

# Biološka aktivnost kvarterne soli 3-aminokinuklidina

---

**Bilandžić, Katijana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:015985>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju

Katijana Bilandžić

**BIOLOŠKA AKTIVNOST KVARTERNE SOLI 3-AMINOKINUKLIDINA**

Završni rad

Split, 2022.

Ovaj rad, izrađen na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Renate Odžak i doc. dr. sc. Matilde Šprung, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnica biologije i kemije.

*Zahvaljujem se svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Renati Odžak i doc. dr. sc. Matildi Šprung koje su mi dale priliku da naučim nešto novo i sudjelujem u eksperimentalnom radu. Hvala i na ukazanom strpljenju kada stvari nisu išle po planu te pomoći koju su pružale kad god je to bilo potrebno.*

*Hvala mojim prijateljicama Lucijani, Lari i Ileani koje su dijelile moje probleme i brige, kako životne, tako i fakultetske. Hvala im što su uvijek nalazile vremena saslušati me i udijeliti dobar savjet. Bez vas ove tri godine ne bi bile iste.*

*Jedno veliko hvala mojoj obitelji koja me naučila da ne odustajem nakon prve prepreke i koja me svakog dana ohrabruje da učim i napredujem u onome što volim. I za kraj hvala momku koji je moja najveća životna podrška i poticaj.*

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

### BIOLOŠKA AKTIVNOST KVARTERNE SOLI 3-AMINOKINUKLIDINA

**Katijana Bilandžić**

Kvarterni amonijevi spojevi (QACs) su amfifilni spojevi, izuzetnih svojstava i širokih mogućnosti primjene. Pokazuju vrlo dobru biološku aktivnost te zahvaljujući svojim antimikrobnim svojstvima veliki su potencijal u proizvodnji novih antibiotika. Zbog razvoja nepoželjne bakterijske rezistencije na ove spojeve, trenutno je u središtu pažnje sinteza modificiranih kvarternih amonijevih soli koje su razgradive, a u isto vrijeme jednako efikasne. U svrhu ovog istraživanja je novosintetiziranoj soli 3-aminokinuklidina s alifatskim lancem od 16 ugljikovih atoma metodom mikrodilucije određena biološka aktivnost na sedam bakterijskih sojeva: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus*. Dobivene vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija potvrdile su prethodna istraživanja da QACs pokazuju široki raspon antimikrobne aktivnosti s boljim djelovanjem na Gram-pozitivne bakterije.

**Ključne riječi:** kvarterni amonijevi spojevi, bakterije, rezistencija, biološka aktivnost

**Rad sadrži:** 25 stranica, 13 slika, 4 tablice i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentorice:** Dr. sc. Renata Odžak, izvanredni profesor

Dr. sc. Matilda Šprung, docent

**Ocjenjivači:** Dr. sc. Renata Odžak, izvanredni profesor

Dr. sc. Matilda Šprung, docent

Dr. sc. Barbara Soldo, docent

Rad prihvaćen: 19. rujna 2022.

## Basic documentation card

University of Split

Final thesis

Faculty of science

Department of Chemistry

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

### BIOLOGICAL ACTIVITY OF 3-AMINOQUINUCLIDINE QUARTERNARY SALT

**Katijana Bilandžić**

Quarternary ammonium compounds (QACs) are amphiphilic compounds of exceptional properties and a wide range of application possibilities. They display very good biological activity and owing to their antimicrobial properties, they exert great potential in the production of new antibiotics. Due to the development of bacterial resistance to QACs, the current aim is to synthesize new and modified QACs which are biodegradable, but still efficient. For this research purposes, the biological activity of newly synthesized 3-aminoquinuclidine quarternary salt, containing 16 carbon atoms in an alkyl chain, has been investigated by microdilution method on seven bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. Obtained minimum inhibitory concentrations have confirmed the previous findings that QACs exhibit wide-range antibacterial potential with better activity against Gram-positive bacteria.

**Keywords:** quarternary ammonium compounds, bacteria, resistance, biological activity

**Thesis consists of:** 25 pages, 13 figures, 4 tables and 19 references, original in: Croatian

**Mentors:** Renata Odžak, Ph.D. *Associate Professor*

Matilda Šprung, Ph.D. *Assistant Professor*

**Reviewers:** Renata Odžak, Ph.D. *Associate Professor*

Matilda Šprung, Ph.D. *Assistant Professor*

Barbara Soldo, Ph.D. *Assistant Professor*

Thesis accepted: September 19, 2022

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>2</b>
2.1. Kvarterni amonijevi spojevi .....	2
2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva kvarternih amonijevih spojeva .....	2
2.1.2. Biološka aktivnost kvarternih amonijevih spojeva .....	3
2.2. Građa bakterijske stijenke.....	4
2.3. Mehanizam antimikrobne aktivnosti kvarternih amonijevih spojeva.....	6
2.4. Kvarterni amonijevi spojevi u antisepticima i dezinficijensima .....	7
2.5. Mehanizmi bakterijske rezistencije na kvarterne amonijeve spojeve.....	8
2.6. Biorazgradnja kvarternih amonijevih spojeva .....	10
2.7. Kinuklidin i njegova svojstva .....	11
2.7.1. Kinuklidin – prirodni produkt .....	11
2.7.2. Kemijska i fizikalna svojstva kinuklidina .....	12
2.7.3. 3-Supstituirani derivati kinuklidina i njihova biološka aktivnost .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>14</b>
3.1. Kemikalije i potrošni materijal .....	14
3.2. Metode .....	15
3.2.1. Priprema medija .....	15
3.2.2. Uzgoj staničnih kultura .....	15
3.2.3. Priprema nosintetiziranog spoja za analizu .....	17
3.2.4. Metoda mikrodilucije .....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
4.1. Rezultati mjerenja u logaritamskoj fazi rasta bakterija .....	20
4.2. MIK vrijednosti .....	20

4.3. Rasprava .....	21
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>23</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>24</b>



## 1. UVOD

Kvarterni amonijevi spojevi su kemijski spojevi građeni od centralnog, pozitivno nabijenog dušikovog atoma sa četiri kovalentno vezana supstituenta. Njihova amfifilna struktura čini ih biološki aktivnim tvarima koje su našle primjenu u sastavu različitih komercijalnih proizvoda. Još važnije, zahvaljujući svojoj strukturi i svojstvima, kvarterni amonijevi spojevi su u posljednjih stotinjak godina postali izrazito potentni u borbi protiv bakterijskih infekcija. Danas ih možemo pronaći u sastavu gotovo svih površinski aktivnih tvari, dezinficijensa i antiseptika [1].

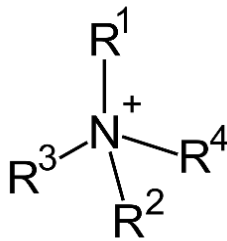
Glavna prepreka djelovanju ovih spojeva postao je razvoj bakterijske rezistencije. Sa otkrićem njihovog potencijala započelo je intenzivnije istraživanje i komercijalizacija spojeva. Visoka stabilnost, koja se pokazala ključnom u sintezi, s druge strane uzrokuje dugo zadržavanje u prirodi i sporu razgradnju što pogoduje razvoju rezistentnih bakterija. Integracija ovih spojeva u lijekove i farmaceutsku industriju dovela ih je u bliski kontakt s cijelom paletom bakterijskih sojeva. Prekomjerna upotreba i akumulacija spojeva u okoliš uzrokovala je u bakterija razvoj određenog oblika fenotipske prilagodbe specifične za kvarterne amonijeve spojeve. Sintezom membranski aktivnih efluks pumpi bakterije koje su u kontaktu s ovim spojevima mogu ih izbaciti van stanice i tako spriječiti njihovo nepovoljno djelovanje [1]. Stoga je u znanstvenom svijetu trenutno u centru pažnje i zanimanja sinteza novih, modificiranih kvarternih amonijevih spojeva te ispitivanje njihove biološke aktivnosti. Cilj je pronaći održivije i biorazgradive spojeve kako bi se izbjegao razvoj nepoželjne rezistencije. Među potencijalnim spojevima su derivati heterocikličkog spoja kinuklidina, koji sudjeluje u izgradnji bioaktivnih alkaloida biljke kininovac. Ranija istraživanja pokazala su da derivati kinuklidina imaju široki spektar biološkog djelovanja, među kojim se posebno ističe antifungalna i antibakterijska aktivnost njegovih kvarternih amonijevih spojeva, što opravdava daljnja istraživanja na ovu temu [2].

Cilj ovog rada bio je ispitati antibakterijsku aktivnost novosintetizirane kvarterne soli 3-aminokinuklidina. Vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija određene su metodom mikrodilucije na sedam bakterijskih sojeva što daje uvid u potencijalna antibakterijska svojstva.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kvarterni amonijevi spojevi

Kvarterni amonijevi spojevi ili kvarterni amonijevi kationi (QACs) su amini (derivati amonijaka) koji posjeduju pozitivno nabijen atoma dušika i najčešće četiri supstituenta [3]. Na Slici 1 prikazana je opća struktura kvarternog amonijevog kationa. Oznake *R* predstavljaju supstituente koji mogu strukturno varirati, a najčešće je minimalno jedan od njih alkilni ili arilni supstituent. Alkilni lanac obično sadrži od 10 do 16 ugljikovih atoma. Kvarterni amonijevi spojevi su elektrostatskim silama vezani na odgovarajući anion. Anion je najčešće halogenidni ion, sulfatna ili acetatna skupina [4]. QACs mogu sadržavati i više od jednog pozitivno nabijenog dušikovog atoma pa ih se dijeli na mono-, bis-, multi- i poli- kvarterne amonijeve spojeve [1].



**Slika 1.** Opća struktura kvarternog amonijevog kationa

Preuzeto s mrežne stranice Wikipedia

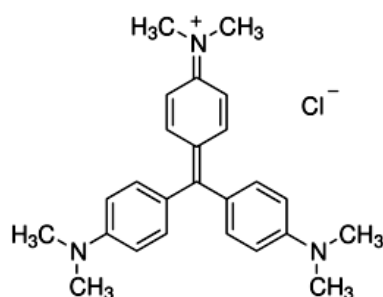
[https://en.wikipedia.org/wiki/Quaternary\\_ammonium\\_cation#/media/File:Quaternary\\_ammonium\\_cation.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Quaternary_ammonium_cation#/media/File:Quaternary_ammonium_cation.svg)

#### 2.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva kvarternih amonijevih spojeva

Za kvarterne amonijeve soli koje imaju alkilni lanac s velikim brojem ugljikovih atoma može se reći da imaju hidrofobni “rep” i hidrofilnu “glavu” što ih čini površinski aktivnim spojevima ili surfaktantima [1]. Surfaktanti su spojevi koji zahvaljujući svojoj strukturi otapaju različite komponente ili mijenjaju njihova svojstva [5]. Ovakva amfifilna struktura čini ove spojeve topljivima u vodi, alkoholu i acetonu te povećava njihovu kemijsku stabilnost. U otopinama, molekule ovih spojeva formiraju nakupine micela pa im se može odrediti i kritična micelarna koncentracija (cmc) [1]. Fizikalna svojstva QACs uvelike ovise o prirodi bočnih lanaca koji su

supstituirani na pozitivno nabijeni dušikov atom. Spojevi sa supstituiranim alkilnim, nepolarnim lancima topljivi su u nepolarnim otapalima te se ponašaju kao izvrsni emulgatori [6].

Zbog svojih dobrih fizikalnih i kemijskih svojstava, kvarterni amonijevi spojevi su pronašli široku primjenu. Poželjni su sastojak brojnih surfaktanata, antiseptika, boja i sl. Kao kationski surfaktanti nalaze se u šamponima, sapunima, omekšivačima, vodici za kontaktne leće, gelovima i sapunima za tuširanje, šminci i raznoj drugoj kozmetici. Jedne od najpoznatijih bioloških boja su kvarterni amonijevi spojevi sa inkorporiranim aromatskim sustavom. Kristal violet, propidium jodid i malahit zelena samo su neki od primjera boja svakodnevno u upotrebi diljem svijeta i laboratorija. Najčešće se koriste pri bojanju stanične stijenke bakterija ili se integriraju u strukturu molekule DNA [1]. Na Slici 2 prikazana je struktura boje kristal violet koja se koristi u bojanju bakterijske stijenke po Gramu.



**Slika 2.** Struktura boje kristal violet

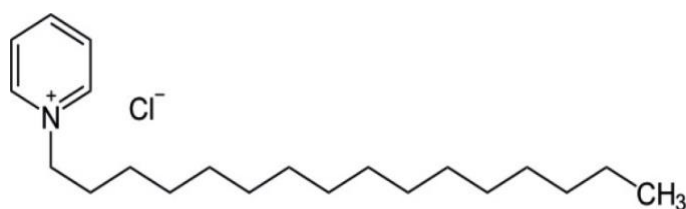
Preuzeto s mrežne stranice ResearchGate

[https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-Crystal-violet\\_fig1\\_317820366](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-Crystal-violet_fig1_317820366)

### 2.1.2. Biološka aktivnost kvarternih amonijevih spojeva

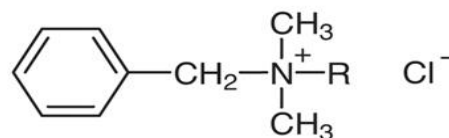
Prvi rad na temu antimikrobnih svojstava kvarternih amonijevih spojeva objavljen je 1916. godine, a temeljen je na istraživanjima na benziliranim i alkiliranim amonijevim solima [1]. Već dugi niz godina ovi spojevi su najzastupljenije tvari antimikrobnih lijekova i dezinfekcijskih sredstava diljem svijeta. Prvi službeno odobren aktivni sastojak poznatih antiseptika spada u grupu benzalkonijevih klorida (BAC). Nedugo nakon, globalnu primjenu su pronašli i cetilpiridinijev klorid (CPC), cetilmetilamonijev bromid (CTAB) i dimetilduodecilamonijev klorid ili bromid

(DDAC ili DDAB) [6]. I danas su ova četiri spoja najčešći i najzastupljeniji komercijalni kvarterni amonijevi spojevi u svijetu. Slika 3 i Slika 4 prikazuju strukture komercijalnih QACs, CPC-a i BAC-a. Istraživanja su pokazala da pojedini kvarterni amonijevi spojevi, posebice oni sa silicijem u bočnom ogranku, imaju i veliki potencijal u borbi protiv raka [1]. Zahvaljujući niskoj toksičnosti ovih spojeva i jednostavnosti njihove pripreme, i danas, gotovo devedeset godina nakon njihovog prvog predstavljanja tržištu, znanstvenici neumorno istražuju i sintetiziraju nove i modificirane kvarterne amonijeve soli koje će svojom biološkom aktivnošću biti jednako ili bolje vrijedne od postojećih.



**Slika 3.** Struktura cetilpiridinijeva klorida (CPC)

Preuzeto s mrežne stranice ResearchGate  
[https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structure-of-cetylpyridinium-chloride-CPC\\_fig1\\_260170399](https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structure-of-cetylpyridinium-chloride-CPC_fig1_260170399)



**Slika 4.** Struktura benzalkonijeva klorida (BAC)

Preuzeto s mrežne stranice TCI-Tokyo Chemical Industry  
<https://www.tcichemicals.com/TH/en/p/B0414>

Amfifilna struktura, kao i način djelovanja QACs može se usporediti s deterđentima što je od velike važnosti za mikrobiološki svijet i interakciju ovih spojeva s bakterijama.

## 2.2. Građa bakterijske stijenke

Bakterije su jednostanični, prokariotski organizmi što znači da nemaju pravu jezgru već jezgrinu tvar, nukleoid. Glavni oblici bakterija (slika 5) su koki, spirili i bacili [7].



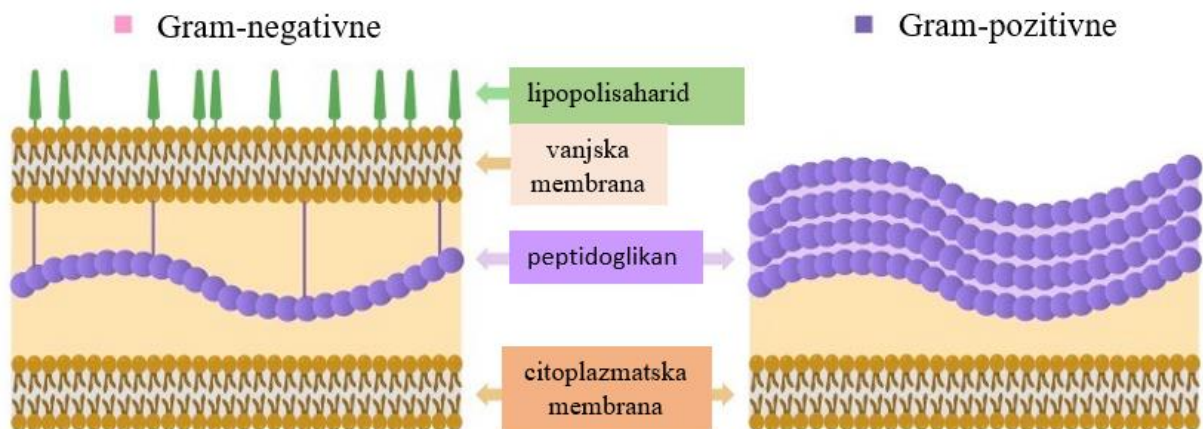
**Slika 5.** Osnovni oblici bakterija

Preuzeto s mrežne stranice Tune in to Learning

Bacteria: Science Lesson: Activity 3 of 3 | TV411

Bakterijske stanice obavijene su staničnom membranom i staničnom stijenkom. Osnovna kemijska tvar koja se nalazi u sastavu bakterijske stanične stijeke je peptidoglikan. U obliku guste mrežice obavija staničnu stijenku i zaslužan je za oblik i čvrstoću stanice. Obzirom na građu stanične stijenke, bakterije dijelimo u dvije velike skupine: Gram-pozitivne i Gram-negativne [8].

Ono što karakterizira Gram-negativne bakterije je vanjska membrana. Građena je od unutarnjeg sloja fosfolipida i vanjskog sloja lipopolisaharida (LPS) koji je jedinstven za ovaj tip bakterija. Također, stijenka se sastoji od samo jednog do dva sloja peptidoglikana, a periplazmatski prostor je voluminozan i pun proteina i enzima. Stijenka Gram-pozitivnih bakterija ne sadrži vanjsku membranu, a sastoji se od čak 40 slojeva debelog peptidoglikana što iznosi pola materijala cijele stanične stijenke. Peptidoglikan se nastavlja na citoplazmatsku membranu, a na sebi može imati i sloj proteina. Periplazmatski prostor je vrlo tanak i ima samo nekoliko proteina i enzima. Stijenku Gram-pozitivnih bakterija karakterizira i velika količina negativno nabijene teikoične te lipoteikoične kiseline u sloju peptidoglikana i/ili na površini stijenke [7], [8]. Razlika u građi staničnih stijenki Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija prikazana je na Slici 6.



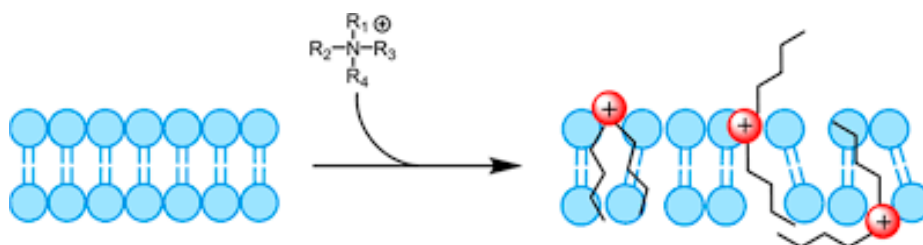
**Slika 6.** Građa stijenke Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija

Preuzeto s mrežne stranice BioNinja.

Gram Staining | BioNinja

### 2.3. Mehanizam antimikrobne aktivnosti kvarternih amonijevih spojeva

Mehanizam antimikrobne aktivnosti kvarternih amonijevih spojeva objašnjava se uspostavljanjem elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenog dijela QACs i negativno nabijenih skupina na površini bakterijske stanične stijenke. Jednom kad se ova interakcija uspostavi, omogućeno je daljnje prodiranje hidrofobnih bočnih lanaca QACs u unutarstanični prostor. Posljedica toga je curenje citoplazmatskog sadržaja bakterije van i naposljetku sama smrt stanice [1]. Opisani mehanizam prikazan je na Slici 7.



**Slika 7.** Shematski prikaz mehanizma antimikrobne aktivnosti QACs

Preuzeto iz Cassandra L. Schrank et al., ACS Infectious Diseases 2020

6 (7), 1553-1557

Budući da je bakterijska stanica negativnija, veća količina pozitivnog naboja, kao i postojanje permanentnog kationa na samom spoju, uzrok je veće selektivnosti QACs prema bakterijskim stanicama u usporedbi s eukariotskim. Zahvaljujući tome, kvarterne amonijeve spojeve karakterizira jaka antibakterijska, ali i antifungalna aktivnost. Budući da je ciljno mjesto njihovog djelovanja stanična stijenka bakterija, za ove spojeve možemo reći da su antibiotici širokog spektra. Poznato je i da je njihova aktivnost znatno bolja prema Gram-pozitivnim bakterijama [1].

#### **2.4. Kvarterni amonijevi spojevi u antisepticima i dezinficijensima**

Proces dezinfekcije definira se kao uklanjanje i destrukcija mikroorganizama različitim kemijskim i fizikalnim procesima. Kemijske tvari koje se koriste u postupku dezinfekcije nazivaju se dezinficijensi [9]. Različite vrste dezinfekcijskih sredstava i antiseptika koriste se već dugi niz godina u industriji, medicini, agrikulturi, kućanstvima i okolišu kao glavno sredstvo u kontroli širenja patogenih mikroorganizama i infekcija [4]. Dezinfekcijska sredstva ubijaju mikroorganizme s neživih površina, a antiseptici se primjenjuju na živo tkivo, odnosno kožu, kako bi se reducirao broj mikroorganizama i patogena normalne flore [8]. Jedna od najvećih primjena antiseptika je u medicini gdje služe za dezinfekciju ruku, tikva prije operacijskih zahvata, mukoznih sluznica, kožnih infekcija ili infekcija usne šupljine. Antiseptici se još nazivaju i tjelesnim dezinficijensima stoga se pojmovi često i lako neispravno koriste. Temelj njihove djelotvornosti krije se u kemijskim spojevima koji su često nazivani biocidima, a imaju veliku moć ubijanja bakterija, virusa i gljivica u kratkom vremenu djelovanja. Budući da se antiseptici koriste izravno na koži, sadrže manje koncentracije biocidnih spojeva. Neki kemijski spojevi, poput etanola, mogu se koristiti kao dezinficijensi i antiseptici [8], [9].

Kemijski spojevi koji se mogu pronaći u sastavu antiseptika i dezinficijensa su alkoholi, fenoli, aldehidi, jod, klor, peroksidi te između ostalog i kvarterni amonijevi spojevi. QACs su dakle po svojoj prirodi biocidni spojevi sintetizirani s ciljem da neutraliziraju, potisnu ili spriječe djelovanje štetnih mikroorganizama zahvaljujući povoljnim antimikrobnim svojstvima [10]. Od trenutka kada je prepoznat antibakterijski značaj kvarternih amonijevih spojeva, njihova zastupljenost u zdravstvenim ustanovama, sredstvima za čišćenje te dezinficijensima naglo je porasla. Provedena su brojna istraživanja na dezinfekcijskim sredstvima koja sadrže kvarterne

amonijeve spojeve te je više puta dokazano kako je broj bakterija smanjen i do 90% na ispitivanim površinama koje su bile tretirane sredstvima koja sadrže QACs. Istraživanja također pokazuju da su vrijednosti koncentracija QACs u uzorcima prašine iz kućanstava povećane duplo u posljednje dvije godine što znači da nikada nismo bili u većem doticaju s ovim spojevima [4]. Njihova velika rasprostranjenost, široka primjena i sve veća prisutnost u okolini potiču zabrinutost za razvoj bakterijske rezistencije koja se može izgledno razviti već pri vrlo razrijeđenim koncentracijama ovih spojeva u okolišu. Bakterijska otpornost na QACs, za koju se mislilo da nije tako izgledna ili uopće moguća, je trenutno u trendu zabrinjavajućeg porasta. Ove činjenice poticaj su za sintezu i biološko ispitivanje novih kvarternih amonijevih spojeva koji se hidrolizom raspadaju na bezopasne produkte koji se ne zadržavaju u okolini. To bi potencijalno smanjilo njihovu prisutnost i razvoj rezistencije.

## **2.5. Mehanizmi bakterijske rezistencije na kvarterne amonijeve spojeve**

Razvoj različitih oblika bakterijske rezistencije na antibiotike razlog je zabrinutosti znanstvenog svijeta već desetljećima. Podatci kažu da ne prođe niti deset godina od predstavljanja novog antibiotika tržištu do razvoja rezistencije na taj isti antibiotik [1]. Budući da je ciljno mjesto djelovanja kvarternih amonijevih spojeva bakterijska stanična stijenka, činilo se nemogućim da bakterije razviju rezistenciju na spojeve koji svojim mehanizmima uništavaju strukturu tako bitnu za njihovo preživljavanje. Neizbježna akumulacija QACs u okoliš dovela je do konstantne izloženosti bakterijskih populacija razrijeđenim i ne smrtonosnim koncentracijama ovih spojeva te naposljetku i do razvoja rezistencije tj. određenog oblika otpornosti. Prvi radovi na temu bakterijske tolerancije na kvarterne amonijeve spojeve objavljeni su 50-ih i 60-ih godina 20. stoljeća. Već tada je otkriveno da su pojedine vrste Gram-negativnih bakterija bile sposobne preživjeti u uvjetima povišene koncentracije benzalkonijevog klorida (BAC) iako je tolerancija na spoj bila izgubljena nakon njegovog uklanjanja [1], [6] .

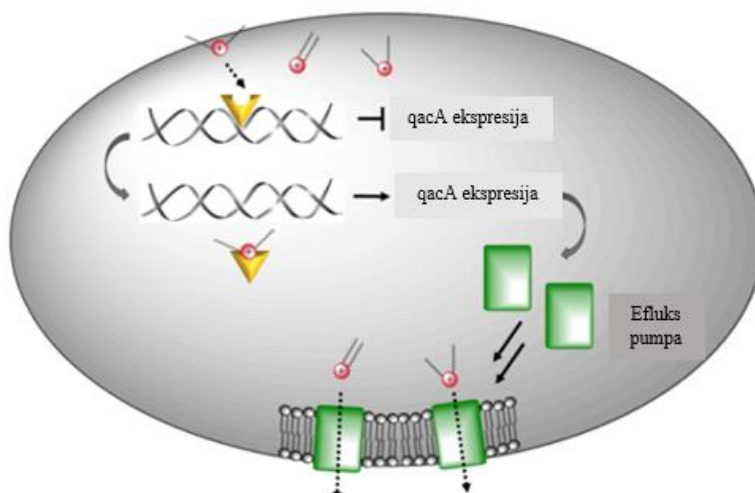
Bakterijske stanice su tijekom godina razvile više načina rezistencije uključujući produkciju posebnih enzima, smanjenje propusnosti, promjenu ciljnog mjesta djelovanja, aktivno izbacivanje ciljanog spoja iz stanice mehanizmom staničnog efluksa i sl.[8]. Razlikujemo također unutarnju, urođenu rezistenciju te stečenu rezistenciju. Urođena rezistencija je bakterijska karakteristika koja ju čini prirodno rezistentnom kao npr. dvostruka membrana Gram-negativnih bakterija, a stečena



se razvija određenom genetičkom mutacijom ili prijenosom plazmida koji nosi gene rezistencije. Bakterije su razvile nekoliko mehanizama otpornosti na mono i bis kvarterne amonijeve spojeve. Moguće su promjene na staničnoj stijenci i membrani ili sinteza stanične efluks pumpe koja izbacuje QACs iz stanice. U oba slučaja sposobnost otpornosti se gubi bez prisutnosti biocida. Obzirom da pojam rezistencije označava trajnu sposobnost rasta u prisutnosti povećane koncentracije QACs, diskutabilno je jesu li navedeni mehanizmi rezistencija u pravom smislu te riječi ili samo fenotipska adaptacija/tolerancija čiji mehanizam djelovanja još uvijek nije objašnjen [1].

Najčešći oblik rezistencije prema QACs je prisutnost tzv. “qac” gena koji kodiraju membranski ovisne efluks pumpe specifične za mono i bis QACs. Ovi geni se nalaze u plazmidima koji obično, osim gena za rezistenciju na QACs, u kombinaciji nose i gene rezistencije na širi spektar spojeva. Jedan od najzastupljenijih je gen qacA koji je prvi put izoliran iz soja *Staphylococcus aureus*. Osim gena qacA, kod Gram-pozitivnih bakterija pronađen je još i njemu homologni gen qacB, a u literaturi su opisani qacB-H/J/Z. Gen qacA kodira transmembranski protein QacA kojeg karakterizira četrnaest transmembranskih zavojnica te kiselinski ostatak aspartatne kiseline. QacA prepoznaje i proton motornom silom izbacuje mono i bis QACs iz stanice. Visoko homologan QacB protein, kodiran genom qacB, sadrži nenabijeni alaninski ostatak umjeto kiselinskog te ga to čini specifičnijim u djelovanju na mono kvarterne amonijeve spojeve. Ekspresija svake efluks pumpe kontrolirana je negativnim regulatornim transkripcijskim proteinom QacR. QacR je vezan za intergensku regiju (IR1) qac gena te tako blokira njegovu transkripciju. Nakon što kvarterni amonijev spoj uđe u stanicu, QacR usmjerava kationski supstrat u svoje aktivno mjesto pomoću kiselinskih ostataka što posljedično uzrokuje konformacijske promjene na samom proteinu. Protein zatim disocira s molekule DNA i omogućuje transkripciju qac gena

rezistencije i produkciju efluks pumpe koja izbacuje QACs iz stanice proton motornom silom kroz membranu [1]. Na Slici 8 prikazan je predloženi mehanizam rezistencije.



**Slika 8.** Mehanizam rezistencije na kvarterne amonijeve spojeve. Crveni simboli predstavljaju QACs, žuti predstavlja QacR protein, a zeleni sintetiziranu efluks pumpu

Preuzeto iz Megan C. Jennings et al., ACS Infectious Diseases 2015 1 (7), 288-303

Budući da do 1990. nije zabilježen gotovo nikakav oblik rezistencije na komercijalne kvarterne amonijeve spojeve, brzina kojom su se bakterije uspjele prilagoditi je vrlo zabrinjavajuća. 1995. godine je prvi put pronađen i opisan gen rezistencije *qacA/B*, a u narednih deset godina se proširio na ostale bakterijske sojeve [1]. Uz sve širu primjenu komercijalnih kvarternih amonijevih spojeva dolazi i sve veća zabrinutost za brzi razvoj rezistencije. Budući da je malo izgledno kako će se njihova primjena ili akumulacija u okoliš smanjiti, rješenje se za sada krije u pronalasku i sintezi novih, biorazgradivih kvarternih amonijevih spojeva.

## 2.6. Biorazgradnja kvarternih amonijevih spojeva

Velika stabilnost i niska reaktivnost kvarternih amonijevih spojeva rezultirala je zabrinjavajućom bioakumulacijom ovih spojeva u okoliš. Procjena je da oko 700 000 tona QACs godišnje dospijeva u otpadne vode i okolinu. Problem nastaje kada se ovi spojevi apsorbiraju na

negativno nabijene površine koje obiluju mikroorganizmima. Bakterije i ostali mikroorganizmi u stalnom dodiru sa kvartenim amonijevim spojevima razvijaju nepoželjnu rezistenciju.

Prvi kvarterni amonijevi spojevi podložni raspadanju sintetizirani su krajem 80-ih i početkom 90-ih. Najčešća metoda sinteze biorazgradivih QACs je dodatak esterskih supstituenata iako je danas to samo jedan od načina. Esterski dijelovi omogućuju hidrolizu spoja na netoksične masne kiseline i diole koji još uvijek zadržavaju antimikrobnu aktivnost. Jedni od najpoznatijih biorazgradivih kvarternih amonijevih spojeva su alkanoilkolini sa C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> i C<sub>14</sub> lancima te spojevi s inkorporiranim imidazolom ili 1,4-diazabiciklo [2.2.2] oktanom [1], [6].

Posljednjih su godina veliki potencijal pokazali kvarterni amonijevi spojevi sa kinuklidinskom jezgrom. Mogu se sintetizirati kvaternizacijom samog kinuklidina ili pak nekih njegovih derivata kao što su 3-supstituirani kinuklidini. Osim što se kao prirodni organski spojevi lako razgrađuju, povoljna antimikrobna aktivnost i niska toksičnost ovih spojeva prema humanim stanicama otvara niz novih mogućnosti i potencijala u istraživanju kvarternih amonijevih soli [2].

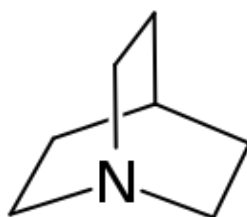
## **2.7. Kinuklidin i njegova svojstva**

### **2.7.1. Kinuklidin – prirodni produkt**

Kinuklidin je po prvi puta izoliran iz kore drveta kininovca (*Cinchona officinalis*). Kininovac je biljka iz roda broćika (*Rubiaceae*) koje su poznate po visokom sadržaju alkaloida [2]. Alkaloidi su prirodni organski spojevi s dušikom, lužnatih svojstava. Biološki su aktivni i najčešće prisutni u biljkama kojima služe za zaštitu od insekata i životinja [11]. Ističu se svojim izrazito jakim djelovanjem te često primarno utječu na središnji živčani sustav [12]. Najpoznatiji izolirani alkaloidi kininovca su kinuklidin i njegovi derivati kinin i kinidin te cinhonidin. U prošlosti se prah kore kininovca koristio za liječenje malarije, povišene temperature i srčane aritmije. Budući da se kinin pokazao učinkovit u borbi protiv malarije, najviše pažnje mu je posvećeno, i danas je najistraženije [13]. Dokazana je njegova antibakterijska, antiparazitska, antioksidativna i antitumorska aktivnost [2].

### 2.7.2. Kemijska i fizikalna svojstva kinuklidina

Kemijski naziv kinuklidina je 1-azabicyklo[2.2.2]oktan. To je zasićeni biciklički sustav sa dva šesteročlana prstena i atomom dušika na osnovici mosta. Oba prstena imaju oblik izvijene kolijevke, a svi mostovi su jednake duljine [5]. Prisutnost atoma dušika na osnovici mosta čini ovaj spoj i njegove derivate heterocikličkim spojevima. To su spojevi od jednog ili više prstenova u kojima minimalno jedan atom nije ugljik. Najvažniji heterociklički spojevi s atomom dušika su upravo oni koji sadrže dušik u premoštenju jer se koriste u svrhu sinteze biološki aktivnih analoga. [14], [15]. Na Slici 9 prikazana je struktura kinuklidina.

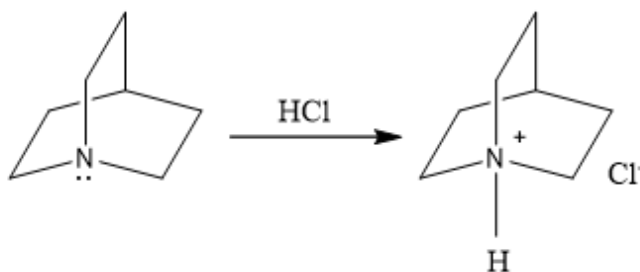


**Slika 9.** Struktura kinuklidina

Preuzeto s mrežne stranice Wikipedia

<https://en.wikipedia.org/wiki/Quinuclidine#/media/File:Quinuclidine.svg>

Kinuklidin je karakterističan po svojoj velikoj simetričnosti strukture i maloj napetosti veza što ga čini vrlo stabilnom molekulom. Ne pokazuje promjene nakon tretiranja s jakim oksidansima niti nakon zagrijavanja s koncentriranim mineralnim kiselinama. Točka tališta mu je 158 °C [16]. Dušik koji se nalazi na osnovici mosta ima na sebi nepodijeljen elektronski par što ovaj spoj čini jako bazičnim. To se može potvrditi i njegovom pKa vrijednosti koja iznosi 10,58. Po definiciji, kinuklidin je Lewisova baza, odnosno donor elektronskog para te će u kiselobaznim reakcijama formirati kvarterne amonijeve soli [5]. U tom slučaju dušikov atom ima pozitivan naboj, a dobivene soli više nemaju bazična svojstva. Kvarterne amonijeve soli su neutralne i čvrste tvari bez mirisa, uglavnom dobro topljive u vodi [17]. Primjer kiselobazne reakcije kinuklidina pri kojoj nastaje kvarтерна amonijeva sol prikazan je na Slici 10.



**Slika 10.** Kiselo-bazna reakcija kinuklidina i HCl

### 2.7.3. 3-Supstituirani derivati kinuklidina i njihova biološka aktivnost

U potrazi za novim kvarternim amonijevim spojevima koji će potencijalno izbjeći razvoj bakterijske rezistencije razvila se ideja o kvaternizaciji prirodnih spojeva. Jedan od takvih spojeva bio je i kinuklidin koji se posebno istaknuo svojom izuzetnom biološkom aktivnošću. Osim samog kinuklidina, dokazano je da i njegovi derivati pokazuju povoljnu biološku aktivnost zbog čega je kinuklidin sve češći predmet interesa i istraživanja [2]. Među sintetskim derivatima kinuklidina, najistaknutiji su 3-supstituirani kinuklidini zbog svoje biološke aktivnosti i široke primjene koju su pronašli. Lako su podložni kvaternizaciji i imaju raznoliku farmakološku primjenu pa su stoga veliki potencijal za sintezu novih kvarternih amonijevih soli. Jedan od najpoznatijih derivata kinuklidina je tercijarni amin kinuklidin-3-ol, alkohol čiji su esteri od posebnog značaja. Esteri kinuklidin-3-ola su analozi acetilkolina pa stupaju u interakcije s acetilkolinesterazom i pokazuju antimuskarinsku i muskarinsku aktivnost. Iz tog razloga koriste se kao antidoti u trovanju organofosforinim spojevima. Također, istraživanja pokazuju pozitivan učinak estera kinuklidin-3-ola na liječenje Alzheimerove bolesti. Brojni sintetski 3-supstituirani derivati kinuklidina su već široko dostupni i koriste se kao terapeutici za liječenje glaukoma, ulkusa, neuroze, mentalnih bolesti, umjerene hipertenzije pa čak i Parkinsonove bolesti [2].

Budući da 3-supstituirani derivati kinuklidina sadrže asimetričan ugljikov atom možemo razlikovati (*R*)- i (*S*)- enantiomere ovih spojeva. Enantiomeri posjeduju ista fizikalna svojstva i kemijsku reaktivnost, no u ovom slučaju mogu se bitno razlikovati po biološkoj aktivnosti i toksičnosti [17].

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije i potrošni materijal

Kemikalije:

- Mueller-Hinton tekući medij (Biofilm)
- Nutrijent agar tekući medij (Biofilm)
- NaCl (Chem-lab NV)
- Pepton (Roth)
- Kvašćev ekstrakt (Liofilchem)
- Etanol – 96%

Potrošni materijal:

- Tubice (1.5, 15, 20 mL)
- Mikrotitarske pločice
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Jednokratne mikrobiološke ušice (“eze”)
- Jednokratne kivete za spektrofotometriju
- Jednokratne rukavice
- Nastavci za pipete
- Parafilm folija

Laboratorijski uređaji i instrumenti:

- Tresilica (Gallenkamp)
- UV/VIS spektrofotometar Lambda Bio 40 (PerkinElmer)
- Inkubator (Gallenkamp)
- Autoklav (Nuve)
- Multikanalna pipeta (Thermo scientific)
- Automatske mikropipete (Eppendorf)
  - 2-20  $\mu\text{L}$
  - 10-100  $\mu\text{L}$
  - 200-2000  $\mu\text{L}$
  - 100-1000  $\mu\text{L}$

- Plamenik (Fuego basic)
- Centrifuga vortex (Biosan)
- Termocikler (Biosan)
- Tehnička vaga
- Analitička vaga

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprema medija

Tijekom izrade ovog rada, korišteni su kruti i tekući hranjivi mediji.

Tekući Mueller-Hinton hranjivi medij (MH) pripremljen je otapanjem MH bujona (11 g) u destiliranoj vodi (500 mL). Nutrijent agar tekući medij pripremljen je otapanjem peptona (2,5 g), ekstrakta kvasca (1,5 g) i natrijevog klorida (2,5 g) u destiliranoj vodi (500 mL). Nakon pripreme, tekući mediji su sterilizirani autoklaviranjem 20 min na 121 °C.

#### 3.2.2. Uzgoj staničnih kultura

Dan 1. – Uzgoj bakterija iz glicerol štokova

Jednokratnom ezom uzme se uzorak bakterija iz dugoročne pohrane u glicerol štokovima na 70 °C. Bakterije se razmažu na krutoj hranjivoj podlozi i ostave u inkubatoru preko noći na 37 °C. Za potrebe izrade ovog završnog rada korišteni su sojevi bakterija iz Tablice 1.

**Tablica 1.** Sojevi bakterija korišteni u eksperimentu

Bakterija	Podrijetlo
<b>Gram-pozitivni sojevi</b>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

Gram-negativni sojevi	
<i>Salmonella enteritidis</i>	Izolat iz hrane
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

Dan 2. – Uzgoj bakterijske kulture u tekućem hranjivom mediju

Svi sojevi bakterija korišteni u ovom eksperimentu uzgajaju se u tekućem Mueller-Hinton hranjivom mediju osim soja *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 koji se uzgaja u tekućem nutrijent agar mediju.

Dan prije eksperimenta sojevi bakterija se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu po sljedećem postupku: u jednokratne tubice od 15 mL doda se po 3 mL tekućeg medija. Ovako alikvotiziran medij inokulira se s odgovarajućim sojem bakterija tako da se jednokratnom ezom prenese jedna bakterijska kolonija s krutog hranjivog medija. Sadržaj tubice se vorteksira i inkubira preko noći u tresilici pri 220 rpm i 37 °C. Medij sa sojem *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 se inkubira pri 30 °C.

Dan 3. – Priprema bakterijske kulture u logaritamskoj fazi rasta

Prekonoćne kulture bakterija potrebno je razrijediti deset puta na sljedeći način: automatskom mikropipetom uzme se 2000 µL prekonoćne kulture i doda u jednokratnu tubicu od 50 mL te razrijedi dodatkom 18 mL odgovarajućeg medija (MH ili nutrijent agar). Ovako alikvotizirani uzorci se vorteksiraju i postave u tresilicu na kratku inkubaciju još 30-40 minuta do logaritamske faze rasta. Uzorak s bakterijom *L.monocytogenes* potrebno je ostaviti duže na inkubaciji, otprilike 1 h i 30 min.

Nakon inkubacije potrebno je odrediti optičku gustoću ili OD (“optical density”) vrijednost svake bakterije. Mjerenje OD vrijednosti bakterija je spektrofotometrijska metoda pomoću koje možemo odrediti broj bakterija (engl. *colony forming unit*; CFU/mL) u suspenziji mjerenjem apsorbancije pri 600 nm. Temelji se na količini svjetla koje će bakterije u suspenziji raspršiti što direktno povezujemo s njihovom količinom budući da bakterije u fazi rasta i dijeljenja raspršuju više svjetla. Pomoću izmjerene apsorbancije i kalibracijskog pravca svakog soja, izračuna se količina bakterija

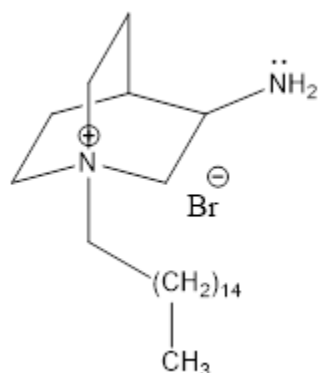


u suspenziji izražena u CFU/mL. CFU je mikrobiološka jedinica koja označava vidljivu količinu bakterija sposobnu za razmnožavanje i formiranje kolonija u kontroliranim uvjetima [18]. Mjerenje OD<sub>600</sub> svakog uzorka radi se na sljedeći način: automatskom pipetom doda se 1000 µL suspenzije bakterija u jednokratnu kivetu i spektrofotometrom izmjeri apsorbancija pri 600 nm. Spektrofotometar je potrebno prethodno baždari na odgovarajući medij. Pomoću izmjerene apsorbancije, iz jednadžbe kalibracijskog pravca za svaku bakteriju izračuna se potreban volumen za razrjeđenje bakterija na 5x10<sup>5</sup> CFU/mL.

Razrjeđenje se izvede kako slijedi: u jednokratnu tubicu od 50 mL automatskom mikropipetom doda se izračunati volumen suspenzije bakterija uz konstantno resuspendiranje sadržaja, te se tubica nadopuni odgovarajućim medijem do 20 mL. Postupak je isti za svih sedam uzoraka.

### 3.2.3. Priprema nosintetiziranog spoja za analizu

U ovom eksperimentu korišten je kemijski spoj 3-amino-1-heksadecilkinuklidinijev bromid (QN<sub>H</sub><sub>2</sub>-16), brutto formule C<sub>23</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>Br, molarne mase 431,55 g/mol. Riječ je o kvarternoj amonijevoj soli 3-aminokinuklidina s alkilnim lancem od šesnaest ugljikovih atoma. Na Slici 11 prikazana je struktura spoja korištenog u svrhu ovog eksperimenta.



**Slika 11.** Struktura 3-amino-1-heksadecilkinuklidinijevog bromida

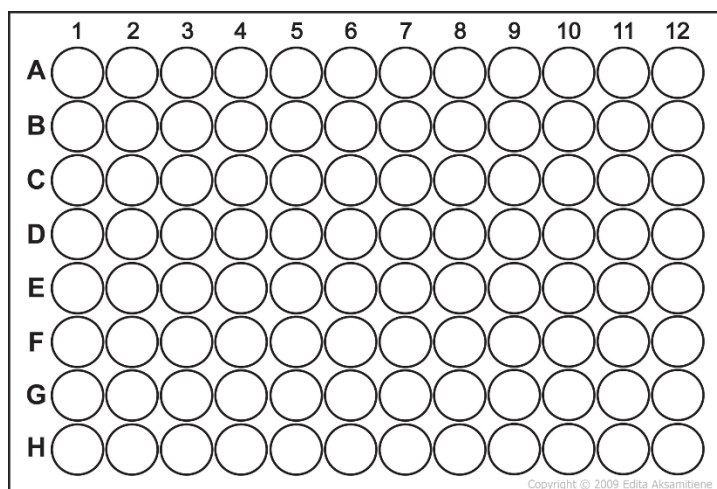
Korišteni spoj pripremljen je na sljedeći način: u jednokratnu tubicu od 1,5 mL izvaže se 10 mg spoja i otopi u 1000 µL otapala dimetil sulfoksid (DMSO), masenog udjela 4%. DMSO je univerzalno, polarno, aprotično otapalo koje otapa i polarne i nepolarne spojeve. Miješa se sa

različitim organskim otapalima, kao i s vodom [19]. Otopinu je potrebno zagrijati nekoliko minuta u termocikleru na 70 °C dok se spoj ne otopi, odnosno dok otopina ne postane bistra.

Masena koncentracija spoja za nastavak eksperimenta iznosi 500 µg/mL. Potrebno je pripremiti dva ovakva razrjeđenja u dva hranjiva medija kako slijedi: u jednokratnu tubicu od 1,5 mL automatskom mikropipetom doda se 50 µL spoja i 950 µL MH ili nutrijent agar medija.

### 3.2.4. Metoda mikrodilucije

Metoda mikrodilucije je mikrobiološka tehnika kojom se određuje minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) kemijskog spoja od interesa koja će spriječiti daljnji rast bakterijskih stanica [8]. Eksperiment se izvodi na mikrotitarskoj pločici u Mueller-Hinton tekućem mediju ili nutrijent agar mediju u slučaju bakterije *L.monocytogenes*. U ovom eksperimentu korištena je mikrotitarska pločica sa 96 jažica. Shema pločice prikazana je na Slici 12.



**Slika 12.** Shema mikrotitarske pločice korištene u eksperimentu

Preuzeto s mrežne stranice Cell signaling networks

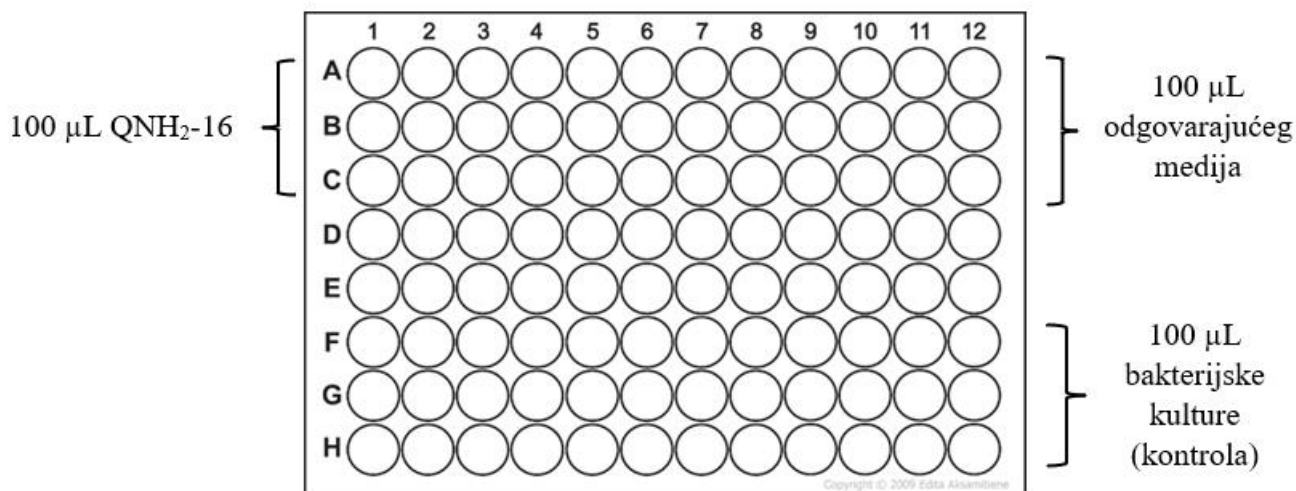
<http://www.cellsignet.com/media/templ.html>

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) kvarterne soli 3-aminokinuklidina korištene u ovom eksperimentu određuje se na sljedeći način: u prvu jažicu se multikanalnom pipetom doda 100 µL

spoja QNH<sub>2</sub>-16, masene koncentracije 500 µg/mL. Spoj se serijski razrijedi odgovarajućim medijem do jedanaeste jažice tako da nakon razrjeđenja konačna koncentracija u prvoj jažici iznosi 250 µg/mL. Konačne koncentracije spoja u ostalim jažicama prikazane su u Tablici 2. U idućem koraku se multikanalnom pipetom svakoj jažici doda 50 µL prethodno pripremljene i razrijeđene bakterijske kulture počevši od jedanaeste jažice i uz konstantno resuspendiranje bakterija. Dvanaesta jažica služi kao kontrolna te se u nju doda 100 µL čistog medija, a u posljednje tri jažice dvanaestog stupca doda se i 100 µL bakterijske suspenzije kao kontrola rasta bakterijske kulture. Isti postupak se ponavlja za sve sojeve bakterija u eksperimentu. Pločice se ostave u inkubatoru na 37 °C preko noći, a MIK vrijednosti se očitaju idućeg dana. Na Slici 13 prikazan je način na koji je pripremljena mikrotitarska pločica u eksperimentu.

**Tablica 2.** Koncentracije QNH<sub>2</sub>-16 na mikrotitarskoj pločici

jažica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
γ(µg/mL)	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	0,98	0,48	0,24	čisti medij (kontrola)



**Slika 13.** Shematski prikaz pripremljene mikrotitarske pločice

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati mjerenja u logaritamskoj fazi rasta bakterija

U Tablici 3 prikazani su rezultati mjerenja apsorbancije svih sojeva bakterija u logaritamskoj fazi rasta i dobivene CFU/mL vrijednosti, odnosno količine bakterija u suspenziji. Prikazani su i potrebni volumeni bakterijske kulture za razrjeđenje na novu koncentraciju  $5 \times 10^5$  CFU/mL koje je uslijedilo.

**Tablica 3.** Rezultati mjerenja u logaritamskoj fazi rasta bakterija

Bakterija	Apsorbancija	CFU/mL	Volumen( $\mu$ L)
<i>E. faecalis</i>	0,756	$7,47 \times 10^8$	13,38
<i>B. cereus</i>	0,736	$7,23 \times 10^6$	1383
<i>L. monocytogenes</i>	0,248	$1,06 \times 10^8$	94
<i>S. aureus</i>	0,275	$2,36 \times 10^6$	4220
<i>S. enteritidis</i>	0,749	$2,63 \times 10^8$	38
<i>P. aeruginosa</i>	0,469	$4,18 \times 10^8$	24
<i>E. coli</i>	0,333	$2,45 \times 10^8$	40,76

### 4.2. MIK vrijednosti

U Tablici 4 prikazane su očitane minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) kvarterne amonijeve soli QNH<sub>2</sub>-16 za sve sojeve bakterija koje su korištene u eksperimentu. Rezultati su prikazani u obliku masenih i množinskih koncentracija testiranog spoja.

**Tablica 4.** Minimalne inhibitorne koncentracije za spoj QNH<sub>2</sub> - 16

Bakterija	MIK (µg/mL)	MIK (µmol/mL)
<i>E. faecalis</i>	15,625	0,036
<i>B. cereus</i>	31,25	0,072
<i>L. monocytogenes</i>	3,906	0,009
<i>S. aureus</i>	3,906	0,009
<i>S. enteritidis</i>	31,25	0,072
<i>P. aeruginos</i>	62,5	0,140
<i>E. coli</i>	31,25	0,072

### 4.3. Rasprava

3-Supstituirani derivati kinuklidina lako su podložni reakciji kvaternizacije te kao produkt daju kvarterne amonijeve soli koje pokazuju dobru biološku aktivnost [2]. U svrhu izrade ovog rada upotrijebljena je novosintetizirana kvarterna amonijeva sol 3-aminokinuklidina s alifatskim lancem od 16 ugljikovih atoma, kemijske formule C<sub>23</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>Br. Biološka aktivnost ovog spoja ispitana je metodom mikrodilucije na nekoliko Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Vanjska, lipopolisaharidna membrana Gram-negativnim bakterijama osigurava veću otpornost na antimikrobne spojeve, pa tako i kvarterne amonijeve soli. Budući da Gram-pozitivne bakterije ne posjeduju ovu dodatnu zaštitu u vidu vanjske membrane, QACs pokazuju bolju biološku aktivnost prema ovoj vrsti bakterija. Nadalje, prisutnost negativno nabijene teikoične i lipoteikoične kiseline u sastavu stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija pospješuje biološku aktivnost QACs. Ovaj dodatan naboj na stijenci omogućuje Gram-pozitivnim bakterijama bolju elektrostatsku interakciju s pozitivno nabijenim glavama QACs prilikom njihovog prodiranja u bakterijsku stanicu [8].

Gotovo sve kvarterne amonijeve soli pokazuju bolju biološku aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama što je potvrđeno i ovim eksperimentom. Najniža minimalna inhibitorna koncentracija ispitivanog spoja zabilježena je kod dva soja Gram-pozitivnih bakterija: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 te je znosila 0,009 µmol/mL. Iako pripada Gram-pozitivnim bakterijama, očitana minimalna inhibitorna koncentracija za soj

*Bacillus cereus* ATCC 14579, bila je bliža vrijednostima za Gram-negativne nego pozitivne bakterije što upućuje na njegovu povećanu rezistentnost u usporedbi s ostalim Gram-pozitivnim sojevima.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog rada može se potvrditi da kvarterne amonijeve soli 3-aminokinuklidina pokazuju potencijalna antibakterijska svojstva.

Kvarterna amonijeva sol 3-amino-1-heksadecilkinuklidinijev bromid pokazala je dobar raspon minimalnih inhibitornih koncentracija prema nekoliko sojeva Gram-pozitivnih bakterija. Metodom mikrodilucije ispitane su minimalne inhibitorne koncentracije novo sintetizirane kvarterne amonijeve soli na bazi kinuklidina, te je pretpostavka da će vrijednosti biti niže kod Gram-pozitivnih bakterija potvrđena.

## 6. LITERATURA

- [1] M. C. Jennings, K. P. C. Minbiole, and W. M. Wuest, "Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance," *ACS Infectious Diseases*, vol. 1, no. 7. American Chemical Society, pp. 288–303, Jan. 08, 2016. doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00047.
- [2] R. Odžak and M. Šprung, "Biological activity of monoquaternary ammonium compounds based on 3-substituted quinuclidine: A short review," *Period Biol*, vol. 121–122, no. 1–2, pp. 15–21, Dec. 2020, doi: 10.18054/pb.v121-122i1-2.10603.
- [3] L.G.Wade, *Organska kemija*, 7.izdanje. Zagreb: Školska knjiga, 2017.
- [4] C. P. Gerba, "Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 2. American Society for Microbiology, pp. 464–469, 2015. doi: 10.1128/AEM.02633-14.
- [5] W. S. Hamama, O. M. Abd El-Magid, and H. H. Zoorob, "Chemistry of Quinuclidines as Nitrogen Bicyclic Bridged-ring Structures."
- [6] L. Bazina, "Kemijski seminar I."
- [7] "Bacteria." <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Bacteria> (pristupljeno 08.09.2022).
- [8] Smilja Kalenić, *Medicinska mikrobiologija*, 2.izdanje. Medicinska naklada d.o.o., 2019.
- [9] "What Is Antiseptic: Antiseptic vs. Disinfectant, Uses, and Safety." <https://www.healthline.com/health/what-is-antiseptic> (pristupljeno 08.09. 2022).
- [10] G. McDonnell, A. D. Russell, L. Operations, and S. Louis, "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance," 1999. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/cmr>
- [11] "alkaloidi | Hrvatska enciklopedija." <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=1790> (pristupljeno 08.09. 2022).
- [12] J. Alvarez-Builla, J.J.Vaquero, and J.Barluenga, *Modern Heterocyclic Chemistry*, 1.izd. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KgaA, 2011.
- [13] L. N. Yakhontov, "Quinuclidine Chemistry'."
- [14] A. T. Balaban, D. C. Oniciu, and A. R. Katritzky, "Aromaticity as a Cornerstone of Heterocyclic Chemistry," *Chem Rev*, vol. 104, no. 5, pp. 2777–2812, Apr. 2004, doi: 10.1021/cr0306790.
- [15] S.H.Pine, *Organska kemija*, 5.izd. Školska knjiga, Zagreb, 1994.
- [16] D.Crnčević, "Synthesis of quaternary ammonium salts based on quinuclidin-3-ol and pyridine-4-aldoxime with alkyl chains," 2020.
- [17] J.A.Joule and K.Mills, *Heterocyclic Chemistry*, 5.izd. J. Wiley-Blackwell, United Kingdom, 2010.



- [18] “Measure microbial growth using the „OD600“ | BMG LABTECH.”  
<https://www.bmglabtech.com/en/blog/measure-microbial-growth-using-the-od600/>  
(pristupljeno 08.09. 2022).
- [19] “Dimethyl sulfoxide - American Chemical Society.”  
<https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/d/dimethyl-sulfoxide.html> (pristupljeno 08.09.2022).