

Sinteza, karakterizacija i razvoj procesa biorazgradnje farmaceutika

Čavec, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:202663>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Laura Čavec

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2024.

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Laura Čavec

**SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I RAZVOJ
PROCESA BIORAZGRADNJE FARMACEUTIKA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Dragana Vuk

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Dragana Vuk

prof. dr. sc. Irena Škorić

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, srpanj 2024.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Dragani Vuk na mentorstvu, stručnim savjetima i prenesenom znanju. Veliko hvala asistentici Vilmi Lovrinčević, mag.appl.chem. na pomoći i savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac sa Zavoda za industrijsku ekologiju na suradnji i pomoći pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na podršci, pomoći te razumijevanju!

Sažetak

Farmaceutici su ključni u održavanju i poboljšanju ljudskog zdravlja, pružajući učinkovita sredstva za prevenciju, liječenje i ublažavanje simptoma mnogih bolesti. Međutim, rastući problem antimikrobne rezistencije predstavlja ozbiljan izazov za učinkovitost mnogih lijekova, posebno antibiotika. Zbog prekomjerne upotrebe i zlouporabe antimikrobnih sredstava, mnogi patogeni su razvili otpornost, što zahtijeva razvoj novih, inovativnih lijekova i terapija kako bi se uspješno borilo protiv otpornih infekcija i očuvalo zdravlje populacije.

Cilj rada je provesti termička ispitivanja na novim stilbenskim sustavima koji su pripremljeni Wittigovom reakcijom u svrhu dobivanja novih struktura. Produkti termičke reakcije su indanski i indenski derivati. Dobivenim produktima reakcije ispitano je potencijalno antimikrobno djelovanje.

Ključne riječi: farmaceutici, derivati distirilbenzena, termičke transformacije, indanski i indenski spojevi, antimikrobna ispitivanja

Summary

Pharmacists are essential in maintaining and improving human health, providing effective means to prevent, treat and relieve the symptoms of many diseases. However, the growing problem of antimicrobial resistance poses a serious challenge to the effectiveness of many medicines, especially antibiotics. Due to the excessive use and misuse of antimicrobials, many pathogens have developed resistance, which requires the development of new, innovative medicines and treatments to successfully combat resistant infections and preserve population health.

The aim of the paper is to perform thermal tests on new styling systems prepared by Wittig's reaction in order to obtain new structures. Thermal reaction products are indanese and indene derivatives. The resulting reaction products tested the potential antimicrobial activity.

Keywords: pharmaceuticals, distirilbenzene derivatives, thermal transformations, indanese and indene compounds, antimicrobial tests

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Farmaceutici	2
2.2. Heterociklički spojevi u farmaceuticima	2
2.3. Farmaceutici u okolišu	3
2.3.1. Proizvodnja farmaceutika	3
2.3.2. Izvori	3
2.4. Procesi razgradnje	6
2.4.1. Fizikalni procesi	6
2.4.1.1. Isparavanje vode	6
2.4.1.2. Isparavanje hlapljivih komponenti.....	7
2.4.1.3. Apsorpcija vode.....	8
2.4.1.4. Polimorfne promjene	8
2.4.2. Kemijski procesi.....	9
2.4.2.1. Hidrolitička razgradnja	9
2.4.2.2. Oksidacijska razgradnja	11
2.4.2.3. Fotolitička razgradnja	13
2.4.3. Biološki procesi.....	14
2.4.3.1. Biotransformacija	15
2.4.3.2. Biorazgradnja	16
2.5. Detekcija spojeva	18
2.6. Otpornost u okolišu	18
2.7. Mikrobiološka dijagnostika	20
2.7.1. Antibiogram.....	20
2.7.1.1. Bacillus subtilis	21
2.7.1.2. Pseudomonas aeruginosa	22
3. REZULTATI I RASPRAVA	24
3.1. Uvod	24
3.2. Sinteza spoja 1 Wittigovom reakcijom	24
3.3. Termička ispitivanja	25
3.4. Antibakterijska ispitivanja	28
4. EKSPERIMENTALNI DIO	31
4.1. Opće napomene	31
4.2. Sinteza spoja 1 Wittigovom reakcijom	31
4.3. Termička reakcija	32
4.4. Antibakterijska aktivnost	33

5. ZAKLJUČAK.....	34
6. LITERATURA.....	35

1. UVOD

Farmaceutici igraju ključnu ulogu u suvremenoj medicini, osiguravajući učinkovita sredstva za prevenciju, dijagnostiku i liječenje širokog spektra bolesti. Razvoj novih farmaceutskih spojeva temelji se na naprednim metodama sinteze, koje uključuju kemijske i biotehnološke pristupe, omogućujući stvaranje lijekova s poboljšanim terapijskim svojstvima. Karakterizacija tih spojeva je od suštinskog značaja za razumijevanje njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, čistoće, stabilnosti i bioaktivnosti, što je ključno za njihovu sigurnu i učinkovitu primjenu.

Međutim, proizvodnja i upotreba farmaceutika dovode do stvaranja otpada koji može predstavljati značajan ekološki i zdravstveni problem. Poseban izazov predstavlja antimikrobna rezistencija, koja je posljedica prekomjerne upotrebe antibiotika i drugih antimikrobnih sredstava. Otpornost patogena na postojeće lijekove zahtijeva razvoj novih terapijskih strategija i spojeva kako bi se učinkovito borilo protiv otpornih infekcija.^[1]

Heterociklički spojevi su ključna komponenta mnogih farmaceutskih lijekova zbog njihove raznolike kemijske strukture i biološke aktivnosti. Unatoč njihovoj učinkovitosti, stalna pojava rezistencije predstavlja značajan izazov. Zbog toga se heterociklički spojevi intenzivno istražuju kako bi se razvile nove i učinkovitije terapije koje mogu prevladati rezistenciju.^[2,3] Kao primjer aktivnih heterocikličkih spojeva ističu se indanski i indenski derivati.

U radu će biti provedene sinteze stilbenskih sustava koje će biti podvrgnute procesu termičke razgradnje zbog nastajanja indanskih i indenskih spojeva poznatih po svojoj širokoj biološkoj aktivnosti. Na dobivenim spojevima bit će proveden antimikrobni test kojim će se ispitati svojstva dobivenih derivata.

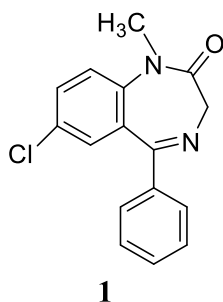
2. OPĆI DIO

2.1. Farmaceutici

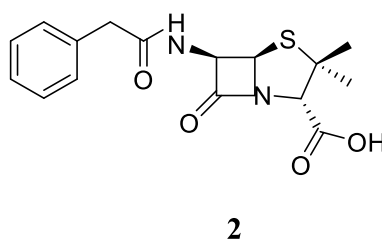
Farmaceutici su aktivni spojevi čije je korištenje postalo neizostavno u suvremenom društvu. Upotreba kako humanih tako i veterinarskih lijekova važna je u kontroli i prevenciji bolesti te poboljšanju kvalitete života i životnog vijeka. Posljednjih nekoliko desetljeća porastom potražnje za lijekovima raste i potražnja za proizvodnjom u farmaceutskim industrijama.^[1] Farmaceutici uključuju velik broj jedinstvenih i raznolikih kemijskih spojeva koji posjeduju različita svojstva od bioaktivnosti, polarnosti do optičke aktivnosti. Razvoj medicinskih i farmaceutskih disciplina, posebice sintetičke organske kemije, farmakologije te raznih bioloških specijalnosti svakodnevno dovode do otkrivanja novih kemijskih sinteza, razvoja bioaktivnih molekula te u konačnici stvaranja nekog novog farmaceutskog proizvoda. Biološki aktivni spojevi, više od 85% njih sastoji se od heterocikličkih spojeva kao jednih od najvažnijih organskih spojeva prisutnih u molekulama važnima za medicinsku kemiju.^[2]

2.2. Heterociklički spojevi u farmaceuticima

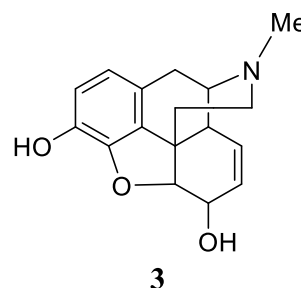
Heterociklički spojevi, ciklički su spojevi koji se mogu sastojati od tri ili više atoma od kojih najmanje jedan atom nije ugljikov. Najčešći heteroatomi koji sačinjavaju heterocikličke prstenove su dušik, sumpor i kisik. Najveći doprinos u istraživanjima i proizvodnji lijekova imaju heterociklički spojevi na bazi dušika. Široka upotreba N-heterocikla može se pripisati njihovoj stabilnosti koja se u ljudskom organizmu postiže interakcijom dušika s DNK vodikovim vezama. Osim široke primjene u farmaceutskoj industriji, široko su rasprostranjeni i u prirodi te su neophodni za život i metabolizam svih živih bića. Purinske i pirimidinske baze RNA i DNA, esencijalne aminokiseline, vitamini, pigmenti, hormoni samo su neki od spojeva koji u svojoj strukturi sadrže heterocikličke prstenove. Većina lijekova dostupnih na tržištu su sintetski derivati koji imaju široku primjenu poput diazepama (slika 1.), no



Slika 1. Diazepam



Slika 2. Penicilin



Slika 3. Morfin

razlikujemo i prirodne lijekove kao što je penicilin ili morfin. Penicilin (benzilpenicilin) je prirodni antibiotik koji se koristi za liječenje niza bakterijskih infekcija (slika 2.), dok se morfin (4,5-epoksi-17-metilmorfin-7-en-3,6-diol), koristi kao prirodni alkaloid. Upotrebljava se kao snažno sredstvo protiv bolova, prvotno izoliran iz nezrele sjemenke maka (slika 3.).

Kao najbrojnija skupina organskih spojeva osim rasprostranjenosti u prirodi te širokog spektra lijekova, heterociklički spojevi koriste se i kao herbicidi, fungicidi i insekticidi te kao komponente boja.^[2,3]

2.3. Farmaceutici u okolišu

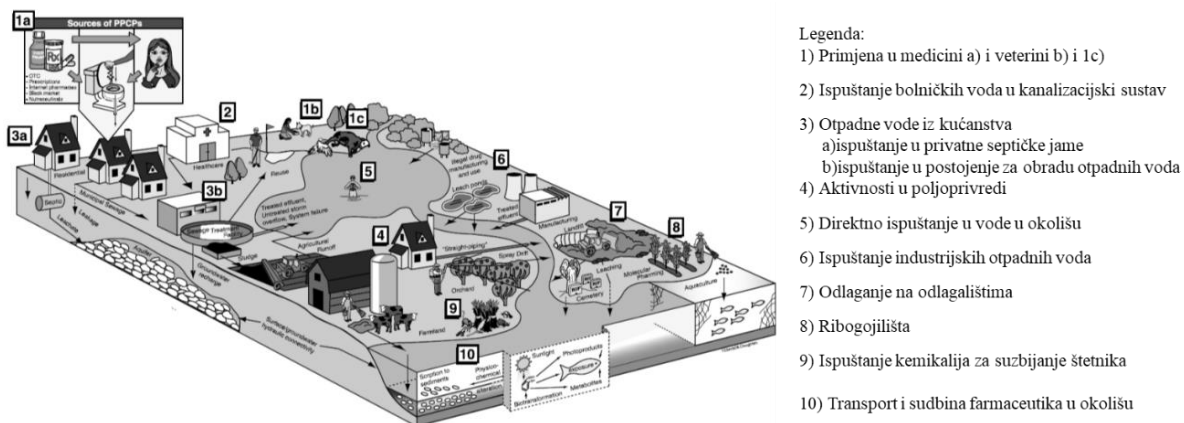
2.3.1. Proizvodnja farmaceutika

Porast konzumacije farmaceutskih proizvoda na gotovo svakodnevnoj razini, ali i porast globalne populacije doprinijelo je značajnom razvoju farmaceutske industrije posljednjih nekoliko desetljeća. Proizvodnja lijekova je složen i strogo reguliran proces koji uključuje niz koraka, od istraživanja i razvoja do proizvodnje i distribucije. Porast farmaceutske tržišta popraćeno je porastom potražnje za lijekovima potrebnih za liječenje bolesti povezanih sa starenjem, kroničnih bolesti te promjene u kliničkoj praksi. Potražnja lijekova za sniženje kolesterola se učestvostručila, dok se upotreba antidepresiva, antidijabetika i lijekova za snižavanje krvnog tlaka udvostručila. Velike promjene na farmaceutsko tržište donijela je pandemija COVID-19 koja je hitnom potrebom cijepljenja svjetskog stanovništva uzrokovala ulaganja u nove kemijske i biološke procese za proizvodnju što veće i učinkovitije količine cjepiva.^[4]

2.3.2. Izvori

Porastom farmaceutske tržišta, raste i potrošnja čime se povećava ispuštanje lijekova i njihovih metabolita u okoliš. Unatoč niskim koncentracijama farmaceutskih proizvoda u okolišu, njihov kontinuirani unos i postojanost mogu dovesti do značajnih ekoloških utjecaja. Izvore onečišćenja možemo podijeliti na točkaste izvore i difuzna onečišćenja. Točkasti izvori onečišćenja su specifične, lako prepoznatljive lokacije iz kojih onečišćenje ulazi okoliš, poput otpadnih voda iz postrojenja za pročišćavanje ili kanalizacijskih sustava. Točkasti izvori mogu se izračunati matematičkim modeliranjem. Difuzni izvori onečišćenja su rašireni i manje očiti, te dolaze iz brojnih manje koncentriranih izvora kao što su poljoprivredne površine.^[5] Izvore farmaceutika primarno možemo klasificirati u tri kategorije: izravno industrijsko ispuštanje, neizravno otpuštanje biološkim izlučivanjem te neprikladno odlaganje neiskorištenih lijekova. Za sve izvore postoji prostorna i vremenska dimenzija. Neki izvori imaju povremene emisije,

dok drugi imaju kontinuirane emisije, ovisno o dnevnim i sezonskim potrebama. Prvi značajni izvor farmaceutskog onečišćenja je sama industrija, mjesto proizvodnje brojnih aktivnih farmaceutskih spojeva (API) u različitim razmjerima. Unatoč strogim propisima, proizvodni pogoni često izravno ispuštaju otpadne vode u tokove otpadnih voda. Otpadni tokovi farmaceutskih voda sadržavaju velike koncentracije API-a te ih je potrebno obraditi na odgovarajući način. Drugi značajan izvor farmaceutskog onečišćenja je neizravno otpuštanje biološkim izlučivanjem. Ovaj proces započinje napuštanjem farmaceutskog proizvoda iz tvornice koji kreće u ciklus ponuda-potražnja. Kao jedan od najraširenijih izvora proteže se na gotovo svako kućanstvo. Konzumacijom lijekova tijelo ne može metabolizirati ukupno unesenu koncentraciju API-e već samo dio, dok se ne metabolizirani dio, koji može iznositi i do 50 %, može izlučiti iz tijela nepromijenjen putem urina ili stolice koji ulaze u kanalizacijske sustave. Lijekovi korišteni za veterinarske svrhe također dopijevaju u okoliš izlučivanjem iz organizama životinja te se preko stajskog gnojiva prenose na poljoprivredne površine. Značajnu opasnost za zdravlje okoliša predstavljaju i neiskorišteni lijekovi ili lijekovi kojima je istekao rok trajanja. Neiskorišteni lijekovi ne zbrinjavaju se na propisan način već se najčešće bacaju u komunalni otpad ili u sustave kanalizacijske odvodnje (slika 4.).^[6]



Slika 4. Izvori farmaceutika u okoliš

Veliki dio farmaceutskog onečišćenja sakuplja se u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, koja se smatraju najvećima izvorom onečišćenja. Postupak uklanjanja nije prikladan za mnoge farmaceutske proizvode jer jedinice za pročišćavanje otpadnih voda nisu projektirane za tretiranje složenih kemijskih struktura.^[1] Konvencionalni procesi obrade koji se koriste u

uređajima za pročišćavanje otpadnih voda, uglavnom biološka razgradnja i fizikalno-kemijsko odvajanje, ne uspijevaju eliminirati farmaceutske spojeve te oni zaostaju u pročišćenoj otpadnoj vodi. Pročišćena otpada voda i biokrutina ispuštaju se natrag u okoliš ili se mogu ponovno upotrijebiti u poljoprivredi kao voda za navodnjavanje ili kao prirodno gnojivo za poboljšanje plodnosti tla i rasta, no osim nutrijenata unosi se i neželjeno onečišćenje neuklonjenih API-a. Biljke mogu apsorbirati lijekove prisutne u tlu, što može dovesti do njihovog ulaska u hranidbeni lanac. Također mogu prodrijeti u podzemne vode ili otjecati u obližnje vodene sustave i izvore pite vode. Tlo djeluje kao složeni kemijski reaktor, u kojem lijekovi mogu prolaziti kroz različite transformacije stvarajući nove produkte različitih bioloških, kemijskih i toksikoloških svojstava. Neuklonjeni aktivni farmaceutski spojevi ispuštaju se u ekosustave u različitim oblicima, uključujući početne nepromijenjene spojeve, metaboličke nusprodukte i proizvode transformacije stvorene tijekom procesa obrade voda kao što su biorazgradnja, fotoliza ili hidroliza. Dok postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda djeluju kao značajan neizravan izvor u područjima bez odgovarajuće infrastrukture za pročišćavanje otpadnih voda ili nadzora izravno ispuštanje farmaceutskih proizvoda postaje primarni put. Posljedice izravnog oslobađanja onečišćenja su višestruke i dugotrajne. Vodeni ekosustav u neposrednim područjima izložen je kontinuiranom onečišćenju što dovodi do razvoja subletalnih efekata, promjene bioraznolikosti te ekološke ravnoteže. Dugoročno izlaganje može dovesti do promjene strukture i funkcije cijelog ekosustava. Osim primarnih kategorija izvora onečišćenja razlikujemo i druge puteve kao što su izlivanje otpadnih voda, akvakultura, ispiranje poljoprivrednih zemljišta, otjecanje. Ispiranje i otjecanje djeluju kao ključne veze koje povezuju kopnene i vodene ekosustave u kontekstu farmaceutskog onečišćenja. Ispiranje se odnosi na proces u kojem voda prodire kroz tlo, otapajući i noseći sa sobom razne tvari, uključujući ostatke lijekova. Ovaj proces posebno je važan u poljoprivrednim poljima gdje se primjenjuje gnojivo ili biokrutina koji sadrže lijekove. Farmaceutski proizvodi isprani iz tla mogu zagađiti podzemnu vodu, dok otjecanje uzrokovano oborina prenosi farmaceutske proizvode vezane na površini u potoke, rijeke ili jezera. Ovaj put je posebno zabrinjavajući jer može dovesti do iznenadnih, povremenih porasta farmaceutskih koncentracija u vodenim ekosustavima što predstavlja ozbiljnu prijetnju organizmima koji žive u tim staništima. Odlaganje neiskorištenih ili isteklih lijekova u komunalni otpad rezultira izravnim unošenjem lijekova u procjedne vode na odlagalištima otpada bez mogućnosti djelomičnog uklanjanja ili razgradnje prije ulaska u okoliš.^[1,6]

2.4. Procesi razgradnje

Razgradnja farmaceutika odnosi se na procese u kojima dolazi do razgradnje farmaceutskih spojeva prisutnih u okolišu. Farmaceutski spojevi, koji uključuju lijekove, hormone i druge medicinske kemikalije, često dopijevaju u prirodu putem otpadnih voda, nepravilnog odlaganja ili poljoprivredne uporabe. Rezultat procesa razgradnje je smanjenje koncentracije početne molekule farmaceutika te nastanak novih spojeva, tzv. razgradnih i transformacijskih produkata. Pojam transformacija podrazumijeva promjenu u strukturi početne molekule farmaceutika, pri čemu molekulska masa ostaje ista, dok razgradnjom dolazi do cijepanja početne molekule i nastajanja spojeva s drugačijom molekulskom masom. Procese razgradnje općenito možemo podijeliti na biotičke i abiotičke. Biotički procesi razgradnje farmaceutika uključuju aktivnosti živih organizama, kao što su mikroorganizmi bakterije i gljive te biljke, koji razgrađuju farmaceutske spojeve u okolišu. Ovi procesi igraju ključnu ulogu u prirodnom ciklusu razgradnje organskih tvari i mogu se odvijati u različitim ekosustavima, uključujući tlo, vodu te sustave otpadnih voda. Abiotički procesi razgradnje farmaceutika odnose se na kemijske i fizikalne metode koje ne uključuju žive organizme u procesu razgradnje. Odvijaju se pod utjecajem različitih čimbenika iz okoliša. Abiotički procesi su ključni za uklanjanje farmaceutskih spojeva iz okoliša, posebno u slučajevima gdje biološka razgradnja nije učinkovita ili je usporena.^[7,8]

2.4.1. Fizikalni procesi

Fizikalni procesi razgradnje su procesi koji dovode do fizičke promjene farmaceutskih proizvoda što rezultira promijenjenim terapijskim i toksičnim učincima. Vanjski i strukturni čimbenici mijenjaju fizikalna i kemijska svojstva farmaceutskih proizvoda tijekom proizvodnje i skladištenja. Fizička razgradnja uključuje promjenu materijala što je posljedica promjene okolnih uvjeta kao što su temperatura, sunčeva svjetlost, toplina i vlaga koji utječu na stabilnost lijekova. Do fizičke razgradnje farmaceutskih proizvoda dovode mnogi uzroci kao što su gubitak vode, polimorfne promjene, promjena boje, gubitak hlapljivog spoja.

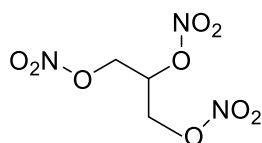
2.4.1.1. Isparavanje vode

Gubitak vode u farmaceutskim proizvodima može ozbiljno utjecati na njihovu stabilnost i učinkovitost. Kada je proizvod izložen otvorenom zraku ili kada spremnik nije hermetički zatvoren, može doći do isparavanja vode. Isparavanje dovodi do povećanja koncentracije lijeka i pomoćnih tvari, što može uzrokovati kristalizaciju aktivnog sastojka. U tekućim

pripravcima, isparavanje vode mijenja koncentraciju lijeka, što može rezultirati kristalizacijom ako je topljivost lijeka u otapalu prekoračena. Ova promjena može negativno utjecati na terapijsku učinkovitost i sigurnost proizvoda. Emulzija ulja u vodi posebno su osjetljive na gubitak vode. Isparavanje vode iz emulzija može dovesti do njihovog pucanja, što znači da se uljna i vodena faza razdvajaju, čineći emulziju neupotrebljivom. Gubitkom vode, suspenzije mogu postati grublje i destabilizirane kada izgube vodu, što utječe na homogenost i doziranje pripravka. Osiguravanje adekvatne hermetičnosti spremnika i kontrola izloženosti zraku ključni su za očuvanje stabilnosti farmaceutskih proizvoda.^[9]

2.4.1.2. Isparavanje hlapljivih komponenti

Gubitak hlapljivih komponenti može ozbiljno narušiti stabilnost farmaceutskih proizvoda. Hlapljive tvari, poput organskih otapala, često isparavaju, što može dovesti do nestabilnosti te narušavanja strukture samog proizvoda. Ovaj problem je posebno izražen kod tekućih formulacija, ali također može utjecati i na čvrste oblike doziranja, poput tableta nitroglicerina. Nitroglicerina je lipofilan i hlapljiv ester koji se koristi za sprječavanje i liječenje boli u prsima opuštajući krvne žile (slika 5.). Sklon je isparavanju iz tableta što dovodi do neravnomjerne distribucije lijeka. Ispareni nitroglicerina, osim prelasku u druge lijekove lako prelazi i u razne materijale poput papira, plastike i pamuka. Dodavanje pomoćnih tvari tzv. stabilizatora snižava se tlak pare nitroglicerina što rezultira smanjenim isparavanjem iz lijekova.^[10]



4

Slika 5. Struktura nitroglicerina

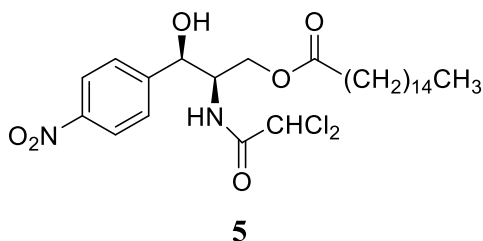
Hlapljive komponente kao što su alkohol, eter, ketoni, aldehidi, jod, hlapljiva ulja i kamfor mogu ispariti čak i na sobnoj temperaturi, što rezultira gubitkom aktivnog sastojka lijeka. Da bi se spriječio ovaj gubitak, proizvode koji sadrže hlapljive tvari potrebno je čuvati u dobro zatvorenim posudama i na odgovarajućoj temperaturi.^[9]

2.4.1.3. Apsorpcija vode

Apsorpcija vode može značajno utjecati na stabilnost farmaceutskih proizvoda koji sadrže higroskopske komponente. Ti proizvodi imaju sklonost apsorbiranju vlage iz okoline, što može dovesti do njihove degradacije kada su izloženi vlažnom okruženju. Prašci su posebno osjetljivi na ovu vrstu razgradnje, jer vlaga može uzrokovati njihovo zgrušavanje ili promjenu fizikalnih svojstava. Kako bi se spriječila razgradnja uzrokovana apsorpcijom vode, važno je da se proizvodi koji su osjetljivi na vlagu čuvaju u dobro zatvorenim ambalažama i suhim okruženjima. Dodatne mjere zaštite mogu uključivati upotrebu sušila zraka ili pakiranje u ambalažu smanjene propusnosti za vlagu. Održavanje odgovarajuće konzistencije i stabilnosti ovih proizvoda ključno je za osiguranje njihove učinkovitosti i sigurnosti za uporabu.^[9]

2.4.1.4. Polimorfne promjene

Polimorfizam, odnosno sposobnost tvari da postoji u više kristalnih oblika, sveprisutan je u farmaceutskoj industriji. Procjenjuje se da je čak 80 % lijekovitih tvari polimorfno. Polimorfni spojevi imaju identično kemijsko ponašanje kada su u otopini, ali mogu imati vrlo različito fizičko ponašanje u čvrstom stanju. Svojstva kao što su talište, topljivost, morfologija i površinska slobodna energija mogu se razlikovati. Na određenoj temperaturi i tlaku, jedan polimorfni oblik uvijek će biti najstabilniji. Ovaj oblik može biti najstabilniji oblik do točke taljenja ili može proći reverzibilni fazni prijelaz u drugi oblik prije taljenja. Neki se proizvodi, poput kloramfenikol palmitata i norfloksacina, uglavnom prodaju kao metastabilni oblici kako bi se povećala topljivost ili bioraspoloživost spoja.^[7] Kloramfenikol-palmitat, predlijek kloramfenikola, lijek je koji se koristi u liječenju bakterijskih infekcija (slika 6.).



Slika 6. Struktura kloramfenikol-palmitata

Kloramfenikol-palmitat postoji u tri polimorfna oblika: stabilni oblik α je biološki neaktivan oblik, metastabilni oblik β je aktivna modifikacija te nestabilni oblik γ . Polimorf α termodinamički je stabilniji, no njegova apsorpcija kod ljudi je znatno niža nego kod

polimorfa β , jer se oblik β otapa brže. Ove razlike u topljivosti doprinose razlici u brzinama hidrolize estera predlijeaka, a time i razlici u oralnoj apsorpciji ako se uzme u obzir da kloramfenikol-palmitat mora biti hidroliziran crijevnim esterazama prije nego što se može apsorbirati.^[11]

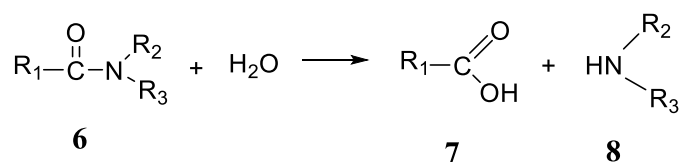
2.4.2. Kemijski procesi

Farmaceutski proizvodi sadrže komponente koje uključuju aktivne tvari i pomoćne tvari, a koje su u osnovi kemikalije različitih molekularnih struktura s raznovrsnim funkcionalnim skupinama. Zbog svoje kemijske prirode, komponente mogu biti podložne kemijskim reakcijama kada su izložene određenim okruženjima, medijima ili drugim čimbenicima. Kemijska stabilnost lijeka ključna je za njegovu učinkovitost. Kada dođe do razgradnje lijeka, smanjuje se količina aktivnog farmaceutskog sastojka, što može rezultirati smanjenom učinkovitošću terapije. Osim toga, razgradnja može proizvesti toksične proizvode koji potencijalno mogu imati štetne učinke na pacijente. Primjeri kemijske razgradnje uključuju hidrolizu, oksidaciju, redukciju, fotodegradaciju.

2.4.2.1. Hidrolitička razgradnja

Hidroliza je jedna od najčešćih reakcija razgradnje lijekova, uslijed čega dolazi do kidanja kemijskih veza. Spojevi mogu biti podvrgnuti kiselj ili alkalnoj hidrolizi kada su izloženi vodenom okruženju ili vlazi.^[9]

Veliki broj funkcionalnih skupina koje se nalaze u lijekovima sklone su hidrolizi tijekom skladištenja, od kojih su najčešći esteri i amidi. Hidroliza estera i amida događa se kao rezultat nukleofilnog napada na ugljik karboksilne skupine i naknadnog cijepanja jednostruke veze ugljika s kisikom ili dušikom.^[12] Reakcije hidrolize odvijaju se prilično sporo, pa njihova brzina ovisi o supstituentima R_1 i R_2 (shema 1.).

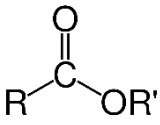
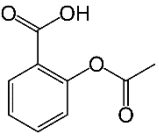
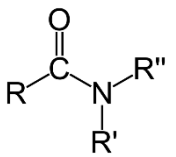
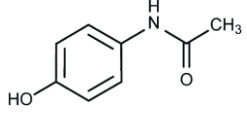
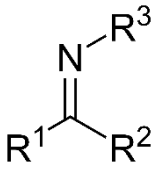
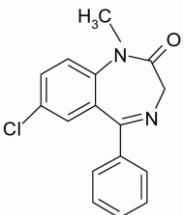
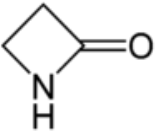
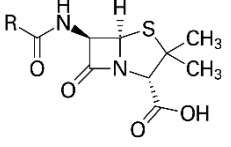


Shema 1. Opća reakcija hidrolize

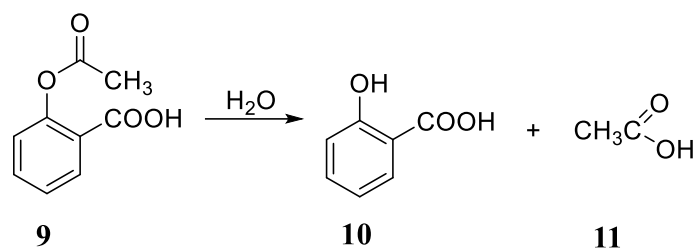
Supstituenti čije skupine privlače elektrone pojačavaju hidrolizu, dok skupine koje doniraju elektron inhibiraju hidrolizu. Supstituirani benzoati koji imaju skupinu koja privlači elektron,

poput nitro skupine, u para položaju fenilnog prstena (R1) pokazuju veće stope razgradnje od nesupstituiranog benzoata. U procesu hidrolitičke razgradnje sudjeluje veliki broj funkcionalnih skupina od kojih su neke prikazane u tablici 1 sa spojevima odgovarajućih skupina.

Tablica 1. Primjeri spojeva podložni hidrolitičkoj razgradnji

Skupina	Prikaz opće skupine	Primjer spoja iz skupine	Struktura spoja
Ester		Aspirin	
Amid		Paracetamol	
Imin		Diazepam	
Ciklički amidi (laktamski)		Penicilin	

Acetilsalicilna kiselina, poznatija kao aspirin primjer je estera koji podliježe hidrolitičkoj razgradnji. Aspirin jedan je od najčešće korištenih terapijskih supstanci sa svojim analgetskim i protuupalnim svojstvima. Acetilsalicilna kiselina stabilna je na suhom zraku, ali postupno hidrolizira u dodiru s vlagom u octenu i salicilnu kiselinu (shema 2) ^[13]

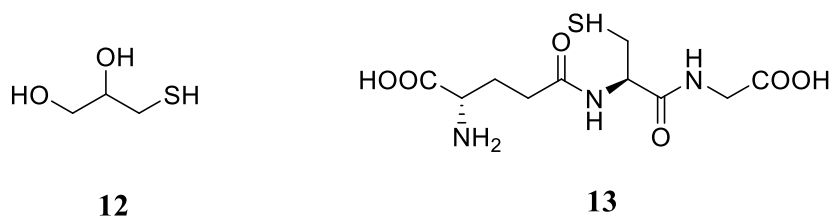


Shema 2. Reakcija hidrolize aspirina

Proces hidrolize ovisi i o čimbenicima kao što su pH, temperatura ili prisutnost tvari koji mogu biti potencijalni katalizatori. Osim okolišnih uvjeta ovisi i o vrsti lijekova te njihovoj kemijskoj strukturi i svojstvima.^[12]

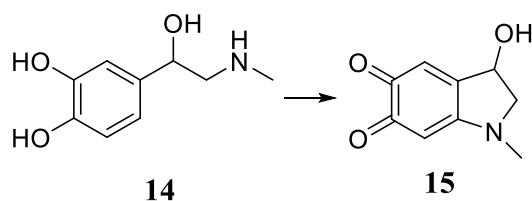
2.4.2.2. Oksidacijska razgradnja

Nakon hidrolize, oksidacija je drugi najčešći proces razgradnje farmaceutskih proizvoda. U usporedbi s hidrolizom, oksidacija je mehanički složeniji proces koji stvara širi raspon produkata razgradnje, zbog čega ga je teže kontrolirati. Proces oksidacije može se pojaviti u bilo kojoj fazi, od proizvodnje do potrošnje, kada je izložen zraku ili okolišu koji sadrži oksidirajuća sredstva.^[14] Do oksidacije spojeva može doći u krutom stanju, ali i u otopini. Brzina oksidacije spojeva u čvrstom stanju ovisi o mnogo faktora poput kristalne strukture, morfologije i površinske strukture. Proces oksidacije započinje difuzijom kisika kroz kristalnu strukturu te ovisno o strukturi spoja proces se odvija brže ili sporije. Do oksidacije najlakše dolazi kod amornih spojeva zbog povećane molekularne pokretljivosti molekula unutar neuređene strukture. Sklonost lijeka oksidaciji ovisi i o sastavu samih lijekova, budući da su pomoćne tvari najčešći pokretači oksidacije krutog ljekovitog proizvoda. Pri odabiru pomoćnih sastojaka pozornost treba obratiti na njihov sastav. Hidroperoksidi, poput organskog ili vodikovog peroksida prisutni su u mnogim pomoćnim tvarima što doprinosi razgradnji aktivnih tvari. Pufferi, sadržavajući tragove prijelaznih metala svojim sastavom također doprinose degradaciji. Pomoćne tvari u svome sastavu često sadrže i nečistoće koje potencijalno također mogu biti uzroci degradacije. Rizik od oksidacije povezan s nečistoćama u pomoćnim tvarima može se smanjiti povećanjem doze lijeka, jer razrijeđeni sustav s proporcionalno većim udjelom nečistoća po dozi lijeka sklon je bržoj degradaciji. Antioksidansi posjeduju mogućnost smanjenje brzine oksidacije, djelujući kao hvatači kisika. Razlikujemo nekoliko vrsta od kojih su neke prikazane na slici 7.



Slika 7. Primjeri antioksidansa (lijevo triglicerol, desno glutation)

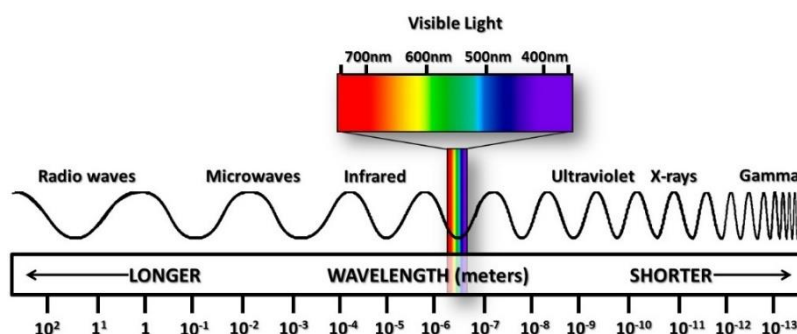
Neadekvatan način pakiranja i pohranjivanja aktivnih farmaceutskih sastojaka, također doprinosi njihovoj degradaciji.^[7] Razlikujemo tri primarna mehanizma oksidativne razgradnje: autooksidacija, nukleofilna i elektrofilna oksidacija te proces prijenosa elektrona. Autooksidacija poznata je kao lančani proces u kojem dolazi do oksidacije supstrata molekularnim kisikom. Do stvaranja lančanog procesa dolazi kada oksidirani supstrat stvara reaktivnu vrstu koja naknadno napada dodatne molekule supstrata. Lančani proces sastoji se od tri istodobne reakcije: inicijacije, propagacije i završetka. Ovisno o koncentracijama radikala i specifičnim konstantama brzine, svaka od ovih reakcija će dominirati unutar određenog vremenskog područja, što dovodi do tri različite faze. Korak inicijacije zahtijeva radikalni inicijator koji generira radikale. Reakcija inicijacije može biti potaknuta hidroperoksidima (ROOH), koji su uobičajene nečistoće pomoćnih tvari.^[14] Skupine sklone oksidaciji uključuju alkohole, aldehide, fenole, amine, etere, tiole. Kao primjer spoja sklonog procesu oksidacije je epinefrin. Epinefrin ili poznatiji kao adrenalin, lijek je koji se koristi za liječenje srčanog zastoja i anafilaksije, podvrgava se oksidaciji kako bi proizveo adrenokrom kroz mehanizam zatvaranja prstena prikazanog na shemi 3.^[7]



Shema 3. Reakcije oksidacije epinefrina

2.5.2.3. Fotolitička razgradnja

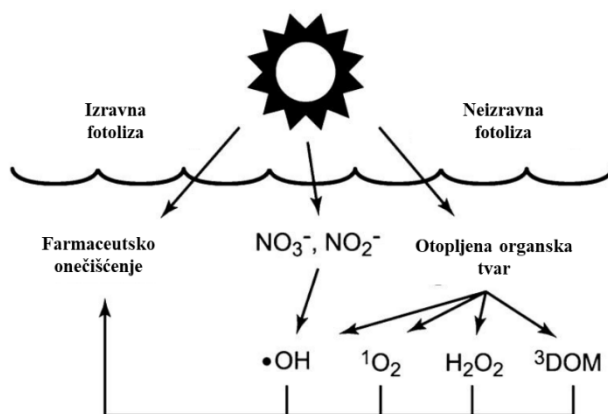
Farmaceutski proizvodi u svome sastavu mogu sadržavati komponente koje su osjetljive na svjetlost prirodnog ili umjetnog izvora. Intenzitet i valna duljina značajno utječu na



Slika 8. Spektar elektromagnetskog zračenja

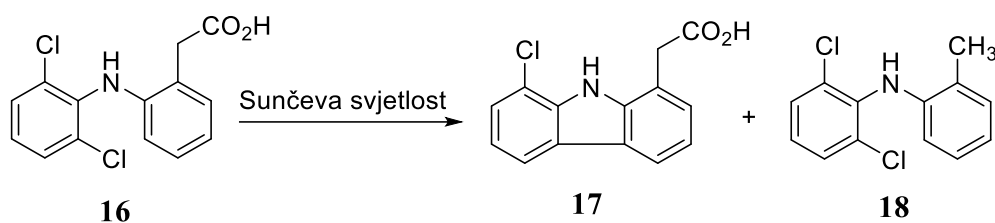
učinkovitost samog procesa razgradnje. Svjetlost pri nižem spektru valnih duljina kao što je UV, ima veću energiju.^[9] Plavo svjetlo, kratke valne duljine, sastoji se od fotona visoke energije, dok crveno svjetlo, duge valne duljine, sastoji se od fotona niske energije (slika 8.). Lijekovi posjeduju različite apsorpcijske spektre te brzina fotorazgradnje ovisi o preklapanju apsorpcijskog spektra danog lijeka sa spektrom svjetla koje pada na proizvod lijeka.^[15]

Razlikujemo dvije vrste procesa fotolize, izravnu i neizravnu. U izravnoj fotolizi, farmaceutski spoj apsorbira solarni foton. U mehanizmu neizravne fotolize, spoj nema potrebu za apsorpiranjem ili nije u stanju apsorpirati svjetlost zbog drugih kromofora u sustavu, kao što je otopljeni organska tvar, djeluje kao senzibilizirajuća vrsta. Svi spojevi, bez obzira apsorpiraju li solarne fotone ili ne, potencijalno su podložni neizravnoj fotolizi. U neizravnom fotokemijskom mehanizmu, aktivator apsorbira svjetlost i potom reagira izravno sa supstratom ili proizvodi reaktivni intermedijer koji reagira sa supstratom. Glavna vrsta koja apsorbira svjetlost u neizravnoj fotolizi je otopljeni organska tvar (DOM) prisutna u prirodnim vodama. Fotoekscitacija DOM-a dovodi do proizvodnje niza foto-kemijski proizvedenih reaktivnih međuprodukata (PPRI), uključujući reaktivne kisikove hidroksilne radikale, peroksi radikale. DOM glavna je vrsta koja izaziva osjetljivost u prirodnim vodama. Druge vrste koje apsorpiraju svjetlost također mogu stvarati PPRI, poput nitrata i nitrita koji proizvode hidroksilne radikale na sunčevoj svjetlosti (slika 9.).^[16]



Slika 9. Shematski prikaz direktne i indirektne fotolize

Prilikom fotodegradacije dolazi do razvijanja mehanizama poput oksidacijskog mehanizma, polimerizacije ili otvaranja prstena. Fotodegradacija se može pojaviti u bilo kojoj fazi, od proizvodnje do potrošnje, prilikom izloženosti svjetlu. Skupine koje se mogu razgraditi fotolizom uključuju ketone, nitro spojeve, konjugirane alkene, aromate i heterocikle.^[9] Kako bi se izbjegle fotokemijske reakcije, fotolabilne formulacije pakiraju se u obojene spremnike. Žućkasto-zeleno staklo najbolja je zaštita od UV zračenja, dok jantarna boja pruža zaštitu od infracrvenog zračenja. Diklofenak, acetazolamid, retinol, riboflavin, furosemid i fenotiazini primjeri su spojeva osjetljivih na svjetlost. Diklofenak, protuupalni je lijek koji apsorbira vrlo malo svjetlosti s valnim duljinama većim od 300 nm što dovodi do malog spektralnog preklapanja (shema 4.).^[16]



Shema 4. Reakcija fotolitičke razgradnje diklofenaka

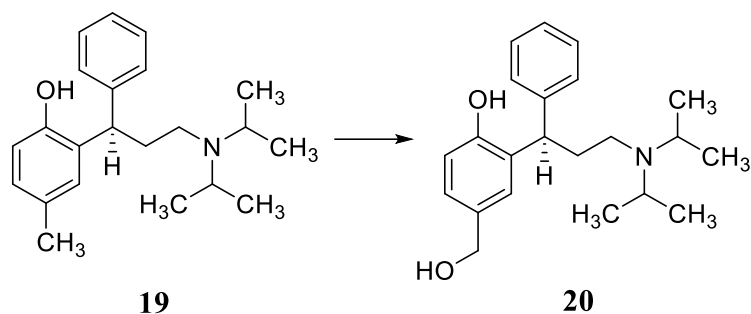
2.4.3. Biološki procesi

Biološki procesi degradacije farmaceutika uključuju razgradnju lijekova i drugih kemijskih spojeva putem mikroorganizama, enzima ili drugih bioloških sustava. Ovi procesi su ključni za smanjenje prisutnosti farmaceutski aktivnih tvari u okolišu, čime se sprječavaju potencijalno štetni učinci na ekosustave i ljudsko zdravlje. Biološka degradacija obuhvaća

različite mehanizme, kao što je biotransformacija gdje mikroorganizmi ili enzimi modificiraju kemijsku strukturu spojeva. Razumijevanje i optimizacija ovih procesa od vitalne je važnosti za razvoj učinkovitih strategija za upravljanje farmaceutskim otpadom i očuvanje okoliša.

2.4.3.1. *Biotransformacija*

Procesi biotransformacije kemijske su reakcije katalizirane mikrobnim stanicama ili enzimima koje izlučuju. Ovaj biološki proces koristi se kao način detoksificiranja lijeka kako bi se stvorili polarniji metaboliti koji se mogu lakše izlučiti iz organizma. Stvoreni metaboliti u procesu biotransformacije posjeduju drugačiju farmakološku aktivnost od početne koja može biti veća, no pokazati se toksičnijom od početne.^[17] U procesu biotransformacije, većina nastalih metabolita je neaktivna, no u nekim slučajevima metaboliti mogu posjedovati aktivnost koja može rezultirati poboljšanom djelatnošću metabolita ili negativnim utjecajem. Promjena aktivnosti metabolita od očekivane može imati neželjene ishode kao što je idiosinkratična toksičnost, za koju se pretpostavlja da je usmjerena na stvaranje reaktivnih međuprodukata metabolita. Nastali intermedijeri kovalentno modificiraju proteine u tijelu, što dovodi do oslabljene funkcije enzima ili čak izazivanja imunološkog odgovora.^[18] Proces biotransformacije ključan je za procjenu specifičnih kliničkih parametara lijekova. Početna svrha mikrobne biotransformacije bila je dobivanje aktivnijih ili manje toksičnih metabolita, čija se aktivnost morala identificirati u slučaju neočekivane farmakološke aktivnosti. No, upotreba dobivenih metabolita se proširila te postala jedan od međukoraka u otkrivanju i sintezi novih molekula sa željenim karakteristikama. Metabolizirane molekule mogu se plasirati na tržište kao novi lijekovi bez velikih ulaganja u nove procese proizvodnje, što može rezultirati značajnim ekonomskim i financijskim uštedama.^[17] Primjer biotransformacije spojeva u aktivni metabolit je proces u kojem je lijek tolterodin zamijenjen aktivnim metabolitima. Tolterodin je lijek koji se koristio za liječenje urinarne inkontinencije te učestalog mokrenja, no izazivao je štetne posljedice i nuspojave povezane sa središnjim živčanim sustavom. Mikrobna biotransformacija tolterodina u aktivni metabolit 5-hidroksimetil tolterodin, zamijenila je izvorni lijek kako bi zaobišao metabolizam i eliminirao neželjene produkte i nuspojave što je prikazano na shemi 5.^[18]

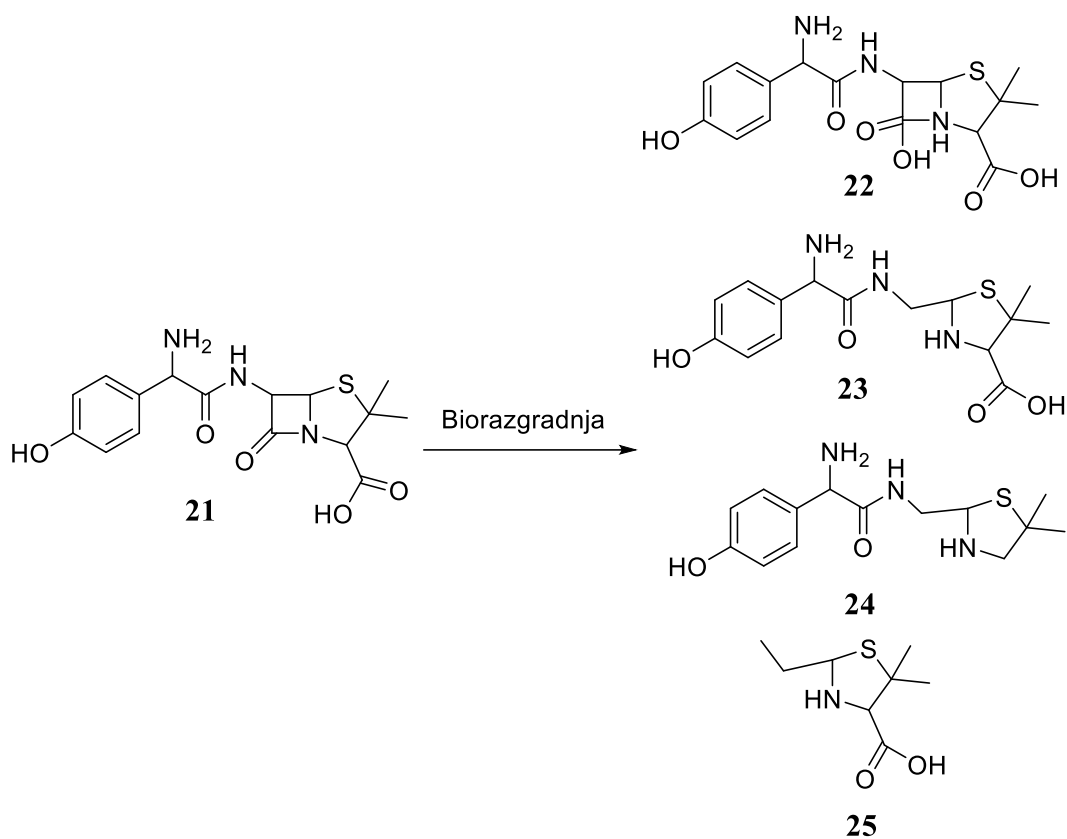


Shema 5. Primjer mikrobne transformacije tolterodina

2.4.3.2. Biorazgradnja

Biorazgradnja jedan je od specifičnih oblika biotransformacije u kojima dolazi do razgradnje supstrata s pomoću mikroorganizama na jednostavnije tvari, poput ugljikova dioksida, vode i osnovnih hranjivih tvari.^[6] Mikroorganizmi u okolišu imaju ključnu ulogu u temeljnim ekološkim procesima kao što je kruženje i razgradnja organskih komponenti. Kao veliki neistraženi potencijal, mikroorganizmi posjeduju veliku genetsku raznolikost i metaboličke sposobnosti koje pružaju brojne usluge u ekosustavu, među kojima su najvažnije održavanje kvalitete tla i vode. Pojava farmaceutika u okolišu može dovesti do promjena u strukturi i aktivnosti mikrobne zajednice. Biorazgradnja lijekova u tlu ili vodi ovisi o brojnim čimbenicima, uključujući fizikalno-kemijska svojstva lijekova kao što su topljivost u vodi i lipofilnost. Osim o fizikalno-kemijskim svojstvima, ovisi i o okolišnim uvjetima temperature i pH vrijednosti te najvažnije, aktivnosti mikroorganizama koja je ujedno i preduvjet za proces biorazgradnje.^[19] Proces biološke razgradnje farmaceutika temelji se na dvije važne skupine mikroorganizama, bakterijama i gljivama. Za razgradnju farmaceutika u podzemnim i površinskim vodama odgovorne su bakterije, dok farmaceutike u tlu razgrađuju gljive. Mikroorganizmi se koriste farmaceuticima za dobivanje energije te kao gradivnim blokovima za svoj rast. Razlikujemo dvije vrste razgradnje, kataboličku i kometaboličku. U kataboličkoj razgradnji farmaceutici se upotrebljavaju kao jedini izvor ugljika i energije, dok kometabolička razgradnja u prisutnosti prikladnog supstrata za rast uzima acetat, metanol ili glukozu. Koja će od navedenih tipova biološke razgradnje prevladavati ovisi o početnoj koncentraciji farmaceutika. Ako je koncentracija farmaceutika velika, tada samo oni služe kao izvor ugljika i energije za mikroorganizme te prevladava katabolička razgradnja. Kometabolička razgradnja prevladava pri vrlo niskim koncentracijama farmaceutika i većim koncentracijama pogodnog supstrata. Prema karakteristikama obje vrste razgradnje, u okolišu će prevladavati kometabolička razgradnja farmaceutika zbog vrlo niskih koncentracija

farmaceutika prisutnih u okolišu. Proces biorazgradnje farmaceutika na početku je vrlo spor zbog potrebnog perioda prilagodne mikroorganizama i njihovih enzima na korištenje farmaceutika kao izvora hrane. Rezultat biološke razgradnje farmaceutika može biti djelomična razgradnja ili njihova potpuna mineralizacija do ugljikova dioksida i anorganskih soli poput sulfata i nitrata. Ako biološka razgradnja nije potpuna, rezultat mogu biti produkti stabilniji od početne molekule farmaceutika s različitim toksičnim svojstvima i mogućnošću akumulacije.^[8] Proces biorazgradnje možemo prikazati kroz primjer amoksicilina. Amoksicilin, kao jedan od najprodavanijih antibiotika koristi se za liječenje nekoliko bakterijskih infekcija, uključujući upale grla, upalu pluća infekcije kože, infekcije srednjeg uha ili urinarnog trakta.^[2] Prema provedenom istraživanju koristeći različite koncentracije pripremljene otopine lijeka te bakterijske kulture, najbolje rezultate pokazala je koncentracija od 0,2 mg/ml koristeći gram-pozitivnu bakteriju *Bacillus subtilis*. Proces razgradnje amoksicilina prikazan je na shemi 6.^[20]



Shema 6. Proces biorazgradnje amoksicilina

2.5. Detekcija spojeva

Porastom konzumacije farmaceutskih proizvoda, suočavamo se s rastućim problemom njihovog prisustva u okolišu. Povećana koncentracija farmaceutika u okolišu iziskuje povećano praćenje stanja okoliša. Konvencionalne metode za detekciju lijekova oslanjaju se na tehnike poput plinske i tekućinske kromatografije u kombinacijom s masenom spektrometrijom. Ove metode predstavljaju temelj ekološkog praćenja farmaceutskih spojeva zbog visoke osjetljivosti i selektivnosti širokog spektra spojeva niskih koncentracija. Tekućinska kromatografija i masena spektroskopija pogodne su za detektiranje polarnih i ionskih spojeva, dok je kombinacija plinske kromatografije i masene spektroskopije pogodna za detekciju hlapljivih i toplinski stabilnijih spojeva. Napreci u medicini i farmaciji pružaju nam sve veću i širu ponudu proizvoda na tržištu čija složenost predstavlja veliki izazov za konvencionalne metode.^[6] Razvoj novih, naprednijih tehnika detekcije kao što su kemijski senzori i biosenzori, omogućuju nam preciznije i učinkovitije otkrivanje farmaceutskih spojeva u okolišu. Nove tehnologije upotrebom senzora temeljenih na elektrokemijskim, optičkim, imunološkim i drugim principima značajno unaprjeđuju praćenje i zaštitu okoliša. Elektrode se izrađuju sa senzornim slojem antitijela, polimera ili aptamera kako bi se olakšao prijenos elektrona između pretvarača i analita što rezultira odgovorom signala prikazanim na uređaju. Osjetljivost i selektivnost postižu se ugradnjom nanomaterijala na bazi ugljika ili metalnih nanočestica u konstrukciju elektrokemijskih. Nanomaterijali ključni su u izradi elektroda koje određuju stabilnost, vodljivost i intenzitet signala za primjenu biosenzora.^[21]

2.6. Otpornost u okolišu

Antimikrobna rezistencija (AMR) rastući je globalni zdravstveni problem koji predstavlja velike društvene, ekološke i financijske izazove za čovječanstvo. AMR se pojavljuje kada mikroorganizmi poput bakterija, virusa, protozoa i gljiva razviju otpornost na antimikrobne tvari, čineći ih neučinkovitima.^[22] Otpornost mikroorganizma može biti naslijeđena putem stanične diobe ili razvijena prilikom kontakta ili tretmana mikroorganizma s antibiotikom. Otpornost se može prenositi između mikroorganizama putem razmjene genetskog materijala konjugacijom. Glavna prednost mikroorganizama je njihova sposobnost brzog razmnožavanja u kratkom periodu, što im omogućuje brzu prilagodbu i opstanak u nepovoljnim vanjskim uvjetima.^[23] Otpornost na antibiotike počinje predstavljati veliki globalni zdravstveni problem, koji postaje sve veći uzrok smrtnih slučajeva, posebno u nerazvijenim zemljama. Pojava ovog fenomena dovela je do brojnih problema, kao što su ponovna pojava prethodno kontroliranih bolesti, pojava neizlječivih infekcija što rezultira dugotrajnim bolestima,

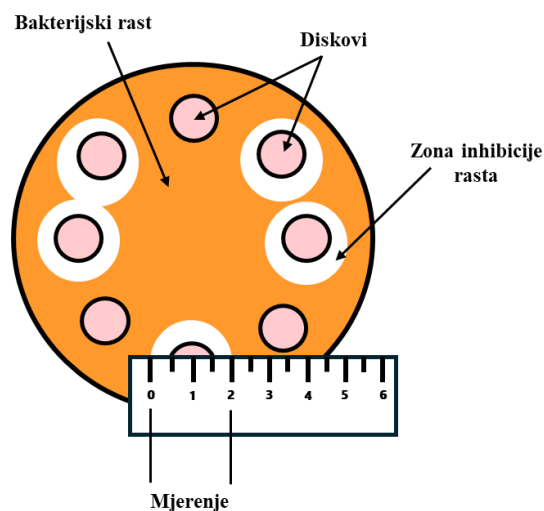
povećanjem troškova liječenja te povećane stope smrtnosti. Otpornost se može širiti kroz različite dijelove okoliša, uključujući vodu, sediment i tlo.^[24] Problem rastuće AMR posljedica je ispuštanja lijekova i specifičnih kemikalija u okoliš. Dugoročna kontaminacija površinskih voda antibioticima može imati vrlo štetne posljedice kao što su utjecaj na okoliš ili povećan razvoj superbakterija. Superbakterije su bakterije koje su stekle otpornost na više vrsta antibiotika, što ih čini teškim za liječenje.^[22] Prema istraživanjima, procjenjuje se da je više od 70% bakterija steklo otpornost na barem jedan antibiotik.^[1] Kontaminacija antibioticima uzrokuje negativan utjecaj na vodene organizme što može dovesti po poremećaja ravnoteže u ekosustavu te narušavanja kvalitete vode. Farmaceutska otpadna voda, nepropisno odlaganje neiskorištenih lijekova te bolnički efluenti smatraju se glavnim načinima ulaska farmaceutskih proizvoda u okoliš. Koncentracija lijekova detektiranih u okolišu ispod su terapijski razina, no dugoročno i kontinuirano izlaganje uzrokuje vidljive posljedice. Antibiotici u površinskim vodama mogu se prenositi na velike udaljenosti, što dovodi do brzog širenja bakterija i njihovih gena na otpornost. Biofilmovi prisutni u vodenim sustavima dodatno pospješuju razvoj i postojanost bakterija pružajući im zaštitu te mogućnosti razmjene gena otpornosti i razvitka mehanizma rezistencije. Nepravilna uporaba te pretjerana primjena antimikrobnih sredstava, neadekvatna dostupnost čiste vode, sanitarnih uvjeta i higijene s lošim upravljanjem otpada, primarni su tzv. katalizatori za razvoj AMR-a.^[22] Postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda posebna su žarišta za pojavu i širenje bakterija otpornih na antimikrobne tvari, zbog velike gustoće različitih mikrobnih zajednica. Promjene okolišnih čimbenika i temperature uvelike utječu na brzinu širenja mikroorganizama i gena otpornosti što pridonosi porastu infekcije. Oborinske vode, koje nastaju uslijed vremenskih neprilika, predstavljaju značajan izvor onečišćenja, osobito u urbanim područjima sadržavajući onečišćenja iz različitih izvora.^[25] Porastom AMR-a raste i broj novih istraživanja u području sinteze i otkrivanja novih bioaktivnih molekula, koje bi potencijalno mogle pokazivati antimikrobno djelovanje.^[26] Posljednjih godina heterociklički spojevi počinju sve više biti tema znanstvenih istraživanja. Zbog svoje strukture koja je podložna modifikacijama, heterociklički spojevi imaju mnogo prednosti i mogućnosti djelovanja. Jedna od važnijih karakteristika heterocikličkih spojeva je i selektivnost koja im omogućuje djelovanje na ciljane bakterijske stanice te izbjegavanje rizika od štetnog djelovanja na ljudske stanice. Stoga je sinteza novih heterocikličkih spojeva važno područje u istraživanju medicinske kemije i razvoju lijekova.^[24]

2.7. Mikrobiološka dijagnostika

Mikrobiološka dijagnostika je postupak utvrđivanja patogenih mikroorganizama koji uzrokuju infekcije kod ljudi, životinja ili biljaka. Ovaj proces uključuje uzimanje uzoraka, izolaciju i uzgoj, identifikaciju patogena te procjenu njihove osjetljivosti na antimikrobne lijekove. Antimikrobni test je postupak kojim određujemo učinkovitost različitih antimikrobnih sredstava protiv izoliranih mikroorganizama. Dobiveni rezultati testova govore nam o učinkovitosti nekog lijeka na patogene organizme. Veliku primjenu testovi imaju pri odabiru odgovarajućeg lijeka i kontroli širenja zarazne bolesti.^[27]

2.7.1. Antibiogram

Antibiogram je laboratorijski test koji se koristi za određivanje osjetljivosti bakterija na različite antibiotike. Ovaj test je ključan u mikrobiološkoj dijagnostici jer pomaže liječnicima u odabiru najučinkovitijeg antibiotika za liječenje bakterijskih infekcija. Proces izrade antibiograma uključuje izolaciju bakterijskog uzorka od pacijenta, njegov uzgoj na hranjivoj podlozi, te postavljanje diskova natopljenih antibioticima na površinu hranjive podloge. Nakon inkubacije, analiziraju se zone inhibicije rasta bakterija oko diskova. Veličina ovih zona pokazuje koliko je bakterija osjetljiva na određeni antibiotik. Što je promjer zone inhibicije širi, bakterijska vrsta je osjetljivija na lijek (slika 10.).^[24]



Slika 10. Primjer mjerenja zona inhibicije

2.7.1.1. *Bacillus subtilis*

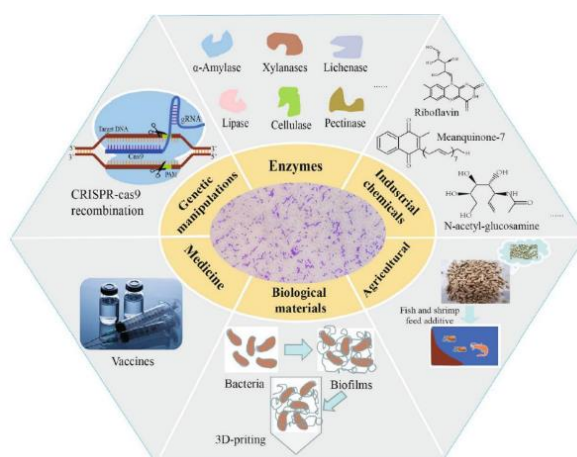
Bacillus subtilis jedna je od najvažnijih i najistraženijih bakterija u mikrobiologiji i biotehnologiji zbog svojih svojstava i učinkovitog metabolizma. Ova aerobna, gram-pozitivna bakterija, zbog svog prilagodljivog mehanizma, izvrsnih fizioloških svojstava i jednostavnog uzgoja koristi se za široku primjenu (slika 11.).



Slika 11. Lijevo *Bacillus subtilis* izgled bakterijske stanice, desno rast *Bacillus subtilisa* na hranjivoj podlozi

Bakterija *B. subtilis* poznata je po svojoj otpornosti na preživljavanje nepovoljnih uvjeta stvarajući spore otporne na toplinu koje mogu proklijati čak i nakon vrlo dugih razdoblja. Zbog svoje jednostanične membrane posjeduje sposobnosti izlučivanja velikih količina proteina i širokog spektra važnih spojeva poput enzima, antibiotika ili probiotika. Znanstvenici su razvili mnoge genetske alate za modifikaciju *B. subtilis*, uključujući CRISPR-Cas9 tehnologiju, koja omogućava preciznu genetsku manipulaciju. Ovi napredni sustavi omogućuju proizvodnju specifičnih bioaktivnih molekula kao što su rekombinirani proteini što predstavlja veliki značaj za medicinski napredak.^[28] Kao dio crijevne mikroflore, pomaže u održavanju ravnoteže korisnih bakterija, poboljšavajući zdravlje probavnog sustava te otpornost na bolesti. Otpornost na kiseline i enzime u gastrointestinalnom traktu omogućava mu preživljavanje i djelovanje tamo gdje je najpotrebnije. Koristi se u dodacima prehrani te kao probiotik za poboljšanje probave te smanjenje crijevnih upala.^[29] Kao neophodan mikroorganizam za industrijsku biotehnologiju, zahvaljujući svojim sposobnostima genetske manipulacije i otpornosti na nepovoljne uvjete ima široku primjenu u farmaceutskoj industriji, od proizvodnje vitamina i enzima do probiotika i biotehnoloških inovacija. Široka primjena čini ga nezamjenjivim u modernom farmaceutskom istraživanju i proizvodnji.^[30] Kao značajan proizvođač industrijskih enzima, uključujući amilaze, proteaze i lipaze, koji se

koriste u proizvodnji hrane, deterdženata i lijekova. Ovi enzimi igraju ključnu ulogu u raznim biokemijskim procesima, od razgradnje škroba do proizvodnje specifičnih terapijskih proteina. U farmaceutskoj industriji, enzimi proizvedeni s pomoću *B. subtilis* koriste se za sintezu lijekova te u dijagnostičkim testovima.^[29] Osim proizvodnje enzima i antibiotika, ključan je i u industrijskoj proizvodnji vitamina B₂ (riboflavina) koji je esencijalan za metabolizam u svim živim stanicama. *B. subtilis* koristi se i za biominiranje, gdje pomaže u postupku ekstrakcije metala iz ruda, kao i u bioremedijaciji kontaminiranih okoliša.^[30] *Bacillus subtilis* poznat je i po svojoj sposobnosti stvaranja površinski povezanih višestaničnih nakupina, koje se nazivaju biofilmovi. Unutar biofilmova sastavne stanice ugrađene su u matrice sastavljene od različitih izvanstaničnih polimernih tvari. Mikrobi povezani s biofilmom pokazuju značajne metaboličke i fiziološke razlike kao što su smanjena osjetljivost na antimikrobna sredstva (slika 12.).^[29]



Slika 12. Široka uporaba *Bacillus subtilis*

2.7.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, gram-negativna, aerobno-fakultativno anaerobna bakterija jedan je od najčešće izoliranih bolničkih patogena, poznat po svojoj sposobnosti da uzrokuje razne



Slika 13. Lijevo *Pseudomonas aeruginosa* izgled bakterijske stanice, desno rast *Pseudomonas aeruginosa* na hranjivoj podlozi

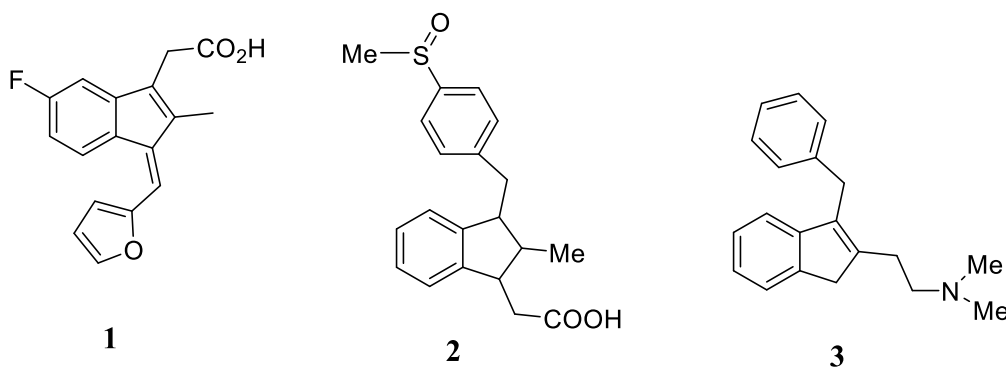
infekcije koje su često povezane s visokom stopom smrtnosti. Široka metabolička raznolikost omogućava preživljavanje u različitim okruženjima i stvaranje biofilmova (slika 13.). Kolonizacija *P. aeruginosa* kod hospitaliziranih pacijenata najčešće se javlja u respiratornom i urinarnom traktu, osobito kod pacijenata s dugotrajnom kateterizacijom.

P. aeruginosa posjeduje brojne mehanizme otpornosti na antibiotike, uključujući smanjenje koncentracije antibiotika unutar stanice zbog otežanog ulaska ili aktivnog izbacivanja, promjenu ciljnog mjesta djelovanja antibiotika te inaktivaciju antibiotika s pomoću prirodnih ili stečenih bakterijskih enzima. Liječenje infekcija uzrokovanih ovim mikroorganizmom zahtijeva pravovremenu i odgovarajuću antimikrobnu terapiju. Međutim, prirodna rezistencija ove bakterije ograničava izbor učinkovitih lijekova. Osobine *P. aeruginosae* čine ga izazovnim bolničkim patogenom, što zahtijeva kontinuirani nadzor i razvoj novih terapijskih strategija za učinkovito suzbijanje infekcija i rezistencije na antibiotike.^[31]

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Uvod

Indani, indeni, indenoni, indenoli predstavljaju važnu skupinu organskih spojeva prisutnih u mnogim prirodnim i sintetičkim proizvodima (slika 1.). Ovi benzociklički spojevi, sastoje se od benzenskog prstenom spojenog s petočlanim ciklopentanskim prstenom, igraju ključnu ulogu u razvoju novih lijekova i biološki aktivnih spojeva. Zbog svojih jedinstvenih kemijskih svojstava i struktura, indani i indeni su temelj mnogih sekundarnih metabolita s raznolikim biološkim aktivnostima. Ciklopentanski prsten može biti zasićen ili nezasićene, dok funkcionalne skupine uglavnom sadrže keton i alkohol koji određuje klasu indana i njihovu biološku aktivnost.^[32] Biološki učinci, poput antibakterijskog, antivirusnog, antitumorskog, antioksidativnog, protuupalnog i antidepresivnog djelovanje samo su dio širokog spektra biološkog djelovanja ovih spojeva.^[33] Prisutni su u različitim biljnim i morskim organizmima, gdje doprinose njihovim farmakološkim svojstvima. Zbog svoje svestranosti i prilagodljivosti, indani i indeni imaju široku primjenu u medicinskoj kemiji, čime su postali neizostavan dio mnogih terapijskih sredstava koja se koriste za liječenje različitih bolesti i poremećaja. Cilj ovog rada bio je provesti termičku reakciju u kiselim uvjetima te ispitati termičku stabilnost stirlnih sustava u svrhu dobivanja indanskih i indenskih derivata. Dobivenim derivatima ispitana je antimikrobna aktivnost.^[32]

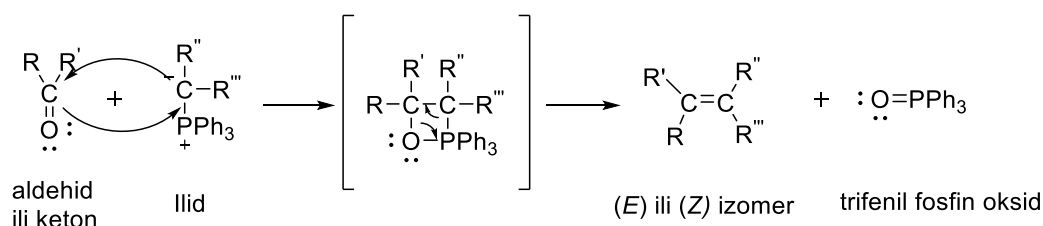


Slika 1. Primjeri indanskih i indenskih biološki aktivnih spojeva (1 aptosin, 2 sulidac, 3 serotonin)

3.2. Sinteza spoja 1 Wittigovom reakcijom

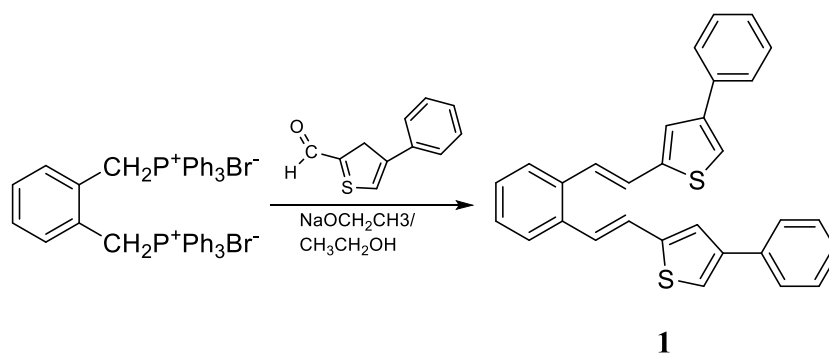
Početni spoj 1 sintetiziran je Wittigovom reakcije aldehida ili ketona s fosforinim ilidima pri čemu nastaju odgovarajući alken i fosfin-oksid. Po prirodi fosforinih reagensa koji se koriste u reakcijama, Wittigova reakcija može se podijeliti na klasičnu Wittigovu reakciju u kojoj se

koriste fosfonijevi ilidi, Horner-Emmons-ova reakcija fosfonatnih iona i Horner- Wittigova reakcija fosfinoksidnih aniona. U provedenoj sintezi korištena je klasična Wittigova reakcija. Početni korak u mehanizmu reakcije jest nukleofilna adicija negativno nabijenog atoma ugljika ilida na karbonilni ugljikov atom. U daljnjem postupku eliminacije iz međuprodukta dobivamo glavni produkt alken te nusprodukt fosfinoksid. Opći mehanizam Wittigove reakcije prikazan je na shemi 1. [34]



Shema 1. Opći prikaz Wittigove reakcije

Spoj **1** sintetiziran je iz jednog ekvivalenta difosfonijeve soli α,α' -*o*-ksilendibromida i 2 ekvivalenta 4-fenil-2-tiofenkarboaldehida uz natrijev etoksid kao bazu (shema 2). Difosfonijeva sol prethodno je sintetizirana iz α,α' -*o*-dibromksilena i 3-fenilfosfina. Dobivena smjesa produkata u obliku tri izomera pročišćena je kolonskom kromatografijom te je izoliran *trans,trans* izomer.

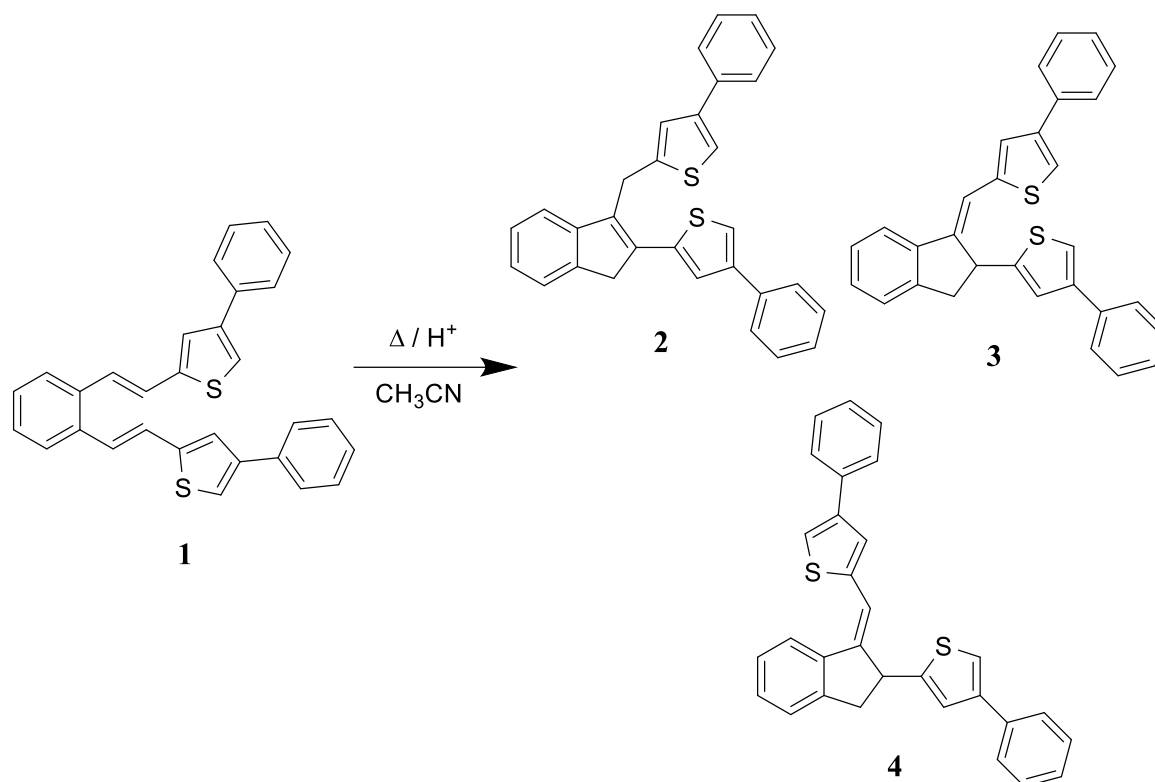


Shema 2. Sinteza spoja **1**

3.3. Termička ispitivanja

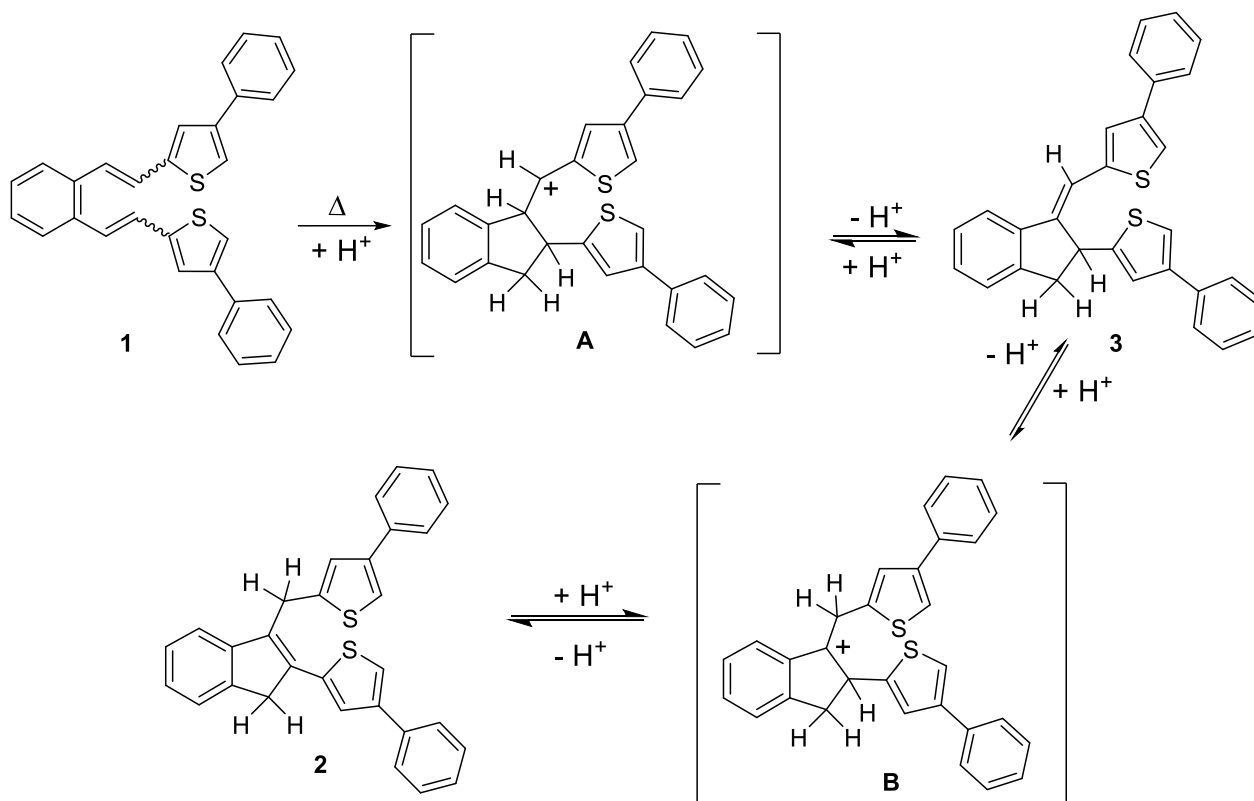
U cilju pripreve novih policikličkih struktura, provedene su termičke transformacije u kiselim uvjetima prethodno sintetiziranog spoja **1**, prema uzoru na prethodna termička ispitivanja provedena na tiofenskim derivatima koja su u kiselom mediju pokazala formiranje novih spojeva.

Prethodno sintetizirana smjesa početnog spoja **1** zagrijavana je u acetonitrilu uz dodatak klorovodične kiseline. Nakon obrade reakcijske smjese, izolirana su tri nova produkta. Izolirani spojevi pročišćeni su kolonskom kromatografijom i u potpunosti okarakterizirani. Produkt **2** nastao je kao većinski, dok su produkti **3** i **4** primijećeni u tragovima. (shema 3.).

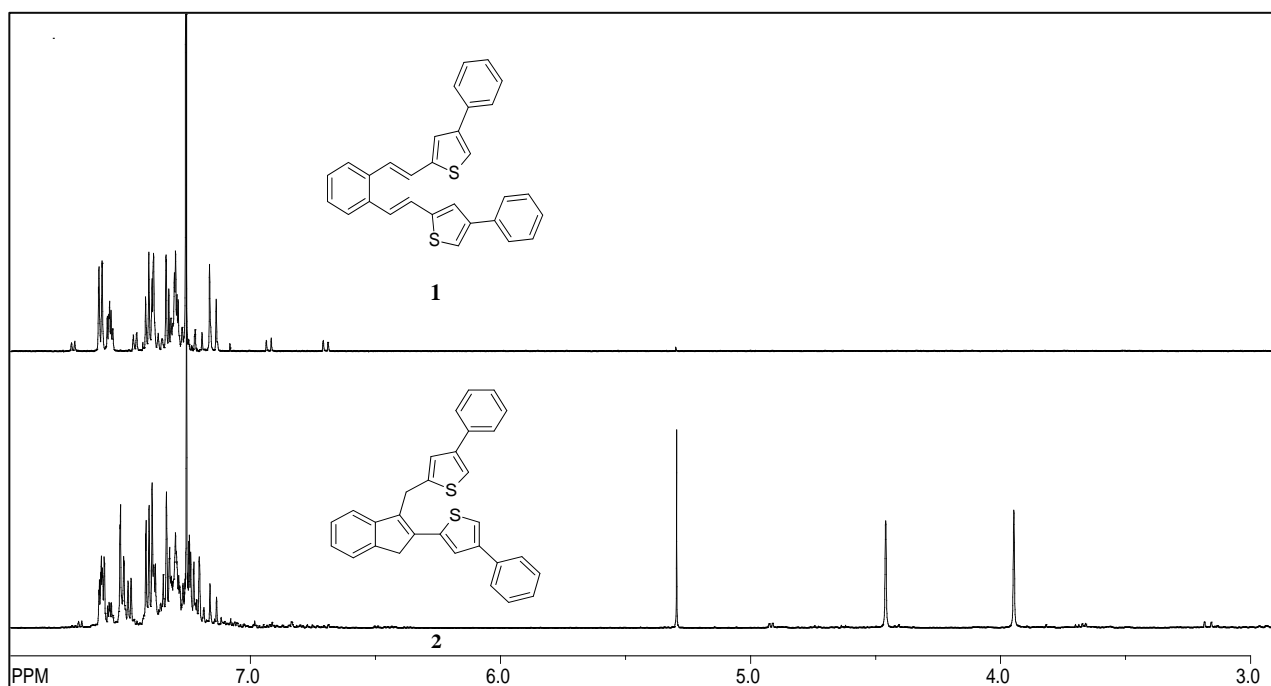


Shema 3. Termička reakcija spoja **1**

Mehanizam formiranja produkata **2** i **3** prikazan je na shemi 4. Pretpostavka je da dolazi do protoniranja etenske veze početnog spoja **1**, nakon čega dolazi do 1,5-zatvaranja i nastajanja karbokationskog intermedijera A. Izlaskom protona, intermedijer A prelazi u produkt **3**, koji se dalje preko intermedijera B protonira i deprotonira u produkt **2**, odnosno **3**.

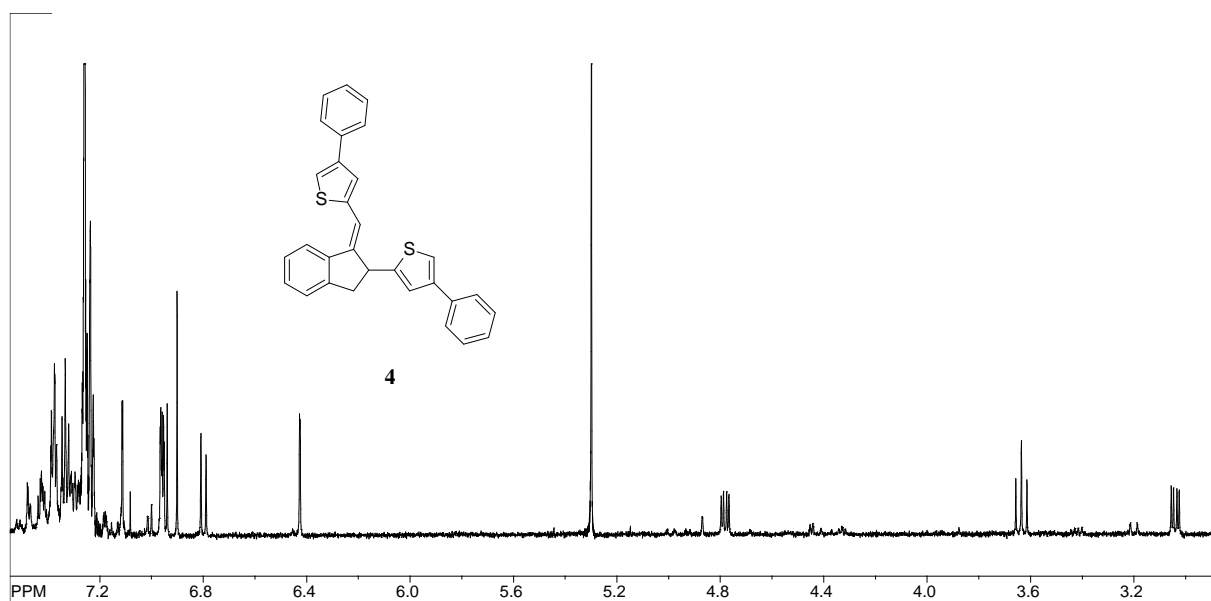


Schema 4. Mehanizam termičke reakcije spoja **1**



Slika 2. Usporedni 1H NMR spektri spoja **1** (gore) i spoja **2** (dolje)

Slika 2. pokazuje spektar početnog spoja **1** te spektar spoja **2** dobivenog termičkom reakcijom. Gornja slika prikazuje ^1H NMR spektar početnog spoja **1** gdje se u području od 6,5 do 8 ppm-a nalaze signali aromatskih protona. Donja slika ^1H NMR spektra prikazuje prisutnost termičkog indenskog produkta **2**. U području od 6,5 do 8 ppm-a nalaze se signali aromatskih protona, dok u području od 3,80 do 4,60 ppm-a uočavamo dva singleta, koji odgovaraju protonima $-\text{CH}_2$ skupine indenskog derivata.



Slika 3. ^1H NMR spektar *-cis* izomera derivata **4**

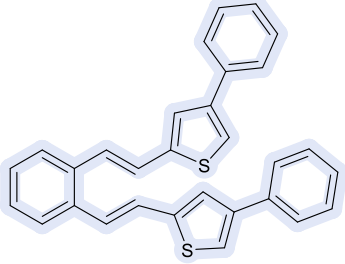
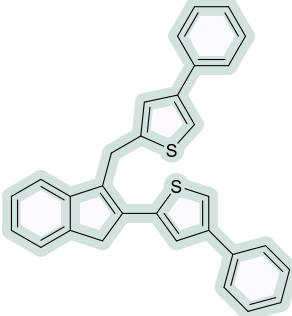
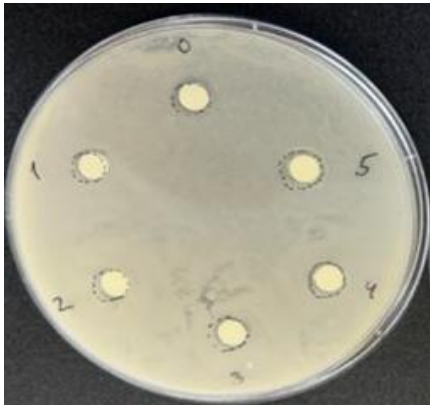
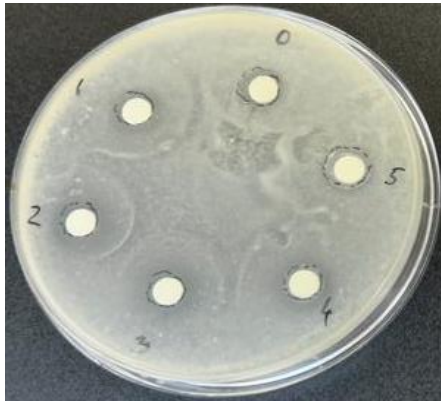


Slika 3. prikazuje ^1H NMR spektar spoja **4**, U području od 6,50 do 8 ppm-a uočavamo signale aromatskih protona, dok na 6,4 ppm-a jasno uočavamo signal tiofena. Posebno se ističu dva dublet-dublet signala na 4,78, odnosno na 3,04 ppm-a

3.4. Antibakterijska ispitivanja

Posljednjih nekoliko godina veliki broj istraživanja odnosi se na otkrivanju i sintezi novih bioaktivnih molekula, koje bi potencijalno mogle pokazivati antimikrobno djelovanje, pri čemu posljednjih godina heterociklički spojevi počinju sve više biti tema znanstvenih istraživanja. Zbog svoje strukture koja je podložna modifikacijama, heterociklički spojevi imaju mnogo prednosti i mogućnosti djelovanja. Jedna od važnijih karakteristika heterocikličkih spojeva je i selektivnost koja im omogućuje djelovanje na ciljane bakterijske

stanice te izbjegavanje rizika od štetnog djelovanja na ljudske stanice. Stoga je sinteza novih heterocikličkih spojeva važno područje u istraživanju medicinske kemije i razvoju lijekova.

Prethodno dobivenim tiofenskim derivatima proveden je test procjene antibakterijske aktivnosti, pri čemu su korištene dvije bakterijske vrste, gram-negativna *Pseudomonas aeruginosa* te gram-pozitivna *Bacillus subtilis*.

	Spoj 1	Spoj 2
Struktura spoja		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Slika 2. Antibakterijska aktivnost za spojeve 1 i 2

Tablica 2. Zone inhibicije izmjerene za oba spoja na dvije bakterijske kulture

Zone inhibicije (mm)							
Spoj	Mikroorganizmi	Koncentracije (mg/ml)					
		10	1	0,1	0,01	0,001	DMSO
1	<i>Bacillus subtilis</i>	9	9	7	6	6	6
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	9	8	7	7	7
2	<i>Bacillus subtilis</i>	9	8	7	7	7	7
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	7	6	6	6	6

Prema rezultatima dobivenim antimikrobnim testom (slika 2.), oba spoja pokazala su potencijalnu antibakterijsku aktivnost. Za svaki spoj izmjerene su zone inhibicije prikazane u tablici 2. Spoj 1 pokazao je najveću antibakterijsku aktivnost pri koncentracijama od 10 mg/ml i 1 mg/ml za oba mikroorganizma. Pri najmanjoj koncentraciji, 0,001 mg/ml, spoj 1 pokazao je veću antimikrobnu aktivnost za *Pseudomonas aeruginosa*. Spoj 2 pokazao je najveću antimikrobno djelovanje pri najvećoj koncentraciji od 10 mg/ml za *Bacillus subtilis*. Pri najmanjoj koncentraciji, 0,01 mg/ml, najmanja antimikrobna aktivnost izmjerena je za *Pseudomonas aeruginosa*.

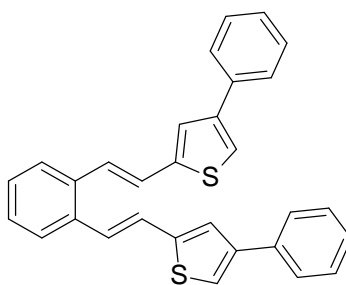
4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silika-gelom i na pločama presvučenim tankim slojem silika-gela. Za identifikaciju sintetiziranih spojeva koristila se nuklearna magnetska rezonancija (^1H NMR i ^{13}C NMR). ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na instrumentu Bruker AV-600 te AV-300 spektrometru, koji rade na frekvenciji od 600 MHz i 300 MHz za ^1H jezgre i frekvenciji od 150 MHz te 75 MHz za ^{13}C jezgre. Svi NMR spektri snimani su u CDCl_3 kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao referencu.

4.2. Sinteza spoja 1 Wittigovom reakcijom

2,2 g difosfonijeve soli α,α' -o-ksilendibromida otopljeno je u 50 ml apsolutnog etanola. Nakon pola sata miješanja na magnetskoj miješalici, u nastalu suspenziju dodano je 2,2 eq 4-fenil-2-tiofenkarboaldehida. Prethodno pripremljena otopina natrijeva etoksida (2,2 eq natrija otopljeno u 7,5 ml suhog etanola) dokapana je u smjesu uz konstantno miješanje. Reakcijska smjesa je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi nakon čega je etanol uparen, a ostatak je ekstrahiran u diklormetanu uz prethodno dodavanje 50 ml destilirane vode. Po završetku ekstrakcije, organski sloj sušen je na MgSO_4 . Nakon uparavanja otapala, ostatak je pročišćen kromatografijom na koloni punjenoj silika-gelom (15 g) uz petroleter kao eluens pri čemu je izoliran spoj 1.



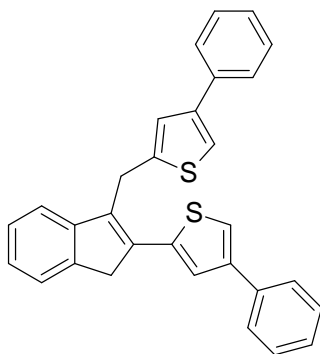
1

1,2-bis ((E)-2- (4-feniltiofen-2-il) vinil) benzen (1):

^1H NMR (CDCl_3 ; 300 MHz) δ /ppm: 7,51-7,63 (m, 4H), 7,20-7,48 (m, 16 H), 7,13 (d, 2H, $J=16,1$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 ; 75 MHz) δ /ppm: 143,6, 142,8, 135,6, 135,4, 128,8, 127,9, 127,3, 126,7, 126,4, 126,3, 125,3, 124,4, 119,5

4.3. Termička reakcija

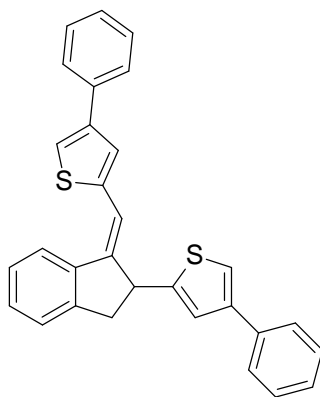
Smjesa izomera spoja **1** zagrijavana je u 100 mL acetonitrila uz dodatak 1 mL klorovodične kiseline na temperaturi refluksa otapala. Nakon 48 sati, reakcijska smjesa neutralizirana je s 10%-tnom vodenom otopinom NaOH u vodenoj kupelji te ekstrahirana etil-acetatom, nakon čega je organski sloj sušen na MgSO₄. Nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni uz silika-gel i petroleter kao eluens izolirana su tri produkta.



2

4-fenil-2-((2-(4-feniltiofen-2-il)-1H-inden-3-il)metil)tiofen (*trans,trans*-2):

¹H NMR (CDCl₃; 300 MHz) δ /ppm: 7,59 (d, 2H, *J*=7,5 Hz), 7,46-7,54 (m, 2H), 7,18-7,43 (m, 12H), 4,46 (s, 2H), 3,94 (s, 2H); ¹³H NMR (CDCl₃; 75 MHz) δ /ppm: 146,0, 142,6, 142,5, 142,1, 141,7, 139,9, 136,1, 136,0, 135,6, 135,4, 128,9 (2C), 128,7 (2C), 127,3, 127,0, 126,8, 126,4 (2C), 126,3 (2C), 125,4, 124,6, 124,3, 123,5, 120,2, 119,7, 118,6, 41,4, 27,5



4

(Z)-4-fenil-2-((2-(4-feniltiofen-2-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-iliden)metil)tiofen (-cis 4):

^1H NMR (CDCl_3 ; 600 MHz) δ /ppm: 7,21-7,45 (m, 13C), 7,11 (d, 1H, $J=1,4$ Hz), 6,93-6,97 (m, 2H), 6,90 (s, 1H), 6,80 (d, 1H, $J=11,5$ Hz), 6,43 (s, 1H), 4,78 (dd, 1H, $J=13,3$; 5,4 Hz), 3,64 (t, 1H, $J=13,3$ Hz), 3,04 (dd, 1H, $J=13,3$; 5,4 Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 ; 150 MHz) δ /ppm: 151,0, 145,7, 141,1, 139,1, 137,5, 137,3, 137,2, 136,3, 136,1, 131,0, 129,2, 129,0, 128,6, 128,1, 127,0, 126,8, 126,1, 125,9, 125,3, 122,8, 121,9, 118,4, 44,6, 41,5

4.4. Antibakterijska aktivnost

Za svaki uzorak pripremljeno je pet razrjeđenja koje smo nanosili na diskove izrađene od filter-papira promjera 6 mm. Diskovi su potom preneseni na uzgojene kulture bakterija na hranjivom agaru. Prva bakterijska kultura je gram-pozitivna bakterija *Bacillus subtilis* uzgojena na hranjivoj podlozi. Druga bakterijska kultura, *Pseudomonas aeruginosa* gram-negativna je bakterijska kultura također uzgojena na hranjivoj podlozi. Petrijeve zdjelice s kulturama i natopljenim diskovima stavlja se na inkubaciju na 37 °C 24 sata. Nakon provedene inkubacije aktivnost za svaki spoj određena je mjerenjem zona inkubacije. Rezultati su prikazani u tablici 2. (rezultati i rasprava).

5. ZAKLJUČAK

U sklopu izrade ovog završnog rada uspješno je provedena sinteza početnog spoja **1** Wittigovom reakcijom te okarakteriziran spektroskopskim metodama. Dobiveni stilbeniski sustavi podvrgnuti su termičkom ispitivanju u kiselom mediju, u cilju dobivanja indanskih i indenskih produkata. Dobiveni produkti okarakterizirani su u potpunosti te je ispitana njihova antimikrobna aktivnost. Oba spoja u kombinaciji s oba mikroorganizma pokazala su potencijalnu antibakterijsku aktivnost.

6. LITERATURA

1. Kümmerer K., Antibiotics in the aquatic environment, *Chemosphere* 75 (2009) 417–434
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
2. Heravi M., Zadsirjan V., Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview, *RSC Advances*, 10 (2020) 44247-44311
DOI: 10.1039/d0ra09198g
3. Ramadevi K., Bathula R., Sadanandam P., Vantikommu J., Manager R., Naidu S., Pharmacy V., Vidyalaya M., Pasha M., Ethnopharmacological Significance of Nitrogen Containing Heterocyclic Compounds, *Advances in chemical sciences*, 2024, 29-52
DOI: 10.22271/int.book.149
4. González P., López Z., Cabral Ruelas H., Pharmaceuticals Market, Consumption Trend and Disease Incidence Are Not Driving the Pharmaceutical Research on Water and Wastewater, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18 (2021) 2532-2569
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18052532>
5. W.C. Li, Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil, *Environmental Pollution* 187 (2014) 193e201
DOI: 10.1016/j.envpol.2014.01.015
6. Ashiwaju B., Uzougbo C. G., Orikpete O. F., Environmental Impact of Pharmaceuticals: A Comprehensive Review, *Matrix Science Pharma* 7 (2024) 85-94
DOI: 10.4103/mtsp.mtsp_15_23
7. Lieberman H., Vemuri M.N., Chemical and Physicochemical Approaches to Solve Formulation Problems, *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2015, 767-788
DOI: 10.1016/B978-0-12-417205-0.00032-8
8. Periša M., Babić S., Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* 65 (2016) 471–482
DOI: 10.15255/KUI.2015.026
9. Khan H. Y., Ahmad A., Butt M. H., Mallhi T. H., Role of Decomposition on Drug Stability, *Drug Stability and Chemical Kinetics*, 2020, 83-94
DOI: 10.1007/978-981-15-6426-0_7
10. Loftsson T., Drug Degradation in Solid State, *Drug Stability for Pharmaceutical Scientists*, 2014, 115-120
DOI: 10.1016/B978-0-12-411548-4.00006-4

11. Choudhary D., Goykar H., Kalyane D., Tekade R. K., Prodrug design for improving the biopharmaceutical properties of therapeutic drugs, *The Future of Pharmaceutical Product Development and Research*, 2020, 179-226
DOI: 10.1016/B978-0-12-814455-8.00006-2
12. Housheh S., *Stability of drugs and medicines Hydrolysis*, 2017
DOI: 10.13140/RG.2.2.24133.35041
13. Ganea M., Cozma A., Bota S., *Study of hydrolysis of acetylsalicylic acid*, 2017
DOI: 10.13140/RG.2.2.24133.35041
14. Gabrič A., Hodnik Ž., Pajk S., *Oxidation of Drugs during Drug Product Development: Problems and Solutions*, *Pharmaceutics*, 14 (2022) 325
DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020325>
15. Loftsson T., *Principles of Drug Degradation, Drug Stability for Pharmaceutical Scientists*, (2014), 5-62
DOI: 10.1016/B978-0-12-411548-4.00002-7
16. Arnold A. W., McNeill K., *Transformation of pharmaceuticals in the environment: Photolysis and other abiotic processes*, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 50 (2007) 361-385
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(07\)50011-5](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(07)50011-5)
17. Pervaiz I., Ahmad S., Madni M. A., Hameed F., *Microbial Biotransformation: a Tool for Drug Designing*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49 (2013)
18. Shanu-Wilson J., Evans L., Wrigley S., Steele J., Atherton J., Boer J., *Biotransformation: Impact and Application of Metabolism in Drug Discovery*, *Med Chem Lett.*, 11 (2020) 2087-2107.
DOI: 10.1021/acsmchemlett.0c00202
19. Caracciolo Barra A., Topp E., Grenni P., *Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106 (2015) 25-36
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.040>
20. Kovačić S., Lovrinčević V., Vuković Domanovac M., Vuk D., *Amoxicillin Biodegradation with Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa: Characterization of Relevant Degradation Products*, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 10 (2023)
DOI: <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2023.2182>

21. Letsoalo R. M., Sithole T., Mufamadi S., Mazhandu Z., Sillanpaa M., Kaushik A., Mashifana T., Efficient detection and treatment of pharmaceutical contaminants to produce clean water for better health and environmental, *Journal of Cleaner Production* 387 (2023) 135798 – 135812
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135798>
22. Rayan A. R., Pharmaceutical effluent evokes superbugs in the environment: A call to action, *Biosafety and Health* 5 (2023) 363–371
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135798>
23. K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, *Journal of Environmental Management* 90 (2009) 2354–2366
DOI: [10.1016/j.jenvman.2009.01.023](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023)
24. Sulaiman M., Hassan Y., Taskin-Tok T., Noundou X. S., Synthesis, antibacterial activity and docking studies of benzyl alcohol derivatives, *Journal of the Turkish Chemical Society* 7 (2020) 481-488
DOI: <https://doi.org/10.18596/jotcsa.692113>
25. Caban M., Stepnowski P., How to decrease pharmaceuticals in the environment, *Environmental Chemistry Letters*, 19 (2021) 3115–3138
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01194-y>
26. Bayrak H., Demirbaş A., Demirbas N., Alpay Karaoğlu Ş., Synthesis of some new 1,2,4-triazoles starting from isonicotinic acid hydrazide and evaluation of their antimicrobial activities, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (2009) 4362-4368
DOI: [10.1016/j.ejmech.2009.05.022](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.022)
27. Tang Y.-W., Persing D.H., Diagnostic Microbiology, *Encyclopedia of Microbiology*, (2009), 308-320
DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00180-2>
28. Su Y., Liu C., Fang H., Zhang D., *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine, *Microbial Cell Factories*, 19 (2020) 173-185
DOI: [10.1186/s12934-020-01436-8](https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8)
29. Earl M. A., Losick R., Kolter R., Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*, *Trends in Microbiology*, 16 (2008) 269-275
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>

30. Stülke J., Gruppen A., Bramkamp M., Pelzer S., *Bacillus subtilis*, a Swiss Army Knife in Science and Biotechnology, *Journal of Bacteriology*, 205 (2023) 102-125
DOI: 10.1128/jb.00102-23
31. Gužvinec M., Butić I., Jelić M., Bukovski S., Lucić S., Andrašević Tambić A., Rezistencija na antibiotike u bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, *Infektološki glasnik*, 32 (2012) 71-80
32. Naseem A., Synthetic Advances in the Indane Natural Product Scaffolds as Drug Candidates, *Studies in Natural Products Chemistry*, 51 (2016) 383-434
DOI: 10.1016/B978-0-444-63932-5.00008-5
33. Prasher P., Sharma M., Medicinal Chemistry of Indane and Its Analogues: A Mini Review, *ChemistrySelect*, 11 (2021) 2658-2677
DOI: <https://doi.org/10.1002/slct.202100177>
34. Ouellette J. R., Rawn D., Aldehydes and Ketones: Nucleophilic Addition Reactions, *Organic Chemistry*, (2018) 595-623
DOI: 10.1016/B978-0-12-812838-1.50020-7