

*Urszula Guzik, Katarzyna Hupert-Kocurek, Adrianna Mazur,
Danuta Wojcieszynska*

BIOTRANSFORMACJA WYBRANYCH NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH W ŚRODOWISKU

Katedra Biochemii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. *S. Łabużek*

Hasła kluczowe: biotransformacja, leki przeciwzapalne, toksyczność, mikroorganizmy.

Key words: biotransformation, anti-inflammatory drug, toxicity, microorganisms.

We współczesnym świecie wzrasta spożycie coraz większej liczby leków, zwłaszcza dostępnych bez recepty, wśród których dużą grupę stanowią niesteroidowe leki przeciwzapalne, jak: ibuprofen, kwas acetylosalicylowy, naproksen, czy diklofenak, będące składnikami wielu środków przeciwbólowych. Roczne spożycie ibuprofenu w 2000 r. w Niemczech wynosiło 300 ton, w Anglii 120 ton, w Polsce 58 ton (1). Niesteroidowe leki przeciwzapalne w organizmach żywych nie ulegają degradacji, a jedynie niewielkim transformacjom. Ponadto, niezużyte leki trafiają często wprost do ścieków lub na wysypiska śmieci. Jak wskazują wyniki badań, oczyszczalnie w wielu przypadkach nie są w stanie usunąć całego ładunku leków znajdujących się w ściekach. W ten sposób część farmaceutyków trafia do wód powierzchniowych, a niejednokrotnie nawet do źródeł wody pitnej, skąd ponownie mogą dostawać się do organizmów żywych, w których ulegają akumulacji (2).

W ostatnich latach podjęto badania nad biotransformacją leków przez bakterie i grzyby. Mają one na celu wyizolowanie gatunków zdolnych do efektywnego usuwania farmaceutyków ze ścieków.

W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat zagrożeń, jakie niesie ze sobą obecność w środowisku niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Dokonano przeglądu aktualnych wyników badań nad efektywnością biodegradacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych, jak również opisano znane szlaki biotransformacji tych związków przez mikroorganizmy.

ZAGROŻENIA ZWIĄZANE Z OBECNOŚCIĄ NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH W ŚRODOWISKU

Przy częstym stosowaniu leków, dużym problemem staje się zanieczyszczenie nimi, co jest związane z przedostawaniem się ich do środowiska w wyniku wydalenia przez organizmy żywe w formie niezmięnionej lub zmienionej nieznacznie, w zależności od ich właściwości, wraz z moczem lub kałem. Trafiają one do ka-

nalizacji i stamtąd do oczyszczalni ścieków. Szczególnie duży ładunek tego typu zanieczyszczeń niesą ze sobą ścieki pochodzące ze szpitali (1, 3, 4).

W oczyszczalni leki i ich metabolity mogą ulec biodegradacji do CO₂ i H₂O, biotransformacji lub pozostać w postaci niezmienionej. Związki polarne i dobrze rozpuszczalne w wodzie pozostają w ściekach oczyszczonych i wraz z nimi dostają się do wód powierzchniowych. Niesteroidowe leki przeciwzapalne lub ich metabolity słabo rozpuszczalne w wodzie mogą zostać zatrzymane w szlamie ściekowym. Użycie takiego szlamu do rekultywacji terenów lub w rolnictwie jako nawozu, grozi przeniknięciem związków chemicznych w nim zawartych do gleby i wód gruntowych (1, 5). W tab. I zamieszczono dane dotyczące stężenia niesteroidowych leków przeciwzapalnych w wodach powierzchniowych i w wodzie pitnej.

Drugim źródłem niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku są źle utylizowane, przeterminowane lub nieużyte farmaceutyki. Z raportu sporządzonego w Stanach Zjednoczonych w 1996 r. wynika, że 54% osób wyrzuca leki do śmieci, a 35,4% do toalety (6). Takie leki w czystej postaci trafiają do oczyszczalni ścieków lub na wysypisko śmieci, skąd mogą dostać się do gleby i wód gruntowych.

Tab e l a I. Występowanie wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku wodnym (2, 10, 29, 30)

Tab l e I. Presence of some non-steroidal anti-inflammatory drug in water environment (2, 10, 29, 30)

Lek	Występowanie	Stężenie (μg/dm ³)	Państwo
Diklofenak	wody powierzchniowe	0,3–0,5	Polska
	wody powierzchniowe	0,001–0,033	Francja
	wody powierzchniowe	0,15	Niemcy
	woda pitna	<0,0025	Francja
Kwas salicylowy	wody powierzchniowe	0,007–0,2	Włochy
Ibuprofen	wody powierzchniowe	0,05–0,1	Polska
	wody powierzchniowe	<0,0045	Francja
	woda pitna	<0,0006	Francja
	woda pitna	0,003	Niemcy
Naprosken	wody powierzchniowe	0,07	Niemcy
Kwas mefenamowy	wody powierzchniowe	≥0,326	Korea
	wody powierzchniowe	0,086	Wielka Brytania

Niesteroidowe leki przeciwzapalne są substancjami chemicznymi, biologicznie aktywnymi, modyfikującymi procesy biochemiczne zachodzące w organizmach ludzkich i zwierzęcych. Negatywne działanie pogłębia się szczególnie podczas długiej, często wielopokoleniowej ekspozycji na te substancje (1).

W przeprowadzonych badaniach nad toksycznością diklofenaku wykazano, że EC₅₀ dla 96 godz. ekspozycji *Dunaliella tertiolecta* (składnik fitoplanktonu) na ten związek wynosiło 185,69 mg/dm³ (7), natomiast dla zielonej algi *Desmodesmus subspicatus* narażonej na 72 godz. kontakt 72 mg/dm³ (8). Dotychczas nie stwierdzono w środowisku stężenia diklofenaku rzędu kilkudziesięciu czy kilkuset miligra-

mów, stąd większe znaczenie mają dane dotyczące długoterminowej ekspozycji na leki przy stężeniach rzędu $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. W badaniach prowadzonych przez *Schwaiger'a* i współpr. (2) sprawdzono wpływ diklofenaku na pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Osobniki w wieku 1,8 roku hodowano przez 28 dni w akwariach z pięcioma różnymi stężeniami leku: 1, 5, 20, 100 i 500 μg diklofenaku/ dm^3 wody. Po tym czasie przeprowadzono badania próbek tkanek pochodzących z wątroby, żołądka, jelita, śledziony, skrzeli i nerek pod kątem zmian histopatologicznych i obliczono współczynnik biokoncentracji (BCF) diklofenaku dla wątroby, skrzeli, nerek i mięśni tych ryb. Badania wykazały brak zmian w tkankach wątroby, jelita, żołądka i śledziony, w przeciwieństwie do próbek pochodzących z nerek i skrzeli, gdzie zmiany zaobserwowano u osobników hodowanych już przy stężeniu diklofenaku 5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ i wyższym. W nerkach stwierdzono zwyrodnienie kropelkowo-szkliste, nagromadzenie materiału białkowego w świetle kanalików oraz wakuolizację i martwicę pojedynczych komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Zwiększyła się też ilość tkanki śródmiąższowej nerek. W skrzelach zaobserwowano zmiany zwyrodnieniowe i nekrotyczne w obrębie komórek podporowych i dylatację ścian naczyń włosowatych. Zmiany te, w znacznym stopniu pogarszają ogólny stan zdrowia i obniżają wydolność organizmu. Współczynnik biokoncentracji u ryb hodowanych w stężeniu 500 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ wynosił 12, 5, 3 i 0,3 odpowiednio dla wątroby, nerek, skrzeli i mięśni, a dla stężenia 1 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ 2732 dla wątroby, 971 dla nerek, 763 dla skrzeli i 69 dla mięśni. Wysoki współczynnik biokoncentracji dla skrzeli i nerek koresponduje z obecnością zmian histopatologicznych, jednak najwyższy współczynnik występuje w wątrobie, gdzie nie zaobserwowano żadnych zmian. Według *Schwaiger'a* i współpr. (2) wynika to z faktu, iż w wątrobie zachodzi metabolizm diklofenaku. Przeprowadzone badania wskazują jednoznacznie na wysokie ryzyko wystąpienia zmian patologicznych w wyniku długotrwałego kontaktu organizmu z farmaceutykami (2, 9, 10).

BIOTRANSFORMACJA NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH

Odpowiedzią na problem zanieczyszczenia środowiska lekami i ich metabolitami jest wzrastające zainteresowanie procesami biologicznej ich degradacji i transformacji, pozyskiwaniem mikroorganizmów i enzymów zaangażowanych w przemiany niesteroidowych związków przeciwzapalnych oraz opisaniem intermedatów szlaków metabolicznych tych związków.

Pomimo wielu badań nad biodegradacją leków w środowisku, nadal niewiele wiadomo na temat dróg ich całkowitej degradacji, co częściowo spowodowane jest trudnościami w pozyskiwaniu mikroorganizmów zdolnych do ich pełnego metabolizowania. W nielicznych doniesieniach opisane są jedynie procesy biotransformacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych, prowadzące często do powstania intermedatów o dużej trwałości w środowisku (1,2, 11). *Quintana* i współpr. (11) w badaniach nad przemianami niesteroidowych leków przeciwzapalnych wykazali, że diklofenak (kwas 2-{2-[(2,6-dichlorofenylo)amino]fenylo}octowy), jeden z najsilniej działających przeciwbólowo niesteroidowych leków przeciwzapalnych, po

dostaniu się do środowiska cechuje się w nim dużą trwałością i toksycznością (2, 11). Zaobserwowano m.in. niską wydajność oczyszczania ścieków zawierających diklofenak w oczyszczalniach ścieków, gdzie często obserwowany jest na wypływie (11). Ponadto, efektywność usuwania diklofenaku metodą osadu czynnego w dużej mierze zależy od początkowego stężenia. Przy stężeniu leku w ściekach wynoszącym $1\mu\text{g}/\text{dm}^3$ efektywność oczyszczania wynosi 71%, natomiast przy stężeniu trzykrotnie większym efektywność spada do 17% (1). Osorio-Lozada i współpr. (12) zaobserwowali, że spośród badanych piętnastu szczepów bakterii i grzybów, jedynie 2 szczepy bakterii i 4 szczepy grzybów biotransformowały diklofenak. Najwyższą efektywnością spośród wszystkich badanych mikroorganizmów, odznaczał się szczep *Actinoplanes* sp., który biotransformował 100% diklofenaku w ciągu 5 godz. Grzyby z gatunków *Cunninghamella elegans*, *Beauveria bassiana* i *Cunninghamella echinulata* przekształcały 100% tego leku w czasie 120 godz. Osorio-Lozada i współpr. (12) obserwowali podczas biotransformacji diklofenaku przez szczep *Actinoplanes* sp. pojawianie się takich metabolitów jak, 4'-hydroksydiklofenak, 5-hydroksydiklofenak oraz 4',5-dihydroksydiklofenak. Metabolity te zidentyfikowano również podczas biotransformacji leku w organizmie ludzkim w pierwszej fazie metabolizmu, co pozwala przypuszczać, że u *Actinoplanes* sp. w szlaku przemian diklofenaku bierze udział ten sam system enzymatyczny, oparty na monoooksygenazach współdziałających z cytochromem P450 (12) (ryc. 1A).

Grzyby białe zgnilizny drewna *Phanerochaete chrysosporium* wykorzystują jako system detoksyfikacji związków ksenobiotycznych aparat enzymatyczny zaangażowany w rozkład lignin: peroksydazy i lakazy (13). W warunkach napowietrzania, w hodowli z glukozą, grzyby te transformowały od 65 do 99% diklofenaku w ciągu doby, przy czym efektywność procesu zależała od zawartości tlenu i czasu inkubacji szczepu w obecności diklofenaku (13). W trakcie inkubacji zaobserwowano niską aktywność peroksydazy manganozależnej, co *Rodríguez-Morales* i współpr. (13) tłumaczą w dwojaki sposób. Autorzy ci sugerują, że być może tylko niewielka ilość enzymów lignolitycznych zaangażowana jest w transformację diklofenaku, bądź metabolizowanie tego związku zachodzi z udziałem innego szlaku metabolicznego, prawdopodobnie związanym z monoooksygenazą typu cytochrom P450 (13). Przypuszczenia te potwierdzają badania *Hata* i współpr. (14), którzy prowadzili hodowlę *Phanerochaete sordida* w obecności diklofenaku o stężeniu $0,1\text{ mol}/\text{dm}^3$. Po wprowadzeniu do hodowli inhibitora cytochromu P450 – 1-aminobenzotriazolu, stwierdzili oni 40% spadek szybkości biotransformacji diklofenaku. Prawdopodobnie cytochrom ten bierze udział w hydroksylacji diklofenaku. Jednak autorzy ci potwierdzają również udział w biotransformacji tego leku manganozależnej peroksydazy i lakazy, co sugeruje możliwość współistnienia dwóch możliwych dróg metabolizowania tego związku (14).

Podobnie może przebiegać biotransformacja ibuprofenu (kwas 2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]propanowy), najszerzej stosowanego niesteroidowego leku przeciwzapalnego równocześnie najbardziej rozpowszechnionego w środowisku farmaceutyki tej grupy. W skrajnych przypadkach zanieczyszczenie tym związkiem dochodzi do $28\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (15). Zaobserwowano kometaboliczny rozkład $5\text{ mg}/\text{dm}^3$ ibuprofenu przez osad czynny oczyszczalni ścieków, do której trafiały wcześniej ścieki zawierające ibuprofen.



Ryc. 1. Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (A – diklofenak; B – ibuprofen; C – ketoprofen; D – naproksen) (16–20).
Fig. 1. Biotransformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (A – diclofenak; B – ibuprofen; C – ketoprofen; D – naproxen) (16–20).

Jako intermediaty pośrednie zidentyfikowano izomery hydroksyibuprofenu. Spadek stężenia tych metabolitów w 15-tym dniu hodowli wskazuje na dalszą mineralizację ibuprofenu (11).

Transformację ibuprofenu przez *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum* i *Phanerochaete chrysosporium* wykazali Marco-Urrea i współpr. (16). Efektywność transformacji zależała od stosowanego podłoża. W trakcie hodowli grzybów na podłożach ubogich w azot, podczas której następuje intensywne synteza enzymów lignolitycznych, obserwowano wzrost szybkości biotransformacji. Sugerowało to udział zewnątrzkomórkowych enzymów lignolitycznych w biotransformacji ibuprofenu. Jednak badania aktywności lakazy i peroksydazy manganozależnej w obecności ibuprofenu wykluczyły ich udział w metabolizmie tego związku. Brak wpływu inhibitorów cytochromu P450, takich jak 1-aminobenzotriazolu, czy piperonylobutoksydu, na transformację ibuprofenu wskazywał na zaangażowanie innych szlaków metabolicznych w rozkład tego leku (16). Marco-Urrea i współpr. (16) sugerują udział reaktywnych form tlenu w metabolizmie ibuprofenu. Podczas zewnątrzkomórkowej redukcji Fe^{3+} z udziałem dehydrogenazy celobiozy lub hydrochinonu dochodzi do generacji rodników hydroksylowych. Prawdopodobnie rodniki te odpowiadają za transformację ibuprofenu do 1,2-dihydroksyibuprofenu przez grzyb *T. versicolor*. W pierwszym etapie tego procesu dochodzi do hydroksylacji ibuprofenu, w wyniku czego powstają dwa izomery: 1-hydroksyibuprofen i 2-hydroksyibuprofen (ryc. 1B). Wykazano, że powstałe intermediaty odznaczają się wyższą toksycznością niż związek macierzysty (16, 17).

Inną transformację mieszaniny racemicznej enancjomerów S(+) i R(-) opisano u szczepu *Nocardia* sp. NRRL 5646, wykazującego zdolność rozkładu ligninu. Po 24 godz. inkubacji szczepu w obecności gibuprofenu obserwowano pojawianie się ibuprofenolu i octanu ibuprofenolu (ryc. 1B) (18, 19). Z badań nad stereochemią powstałych intermediatów wynika, że biotransformacji ulegał przede wszystkim izomer R(-), co wskazuje na udział w tym procesie R(-)-selektywnej reduktazy kwasów karboksylowych (18, 19).

Pochodną kwasu fenylopropionowego jest również ketoprofen (kwas 2-(3-benzoylofenylo)propanowy). Quintana i współpr. (11) stwierdzili transformację tego związku do dwóch metabolitów kwasu 3-(hydroksy-karboksymetylo)hydratropowego oraz kwasu 3-(keto-karboksymetylo)hydratropowego. Obecność tych metabolitów wskazuje, że ketoprofen może być rozkładany wspólnym szlakiem dla bifenyli, eterów bifenyli i związków pokrewnych. Proponowany szlak przedstawiono na ryc. 1C. Zdolność do całkowitej biotransformacji 10 mg/dm^3 ketoprofenu wykazuje również *Trametes versicolor*. Prawdopodobnie związek ten dostaje się do komórki na drodze transportu aktywnego, a następnie przekształcany jest przez system enzymatyczny związany z cytochromem P450.

Głównym zidentyfikowanym metabolitem był kwas 2-([3-hydroksy{fenylo}metylo]fenylo)propanowy, w niewielkich ilościach obserwowano również kwas 2-[3-(4-hydroksybenzoylo)fenylo]propanowy oraz kwas 2-(3-benzoylo-4-hydroksyfenylo)propanowy (ryc. 1C) (20).

Naproksen (kwas 2-(6-metoksynaft-2-yl)-propanowy) należy do grupy leków będących pochodnymi kwasu propionowego. Wykazano jego biotransformację w układach kometabolicznych do O-desmetylonaproksenu i siarczanu 6-O-des-

metylonaproksenu. Do organizmów zaangażowanych w rozkład tego leku należą grzyby z rodzaju *Cunninghamella* (*Cunninghamella blakeslesna*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegant*), wykorzystujące układ enzymatyczny związany z cytochromem P450, analogiczny do systemu detoksykacji obecnego u ssaków (11, 21) (ryc. 1D).

PODSUMOWANIE

Z przedstawionego przeglądu dostępnych danych literaturowych wynika, iż większość niesteroidowych leków przeciwzapalnych nie ulega w środowisku całkowitej degradacji, a jedynie biotransformacji. Zaangażowane w nią są dwa główne układy enzymatyczne: enzymy lignolityczne oraz analogiczny do ssaczego system cytochromu P450. Wydaje się, że w celu podwyższenia wydajności oczyszczania ścieków z tych trudno degradowanych związków, w dalszych perspektywach uzasadnione będzie zastosowanie systemów zintegrowanych: biologicznego i chemicznego oczyszczania (w tym zaawansowanego utlenienia z wykorzystaniem układów rodnikowych).

U. Guzik, K. Hupert-Kocurek, A. Mazur, D. Wojcieszynska

BIOTRANSFORMATION OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN ENVIRONMENT

PIŚMIENNICTWO

1. *Sosnowska K., Styszko-Grochowiak K., Golaś J.*: Leki w środowisku-źródła, przemiany, zagrożenia. IV Krakowska Konferencja Młodych Uczonych, 2009; 395-404. – 2. *Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D.*: Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.*, 2004; 68: 141-150. – 3. *Bendz D., Paxéus N.A., Ginn T.R., Loge F.J.*: Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje river in Sweden. *J. Hazard. Mater.*, 2005; 122: 195-204. – 4. *Nosek K., Styszko K., Gola J.*: Badanie obecności wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (nlpz), triclosanu i bisfenolu a w ściekach komunalnych techniką chromatografii gazowej z detektorem mas (GC/MS). VI Krakowska Konferencja Młodych Uczonych, 2011; Kraków. – 5. *Halling-Sorensen B., Nielsen N.S., Lanzky S.F., Ingerslev F.*: Occurrence, fate, and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review. *Chemosphere*, 1998; 36: 357-393. – 6. http://www.aptekarzypolski.pl/index.php?option=com_content&task=view&id=606&Itemid=108_07-05-2012. – 7. *Delorenzo M.E., Fleming J.*: Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2008; 54: 203-210. – 8. *Cleuvers M.*: Aquatic Ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.*, 2003; 142: 185-194. – 9. *Hoeger B., Kollner B., Dietrich D.R., Hitzfeld B.*: Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* fario). *Aquatic Toxicol.*, 2005; 75: 53-64. – 10. *Quinn B., Schmidt W., O'Rourke K., Hernan R.*: Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere*, 2011; 84: 657-663. – 11. *Quintana J.B., Weiss S., Reemtsma T.*: Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.*, 2005; 39: 2654-2664. – 12. *Osorio-Lozada A., Surapaneni S., Skiles G.L., Subramanian R.*: Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: case study of diclofe-

- nac metabolism by *Actinoplanes* species. Drug Metab. Dispos., 2008; 36: 234-240. – 13. *Rodríguez-Morales A.I., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M.*: Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. Biodegradation, 2012; 23: 145-156. – 14. *Hata T., Kawai S., Okamura H., Nishida T.*: Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. Biodegradation, 2010; 21: 681-689. – 15. *Roberts P.H., Thomas K.V.*: The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. Sci. Total Environ., 2006; 356: 143-153. – 16. *Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Vicent T., Caminal G.*: Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. Chemosphere, 2009; 74: 765-772. – 17. *Luis P., Ortiz I., Aldaco R., Irabien A.*: Anvel group contribution method in the development of QSAR for predicting the toxicity (*Vibrio fischeri* EC50) of ionic liquids. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2007; 67: 423-429. – 18. *Chen Y., Rosazza J.P.N.*: Microbial transformation of ibuprofen by a *Nocardia* species. Appl. Environ. Microbiol., 1994; 60: 1292-1296. – 19. *Trojanowski J., Haider K., Sundman V.*: Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenols by a *Nocardia* sp. Arch. Microbiol., 1977; 114: 149-153. – 20. *Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Cruz-Morató C., Vicent T., Caminal G.*: White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC–DAD–MS and NMR. Chemosphere, 2010; 78: 474-481.
21. *Zhong D.F., Sun L., Liu L., Huang H.H.*: Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species. Acta Pharmacol. Sin., 2003; 24: 442-447.

Adres: 40-032 Katowice, ul. Jagiellońska 28.