

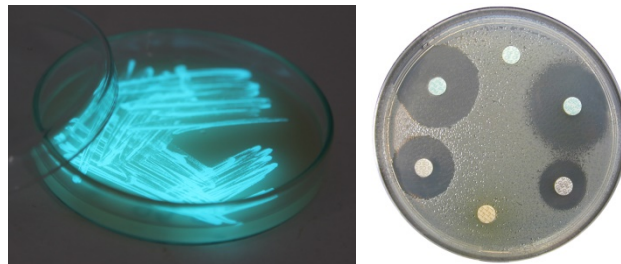
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Josipa Papac

Klara Perović

Maja Halužan

## **ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI FARMACEUTIKA U VODI**



Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zavodu za analitičku kemiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-2353 i izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2016./2017. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger



|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. OPĆI DIO.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.1. FARMACEUTICI.....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1.1. ANTIBIOTICI.....   | 4         |
| 2.1.2. ANTIHELMINTICI.....  | 5         |
| 2.1.3. KEMOTERAPEUTICI.....   | 6         |
| <b>2.2. FARMACEUTICI U VODAMA.....</b>  | <b>7</b>  |
| 2.2.1. ÚTJECAJ FARMACEUTIKA NA OKOLIŠ.....  | 10        |
| 2.2.2. METODE OBRADÉ OTPADNIH VODA TE NJIHOVA ÚČINKOVITOST PRI UKLANJANJU FARMACEUTIKA..... | 12        |
| 2.2.3. PRAVILNO ZBRINJAVANJE FARMACEUTIKA.....  | 13        |
| <b>2.3. ISPITIVANI FARMACEUTICI.....</b>  | <b>14</b> |
| 2.3.1. ALBENDAZOL.....  | 14        |
| 2.3.2. ALENDRONAT.....  | 14        |
| 2.3.3. CEFDINIR.....  | 15        |
| 2.3.4. FEBANTEL.....  | 16        |
| 2.3.5. HIDROSIKLOROKIN.....   | 16        |
| 2.3.6. MEMANTIN.....  | 17        |
| 2.3.7. METOKLOPRAMID.....   | 17        |
| 2.3.8. NITROFURANTOIN.....  | 18        |
| 2.3.9. PRAZIKVANTEL.....  | 18        |
| <b>2.4. TOKSIČNOST FARMACEUTIKA U VODAMA.....</b>   | <b>19</b> |
| 2.4.1. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI FARMACEUTIKA.....  | 19        |
| 2.4.2. PRIKAZ TOKSIČNOSTI – KRIVULJA TOKSIČNOSTI.....                                       | 21        |
| 2.4.4. ISPITIVANJE AKUTNE TOKSIČNOSTI NA BAKTERIJAMA <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....           | 21        |
| 2.4.5. DEFINICIJE POVEZANE S TOKSIČNOŠĆU.....   | 22        |
| 2.4.6. ZONA INHIBICIJE.....   | 23        |
| <b>2.4. PROCJENA RIZIKA ZA OKOLIŠ.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>2.5. OSVRT NA ZAKONODAVSTVO.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>  | <b>28</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.1. MATERIJALI .....</b>   | <b>28</b> |
| 3.1.1. KEMIKALIJE .....  | 28        |
| 3.1.2. HRANJIVE PODLOGE.....   | 28        |
| 3.1.2.1. Podloga za uzgoj bakterija <i>Vibrio fischeri</i> .....   | 28        |
| 3.1.2.2. Podloga za uzgoj bakterija <i>Streptomyces rimosus</i> i <i>Bacillus sp.</i> – bujon agar ..... | 29        |
| 3.1.2.3. Podloga za uzgoj plijesni <i>Aspergillus niger</i> – malt agar (kruti) .....                    | 30        |
| 3.1.3. OTOPINA ZA RESUSPENZIJU.....  | 30        |
| 3.1.4. DJELATNI MIKROORGANIZMI .....   | 31        |
| 3.1.4.1. Bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....  | 31        |
| 3.1.4.2. Mikroorganizmi korišteni za određivanje toksičnosti zonom inhibicije .....                      | 33        |
| 3.1.5. FARMACEUTICI .....  | 34        |
| 3.1.5.1. Otopine farmaceutika .....  | 34        |
| <b>3.2. INSTRUMENTI I UREĐAJI.....</b>   | <b>35</b> |
| 3.2.1. ANALITIČKA VAGA .....   | 35        |
| 3.2.2. ULTRAZVUČNA KUPELJ .....  | 36        |
| 3.2.3. AUTOKLAV .....  | 37        |
| 3.2.4. LUMINOMETAR .....   | 38        |
| <b>3.3. METODIKA ODREĐIVANJA TOKSIČNOSTI BAKTERIJAMA <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....</b>                    | <b>40</b> |
| <b>3.4. METODIKA ODREĐIVANJA TOKSIČNOSTI ZONOM INHIBICIJE .....</b>                                      | <b>41</b> |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>4.1. ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI BAKTERIJAMA <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....</b>                             | <b>47</b> |
| <b>4.3. ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI ZONOM INHIBICIJE .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>6. LITERATURA.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>7. DODATAK .....</b>  | <b>66</b> |
| 7.1. POPIS SLIKA .....   | 66        |
| 7.2. POPIS TABLICA.....  | 67        |
| 7.3. POPIS KRATICA I SIMBOLA .....   | 68        |
| <b>SAŽETAK .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>70</b> |
| ZAHVALA .....  | 71        |
| ŽIVOTOPISI .....   | 72        |

# 1.UVOD

---

Okvirna direktiva o vodama (ODV) jest krovni dokument na nivou Europske zajednice na području vodne politike. Između ostalog uspostavlja osnovne principe zaštite voda od onečišćenja. Strategija sprečavanja onečišćenja voda uključuje i listu od 45 prioriternih tvari ili grupe tvari koje predstavljaju značajan rizik za vodni okoliš. Neke tvari sa liste su, zbog svojih karakteristika kao što su: postojanost u okolišu, bioakumuliranje i toksičnost, dodatno označene kao prioritetne opasne tvari, a ukupno ih je 45. Posebno mjesto zauzimaju „nove onečišćujuće tvari“ gdje su svrstani i farmaceutici. [1]

Jedan od najbitnijih okolišnih segmenata koji biva onečišćen jest voda i vodeni okoliš. U Zakonu o vodama navodi se da su vode opće dobro i imaju osobitu zaštitu Republike Hrvatske. [2] Upravo zato, kako otpadna voda iz raznih izvora ne bi došla u direktan kontakt sa prirodnim vodotocima, potrebno ju je prethodno obraditi, tj. pročistiti. Načini obrade se biraju s obzirom na karakteristike otpadne vode te stupanj onečišćenja. Nakon što prođe klasični komunalni sustav za obrađivanje otpadnih voda (engl. *Wastewater Treatment Plants*, WWTPs), voda određene kvalitete se ispušta u okoliš. Uvjete kvalitete koje mora zadovoljavati takva voda propisane su u Zakonu o vodama. [2,3]

Posljednjih nekoliko desetljeća zabilježene su povećane koncentracije humanih i veterinarskih farmaceutika u okolišu koje su uzrokovane povećanom proizvodnjom, ali i upotrebom. Ti spojevi mogu dospjeti u vodeni okoliš na različite načine: u izvornom obliku putem otpadne vode farmaceutske industrije te putem staničnih izlučevina u izvornom molekulskom obliku, ali i kao metabolizirane molekule i razgradni produkti.[4]Neka farmakokinetička istraživanja pokazala su da gotovo 50 % izvorne komponente farmaceutika može biti prisutno u staničnim izlučevinama. [5]

Unatoč tome što su farmaceutici prvenstveno namijenjeni liječenju, metaboliti i razgradni produkti pokazuju visoku razinu toksičnosti iako su u okolišu prisutni u vrlo niskim koncentracijama. Zato je važno razviti i cjelokupan sustav praćenja takvih spojeva u okolišu.

Poseban naglasak trebaviti na inženjerstvo okoliša. Integrirano upravljanje okolišem (engl. *Integrated Environmental Management*, IEM) jest svojevrsni preventivni pristup zaštiti okoliša. [6] Iako su podaci o toksičnom utjecaju farmaceutika u smislu zdravstvenog

rizik prilikom upotrebe lijekova jasno definirani i opće poznati, važno je utvrditi njihovu ekotoksičnost, odnosno toksičnost za sve sastavnice okoliša, a u tom kontekstu i za ljude. Informacije o ekotoksičnosti važne su za praćenje farmaceutika u okolišu. To je dodatni segment prilikom procjene rizika takvih komponenata na okoliš. Ekotoksikologija je jedan od ključnih segmenata za određivanje „sudbine“ farmaceutika u okolišu. [7, 8]

Kod procjene toksičnosti važno je naglasiti širu mogućnost upotrebe takvih testova u laboratorijskoj praksi. To podrazumijeva da je metoda: jednostavna za izvedbu, ne zahtjeva ekstremne eksperimentalne uvjete, kratko traje, daje jak odziv procesa koji se jasno tumači i interpretira, jednoznačna, ponovljiva. Kod testova za određivanje akutne toksičnosti najčešće je u uporabi standardna metoda DIN 38 412-L-34 koja se temelji na mjerenju inhibicije bioluminiscencije bakterijske vrste *Vibrio fischeri*. S druge strane u upotrebi su i različite metode koje za određivanje toksičnosti komponenata koriste okolišne mikroorganizme, kao što je metoda praćenjem zone inhibicije.

Provođenje upravo ovakvih kompleksnih istraživanja i monitoring farmaceutika u okolišu u budućnosti će rezultirati još većim podizanjem svijesti o zaštiti okoliša, osobito vodenog. Uz to, ključno je naglasiti i utjecaj ovih istraživanja na definiranje maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) tih komponenata u vodi.

## 2. OPĆI DIO

---

### 2.1. Farmaceutici

Farmaceutici, odnosno lijekovi su grupa kemijskih spojeva koji obuhvaćaju sve terapijske lijekove namijenjene ljudima, veterinarske lijekove te dodatke prehrani. Dije se na prirodne, polusintetske i sintetske. U određenim količinama i pod određenim uvjetima služe za dijagnosticiranje, liječenje, ublažavanje ili sprječavanje bolesti. [9]

Farmaceutici su većinom organski spojevi male molekulske mase u iznosu od 200 do 500 daltona. Lipofilni su i umjereno topljivi kako bi bili biološki aktivni i biorasplošivi. [10]

Na tržište dolaze u obliku tableta ili tekućina. Bitno je napomenuti da se takav gotov proizvod sastoji od jedne ili više farmaceutski aktivnih tvari (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API), pomoćnih sredstava i aditiva kao što su anorganske soli ili druge organske kemikalije poput šećera, mirisa, pigmenta i boja. Struktura API-a može imati značajan utjecaj na sudbinu farmaceutika u okolišu. [11]

Farmaceutici spadaju u skupinu „novih onečišćujućih tvari“. Naime, posljednjih nekoliko desetljeća intenzivirala su se istraživanja okoliša koja su pomaknula pozornost sa konvencionalnih prioritetnih onečišćujućih tvari poput policikličkih aromatskih ugljikovodika i polikloriranih bifenila na tzv. „nove onečišćujuće tvari“ koje se sve više ispuštaju u okoliš i predstavljaju potencijalnu opasnost za ekosustav. Problem je u tome što za takve tvari još uvijek ne postoje zakonske regulative koje kontroliraju njihove maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) u okolišu. Osim farmaceutika, tu se ubrajaju i sredstva za osobnu higijenu, kao i sredstva koje se upotrebljavaju u kućanstvima. [12]

Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, farmaceutici lako prolaze kroz prirodne filtere i postrojenja za obradu otpadnih voda čime ugrožavaju sustav opskrbe pitkom vodom. [13]

Iako su u vodi prisutni u niskim, mikrogramskim ili nanogramskim koncentracijama, njihov dugoročni i kontinuirani unos može rezultirati brojnim negativnim utjecajima na izložene kopnene ili vodene organizme u okolišu. [10, 12]. Takve spojeve je danas, zbog značajnih poboljšanja u analitičkim postupcima, ipak moguće detektirati u vodama bez obzira što su u njima prisutni u jako niskim koncentracijama. [14]

Analize farmaceutskog tržišta pokazuju da je za zdravstvenu zaštitu ljudi u Europskoj uniji odobreno oko 3.000 različitih farmaceutskih aktivnih spojeva (PhAC) dok se u svijetu koristi ukupno oko 4.000 farmaceutskih aktivnih spojeva čija godišnja proizvodnja iznosi više od 1.000.00 tona. [9, 10]

U Republici Hrvatskoj je prema posljednjem Izvješću o potrošnji lijekova za 2015. godinu bilo potrošeno ukupno 5.266.937.944 kuna na lijekove, dok je 2014. godine ta potrošnja iznosila 5.005.884.342 kuna. Iz navedenih podataka vidimo da se potrošnja lijekova sve više povećava. [15, 16]

U radu je obrađena toksičnost tri skupine farmaceutike na bakterije *Vibrio fischeri*, a to su antihelmintici ili antiparazitici, antibiotici te kemoterapeutici.

### 2.1.1. Antibiotici

Antibiotici su kemijska terapijska sredstva koja se koriste za uništavanje ili inhibiranje mikroorganizama odnosno bakterija. Imaju široku primjenu u humanoj, veterinarskoj i stočarskoj praksi. Koriste se u dovoljno niskoj koncentraciji kako bi se izbjeglo oštećenje organizma domaćina.

Jedna od podjela antibiotika je na baktericidne i bakteriostatske. Baktericidni antibiotici koriste se za uništavanje bakterija dok bakteriostatski inhibiraju rast bakterija.

Klasifikacija antibiotika se uglavnom vrši na osnovi njihove strukture ili mehanizma djelovanja, uključujući podskupine poput beta-laktama, kinolona, tetraciklina, makrolida, sulfonamida i drugih.

S obzirom na različite pH-vrijednosti, antibiotici mogu biti neutralni, kationi, anioni ili cviterioni. Unutar iste molekule mogu imati više različitih funkcija zbog kojih se njihova fizikalna, kemijska i biološka svojstva poput sorpcije, fotoreaktivnosti, aktivnosti i toksičnosti mijenjaju sa pH vrijednošću.

Proizvodnja i uporaba antibiotika se naglo povećala u cijelom svijetu posljednjih nekoliko desetljeća. Na globalnoj razini se koristi oko 100.000-200.000 tona antibiotika godišnje. Zbog povećane potrošnje antibiotika, intenzivirala su se istraživanja o njihovom utjecaju na okoliš.



Antibiotici su među najčešće pripisivanim farmaceuticima koji vrlo lako pronalaze svoj put u vodenim sustavima. Budući da su postojani u okolišu i nisu biorazgradivi, antibiotici se smatraju najvećom prijetnjom za kvalitetu vodenih resursa u urbanim društvima. [17, 18, 19, 20] U radu su od antibiotika obrađeni cefdinir i nitrofurantoin.

### 2.1.2. Antihelmintici

Antihelmintici ili antiparazitici su grupa farmaceutika koja se koristi za liječenje crijevnih nametnika (gliste, metilji, trakavice i drugi) kod ljudi i životinja. Infekcije uzrokovane crijevnim nametnicima su najčešće infekcije koje pogađaju veliki broj ljudi.

Čine najveću skupinu veterinarskih farmaceutika. U poljoprivredi se koriste protiv grinja (akaricidi) i insekata (insekticidi).

Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih na benzimidazole (albendazol), difenilsulfide (febantel), heksahidropirazine (prazikvantel), imidazotiazole (levamisol), makrocikličke laktone (abamektin), salicilanilide (klosantel), tetrahidropirimidine (pirantel) i ostale (niklofolan).

U novije vrijeme se sve više primjenjuju kao antitumorski lijekovi. Tako benzimidazoli djeluju protiv parazita na način da se vežu na  $\beta$ -tubulin parazita i inhibiraju polimerizaciju tubulina i stvaranje mikrotubula čime se narušava funkcija diobenog vretena i dolazi do smrti stanica. Imaju potencijala u liječenju raka debelog crijeva dok se levamisol, predstavnik skupine imidazotiazola, u kombinaciji s drugim kemoterapeutcima primjenjuje kao djelotvoran imunomodulator u liječenju raka debelog crijeva, raka glave i vrata te melanoma. [21, 22]

U radu su od antihelmintika obrađeni albendazol, febantel i prazikvantel.

### 2.1.3. Kemoterapeutici

Kemoterapeutici su primarno koncipirani kao kemijske tvari antibiokrobnog djelovanja, a koje su dobivene sintetskim putem.

Početak dvadesetog stoljeća, njemački bakteriolog Paul Ehrlich je skovao izraz *kemoterapija* u potrazi za kemikalijom koja bi izlječila sifilis. On je predvidio tvar koja bi poput „*magičnog metka*“ ciljano napadala određeni mikroorganizam, a pri tome ostavljala domaćina nepovrijeđenog. Taj je cilj pružanja terapijskih svojstva s minimalnim nuspojavama i dalje u svim područjima razvoja lijekova. Značajan je uspjeh postignut u razvoju spojeva koji utječu na normalnu biokemiju ljudskog organizma. U takve spojeve ubrajaju se analgetici, antihistaminici, regulatori srčanog ritma, modifikatori krvnog tlaka, anestetici, protuupalna sredstva, sedativi, diuretici i vazodilatatori.

Posljednjih godina, kemoterapija je postala popularan oblik terapije protiv raka. Prvi potvrđeno uspješan lijek protiv raka bio je Heidelbergerov 5-fluorouracil (5-FU). Kemoterapeutska sredstva koja se koriste za liječenje raka dijele se prema načinu na koji utječu na određene kemijske puteve u stanicama raka, prema načinu na koji interferiraju sa staničnim putevima, te prema fazi u kojoj se stanica raka nalazi kada lijek na nju utječe. Neke od osnovnih vrsta kemoterapeutika su alkilirajuća sredstva, citotoksični antibiotici, antimetaboliti, hormoni i biljni alkaloidi. [23, 24, 25]

U radu su od kemoterapeutika obrađeni alendronat, hidroksiklorokin, memantin i metoklopramid.

## 2.2. Farmaceutici u vodama

Nakon primjene, farmaceutici u tijelima ljudi i životinja prolaze kroz strukturalne promjene što rezultira stvaranjem metabolita. Te promjene se rijetko odvijaju do kraja tako da se farmaceutski aktivni spojevi izlučuju kroz jetru ili bubrege kao smjesa osnovnog spoja, odnosno farmaceutski aktivne tvari (API-a) i metabolita koji mogu biti hidrofilniji i polarniji od izvornoga lijeka. [9, 11] Tako se neki antibiotici, primjerice, metabliziraju do 95 %, dok drugi samo do 5 %. Studije o API-ima provedene u Njemačkoj pokazuju kako se čak 75 % antibiotika koji se koriste u Njemačkoj izlučuje nepromijenjeno u obliku još uvijek aktivnih API-a. [11]

Nakon njihova izlučivanja i unošenja u okoliš, smjese osnovnih spojeva farmaceutika i metabolita prolaze kroz daljnje promjene putem biotičkih i abiotičkih procesa. Biotički procesi podrazumijevaju biološku razgradnju farmaceutika bakterijama i gljivicama dok abiotički procesi razgradnje uključuju fotolizu i hidrolizu. Razgradnja rezultira smanjenjem koncentracije farmaceutika i nastajanjem razgradnih i transformacijskih produkata. Transformacijom dolazi do promjene u strukturi početne molekule farmaceutika pri čemu se molekulska masa ne mijenja dok razgradnjom nastaju spojevi drugačije molekulske mase.

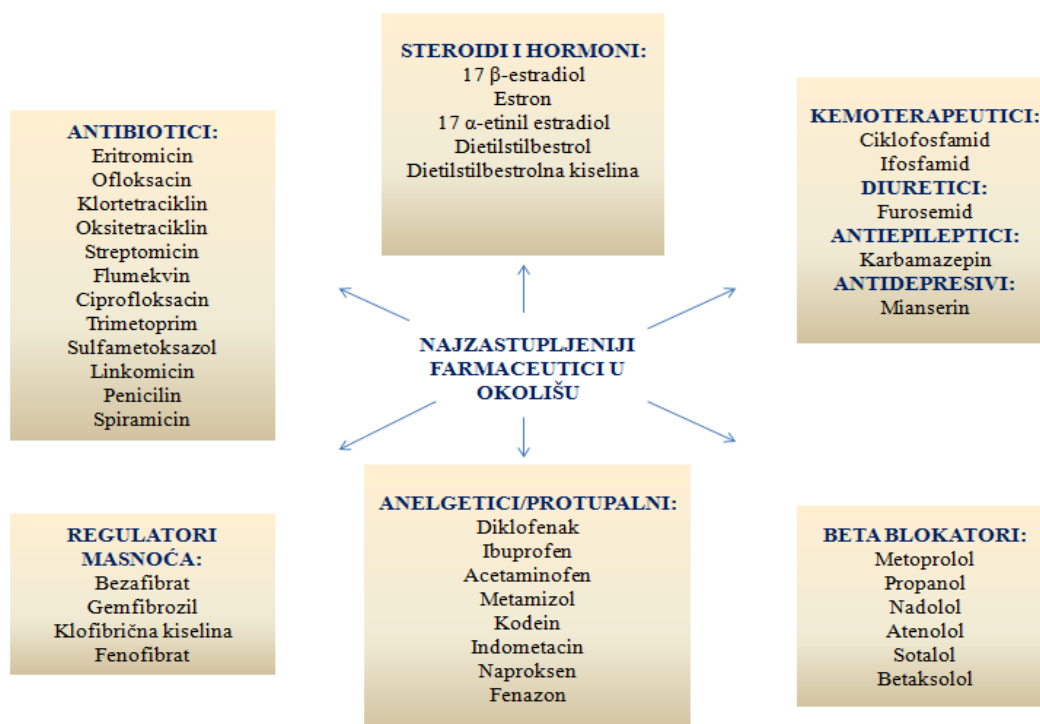
Zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava u odnosu na početne molekule farmaceutika, razgradni i transformacijski produkti mogu biti i toksičniji od početnih molekula.

Koncentracija farmaceutika u okolišu se ne mora nužno smanjiti zbog procesa razgradnje, već može biti posljedica sorpcije farmaceutika na čestice tla, sedimenta ili suspendirane čestice koje su prisutne u vodenoj fazi. [9, 11]

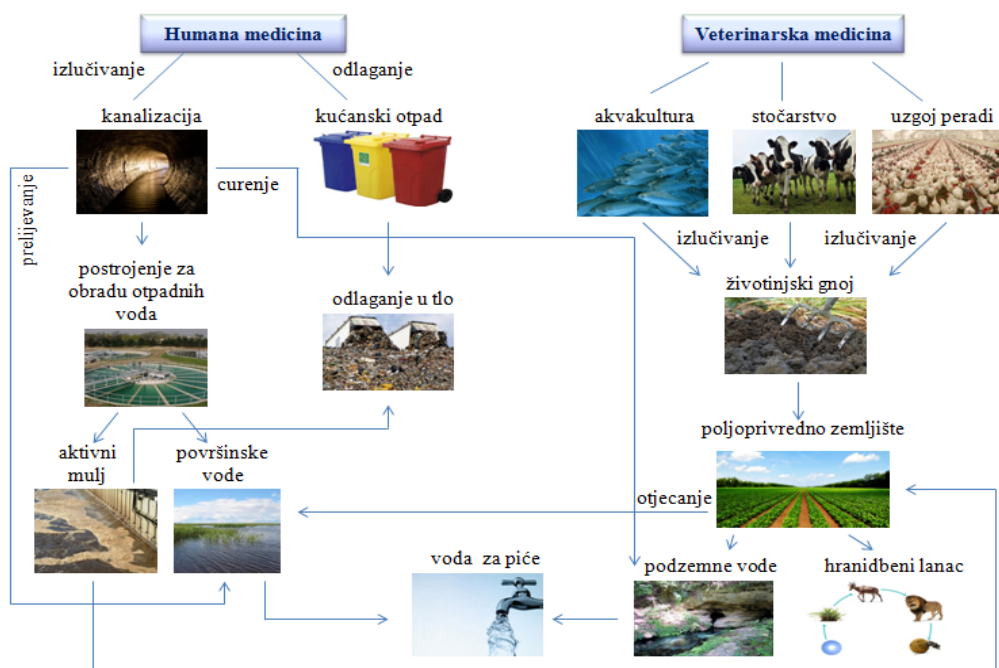
Poznat je čitav niz farmaceutika koji su tijekom godina detektirani u okolišu (**Slika 1.**) i koji u okoliš mogu dospjeti iz različitih izvora (**Slika 2.**). Neki od izvora su farmaceutska industrija, postrojenja za obradu otpadnih voda, procjedne vode iz odlagališta, septički sustavi, bolnice, nepropisno odlaganje neiskorištenih lijekova te farme na kojima se velike količine lijekova, posebice antibiotici, dodaju životinjskoj hrani radi liječenja ili preveniranja bolesti, u svrhu poboljšanog rasta i bolje iskoristivosti prehrane. Upotrebom stajskog gnojiva, farmaceutici mogu dospjeti na poljoprivredne površine, a ispiranjem tih površina čak i u podzemne vode. Gnojenjem poljoprivrednih površina aktivnim muljem, koji je nastao kao produkt obrade komunalnih otpadnih voda, farmaceutici također mogu dospjeti u tlo. Ipak,

većina onečišćujućih tvari se ispušta iz postrojenja za obradu komunalnih otpadnih voda. [10, 13, 26]

Prilikom ulaska u postrojenje za obradu otpadnih voda, farmaceutici uobičajeno nisu u potpunosti mineralizirani. Oni se ili djelomično zadržavaju u mulju ili metaboliziraju u još hidrofilniji, ali postojani oblik pri čemu prolaze kroz sustav obrade otpadnih voda i završavaju u vodnim prijamnicima. Njihovo uklanjanje u postrojenjima za obradu otpadnih voda je promjenjivo i ovisi o svojstvima samih farmaceutika i procesnim uvjetima kao što su vrijeme zadržavanja mulja (engl. *Sludge Retention Time*, SRT), hidrauličko vrijeme zadržavanja (engl. *Hydraulic Retention Time*, HRT) i temperatura. Vrlo se malo farmaceutskih aktivnih spojeva uklanja konvencionalnim postupcima obrade otpadnih voda i tako naposljetku mogu dospjeti u površinske vode, podzemne vode i vodu za piće. [29]



**Slika 1.** Najzastupljeniji farmaceutici u okolišu [27]



**Slika 2.** Glavni putevi dopijeca humanih i veterinarskih farmaceutika u okoliš [28]

Koncentracije pojedinačnih farmaceutskih spojeva u ispustima postrojenja za obradu otpadnih voda su uobičajeno niže od 1 µg/L, iako su više koncentracije u iznosu od nekoliko mg/L izmjerene u ispustima postrojenja za obradu otpadnih voda farmaceutske industrije. [26]

Nakon dospijevanja u okoliš, koncentracija lijeka ili metabolita u određenom dijelu ekosustava ovisi o njegovoj otpornosti na fotokemijsku i mikrobiološku razgradnju te o afinitetu vezanja na krute čestice. Farmaceutici sa tendencijom sorbiranja na krute matrice akumuliraju se u sedimentima i tlu, dok se topljivije tvari prenose površinskim i podzemnim vodama gdje podliježu daljnjoj biotičkoj transformaciji. [10]

Vrlo niske koncentracije farmaceutika u okolišu predstavljaju veliki problem prilikom njihove identifikacije i kvantitativnog određivanja. Za njihovo određivanje uglavnom se primjenjuju plinska kromatografija (GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) povezane sa spektrometrijom masa (MS).

Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika poput nehlapljivosti, nestabilnosti pri povišenim temperaturama i polarnosti ograničavaju primjenu plinske kromatografije. Zbog toga se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti primjenjuje za određivanje polarnih i termički nestabilnih farmaceutika u uzorcima iz okoliša.

U posljednjih nekoliko godina, HPLC-MS metode se sve više primjenjuju i zamjenjuju kromatografske metode koje koriste detektore s nizom dioda te fluorescentne detektore. Upotreba fluorescentnog detektora omogućuje postizanje niskih granica detekcije, dok se detektor s nizom dioda upotrebljava za određivanje spojeva koji apsorbiraju u području UV/VIS-a i kada se analiziraju jako opterećene otpadne vode sa visokim koncentracijama farmaceutika. HPLC-MS metode pak, uz niže granice dokazivanja i kvantifikacije, omogućuju određivanje molekulske mase farmaceutika i utvrđivanje struktura nepoznatih spojeva. [12]

Proizvodnju, otpuštanje i upotrebu farmaceutika u sljedećih 10 do 50 godina nije lako predvidjeti, ali iz više razloga se očekuje povećanje otpuštanja farmaceutika u okoliš. Prije svega, to može biti posljedica povećanja broja starijih ljudi čime se povećava upotreba lijekova te povećanje životnog standarda, posebice u brzo rastućim ekonomijama. Prema tome, pretpostavka da proizvodnja i uporaba lijekova može ostati približno konstantna je definitivno pogrešna. [11]

### 2.2.1. Utjecaj farmaceutika na okoliš

Prisutnost farmaceutika u okolišu uzorkuje poremećaje fizioloških procesa i reproduktivnih funkcija organizama, razvoj rezistentnih bakterija i povećanje toksičnosti nekih farmaceutski aktivnih spojeva. Iako su u okolišu prisutni u niskim koncentracijama, mogu imati negativne učinke na vodene organizme. Učinci ovise o bioraspoloživosti spoja, osjetljivosti na ispitivani spoj i o njegovoj razgradivosti.

Njihova prisutnost u okolišu je prvi put identificirana 60-ih godina 20. stoljeća u površinskim i otpadnim vodama u SAD-u i Europi. Zabrinutost zbog njihove potencijalne opasnosti porasla je devedesetih godina prošlog stoljeća kada su znanstvenici otkrili masovnu pojavu feminizacije mužjaka ribe u područjima rijeka, a u blizini postrojenja za obradu otpadnih voda. Feminizacija je bila uzrokovana prisutstvom 17  $\alpha$ -etinil estradiola sintetskog estrogenog hormona u vodi koji se inače koristi za kontracepciju. Osim estrogenih spojeva, u vodi su bili prisutni i ostali farmaceutici poput karbamazepina (antiepileptik) koji naglo smanjuje populaciju vodenih kukaca, fluoksetina (antidepresiv) koji nepovoljno utječe na mriještenje školjaka itd. Otkriveno je još i da je lijek diklofenak, poznatiji kao voltaren, skoro

uzrokovao izumiranje bengalskih i indijskih tankokljunih supova. Voltaren se davao kao protuupalno sredstvo za stoku čijim su se uginulim ostacima hranili supovi i tako se izravno ugrozili. [10, 16, 30]

Prisutnost tragova lijekova u vodi, posebice antibiotika, izaziva niz ekoloških i medicinskih problema. Mnogo su puta željeni utjecaji na ciljane vrste štetni na one neciljane. Utjecaji humanih i veterinarskih antibiotika na okoliš prikazani su u **Tablici 1**. Ukoliko su bakterije konstantno izložene malim koncentracijama antibiotika, dolazi do pojave rezistentnosti, čime se izravno ugrožava zdravlje ljudi i životinja budući da se sve veći broj infekcija ne može liječiti postojećim antibioticima. Smatra se da je najviše rezistentnosti stvoreno prema penicilinu, posebice ampicilinu te tetraciklinima i makrolidima kao što je eritromicin.

Osim pojave rezistentnosti, drugi problem koji može uzrokovati prisutstvo antibiotika u vodi jesu kemijske reakcije antibiotika sa sredstvima za obradu voda, najčešće s klorom koji se dodaje otpadnoj ili pitkoj vodi kako bi se uklonile štetne tvari. Zbog reakcija s klorom, antibiotici se u vodi pregrađuju u spojeve koji mogu biti čak toksičniji od početnog farmaceutskog spoja. [10, 31]

**Tablica 1.** Utjecaj nekih sintetskih aktivnih farmaceutskih tvari na ljude i životinje [31]

| Aktivna farmaceutska tvar (API) | Farmakološki učinak na ciljane organizme    | Potencijalni negativni učinci na neciljane organizme                  |
|---------------------------------|---|---|
| Fluoksetin                      | Seksualne disfunkcije u ljudi kao nuspojava | Mijenja razinu estradiola kod riba                                    |
| Diklofenak                      | Bubrežna toksičnost kod ljudi               | Oštećenje bubrega kod riba i ptica te uzrokuje smrt supova            |
| Etinil estradiol                | Feminizacija mužjaka kao nuspojava          | Utječe na plodnost riba, gmazova i vodenih beskralježnjaka            |
| Citotoksici                     | Željeni učinak - antikancerogen             | Reproduktivni toksikanti i citotoksični za ribe i ostale vodene vrste |

## 2.2.2. Metode obrade otpadnih voda te njihova učinkovitost pri uklanjanju farmaceutika

Kada se voda koristi za ljudsku uporabu, onečišćena je različitim spojevima. Kako bi se prevladala ograničena dostupnost vode, pročišćavanje onečišćene vode za njenu eventualnu ponovnu upotrebu predstavlja jedinstveno rješenje. [32]

Povećana upotreba farmaceutika i njihovo kontinuirano ispuštanje u okoliš može ugroziti ponovnu upotrebu pročišćene otpadne vode. Uklanjanje farmaceutskih aktivnih spojeva (PhAC) tijekom procesa pročišćavanja otpadnih voda postala je glavna briga u istraživanju vode tijekom prošlog desetljeća. Učinkovitost uklanjanja farmaceutika u postrojenjima za obradu otpadnih voda može biti jako niska, a ovisi o specifičnim svojstvima uklanjanih komponenti, te o čimbenicima vezanim za samo postrojenje obrade otpadnih voda kao što su tip provođenog procesa, starost mulja itd. [33, 34]

Istraživanja provedena na ukupno 32 farmaceutika pokazala su da njihova učinkovitost uklanjanja prilikom prolaska kroz jedinicu za obradu otpadnih voda iznosi od 7 do 96 %. Velike razlike u učinkovitosti uklanjanja mogu se objasniti time što mnoge jedinice za obradu otpadnih voda nisu dizajnirane za uklanjanje spojeva poput farmaceutika. [35]

Biološka obrada predstavlja najčešću i ekonomski najisplativiju metodu za obradu otpadnih voda. Međutim, biološke metode su se pokazale nedovoljno učinkovitima za uklanjanje svih potencijalno opasnih sastojaka iz otpadnih voda. U posljednje vrijeme, za obradu otpadnih voda onečišćenih farmaceuticima sve se više koriste metode poput MBR (membranski bioreaktori) tehnologija, ozonizacije i naprednih oksidacijskih procesa (– engl. *Advanced Oxidation Processes*, AOPs) koje su pokazale različite stupnjeve učinkovitosti.

Kako bi se otpadna voda što bolje obradila, potrebna je integracija i kombinacija tehnologija budući da se jedino na taj način u budućnosti može osigurati učinkovita, iako skuplja obrada. [36]



### 2.2.3. Pravilno zbrinjavanje farmaceutika

Izuzetno učinkovit i ekološki najprihvatljiviji način zbrinjavanja neiskorištenih farmaceutika jest putem spaljivanja. Ukoliko se otpad koji sadrži neiskorištene farmaceutike odlaže na odlagališta, postoji opasnost da će se farmaceutski aktivni spojevi naći nakon nekoliko godina u procjednim vodama odlagališta. Ukoliko na odlagalištima nije razvijen sustav prikupljanja procjednih voda, one vrlo lako mogu prodrijeti u površinske i podzemne vode te izravno ugroziti vodeni ekosustav.

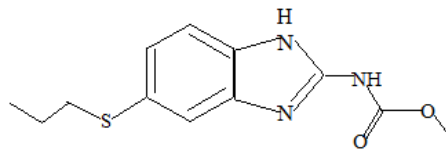
Veliki problem predstavlja otpuštanje ostataka farmaceutika i onih kojima je istekao rok trajanja putem odvoda. Takva postupanja zahtijevaju obveznu edukaciju građana o načinima pravilnog odlaganja neiskorištenih farmaceutika. Onečišćenje okoliša farmaceuticima bi se u znatnoj mjeri smanjilo kad bi se oni samo prestali bacati u odvod. Naime, u nekim zemljama su uvedeni i jako dobro funkcioniraju tzv. „*take-back*“ sistemi gdje se neiskorišteni farmaceutici mogu vratiti u ljekarne koje se potom brinu o njihovom daljnjem zbrinjavanju. [11]

Zbrinjavanje farmaceutskog otpada u Republici Hrvatskoj je regulirano Pravilnikom o gospodarenju farmaceutskim otpadom koji je donesen 8. svibnja 2015. godine. Prema tom Pravilniku, ljekarne su dužne od građana preuzimati stare lijekove i farmaceutski otpad neovisno o njegovom podrijetlu, dok su veterinarske ljekarne i ambulante dužne preuzimati stare veterinarske lijekove i sličan farmaceutski otpad koji je nastao pružanjem veterinarskih usluga u kućanstvima ili na poljoprivrednim gospodarstvima. Zbrinjavanje farmaceutskog otpada odvija se u postrojenjima koja su ovlaštena za zbrinjavanje opasnog otpada postupkom spaljivanja. [37, 38]

## 2.3. Ispitivani farmaceutici

### 2.3.1. Albendazol

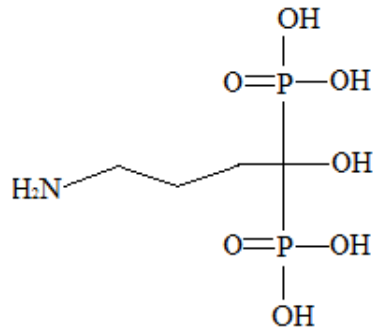
Albendazol (ABZ) je antihelmintik širokog spektra djelovanja iz grupe benzimidazola (**Slika 3.**). Primjenjuje se oralno. Koristi se za liječenje raznih crvnih infekcija uzrokovanih nematodama i trakavicama kod ljudi i životinja. Slabo je topljiv u vodi. Zbog svoje niske topivosti u vodi, slabo se i nepravilno apsorbira nakon oralnog davanja što rezultira nižom bioraspodjelivosti. [39, 40]



**Slika 3.** Molekulska struktura albendazola

### 2.3.2. Alendronat

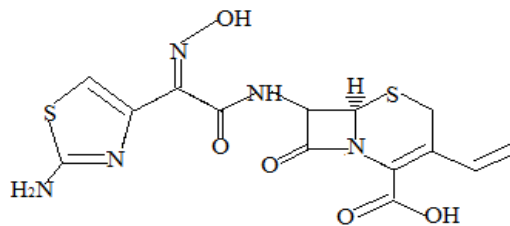
Alendronat (ALN) je bisfosfonat treće generacije koji je najviše i najduže ispitan u liječenju i prevenciji osteoporoze (**Slika 4.**). Općenito, bisfosfanati su lijekovi prvog izbora za liječenje osteoporoze i za prevenciju prijeloma. Oni povisuju mineralni koštani sadržaj (BMD) i na taj način smanjuju rizik za vertebralne, nevertebralne prijelome i za prijelome kuka. Djelotvoran je i u osteoporozi induciranoj kortikosteroidima. [41]



**Slika 4.** Molekulska struktura alendronata

### 2.3.3. Cefdinir

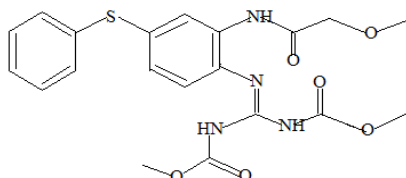
Cefdinir (CEF) je polusintetički, cefalosporinski antibiotik treće generacije (**Slika 5.**). Primjenjuje se oralno i učinkovit je protiv mnogih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Koristi se za liječenje akutnog i kroničnog bronhitisa, bakterijske upale pluća, upale srednjeg uha, faringitisa te infekcije kože i mekih tkiva. Zbog slabe topljivosti u vodi, oralna bioraspoloživost mu iznosi svega 21-25 %. [42]



**Slika 5.** Molekulska struktura cefdinira

### 2.3.4. Febantel

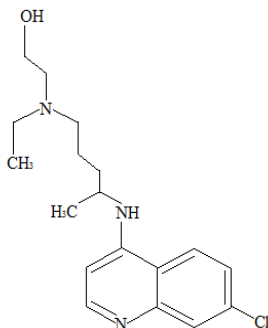
Febantel (FBT) je antihelmintik širokog spektra antiparazitskog djelovanja (**Slika 6**). Koristi se isključivo u veterinarskoj medicini gdje se kod životinja brzo apsorbira i metabolizira. Visoko je učinkovit je u liječenju probavnih parazita u goveda, ovaca i svinja. Ubrzo nakon primjene se pretvara u aktivne spojeve. [43]



**Slika 6.** Molekulska struktura febantela

### 2.3.5. Hidroksiklorokin

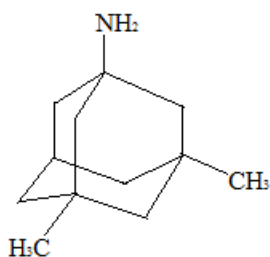
Hidroksiklorokin (HCQ) je farmaceutik koji se najviše koristi za liječenje reumatoidnog artritisa i drugih upalnih stanja kao što je sistemski eritemski lupus (**Slika 7**). Nastoji smanjiti štetu u zglobovima, a ne samo ublažiti bol tako da se ubraja u skupinu lijekova koji modificiraju tijek bolesti (engl. *Disease Modifying AntiRheumatic Drugs*, DMARDs). Također je i antimalarijski lijek koji se koristi za liječenje i prevenciju malarije i ostalih parazitskih infekcija. U nekoliko vrsta raka postiže antikancerogenu aktivnost, posebice kod raka krvi. [44, 45]



**Slika 7.** Molekulska struktura hidroksiklorokina

### 2.3.6. Memantin

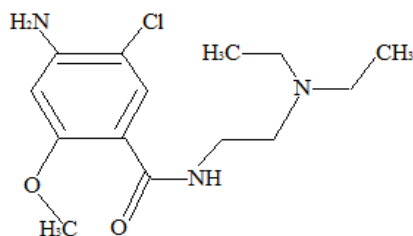
Memantin je derivat amantadina koji djeluje na glutamatergični sistem putem blokiranja NMDA glutamatnih receptora (**Slika 8.**). Klinički se dugo koristi za liječenje Parkinsonove bolesti, a u današnje vrijeme se također široko primjenjuje i za liječenje Alzheimerove bolesti. Ima veliki potencijal u liječenju neurodegenerativnih i cerebralnih poremećaja. Njegovo korištenje pozitivno utječe na učenje, pamćenje, bol i neurozaštitne učinke. [46, 47]



**Slika 8.** Molekulska struktura memantina

### 2.3.7. Metoklopramid

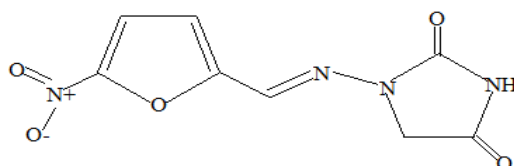
Metoklopramid je antiemetik i propulziv (**Slika 9.**). Također je i dopaminski antagonist koji inhibira dopaminske efekte u središnjem živčanom sustavu i drugim organskim sustavima. Obično se koristi za liječenje mučnine i povraćanja, za olakšanje pražnjenja želuca kod ljudi s gastroparezom i kao lijek za želučane smetnje koje su često povezane s migrenskim glavoboljama. [48, 49]



**Slika 9.** Molekulska struktura metoklopramida

### 2.3.8. Nitrofurantoin

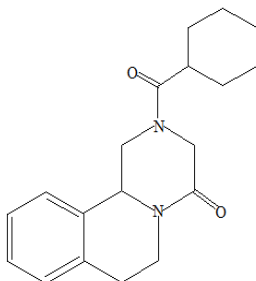
Nitrofurantoin je sintetički antibiotik koji je derivat nitrofurana (**Slika 10.**). Koristi se u ljudskoj i veterinarskoj medicini. Klinički je koristan protiv širokog spektra Gram pozitivnih (*Enterococci*) i Gram negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*). Općenito se koristi u ginekologiji za liječenje akutnih upala donjeg dijela mokraćnog sustava u trudnoći te za prevenciju upala mokraćnog sustava poslije kateterizacije ili kirurškog zahvata. [50]



**Slika 10.** Molekulska struktura nitrofurantoina

### 2.3.9. Prazikvantel

Prazikvantel (PZQ) je antihelmintik širokog spektra djelovanja protiv parazita poput metilja i trakavica (**Slika 11.**). Naširoko se koristi za liječenje parazitarne bolesti prouzročene crvima roda *Shistosoma*, shistosomijaze. Učinkovit je i protiv ehinokokoze. Dobro se metabolizira i brzo izlučuje iz organizma, uglavnom u mokraći. Prednosti su mu visoka učinkovitost, dobra sigurnost i dobar terapijski profil. [51, 52]



**Slika 11.** Molekulska struktura prazikvantela

## 2.4. Toksičnost farmaceutika u vodama

Razvojem specifičnih preventivnih mjera, zdravstvena ekologija nastoji svesti izloženost opasnim okolišnim čimbenicima na prihvatljivu razinu. U opasne okolišne čimbenike najčešće ubrajamo nusprodukte industrije ili poljoprivredne djelatnosti koji donose ekonomsku dobrobit zajednici. Nekontrolirano ispuštanje toksičnih tvari iz industrije može imati nesagledive posljedice na stanje okoliša. Primjerice, ispuštanje toksične tvari u vodeni recipient u prekomjernoj koncentraciji može dovesti do posljedica u hranidbenom lancu ekosustava recipienta. Sva djelovanja intoksikacije narušavaju normalan ustroj protoplazme i dovodeći do reverzibilnih procesa, u njoj izazivaju poremećaje s posljedicama narušavanja prirodne biološke ravnoteže. Učinci mogu imati kancerogen ili mutagen karakter, ovisno o stanju organizma i djelovanju zaštitnih fizioloških mehanizama intoksikacije. Uklanjanje takvih tvari iz okoliša je skupo, ali onečišćenje okoliša ugrožava ljudsko zdravlje i proizvodnju. [53]

### 2.4.1. Ispitivanje toksičnosti farmaceutika

Provođenje testova toksičnosti je neophodno kako bi se ocijenila onečišćenost vodenih medija, jer fizikalne i kemijske analize nisu dovoljne za definiciju svih štetnih učinaka onečišćujućih tvari na žive organizme. Naime, fizikalne i kemijske analize su ograničene i one samo ukazuju na prirodu štetnih tvari, ali ne daju nikakve informacije o biološkim utjecajima. Do danas je razvijeno mnogo metoda utvrđivanja biološke toksičnosti voda poput testova na algama, bakterijama, beskralješnjacima, biljkama i ribama.

Granične vrijednosti tolerancije pri izlaganju odabranih bioloških modela, test organizama, utjecaju različitih toksičnih tvari se eksperimentalno određuju biotestovima. Najčešći oblik ispitivanja je mortalitet. Osnovu biotesta čini praćenje utjecaja koncentracijskog gradijenta otpadne vode u kontroliranim uvjetima među kojima je koncentracija otpadne vode jedina promjenjiva veličina. Izbor bioindikatora ovisi o specifičnostima ekosustava, karakteristikama otpadne vode i recipienta, svrsi testa, ali i o laboratorijskim mogućnostima (**Tablica 2.**).

Mnogo je parametara koji utječu na varijabilnost testova ekotoksičnosti, a neki od njih su fizikalni i kemijski uvjeti ispitivanja (pH-vrijednost, provodnost, salinitet itd.), priroda ispitivanog uzorka, procedura provođenja (protokol i uvježbanost) itd.

Razlikujemo akutne i kronične testove toksičnosti. Akutnim testom se određuje preživljavanje testiranih organizama unutar 24 do 96 sati dok se kroničnim testom određuje preživljavanje organizma koji je kontaminiran ispitivanim uzorkom, ali i utjecaj tog uzorka kao npr. smetnje ponašanja, rasta, reprodukcije i slično, a traje minimalno 7 dana. [53, 54, 55]

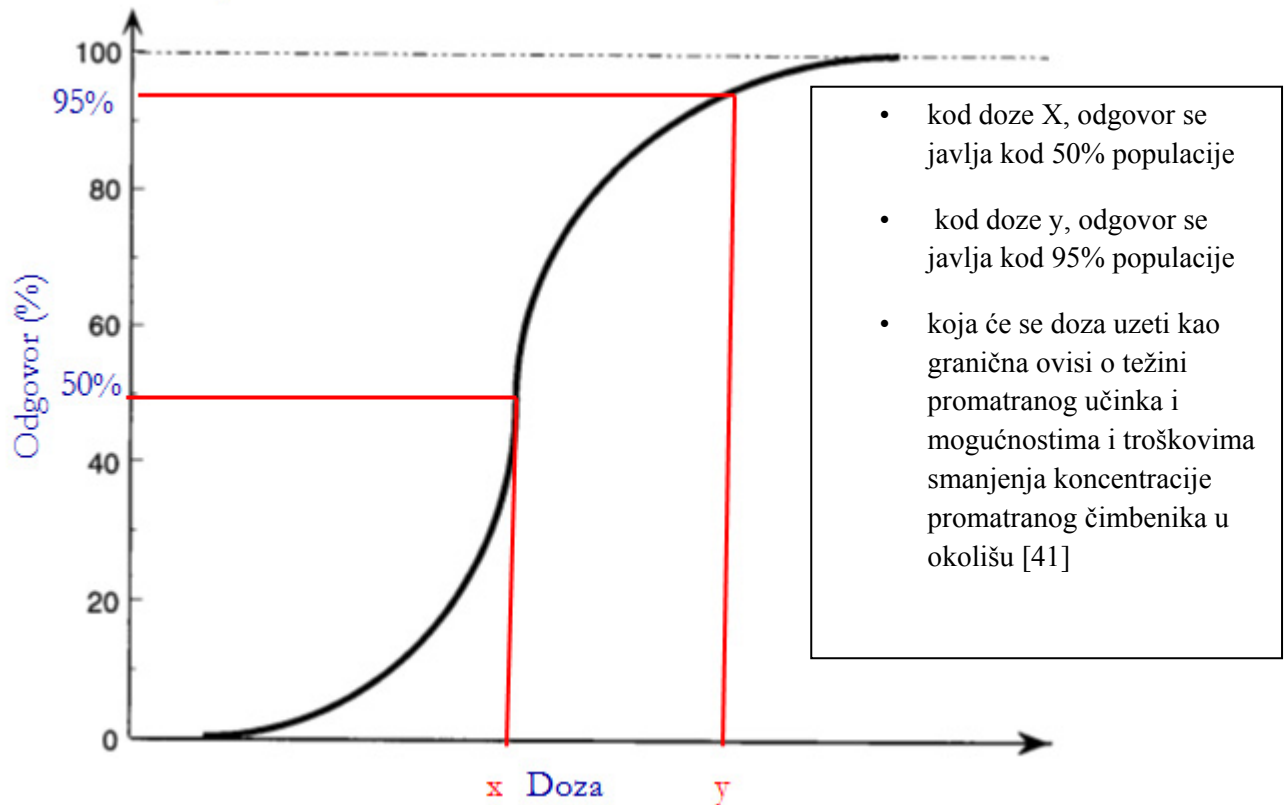
**Tablica 2.** Pregled različitih vrsta standardnih bioindikatora [53]

|    | <b>Test organizam</b>   | <b>Metoda</b>                                   | <b>Instrument</b>  | <b>Načelo</b>   |
|----|---|---|--|---|
| 1. | Daphnia magna Straus (Crustacea)  | HRN EN ISO 6431:2000<br>Test akutne toksičnosti | Oprema za uzgoj jedinki u laboratorijskim uvjetima, mikroskop i standardni laboratorijski pribor | Slatkovodni račić / inhibicija pokretljivosti - optička opservacija mortaliteta gravidnih jedinki |
| 2. | Photobacterium phosphoreum (dr. Lange LUMISTox luminous Bacteria, LCK480) | DIN 38412-L34 (ISO/DIS 11384)                   | Luminometar - Monolight 2010   | Luminiscentna bakterija / inhibicija emitiranja svjetlosti  |
| 3. | Skeletonema costatum ili Pheodactylum tricorutum                          | ISO 10253                                       | Aparat za membransku filtraciju, autoklav, pH-metar, mikroskop                                   | Morske alge / inhibicija rasta  |
| 4. | Scenedesmus subspicatus Selenastrum capricornutum                         | ISO 8692  | Aparat za membransku filtraciju, autoklav, pH-metar, mikroskop                                   | Planktonske slatkovodne alge / inhibicija rasta   |
| 5. | Saccharomyces cerevisiae ili Yeast Toxicity Test                          | <b>YTT</b> (Dvoraček, Stilinović, 1997.)        | Serum boce vol. 125 cm <sup>3</sup> , igle sa štrcaljkom, pH-metar, magnetna miješalica          | Kvaščeve gljivice / inhibicija fermentacije i smanjenje količine nastalog CO <sub>2</sub>         |



## 2.4.2. Prikaz toksičnosti – krivulja toksičnosti

Krivulja toksičnosti (Slika 12.) pokazuje međuovisnost DOZE i ODGOVORA. Najčešće (kod normalne razdiobe) ima karakteristični oblik slova S. [54]



Slika 12. Opći izgled krivulje toksičnosti

## 2.4.4. Ispitivanje akutne toksičnosti na bakterijama *Vibrio fischeri*

U posljednjih nekoliko godina razvijen je velik broj testova za određivanje akutne toksičnosti uz pomoć bioluminiscentnih test organizama kao što su bakterije *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi* i *Pseudomonas fluorescens*. Izlaganje luminescentnih bakterija toksičnim tvarima uzrokuje pad luminiscencije koji je proporcionalan s toksičnošću ispitivane tvari. Veliki je interes za provođenjem ovih testova budući da su jednostavni, daju brzi odgovor i relativno su povoljni. Također, usprkos činjenici da postoje različiti mehanizmi toksičnosti za različite organizme različitih vrsta, ona tvar koja je toksična

za neki organizam pokazuje slične toksične učinke na drugom organizmu. Dakle, inhibicija luminiscencije kod bakterija može učinkovito pokazati toksične učinke na višim organizmima. [54, 55]

Za određivanje toksičnosti u ovom radu korištena je njemačka standardna metoda po DIN-u (DIN 38412-L-34). Radi se o bioluminiscentnoj metodi koja se ubraja u testove kratkog trajanja. S obzirom na vrijeme trajanja testa od 30 minuta ima velike prednosti u odnosu na ostale „short term“ metode koje obično traju 48 ili 96 sati. Kao test organizmi se koriste bakterije *Vibrio fischeri*. To je bioluminiscentna, Gram negativna bakterija koja živi kao simbiot u bioluminiscentnim ribama i u svjetlosnim organima lignji. Danju i noću prirodno emitira svjetlost ujednačenog intenziteta kao sastavni dio svog metabolizma. Uzrok tome je enzim luciferaza. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma koje je nastalo kao posljedica djelovanja toksina. [53, 55, 57]

#### 2.4.5. Definicije povezane s toksičnošću [58]

Tijekom provođenja određene analitičke metode potrebno je definirati fizikalno-kemijske veličine koje se pritom ispituju. Prilikom određivanja toksičnosti prvo je potrebno odrediti početnu luminiscenciju bakterijske suspenzije kako bi se poslije moglo pratiti kako otopina uzorka, odnosno ispitivanog farmaceutika djeluje na korištenu bakterijsku kulturu što vidimo u vrijednostima mjerene luminiscencije. Potom se uz pomoć gotovih matematičkih izraza računa postotak inhibirane kulture nakon određenog vremena što ujedno i predstavlja os ordinatu na grafu toksičnosti otopine ispitivanog farmaceutika dok se na apscisi nalazi logaritam koncentracije otopine farmaceutika.

Kasnije se iz grafa očitaju vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  koje uzrokuju inhibiciju 20 %, odnosno 50 % bakterijske kulture što nam omogućava lakšu interpretaciju rezultata i definiranje utjecaja uzorka na ispitivanu bakterijsku kulturu.

Prikaz određivanih fizikalno-kemijskih veličina:

$l_0$  – luminiscencija bakterija u suspenziji prije nego je dodan uzorak (početna luminiscencija)

$l_t$  – luminiscencija testirane otopine nakon inkubacije u vremenu  $t$  (konačna luminiscencija nakon dodavanja uzorka)

$l_0K/l_tK$  – početna i konačna luminiscencija kontrolne otopine (2% NaCl)

$fK$  – faktor korekcije

$$fK = l_tK/l_0K \quad (1)$$

$l_c$  – ispravljeni  $fK$

$$l_c = fK \times l_0 \quad (2)$$

% inhib.t. – postotak inhibicije luminiscencije nakon inkubacije u vremenu  $t$

$$\% \text{ inhib.t.} = (l_c - l_t) \times 100/l_c \quad (3)$$

GL vrijednost – faktor razrjeđenja kojim je postignut % inhib.t. < 20

EC<sub>20</sub> – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 20 % inhibicije

EC<sub>50</sub> – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50% inhibicije

#### 2.4.6. Zona inhibicije [59]

Zona inhibicije podrazumijeva ispitivanje aktivnosti mikrobicidnih sredstava. Ovisno o vrsti mikrobicidnog sredstva, pažljivo se odabire mikroorganizam za provedbu odgovarajućih ispitivanja. Jedna od metoda ispitivanja je metoda difuzije, pri čemu se aktivna tvar nanosi u cilindar, na disk ili na pločicu. Kod ove metode određena količina aktivne tvari je pohranjena na maloj površini agar ploče koja je inokulirana ispitivanim mikroorganizmom, uz vrijeme inkubacije 16-18 sati. Nastala zona inhibicije je povezana s logaritmom koncentracije mikrobicidnog sredstva. Teoriju nastajanja zone inhibicije razvio je Cooper i prikazao je jednadžbom:

$$X_2 = 4 \times D \times T_0 \times \ln(m_0/m') \quad (4)$$

$D$  - koeficijent difuzije aktivne tvari u vodi pri temperaturi inkubacije

$T_0$  - vrijeme potrebno za stvaranje zone inhibicije

$m_0$  - početna koncentracija na disku

$m'$  - kritična koncentracija aktivne tvari

$X$  - dužina difuzije

Kritično vrijeme  $T_0$ , kritična koncentracija aktivne tvari  $m'$  i kritična koncentracija mikroorganizama značajni su za teoriju nastajanja zone difuzije. Shodno tome slijedi opća jednadžba koja objašnjava utjecaj temperature, sastava podloge i koncentraciju inokuluma na veličinu zone:

$$X_2 = (9,2 \times D \times \log(m_0/m')) \times (L + 3,32 \times G \times \log(N'/N_0)) \quad (5)$$

$G$  - generacijsko doba

$L$  - vrijeme laganog rasta

$N_0$  - početna koncentracija mikroorganizama

$N'$  - kritična koncentracija mikroorganizama

## 2.4. Procjena rizika za okoliš

Prema definiciji, procjena rizika za okoliš podrazumijeva analizu i interpretaciju podataka u cilju predviđanja potencijalne opasnosti/štetnih učinaka. Integrirano upravljanje okolišem (engl. *Integrated Environmental Management*, IEM) jest sveobuhvatan proces planiranja i gospodarenja prirodnim resursima koji uključuje okolišne, društvene i ekonomske ciljeve. Uzima u obzir međusobnu zavisnost i utjecaje između različitih sastavnica okoliša i elemenata ekosustava. Osnovne karakteristike se ostvaruju primjenom raznih alata, navedenih na **Slici 13.**, a jedan od njih jest i procjena rizika, gdje spada i određivanje ekotoksičnosti.

Internacionalna organizacija koja se bavi biomonitoringom onečišćenja jest Europska agencija za okoliš (engl. *European Environmental Agency*, EEA) koja pruža neovisne informacije o okolišu za one koji su uključeni u razvoj, usvajanje, provedbu i ocjenu politike zaštite okoliša, ali i široj javnosti. EEA prikuplja podatke i proizvodi procjene o širokom rasponu tema vezanih uz okoliš.[60]



**Slika 13.** Alati integriranog upravljanja okolišem (IEM) [61]

Farmaceutici su u okolišu prisutni u vrlo niskim koncentracijama, važna je primjena osjetljivih analitičkih metoda detekcije i kvantifikacije. U okolišu mogu biti podložni raznim procesima kao što su: hidroliza, fotorazgradni i biorazgradni procesi. Na taj način su u okolišu prisutni i metaboliti te razgradni produkti, koji u nekim slučajevima mogu pokazati veću toksičnost od polazne komponente. [62]

Svaki zahtjev za odobrenje novog lijeka treba sadržavati ocjenu potencijalnog rizika za okoliš (ERA) i u slučaju potrebe nužno je poduzeti mjere za smanjenje negativnog utjecaja na okoliš, Kako je literaturno navedeno, ocjena rizika koji lijek može imati za okoliš je proces koji se sastoji od dvije faze. U prvoj fazi ispitivanja se temelje isključivo na djelatnoj tvari, neovisno o načinu primjene, farmaceutskom obliku, metabolizmu lijeka i njegovom izlučivanju.

Ocjenjuje se izloženost okoliša lijeku, izračunava se predviđena koncentracija lijeka u vodenom okolišu (engl. *Predicted Environmental Concentration*, PEC). Ako je vrijednost PEC u površinskim vodama ispod 0,01 µg/L i nema drugih naznaka opasnosti za okoliš, pretpostavka je da lijek ne predstavlja rizik za okoliš nakon propisane primjene i nisu potrebna dodatna ispitivanja. Ako je vrijednost veća, potrebna je provedba druge faze koja podrazumijeva analize postojanosti lijeka u okolišu i njegovog utjecaja na okoliš. Određuje se odnos PEC/PNEC (engl. *Predicted-no-effect-Concentration*, PNEC). Eksperimentalne studije trebaju slijediti protokole koje su propisale Europska komisija (engl. *Organization for Economic Co-operation and Development*, OECD) ili Međunarodna organizacija za normizaciju (engl. *International Organization for Standardization*, ISO). Kod ocjene rizika za okoliš skupljaju se i obrađuju svi dostupni podaci o fizikalno-kemijskim osobinama, primarnoj i sekundarnoj farmakodinamici, toksikologiji, metabolizmu, izlučivanju, razgradnji i postojanosti djelatne tvari i/ili određenog metabolita te razgradnog produkta. Neovisno o rezultatima ispitivanja potencijalnog rizika ne postoje kriteriji kojima bi se uskratilo davanje odobrenja zastavljanje lijeka u promet.

Svrha dobro provedene procjene rizika na okoliš je utvrditi štetan utjecaj na okoliš, definirati mjere koje je potrebno poduzeti pri pohrani i zbrinjavanju lijeka te podatke o lijeku upotpuniti potrebnim podacima o zbrinjavanju neupotrebljenog lijeka. [8]

## 2.5. Osvrt na zakonodavstvo

Europska komisija je u kolovozu 2013. godine usvojila novu Direktivu 2013/39/EU o prioritetnim tvarima koja dopunjava i mijenja Okvirnu direktivu o vodama (ODV) 2000/60/EZ i Direktivu 2008/105/EZ. Strategija sprječavanja onečišćenja uključuje listu od 45 prioritetnih tvari koje predstavljaju rizik za vodni okoliš. Neke tvari su zbog karakteristika poput postojanosti u okolišu, bioakumulativnosti i toksičnosti dodatno označene kao prioritetne opasne tvari. ODV propisuje reviziju liste prioritetnih tvari svake četiri godine. Novom Direktivom bi se emisije u vodeni okoliš prioritetno opasnih tvari trebale obustaviti unutar sljedećih 20 godina. Također, uvodi se i tzv. „*watch lista*“, odnosno popis od 10 novih, do sada neidentificiranih opasnih i onečišćujućih tvari koje bi, ukoliko su prisutne, mogle štetno djelovati na vodni okoliš i ljudsko zdravlje.

Rastući problem okoliša i utjecaja na ljudsko zdravlje predstavlja onečišćenje vode i tla ostacima i razgradnim produktima farmaceutskih pojeva. Na „*watch listi*“ su se našla i tri farmaceutska spoja: 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), 17  $\beta$ -estradiol (E2) i diklofenak. Europska komisija će do rujna 2017. godine trebati odrediti mjere koje će se poduzimati na razini Unije ili države članice, a kojima će se smanjivati ispuštanje i gubitci ovih tvari u vodni okoliš. [64]

Također, na razini Europske unije, utjecaj farmaceutika na okoliš se prvi put spominje u Direktivi iz 1993. godine (Direktiva 93/39/EEC), a u kasnijim Direktivama se toj temi daje više prostora. U Direktivama se navode rizici za okoliš koji proizlaze iz primjene, skladištenja i odlaganja lijekova, a ne iz sinteze ili proizvodnje lijekova.

Zahtjev za odobrenje novih lijekova za ljudsku primjenu mora sadržavati ocjenu rizika koju taj farmaceutik može imati za okoliš (engl. *Environmental Risk Assessment*, ERA). Ocjena rizika koju farmaceutik može imati za okoliš je proces koji se sastoji od dvije faze. U fazi I se ispitivanja temelje isključivo na djelatnoj tvari, neovisno o načinu primjene, farmaceutskom obliku, njegovom izlučivanju ili metabolizmu lijeka. Ukoliko se u fazi I utvrdi da farmaceutik predstavlja rizik za okoliš, provodi se faza II u kojoj se rade analize postojanosti lijeka u okolišu i njegovog utjecaja na okoliš.

U Republici Hrvatskoj je potreba ocjene rizika za okoliš tijekom davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet regulirana Zakonom o lijekovima i Pravilnikom o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet. Propisuje se i da u Sažetku opisa svojstva lijeka i na vanjskom pakiranju gotovog lijeka moraju biti navedene posebne mjere za uklanjanje neupotrijebljenog farmaceutika ili ostataka farmaceutika, a kada je potrebno, s uputom o prikladnom sustavu prikupljanja koji se primjenjuje. [63]

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

U **Tablici 3.** Navedene su kemikalije koje su korištene prilikom provođenja analiza u svrhu određivanja toksičnosti farmaceutika.

**Tablica 3.** Kemikalije koje su korištene za određivanje toksičnosti

| KEMIKALIJE                   | MOLEKULSKA FORMULA  | ČISTOĆA      | PROIZVOĐAČ                         |
|------------------------------|---|--------------|------------------------------------|
| Acetonitril                  | CH <sub>3</sub> CN  | HPLC čistoća | Fischer Chemical, Velika Britanija |
| Agar                         | C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>                    | p.a.         | Liofilchem, Italija                |
| Amonijev-željezo (II) sulfat | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | p.a.         | Sigma-Aldrich, SAD                 |
| Cink sulfat heptahidrat      | ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                             | p.a.         | Lach-ner, Češka                    |
| D(+)-rafinoza pentahidrat    | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>                   | 99%          | Alfa Aesar, Njemačka               |
| D-glukoza                    | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                     | p.a.         | Lach-ner, Češka                    |
| Etanol                       | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH                                  | 96 %         | Gram-mol d.o.o., Hrvatska          |
| Feroin indikator             | C <sub>36</sub> H <sub>24</sub> FeN <sub>6</sub> <sup>2+</sup>    | p.a.         | Sigma-Aldrich, SAD                 |
| Glicerol                     | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                      | p.a.         | Lach-ner, Češka                    |
| Kalcij karbonat              | CaCO <sub>3</sub>   | p.a.         | Kemika, Hrvatska                   |
| Kalcij klorid                | CaCl <sub>2</sub>   | p.a.         | Kemika, Hrvatska                   |
| Kalij dihidrogen fosfat      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                   | p.a.         | Kemika, Hrvatska                   |
| Kalijev bikromat             | K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>                     | p.a.         | Merck, Njemačka                    |
| Kvašćev ekstrakt             | C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>                    | p.a.         | Biolife, Italija                   |
| Magnezij sulfat              | MgSO <sub>4</sub>   | p.a.         | T.T.T., Hrvatska                   |
| Metanol                      | CH <sub>3</sub> OH  | HPLC čistoća | J.T. Baker, Nizozemska             |
| Natrijev klorid              | NaCl  | p.a.         | Lach-ner, Češka                    |
| Pepton                       | -   | p.a.         | Biolife, Italija                   |
| Srebrov sulfat               | Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                   | p.a.         | Kemika d.d., Hrvatska              |
| Sulfatna kiselina            | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                    | p.a.         | Kemika d.d., Hrvatska              |
| Živin (II) sulfat            | Hg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                   | p.a.         | Sigma-Aldrich, SAD                 |

#### 3.1.2. Hranjive podloge

##### 3.1.2.1. Podloga za uzgoj bakterija *Vibrio fischeri*

Sve sastojke (**Tablica 4.**) otopiti u hladnoj deioniziranoj vodi u Erlenmeyer tikvici. Ostaviti 15 minuta da agar nabubri i potom zagrijati do vrenja. Budući da većina kalcij karbonata ostaje neotopljena, zagrijavanje treba izvoditi u vodenoj kupelji. Kada se sastojci u



potpunosti otope zagrijavati suspenziju do vrenja direktno na azbestnoj mrežici nad plamenikom. Čim dođe do vrenja treba odmah maknuti suspenziju s mrežice. Sterilizirati u autoklavu na 121°C 15 minuta.

Sterilnu podlogu ohlađenu na 45°C izliti u Petrijeve zdjelice (ili se može neizlivena čuvati u hladnjaku na 4°C). Prije izlivanja podlogu lagano homogenizirati kako bi se kalcij karbonat koji je na dnu ravnomjerno rasporedio u podlozi (ako se jako miješa podloga se može zapjeniti). Podlogu koja se naknadno otapa najbolje je otapati u vodenoj kupelji (tikvicu staviti u posudu s vodom na plamenik i povremeno protresti). [58]

**Tablica 4.** Sastav hranjive podloge

| Sastojci          | u 1000 mL |
|-------------------|-----------|
| NaCl              | 30 g      |
| Agar              | 15 g      |
| Glicerol          | 10 g      |
| CaCO <sub>3</sub> | 5 g       |
| Pepton            | 5 g       |
| Kvašćev ekstrakt  | 3 g       |

Za uzgoj bakterija i plijesni tijekom mikrobioloških ispitivanja toksičnosti metodom mjerenja zone inhibicije upotrijebljene su dehidrirane hranjive podloge proizvođača "Biolife", Milano, Italija i pripravljene su po uputstvu proizvođača. Prethodno izvagane i otopljene podloge sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C i 1 atmosferi pretlaka u trajanju od 15 minuta.

### 3.1.2.2. Podloga za uzgoj bakterija *Streptomyces rimosus* i *Bacillus* sp. – bujon agar

U Erlenmeyerovoj tikvici u destiliranoj vodi suspendirano je 23,3 g bujona dopunjeno do 1000 mL (**Tablica 5.**). Podloga se zatim pažljivo zagrijavala do vrenja dok se nije potpuno otopila i sterilizirana je u autoklavu 15 min pri 121 °C.[65]

**Tablica 5.** Sastav hranjive podloge

| Sastojci                       | u 1000 mL |
|--------------------------------|-----------|
| Pepton-1 „Torlak“              | 15,0 g    |
| Mesni ekstrakt „Torlak“        | 3,0 g     |
| NaCl                           | 5,0 g     |
| K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 0,3 g     |

### 3.1.2.3. Podloga za uzgoj plijesni *Aspergillus niger* – malt agar (kruti)

U hladnoj destiliranoj vodi suspendirano je 47,0 g malt agara u prahu dopunjeno do 1000 mL i ostavljeno stajati 15 min. Potom je zagrijavano do vrenja i sterilizirano u autoklavu 15 min pri 121 °C.[65]

**Tablica 6.** Sastav hranjive podloge

| Sastojci      | u 1000 mL |
|---------------|-----------|
| Malt ekstrakt | 30,0 g    |
| Agar Bios LL  | 17,0 g    |

### 3.1.3. Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture. U destiliranoj vodi se otope sastojci (**Tablica 7.**). Otopina se prokuha, ohladi i profiltrira. Sterilizira se u autoklavu. Tako pripremljena se čuva u hladnjaku do 4°C do 2 tjedna ili do pojave zamućenja, a može se i smrznuti u manjim bočicama (100mL) i duže očuvati. [58]

**Tablica 7.** Sastav otopine za resuspenziju

| Sastojci | u 1000mL |
|----------|----------|
| NaCl     | 36 g     |
| KHPO     | 0,2 g    |
| CaCl     | 0,5 g    |
| MgSO     | 0,2 g    |
| Glicerol | 0,5 mL   |

### 3.1.4. Djelatni mikroorganizmi

#### 3.1.4.1. Bakterije *Vibrio fischeri*

Bakterijsku suspenziju pripremamo sterilnom tehnikom rada. Pripremi se sav potreban pribor. Prema propisu, u kivetu koja je netom izvađena iz dubokog smrzavanja pipetira se netom izvađena otopina za resuspenziju (na temperaturi najviše do 8°C) te se pripravljena suspenzija dobro homogenizira na stolnoj mućkalici i stavi na 15 minuta na termostat koji je prethodno namješten na radnu temperaturu od 15°C. Nakon 15 minuta odmah se kreće sa radom i mjerenjem da kultura predugo ne stoji jer s vremenom gubi sposobnost luminiscencije i postaje nestabilna za rad.

Budući da takve test kivete volumno ne zadovoljavaju naše metode analize, pripravljena suspenzija se koristi za uzgoj svježije bakterijske kulture.

Sterilnom tehnikom rada se pažljivo sadržaj kivete izlije na svježju, sterilnu čvrstu hranjivu podlogu na Petrijevoj zdjelici. Također se može i sterilnom mikrobiološkom ezom uzeti malo suspenzije i *cik-cak* potezima nacijepiti na podlogu.

Kultura se održava u Petrijevim zdjelicama na temperaturi od 15 °C do 22°C uz temperaturni optimum od 18°C. Petrijeva posuda se postavi poklopcem prema dolje kako bi se spriječilo kapanje vode na bakterije zbog kondenzacije. Pri navedenim uvjetima, kultura je upotrebljiva najmanje dva, a najviše devet dana od precjepeljivanja. Optimalna luminiscencija i stabilnost bakterijske suspenzije opaža se od drugog do četvrtog dana.

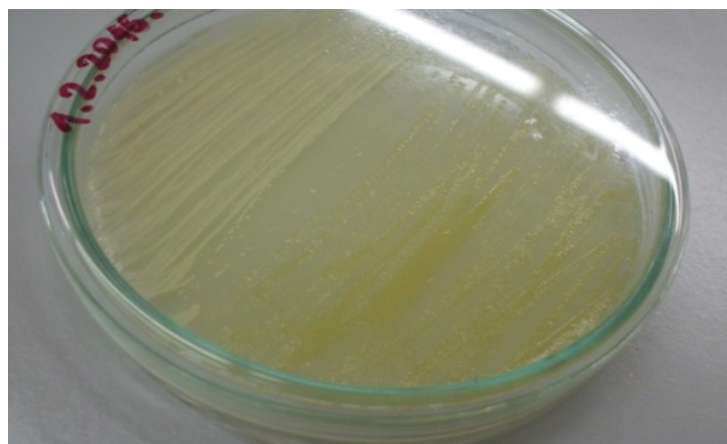
pH–Vrijednost otopine za resuspenziju, radne otopine i otopine referentnih tvari mora iznositi između 6,8 i 7,2.

Otopina standarda za provjeru valjanosti bakterijske suspenzije priprema se kao otopina masene koncentracije 25 mg/L odvagom soli  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  koja se otopi u 100 mL redeionizirane vode.

Radna otopina za resuspenziju bakterija *Vibrio fischeri* (2 % NaCl) priprema se tako da se odvaže 20 g NaCl koji se otopi u 1000 mL deionizirane vode te se sterilizira u autoklavu, a koristi se i za pripremu niza razrjeđenja.

Sterilnom tehnikom rada, što podrazumijeva upaljeni plamenik s oksidirajućim plamenom te radna površina očišćena etanolom, se sterilnom mikrobiološkom ezom pokupi malo kulture izrasle na hranjivoj podlozi (**Slika 14.**), stavi se u 5 mL sterilne otopine za resuspenzije u kivetu, dobro se homogenizira te se stavi na termostat na 15 minuta na temperaturu od 15 °C. Pripremljena suspenzija mora biti gusta (zamućena).

Kivete za provjeru toksičnosti moraju biti u termostatiranom bloku na 15 °C barem 15 minuta prije početka izvođenja testa. Termostatirani blok postiže temperaturu od 15 °C za otprilike 10 minuta. pH-vrijednost uzorka mora biti između 6 i 8,5 (podesiti s 0,1 M NaOH ili 0,1 M HCl). [65]



**Slika 14.** Hranjiva podloga sa vidljivim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (žute kolonije, kultura nakon 48 h inkubacije)

### 3.1.4.2. Mikroorganizmi korišteni za određivanje toksičnosti zonom inhibicije

Za određivanje toksičnosti farmaceutika metodom mjerenja zone inhibicije korištene su čiste kulture bakterija i plijesni iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Odabrane su bakterije i plijesni koje mogu biti prisutne u okolišu[64]:

*Streptomyces rimosus* R7 - za uzgoj zrakaste bakterije koristio se hranjivi bujon uz inkubaciju 2-5 dana pri 28 °C.

*Bacillus* sp. 3045 - za uzgoj štapičaste bakterije koristio se hranjivi bujon uz inkubaciju od 48 sati pri 37 °C.

*Aspergillus niger* 405 - za uzgoj plijesni koristio se hranjivi malt uz dodatak oksitetraciklina (OTC) kao antibiotika radi sprječavanja bakterijske infekcije uz inkubaciju od 2-5 dana pri 28 °C.

### 3.1.5. Farmaceutici

U **Tablici 8.** navedeni su osnovni podaci o farmaceuticima koji su korišteni u radu.

**Tablica 8.** Podatci o korištenim farmaceuticima

| Farmaceutik             | Molekulska formula      | CAS broj   | $M_w$ , g/mol | Čistoća     | Proizvođač      |
|-------------------------|-------------------------|------------|---------------|-------------|-----------------|
| <b>Albendazol</b>       | $C_{12}H_{15}N_3O_2S$   | 54965-21-8 | 265,33        | 99 %        | Veterina d.o.o. |
| <b>Alendronat</b>       | $C_4H_{13}NO_7P_2$      | 66376-36-1 | 249,096       | $\geq 97$ % | Sigma Aldrich   |
| <b>Cefdinir</b>         | $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$ | 91832-40-5 | 395,41        | $\geq 95$ % | Sigma Aldrich   |
| <b>Febantel</b>         | $C_{20}H_{22}N_4O_6S$   | 58306-30-2 | 446,48        | $\geq 99$ % | Veterina d.o.o. |
| <b>Hidroksiklorokin</b> | $C_{18}H_{26}ClN_3O$    | 118-42-3   | 335,872       | $\geq 95$ % | Sigma Aldrich   |
| <b>Memantin</b>         | $C_{12}H_{21}N$         | 19982-08-2 | 179,302       | 99,4 %      | Sigma Aldrich   |
| <b>Metoklopramid</b>    | $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$  | 364-62-5   | 299,800       | $> 99,9$ %  | Sigma Aldrich   |
| <b>Nitrofurantoin</b>   | $C_8H_6N_4O_5$          | 67-20-9    | 238,16        | 98 %        | Acros Organics  |
| <b>Prazikvantel</b>     | $C_{19}H_{24}N_2O_2$    | 55268-74-1 | 312,41        | $\geq 99$ % | Veterina d.o.o. |

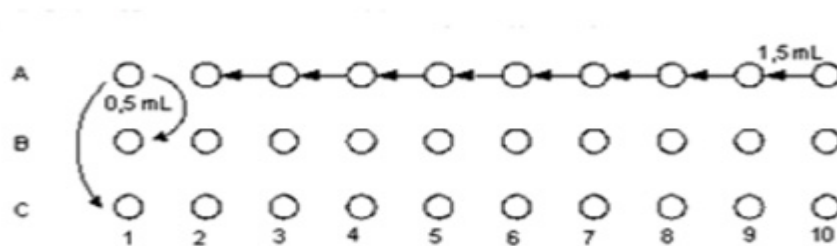
#### 3.1.5.1. Otopine farmaceutika

Temeljna standardna otopina (TSO) farmaceutika masene koncentracije 200 mg/L priprema se otapanjem točno poznate mase svakog farmaceutika u otapalu metanolu HPLC čistoće u odmjernim tikvicama od 10 mL. Razrjeđenja, tj. radne otopine (RO) od 100 ppm pripremaju se u redeioniziranoj MiliQ vodi.

## Priprema geometrijskog niza razrjeđenja

U prvu kivetu se stavi 2/3 kivete 2 % NaCl, a u zadnju 2/3 uzorka razrijeđenog onoliko puta koliko se utvrdi preliminarnim ispitivanjima (najveća koncentracija). U sve ostale kivete stavi se po 1,5 mL 2 % NaCl. U **A** nizu napravi se niz željenih razrjeđenja počevši od najmanjeg do najvećeg, tako da se po 1,5 mL dobro homogeniziranog uzorka prebacuje iz kivete u kivetu (iz smjera kivete broj 10 prema 1). U sve ostale kivete **B** i **C** niza stavi se po 0,5 mL inokuluma (**Slika 15.**).

Nakon što se očita prva kiveta **B1** vraća se na termo blok, na luminometar se stavlja iduća po redu **C1**, a istovremeno se iz kivete **A1** u kivetu **B1** pipetira po 0,5 mL otopine. **C1** se vraća na termo blok, **B2** se stavlja na luminometar, a iz **A1** se također pipetira 0,5 mL otopine u kivetu **C1**. I tako sve do kraja mjerenja. [65]



**Slika 15.** Geometrijski niz

## 3.2. Instrumenti i uređaji

### 3.2.1. Analitička vaga

U radu je korištena analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska, sa mogućnošću vaganja na pet decimala, SmartGrid, a prikazana na **Slici 16.**



**Slika 16.** Analitička vaga

### 3.2.2. Ultrazvučna kupelj

Nakon pripreme standardnih otopina farmaceutika u odmjernim tikvicama, svaka tikvica se uronila u ultrazvučnu kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka (**Slika17.**), kako bi se poboljšao proces otapanja farmaceutika albendazola u smjesi otapala. Ultrazvučna kupelj je programibilna, tj. omogućuje podešavanje temperature kupelji i snage ultrazvuka te pohranjivanja do 10 programa s različitim postavkama eksperimentalnih uvjeta. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 80 °C, vrijeme od 1 do 99 minuta, a maksimalna snaga 1200 W. [58]

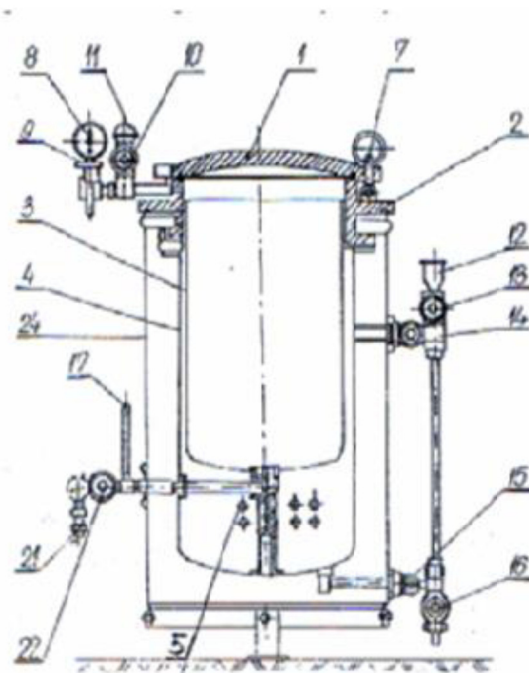




**Slika 17.** Ultrazvučna kupelj

### 3.2.3. Autoklav

Autoklav je uređaj za provedbu sterilizacije zasićenom vodenom parom pod pritiskom (**Slika 18.**). Građen je od vrlo čvrstog materijala, najčešće u vidu cilindra. Ima dvostruke stjenke i poklopac koji se pomoću podesivih vijaka i gumenog obruča hermetički zatvara. Uložak s termometrom, manometar i sigurnosni ventil najčešće su postavljeni bočno, obično u gornjem dijelu. Postranično se nalazi i staklena cijev za kontrolu nivoa vode u autoklavu. U donjem dijelu nalazi se ventil za ispuštanje pare. U dnu je postavljen izvor topline (plinski ili električni grijač). Sterilizacija zasićenom vodenom parom pod pritiskom najčešće se provodi pri pritisku od 1 atmosfere pretlaka i 121 °C tijekom 15 do 30 min i smatra se najpouzdanijom metodom sterilizacije jer povećani pritisak povećava temperaturu, a time i prodor vodene pare u materijal koji se sterilizira. [66]



Slika 1. Autoklav: 1-poklopac, 2-prsten, 3-unutrašnja stjenka, 4--vanjska stjenka, 5-električni grijачi, 7-metalni zavrtnaj, 8-manometar, 9-sigurnosni ventil, 10-ventilacijski ventil, 11-ventilacijska šalica, 12-ljevak za punjenje, 13-, 14-, 15- i 16-ventili sustava za punjenje, 17-termometar, 21-odvod, 22-ventil za ispuštanje, 24-plašt autoklava

Slika18. Shematski prikaz autoklava

### 3.2.4. Luminometar

Toksičnost je određivana na mjernom instrumentu LUMISTox 300 s bakterijama koje imaju sposobnost luminiscencije (Slika 19.).

LUMISTox 300 objedinjuje računalnu tehnologiju s tehnologijom mjernih instrumenata (u ovom slučaju luminometrom). Baš kao i računala, LUMISTox 300 ima vlastiti operativni sustav sa ugrađenom disketom na kojoj su pohranjeni svi podaci i programi potrebni za rad.

LUMISTox 300 ima ugrađen fotometar i ustaljeni rad automatskog mjerenja i razvijanja podataka čime je omogućeno prepoznavanje boje uzorka u testu s luminiscirajućim bakterijama. Radna temperatura instrumenta je 15 °C (±1 °C).



**Slika 19.** Uređaj za provedbu toksičnosti (LUMISTox 300)

SCRN funkcija: Test valjanosti bakterijske kulture izvodi se svaki put prije postavljanja testa. U referentnu kivetu se stavi 0,5 mL otopine 2 % NaCl i 0,5 mL inokuluma (suspenzije). U test kivetu se stavi 0,5 mL otopine  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  i 0,5 mL inokuluma.

Ostavi se na termostatom bloku 15 minuta te se na LUMISTox-u pokrene SCRN program. Očita se vrijednost. Sadržaj test kivete u odnosu na sadržaj referentne kivete mora imati između 20 % i 80 % luminiscencije.

Na glavnom izborniku LUMISTox uređaja odabere se program LU za mjerenje relativne luminiscencije, te se na taj način provjeri aktivnost bakterijske kulture. Luminiscencija mora biti najmanje 1 000, a najviše do 10 000 da se može započeti test.

Na luminometru se odabere funkcija EC, podese se uvjeti rada i započne se sa mjerenjem. Rezultati se očitavaju i odmah zapisuju.

Za pripravu razrjeđenja te natapanje diskova otopinama koristila se automatska mikropipeta proizvođača Eppendorf (**Slika 20**). Značajke mikropipete su rad na dva zgloba, kemijska otpornost, 4-znamenasti prikaz, automatski donji dio, volumen 10-1000  $\mu\text{L}$ .



**Slika 20.** Automatska mikropipeta Eppendorf

### **3.3. Metodika određivanja toksičnosti bakterijama *Vibrio fischeri***

Postupak provedbe određivanja toksičnosti metodom s *Vibrio fischeri* prikazana je na **Slici 21**. Do problema je ponekad dolazilo u uzgajanju kultura bakterija *Vibrio fischeri* koje su vrlo osjetljive na okolišne uvjete. Ključno je prije samih analiza podesiti pH svih otopina za rad (optimalno 6,8-7,2), te termostatirati ih na 15 °C. Provedba eksperimentalnog dijela rada je uključivala reaktiviranje liofiliziranih bakterija, njihovo precjepljivanje na hranjivu podlogu i inkubaciju na 18-22 °C, 24-48 h.

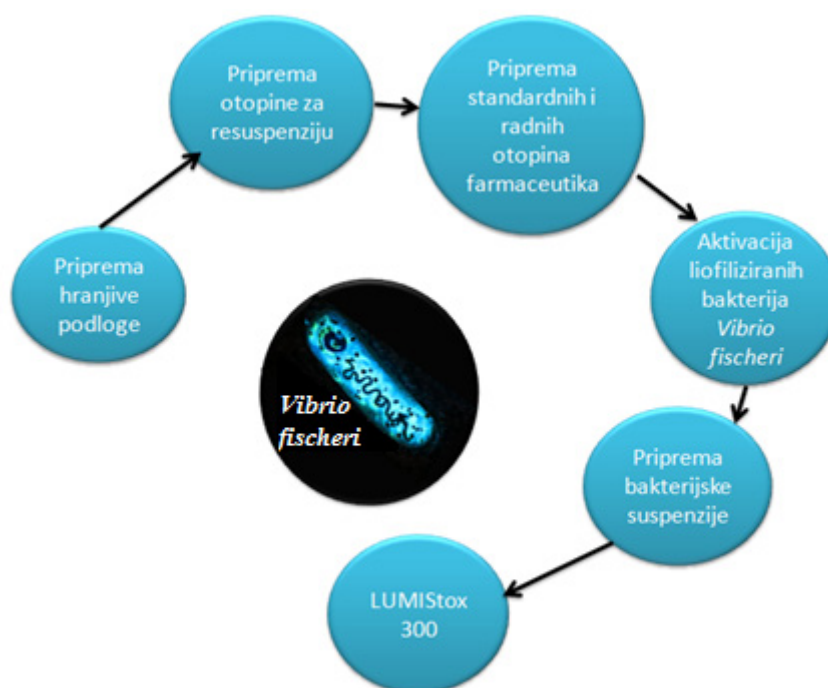
U radu je najprije mjerena luminiscencija bakterijskih suspenzija bez čistih aktivnih supstanci farmaceutika, a potom su se sljedeći pravilo geometrijskog niza dodavale otopine farmaceutika različitih koncentracija, počevši od najmanje do najveće (Navedeno u dijelu: **3.1.5.1. Otopine farmaceutika**).

Nakon 30 min očitavani su rezultati testa provedenog na uređaju LUMISTox 300 i na temelju rezultata crtani su grafovi toksičnosti za otopine pojedinačnih farmaceutika.

Kako se temeljnu standardnu otopinu farmaceutika priprema otapanjem točno poznate odvage farmaceutika u metanolu u čemu su ispitivani farmaceutici najbolje topljivi, prije početka ispitivanja otopina farmaceutika, bilo je provedeno mjerenje toksičnosti samog otapala metanola iste količine koja je prisutna i kod standardnih otopina. To se provelo u cilju isključivanja potencijalnog utjecaja otapala na proces provedbe toksičnosti testa izlažući bakterijsku suspenziju različitim koncentracijama otapala.

Sva ispitivanja na pojedinim farmaceuticima provedena su dva puta radi provjere ponovljivosti. Uz grafove, tablično su navedene i vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  za svako mjerenje koje predstavljaju koncentracije uzorka u testu koje uzorkuju 20 %, to jest 50 % inhibicije rasta prisutnih bakterija *Vibrio fischeri*. Također, izračunata je i relativna standardna devijacija (RSD) u postotcima koja ukazuje na odstupanja u mjerenjima.

Kako bi se učinci ispitivanih farmaceutika na ispitivanu bakterijsku populaciju mogli usporediti, konačno je dan i prikaz tablice sa srednjim vrijednostima  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  koje su izračunate na temelju provedenih mjerenja.

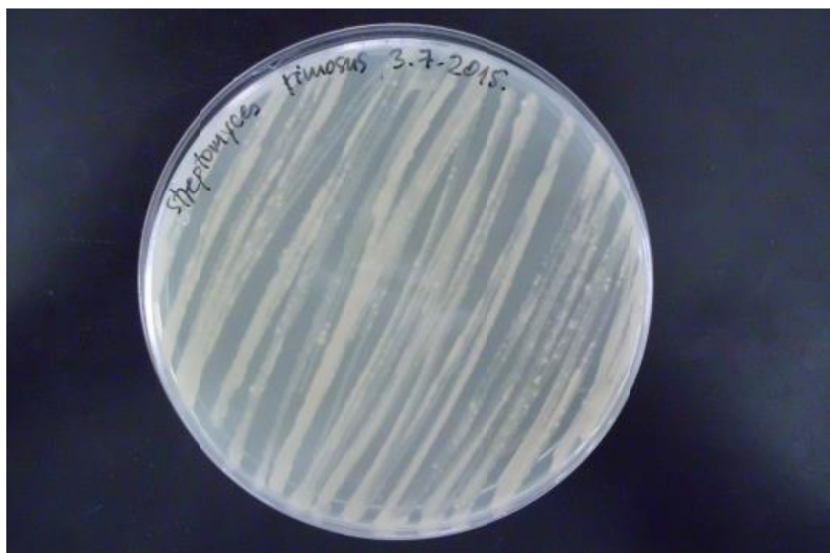


**Slika 21.** Shema postupka određivanja toksičnosti metodom *Vibrio fischeri*

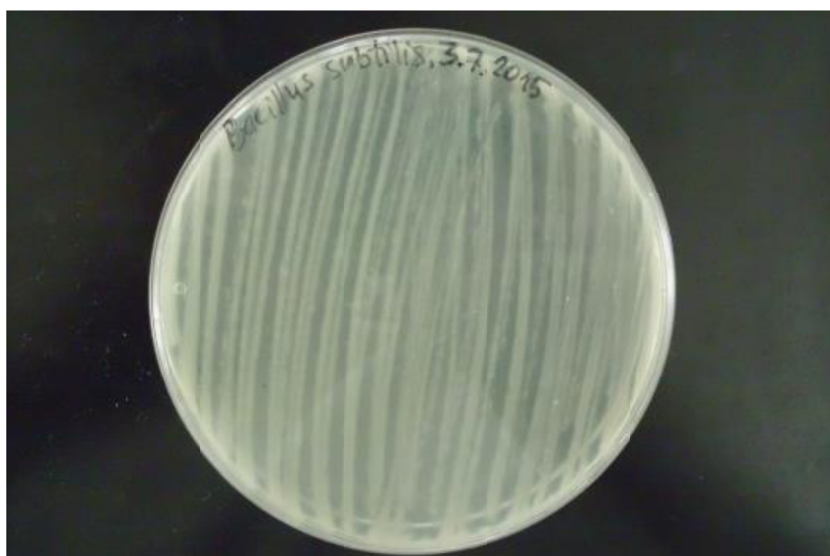
### 3.4. Metodika određivanja toksičnosti zonominhibicije

Bakterijske kulture i plijesni su prethodno sterilnom tehnikom rada precijepljene u propisno označenu epruvetu s kosom hranjivom podlogom te uzgajane u termostatu pri temperaturi 37 °C (*Bacillus* sp ) i 28 °C (*Streptomyces rimosus*, *Aspergillus niger*) kako bi kulture bile svježije za pripremu suspenzija. Nakon 96-satnog uzgoja, čiste bakterijske kulture *Streptomyces rimosus* (Slika22.) i *Bacillus* sp. (Slika23.) i plijesni *Aspergillus niger* (Slika24.) uporabljene su za pripremu suspenzije bakterija, odnosno plijesni. U ovako

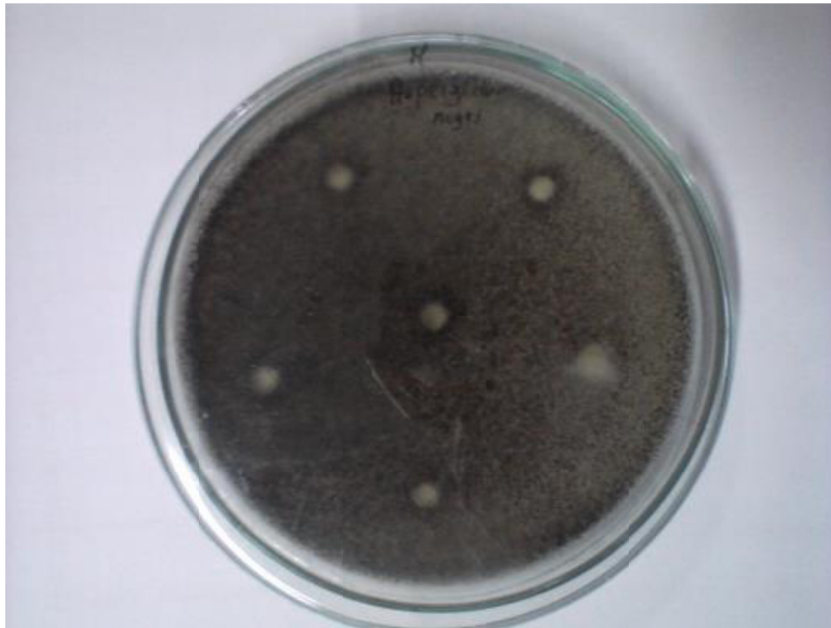
priređenim suspenzijama prethodno je određivan ukupan broj stanica bakterija optičkom gustoćom. Ukupan broj plijesni, odnosno broj spora plijesni utvrđen je metodom izravnog određivanja optičke gustoće prema McFarland standardima.



**Slika22.** Bakterijska kultura *Streptomyces rimosus* izrasla na hranjivom bujon agar



**Slika23.** Bakterijska kultura *Bacillus* sp. izrasla na hranjivom bujon agaru



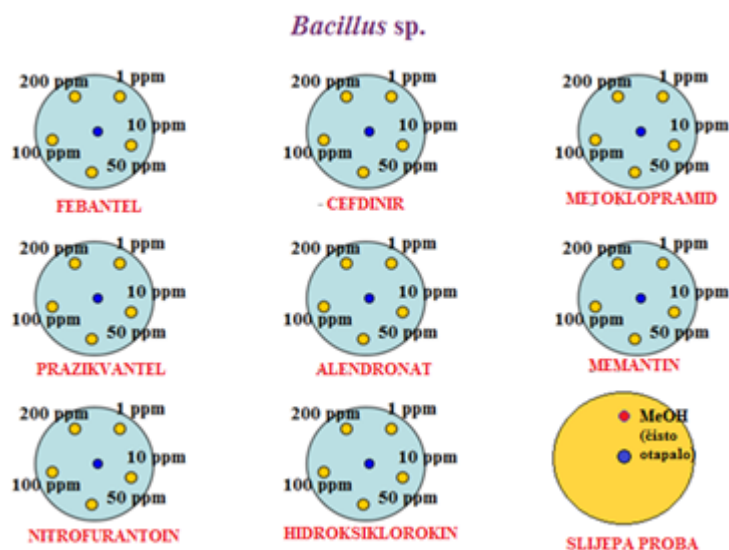
**Slika24.** Plijesan *Aspergillus niger* izrasla na malt agaru

Sterilizacija je uništavanje ili uklanjanje vegetativnih stanica i endospora. Za vlažnu sterilizaciju bakteriološki onečišćenog posuđa i hranjivih podloga upotrijebljen je autoklav. Sterilizacija čistog posuđa provedena je u suhom sterilizatoru, "Instrumentaria", Zagreb, Hrvatska, pri temperaturi 160-180 °C tijekom 2 sata.

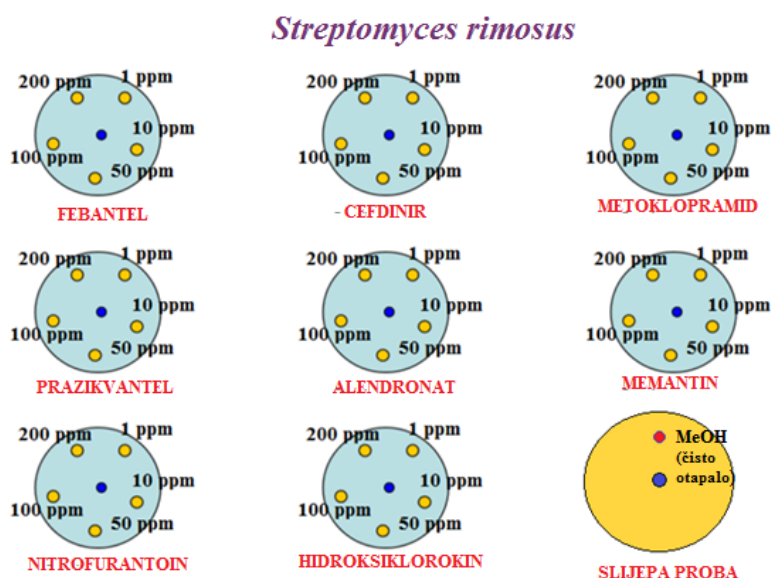
U priređenim suspenzijama mikroorganizama određivan je ukupan broj stanica bakterija optičkom gustoćom koji je iznosio  $5,8 \times 10^7$  stanica/mL suspenzije. Sterilnom tehnikom rada je pripremljeno 10 puta manje razrjeđenje, tako da je suspenzija koja je dodana u epruvete s hranjivim agarom sadržavala oko  $6 \times 10^6$  stanica/mL suspenzije. Ukupan broj plijesni, odnosno broj spora plijesni utvrđen je procjenom optičke gustoće i iznosio je oko  $5 \times 10^6$  stanica/mL suspenzije.

Nakon što se odredio broj stanica bakterija i plijesni u priređenim suspenzijama, po 3 mL suspenzije je sterilnom tehnikom rada dodano u epruvetu koja sadržava 27 mL hranjivog bujona agara, odnosno malt agara. Bacterije, odnosno plijesni su dobro homogenizirane u podlozi i izliveno u sterilne Petrijeve zdjelice. Prethodno pripremljeni suhi i čisti diskovi natopljeni su otopinama farmaceutika, realnih uzoraka te otopina slijepih proba, svaki po 50  $\mu$ L, što je maksimalni volumen koji disk može primiti bez prelijevanja i to automatskom pipetom. Tako pripremljeni diskovi čuvani su na suhim i čistim označenim jažicama a potom su preneseni na pripremljene očvrslje hranjive podloge (**Slika 25, Slika 26, Slika 27, Slika**

28). Na svaku Petrijevu zdjelicu se u sredinu stavlja jedan kontrolni disk natopljen MiliQ vodom. Petrijeve zdjelice su inkubirane pri 28 °C i 37 °C, a rezultati su očitavani nakon 24 sata i tako kroz vremenski period od 7 dana.



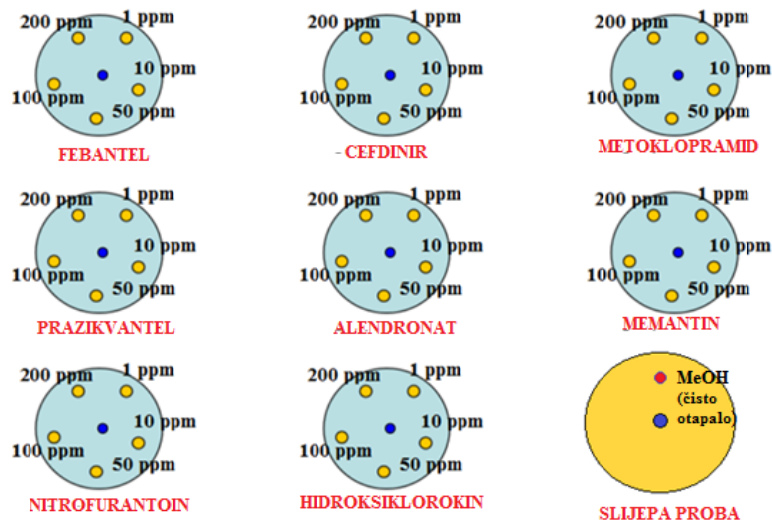
**Slika 25.** Shematski prikaz Petrijevih zdjelica s *Bacillus sp.* na bujon agaru i diskovima sa standardnim otopinama ispitivanih farmaceutika. Plavo označeni diskovi su namočeni MiliQ vodom, žuti kružići prikazuju diskove namočene radnim otopinama farmaceutika različitih masenih koncentracija. Žuta Petrijeva zdjelica prikazuje slijepu probu u kojoj se mjeri zona inhibicije bakterija na čisto otapalo, odnosno metanol.



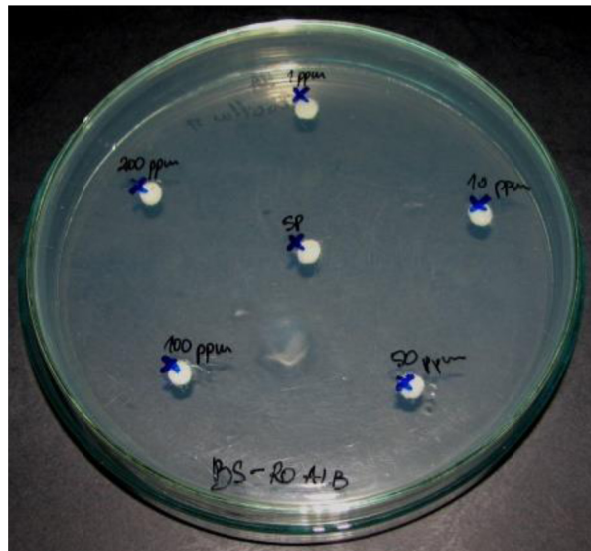
**Slika 26.** Shematski prikaz Petrijevih zdjelica s *Streptomyces rimosus* na bujon agaru i diskovima sa standardnim otopinama ispitivanih farmaceutika. Plavo označeni diskovi su namočeni MiliQ vodom, žuti kružići prikazuju diskove namočene radnim otopinama farmaceutika različitih masenih koncentracija. Žuta Petrijeva zdjelica prikazuje slijepu probu u kojoj se mjeri zona inhibicije bakterija na čisto otapalo, odnosno metanol.



*Aspergillus niger*

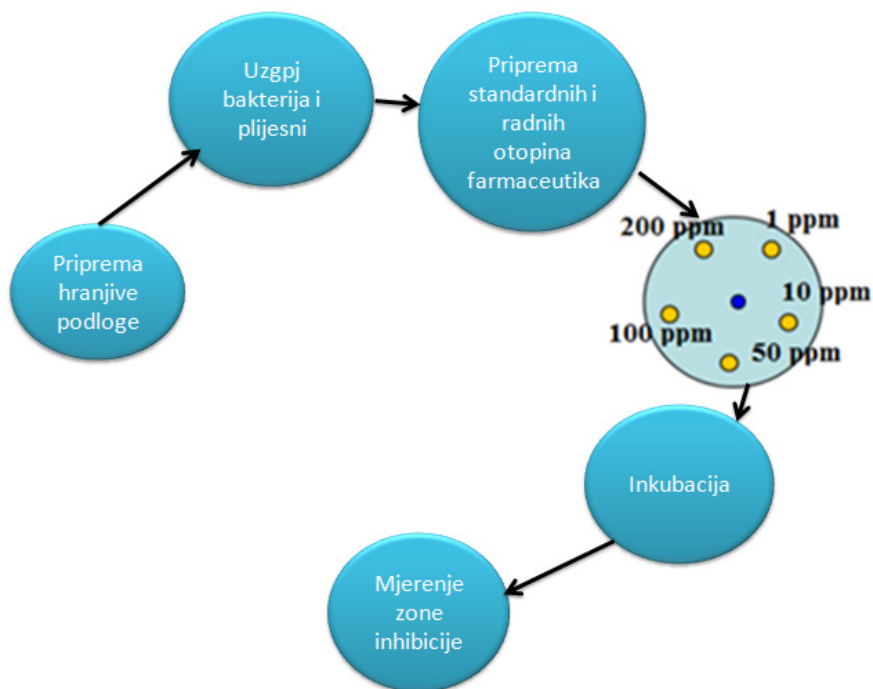


**Slika 27.** Shematski prikaz Petrijevih zdjelica s *Aspergillus niger* na malt agaru i diskovima sa standardnim otopinama ispitivanih farmaceutika. Plavo označeni diskovi su namočeni MiliQ vodom, žuti kružići prikazuju diskove namočene radnim otopinama farmaceutika različitih masenih koncentracija. Žuta Petrijeva zdjelica prikazuje slijepu probu u kojoj se mjeri zona inhibicije plijesni na čisto otapalo, odnosno metanol.



**Slika28.** Prikaz propisno označene Petrijeve zdjelice sa očvrslom hranjivom podlogom i nanesenim diskovima natopljenim standardnim otopinama na početku eksperimenta (nulti radni dan)

Na **Slici 29.** prikazani su koraci u radu prilikom provedbe određivanja toksičnosti farmaceutika praćenjem razvijenih zona inhibicije.



**Slika 29.** Shema postupka određivanja toksičnosti metodom zone inhibicije

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

---

Kao što je već navedeno, ispitivanih 9 farmaceutika s obzirom na učestalu uporabu na globalnoj razini, u okoliš dospjevaju na različite načine. Upravo zato je ključan monitoring koji uključuje određivanje njihove toksičnosti, odnosno ekotoksičnosti. U ovom radu je ispitivana toksičnost čistih aktivnih supstanci (API) farmaceutika albendazola, alendronata, cefdinira, febantela, hidroksiklorokina, memantina, metoklopramida, nitrofurantoina i prazikvantela. Ispitivanja čistih aktivnih supstanci se provode kako bi se lakše moglo pratiti kretanje njihovih metabolita i razgradnih produkata nakon što dopiju u otpadne vode, odnosno kako bi se moglo odrediti da li se njihova toksičnost povećala ili nije s obzirom na glavnu komponentnu. U radu su korištene dvije metode za određivanje ekotoksičnosti farmaceutika, metoda pomoću bakterijske kulture *Vibrio fischeri* te praćenjem zone inhibicije. Njihove prednosti i nedostaci mogu se potvrditi dobivenim rezultatima.

U nekoliko radova navedeni su podaci za ekotoksičnost nekih farmaceutika koji su najčešće u uporabi, kao što su antibiotici. [67] Važno je naglasiti da literaturno nije potvrđeno da postoje informacije o toksičnosti navedenih devet farmaceutika. Upravo zato je provedba ekotoksikoloških istraživanja ključna.

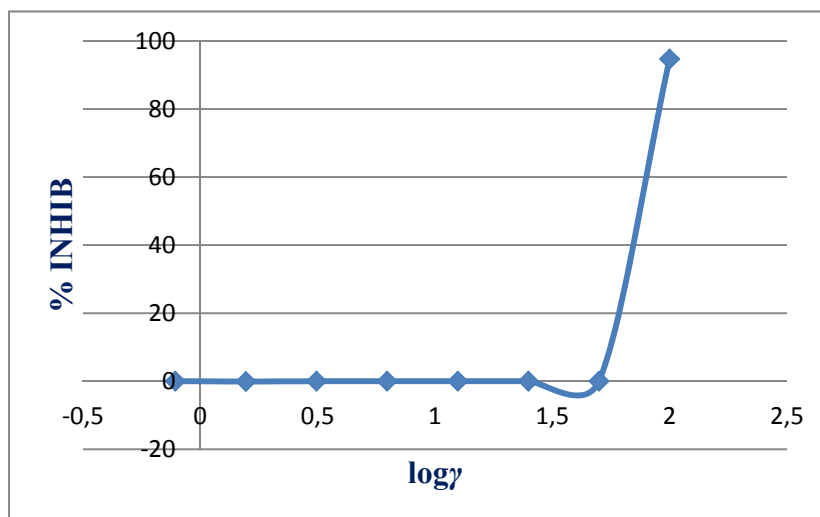
### 4.1. Određivanje toksičnosti bakterijama *Vibrio fischeri*

U radu je najprije izmjerena luminiscencija bakterijskih suspenzija bez čistih aktivnih supstanci farmaceutika, a potom su se sljedeći pravilo geometrijskog niza dodavale otopine farmaceutika različitih koncentracija, počevši od najmanje do najveće. Najmanja koncentracija otopine farmaceutika je bila razrijeđena 128 puta (0,78 mg/L), a najveću koncentraciju je imala originalna otopina farmaceutika, odnosno radna otopina pripremljena u vodenom mediju (100 mg/L, izuzev albendazola čija je radna otopina imala koncentraciju od 300 mg/L) koja je bila pripremljena otapanjem izračunate količine temeljne standardne otopine u MiliQ vodi.

Nakon 30 min očitavani su rezultati testa provedenog na uređaju LUMIStox 300 i na temelju rezultata crtani su grafovi toksičnosti za otopine pojedinačnih farmaceutika.

Prije početka ispitivanja toksičnosti otopina farmaceutika, bilo je provedeno mjerenje toksičnosti samog otapala metanola i to iste količine koja je prisutna i kod pripreme standardnih otopina (**Slika 30.**). [68, 69]

To se provelo u cilju isključivanja potencijalnog utjecaja otapala na proces provedbe toksičnosti testa izlažući bakterijsku suspenziju različitim koncentracijama otapala.

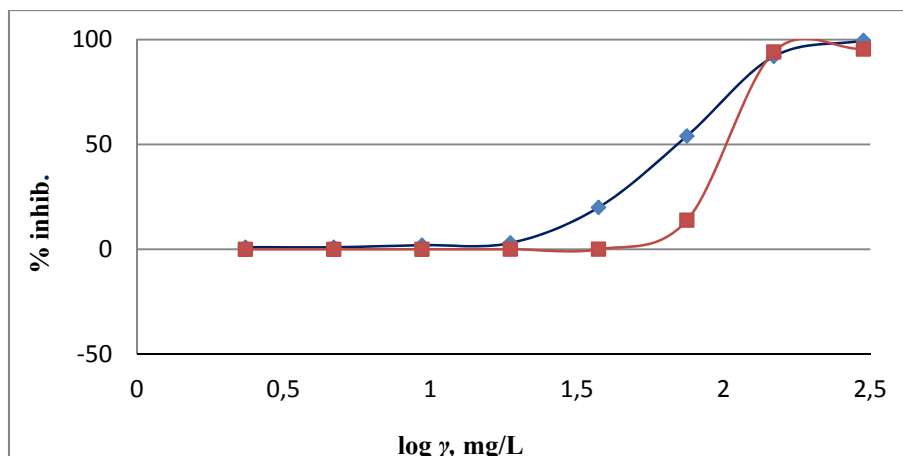


**Slika 30.** Graf toksičnosti metanola

Sva ispitivanja na pojedinim farmaceuticima provedena su najmanje dva puta radi provjere ponovljivosti. Uz grafove, tablično su navedene i vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  za svako mjerenje koje predstavljaju koncentracije uzorka u testu koje uzorkuju 20 %, to jest 50 % inhibicije prisutnih bakterija *Vibrio fischeri*. Također, izračunata je i relativna standardna devijacija (RSD) u postocima koja ukazuje na odstupanja u mjerenjima.

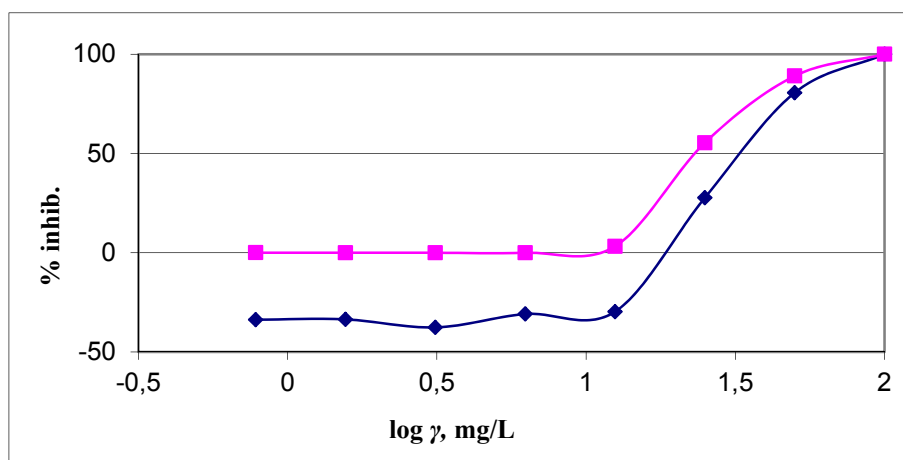
Kako bi se učinci ispitivanih farmaceutika na ispitivanu bakterijsku populaciju mogli usporediti, konačno je dan i prikaz tablice (**Tablica 9.**) sa srednjim vrijednostima  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  koje su izračunate na temelju provedenih mjerenja.

**Slika 31** prikazuje usporedbeni graf toksičnosti otopine albendazola početne koncentracije 300 mg/L. Iz grafa je vidljivo kako je u čitavom području razrjeđenja prisutna inhibicija bakterijske kulture, s tim da se ona, kako se ide prema manjim razrjeđenjima također povećava tako da otopina masene koncentracije 100 odnosno 300 mg/L uzrokuje inhibiciju gotovo čitave bakterijske kulture.



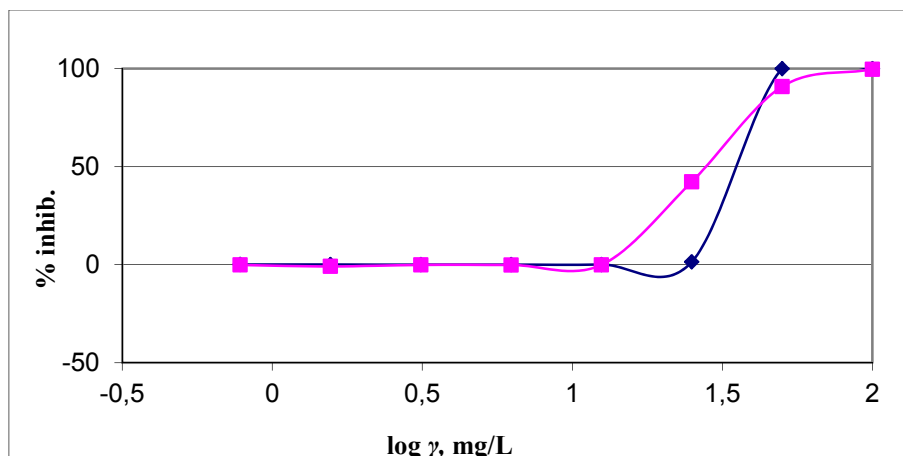
**Slika 31.** Graf usporedbe toksičnosti otopine albendazola

**Slika 32.** prikazuje graf toksičnosti otopine cefdinira. Iz grafa je vidljivo da veća razrjeđenja ne utječu na inhibiciju bakterijske suspenzije dok manja razrjeđenja, međutim sve veće koncentracije, dakle bliže originalnom uzorku farmaceutika masene koncentracije 100 mg/L, uzrokuju sve veću inhibiciju koja se očituje u smanjenju luminiscencije bakterija *Vibrio fischeri*.



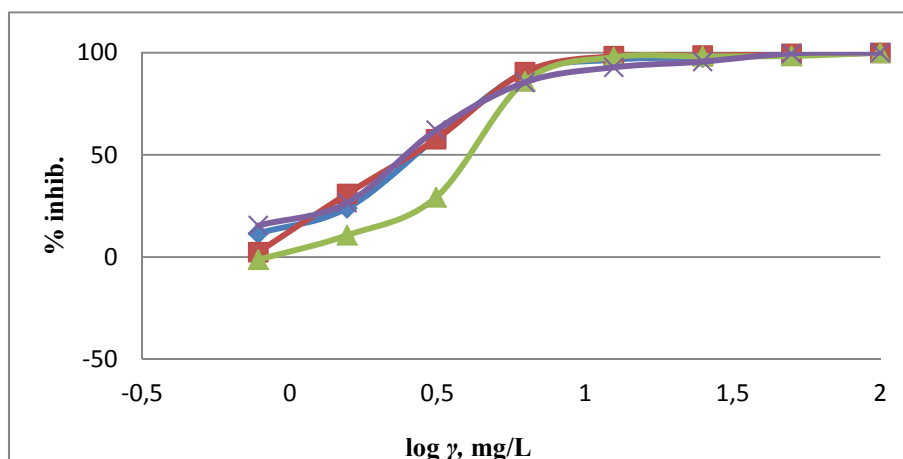
**Slika 32.** Graf usporedbe toksičnosti otopine cefdinira

**Slika 33** prikazuje graf toksičnosti otopine febantela gdje je na krivulji toksičnosti vidljivo kako veća razrjeđenja također ne utječu na inhibiciju testiranih organizama kao i kod ispitivanja toksičnosti cefdinira, dok veće koncentracije farmaceutika uzrokuju inhibiciju bakterijske suspenzije tako da originalna otopina farmaceutika masene koncentracije 100 mg/L uzrokuje inhibiciju bakterijske suspenzije gotovo 100%.



**Slika 33.** Graf usporedbe toksičnosti otopine febantela

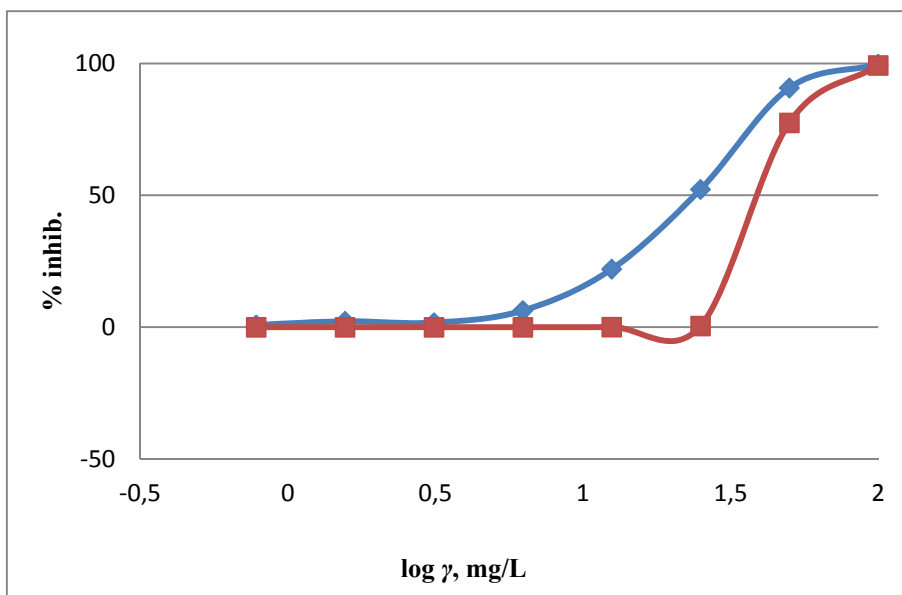
Na **Slikama 34.** i **35.** prikazani su grafovi toksičnosti za otopine nitrofurantoina te prazikvantela. Od svih promatranih krivulja dobivenih mjerenim vrijednostima, krivulja toksičnosti za nitrofurantoin pokazuje najveći porast tako da čak i otopina masene koncentracije od 0,98 mg/L (razrijeđenje 128 puta obzirom na početnu koncentraciju od 100 mg/L) uzrokuje inhibiciju od 9,98 % testiranih organizama. Kod razrijeđenja masene koncentracije od 6,25 do 100 mg/L inhibicija testiranih organizama povećava se na od 90 do 100 %.



**Slika 34.** Graf usporedbe toksičnosti otopine nitrofurantoina

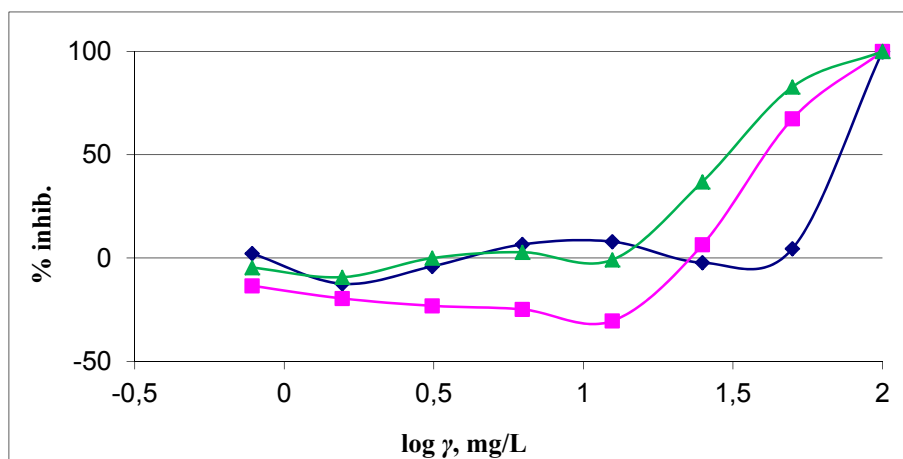
Kod otopine prazikvantela krivulja toksičnosti prikazuje blaži porast s obzirom na krivulju toksičnosti otopine nitrofurantoina, ali opet je vidljivo da i jako velika razrjeđenja uzrokuju

malu inhibiciju testiranih organizama. Tako otopina masene koncentracije od 0,63 mg/L uzrokuje inhibiciju od 12,89 %.



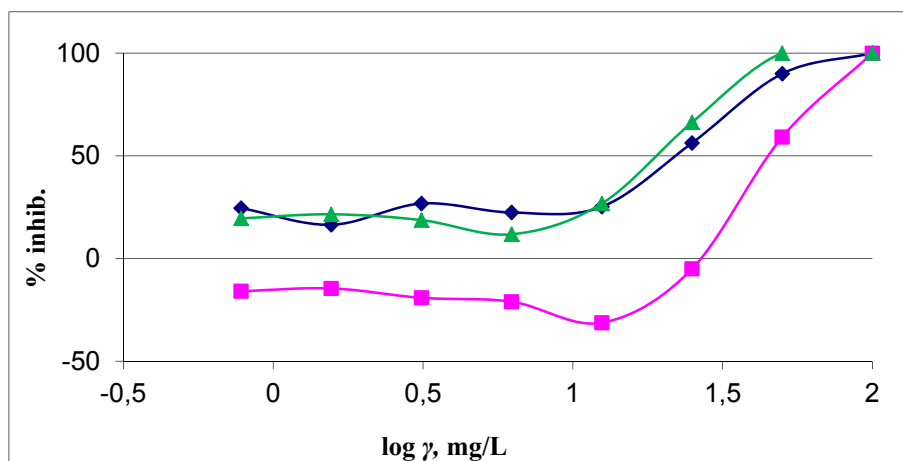
**Slika 35.** Graf usporedbe toksičnosti otopine prazikvantela

Kod otopine alendronata (**Slika 36.**) krivulja toksičnosti ukazuje na blaži porast s obzirom na krivulju toksičnosti otopine nitrofurantoina. Tako otopina masene koncentracije 34,89 mg/L uzrokuje inhibiciju od 50,00 %, a otopina masene koncentracije 23,91 mg/L inhibira 20,00 % populacije izložene farmaceutiku.

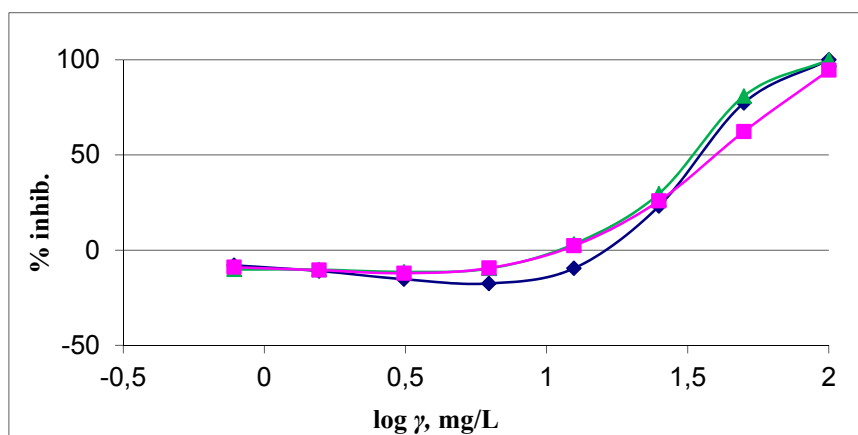


**Slika 36.** Graf usporedbe toksičnosti otopine alendronata

Kod hidroksiklorokina, memantina te metoklopramida dobiveni su bliski rezultati, a grafički prikaz se nalazi na **Slikama 37, 38, 39**. Sličnost je i u nestabilnosti bakterijske kulture pri izlaganju niskim koncentracijama odnosno većim razrijeđenjima, pri čemu i dolazi do većih odstupanja pri mjerenju za isti farmaceutik. Pri višim koncentracijama izlaganja odstupanja su manje izražena.

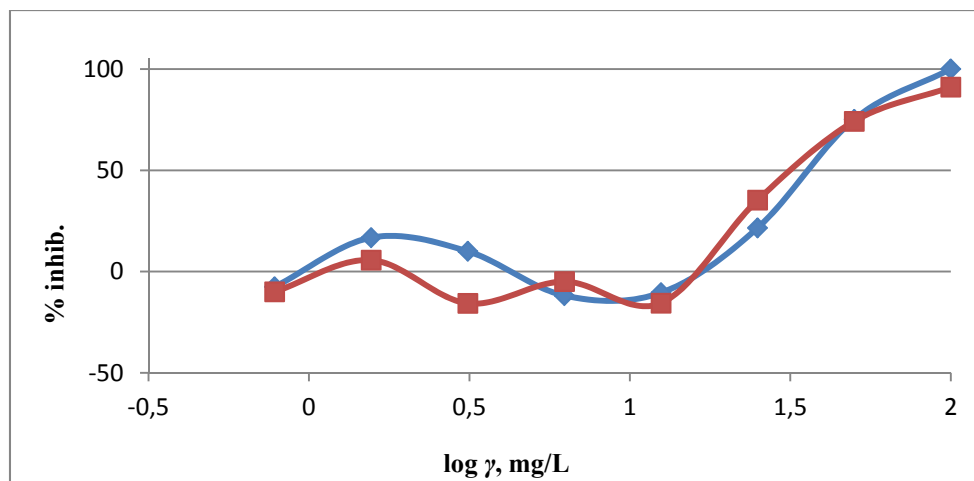


**Slika 37.** Graf usporedbe toksičnosti otopine hidroksiklorokina



**Slika 38.** Graf usporedbe toksičnosti otopine memantina





**Slika 39.** Graf usporedbe toksičnosti otopine metoklopramida

Jedna od prednosti primjene upravo ove metode određivanja toksičnosti jest osjetljivost metode. Zato je izračunato i relativno standardno odstupanje (RSD) koje ukazuje na ponovljivost metode određivanja toksičnosti.

Jasno je vidljivo da kako idemo prema većim koncentracijama da su i odstupanja između krivulja pojedinog mjerenja sve manja. Najmanje odstupanje provedenih mjerenja daju rezultati za memantin. Za  $EC_{20}$  8,13 %, a za  $EC_{50}$  tek 2,62 %.

U **Tablici 9.** navedene su srednje vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  za sve otopine ispitivanih farmaceutika.  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  očitavani su iz krivulja toksičnosti za svako provedeno mjerenje. Ukupno se za svaki farmaceutik provelo dva mjerenja, drugo mjerenje se provodilo radi utvrđivanja ponovljivosti rezultata. Jedino su za otopinu nitrofurantoina provedena sveukupno tri mjerenja budući da je on u odnosu na ostale farmaceutike pokazivao najveću toksičnost i pri manjim koncentracijama, odnosno pri većim razrjeđenjima.

Velika relativna standardna odstupanja ukazuju na nestabilnost bakterijske kulture prilikom mjerenja kroz duže vrijeme. Iz grafova na slikama je vidljivo da su kod većih koncentracija odstupanja između krivulja pojedinog mjerenja sve manja. Međutim, da bi se dobio bolji uvid utjecaja farmaceutika na okoliš odnosno da bi se predvidjelo njihovo ponašanje u okolišu bolje je toksičnost izražavati u jedinicama toksičnosti (engl. *Toxicity Units*, TU) prema formuli:

$$TU=100(EC_{50})^{-1} \quad (7)$$

Stoga su u **Tablici 10** navedeni parametri toksičnosti za ispitivane farmaceutike, dakle uz koncentracije farmaceutika koje pokazuju 50 % inhibiciju luminiscencije bakterija *Vibrio fischeri* (EC<sub>50</sub>), prikazane su jedinice toksičnosti koje se računaju na temelju grafički očitane vrijednosti EC<sub>50</sub> prema formuli (7), te su prikazane za svaki farmaceutik najniže koncentracije koje izazivaju inhibiciju luminiscencije ispitivanih bakterija (engl. *Lowest Observed Effect Concentration*, LOEC).

**Tablica 9.** Očitani EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> za sva mjerenja toksičnosti ispitivanih farmaceutika i izračunata srednja vrijednost uz RSD vrijednost

| FARMACEUTIK             | EC <sub>50</sub> ,<br>mg/L | EC <sub>20</sub> ,<br>mg/L | Srednja vrijednost EC <sub>50</sub> ,<br>mg/L | Srednja vrijednost EC <sub>20</sub> ,<br>mg/L |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|---|---|
| <b>Albendazol</b>       | 67,61                      | 37,15                      | 83,81±27,33                                   | 60,17±54,1                                    |
|                         | 100                        | 83,18                      |   |   |
| <b>Alendronat</b>       | 40,27                      | 28,97                      | 34,89±21,81                                   | 23,91±29,96                                   |
|                         | 29,51                      | 18,84                      |   |   |
| <b>Cefdinir</b>         | 32,36                      | 23,44                      | 27,38±25,75                                   | 20,02±24,16                                   |
|                         | 22,39                      | 16,6                       |   |   |
| <b>Febantel</b>         | 31,62                      | 29,51                      | 28,37±16,2                                    | 23,65±35,1                                    |
|                         | 25,12                      | 17,78                      |   |   |
| <b>Hidroksiklorokin</b> | 19,05                      | 14,12                      | 20,22±8,15                                    | 11,15±37,75                                   |
|                         | 21,38                      | 8,17                       |   |   |
| <b>Memantin</b>         | 34,36                      | 23,44                      | 33,74±2,62                                    | 22,17±8,13                                    |
|                         | 33,11                      | 20,89                      |   |   |
| <b>Metoklopramid</b>    | 19,5                       | 10,47                      | 21,21±11,37                                   | 15,45±45,55                                   |
|                         | 22,91                      | 20,42                      |   |   |
| <b>Nitrofurantoin</b>   | 2,09                       | 1,12                       | 2,39±11,5                                     | 1,19±7,32                                     |
|                         | 2,63                       | 1,29                       |   |   |
|                         | 2,45                       | 1,17                       |   |   |
| <b>Prazikvantel</b>     | 24,55                      | 11,22                      | 31,73±31,98                                   | 20,37±63,51                                   |
|                         | 38,9                       | 29,51                      |   |   |

**Tablica 10.** Parametri toksičnosti dobiveni mjerenjima na bakterijama *Vibrio fischeri*, izraženi kao 50 % inhibicija luminiscencije (EC<sub>50</sub>), jedinice toksičnosti (TU), i najniža koncentracija kod koje je primjećena inhibicija luminiscencije (LOEC)

| FARMACEUTIK             | EC <sub>50</sub> , mg/L | TU   | LOEC, mg/L |
|-------------------------|-------------------------|------|------------|
| <b>Albendazol</b>       | 83,81                   | 1,2  | 42,19      |
| <b>Alendronat</b>       | 34,9                    | 2,9  | 16,93      |
| <b>Cefdinir</b>         | 27,36                   | 3,6  | 18,75      |
| <b>Febantel</b>         | 28,37                   | 3,5  | 25         |
| <b>Hidroksiklorokin</b> | 20,22                   | 4,9  | 17,19      |
| <b>Memantin</b>         | 33,74                   | 2,9  | 16,67      |
| <b>Metoklopramid</b>    | 21,21                   | 4,7  | 2,34       |
| <b>Nitrofurantoin</b>   | 2,39                    | 41,8 | 0,98       |
| <b>Prazikvantel</b>     | 31,73                   | 3,2  | 12,89      |

Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako nitrofurantoin pokazuje najveću toksičnost budući da je već pri masenoj koncentraciji od svega 1,19 mg/L inhibirano 20 % bakterijske kulture dok je pri koncentraciji od 2,39 mg/L inhibirano 50 % bakterijske kulture.

Albendazol pokazuje najmanju toksičnost jer je pri koncentraciji od 60,17 mg/L inhibirano 20 % bakterijske kulture dok je pri koncentraciji od 83,8 mg/L inhibirano 50 % bakterijske kulture.

### 4.3. Određivanje toksičnosti zonom inhibicije

Provedeno je i određivanje toksičnosti pojedinih farmaceutika praćenjem razvijenih zona inhibicije. Ovdje treba naglasiti nedostatak primjene ove metode za definiranje parametara ekotoksičnosti, a to je duljina trajanja provedbe eksperimenta, ali velika prednost je dostupnost materijala za provedbu eksperimenata. Upravo zato je ova metoda vrlo često u uporabi za određivanje ekotoksičnosti. [70]

U ovom radu je ispitivana toksičnost standardnih otopina čistih aktivnih supstanci (API) farmaceutika: albendazola, alendronata, cefdinira, febantela, hidroksiklorokina, memantina, metoklopramida, nitrofurantoina i prazikvantela, u vodenom mediju.

U priređenim suspenzijama mikroorganizama prethodno je određivan ukupan broj stanica bakterija optičkom gustoćom kako je navedeno u Eksperimentalnom dijelu u poglavlju 3.4.

Zone inhibicije su se nakon 24 sata inkubacije hranjivih podloga pojavile oko diskova natopljenih standardnim otopinama cefdinira i hidrosikloroikina koji su postavljeni na hranjivi agar naciepljen bakterijskom kulturom *Streptomyces rimosus*. Vrijednosti promjera razvijenih zona inhibicije navedene su u **Tablicama 11 i 12**. Kroz 5 dana se nisu povećavale, već su se pomalo smanjivale i sužavale zbog prilagodbe plijesni na farmaceutik i zbog pojave sušenja hranjive podloge.

**Tablica 11.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina cefdinira kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Streptomyces rimosu* sod 5 dana

| Oznaka diska | 1.dan<br>(28.11.2016.) | 2.dan<br>(29.11.2016.) | 3. dan<br>(30.11.2016.) | 4.dan<br>(01.12.2016.) | 5.dan<br>(02.12.2016.) |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 mg/L       | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 10 mg/L      | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 50 mg/L      | 3 mm                   | 3 mm                   | 2,5 mm                  | 2,5 mm                 | 2 mm                   |
| 100 mg/L     | 5 mm                   | 5 mm                   | 4,5 mm                  | 4,5 mm                 | 4 mm                   |
| 200 mg/L     | 8 mm                   | 8 mm                   | 7,5 mm                  | 7,5 mm                 | 7 mm                   |

**Tablica 12.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina hidrosikloroikina kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Streptomyces rimosus* sod 5 dana

| Oznaka diska | 1.dan<br>(28.11.2016.) | 2.dan<br>(29.11.2016.) | 3. dan<br>(30.11.2016.) | 4.dan<br>(01.12.2016.) | 5.dan<br>(02.12.2016.) |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 mg/L       | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 10 mg/L      | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 50 mg/L      | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 100 mg/L     | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 200 mg/L     | 9 mm                   | 9 mm                   | 8,5 mm                  | 8,5 mm                 | 8 mm                   |

Na hranjivim podlogama naciepljenim bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. nakon 24 h razvile su se vidljive zone inhibicije oko diskova natopljenih standardnim otopinama nitrofurantoina, cefdinira te alendronata, kako je prikazano u **Tablicama 13, 14, 15**. Kroz 5 dana se nisu

povećavale, već su se pomalo smanjivale i sužavale zbog prilagodbe plijesni na farmaceutik i zbog pojave sušenja hranjive podloge.

**Tablica 13.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina nitrofurantoina kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Bacillus* sp.od 5 dana

| Oznaka diska | 1.dan<br>(28.11.2016.) | 2.dan<br>(29.11.2016.) | 3. dan<br>(30.11.2016.) | 4.dan<br>(01.12.2016.) | 5.dan<br>(02.12.2016.) |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 mg/L       | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 10 mg/L      | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 50 mg/L      | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 100 mg/L     | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 200 mg/L     | 6 mm                   | 6 mm                   | 5,5 mm                  | 5,5 mm                 | 5,5 mm                 |

**Tablica 14.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina cefdinira kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Bacillus* sp.od 5 dana

| Oznaka diska | 1.dan<br>(28.11.2016.) | 2.dan<br>(29.11.2016.) | 3. dan<br>(30.11.2016.) | 4.dan<br>(01.12.2016.) | 5.dan<br>(02.12.2016.) |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 mg/L       | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 10 mg/L      | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 50 mg/L      | 3 mm                   | 3 mm                   | 3 mm                    | 2,5 mm                 | 2,5 mm                 |
| 100 mg/L     | 3 mm                   | 3 mm                   | 3 mm                    | 2,5 mm                 | 2,5 mm                 |
| 200 mg/L     | 6 mm                   | 6 mm                   | 5,5 mm                  | 5,5 mm                 | 5,5 mm                 |

**Tablica 15.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina alendronata kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Bacillus* sp.od 5 dana

| Oznaka diska | 1.dan<br>(28.11.2016.) | 2.dan<br>(29.11.2016.) | 3. dan<br>(30.11.2016.) | 4.dan<br>(01.12.2016.) | 7.dan<br>(02.12.2016.) |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 mg/L       | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 10 mg/L      | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 50 mg/L      | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 100 mg/L     | -                      | -                      | -                       | -                      | -                      |
| 200 mg/L     | 2 mm                   | 2 mm                   | 1,5 mm                  | 1,5 mm                 | 1,5 mm                 |

Nakon 24 sata inkubacije uočilo se da se u Petrijevoj zdjelici na kojoj se nalazi malt agar na koji je nacijepljena plijesan *Aspergillus niger* oko zona inhibicije na diskovima koji su bili natopljeni uzorcima standardnih otopina: alendronata, cefdinira, febantela, hidroksiklorokina, memantina, metoklopramida, nitrofurantoina i prazikvantela nisu razvile vidljive zone inhibicije nakon 24 sata, a ni nakon 5 dana.

Na Petrijevim zdjelicama s hranjivim podlogama koje su nacijepljene bakterijskom kulturom *Aspergillus niger* oko diskova natopljenih standardnim otopinama albendazola različitih koncentracija su se pojavile vidljive zone inhibicije nakon 24 sata, a nisu se znatno mijenjale niti nakon 5 dana (**Tablica 16**). Djelomično smanjenje zona pripisano je sušenju hranjive podloge.

**Tablica 16.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina albendazola kroz vremenski period inkubacije malt agara inokuliranog sporama plijesni *Aspergillus niger* od 7 dana

| Oznaka diska | 1.dan<br>(07.07.2015.) | 2.dan<br>(07.07.2015.) | 3. dan<br>(07.07.2015.) | 4.dan<br>(07.07.2015.) | 5.dan<br>(07.07.2015.) |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 mg/L       | 7 mm                   | 6,5 mm                 | 6,5 mm                  | 6,0 mm                 | 5,5 mm                 |
| 10 mg/L      | 10 mm                  | 10 mm                  | 10 mm                   | 8 mm                   | 7 mm                   |
| 50 mg/L      | 13 mm                  | 12 mm                  | 12 mm                   | 11 mm                  | 10 mm                  |
| 100 mg/L     | 14 mm                  | 13 mm                  | 13 mm                   | 12 mm                  | 10 mm                  |
| 200 mg/L     | 15 mm                  | 13 mm                  | 13 mm                   | 13 mm                  | 11 mm                  |

Na temelju provedenih rezultata može se primijetiti da albendazol koji ima najmanji utjecaj na inhibiciju luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* i time rezultira najmanjom toksičnošću od svih ispitivanih farmaceutika (**Tablica 10.**) ipak pokazuje najznačajniji utjecaj na inhibiciju rasta plijesni *Aspergillus niger* kod praćenja zone inhibicije. To ukazuje na činjenicu da se ne može zanemariti njegov utjecaj na okolišne mikroorganizme s obzirom da su se zone inhibicije razvile oko diskova natopljenih radnim otopinama masenih koncentracija 200, 100, 50, 10 i 1 mg/L. Osobito je naglasak stavljen na zonama razvijenim na 10 i 1 mg/L zato što je to najčešća detektirana količina

albendazola, ali i ostalih farmaceutika u okolišu, vodama, ali i tlu. Time je istaknut utjecaj toksičnosti albendazola na okoliš.

S druge strane zone inhibicije su se umjereno razvile oko diskova natopljenih farmaceuticima: cefdinir, hidroksikloroin i alendronat i to na hranjivim podlogama naciepljenim bakterijama *Bacillus sp.* te *Streptomyces rimosus* i to isključivo pri najvišoj masenoj koncentraciji izloženosti od 200 mg/L (**Tablica 12., 14., 15.**). To je zanimljivo jer masa aktivne tvari u tabletama često puta iznosi 200 mg. Posebno treba istaknuti rezultate određivanja zona inhibicije cefdinira (**Tablica 11.**) kod kojeg su zone uočene i pri nižim koncentracijama (100, 50 mg/L). Uz to, na temelju provedenih testova inhibicije luminiscencije *Vibrio fischeri* za iste farmaceutike može se primijetiti umjerena toksičnost (**Tablica 10.**) obzirom na vrijednosti  $EC_{50}$  i LOEC.

Već su prethodno navedeni rezultati određivanja toksičnosti metodom inhibicije luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* za antibiotik nitrofurantoin u **Tablici 10.**, a posebno treba naglasiti vrijednosti  $EC_{50}$  te LOEC koji nedvojbeno ukazuju na izrazito visoku razinu toksičnosti navedenog farmaceutika. Važno je naglasiti i puno manji utjecaj na okolišne organizme, odnosno da su se vidljive zone inhibicije razvile na hranjivoj podlozi naciepljenoj bakterijom *Bacillus sp.* i to samo pri najvišoj koncentraciji izlaganja od 200 mg/L.

Ovime je samo potvrđena polazna ideja provedbe ovakvih ispitivanja. Različit pristup i simultana provedba više različitih bioanalitičkih metoda određivanja toksičnosti na različitim vrstama mikroorganizama rezultirat će cjelovitim odgovorom o toksičnosti farmaceutika. Treba dodati i preporuku da se prije same provedbe testova toksičnosti treba dobro ispitati cijeli niz fizikalno kemijskih parametara koji određuju ponašanje pojedinih farmaceutika u okolišu kao što su biodostupnost, mogućnost razgradnje. Uz to, jedan od sljedećih koraka u istraživanju jest određivanje toksičnosti razgradnih produkata (nastalih cijelim nizom različitih vrsta razgradnje, kao i biorazgradnje). Uz to, svakako se preporuča i provedba testova toksičnosti na realnim uzorcima otpadnih voda u kojima su prisutni metaboliti ali i razgradni produkti navedenih farmaceutika. Na kraju, te sve informacije biti će ključna karika koja upotpunjuje sliku o sudbini farmaceutika u okolišu. #

## 5. ZAKLJUČAK

---

Na temelju provedenih eksperimenata dobiveni rezultati ukazuju na:

1. Od svih ispitivanih farmaceutika, najveću toksičnost pokazuje nitrofurantoin budući da i pri izrazito niskim koncentracijama uzrokuje inhibiranje bakterijske kulture -  $EC_{50}$  kod 2,39 mg/L. Albendazol pokazuje najmanju toksičnost –  $EC_{50}$  kod 83,81 mg/L, zato što do inhibiranja bakterijske kulture dolazi pri visokim koncentracijama u usporedbi sa svim ostalim ispitivanim farmaceuticima.

2. Ponovljena mjerenja kod pojedinih farmaceutika su pokazala znatna odstupanja u mjerenim rezultatima. Matematički gledano, radi se o velikim odstupanjima ako se promatraju postotci. Međutim, prilikom razvoja bioanalitičkih metoda u kojima se koriste živi organizmi, vrlo je teško ostvariti preciznost u rezultatima prilikom ponovljenih mjerenja zbog nepredvidljivosti i osjetljivosti na minimalne promjene okolišnih uvjeta živih organizama koji se koriste u radu. U tom slučaju zaključeno je da su analize na okolišnim mikroorganizmima praćenjem zone inhibicije pokazale veću robusnost i ponovljivost, ali istovremeno s naglaskom na puno manju osjetljivost i preciznost te metode.

3. Razvijanjem zone inhibicije pri različitim koncentracijama standardnih otopina farmaceutika može se zaključiti da porastom koncentracije raste i zona inhibicije. Tako su najveće zone inhibicije bile upravo kod 200 mg/L. Treba naglasiti da su u okolišu detektirane znatno niže koncentracije (do oko 10 mg/L). No, važno je istaknuti da se i koncentracije od 200 mg/L nalaze u nekim farmaceutskim pripravcima pa provedba testa toksičnosti pri ovako visokim koncentracijama dobiva svoj smisao.



## 6. Literatura

---

- [1] Okvirna direktiva o vodama na: <http://water.usgs.gov/edu/watercycle.html> (Pristup: ožujak.2017.)
- [2] Zakon o vodama na: <https://www.zakon.hr/z/124/Zakon-o-vodama> (Pristup: travanj 2017.)
- [3] Tušar, B., Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, CROATIANKJIGA, Zagreb, 2004., 62-66.
- [4] Gauthier, H., Biodegradation of pharmaceuticals by microorganisms, Doktorska disertacija, Department of Chemical Engineering, McGill University, Montreal, (2008) 12-15.
- [5] Ternes, T. A., Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, **32** (1998) 3245-3260.
- [6] Peake, B. M., Braund, R., Tong, A., Tremblay, L. A., Environmental risk assessment methodology u knjizi: *The Life-Cycle of Pharmaceuticals in the Environment*, Technology and Engineering (2015) 109-114
- [7] Mata, M. T., Martins, A. A., Neto, B., Martins, M. L., Salcedo, R. L. R., Costa, C. A. V., LCA Tool for Sustainability Evaluations in the Pharmaceutical Industry, *Chemical Engineering Transactions*, **26** (2012) 261-266
- [8] Čajo, Č. G., Osrečki, V., Tomić., S., Utjecaj lijekova na okoliš, *Kemija u Industriji* **59** (2010) 351–354
- [9] Kaštelan-Macan, M., Petrović, M., Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str.75
- [10] Zrnčević, S., Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode* **24** (2016) 119 -136
- [11] Kümmerer, K., Pharmaceuticals in the Environment, *The Annual Review of Environment and Resources* **35** (2010) 57-75
- [12] Periša, M., Babić, S., Farmaceutici u okolišu, *Kemija u industriji* **65** (9-10) (2016) 417-482
- [13] Cesaro, A., Naddeo, V., Belgiorno, V., Wastewater Treatment by Combination of Advanced Oxidation Processes and Coventional Biological Systems, *Journal of Bioremediation and Biodegradation* **4** (2013) 4-8
- [14] S. Semrany, L. Favier, H. Djelal, S. Taha, A. Amrane, Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs), *Biochemical Engineering Journal* **69** (2012) 75-86
- [15] Potrošnja lijekova na: [http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjescje-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2015/#Tablica\\_2](http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjescje-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2015/#Tablica_2) pristupljeno ožujak 2017.

- [16] Potrošnja lijekova na: [http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-prometu-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2014/#Tablica\\_2](http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-prometu-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2014/#Tablica_2) pristupljeno ožujak 2017.
- [17] Kumar, R. R., Lee, J. T., Cho, Y. T., Fate, Occurence, and Toxicity of Veterinary Antibiotics in Environment, Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry **55** (2012) 701-709
- [18] Dafale, N. A., Semwal, U. P., Rajput, R. K., Singh, G. N., Selection of appropriate analytical tools to determine the potency and bioactivity of antibiotics and antibiotic resistance, Journal of Pharmaceutical Analysis **6** (2016) 207-213
- [19] Singh, P., Priya, B., Shandilya, P., Raizada, P., Singh N., Pare B., Jonnalagadda, S. B., Photocatalytic mineralization of antibiotics using 60 % WO<sub>3</sub>/BiOCl stacked to graphene sand composite and chitosan, Arabian Journal of Chemistry **10**(2016)*in press*
- [20] Samaržija, D., Antunac, N., Važnost dokazivanja prisutnosti antibiotičkih ostataka u mlijeku, Mljekarstvo **52** (2002) 61-70
- [21] Yadav, P., Singh R., A review on anthelmintic drugs and their future scope, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **3** (2011) 17-21
- [22] Milekić, T., Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.
- [23] Maartens, M. M. J., Swart, C. W., Pohl, C. H., Koc, L. J. F., Antimicrobials, chemotherapeutics or antibiotics, Science Research and Essays **6** (2011) 3927-3929
- [24] Perry M. C., Perry's The Chemotherapy Source Book, Fifth edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012, str. 1
- [25] Aldred E. M., Buck C., Vall K., Pharmacology, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2009., str. 309
- [26] Fram, M. S., Belitz, K., Occurence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California, Science of the Total Environment **409** (2011) 3409-3417
- [27] Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., Occurence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environment, Analytical and Bioanalytical Chemistry **387** (2007) 1225-1234
- [28] Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment, Emerging Contaminants **2** (2016) 1-16
- [29] Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D., Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, Analytical and Bioanalytical Chemistry **387** (2007) 1365-1377
- [30] Deegan, A. M., Shaik, M., Nolan, K., Urell, Oelgemöller, U. K., Tobin, J., Morrissey, A., Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, International Journal of Environmental Science and Technology **8** (2011) (3) 649-666

- [31] Randhawa, G. K., Kullar J. S., Bioremediation of Pharmaceuticals, Pesticides, and Petrochemicals with Gomeya/Cow Dung, *ISRN Pharmacology* **2011**(2011) 1-7
- [32] Semrany, S., Favier, L., Djelal, H., Taha, S., Amrane, A., Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs), *Biochemical Engineering Journal* **69** (2012) 75-86
- [33] Behera, S. K., Kim, H.W., Oh, J. E., Park, H. S., Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea, *Science of the Total Environment* **409** (2011) 4351-4360
- [34] Majewsky, M., Gallé, T., Yargeau, Y., Fischer, K., Active heterotrophic biomass and sludge retention time (SRT) as determining factors for biodegradation kinetics of pharmaceuticals in activated sludge, *Bioresource Technology* **102** (2011) 7415-7421
- [35] Gauthier, H., Yargeau, V., Cooper, G. D., Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism, *Science of the Total Environment* **408** (2010) 1701-1706
- [36] Deegan, A. M., Shaik, B., Nolan, K., Urell K., Oelgemöller, M., Tobin, J., Morrissey, A., Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, *International Journal of Environmental Science and Technology* **8** (3) 2011 649-666
- [37] Pravilnik o gospodarenju medicinskim otpadom na: <http://www.propisi.hr/print.php?id=6622> pristupljeno ožujak 2017.
- [38] Vajda, A., Jezerčić, I. A., Donesen novi Pravilnik o gospodarenju medicinskim otpadom, *Sigurnost* **57**(2015) 283-288
- [39] Meena, K. A., Sharma, K., Kandaswamy, M., Rajagopal, S., Mullangi, R., Formulation development of an albendazole self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) with enhanced systemic exposure, *Acta Pharmaceutica* **62** (2012) 563-580
- [40] Anusha, V., Palanichamy, S., Sugumar, M., Rajesh, M., Parasakthi, N., Godwin Raja, T., Ramasubramaniyan, P., Thanga, A., Thirupathi, A., Formulation and characterization of albendazole chewable tablets, *Der Pharmacia Sinica* **3**(2012) 211-216
- [41] Ćurković, B., Babić-Naglić, Đ., Optimizacija učinka alendronata integriranjem kolekalciferola u tjednu formulaciju lijeka (Fosavance 5600), *Reumatizam* **56** (2009)
- [42] Park, J., Park, H. J., Cho, W., Cha, K. H., Kang, Y. S., Hwang, S. J., Preparation and pharmaceutical characterization of amorphous cefdinir using spray-drying and SAS-process, *International Journal of Pharmaceutics* **396** (2010) 239-245
- [43] Divya, K., Narayana, B., A novel spectrophotometric approach for the determination of febantel in pure and dosage forms, *Journal of the Association of Arban Universities for Basic and Applied Sciences* **19** (2016) 23-28
- [44] Keshavarzi, F., Fungistatic effect of hydroxychloroquine, lessons from a case, *Medical Mycology Case Reports* **13** (2016) 17-18

- [45] Lin, Y. N., Lin, Y. N., Wen, S. I., Yang, S. C., Tsai, T. F., Chen, H. E., Chou, K. H., Hwang, T. I. S., Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis, *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* **33** (2017) 215-223
- [46] Dominguez, E., Chin, T. Y., Chen, C. P., Wu, T. Y., Management of moderate to severe Alzheimer's disease: Focus on memantine, *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* **50** (2011) 415-423
- [47] Emik, U., Unal, Y., Arslan, M., Bekir Demirel, C., The effects of memantine on recovery, cognitive functions and pain after propofol anesthesia, *Brazilian Journal of Anesthesiology* **66** (2016) 485-491
- [48] Sowjanya, S., Shamugasundaram, P., Naidu, P., Singamsetty, S. K., Novel validated stability-indicating UPLC method for the determination of Metoclopramide and its degradation impurities in API and pharmaceutical dosage form, *Journal of Pharmacy Research* **6** (2013) 765-773
- [49] Amiri, H., Ghodrati, N., Nikuyeh, M., Shams-Vahdati, S., Jalilzadeh-Binazar, M., Comparison of granisteron and metoclopramide in the treatment of pain and emesis in migraine patients: A randomized controlled trial study, *Turkish Journal of Emergency Medicine* **17** (2017) 1-4
- [50] Patel, N., Sharma, S. M., Patel, M. C., Patel, B. N., Shrivastav, P. S., Sanyal, M., Quantitation of nitrofurantoin in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Acta Pharmaceutica* **63** (2013) 141-158
- [51] Hashem, H., Ibrahim, A. E., Elhenawee, M., A rapid stability indicating LC-method for determination of praziquantel in presence of its pharmacopoeial impurities, *Arabian Journal of Chemistry* **10** (2017) 35-41
- [52] Gonçalves, J. P., Menezes, A. O., Maldonado Junior, A., Carvalho, T. M. U., De Souza, W., Evaluation of Praziquantel effects on *Echistoma paraensei* ultrastructure, *Veterinary Parasitology* **194** (2013) 16-25
- [53] Korunić-Košćina, S., Mioč, M., Bobić, V., Ekotoksičnost kao biološki pokazatelj onečišćenja rafinerijskih otpadnih voda, goriva i maziva **42** (2003) 153-176.
- [54] Papić, S., Moderne analitičke tehnike u analizi okoliša, Toksičnost, nastavni materijali na web-u (2016).
- [55] Parvez, S., Venkataraman, S., Mukherji, S., A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* **32** (2006) 265-8
- [56] Mariscal, A., Peinado, M. T., Carnero-Varo, M., Fernández-Crehuet, J., Influence of organic solvents on the sensitivity of a bioluminescence toxicity test with *Vibrio harveyi*, *Chemosphere* **50** (2003) 349-354
- [57] Korlević, M., Detaljna analiza bakterijske raznolikosti Jadranskoga mora, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički Fakultet, Geološki odsjek, Zagreb, 2015.

- [58] Perović, K., Određivanje toksičnosti antiparazitika i antibiotika u vodi bakterijama *Vibrio fischeri*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
- [59] Ferenčak, M., Određivanje utjecaja veterinarskih farmaceutika na mikroorganizme, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2014.
- [60] Europska agencija za okoliš na: <http://www.eea.europa.eu/about-us> (Pristup: 05.04.2017.)
- [61] Kušić, H., Integrirano upravljanje okolišem, FKIT, nastavni materijali na web-u (2015)
- [62] Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Preverita, L., Rubino, M., Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products, *Science of Total Environment*, **348** (2005) 93-101
- [63] Čogelja Čajo, G., Osrečki, V., Tomić, S., Utjecaj lijekova na okoliš, *Kemija u industriji* **59**(2010) 351-354
- [64] Bujas, R., Antolić, J., Medić, Đ., Prijedlog europskog zakonodavstva o dopuni liste prioriternih i prioriternih opasnih tvari, *Hrvatske vode* **21** (2013) 86
- [65] Vrdoljak, M., Određivanje utjecaja veterinarskih farmaceutika na mikroorganizme, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2014.
- [66] Interna skripta: Laboratorijske vježbe Mikrobiologija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2012) 1-9
- [67] Fent, K., Weston A. A., Caminada D., Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic toxicology* **76** (2006) 122-159
- [68] Wagil, M., Mulkiwicz, E., Bialk-Bielinksa, A., Puckowski, A., Wychodnik, K., Maszkowska, J., Stepnowski, P., Assessing Toxicity of Anthelmintic Drugs (Fenbendazole and Flubendazole) to Aquatic Organisms, *Environmental Science and Pollution Research International* **22** (2015) 2566-2573
- [69] Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji S., A review on advantages of implementing luminiscence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* **32** (2006) 265-268
- [70] Nostro, A., Germano, M., P., D'Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M. A., Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity, *Letters in Applied Microbiology* **30** (2000) 379-384

# 7. DODATAK

---

## 7.1. Popis slika

- Slika 1.** Najzastupljeniji farmaceutici u okolišu,
- Slika 2.** Glavni putevi dopijeca humanih i veterinarskih farmaceutika u okoliš [25]
- Slika 3.** Molekulska struktura albendazola
- Slika 4.** Molekulska struktura alendronata
- Slika 5.** Molekulska struktura cefdinira
- Slika 6.** Molekulska struktura febantela
- Slika 7.** Molekulska struktura hidroksiklorokina
- Slika 8.** Molekulska struktura memantina
- Slika 9.** Molekulska struktura metoklopramida
- Slika 10.** Molekulska struktura nitrofurantoina
- Slika 11.** Molekulska struktura prazikvantela
- Slika 12.** Opći izgled krivulje toksičnosti
- Slika 13.** Alati integriranog upravljanja okolišem (IEM) [57]
- Slika 14.** Hranjiva podloga sa vidljivim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (žute kolonije, kultura stara 2 dana)
- Slika 15.** Geometrijski niz
- Slika 16.** Analitička vaga
- Slika 17.** Ultrazvučna kupelj
- Slika 18.** Shematski prikaz autoklava
- Slika 19.** Uređaj za provedbu toksičnosti (LUMISTox 300)
- Slika 20.** Automatska mikropipeta Eppendorf
- Slika 21.** Shema postupka određivanja toksičnosti metodom *Vibrio fischeri*
- Slika 22.** Bakterijska kultura *Streptomyces rimosus* izrasla na hranjivom bujon agar
- Slika 23.** Bakterijska kultura *Bacillus* sp izrasla na hranjivom bujon agaru
- Slika 24.** Plijesan *Aspergillus niger* izrasla na malt agaru
- Slika 25.** Shematski prikaz Petrijevih zdjelica s *Bacillus* sp. na bujon agaru i diskovima sa standardnim otopinama ispitivanih farmaceutika
- Slika 26.** Shematski prikaz Petrijevih zdjelica s *Streptomyces rimosus* na bujon agaru i diskovima sa standardnim otopinama ispitivanih farmaceutika
- Slika 27.** Shematski prikaz Petrijevih zdjelica s *Aspergillus niger* na malt agaru i diskovima sa standardnim otopinama ispitivanih farmaceutika
- Slika 28.** Prikaz propisno označene Petrijeve zdjelice sa očvrslom hranjivom podlogom i nanesenim diskovima natopljenim standardnim otopinama na početku eksperimenta (nulti radni dan)
- Slika 29.** Shema postupka određivanja toksičnosti metodom zone inhibicije.
- Slika 30.** Graf toksičnosti metanola
- Slika 31.** Graf usporedbe toksičnosti otopine albendazola
- Slika 32.** Graf usporedbe toksičnosti otopine cefdinira
- Slika 33.** Graf usporedbe toksičnosti otopine febantela
- Slika 34.** Graf usporedbe toksičnosti otopine nitrofurantoina
- Slika 35.** Graf usporedbe toksičnosti otopine prazikvantela
- Slika 36.** Graf usporedbe toksičnosti otopine alendronata
- Slika 37.** Graf usporedbe toksičnosti otopine hidroksiklorokina
- Slika 38.** Graf usporedbe toksičnosti otopine memantina
- Slika 39.** Graf usporedbe toksičnosti otopine metoklopramida

## 7.2. Popis tablica

**Tablica 1.** Utjecaj nekih sintetskih aktivnih farmaceutskih tvari na ljude i životinje [28]

**Tablica 2.** Pregled različitih vrsta standardnih bioindikatora [49]

**Tablica 3.** Kemikalije koje su korištene za određivanje toksičnosti

**Tablica 4.** Sastav hranjive podloge

**Tablica 5.** Sastav hranjive podloge

**Tablica 6.** Sastav hranjive podloge

**Tablica 7.** Sastav otopine za resuspenziju

**Tablica 8.** Podatci o korištenim farmaceuticima

**Tablica 9.** Očitani  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  za sva mjerenja toksičnosti ispitivanih farmaceutika i izračunata srednja vrijednost uz RSD vrijednost

**Tablica 10.** Parametri toksičnosti dobiveni mjerenjima na bakterijama *Vibrio fischeri*, izraženi kao 50 % inhibicija luminiscencije ( $EC_{50}$ ), jedinice toksičnosti (TU), i najniža koncentracija kod koje je primjećena inhibicija luminiscencije (LOEC)

**Tablica 11.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina cefdinira kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Streptomyces rimosus* od 5 dana

**Tablica 12.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina hidroksiklorokina kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Streptomyces rimosus* od 5 dana

**Tablica 13.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina nitrofurantoina kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Bacillus sp.* od 5 dana

**Tablica 14.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina cefdinira kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Bacillus sp.* od 5 dana

**Tablica 15.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina alendronata kroz vremenski period inkubacije hranjivog agara inokuliranog sporama bakteriju *Bacillus sp.* od 5 dana

**Tablica 16.** Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina albendazola kroz vremenski period inkubacije malt agara inokuliranog sporama plijesni *Aspergillus niger* od 7 dana

### 7.3. Popis kratica i simbola

WWTPs- Wastewater Treatment Plant - postrojenje za obradu otpadnih voda  
TSO- temeljna standardna otopina  
RO- radna otopina  
Okvirna direktiva o vodama (ODV)  
Integrirano upravljanje okolišem (*Integrated Environmental Management, IEM*)  
Maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK)  
Farmaceutski aktivna tvar (*Active pharmaceutical ingredient, API*)  
Vrijeme zadržavanja mulja (*Sludge retention time, SRT*)  
Hidrauličko vrijeme zadržavanja (*Hydraulic retention time, HRT*)  
Plinska kromatografija (*Gas Chromatography, GC*)  
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*)  
Spektrometrija masa (*Mass Spectrometry, MS*)  
Spektar ultraljubičastog/vidljivog zračenja - UV/VIS  
Farmaceutski aktivni spojevi (PhAC)  
MBR - membranski bioreaktori  
Napredni oksidacijski procesi (*Advanced oxidation processes, AOP's*)  
Albendazol (ABZ)  
Alendronat (ALN)  
Mineralni koštani sadržaj (BMD)  
Cefdinir (CEF)  
Febantel (FBT)  
Hidroksiklorokin (HCQ)  
Cefdinir (CEF)  
Febantel (FBT)  
Hidroksiklorokin (HCQ)  
Prazikvantel (PZQ)  
Integrirano upravljanje okolišem (*Integrated Environmental Management, IEM*)  
Europska agencija za okoliš (*European Environmental Agency*)  
Alati integriranog upravljanja okolišem (IEM)  
Predviđena koncentracija lijeka u vodenom okolišu (*Predicted Environmental Concentration, PEC*).  
Napisati hrvatski prijevod, napisala sam Vam u tekstu!!! PNEC (*Predicted-no-effect-Concentration*)  
Ovdje isto!!! OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*)  
Ovdje isto!!! ISO (*International Organization for Standardization*)  
 $I_0$  – luminiscencija bakterija u suspenziji prije nego je dodan uzorak (početna luminiscencija)  
 $I_t$  – luminiscencija testirane otopine nakon inkubacije u vremenu  $t$  (konačna luminiscencija nakon dodavanja uzorka)  
GL vrijednost – faktor razrjeđenja kojim je postignut % inhib.  $t. < 20$   
 $EC_{20}$  – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 20 % inhibicije  
 $EC_{50}$  – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50% inhibicije  
 $D$  - koeficijent difuzije aktivne tvari u vodi pri temperaturi inkubacije  
 $T_0$  - vrijeme potrebno za stvaranje zone inhibicije  
 $m_0$  - početna koncentracija na disku  
 $m'$  - kritična koncentracija aktivne tvari  
 $X$  - dužina difuzije  
 $G$  - generacijsko doba  
 $L$  - vrijeme laganog rasta  
 $N_0$  - početna koncentracija mikroorganizama  
 $N'$  - kritična koncentracija mikroorganizama  
 $d$  - promjer zone inhibicije



# SAŽETAK

---

## ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI FARMACEUTIKA U VODI

S obzirom na sve veću globalnu uporabu farmaceutika oni postaju problem kada nekontrolirano dospiju u okoliš. Nije u potpunosti poznata njihova sudbina u okolišu. Kao takvi, prema zakonodavstvu EU su kategorizirani kao „nove onečišćujuće tvari“. O njima se sve više istražuje te da bi se dobio potpuni monitoring potrebno je provesti cijeli niz analiza. Važno je definirati procjenu rizika na okoliš, a određivanje toksičnosti je jedan od ključnih segmenata. Jedna od najvažnijih analiza jest procjena toksičnosti farmaceutika te njihovih metabolita odnosno razgradnih produkata u okolišu. Upravo zato je ključno uvesti rutinske testove toksičnosti u široj laboratorijskoj praksi.

Cilj ovog rada jest procjena akutne toksičnosti standardnih otopina devet farmaceutika: albendazol, febantel, prazikvantel, cefdinir, nitrofurantoin, hidroksiklorokin, memantin, alendronat te metoklopramid pomoću dviju metoda. Akutna toksičnost određena je koristeći metodu s bakterijama *Vibrio fischeri* te mjerenjem zone inhibicije.

U ovom radu mjerenja su provedena standardnom metodom DIN 38 412-L-34 koja se temelji na mjerenju inhibicije bioluminiscencije bakterijske vrste *Vibrio fischeri*. Time su određene  $EC_{50}$  i  $EC_{20}$  vrijednosti koje ukazuju na različitu ekotoksičnost ispitivanih farmaceutika. Metodom mjerenja zone inhibicije na mikroorganizmima karakterističnima za tlo i vodu praćen je promjer razvijenih zona inhibicije nastalih nakon tretiranja otopinama farmaceutika čime je indirektno određen utjecaj farmaceutika na okoliš, odnosno može se predvidjeti njihovo ponašanje u okolišu.

### **Ključne riječi:**

*albendazol, alndronat, cefdinir, febantel, prazikvantel, nitrofurantoin, hidroksiklorokin, memantin, metoklopramid, ekotoksičnost, bioluminiscentna metoda s Vibrio fischeri, zona inhibicije*

# ABSTRACT

---

## THE ECOTOXICITY DETERMINATION OF THE PHARMACEUTICALS IN THE WATER

Hence, the pharmaceuticals have been in use for a very long time, and therefore their production and consumption have increased in huge deal. The fate of the pharmaceuticals in the environment is not entirely known. Because of the EU legislation they are sorted in category „new emerging contaminants“. To get a fully monitoring a lot of analysis of pharmaceuticals is a must. Investigation and determination of the environmental risk assessment is the key goal. Determination the toxicity of the pharmaceuticals and their degradation products is one of the most important analysis of all. That is why the routine tests of toxicity evaluation need to be implemented in wider laboratory practice.

The aim of this study was to determine the acute toxicity of pharmaceutical nine standard solutions: albendazole, febantel, praziquantel, cefdinir, nitrofurantoin, hidroksikloroikn, memantine, alendronate and metoclopramide by two methods. Acute toxicity was determined using the method by *Vibrio fischeri*, and the zone of inhibition measuring.

In this study, measurements were performed by using the standard method DIN 38 412-L-34 based on the measurement of inhibition the bioluminescence of *Vibrio fischeri* bacterial species. Therefore,  $EC_{50}$  and  $EC_{20}$  values are determined, and they defined the toxicity of the tested drugs. By measuring the zones of inhibition of microorganism typical for soil and water, the diameter of developed inhibition zones gives a certain information about toxicity of the tested compounds, which indirectly determines the influence of pharmaceuticals on the environment, so therefore their behavior in the environment can be predicted.

### **Key words:**

*albendazole, alendronate, cefdinir, febantel, praziquantel, nitrofurantoin, hydroxychloroquine, memantine, metoclopramide, ecotoxicity, bioluminescent method with Vibrio fischeri bacteria, zone inhibition*

## Zahvala

*Zahvaljujemo se našoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na ukazanom povjerenju i prilici za suradnju, na stručnom vodstvu, podršci, pomoći i trudu koji namje pružila tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujemo se izv prof. dr. sc. Mariji Vučković Domanovac i tehničkoj suradnici Marijani Vidaković sa Zavoda za industrijsku ekologiju na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujemo se obitelji i prijateljima koji su nam velika podrška.*

## Životopisi

### Josipa Papac

Rođena sam 23. listopada 1992. godine u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Stjepana Radića u Božjakovini nakon koje sam se upisala u VII. Gimnaziju u Zagrebu. 2011. godine sam upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Ekoinženjerstvo. Stručnu praksu sam odradila na Zavodu za javno zdravstvo Andrija Štampar, na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe u Laboratoriju za predmete koji dolaze u neposredni dodir s hranom. Završni rad pod naslovom: „Bioanalitičke metode praćenja farmaceutika u okolišu“ izradila sam 2015. godine na Zavodu za analitičku kemiju pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger. S istim radom u obliku posterskog izlaganja sudjelovala sam na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera 2016. godine. Od stranih jezika koristim engleski i njemački jezik u govoru i pismu. Računalno sam pismena.

Prosjek ocjena: 4,667

Težinski prosjek ocjena: 4,713

### Klara Perović

Rođena sam 31. prosinca 1994. godine u Zadru. Završila sam Osnovnu školu Krune Krstića u Zadru nakon koje sam upisala Gimnaziju Jurja Barakovića, opći smjer, također u Zadru. Gimnaziju sam završila 2013. godine nakon čega sam upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer ekoinženjerstvo. Stručnu praksu sam odradila u EKO d.o.o., tvrtki za gospodarenje otpadom Zadarske županije. Završni rad pod naslovom „Određivanje toksičnosti antiparazitika i antibiotika u vodi bakterijama *Vibrio fischeri*“ izradila sam 2016. godine pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger na Zavodu za analitičku kemiju. Od stranih jezika se koristim engleskim i talijanskim u govoru i pismu. Računalno sam pismena.

Prosjek ocjena: 5,000

Težinski prosjek ocjena: 5,000

### Maja Halužan

Rođena sam 26. ožujka 1993. godine u Zagrebu. Školovanje sam započela 1999. godine u OŠ „Malešnica“. Drugi razred upisujem u OŠ „Savski gaj“, a četvrti u OŠ „Luka II“ u Sesvetama, u oba slučaja radi preseljenja. Godine 2007. upisujem se u 1. razred jezične gimnazije „XVIII. Gimnazija“ u Zagrebu. Nakon završetka srednje škole i polaganja Državne mature, 2011. godine upisujem Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a potom, 2012. godine Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Primjenjena kemija. Stručnu praksu odradila sam u Plivi, u ICP-laboratoriju u sklopu TAPI, Istraživanje i razvoj, Analitika, gdje i trenutno radim preko Student servisa. Od stranih jezika koristim se engleskim u govoru i pismu. U radu na računalu koristim MS Office Word, Excel i Powerpoint, CorelDRAW, Mathematica, MATLAB, Scientist, te Origin.

Prosjek ocjena: 3,032

Težinski prosjek ocjena: 2,994