleksyn w poprawie zdrowotności zwierząt gospodarskich. The Polish Branch of World's Poultry Science Association. XXII International Poultry Symposium PB WPSA, „Science for poultry practice – poultry practice for science”. Olsztyn 2010, s. 151).

W Dziale Badań i Rozwoju AdiFeed opracowano szereg preparatów opartych na fitoncydach. Pomimo ich wprowadzenia na rynek cały czas prowadzone są badania naukowe *in vitro* i *in vivo*, ponadto testy terenowe na większej populacji zwierząt gospodarskich (drób, zwierzęta futerkowe, trzoda chlewna, przeżuwacze). Technologia produkcji preparatów fitoncydowych jest skomplikowana, bowiem są to związki labilne (nie trwałe) i reaktywne (wchodzą w reakcję, podlegają spontanicznym przemianom). Część z nich jest lipofilna (rozpuszczają się dobrze w rozpuszczalnikach organicznych, np. tłuszczach, alkoholach), inne z kolei są hydrofilowe (dobrze rozpuszczalne w wodzie). Dlatego też wiele preparatów fitoncydowych ma charakter dwufazowy i przybiera postać emulsji.

Fitoncydy należą do różnorodnych związków chemicznych i stąd preparaty z nich mogą być alkaloidowe, polifenolowe, fenolowe, terpenowe, antrachinonowe, irydoidowe, kumarynowe, poliacetylenowe, saponinowe, czy też fenyloalkiloaminowe. Fitoncydy należące do różnych grup chemicznych mogą wzajemnie wzmacniać i uzupełniać swoje działanie przeciwdrobnoustrojowe, albo też działać antagonistycznie i znosić swoją aktywność.

Dodatek różnych metali, np. żelaza, w niskich stężeniach, wzmacnia działanie antybakteryjne i antyparazytyczne fitoncydów. W mechanizmie działania antyseptycznego i antyparazytycznego wykorzystano efekt oligodynamiczny, Zauważył on, że metale mogą hamować rozwój mikroorganizmów i roślin, jeśli są w odpowiednim stężeniu w środowisku. W XIX wieku nie potrafiono wyjaśnić mechanizmu efektu oligodynamicznego. Do takich metali przeciwdrobnoustrojowych, antyseptycznych należą m.in. miedź, żelazo, srebro, mangan, rtęć, bizmut, cyna, cynk (Róžański H. *Środki antyseptyczne i odkażające stosowane w medycynie dawnej i współczesnej. Lek w Polsce, vol. 14 nr 3'04, s. 66-77. Vol 13 (154) nr 10/2003, s. 68-81, vol 13 (155) nr 11/2003, s. 94-110; Penzoldt F.: Podręcznik farmakologii klinicznej dla użytku lekarzy i studentów. Druk Maryi Ziemkiewiczowej, Warszawa 1891, s. 9-42).*

Wiele z nich znalazło trwałe zastosowanie w lecznictwie. Wkrótce zwrócono też uwagę na „czystość” klamek metalowych (np. mosiężnych i stalowych) w szpitalach, które pomimo, że są dotykane przez licznych chorych pacjentów, na swojej powierzchni nie zawierają aktywnych

patogennych bakterii, które z kolei występują licznie na przedmiotach drewnianych, podłogach, tworzywach sztucznych, czy pościeli. Tłumaczy się to zjawisko właśnie efektem oligodynamicznym. Również wody, w tym wody zdrojowe zasobne w rozmaite metale są bardzo ubogie w bakterie. Zanim w medycynie zaczęto stosować antybiotyki i sulfonamidy, powszechnie używanymi chemioterapeutykami i antyseptykami były preparaty bizmutu, srebra, rtęci, żelaza, miedzi, złota, platyny, cyny i cynku (*Butkiewicz T.: Chirurgia ogólna. PZWL Warszawa 1954; s. 31-45*). W XX wieku nawet łączono antybiotyki (np. bacytracynę z cynkiem) i sulfonamidy (np. sól srebrowa sulfadiazyny) z metalami dla uzyskania efektywniejszego działania bakteriostatycznego (*Chruściel T., Gibiński K. (red.): Leksykon leków. PZWL Warszawa 1991, s. 484-485*). Podwójny mechanizm działania przeciwbakteryjnego soli srebrowej sulfadiazyny utrudnia powstawanie szczepów opornych (*Ibidem, s. 485*). Podobną korzyść uzyskuje się po połączeniu fitoncydów z metalami (*Drymel W., Różański H.: Wykorzystywanie fitoaleksyn w poprawie zdrowotności zwierząt gospodarskich. The Polish Branch of World's Poultry Science Association. XXII International Poultry Symposium PB WPSA, „ Science for poultry practice – poultry practice for science. Olsztyn 2010, s. 151; Korniewicz D., Różański H., Effectiveness of active substances of plant origin in pigs feeding. Mag. Wet., Supl.-Świnie., 2006, 22-24*).

Jeżeli do wody destylowanej dodać metalicznego srebra, to nabiera ona właściwości bakteriobójczych, mimo, iż stężenie jonów wynosi w tych warunkach zaledwie 1: 20 000 000. Działanie to nosi nazwę efektu oligodynamicznego, a jego mechanizm nie jest jasny, mimo wielu wysuwanych hipotez (*Kostowski W., Herman Z. (red.): Farmakologia. Podstawy farmakoterapii. PZWL Warszawa 2003; wyd. III; Tom II, s. 271; Kostowski W., Kubikowski P. Farmakologia. Podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej. Wyd. III. PZWL Warszawa 1991, s. 740-741*). Jedną z hipotez upatruje efekt oligodynamiczny w zakłócaniu rozmieszczenia ładunków jonowych w obrębie błon komórkowych, zakłócanie biegunowości komórki. Wiele metali destabilizuje (poprzez przyłączanie się) również strukturę kluczowych białek (enzymów, białek kanałowych) i kwasów nukleinowych.

Choroby zwierząt i ludzi, wywołane przez pierwotniaki, są przyczyną znacznej zachorowalności i śmiertelności na całym świecie. Stosowanie chemioterapeutyków w leczeniu zakażeń pierwotniakowych okazało się być problematyczne, ze względu na narastającą lekooporność, zmienną skuteczność między szczepami lub gatunkami oraz toksyczność. Istnieje silna potrzeba znalezienia nowych, skutecznych rozwiązań do leczenia tych chorób.

Podczas analizy doniesień literaturowych i opisu stanu techniki zaobserwowano, iż publikowane badania w głównej mierze opierają się na analizie właściwości hamujących rozwój pierwotniaków (IC_{50} i IC_{100}) w okresie 24 do 72 godzin. Zdecydowanie mniejszy odsetek badaczy wykonywał analizy pod kątem dawki śmiertelnej dla pierwotniaków.

Zastosowanie surowców roślinnych, w terapii parazytoz, jest powszechne w medycynie naturalnej i tradycyjnej. Dotychczasowe badania wykazały, że rośliny lecznicze zawierają związki aktywne, które wykazują silne działanie przeciwko pierwotniakom. Przykładem powszechnie stosowanego naturalnego środka przeciw pasożytniczego pochodzenia roślinnego jest chinina – alkaloid z kory drzewa chinowego, artymizynina - seskwiterpen z *Artemisia annua* oraz *Artemisia indica* (*Hygeia Public Health* 2014, 49(3): 442-448).

Opublikowano także wiele doświadczeń naukowych, w których wykazano (in vitro i in vivo) hamowanie rozwoju pierwotniaków przez zastosowanie ekstraktów roślinnych i wyselekcjonowanych z nich metabolitów wtórnych: olejków eterycznych, alkaloidów, związków fenolowych (*Natural products as sources of antiprotozoal drugs. Current Opinion in Anti-infective Investigational Drugs* 2000; 2, 47–62).

Znane są oparte na miedzi kompleksy działające poprzez interakcje z DNA pierwotniaków, np. *Trypanosoma cruzi*. Becco i in. wykazali wpływ hamujący na rozwój 50% populacji (IC_{50}) dla syntezowanych przez siebie związków na poziomie 3.9 ± 1.5 do $11.3 \pm 3.8 \mu\text{M}$, w porównaniu do leku Nifurtimox ($6 \mu\text{M}$). Wartość IC_{100} osiągnięto dla analizowanych związków przy stężeniu $>20 \mu\text{M}$ (Becco, L., Rodríguez, A., Bravo, M. E., Prieto, M. J., Ruiz-Azuara, L., Garat, B., Moreno V., Gambino, D. (2012). *New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. Journal of inorganic biochemistry*, 109, 49-56).

Inni badacze zaproponowali kompleksy wanadu z 2,2'-bipirydyny lub dipirydno [3,2-a: 2',3'-c]fenazyny oraz semikarbazyd aldehydu salicylowego lub jego pochodną semikarbazyd aldehydu 5-bromosalicylowego. Podobnie jak w przypadku poprzednich badaczy substancją, do której autorzy odnieśli swoje wyniki był nifurtimoks. Uzyskali oni wyniki IC_{50} , dla czterech wariantów kompleksów, w przedziale $13-84 \mu\text{M}$ (Benítez, J., L. Guggeri, I. Tomaz, G. Arrambide, M. Navarro, J. Costa Pessoa, B. Garat and D. Gambino (2009). "Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents." *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(4): 609-616).

Podobne analizy przeprowadziły dwa zespoły badaczy Martins i in. oraz Paixão i in. W swoich badaniach skupili się na wykorzystaniu jonów miedzi do stworzenia kompleksów wykazujących właściwości przeciwko *Trypanosoma cruzi*. Pierwsza grupa badaczy z powodzeniem wykorzystwała do stworzenia kompleksów powszechnie stosowane antybiotyki (lewofloksacynę i sparfloksacynę) (Martins, D. A., Gouvea, L. R., Batista, D. D. G. J., Da Silva, P. B., Louro, S. R., Maria de Nazaré, C. S., & Teixeira, L. R. (2012). *Copper (II)-fluoroquinolone complexes with anti-Trypanosoma cruzi activity and DNA binding ability. BioMetals*, 25(5), 951-960). Natomiast Paixão i in., podobnie jak Benítez i in., stworzyli kompleksy o ogólnym wzorze $[Cu(N_O)(N_N)]^{2+}$, z wykorzystaniem 2-metoksybenzhydrazyd, 4-metoksybenzhydrazyd oraz trzy ligandy α -diiminowe: 1,10-fenantrolinę, 2,2'-bipirydynę i 4,4'-dimetoksy-2,2'-bipirydynę (Paixão, D. A., Lopes, C. D., Carneiro, Z. A., Sousa, L. M., de Oliveira, L. P., Lopes, N. P., Pivatto M., Chaves J.D.S., de Almeida M.V., Ellena J., Moreira M.B., Netto A.V.G., de Oliveira R.J., Guilardi S., de Albuquerque S., Guerra W Moreira, M. B. (2019). *In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of ternary copper (II) complexes and in vivo evaluation of the most promising complex. Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 157-166).

Kompleksy sulfoaminoamidowe z ugrupowaniem 8-aminochinolinowym miedzi i cynku wykazały skuteczność wobec patogennych szczepów *Leishmania braziliensis*, *chagasi* i *Trypanosoma cruzi*. Ich najniższe IC₅₀ określono na 0,35 mM (około 0,034%) w warunkach laboratoryjnych (Everson da Silva, L., Teixeira, D. S. J., Nunes Maciel, E., Korting Nunes, R., Eger, I., Steindel, M., & Andrade Rebelo, R. (2010). *In vitro antiprotozoal evaluation of zinc and copper complexes based on sulfonamides containing 8-aminoquinoline ligands. Letters in Drug Design & Discovery*, 7(9), 679-685).

Inne syntetyczne kompleksy metali tj. manganu, kobaltu, niklu w postaci 4'-(2-ferrocenyl)-2,2':6'2"-terpyridyniowych pochodnych w warunkach in-vitro były bardzo skuteczne przy stężeniu 1,1 mM wobec *Plasmodium falciparum*. Autorzy udowodnili skuteczność mieszanin soli manganu, żelaza, kobaltu, niklu i miedzi (Al-Khodir, F. A. I., & Refat, M. S. (2017). *Investigation of coordination ability of Mn (II), Fe (III), Co (II), Ni (II), and Cu (II) with metronidazole, the antiprotozoal drug, in alkaline media: Synthesis and spectroscopic studies. Russian Journal of General Chemistry*, 87(4), 873-879).

Wykazano również możliwości skutecznego tworzenia kompleksów i powszechnie stosowanym antybiotykiem o silnym działaniu przeciwpierwotniaczym (Metronidazol), z metalami m.in. Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), i Cu(II) (Al-Khodir, F. A. I. and M. S. Refat

(2017). "Investigation of coordination ability of Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), and Cu(II) with metronidazole, the antiprotozoal drug, in alkaline media: Synthesis and spectroscopic studies." *Russian Journal of General Chemistry* 87(4): 873-879).

Wzmocnienie aktywności przeciwpierwotniakowych jonów metali miedzi i cynku w syntetycznych kompleksach organicznych imidazopirydyniowych i diarylopiperydyniowych założy również swoją ochronę patentową. I tak, w patencie US6291480B1 oraz US20060178358 udowodniono aktywność pochodnych diarylopierydyliowych wobec *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* oraz *Emerica* gatunków: *tenella*, *acervulina*, *necatrix*, *brunetti maxima*. Innym przykładem zastosowań przeciwpierwotniakowych kompleksów metali, w tym miedzi i niskocząsteczkowych związków bioorganicznych (US20110207701A1).

Dotychczasowe badania nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi pokazały bardzo silne działanie olejków eterycznych. Escobar, P i in. przeprowadzili badania właściwości przeciwpierwotniaczych dla 5 roślin z rodzaju *Lippia*. Pozyskane olejki przeanalizowali pod kątem pod kątem hamowania rozwoju pierwotniaków na *Trypanosoma cruzi* oraz *Leishmania chagasi*, w odniesieniu nifurtimoksu. Uzyskali oni wartości IC₅₀ od 4,4 do >100 µg/ml, natomiast w przypadku nifurtimoksu wartość ta wyniosła 0,3-0,4 µg/ml (Escobar, P., Milena Leal, S., Herrera, L. V., Martinez, J. R., & Stashenko, E. (2010). *Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian Lippia spp essential oils and their major components. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 184-190).

Podobnie ze zgłoszenia WO2008101131 A1 znana jest kompozycja do zabijania lub odpychania pasożytów zewnętrznych i/lub szkodników, zawierająca co najmniej 3% olejku eterycznego *Lippia javanica* i co najmniej jeden inny olejek eteryczny.

Inna grupa badaczy wykazała wpływ olejków eterycznych z *Annona coriacea* na *Trypanosoma cruzi* oraz różne gatunki leishmanii (*Leishmania (L.)*: *amazonensis*, *braziliensis*, *chagasi*, *major*). Do analizy porównawczej wykorzystano dwa powszechnie stosowane, w przypadku wystąpienia leishmaniozy, związki pentamidynę oraz benznidazol. Uzyskane wartości dla olejków eterycznych (39,93-261,20 µg/mL) były znacznie wyższe niż dla testowanych leków (odpowiednio 0,06-0,22 µg/mL i 45,02 µg/mL) (Siqueira, C. A. T., J. Oliani, A. Sartoratto, C. L. Queiroga, P. R. H. Moreno, J. Q. Reimão, A. G. Tempone and D. C. H. Fischer (2011). "Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity." *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21: 0-0).

Perez i in. w swojej pracy przeglądowej zebrali informację o właściwościach przeciwpierwotniaczych, IC₅₀ (*Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania sp*, *Trypanosoma cruzi*) dla m.in. olejku tymiankowego, czosnkowego, bazyliowego, lawendowego, herbacianego czy też krwawnikowego. Wykazali oni właściwości przeciwpierwotniakowe olejków eterycznych w bardzo szerokim przedziale stężeń, od 8.3 ng/ml do 8mg/ml (Pérez, S., M. Ramos-Lopez, E. Sánchez-Miranda, M. Fresán-Orozco and J. Pérez-Ramos (2012). "Antiprotozoa activity of some essential oils." *Journal of medicinal plant research* 6: 2901-2908).

Monzote i in. zebrali w swojej pracy doniesienia literaturowe dotyczące właściwości przeciwpasożytniczych olejków eterycznych, które powstały na przestrzeni lat 1988-2012. Prezentują oni znaczny wzrost zainteresowania i ilości badań nad zastosowaniem olejków eterycznych w zwalczaniu pierwotniaków (Monzote, L., O. Alarcón and W. Setzer (2012). "Antiprotozoal Activity of Essential Oils." *Agriculturae Conspectus Scientificus* 77: 167-175).

Natomiast Moon i in., w pracy badawczej, przedstawili właściwości pierwotniakobójcze dwóch olejków lawendowych przeciwko *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* oraz *Hexamita inflata*. Wykazały one, iż stężenie 0,1% olejku lawendowego działa bójczo w stosunku do analizowanych pierwotniaków (Moon, T., J. Wilkinson and H. Cavanagh (2006). "Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*." *Parasitology research* 99: 722-728).

Natomiast ze zgłoszenia EP2070427 A1 znane jest zastosowanie co najmniej jednego związku olejku eterycznego wybranego z grupy składającej się z aldehydu cynamonowego, 2-decenalu i nerolidolu jako lub w preparacie histomonastatu. Korzystnie związek olejku eterycznego jest dodatkowo łączony z co najmniej jednym związkiem wybranym z grupy obejmującej p-cymen, tymol, aldehyd salicylowy, olejek z drzewa herbacianego, olejek miętowy, aldehyd kuminowy, kwas cynamonowy, cynamon alkohol, farnezał i farnezyloaceton.

Ze zgłoszenia EP2119363 A2 znana jest kompozycja przeciwdrobnoustrojowa na bazie olejków eterycznych roślin, o zwiększonej skuteczności przeciwdrobnoustrojowej, zawierająca: co najmniej dwa olejki eteryczne z roślin jako główny składnik; i niewielką, ale przeciwbakteryjnie skuteczną ilość wzmacniacza wybranego z grupy składającej się z polijonowych organicznych wzmacniaczy (np. polietylenoimina) i polijonowych nieorganicznych wzmacniaczy (np. tripolifosforan sodu, heksametafosforan sodu)

Z dokumentu US2014106012 AA znana jest kompozycja zawierająca: olejek eteryczny wybrany z grupy obejmującej olejek anyżowy, olejek rozmarynowy, olejek nagietkowy, olejek z drzewa herbacianego, olejek sasafrasowy, olejek quasi, olejek cynamonowy, olejek goździkowy, olejek eukaliptusowy, olejek lawendowy, olejek miętowy, lub ich kombinacje; od około 10 procent do około 30 procent (v/v) alkoholu izopropylowego; od około 30 procent do około 50 procent (v/v) mirystynianu izopropylu; od około 5 procent do około 20 procent (v/v) oleju silikonowego; i od około 5 procent do około 25 procent (v/v) trójglicerydu kaprynowego / kaprylowego.

Z dokumentu EP1512409 B1 znana jest wodna kompozycja do zwalczania wszy głowowych i ich jaj, która zawiera jako składniki aktywne co najmniej jeden olejek eteryczny, znanymi tym, że kompozycja zawiera ponadto napar z: suszonych liści mięty pieprzowej, herbaty i czosnku. Natomiast ujawniony sposób wytwarzania wspomnianej kompozycji obejmuje następujące etapy: wykonanie naparu z liści mięty pieprzowej, herbaty i czosnku we wrzącej wodzie i pozostawienie do ostygnięcia, dodanie olejków eterycznych do schłodzonego naparu, a następnie zmieszanie ochłodzonego naparu z surfaktantami i środkami zagęszczającymi z wytworzeniem żelu.

Z patentu EP1089745 B1 znane jest zastosowanie ekstraktu z oregano lub produktu metabolicznego ekstraktu z oregano do wytwarzania leku do zmniejszania lub eliminowania ameby jelitowej wybranej z grupy obejmującej *Entamoeba hartmanni*, *Blastocystis hominis*, *Endolimax nana* i *Entamoeba histolytica* u ludzi potrzebujących leczenia przeciwpiętowotniakowego. Przy czym ujawniony lek jest przystosowany do podawania w postaci zemulgowanej tabletki o przedłużonym uwalnianiu zawierającej karwakrol jako składnik aktywny.

Natomiast z dokumentu US2014037698 AA (EP2666364 (B1)) znany jest dodatek do paszy dla zwierząt zawierający połączenie soli kwasu organicznego z co najmniej jednym składnikiem aktywnym pochodzenia roślinnego, połączenie to częściowo pokryte olejami roślinnymi i / lub tłuszczami. Przy czym, aktywne składniki pochodzenia roślinnego obejmują olejki eteryczne wybrane z grupy składającej się z imbiru, piperyny, oregano, tymolu, karwakrolu, aldehydu cynamonowego, czosnku i ich kombinacji. Natomiast kwas organiczny korzystnie wybrany jest z grupy obejmującej masłowy, propionowy, mrówkowy, mlekowy, cytrynowy, laurynowy, kaprynowy, kaprylowy, kaprynowy i octowy. Dodatek ma właściwości przeciwpiętowotniakowe.

Celem wynalazku jest zapewnienie nowej kompozycji do zwalczania pierwotniaków o właściwościach bójczych.

Istotą wynalazku jest kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek cedrowy, charakteryzująca się tym, że olejek cedrowy występuje w postaci kompleksu z kwasem organicznym i metalem.

Korzystnie kwas organiczny jest wybrany z grupy obejmującej kwas octowy, kwas propionowy, kwas mlekowy.

Korzystnie metal jest wybrany z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich tlenki lub sole.

Korzystnie stosunek olejku cedrowego do kwasu organicznego wynosi od 1:80 do 80:1.

Korzystnie stosunek olejku cedrowego do kwasu organicznego wynosi 1:1.

Kolejną istotą wynalazku jest sposób wytwarzania kompozycji pierwotniakobójczej według wynalazku, charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy:

- a) zmieszanie olejku cedrowego z kwasem organicznym w stosunku wagowym od 80:1 do 1:80;
- b) dodanie katalizatora do mieszaniny z etapu a)
- c) dodawanie metalu wybranego z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich sole lub tlenki;
- d) ogrzewanie mieszaniny z katalizatorem uzyskanej w etapie c) do temperatury wrzenia oraz kontynuowanie ogrzewania w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 20-120 minut;
- e) odstawienie produktu reakcji do wystygnięcia na okres od 10 do 24 godzin;
- f) filtrowanie ostudzonego produktu reakcji

Korzystnie kwas organiczny stosowany w etapie a) jest wybrany z grupy obejmującej kwas octowy, kwas propionowy, kwas mlekowy.

Korzystnie jako katalizator stosuje się mieszaninę siarczanu kobaltu, molibdenianu amonu oraz chlorku lub siarczanu manganu.

Kolejną istotą wynalazku jest zastosowanie kompozycji według wynalazku do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi.

Wynalazek dostarcza następujących korzyści:

- właściwości pierwotniakobójcze kompozycji zapewniają całkowitą eliminację infekcji;
- kompozycja według wynalazku działa w niskich stężeniach;
- kompozycja według wynalazku wykazuje szerokie spektrum działania – tj. wykazuje dobre działanie bójcze wobec wielu gatunków pierwotniaków;
- kompozycja według wynalazku może stanowić alternatywę dla chemioterapeutyków pierwotniakobójczych (Antiprotozoal), takich jak np. metronidazol, albendazol, tynidazol, chlorochina, sulfonamidy lub może też stanowić dodatek do chemioterapeutyków przeciwpierwotniakowych, zmniejszający ryzyko powstania oporności na dany lek.

Wynalazek szczegółowo przedstawiono w poniższych przykładach wykonania, przy czym wszystkie opisane poniżej testy i procedury doświadczalne przeprowadzono z zastosowaniem komercyjnie dostępnych zestawów testowych, odczynników i aparatury, postępując zgodnie z zaleceniami producentów stosowanych zestawów, odczynników i aparatury, o ile nie wskazano wyraźnie inaczej. Wszelkie parametry testowe mierzono z zastosowaniem standardowych, powszechnie znanych metod stosowanych w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek.

Wszystkie wykorzystane do badań surowce dopuszczone są zarówno do żywienia zwierząt jak i ludzi przez odpowiednie dyrektywy oraz organy. Doboru surowców dokonano na podstawie Codex Alimentarius, czyli Kodeksu Żywnościowego utworzonego przez FAO i WHO, Der Deutsche Arzneimittel-Codex (DAC), wytycznych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority – EFSA) oraz Rozporządzenia (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt Ponadto olejki eteryczne wykorzystane do badań spełniały wymagania Farmakopei Europejskiej, Szwajcarskiej oraz Der Deutsche Arzneimittel-Codex (DAC)

Natomiast do badań *in vitro* aktywności przeciwpierwotniakowej kompozycji według wynalazku wytypowano 5 organizmów reprezentujących grupy taksonomiczne, do których należą pierwotniaki chorobotwórcze, tj.:

- *Amoeba proteus* – pełzak odmieniec – pierwotniak z rzędu *Euamoebida*, należący do supergrupy 5 *Amoebozoa*, żyjący w wodach.

- *Paramecium caudatum* – pantofelek ogoniasty reprezentujący orzęski *Ciliata*, żyjący w wodach.
- *Gregarina blattarum* – gregaryna izolowana z karaczanów, reprezentujący typ *Apicomplexa*, żyjący w przewodach pokarmowych lub jamach ciała bezkręgowców.
- *Euglena gracilis* – pierwotniak żyjący w wodach, reprezentujący wiciowce - *Mastigophora*, rodzinę *Euglenaceae*.
- *Trichomonas hominis* – pierwotniak żyjący w jelicie grubym człowieka, reprezentujący *Trichomonadidae*.

Przy czym, *Amoeba*, *Paramecium*, *Trichomonas* i *Euglena* obserwowano pod mikroskopem na szkiełkach zegarkowych z włóknami waty wiskozowej (w celu ułatwienia obserwacji) w kropli wody z hodowli, z której pochodziły. Do prób badanych wprowadzano różne koncentracje badanych kompozycji, ustalając dawkę LD₅₀ (śmiertelność 50%) i dawkę LD₁₀₀ (śmiertelność 100%). We wszystkich przypadkach zastosowano 4-krotne powtórzenia badania wraz z próbą ślepą.

Gregaryny izolowano z karaczanów i po umieszczeniu na szkiełku zegarkowym, w roztworze Ringera, poddawano działaniu produktów w różnym stężeniu. Każda próbka obejmowała dziesięć osobników. Ustalano śmiertelne stężenie substancji dla 50% i 100% osobników (LD₅₀, LD₁₀₀) w ciągu 3 minut. Izolacji gregaryn z karaczanów dokonano na podstawie sposobu izolacji gregaryn z chrząszczy zaproponowanego przez J. Moraczewskiego (*Moraczewski J. Ćwiczenia z zoologii bezkręgowców. Wydanie I, PWN, Warszawa 1974 r., s.29-31, 285-292*).

Identyfikacji poszczególnych pierwotniaków dokonano na podstawie ich opisów i rysunków za W.A. Dogiel oraz J. Hempel-Zawitkowską (*Dogiel W.A.: Zoologia bezkręgowców. Wydanie III, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne 1972r; Hempel-Zawitkowska J., Gałka B., Kalińska B., Kamionek M., Komosińska H., Pezowicz E., Podsiadło E., Sulgostowska T.: Zoologia dla uczelni rolniczych. Wydawnictwo Naukowe PWN 2008 r.*).

Wszystkie badane preparaty (tj. kompozycje według wynalazku oraz próby kontrolne), przed podaniem na szkiełko zegarkowe, rozpuszczano w roztworze wodnym polisorbatu 80 (0,05%). Nie stwierdzono działania bójeznego polisorbatu 80 w ww. stężeniu.

Przykład 1.

Połączenie olejku cedrowego (*Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière, *Cedrus deodara* (Roxb. ex D. Don) G. Don, *Cedrus libani* A. Rich.) z kwasami (octowy, propionowy, mlekowy) w stosunku 1:1 oraz metalem (miedzią, manganem i cynkiem).

W tym nieograniczającym przykładzie wykonania przygotowano dziewięć następujących kompozycji:

- a) kompozycję I – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i miedzią
- b) kompozycję II – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i manganem
- c) kompozycję III – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i cynkiem
- d) kompozycję IV – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i miedzią
- e) kompozycję V – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i manganem
- f) kompozycję VI – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i cynkiem
- g) kompozycję VII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym i miedzią
- h) kompozycję VIII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym oraz manganem
- i) kompozycję IX – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym i cynkiem.

Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowano sole metali w postaci węglanów, natomiast w kompozycji według wynalazku można stosować również inne sole (np. chlorki, siarczany) lub inne formy, np. tlenki.

W celu wytworzenia kompozycji I, do 100 ml olejku cedrowego dodano 100 ml kwasu octowego, 0,6 g katalizatora (zawierającego siarczan kobaltu, molibdenian amonu oraz chlorek manganu w stosunku 1:1:1) oraz 5 g węglanu miedzi. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia, do czasu zmiany barwy, pod chłodnicą zwrotną przez 20 minut. Następnie mieszaninę pozostawiono do wychłodzenia (przez 10 godzin) i uzyskania klarownego roztworu (jedno, dwu lub trójfazowego). Po tym czasie produkt reakcji filtrowano przez bibułę filtracyjną. Kompozycje II-IX wytworzono analogicznie do kompozycji I.

Kompozycje I-IX zostały następnie poddane analizie pod kątem ich właściwości pierwotniakobóczych. W tym celu obie kompozycje rozcieńczano: 0,001% do 1%, po czym umieszczano w poszczególnych rozcieńczeniach pierwotniaki.

- *Amoeba proteus* – pełzak odmieniec – pierwotniak z rzędu *Euamoebida*, należący do supergrupy *Amoebozoa*, żyjący w wodach;

- *Paramecium caudatum* – pantofelek ogoniasty reprezentujący orzęski *Ciliata*, żyjący w wodach;
- *Gregarina blattarum* – gregaryna izolowana z karaczanów, reprezentujący typ *Apicomplexa*, żyjący w przewodach pokarmowych lub jamach ciała bezkręgowców;
- *Euglena gracilis* – pierwotniak żyjący w wodach, reprezentujący wiciowce - *Mastigophora*, rodzinę *Euglenaceae*.
- *Trichomonas hominis* – pierwotniak żyjący w jelicie grubym człowieka, reprezentujący *Trichomonadidae*.

Analizie właściwości pierwotniakobójczych poddano poszczególne kwasy, roztwór katalizatora, olejek cedrowy oraz roztwory soli metali. Badane preparaty, przed podaniem na szkiełko zegarkowe, rozpuszczano w roztworze wodnym polisorbatu 80 (0,05%). Nie stwierdzono działania bójczego polisorbatu 80 w ww. stężeniu. Prowadzono obserwację pod mikroskopem fluorescencyjnym z kontrastem fazowym. Aktywność pierwotniakobójczą uznano za efektywną, gdy nastąpiła śmierć 50% i 100% osobników w ciągu 3 minut. Kontrolne substancje przeciwpierwotniakowe stanowiły CH – chloramfenikol oraz M – metronidazol.

Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono w tabeli 1 oraz tabeli 2. Przy czym, w tabeli 1. umieszczono wyniki aktywności przeciwpierwotniakowej prób kontrolnych, tzn. kontrolnych substancji przeciwpierwotniakowych oraz poszczególnych elementów składowych kompozycji I-IX. Natomiast aktywność kompozycji I-IX przedstawiono w tabeli 2.

Przeprowadzona analiza wykazała, że działanie bójcze i statyczne w układach złożonych i po zajęciu reakcji było wyższe niż działanie substancji z osobna, wchodzących w skład mieszanin reakcyjnych i kompleksów. Kompozycje I-X wykazują wielokrotnie silniejszą (potencjalizacja) aktywność pierwotniakobójczą niż każdy z tych składników z osobna. Wszystkie wykorzystane składniki kompozycjach według wynalazku są dopuszczone zarówno do żywienia zwierząt jak i ludzi przez odpowiednie dyrektywy oraz organy, co w połączeniu z ich wysoką skutecznością pozwala na ich zastosowanie w leczeniu i/lub profilaktyce parazytoz u ludzi, wywoływanych przez pierwotniaki, W szczególności histomonadozy (wywołanej przez *Histomonas meleagridis*), kokcydiozy (wywołanej przez *Eimeria*), cryptosporidiozy (wywołanej przez *Cryptosporidium*), trichomonadozy (wywołanej przez *Trichomonas*), babeszjozy (wywołanej przez *Babesia*), czy ameboz (wywołanych przez *Amoeba*).

Tabela 1. Wartości LD₅₀, LD₁₀₀ dla wykorzystanych w badaniu prób kontrolnych

Próba	CH*	M**	Kwas octowy	Kwas propionowy	Kwas mlekowy	Roztwór chlorku manganu	Roztwór węglanu miedzi	Roztwór węglanu cynku	Roztwór katalizatora	Olejek cedrowy (<i>Cedrus</i> sp.)
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : LD ₁₀₀ :	LD ₅₀ :0,05% LD ₁₀₀ :0,1%	LD ₅₀ : 1% LD ₁₀₀ : 1,5%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,95% LD ₁₀₀ : 1,3%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,1% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,25% LD ₁₀₀ : 0,5%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,09% LD ₁₀₀ : 0,1%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ :0,001% LD ₁₀₀ :0,006%	LD ₅₀ : LD ₁₀₀	LD ₅₀ : 1% LD ₁₀₀ : 1,3%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1,25%	LD ₅₀ : 1% LD ₁₀₀ : 1,5%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1,25%	LD ₅₀ : 0,35% LD ₁₀₀ : 0,5%	LD ₅₀ : 0,3 LD ₁₀₀ : 0,5%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1,25%	LD ₅₀ : 0,1% LD ₁₀₀ : 0,3%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ :0,07% LD ₁₀₀ :0,15%	LD ₅₀ :0,3% LD ₁₀₀ :0,5%	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,6% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1,4%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,09% LD ₁₀₀ : 0,17%	LD ₅₀ : 0,15% LD ₁₀₀ : 0,25%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : LD ₁₀₀ :	LD ₅₀ :0,13% LD ₁₀₀ :0,3%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,9% LD ₁₀₀ : 1%	LD ₅₀ : 1% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,12% LD ₁₀₀ : 0,37%	LD ₅₀ : 0,2% LD ₁₀₀ : 0,4%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,08% LD ₁₀₀ : 0,1%
<i>Trichomonas hominis</i>	LD ₅₀ :0,05% LD ₁₀₀ :0,1%	LD ₅₀ : LD ₁₀₀ :	LD ₅₀ : 0,8% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,5% LD ₁₀₀ : 1,1%	LD ₅₀ : 0,6% LD ₁₀₀ : 1,3%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,1%	LD ₅₀ : 0,15% LD ₁₀₀ : 0,25%	LD ₅₀ : 0,1% LD ₁₀₀ : 0,3%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,1%	LD ₅₀ : 0,1% LD ₁₀₀ : 0,2%

*CH – chloramfenikol, M** – metronidazol

Tabela 2. Wartości LD₅₀, LD₁₀₀ kompozycji I-IX, wyznaczone dla wybranych pierwotniaków

Olejek cedrowy (<i>Cedrus sp.</i>)												
Próba	Kwas octowy				Kwas propionowy				Kwas mlekowy			
	miedź	mangan	cynek		miedź	mangan	cynek		miedź	mangan	cynek	
	Kompozycja I	Kompozycja II	Kompozycja III	Kompozycja IV	Kompozycja V	Kompozycja VI	Kompozycja VII	Kompozycja VIII	Kompozycja IX			
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,001% LD ₁₀₀ : 0,002%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,003%	LD ₅₀ : 0,001% LD ₁₀₀ : 0,002%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,006% LD ₁₀₀ : 0,01%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,006% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,005%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,005% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,008%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,006%	LD ₅₀ : 0,004% LD ₁₀₀ : 0,007%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,003%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,003%	LD ₅₀ : 0,003% LD ₁₀₀ : 0,004%	LD ₅₀ : 0,002% LD ₁₀₀ : 0,004%
<i>Trichomona s hominis</i>	LD ₅₀ : 0,09% LD ₁₀₀ : 0,15%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,045%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,045% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,03%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,03%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,07%

Przykład 2.

Połączenie olejku cedrowego (*Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière, *Cedrus deodara* (Roxb. ex D. Don) G.Don, *Cedrus libani* A.Rich.) z kwasami (octowy, propionowy, mlekowy) w stosunku 80:1 oraz metalem (miedzią, manganem i cynkiem).

W tym nieograniczającym przykładzie wykonania przygotowano dziewięć następujących kompozycji:

- a) kompozycję X – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i miedzią
- b) kompozycję XI – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i manganem
- c) kompozycję XII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i cynkiem
- d) kompozycję XIII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i miedzią
- e) kompozycję XIV – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i manganem
- f) kompozycję XV – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i cynkiem
- g) kompozycję XVI – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym i miedzią
- h) kompozycję VII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym oraz manganem
- i) kompozycję XVIII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym i cynkiem.

Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowano sole metali w postaci tlenków, natomiast w kompozycji według wynalazku można stosować również inne formy, takie jak sole (np. chlorki, siarczany, węglany). W celu wytworzenia kompozycji X, do 80 ml olejku cedrowego dodano 1 ml kwasu octowego, 0,1 g katalizatora (zawierającego siarczan kobaltu, molibdenian amonu oraz siarczan manganu zmieszane w stosunku 1:1:1) oraz 1 g tlenku miedzi. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia, do czasu zmiany barwy, pod chłodnicą zwrotną przez 120 minut. Następnie mieszaninę pozostawiono do wychłodzenia (przez 24 godziny) i uzyskania klarownego roztworu (jedno, dwu lub trójfazowego). Po tym czasie produkt reakcji filtrowano przez bibułę filtracyjną. Kompozycje XI-XVIII wytworzono analogicznie do kompozycji X. Kompozycje X-XVIII zostały następnie poddane analizie pod kątem ich właściwości pierwotniakobójczych analogicznie jak w przykładzie 1, a wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Wartości LD₅₀, LD₁₀₀ kompozycji X-XVIII, wyznaczone dla wybranych pierwotniaków

Olejek cedrowy (<i>Cedrus</i> sp.)												
Próba	Kwas octowy				Kwas propionowy				Kwas mlekowy			
	miedź	mangan	cynek	miedź	mangan	cynek	miedź	mangan	cynek	miedź	mangan	cynek
	Kompozycja X	Kompozycja XI	Kompozycja XII	Kompozycja XIII	Kompozycja XIV	Kompozycja XV	Kompozycja XVI	Kompozycja XVII	Kompozycja XVIII			
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,08%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,055% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,045% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,7%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,7%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,055%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,055%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,15%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,15%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,17%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,2%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,2%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,19%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,18%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,17%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,18%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,18%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,17%	LD ₅₀ : 0,08% LD ₁₀₀ : 0,18%
<i>Trichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,08%

Przykład 3.

Połączenie olejku cedrowego (*Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière, *Cedrus deodara* (Roxb. ex D. Don) G.Don, *Cedrus libani* A.Rich.) z kwasami (octowy, propionowy, mlekowy) w stosunku 1:80 oraz metalem (miedzią, manganem i cynkiem).

W tym nieograniczającym przykładzie wykonania przygotowano dziewięć następujących kompozycji:

- a) kompozycję XIX – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i miedzią
- b) kompozycję XX – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i manganem
- c) kompozycję XXI – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem octowym i cynkiem
- d) kompozycję XXII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i miedzią
- e) kompozycję XXIII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i manganem
- f) kompozycję XXIV – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem propionowym i cynkiem
- g) kompozycję XXV – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym i miedzią
- h) kompozycję XXVI – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym oraz manganem
- i) kompozycję XXVII – tj. kompozycję olejku cedrowego z kwasem mlekowym i cynkiem.

Przy czym, w tym nieograniczającym przykładzie wykonania zastosowano sole metali w postaci węglanów, natomiast w kompozycji według wynalazku można stosować również inne sole (np. chlorki, siarczany) lub inne formy, np. tlenki. W celu wytworzenia kompozycji XIX, do 1 ml olejku cedrowego dodano 80 ml kwasu octowego, 1 g katalizatora (który stanowi siarczan kobaltu, molibdenian amonu oraz chlorek manganu zmieszane w stosunku 1:1:1) oraz 5 g węglanu miedzi. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia, do czasu zmiany barwy, pod chłodnicą zwrotną przez 60 minut. Następnie mieszaninę pozostawiono do wychłodzenia (przez 12 godzin) i uzyskania klarownego roztworu (jedno, dwu lub trójfazowego). Po tym czasie produkt reakcji filtrowano przez bibułę filtracyjną. Kompozycje XX-XXVII wytworzono analogicznie do kompozycji XIX. Kompozycje XIX-XXVII zostały następnie poddane analizie pod kątem ich właściwości pierwotniakobójczych analogicznie jak w przykładzie 1, a wyniki przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Wartości LD₅₀, LD₁₀₀ kompozycji XIX-XXVII, wyznaczone dla wybranych pierwotniaków

Olejek cedrowy (<i>Cedrus</i> sp.)															
Próba	Kwas octowy						Kwas propionowy						Kwas mlekowy		
	miedź	mangan	cynk	miedź	mangan	cynk	miedź	mangan	cynk	miedź	mangan	cynk	miedź	mangan	cynk
	Kompozycja XIX	Kompozycja XX	Kompozycja XXI	Kompozycja XXII	Kompozycja XXIII	Kompozycja XIV	Kompozycja XV	Kompozycja XVI	Kompozycja XVII	Kompozycja XVIII	Kompozycja XIX	Kompozycja XX	Kompozycja XXI	Kompozycja XXII	Kompozycja XXIII
<i>Euglena gracilis</i>	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,036% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,037% LD ₁₀₀ : 0,068%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,038% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,035% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,038% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,035% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,036% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,015% LD ₁₀₀ : 0,06%
<i>Gregarina blattarum</i>	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,046% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,037% LD ₁₀₀ : 0,053%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,043% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,034% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,034% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,043% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,034% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,05% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,034% LD ₁₀₀ : 0,06%
<i>Amoeba proteus</i>	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,035%	LD ₅₀ : 0,017% LD ₁₀₀ : 0,03%	LD ₅₀ : 0,025% LD ₁₀₀ : 0,035%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,04%	LD ₅₀ : 0,034% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,036% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,02% LD ₁₀₀ : 0,03%	LD ₅₀ : 0,034% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,034% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,04% LD ₁₀₀ : 0,05%	LD ₅₀ : 0,036% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,03% LD ₁₀₀ : 0,06%	LD ₅₀ : 0,036% LD ₁₀₀ : 0,06%
<i>Paramecium caudatum</i>	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,75% LD ₁₀₀ : 0,085%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,065% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,065% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%
<i>Trichomonas hominis</i>	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,065% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,08% LD ₁₀₀ : 0,09%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,075%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,075% LD ₁₀₀ : 0,085%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,07%	LD ₅₀ : 0,075% LD ₁₀₀ : 0,085%	LD ₅₀ : 0,06% LD ₁₀₀ : 0,08%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,085%	LD ₅₀ : 0,07% LD ₁₀₀ : 0,085%

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek cedrowy, **znamienna tym, że** olejek cedrowy występuje w postaci kompleksu z kwasem organicznym i metalem.
2. Kompozycja według zastrz. 1, **znamienna tym, że** kwas organiczny jest wybrany z grupy obejmującej kwas octowy, kwas propionowy, kwas mlekowy.
3. Kompozycja według zastrz. 1 albo 2, **znamienna tym, że** metal jest wybrany z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich tlenki lub sole.
4. Kompozycja według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 3, **znamienna tym, że** stosunek olejku cedrowego do kwasu organicznego wynosi od 1:80 do 80:1.
5. Kompozycja według zastrz. 4, **znamienna tym, że** stosunek olejku cedrowego do kwasu organicznego wynosi 1:1.
6. Sposób wytwarzania kompozycji pierwotniakobójczej, według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 5, **znamienny tym, że** obejmuje następujące etapy:
 - a) Zmieszanie olejku cedrowego z kwasem organicznym w stosunku wagowym od 80:1 do 1:80;
 - b) dodanie katalizatora do mieszaniny z etapu a)
 - c) dodawanie metalu wybranego z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich sole lub tlenki;
 - d) ogrzewanie mieszaniny z katalizatorem uzyskanej w etapie c) do temperatury wrzenia oraz kontynuowanie ogrzewania w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 20-120 minut;
 - e) odstawienie produktu reakcji do wystygnięcia na okres od 10 do 24 godzin;
 - f) filtrowanie ostudzonego produktu reakcji
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym, że** kwas organiczny stosowany w etapie a) jest wybrany z grupy obejmującej kwas octowy, kwas propionowy, kwas mlekowy.

8. Sposób według zastrz. 6 albo 7, **znamienny tym, że** jako katalizator stosuje się mieszaninę siarczanu kobaltu, molibdenianu amonu oraz chlorku lub siarczanu manganu.
9. Zastosowanie kompozycji według dowolnego z poprzednich zastrz. od 1 do 5 do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi.

Skrót

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek cedrowy, charakteryzująca się tym, że olejek cedrowy występuje w postaci kompleksu z kwasem organicznym i metalem. Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kompozycji pierwotniakobójczej, który obejmuje następujące etapy: a) zmieszanie olejku cedrowego z kwasem organicznym w stosunku wagowym od 80:1 do 1:80; b) dodanie katalizatora do mieszaniny z etapu a); c) dodawanie metalu wybranego z grupy obejmującej miedź, cynk, mangan, ich sole, lub tlenki; d) ogrzewanie mieszaniny z katalizatorem uzyskanej w etapie c) do temperatury wrzenia oraz kontynuowanie ogrzewania w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 20-120 minut; e) odstawienie produktu reakcji do wystygnięcia na okres od 10 do 24 godzin; f) filtrowanie ostudzonego produktu reakcji. Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji według wynalazku do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi.

(9 zastrzeżeń)

3.6. Patent 2.

Poniższy patent jest analogiczny do patentu 1., z tą różnicą, iż kompozycja zawierała olejek eukaliptusowy

Kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek eukaliptusowy, sposób jej wytwarzania oraz jej zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi

3.7.Patent 3

Poniższy patent jest analogiczny do patentu 1., z tą różnicą, iż kompozycja zawierała olejek z drzewa herbacianego

Kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek herbaciany, sposób jej wytwarzania oraz jej zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi.

3.8. Patent 4

Poniższy patent jest analogiczny do patentu 1., z tą różnicą, iż kompozycja zawierała olejki eteryczne z grupy olejków fenylopropanoidowych

Kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek eteryczny, sposób wytwarzania kompozycji pierwotniakobójczej oraz jej zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi

3.9. Patent 5

Poniższy patent jest analogiczny do patentu 1., z tą różnicą, iż kompozycja zawierała olejki eteryczne z grupy olejków ftalidowych

Kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek eteryczny, sposób wytwarzania kompozycji pierwotniakobójczej oraz jej zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi

3.10. Patent 6

Poniższy patent jest analogiczny do patentu 1., z tą różnicą, iż kompozycja zawierała olejki eteryczne z grupy olejków izoprenoidowych

Kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek eteryczny, sposób wytwarzania kompozycji pierwotniakobójczej oraz jej zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi

4. WDROŻENIE

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji doktoratu w ramach „II” edycji programu Doktorat Wdrożeniowy, umożliwił wdrożenie szeregu innowacji w firmie AdiFeed Sp. z o.o., m.in.:

4.1. Technologia wytwarzania

Testy przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych zaowocowały opracowaniem warunków prowadzenia procesu m.in. zastosowanej temperatury, kolejności dodawania czy czasu prowadzenia procesu. Podczas badań zaobserwowano szereg zjawisk utrudniających, czy też uniemożliwiających, zastosowanie w warunkach przemysłowych. Jedną z podstawowych zmian zachodzących w badanych mieszaninach była zmiana barwy. Inne natomiast po ochłodzeniu charakteryzowały się występowaniem dwóch lub nawet trzech faz. Innym czynnikiem, który determinował możliwość wykorzystania badanej kombinacji w późniejszych produktach było tworzenie się kryształów, galaretowatych osadów czy też przyjmowanie przez mieszaninę formy stałej. Niestety te trzy czynniki były kluczowe dla możliwości dalszego wdrożenia mieszanin.

Do dalszego etapu prac wdrożeniowych zakwalifikowano mieszaniny charakteryzujące się w pierwszej kolejności najlepszymi właściwościami przeciwpiętowniczymi, ale co równie istotne dla procesu technologicznego, nie tworzące osadów i nie krystalizujące po wychłodzeniu oraz będące mieszaninami jednofazowymi.

4.2. Linia pilotażowa

Dotychczasowy park maszynowy uniemożliwił wytworzenie nowych produktów z wykorzystaniem nowych technologii. Dlatego też podjęto działania mające na celu stworzenie linii pilotażowej składającej się z mieszalnika z funkcją homogenizacji oraz grzania i chłodzenia, odstojnika, a w późniejszym etapie wirówki przemysłowej. Mieszalnik został wykonany w standardzie farmaceutycznym, z zastosowaniem wysoce wytrzymałych materiałów polimerowych jako uszczelnień, ze względu na agresywne środowisko procesu. Początkowo technologia produkcji nowych wyrobów gotowych zakładała ich odstawienie na 24 godziny do momentu wytrącenia się nieprzereagowanych soli mineralnych i katalizatora. Proces ten ze względu na charakter mieszaniny, w warunkach produkcyjnych, trwał jednak zbyt długo, w związku z czym podjęto próby optymalizacji procesu produkcyjnego. Przeprowadzone wstępne testy z wykorzystaniem wirówki laboratoryjnej oraz w firmach zewnętrznych, pozwoliły na określenie parametrów wirowania oraz gabarytów i parametrów technicznych urządzenia. Zabieg ten w zdecydowany sposób przyspieszył proces produkcji oraz zmniejszył jednostkowy koszt wytworzenia wyrobu gotowego.

4.3. Nowe produkty

Zastosowanie nowej technologii wytwarzania oraz pilotażowej linii produkcyjnej zaowocowało powstaniem i wprowadzeniem na rynek 3 nowych produktów komercyjnych (2 preparaty w formie płynnej oraz jeden w formie sypkiej). W trakcie procesu wprowadzania na rynek nowych produktów niezbędne było przygotowanie wszystkich elementów począwszy od wyboru opakowań jednostkowych, poprzez opakowania zbiorcze, tworzenie etykiet oraz ulotek produktowych, a skończywszy na przygotowaniu strategii cenowej, sprzedażowej i marketingowej.

W wyborze opakowania jednostkowego jako główne kryterium przyjęto jego odporność chemiczną i możliwość recyklingu. Dlatego też wytypowano we wstępnym etapie opakowanie aluminiowe, szklane i białe opakowanie HDPE. Ze względów praktycznych i wytrzymałościowych odrzucono możliwość zastosowania butelek szklanych. Ryzyko uszkodzenia w transporcie oraz obowiązek wprowadzenia dodatkowych procedur jakościowych powodowały odrzucenie tego rozwiązania. Ze względu na wytrzymałość, odporność oraz aspekty wizualno-marketingowe wybrano butelki aluminiowe o pojemności 1 L pokryte wewnątrz powłoką odporną chemicznie. Testy trwałości i wytrzymałości opakowań wykazały jednak, że w temperaturze powyżej 50°C, butelki te ulegały wybrzuszeniu ze względu na zwiększenie ciśnienia. Dlatego też, podjęta została decyzja o docelowym zastosowaniu białych butelek HDPE, z uszczelką indukcyjną oraz otworem wentylacyjnym. Opakowanie zbiorcze stanowi natomiast karton na 4 butelki.

Dla produktu w formie sypkiej, wybrano opakowanie jednostkowe w formie worka. Worek ten składa się z trzech warstw zewnętrznej poliestrowej (PET), środkowej aluminiowej (ALU) oraz wewnętrznej polietylenowej (PE).

Następny etap polegał na stworzeniu etykiety na opakowanie jednostkowe oraz materiałów marketingowych w formie ulotki produktowej. Etykiety jak i ulotki dla wszystkich 3 produktów znajdują się w opisie poszczególnych produktów.

Poniżej przedstawiono wygląd opakowań jednostkowych lub próbek marketingowych oraz krótką charakterystykę wdrożonych produktów.

4.3.1. adiBiotic®

Jest to produkt dedykowany dla drobiu w profilaktyce patogenów układu pokarmowego ptaków. Bazuje on na mieszaninie fitoncydów, kwasów organicznych i jonów metali. Opakowanie jednostkowe zawiera 1L preparatu i pakowane jest do kartonów po 4 szt. Rycina 1. Przedstawia wygląd produktu w opakowaniu jednostkowym.

Skład: salicylan metylu, olejek eukaliptusowy, olejek anyżowy, mentol siarczan manganu octan cynku dwuwodny, mono- i dwuglicerydy kwasów tłuszczowych (kwas kaprylowy, kwas kaprynowy) estryfikowane kwasami organicznymi, glikol propylenowy, kwas propionowy, kwas octowy

Przeznaczenie: kurczęta rzeźne, indyki rzeźne, drób wodny, kurczęta odchowywane na kury nioski, nioski reprodukcyjne, kury nioski towarowe.

Sposób podania: preparat podaje się w wodzie do przygotowania przedmiotowej paszy: 50 - 100 mL/1000 L



Ryc. 1. Produkt adiBiotic w opakowaniu jednostkowym



adiBIOTIC®

FITONCYDOWA MOC

zdrowe
jelita



**KOMPLEKSOWE
ROZWIĄZANIE DLA JELIT**
ogranicza aktywność życiową
niepożądanych kultur mikrobiologicznych



Nowoczesny, silnie skoncentrowany produkt fitoncydowy wytworzony w technologii adiPHAG.

adiBIOTIC® to innowacyjny zestaw fitoncydów zapewniających prawidłowe funkcjonowanie układu pokarmowego. Zdrowe jelita to lepsza wydajność produkcyjna i wyższy status zdrowotny ptaków.

adiPHAG to opatentowana formuła pozwalająca na uzyskanie stabilnej i wysoce skutecznej emulsji micelarnej.

Aktywne składniki adiBIOTIC® tworzą liposomy oraz niosomy, wykazujące aktywność koacerwatów. Charakteryzują się wysokim powinowactwem do składników ścian, błon i otoczek komórkowych mikroorganizmów.

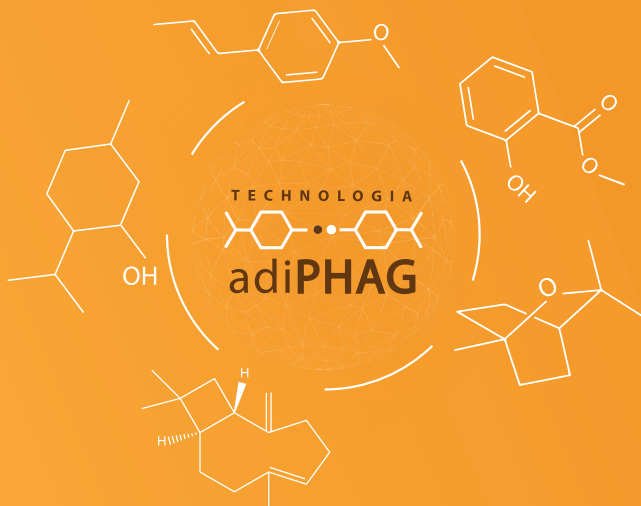
Technologia adiPHAG pozwala uzyskać skompleksowane fitoncydy meta-loorganiczne. W wyniku fotodynamizacji oraz wiązania aktywnych form tlenu fitoncydy przyjmują postać estrów, oksydów terpenoidowych, epitlenków i ozonów ograniczających procesy życiowe kultur mikrobiologicznych.

Fitoncydy w adiBIOTIC®

Kompleksy fitoncydowe z krótko- i średniołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi nasilają procesy odnowy nabłonka jelit oraz wzrost kosmków jelitowych. Fitokompleksy metaloorganiczne olejku eukaliptusowego oraz anyżowego wzmagają aktywność bursy Fabrycjusza i pobudzają krążenie limfy. Mentol i salicylan metylu redukują uwalnianie amoniaku. Kariofilen hamuje procesy gnicia i pleśnienia. Ograniczając stres zapobiega nerwicom wegetatywnym. Fitoncydy w adiBIOTIC® korzystnie wpływają na perystaltykę przewodu pokarmowego.

Fitoskładniki zawarte w produkcie:

- salicylan metylu
- trans-anetol
- mentol
- 1,8-cyneol
- kariofilen



SPOSÓB PODANIA:

preparat podaje się w wodzie do przygotowania przedmiotowej paszy:

- 50 - 100 ml / 1000 L wody
- 0,5 - 1,0 ml / 100 kg m.c. /dzień.

Opakowanie: butelka 1,25 L



zdrowe jelita



PRZEZNACZENIE:

kurczęta rzeźne, kurczęta odchowywane na kury nioski



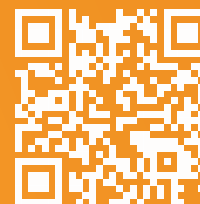
nioski reprodukcyjne kury nioski towarowe



indyki rzeźne



drób wodny





Zapewnia prawidłowe funkcjonowanie jelit i podnosi wydajność zdrowotną ptaków. Obecne w składzie fitoncydy ograniczają procesy życiowe kultur mikrobiologicznych.

PRZEZNACZENIE:

kurczęta rzeźne, indyki rzeźne, drób wodny, kurczęta odchowywane na kury nioski, nioski reprodukcyjne, kury nioski towarowe.

SPOSÓB PODANIA:

preparat podaje się w wodzie do przygotowania przedmiotowej paszy: 50 - 100 ml/1000 L wody lub 0,5 – 1 ml/100 mg k.m.c./dzień.

SKŁAD:

mono- i dwuglicerydy kwasów tłuszczowych (kwas kaprylowy, kwas kaprynowy) estryfikowane kwasami organicznymi, glikol propylenowy.

DODATKI (w 100 g):

Dodatki sensoryczne: mieszanka substancji aromatyzujących /2b/: 32 165 mg (m.in. salicylan metylu, olejek eukaliptusowy, olejek anyżowy, mentol). **Dodatki dietetyczne:** siarczan manganu jednowodny /3b503/: w przeliczeniu na 560 mg Mn; octan cynku dwuwodny /3b601/: w przeliczeniu na 513 mg Zn; **Dodatki technologiczne:** kwas propionowy /1a/1k280: 6905 mg, kwas octowy /1a/1a260: 6905 mg.

OBOWIĄZKOWA DEKLARACJA:

białko surowe: < 0,20% (PN-A-04018:1975+Az3:2002); włókno surowe: < 1,00%; tłuszcz surowy: 2,00%; popiół surowy: 1,66%; lizyna: <0,02%; metionina: <0,02%; sól: 0,52%; wilgotność (strata masy po suszeniu) <70,00%.

Pasza nie jest produktem ekologicznym w rozumieniu przepisów rozporządzenia 834/2007.

Przechowywać w chłodnym i suchym miejscu.

adiBIOTIC®

Mieszanka Paszowa Uzupełniająca

FITONCYDOWA MOC

Zapewnia prawidłowe funkcjonowanie jelit,
podnosi wydajność zdrowotną ptaków

FITONCYDOWA MOC
ZDROWE JELITA

Nr referencyjny partii:

Najlepiej wykorzystać przed:



adiBIOTIC® zawiera:
Eukaliptol, Dipenten, Trans-anetol, 4-Allilinizol



Niebezpieczeństwo

- H314** Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
- H317** Może powodować reakcję alergiczną skóry.
- H361** Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki.
- P264** Dokładnie umyć ręce po użyciu.
- P280** Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
- P301 + P330 + P331** W PRZYPADKU POŁKNIECIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów.
- P303 + P361 + P353** W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem.
- P363** Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem.
- P304 + P340** W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.
- P305 + P351 + P338** W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
- P310** Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUCI/lekarzem.
- P333 + P313** W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
- P308 + P313** W przypadku narażenia lub styczności: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUCI/ lekarzem.
- P403 + P235** Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.
- P501** Zawartość/ pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów.
- UN: 3265**

V5-30012023

AdiFeed®
a PL 1405015p

Objętość netto:
1L

AdiFeed Sp. z o.o.
ul. Opaczewska 43
02-201 Warszawa
tel. +48 22 531 38 60
www.adifeed.pl



4.3.2. naturBiotic®

To skoncentrowany preparat wytworzony w nowej technologii, oparty na fitoncydach, kwasach organicznych i jonach metali. Dostępny w sprzedaży w butelce o pojemności 1L i kartonie zawierającym 4 szt. Na rycinie 2 przedstawiono produkt naturBiotic w opakowaniu jednostkowym.

Skład: salicylan metylu, olejek herbaciany, olejek anyżowy, mentol, olejek eukaliptusowy, mono- i dwuglicerydy kwasów tłuszczowych (kwas kaprylowy, kwas kaprynowy) estryfikowane kwasami organicznymi, glikol propylenowy, kwas octowy, kwas propionowy octan cynku dwuwodny.

Przeznaczenie: prosięta, warchlaki, tuczniaki, lochy, knury.


Sposób podania: preparat podaje się w wodzie do przygotowania przedmiotowej paszy: 100 mL/1000 L wody lub 0,01 mL/kg m.c./dzien.



Ryc. 2. Produkty naturBiotic® w oryginalnym opakowaniu jednostkowym

Recepta na zdrowie bez antybiotyków

AdiFeed®

TECHNOLOGIA

adiPHAG



naturBIOTIC®
zdrowe jelita

www.adifeed.pl



WYPRODUKOWANE
W POLSCE

Nowoczesny, silnie skoncentrowany produkt fitoncydowy wytworzony w technologii adiPHAG.

naturBIOTIC® – unikalny zestaw naturalnych składników ziołowych (fitoncydów) zapewniający prawidłowe funkcjonowanie układu pokarmowego i poprawiający wydajność zdrowotną trzody chlewnej.

adiPHAG – innowacyjna, opatentowana formuła pozwalająca na uzyskanie stabilnej i wysoce skutecznej emulsji micelarnej.

Aktywne składniki naturBIOTIC® tworzą liposomy i niosomy, wykazujące właściwości koacerwatów. Charakteryzują się one wysokim powinowactwem do składników ścian, błon i otoczek komórkowych mikroorganizmów.

Technologia adiPHAG pozwala uzyskać skompleksowane fitoncycydy metaloorganiczne. W wyniku fotodynamizacji oraz wiązania aktywnych form tlenu fitoncycydy przyjmują postać estrów, oksydów terpenoidowych, epitlenków i ozonianów ograniczających procesy życiowe kultur mikrobiologicznych.

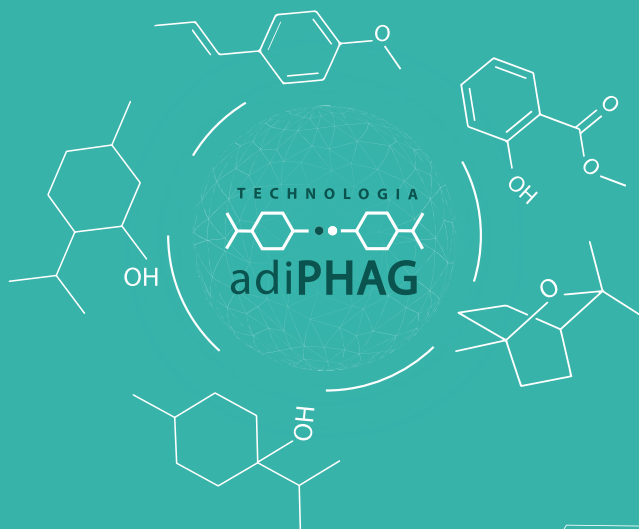
Fitoncycydy w naturBIOTIC®

Fitoncycydy zawarte w oleju herbacianym i anyżowym przyczyniają się do ograniczenia rozwoju grzybów i bakterii. Zwiększają aktywność układu limfatycznego, usprawniając funkcjonowanie grasicy i układu siateczkowo-śródbłonkowego jelit. Salicylan metylu i mentol zmniejszają uwalnianie amoniaku i siarkowodoru. Zawarte w produkcie fitoncycydy korzystnie wpływają na perystaltykę przewodu pokarmowego.

Fitokompleksy metaloorganiczne oleju eukaliptusowego oraz herbacianego wraz z krótko- i średniołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi wzmagają uwalnianie limfokin i procesy proliferacji enterocytów, zapewniając sprawną regenerację tkanki nabłonkowej jelit.

Fitoskładniki zawarte w produkcie:

- salicylan metylu
- terpinen-4-ol
- trans-anetol
- mentol
- 1,8-cyneol



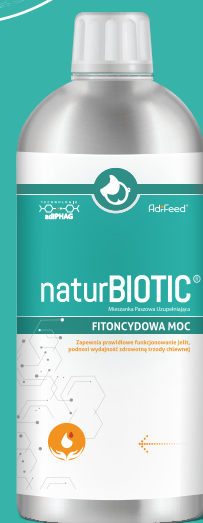
SPOSÓB PODANIA:

preparat podaje się w wodzie do przygotowania przedmiotowej paszy:

- 100 ml / 1000 L wody
- 0,01 ml / 1 kg m.c. /dzień

opakowanie: butelka 1,25 L

zdrowe jelita



PRZEZNACZENIE:

- PROSIĘTA
- WARCHLAKI
- TUCZNIKI
- LOCHY
- KNURY

naturBIOTIC®



Zapewnia prawidłowe funkcjonowanie jelit i podnosi wydajność zdrowotną trzody chlewnej. Obecne w składzie fitoncydy ograniczają procesy życiowe kultur mikrobiologicznych.

PRZEZNACZENIE:

prosięta, warchlaki, tuczniaki, lochy, knury.

SPOSÓB PODANIA:

preparat podaje się w wodzie do przygotowania przedmiotowej paszy; 100 ml/1000 L wody lub 0,01 ml/kg m.c./dzień.

SKŁAD:

mono- i dwuglicerydy kwasów tłuszczowych (kwas kaprylowy, kwas kaprynowy) estryfikowane kwasami organicznymi, glikol propylenowy.

DODATKI (w 100 g):

Dodatki sensoryczne: mieszanka substancji aromatyzujących /2b/: 32165 mg (m.in. salicylan metylu, olejek drzewa herbacianego, olejek eukaliptusowy, olejek anyżowy, mentol). **Dodatki dietetyczne:** octan cynku dwuwodny /3b601/: w przeliczeniu na Zn 513 mg; siarczan manganu jednowodny /3b503/: w przeliczeniu na Mn 560 mg. **Dodatki technologiczne:** kwas octowy /1a/ 1a260: 6905 mg, kwas propionowy /1a/ 1k280: 6905 mg.

TECHNOLOGIA
adiPHAG®



AdiFeed®

naturBIOTIC®

Mieszanka Paszowa Uzupełniająca

FITONCYDOWA MOC

Zapewnia prawidłowe funkcjonowanie jelit,
podnosi wydajność zdrowotną trzody chlewnej

OBOWIĄZKOWA DEKLARACJA:

białko surowe: <0,20% (PN-A-04018:1975+Az3:2002); włókno surowe: <1,00%; tłuszczy surowy: 2,30%; popiół surowy: 1,42%; lizyna: <0,02%; metionina: <0,02%; sód: 0,47%, wilgotność (strata masy po suszeniu) <70,00%.

Pasza nie jest produktem ekologicznym w rozumieniu przepisów rozporządzenia 834/2007.

Przechowywać w chłodnym i suchym miejscu.

Nr referencyjny partii:

FITONCYDOWA MOC
ZDROWE JELITA

Najlepiej wykorzystać przed:



naturBIOTIC® zawiera:
**Eukaliptol, Dipenten, Trans-anetol,
4-Allililanol, Olejek drzewa herbacianego**



Niebezpieczeństwo

- H314** Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.
H361 Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki.
P264 Dokładnie umyć ręce po użyciu.
P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P301 + P330 + P331 W PRZYPADKU POŁKNIECIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów.
P303 + P361 + P353 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem.
P363 Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem.
P304 + P340 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.
P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P310 Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUCIEKARZEM.
P333 + P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P308 + P313 W przypadku narażenia lub styczności: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUCIEKARZEM.
P403 + P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.
P501 Zawartość/ pojemnik usunąć do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów.
UN: 3265

V5-08022023

AdiFeed®
q PL 1405015p

Objętość netto:
1L

AdiFeed Sp. z o.o.
ul. Opaczewska 43
02-201 Warszawa
tel. +48 22 531 38 60
www.adifeed.pl



4.3.3. adiNext®

Produkt wytworzony podobnie jak dwa poprzednie wyroby gotowe w nowej technologii, jednakże został on doprowadzony do formy sypkiej. Opakowanie jednostkowe stanowi worek aluminiowy pokryty warstwą polimerową o masie 25 kg. Jest to preparat, w odróżnieniu od pozostałych dwóch, stosowany do paszy dla zwierząt. Nazwa preparatu jest również zamierzonym zabiegiem marketingowym mającym na celu wywołać skojarzenia z martwiczym zapaleniem jelit (NE), a jednocześnie poprzez dodanie przyrostka „xt” i utworzenie słowa „Next” jako produkt nowej generacji i nowe rozwiązanie profilaktyce tej jednostki chorobowej. Na rycinie 3. przedstawiono próbkę produktu.

Skład: dolomit, chlorek sodu, salicylan metylu, olejek eukaliptusowy, olejek anyżowy, mentol siarczan manganu, octan cynku dwuwodny, mono- i dwuglicerydy kwasów tłuszczowych (kwas kaprylowy, kwas kaprynowy) estryfikowane kwasami organicznymi, glikol propylenowy, kwas propionowy, kwas octowy

Przeznaczenie: drób, trzoda chlewna

Sposób podania: dla zwierząt wykorzystywanych do produkcji żywności: drób 50 - 100 g/t mieszanki paszowej pełnoporcjowej, trzoda chlewna 100g/t mieszanki pełnoporcjowej

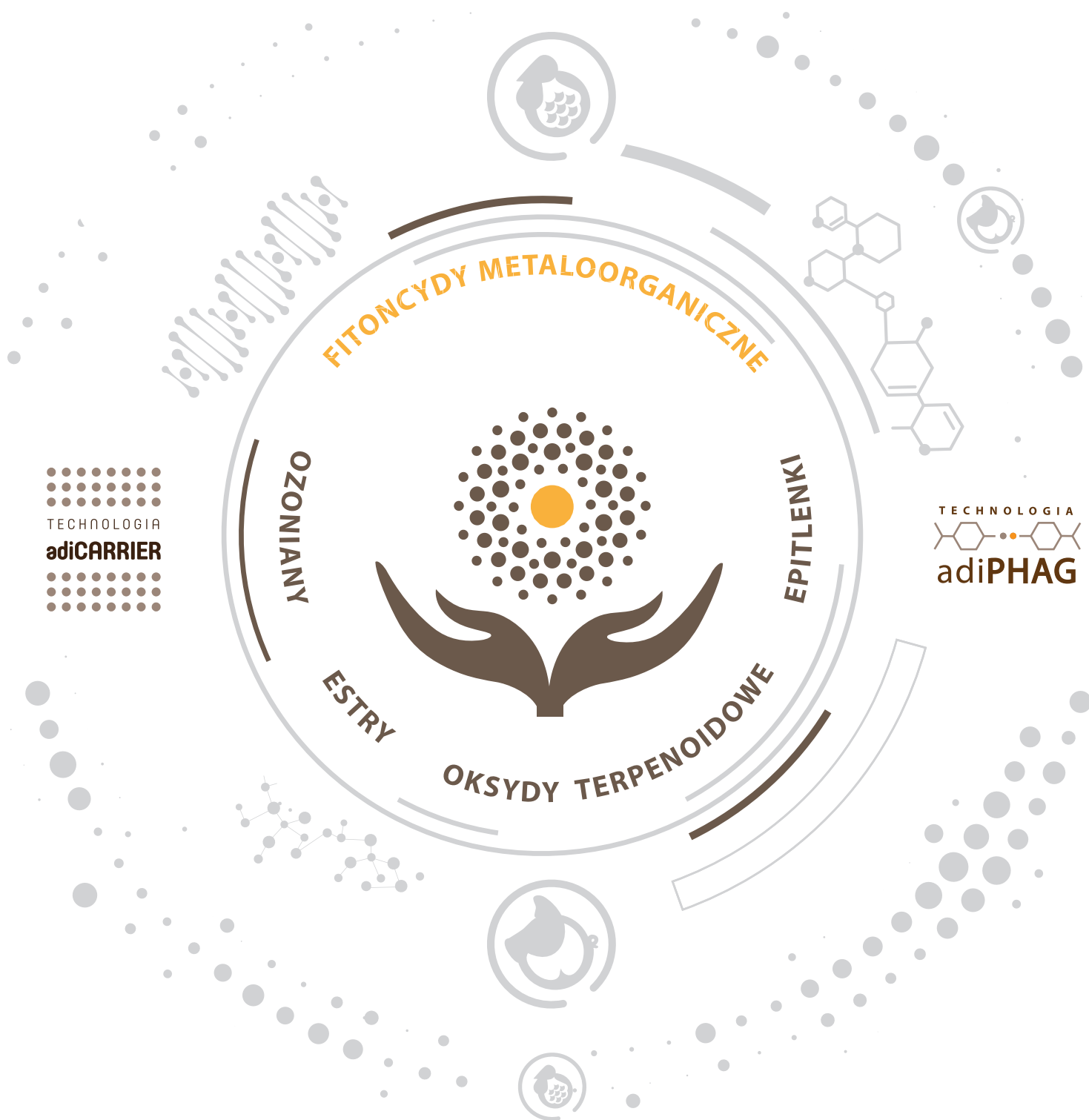


Ryc. 3. Próbkę produktu adiNext®

adiNEXT[®]



Nowoczesny, silnie skoncentrowany produkt fitoncydowy dla drobiu i trzody chlewnej.



TECHNOLOGIA
adiCARRIER

TECHNOLOGIA
adiPHAG

adiNEXT®



**nowoczesny, silnie skoncentrowany
sypek produkt fitoncydowy
wytworzony w technologii adiPHAG i adiCARRIER**

DOSKONAŁA HOMOGENNOŚĆ I PRZYSWAJALNOŚĆ

Jednorodna struktura fizykochemiczna podłoża **adiCARRIER** gwarantuje homogenne rozprowadzenie aktywnych substancji zarówno w premiksach jak i w paszach. Dodatkowo zapewnia stabilizację i ochronę składników czynnych oraz ich łatwe, a zarazem kontrolowane uwalnianie w przewodzie pokarmowym. Pamięć biochemiczna struktur glinokrzemianowych potencjalizuje efekt oligodynamiczny fitoncydów metaloorganicznych. Opatentowana formuła **adiPHAG** pozwala na uzyskanie stabilnej i wysoce skutecznej emulsji micelarnej w dwunastnicy.

WYSOKA ZDROWOTNOŚĆ

adiNEXT® jest innowacyjnym zestawem fitoncydów zapewniających prawidłowe funkcjonowanie układu pokarmowego. Zdrowe jelita to lepsza wydajność produkcyjna i wyższy status zdrowotny zwierząt.

Aktywne składniki **adiNEXT®** tworzą liposomy oraz niosomy wykazujące aktywność koacerwatów. Charakteryzują się wysokim powinowactwem do składników ścian, błon i otoczek komórkowych mikroorganizmów.

Technologia **adiPHAG** pozwala uzyskać skompleksowane **fitoncydy metaloorganiczne**. W wyniku fotodynamizacji oraz wiązania aktywnych form tlenu fitoncydy przyjmują postać estrów, oksydów terpenoidowych, epitlenków oraz ozonianów ograniczających procesy życiowe kultur mikrobiologicznych.

Kompleksy fitoncydowe z kwasami krótkołańcuchowymi nasilają procesy odnowy nabłonka jelit i wzrost kosmków jelitowych.

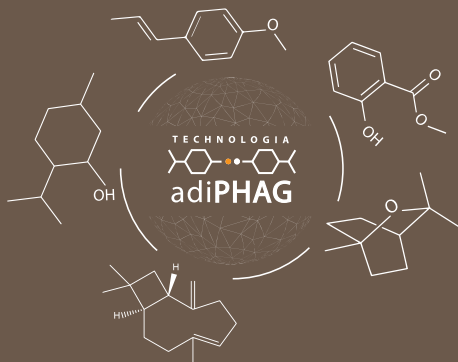
Fitokompleksy metaloorganiczne olejku eukaliptusowego i anyżowego wzmagają aktywność organów limfoidalnych i pobudzają krążenie chłonki.

LEPSZY DOBROSTAN I OCHRONA ŚRODOWISKA

Mentol i salicylan metylu redukują uwalnianie amoniaku i siarkowodoru. Kariofilen i mentol hamują procesy gnicia i pleśnienia. **adiNEXT®** ogranicza stres zapobiegając nerwicom wegetatywnym. Gamma terpinen, terpinen-4-ol, fenchen, borneol i pineny działają żółciotwórczo, żółciopędnie ułatwiając trawienie tłuszczów. Dodatkowo zapobiegają wzdęciom. Zawarte w produkcie fitoncydy korzystnie wpływają na perystaltykę przewodu pokarmowego.

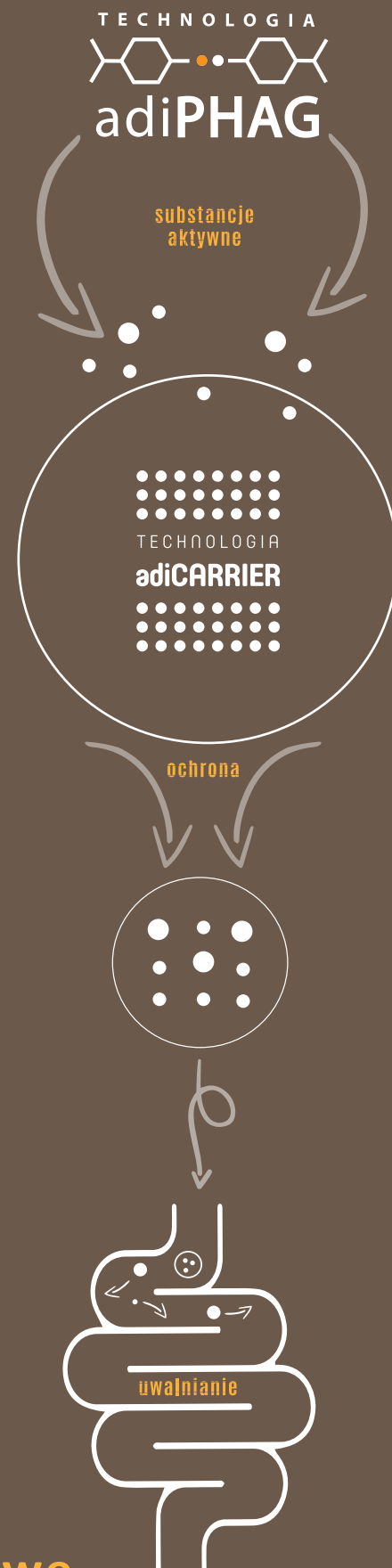
Wybrane fitoantycypiny zawarte w produkcie:

- salicylan metylu
- 1,8- cyneol
- trans-anetol
- mentol
- kariofilen



**SPOSÓB PODAWANIA:
50 - 100g / tonę paszy**

Opakowanie 20 kg



adiNEXT

Mieszanka Paszowa Mineralna

PRZEZNACZENIE: drób, trzoda chlewna

SPOSÓB PODANIA: dla zwierząt wykorzystywanych do produkcji żywności:

drób 50 - 100 g/t mieszanki paszowej pełnoporcjowej,

trzoda chlewna 100g/t mieszanki pełnoporcjowej

Skład: dolomit, chlorek sodu.

Dodatki (w 100g):

Dodatki sensoryczne: mieszanka substancji aromatyzujących /2b/: 30690 mg

Dodatki dietetyczne: octan cynku dwuwodny /3b601/: w przeliczeniu na Zn 590 mg; siarczan manganu /3b503/: w przeliczeniu na Mn 643,5 mg

Dodatki technologiczne: krzemionka koloidalna E551b /1/: 49500 mg; kwas octowy /1a/ E260: 7425 mg, kwas propionowy /1a/ E280: 7425 mg

Obowiązkowa deklaracja: wapń 0,16 %, fosfor <0,01%, popiół surowy: 50%; lizyna:<0,05%; metionina: 0,05%; sód: 0,37%.

Przechowywać w chłodnym i suchym miejscu.

Eukaliptol

Dipenten

trans-anetol

Niebezpieczeństwo



H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu .

H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.

H361 Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki

P264 Dokładnie umyć ręce po użyciu.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P301 + P330 + P331 W PRZYPADKU POŁKNIECIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów.

P303 + P361 + P353 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem.

P363 Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem.

P304 + P340 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

P305+P351+P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P310 Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem.

P333 + P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P308 + P313 W przypadku narażenia lub styczości: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem.

P403 + P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

P501 Zawartość/ pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów.

UN: 3261

**Nr referencyjny partii:
Najlepiej wykorzystać przed:**

Masa netto: 20 kg

AdiFeed Sp. z o.o., α PL 1405015 p
ul. Opaczewska 43; 02-201 Warszawa
tel. +48 22 531 38 60
Polska
www.adifeed.pl

Wersja: V7-18102022

5. WNIOSKI

1. Najbardziej efektywne okazały się połączenia olejków eterycznych goździkowego, cynamonowego oraz cedrowego w szczególności z mieszaniną kwasów (octowy, propionowy, mlekowy) i jonami manganu;
2. Badane połączenia fitoncydów z kwasami organicznymi i jonami metali, charakteryzują się dobrymi właściwościami przeciwpierwotniaczymi wobec *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum*, *Gregarina blattarum*, *Euglena gracilis*, *Trichomonas hominis*, jak również przeciwbakteryjnymi wobec lekoopornych szczepów *Salmonella* spp. oraz ptasie szczepy *Escherichia coli* (Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC) i innych szczepów *Escherichia coli*. Większość analizowanych połączeń charakteryzuje się znacznie silniejszym działaniem bójącym aniżeli stosowane antybiotyki;
3. Analizowane mieszaniny wykazują dużą efektywność w kontekście ich potencjalnego działania przeciwnowotworowego, przy jednoczesnej niskiej cytotoksyczności wobec zdrowych komórek;
4. Przeprowadzone wstępne badania *in vivo* na brojlerach kurzych, wykazały brak negatywnego wpływu na organy wewnętrzne i parametry produkcyjne. Co więcej, składowe produktu jak i potencjalne metabolity nie akumulują się w mięśniach piersiowym, mięśniach udowym, tłuszczu okołojelitowym czy też wątrobie. Sugeruje to możliwość wykorzystania produktów, bazującej na nowej technologii, bez zastosowania okresu karencji;
5. Wykorzystując potencjał firmy AdiFeed oraz Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu stworzono technologię produkcji w szarzy ca 100 kg, metodę standaryzacji oraz wprowadzono na rynek trzy preparaty o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych;
6. Skuteczność opracowanych i wdrożonych produktów potwierdza rosnący wolumen produkcji, a w konsekwencji sprzedaży. Na miesiąc marzec 2023 zaobserwowano około 50% wzrost sprzedaży produktów.

6. OŚWIADCZENIA

Hubert Iwiński
imię i nazwisko

Grodzisk Mazowiecki, 28.03.2023
(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Łyczko J, Różański H, Szumny A., 2022, Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures. Antibiotics (Basel). 7;11(7):913. doi: 10.3390/antibiotics11070913. mój udział polegał na tworzeniu koncepcji wykonanych analiz i badań, przygotowaniu mieszanin olejków eterycznych z kawasami i metalami, wykonywaniu analiz przeciwpiętowniczych badanych mieszanin i oszacowaniu wartości LD₅₀ oraz LD₁₀₀, przygotowaniu tekstu manuskryptu wraz z późniejszymi poprawkami, opracowaniu wyników badań analiz GC-MS, jak i skutecznego stężenia bójczego wobec wybranych przedstawicieli pierwotniaków.

28.03.2023

.....
data i podpis

Antoni Szumny
imię i nazwisko

Wrocław, 28.03.2023
(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Łyczko J, Różański H, Szumny A., 2022, Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures. Antibiotics (Basel). 7;11(7):913. doi: 10.3390/antibiotics11070913, mój udział polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji badań, analizie próbek metodą GC-MS, przygotowaniu tekstu dotyczącego analiz chromatograficznych i sposobu ich wykonania.

28.03.2023
data i podpis

Henryk Róžański
imię i nazwisko

Krosno, 28.03.2023
(miejsowość i data)

Laboratorium Biologii Przemysłowej i Eksperymentalnej
Instytut Zdrowia i Ekonomii,
Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Krośnie
Rynek 1, 38-400 Krosno,
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Łyczko J, Róžański H, Szumny A., 2022, Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures. Antibiotics (Basel). 7;11(7):913. doi: 10.3390/antibiotics11070913, mój udział polegał na opracowaniu koncepcji i kierunku badań, opracowaniu draftu manuskryptu, interpretacji oraz opisie uzyskanych rezultatów.



data i podpis

Jacek Łyczko
imię i nazwisko

Wrocław, 24.03.2023
(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Łyczko J, Różański H, Szumny A., 2022, Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures. Antibiotics (Basel). 7;11(7):913. doi: 10.3390/antibiotics11070913. mój udział polegał na analizie statystycznej wyników eksperymentów oraz ich opracowaniu.

24.03.2023 Jacek Łyczko
data i podpis

Hubert Iwiński
imię i nazwisko

Grodzisk Mazowiecki, 28.03.2023

(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Wódz K, Chodkowska K, Nowak T, Różański H., 2022, In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler. Antibiotics.; 11(7):868. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070868> mój udział polegał na opracowaniu koncepcji nowych mieszanin fitoncydowych, opracowaniu metodyki, wykonaniu badań w celu określenia dawki LD50 oraz LD100 oraz określenia ich właściwości przeciwpierwotniaczych i interpretacji uzyskanych wyników. Przygotowaniu mieszanin do badań, przygotowania tekstu manuskryptu począwszy od wstępu, poprzez metodykę, skończywszy na interpretacji wyników i sporządzeniu wniosków.

28.03.2023.....

data i podpis

Tomasz Nowak
imię i nazwisko

07.03.2023 Brudzew

(miejscowość i data)

Laboratorium Biologii Molekularnej,
Vet-Lab Brudzew,
Turkowska 58c, 62-720 Brudzew
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Wódz K, Chodkowska K, Nowak T, Różański H., 2022, In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler. Antibiotics.; 11(7):868. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070868> mój udział polegał na wykonaniu analiz MIC, opracowaniu koncepcji badań oraz metodyki badań mikrobiologicznych i genetycznych.

07.03.2023 Tomasz Nowak

data i podpis

Karolina Chodkowska

imię i nazwisko

Pionki, 27.03.2023r.

(miejsowość i data)

Krzyżanowski Partners Spółka z o.o.,

Zakładowa 7, 26-670 Pionki

afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Wódz K, Chodkowska K, Nowak T, Różański H., 2022, In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler. Antibiotics.; 11(7):868. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070868> mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, nadzorze nad poborem i/lub poborze prób na fermie drobiu, przygotowania draftu oraz wersji ostatecznej manuskryptu, analizie uzyskanych wyników, ich opisaniu oraz interpretacji.

27.03.2023r. K. Chodkowska

data i podpis

Karolina Wódz
imię i nazwisko

Brudzew 03.04.2023

(miejsowość i data)

Laboratorium Biologii Molekularnej,
Vet-Lab Brudzew,
Turkowska 58c, 62-720 Brudzew
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Wódz K, Chodkowska K, Nowak T, Różański H., 2022, In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on *Salmonella* spp. Isolated from Chicken Broiler. Antibiotics.; 11(7):868. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070868> mój udział polegał na wykonaniu analiz MIC, badanych mieszanin, wykonaniu badań w celu weryfikacji obecności genów oporności szczepów *Salmonella* spp. na antybiotyki, opracowanie i interpretacja uzyskanych wyników oraz przygotowanie metodyki wykonywanych analiz.

VET-LAB BRUDZEW
dr n. med. Karolina Wódz
MIKROBIOLOG
63 279 77 04
13986

data i podpis 03.04.2023

Henryk Różański
imię i nazwisko

Krosno, 28.03.2023
(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Różański H, Pachura N, Wojciechowska A, Gębarowski T, Szumny A., 2023, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. *Molecules.*; 28(3):1395. <https://doi.org/10.3390/molecules28031395> mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań o raz metodyki badań właściwości przeciwpierwotniaczych, a także wykonaniu analiz wartości LD50 i LD100 dla wybranych pierwotniaków i wcześniej przygotowanych mieszanin, następnie interpretacji uzyskanych wyników.


.....
data i podpis


Hubert Iwiński
imię i nazwisko

Grodzisk Mazowiecki, 28.03.2023
(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Różański H, Pachura N, Wojciechowska A, Gębarowski T, Szumny A., 2023, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. *Molecules.*; 28(3):1395. <https://doi.org/10.3390/molecules28031395> mój udział polegał na opracowaniu koncepcji nowych mieszanin fitoncydowych, opracowaniu metodyki, wykonaniu badań w celu określenia dawki LD50 oraz LD100 oraz określenia ich właściwości przeciwpierwotniaczych i interpretacji uzyskanych wyników. Przygotowaniu mieszanin do badań, przygotowania tekstu manuskryptu począwszy od wstępu, poprzez metodykę, skończywszy na interpretacji wyników i sporządzeniu wniosków.


28.03.2023
data i podpis

Natalia Pachura
imię i nazwisko

Wrocław, 29.03.2023r.

(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Różański H, Pachura N, Wojciechowska A, Gębarowski T, Szumny A., 2023, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. *Molecules.*; 28(3):1395. <https://doi.org/10.3390/molecules28031395> mój udział polegał na analizie próbek metodą GC-MS oraz z wykorzystaniem spektrometrii NMR, przygotowaniu tekstu dotyczącego analiz chromatograficznych i spektrometrycznych oraz sposobu ich wykonania, a także interpretacji uzyskanych wyników.

29.03.2023r. Podpis: Natalia

data i podpis

Henryk Róžański
imię i nazwisko

Krosno, 28.03.2023
(miejsowość i data)

Laboratorium Biologii Przemysłowej i Eksperymentalnej
Instytut Zdrowia i Ekonomii,
Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Krośnie
Rynek 1, 38-400 Krosno,
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Wódz K, Chodkowska K, Nowak T, Róžański H., 2022, In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler. Antibiotics.; 11(7):868. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070868> mój udział polegał na opracowaniu koncepcji i kierunku badań, opracowaniu draftu mansukryptu, interpretacji oraz opisie uzyskanych rezultatów.



data i podpis

Tomasz Gębarowski
imię i nazwisko

Wrocław, 27.03.2023

.....
(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Biostruktur i Fizjologii Zwierząt
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Różański H, Pachura N, Wojciechowska A, Gębarowski T, Szumny A., 2023, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. *Molecules.*; 28(3):1395. <https://doi.org/10.3390/molecules28031395> mój udział polegał na wykonaniu badań cytotoksyczności i właściwości przeciwnowotworowych analizowanych mieszanin oraz opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników.

27.03.2023

Tomasz Gębarowski

.....
data i podpis

Aleksandra Wojciechowska
imię i nazwisko

Wersowa 21/03/23

(miejsowość i data)

Niezależny pracownik naukowy
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Różański H, Pachura N, Wojciechowska A, Gębarowski T, Szumny A., 2023, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. *Molecules.*; 28(3):1395. <https://doi.org/10.3390/molecules28031395> mój udział polegał na opracowaniu wyników uzyskanych podczas analizy właściwości przeciwpierwotniaczych, dla badanych mieszanin, oraz opisanii uzyskanych wyników.

21/03/23 Aleksandra
data i podpis Wojciechowska

Antoni Szumny
imię i nazwisko

Wrocław, 28.03.2023
(miejsowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Iwiński H, Różański H, Pachura N, Wojciechowska A, Gębarowski T, Szumny A., 2023, In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. *Molecules.*; 28(3):1395. <https://doi.org/10.3390/molecules28031395> mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, analizie próbek metodą GC-MS oraz z wykorzystaniem spektrometrii NMR, przygotowaniu tekstu dotyczącego analiz chromatograficznych i spektrometrycznych oraz sposobu ich wykonania, a także interpretacji uzyskanych wyników.

28.03.2023...
data i podpis

7. DOROBEK NAUKOWY

PUBLIKACJE:

1. **Iwiński, H.**; Róžański, H.; Pachura, N.; Wojciechowska, A.; Gębarowski, T.; Szumny, A. In Vitro Evaluation of Antiprotozoal Properties, Cytotoxicity Effect and Anticancer Activity of New Essential-Oil Based Phytoncide Mixtures. *Molecules* 2023, 28, 1395. <https://doi.org/10.3390/molecules28031395>, IF 2021 **4.927**, Punkty MEiN 140
2. Chodkowska, K.A.; **Iwiński, H.**; Wódz, K.; Nowak, T.; Róžański, H. In Vitro Assessment of Antimicrobial Activity of Phytobiotics Composition towards of Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC) and Other E. coli Strains Isolated from Broiler Chickens. *Antibiotics* 2022, 11, 1818. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121818> IF 2021 **5.222**, Punkty MEiN 70
3. **Iwiński, H.**; Łyczko, J.; Róžański, H.; Szumny, A. Novel Formula of Antiprotozoal Mixtures. *Antibiotics* 2022, 11, 913. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070913>, IF 2021 **5.222**, Punkty MEiN 70
4. **Iwiński, H.**; Wódz, K.; Chodkowska, K.; Nowak, T.; Róžański, H. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Phytobiotics Mixture on Salmonella spp. Isolated from Chicken Broiler. *Antibiotics* 2022, 11, 868. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070868> 2021 **5.222**, Punkty MEiN 70
5. Łyczko, J.; Masztalerz, K.; Lipan, L.; **Iwiński, H.**; Lech, K.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Szumny, A. Coriandrum sativum L.—Effect of Multiple Drying Techniques on Volatile and Sensory Profile. *Foods* 2021, 10, 403. <https://doi.org/10.3390/foods10020403>, IF 2021 **5.561**, Punkty MEiN 100

MONOGRAFIE

1. Róžański H., **Iwiński H.**, Znaczenie roślin fitoncydowych w zootechnice i weterynarii The importance of phytoncide plants in animal science and veterinary medicine. Monografia naukowa z VII Międzynarodowej Konferencji Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna. Rośliny lecznicze i leki ziołowe w terapii i profilaktyce chorób wirusowych. Naturalne substancje przeciwwirusowe. Krosno-Wrocław, 2022, Karpacka Państwowa Uczelnia w Krośnie, ISBN 978-83-64457-73-9
2. Osnowski N., **Iwiński H.**, Róžański H., Drymel W., Kapusta K., Phytoncides and phytoalexins against coccidiosis, 2020, FeedMagazine/ Kraftfutter,
3. **Iwiński H.**, Róžański H., „Leksykon Ziół”, EDYCJA - Książki Naukowe i Specjalistyczne Grodzisk Mazowiecki 2019

4. Różański H., **Iwiński H.**, Rośliny i leki syntetyczne o działaniu przeciwcukrzycowym, Rośliny zielarskie kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna, PWSZ im. Stanisława Pigonia w Krośnie, Krosno-Wrocław 2019, s 19-38
5. Różański H., **Iwiński H.**, Słabik A., Kądziela R., Paulownia omszona – *Paulownia tomentosa* (Thunberg) Steudel jako surowiec zielarski. Znaczenie paulowni w gospodarce człowieka , Rośliny zielarskie kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna, PWSZ im. Stanisława Pigonia w Krośnie, Krosno-Wrocław 2019, s. 343-352
6. Różański H., Pietrasz A., **Iwiński H.**, Zawartość związków salicylowych w wybranych gatunkach topoli – Populus i wierzby – Salix, VI Konferencja pt. Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna. Medycyna komplementarna w zapobieganiu i leczeniu chorób cywilizacyjnych. PWSZ im. Stanisława Pigonia w Krośnie, 2019, s. 54-58

WYSTĄPIENIA

1. Chodkowska K., **Iwiński H.**, When science meets practice – phytobiotic solutions in broiler chicken production as a response to market needs. XXXII International Poultry Science Symposium PB WPSA “Science to Practice – Practice to Science”, 5- 7 September 2022, Lidzbark Warmiński, Poland
2. **Iwiński H.**, Nowe formułacje fitoncydów o właściwościach przeciwpierwotniaczych. VIII Konferencja Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna. Polskie zioła w medycynie i tradycji kulturowej., 15-16 Września 2022, Krosno, Polska

KONFERENCJE

1. XXXII International Poultry Science Symposium PB WPSA “Science to Practice – Practice to Science” 5- 7 September 2022, Lidzbark Warmiński, Poland
2. World Poultry Congress, 7-11 August 2022, Paris France
3. VIII Konferencja Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna. Polskie zioła w medycynie i tradycji kulturowej., 15-16 Września 2022, Krosno, Polska
4. VII Międzynarodowej Konferencji Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna. Rośliny lecznicze i leki ziołowe w terapii i profilaktyce chorób wirusowych. Naturalne substancje przeciwwirusowe. Krosno- Wrocław, 2022
5. VI Konferencja pt. Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna. Medycyna komplementarna w zapobieganiu i leczeniu chorób cywilizacyjnych., Krosno, 2019

8. LITERATURA

1. Noack, S.; Chapman, H.D.; Selzer, P.M. Anticoccidial drugs of the livestock industry. *Parasitol Res* **2019**, *118*, 2009-2026, doi:10.1007/s00436-019-06343-5.
2. Moritz, A.H.; Lumpkins, B.; Mathis, G.F.; Bridges, W.C.; Wilson, S.; Blair, M.E.; Buresh, R.E.; Strickland, J.R.; Arguelles-Ramos, M. Comparative efficacy of tannin-free grain sorghum varieties for the control of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poultry Science* **2023**, *102*, 102300, doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102300>.
3. Abd El-Hack, M.E.; El-Saadony, M.T.; Elbestawy, A.R.; El-Shall, N.A.; Saad, A.M.; Salem, H.M.; El-Tahan, A.M.; Khafaga, A.F.; Taha, A.E.; AbuQamar, S.F.; et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives – a comprehensive review. *Poultry Science* **2022**, *101*, 101590, doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101590>.
4. RASFF, E.C. *2021 Annual Report Alert and Cooperation Network*; 2022.
5. Stanley, D.; Hughes, R.J.; Moore, R.J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied microbiology and biotechnology* **2014**, *98*, 4301-4310, doi:10.1007/s00253-014-5646-2.
6. Kikowska, M.; Chanaj-Kaczmarek, J.; Derda, M.; Budzianowska, A.; Thiem, B.; Ekiert, H.; Szopa, A. The Evaluation of Phenolic Acids and Flavonoids Content and Antiprotozoal Activity of *Eryngium* Species Biomass Produced by Biotechnological Methods. *Molecules* **2022**, *27*, 363.
7. Adiko, V.A.; Kablan, L.C.A.; Kabran, F.A.; Seri, C.S.; Okpekon, T.A.; Attioua, B.K. Antiprotozoal activity and phenolic constituents of ethyl acetate extract from *Parinari excelsa* sabin (Chrysobalanaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **2022**, *11*, 20-23.
8. Orhan, I.E.; Ozturk, N.; Sener, B. Antiprotozoal assessment and phenolic acid profiling of five *Fumaria* (fumitory) species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2015**, *8*, 283-286, doi:[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60331-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60331-X).
9. Zaki, A.A.; Kaddah, M.M.Y.; Abulkhair, H.S.; Ashour, A. Unravelling the antifungal and antiprotozoal activities and LC-MS/MS quantification of steroidal saponins isolated from *Panicum turgidum*. *RSC Advances* **2022**, *12*, 2980-2991, doi:10.1039/D1RA08532H.
10. Ramos-Morales, E.; de la Fuente, G.; Duval, S.; Wehrli, C.; Bouillon, M.; Lahmann, M.; Preskett, D.; Braganca, R.; Newbold, C.J. Antiprotozoal Effect of Saponins in the

- Rumen Can Be Enhanced by Chemical Modifications in Their Structure. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 399, doi:10.3389/fmicb.2017.00399.
11. Ramos-Morales, E.; de la Fuente, G.; Duval, S.; Wehrli, C.; Bouillon, M.; Lahmann, M.; Preskett, D.; Braganca, R.; Newbold, C.J. Antiprotozoal Effect of Saponins in the Rumen Can Be Enhanced by Chemical Modifications in Their Structure. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.00399.
 12. Batiha, G.E.; Magdy Beshbishy, A.; Adeyemi, O.S.; Nadwa, E.H.; Rashwan, E.K.M.; Alkazmi, L.M.; Elkelish, A.A.; Igarashi, I. Phytochemical Screening and Antiprotozoal Effects of the Methanolic *Berberis vulgaris* and Acetonic *Rhus coriaria* Extracts. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25030550.
 13. Nair, J.J.; van Staden, J. Antiprotozoal alkaloid principles of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *29*, 126642, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126642>.
 14. Szabó, L.U.; Kaiser, M.; Mäser, P.; Schmidt, T.J. Antiprotozoal Nor-Triterpene Alkaloids from *Buxus sempervirens* L. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* **2021**, *10*, doi:10.3390/antibiotics10060696.
 15. Alenezi, S.S.; Alenezi, N.D.; Ebiloma, G.U.; Natto, M.J.; Ungogo, M.A.; Igoli, J.O.; Ferro, V.A.; Gray, A.I.; Fearnley, J.; de Koning, H.P.; et al. The Antiprotozoal Activity of Papua New Guinea Propolis and Its Triterpenes. *Molecules* **2022**, *27*, 1622.
 16. Cunha, A.B.; Batista, R.; Castro, M.Á.; David, J.M. Chemical Strategies towards the Synthesis of Betulinic Acid and Its More Potent Antiprotozoal Analogues. *Molecules* **2021**, *26*, 1081.
 17. Pospíšil, J.; Konrádová, D.; Strnad, M. Antileishmanial Activity of Lignans, Neolignans, and Other Plant Phenols. *Progress in the chemistry of organic natural products* **2021**, *115*, 115-176, doi:10.1007/978-3-030-64853-4_3.
 18. Derda, M.; Hadaś, E. The use of phytotherapy in diseases caused by parasitic protozoa. *Acta Parasitologica* **2014**, *60*, 1-8, doi:doi:10.1515/ap-2015-0001.
 19. Monzote, L.; Alarcón, O.; Setzer, W. Antiprotozoal Activity of Essential Oils. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **2012**, *77*, 167-175.
 20. Lam, N.S.; Long, X.; Su, X.-z.; Lu, F. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its monoterpene constituents in treating protozoan and helminthic infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2020**, *130*, 110624, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110624>.

21. Pérez, S.; Ramos-Lopez, M.; Sánchez-Miranda, E.; Fresán-Orozco, M.; Pérez-Ramos, J. Antiprotozoa activity of some essential oils. *Journal of medicinal plant research* **2012**, *6*, 2901-2908.