

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Klara Perović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Klara Perović

**ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI ANTIPARAZITIKA I ANTIBIOTIKA U VODI
BAKTERIJAMA *Vibrio fischeri***

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Dr. sc. Mirta Čizmić

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 2015./2016. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger.



ZAHVALA:

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na stručnom vodstvu, pomoći, susretljivosti i trudu koji mi je pružila tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem svojoj kolegici Josipi Papac koja mi je uvelike pomogla tijekom provedbe rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac i tehničkoj suradnici Marijani Vidaković sa Zavoda za industrijsku ekologiju na pruženim savjetima i otvorenim vratima njihovog Zavoda.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na podršci i ljubavi koju mi pružaju.

SAŽETAK

ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI ANTIPARAZITIKA I ANTIBIOTIKA U VODI BAKTERIJAMA *Vibrio fischeri*

Rast ljudske potrošnje iz godine u godinu uzrokuje i povećanje upotrebe farmaceutika u svakodnevnom životu. To izrazito nepovoljno djeluje na okoliš, prije svega onaj vodni, uzrokujući njegovo onečišćenje.

Problem se javlja pri nastojanju obrade takvih otpadnih voda jer se voda onečišćena farmaceuticima vrlo teško obrađuje klasičnim metodama obrade. Sve te činjenice, kao i nepostojanje zakonskih regulativa koje propisuju maksimalno dopuštene koncentracije farmaceutika u okolišu, nagnale su znanstvenike i brojne stručnjake na provedbu istraživanja koja su usmjerena na razvoj modernih tehnologija obrade otpadnih voda.

Cilj ovoga rada je odrediti toksičnost čistih aktivnih supstanci antiparazitika (albendazol, febantel, prazikvantel) i antibiotika (cefdinir, nitrofurantoin). Prije određivanja toksičnosti farmaceutskih aktivnih tvari na okoliš, bitno je odrediti toksičnost njihovih čistih komponenti kako bi se lakše mogla pratiti toksičnost njihovih metabolita i razgradnih produkata u okolišu.

Za određivanje toksičnosti primijenjena je bioluminiscentna metoda DIN 38412-L-34 koja za test organizme koristi bakterije *Vibrio fischeri* koje su osjetljive na organska onečišćenja i njihova prisutnost uzrokuje smanjenje njihove luminiscencije.

Mjerenja su pokazala kako svi farmaceutici pri višim koncentracijama čiste komponente uzrokuju inhibiciju bakterijske kulture. Koja će se pak koncentracija uzeti kao granična ovisi o težini promatranog učinka.

Kako za većinu farmaceutika nije poznato djelovanje nakon uporabe, potrebno je provoditi što više ovakvih mjerenja, prije svega za antibiotike i estrogene za koje se sumnja da opstaju u okolišu, bilo zbog nemogućnosti biološke razgradnje ili zbog kontinuiranog ispuštanja u okoliš.

Ključne riječi:

antiparazitici, albendazol, febantel, prazikvantel, antibiotici, cefdinir, nitrofurantoin, toksičnost, bioluminiscentna metoda, Vibrio fischeri

ABSTRACT

TOXICITY DETERMINATION OF ANTIPARASITICS AND ANTIBIOTICS IN THE WATER BY *Vibrio fischeri* BACTERIA

The growth of human consumption from year to year increases the use of pharmaceuticals in everyday life. This has extremely negative effect on environment, especially the water, causing the pollution. The problem occurs in the treatment of such waste water because the water, which contaminated with pharmaceuticals, is very difficult to process with conventional methods of treatment. All these facts, and the lack of legal regulations that prescribe the maximum permissible concentrations of pharmaceuticals in environment, prompted the scientists and numerous experts on doing researches which are focused on the development of modern technologies for wastewater treatment.

The aim of this study was to determine toxicity of pure active compounds of anthelmintics (albendazole, febantel, praziquantel) and antibiotics (cefdinir, nitrofurantoin). Before determining toxicity of pharmaceutical active substances in environment, it is important to determine the toxicity of pure active components to help track the toxicity of their metabolites and degradation products in environment.

To determine the toxicity was applied bioluminescent method DIN 38412-L-34 that as test organisms used *Vibrio fischeri* bacteria which are sensitive to organic contaminants which presence causes a reduction of their luminescence.

Measurements have shown that all pharmaceuticals with higher concentrations of pure component cause inhibition of bacterial culture. What concentration will be taken as the limit one depends on the severity of the observed effect.

As for the most pharmaceuticals is not known action after their use, it is necessary to implement more and more such measurements, especially for antibiotics and estrogens, which are suspected to persist in environment, either due to disability of biodegradation or continuous discharge.

Key words:

anthelmintics, albendazole, febantel, praziquantel, antibiotics, cefdinir, nitrofurantoin, toxicity, bioluminescent method, Vibrio fischeri bacteria

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Farmaceutici	3
2.1.1. Antiparazitici ili antihelminatici	3
2.1.2. Antibiotici	4
2.2. Farmaceutici u vodama	4
2.3. Ispitivani farmaceutici	6
2.3.1. Albendazol	6
2.3.2. Cefdinir	6
2.3.3. Febantel.....	7
2.3.4. Nitrofurantoin	8
2.3.5. Prazikvantel.....	8
2.4. Toksičnost farmaceutika u vodama	9
2.4.1. Krivulja toksičnosti	11
2.4.2. Bioluminiscentna metoda - DIN 38412-L-34	11
2.4.3. Luminiscentne bakterije – <i>Vibrio fischeri</i>	12
2.4.4. Definicije vezane za toksičnost.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije.....	14
3.1.2. Fizikalno – kemijska svojstva ispitivanih farmaceutika	14
3.2. Instrumenti za provedbu toksičnosti	15
3.3. Metode rada [24]	15
3.3.1. Priprema hranjive podloge	15
3.3.2. Priprema otopine za resuspenziju	16
3.3.3. Priprema standardnih i radnih otopina	17
3.3.4. Aktivacija liofiliziranih bakterija	17
3.3.5. Priprema bakterijske suspenzije.....	18
3.4. Radni postupci	19
3.4.1. Priprema geometrijskog niza razrjeđenja.....	19
3.4.2. Očitavanje rezultata.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČAK	32
7. DODATCI	35
7.1. Popis slika	35
7.2. Popis Tablica	36

1. UVOD

Potrošnja farmaceutika za ljudsku i veterinarsku primjenu je u uzlaznoj putanji, kao i njihovo otpuštanje u okoliš. Danas sve više ljudi posjećuje liječnike, više nego prije odlazi na dijagnostičke pretrage i uzimaju sve više lijekova. Ne samo što više ljudi uzima lijekove, nego svaka osoba pojedinačno koristi više lijekova. Zanimljiv je primjer kako na tržištu postoji više od 200.000 lijekova koji se dobivaju bez recepata, a onih na recept ima više od 30.000. Liječnici godišnje napišu više od tri milijarde recepata (Tablica 1.). [1]

Njihovu učestalu upotrebu naposljetku osjeća priroda te u konačnici ljudi budući da farmaceutici u najvećoj mjeri nakon primjene i izlučivanja iz ljudskih i životinjskih organizama dospijevaju u okoliš putem komunalnih otpadnih voda. Mnogi farmaceutici u ljudskom tijelu prolaze proces biotransformacije, što rezultira oslobađanjem velikih količina različitih metabolita. Ti metaboliti se dalje mogu transformirati u postupcima pročišćavanja otpadnih voda. Razgradni produkti mogu imati veću toksičnost od izvornih tvari. [2]

Zbog zakonski nereguliranih graničnih vrijednosti emisija te zbog nedovoljno poznatog utjecaja na ljudsko zdravlje i okoliš, farmaceutici spadaju u skupinu „novih onečišćujućih tvari“. Uz njih, tu se još nalaze i proizvodi za osobnu higijenu, površinski aktivne tvari te različite vrste aditiva i boja. Za većinu navedenih proizvoda, odnosno njihovih aktivnih tvari nije poznato djelovanje nakon uporabe, kao ni maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) u vodama, tlu i sedimentu. Osobito farmaceutici predstavljaju veliki problem kod obrade otpadnih voda klasičnim fizikano–kemijskim–biološkim i mehaničkim metodama, jer se tim metodama te molekule ili ne uklanjaju ili se uklanjaju djelomično. [3]

Ostaci lijekova su otkriveni u različitim uzorcima iz okoliša u velikom broju zemalja, čemu je uvelike pridonio razvoj naprednijih i osjetljivijih kemijskih metoda analize koje omogućuju detekciju polarnih organskih tvari. Te metode omogućavaju detekciju i identifikaciju lijekova i njihovih metabolita u okolišu u vrlo malim koncentracijama. U postupku davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet, većina regulatornih agencija propisuje potrebu ocjene rizika koji lijek može imati za okoliš. Odobravanja lijekova u Europskoj uniji propisano je Direktivom 2001/83/EC, na osnovi koje je Europska agencija za lijekove izdala smjernice koje opisuju postupak ocjene rizika lijeka za okoliš. [4]

Zbog toga, znanstvenici posljednjih desetaka godina rade na istraživanjima koja su usmjerena na što bolje razumijevanje sudbine farmaceutika u okolišu kako bi se mogli razviti novi napredni postupci obrade otpadnih voda, a sve u cilju što boljeg očuvanja okoliša. Od značajnog interesa su oni farmaceutici koji se proizvode u velikim količinama, često se pripisuju u medicinskoj praksi, potencijalno su postojani i skloni bioakumulaciji, a ne postoje podatci o njihovoj sudbini u okolišu. [5]

Tablica 1. Ukupna potrošnja lijekova u 2014. godini u RH izražena financijski, u kunama, po glavnim skupinama ATK klasifikacije [6]

	Nazivi glavnih ATK (anatomsko - terapijsko - kemijska) skupina	Ukupni iznos (kn)
1.	Lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti i imunomodulatori	937.359.774
2.	Lijekovi koji djeluju na živčani sustav	794.628.399
3.	Lijekovi koji djeluju na kardiovaskularni sustav	778.415.558
4.	Lijekovi s učinkom na probavni sustav i mijenu tvari	691.942.355
5.	Lijekovi za liječenje sustavnih infekcija	407.501.383
6.	Lijekovi koji djeluju na respiratorni sustav	322.742.961
7.	Lijekovi koji djeluju na krvi i krvotvorne organe	303.279.521
8.	Lijekovi koji djeluju na koštano-mišićni sustav	199.281.970
9.	Lijekovi koji djeluju na urogenitalni sustav i spolni hormoni	160.081.470
10.	Ostali terapijski pripravci, Dijagnostici, Kontrastna sredstva	116.453.386
11.	Lijekovi koji djeluju na kožu – dermatici	109.791.151
12.	Sustavni hormonski lijekovi, izuzev spolnih hormona	89.501.397
13.	Lijekovi koji djeluju na osjetila	86.387.503
14.	Lijekovi za liječenje infekcija izazvanih parazitima	8.517.516
	UKUPNO:	5.005.884.342

2. OPĆI DIO

2.1. Farmaceutici

Farmaceutici ili lijekovi su raznolika grupa kemijskih spojeva koji obuhvaćaju sve terapijske lijekove namijenjene ljudima, veterinarske lijekove i dodatke prehrani. U određenim količinama i pod određenim uvjetima služe za sprječavanje, ublažavanje, liječenje ili dijagnosticiranje bolesti u čovjeka ili životinja. Osnovna podjela je na prirodne, polusintetske i sintetske.

U Europskoj uniji je za zdravstvenu zaštitu ljudi odobreno oko 3000 različitih farmaceutskih aktivnih spojeva (PhAC). Većina modernih lijekova su mali organski spojevi molekulske mase ispod 500 Da, koji su umjereno topljivi u vodi i liofilni, da bi bili biorasploživ i biološki aktivni.

Razvijeni su kako bi u malim dozama postigli određene farmakološke i fiziološke učinke. [7] Tako se npr. lijek koji se pak slabo apsorbira i brzo eliminira iz organizma treba uzimati u većim dozama od lijeka sa povoljnim farmakokinetičkim svojstvima. To je nepovoljno za pacijenta i liječnika te se time povisuju i troškovi liječenja. [8]

Zbog svojih svojstava uzrokuju nenamjeravane posljedice na živi svijet.

U ovom radu je obrađena toksičnost dvije skupine farmaceutika na bakterije *Vibrio fischeri*, a to su antiparazitici ili antihelmintici te antibiotici.

2.1.1. Antiparazitici ili antihelmintici

Antiparazitici ili antihelmintici su grupa farmaceutika koja se koristi u liječenju crijevnih nametnika u ljudi i životinja. Najveća su skupina veterinarskih farmaceutika po količini proizvodnje i po vrijednosti. U poljoprivredi se koriste kao insekticidi (protiv insekata) i akaricidi (protiv grinja). U novije vrijeme sve se više primjenjuju kao antitumorski lijekovi. Dijelimo ih prema kemijskoj strukturi na benzimidazole (albendazol), difenilsulfide (febantel), imidazotiazole (levamisol), heksahidropirazine (prazikvantel), makrocikličke laktone (doramektin), salicilanilide (niklozamid), trahidropirimidine (morantel) i ostale (suramin).

Benzimidazoli su selektivno toksični antihelmintici koji se vežu na β -tubulin parazita i inhibiraju polimerizaciju tubulina i stvaranje mikrotubula čime narušavaju funkciju diobenog vretena. Na taj način uzrokuju smrt stanica koje se ubrzano dijele. Ispitivanja su pokazala njihov potencijal u liječenju raka dojke i raka debelog crijeva. [9]

Od antihelmintika su u radu obrađeni albendazol, febantel i prazikvantel.

2.1.2. Antibiotici

Antibiotici su tvari koje su u mogućnosti potpuno uništiti mikroorganizme odnosno bakterije, koji ne moraju uvijek biti patogeni i to na način da zaustave njihov rast ili razmnožavanje bez da učine veću štetu organizmu domaćina. To znači da imaju selektivnu toksičnost. Mogu biti prirodne, sintetske ili polusintetske (dobivene biosintezom) tvari. U svijetu su najzastupljeniji sintetski spojevi antibiotika, dobiveni čistom kemijskom sintezom u laboratorijima. Najpoznatiji predstavnici su konoloni i sulfonamidi.

Jedna od mnogih podjela antibiotika je na bakteriostatske i baktericidne.

Bakteriostatska sredstva (kloramfenikol ili eritromicin) zaustavljanjem rasta i razmnožavanja mikroba omogućuju vlastitim obrambenim snagama organizma da lakše suzbiju infekciju.

Baktericidna sredstva (penicilini, ciklosporini, aminoglikozidi) izravno ubijaju mikrobe i mogu izliječiti infekciju i kada se bolesnikov organizam ne može sam braniti.

Od antibiotika su u radu obrađeni cefdinir i nitrofurantoin. [10]

2.2. Farmaceutici u vodama

Nakon primjene, farmaceutski aktivni spojevi (PhAC) se izlučuju kroz jetru ili bubrege kao smjesa osnovnog spoja i metabolita koji su polarniji i hidrofilniji od izvornoga lijeka. Velik dio ovih tvari se ispušta u otpadne vode nepromijenjen ili u obliku razgradnih produkata koji se teško mogu ukloniti konvencionalnim postupcima obrade otpadnih voda.

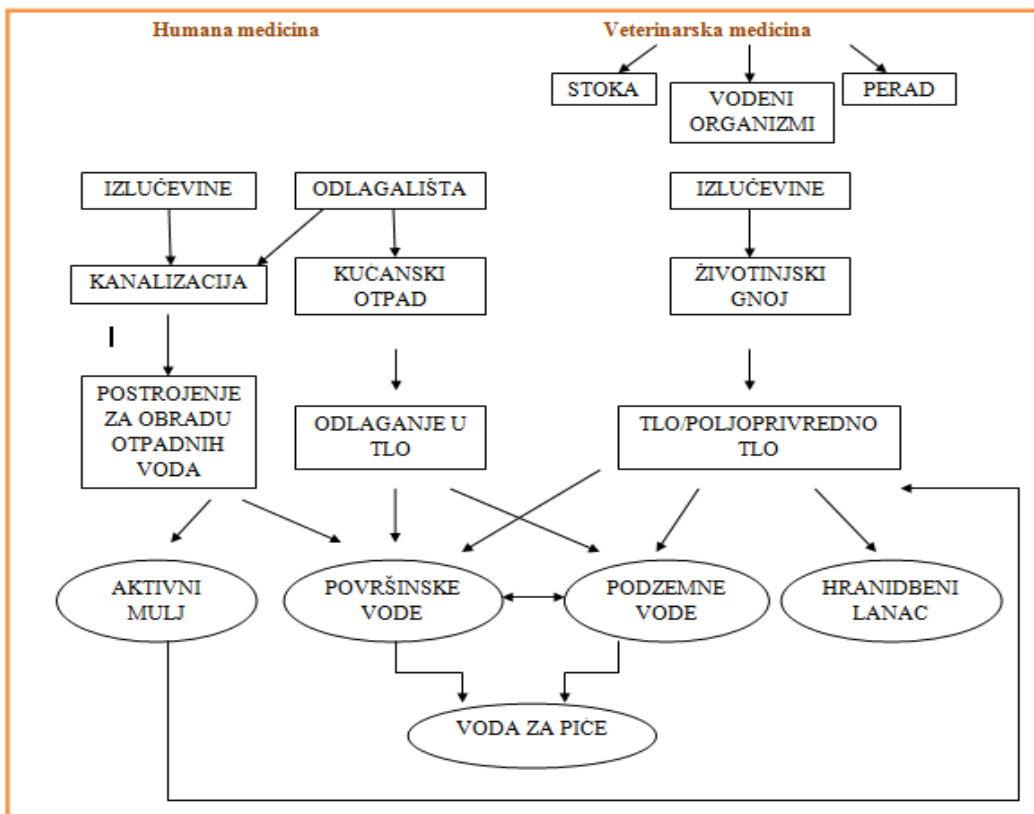
Ovisno o učinkovitosti obrade i kemijskom sastavu spoja, farmaceutski aktivne tvari mogu dospjeti u površinske, podzemne vode, more i tlo (Slika 1.). Kada farmaceutici dođu u okoliš dolazi do njihove razdiobe između različitih dijelova okoliša što podrazumijeva sorpciju i desorpciju te razgradnju koja može biti abiotička ili biotička. Razgradnja farmaceutika je od izuzetnog značaja s obzirom da nastaju novi spojevi koje nazivamo razgradnim produktima s bitno drugačijim fizikalnim, kemijskim i toksičnim svojstvima. Mogu nastati spojevi koji su toksičniji od osnovne komponente. [7]

Antibiotici i estrogene su samo dvije od brojnih vrsta farmaceutika za koje se sumnja da opstaju u okolišu, bilo zato što se ne mogu prirodno biološki razgraditi ili zbog njihova

trajnoga ispuštanja. U okolišu su najčešće prisutni diklofenak, paracetamol, ibuprofen, acetilsalicilna kiselina, atorvastatin i etinilestradiol. [11]

Iako je njihova količina u vodenim ekosustavima niska, njihovo kontinuirano ispuštanje može dovesti do dugoročnog potencijalnog rizika za vodene organizme. Stoga se nekoliko godina ovaj problem smatra jednim od „prioritetnih problema životne sredine“. [12]

Negativan učinak farmaceutika na vodni okoliš možemo objasniti na primjeru kontracepcijskih sredstava. Njihov glavni sastojak etinilestradiol (EE2), koji je vrsta estrogena, kod ljudi sprječava neželjenu trudnoću, ali kod životinja čini ozbiljne probleme. Nakon što fekalijama dospiju u otpadne vode, ti spojevi odlaze u okoliš jer često takve vode nisu dovoljno pročišćene. Gomilanje takvih spojeva uzrokuje poremećaje i deformacije u spolnom razvoju riba, vodozemaca, pa čak i ptica koje žive u blizini takvih odvoda. Kod riba je zamijećena feminizacija mužjaka, odnosno pojava ženskih spolnih karakteristika poput ženskih jajašaca. Zbog toga mužjaci postaju sterilni i ne sudjeluju u razvoju populacije. [13]

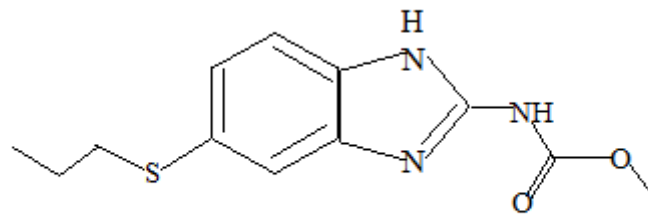


Slika 1. Glavni tokovi humanih i veterinarskih farmaceutika u okolišu [14]

2.3. Ispitivani farmaceutici

2.3.1. Albendazol

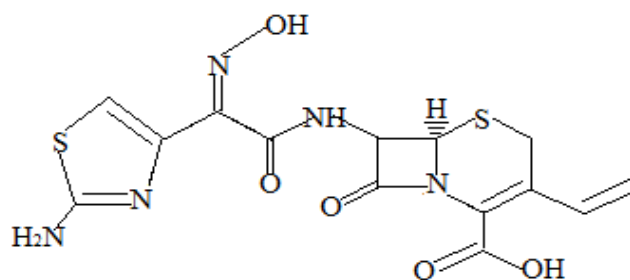
Albendazol je antihelmintik širokog spektra djelovanja iz grupe benzimidazola (Slika 2.). Ometa normalni metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u sva tri njegova razvojna stupnja. Posljedica toga je potrošnja endogenog glikogena u samih parazita te smanjeno stvaranje ATP-a. Teško je topljiv u vodi i zbog toga slabo i nepravilno apsorbira nakon oralne primjene. Iz probavnog trakta apsorbira se manje od 5 % albendazola. Apsorbirani lijek se u jetri meabolizira u albendazol–sulfonksid i veže za serumske bjelančevine. [15, 16]



Slika 2. Molekulska struktura albendazola

2.3.2. Cefdinir

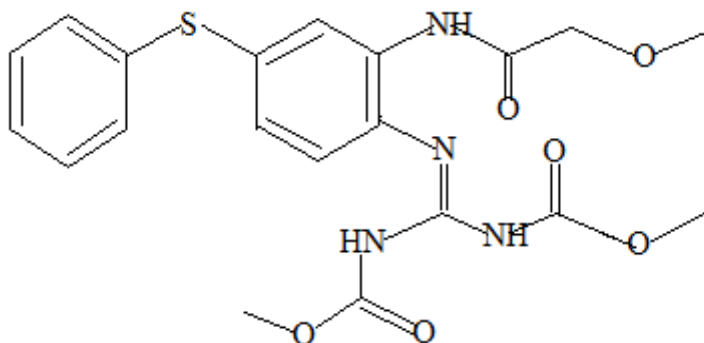
Cefdinir pripada trećoj generaciji cefalosporinskih antibiotika (Slika 3.). Primjenjuje se oralno i učinkovit je protiv širokog raspona bakterija (i Gram pozitivnih i Gram negativnih). Koristi se u liječenju upale srednjeg uha, akutnog kroničnog bronhitisa, faringitisa, bakterijske upale pluća te infekcija kože i mekih tkiva. [17]



Slika 3. Molekulska struktura cefdinira

2.3.3. Febantel

Febantel je probenzimidazol koji se nakon resorpcije iz crijeva, u jetri prevodi u djelatne metabolite (fenbendazol i oksfendazol) koji koče resorpciju i razgradnju hranjivih tvari endoparazita (Slika 4.). Febantel se koristi za liječenje i kontrolu gastrointestinalnih glista, plućnih nametnika i trakavica kod životinja. Polazni se fenbendazol sulfid vrlo lako oksidira u sulfoksidni metabolit oksfendazol, koji je isto tako važan antihelmintik. Svi se navedeni farmaceutici koriste isključivo u veterinarskoj medicini. [18]

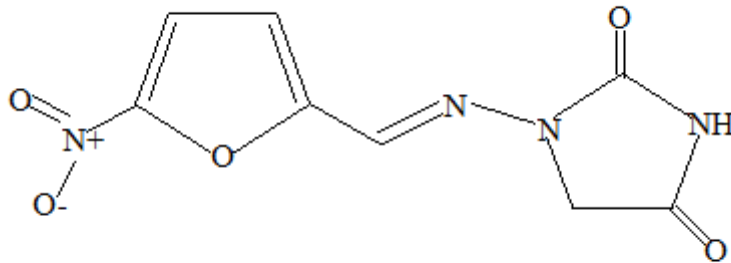


Slika 4. Molekulska struktura febantela

2.3.4. Nitrofurantoin

Nitrofurantoin je sintetički antibiotik koji je derivat nitrofurana (Slika 5.). Koristi se u ljudskoj i veterinarskoj medicini. Baktericidan je. Klinički je koristan protiv širok spektra Gram pozitivnih (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) i Gram negativnih (*Escherichia coli*, *Serratia sp.*, *Enterobacter*, *Klebsiella* i *Citrobacter*) bakterija. Mehanizam djelovanja mu se bazira na redukciji nitro grupe u amino unutar bakterija i oštećenju bakterijske DNK.

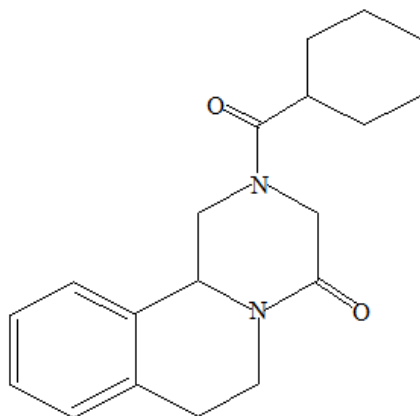
Koristi se za liječenje akutnih upala donjeg dijela mokraćnog sustava u trudnoći i općenito ginekologiji i za prevenciju upala mokraćnog sustava poslije kateterizacije ili kirurškog zahvata . Postoji samo kao oralni pripravak. Otpornost se skoro nikada ne razvija. [19]



Slika 5. Molekulska struktura nitrofurantoina

2.3.5. Prazikvantel

Prazikvantel je antihelmintik širokog spektra djelovanja (Slika 6.). Djeluje povećavajući permeabilnost nematoda za kalcij i tako izaziva mišićne kontrakcije i eventualno paralizu i smrt parazita. Također povećava osjetljivost parazita na imunološki obrambeni sustav domaćina. Učinkovit je protiv ehinokokoze. U terapijskim dozama nema farmakološko djelovanje kod ljudi. Oralno se brzo resorbira. Dobro se raspodjeljuje u sva tkiva (jetra, bubrež te u žuč). Dobro se metabolizira te se brzo izlučuje iz organizma, uglavnom u mokraći i to kao glukuronid ili sulfat. [20]



Slika 6. Molekulska struktura prazikvantela

2.4. Toksičnost farmaceutika u vodama

Jedan od najvažnijih zadataka zdravstvene ekologije je razvoj specifičnih preventivnih mjera kojima će se izloženost opasnim okolišnim čimbenicima svesti na prihvatljivu mjeru. U opasne okolišne čimbenike najčešće ubrajamo nusprodukte industrije ili poljoprivredne djelatnosti koje donose ekonomsku dobrobit zajednici. Nekontrolirano ispuštanje toksičnih tvari iz industrije može imati nesagledive posljedice na stanje okoliša. Uklanjanje tih nusprodukata je skupo, ali onečišćenje okoliša ugrožava i ljudsko zdravlje i proizvodnju. Zadatak epidemioloških studija i zdravstvene ekologije jest pronaći prihvatljivu ravnotežu između rizika za zdravlje i troškova prevencije izloženosti.

Toksičnost otpadnih voda ili ekotoksičnost se provodi kako bi se utvrdila eventualna štetnost dotoka otpadnih industrijskih voda u prirodne vodotokove. Može biti uzrokovana kemijskim, fizikalnim, biološkim parametrima ili njihovom kombinacijom. Do danas je razvijeno mnogo metoda utvrđivanja biološke toksičnosti voda, kao što su testovi na bakterijama, algama, biljkama, beskralješnjacima i ribama.

Test organizmi su biološki modeli (bioindikatori) na kojima se provodi praćenje djelovanja različitih toksičnih tvari, a najčešći oblik ispitivanja je mortalitet. Izbor bioindikatora ovisi o svrsi testa, specifičnostima ekosustava, karakteristikama otpadne vode i recipijenta, ali i mogućnostima laboratorija (Tablica 2.).

Biotestovi su eksperimentalne ekološke metode za određivanje granične vrijednosti tolerancije pri izlaganju test organizma utjecaju različitih toksičnih tvari. Osnova biotesta je

praćenje utjecaja koncentracijskog gradijenta otpadne vode u kontroliranim uvjetima među kojima je koncentracija otpadne vode jedina promjenjiva veličina. [21, 22]

Tablica 2. Pregled različitih vrsta standardnih bioindikatora [21]

	Test organizam	Metoda	Instrument	Princip
1.	Daphnia magna Straus (Crustacea)	HRN EN ISO 6431:2000 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 tricornutum	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	YTT (Dvoraček, Stilinović, 1997.)	Serum boce vol. 125 cm ³ , igle sa štrcaljkom, pH-metar, magnetna miješalica	Kvaščeve gljivice/inhibicija fermentacije i smanjenje količine nastalog CO ₂

Mnogo je parametara koji utječu na varijabilnost testova ekotoksičnosti:

- priroda ispitivanog uzorka
- fizikalni i kemijski uvjeti ispitivanja (salinitet, pH-vrijednost, provodnost itd.)
- procedura provođenja (protokol i uvježbanost)
- fizičko stanje organizma (dob, spol, uhranjenost).

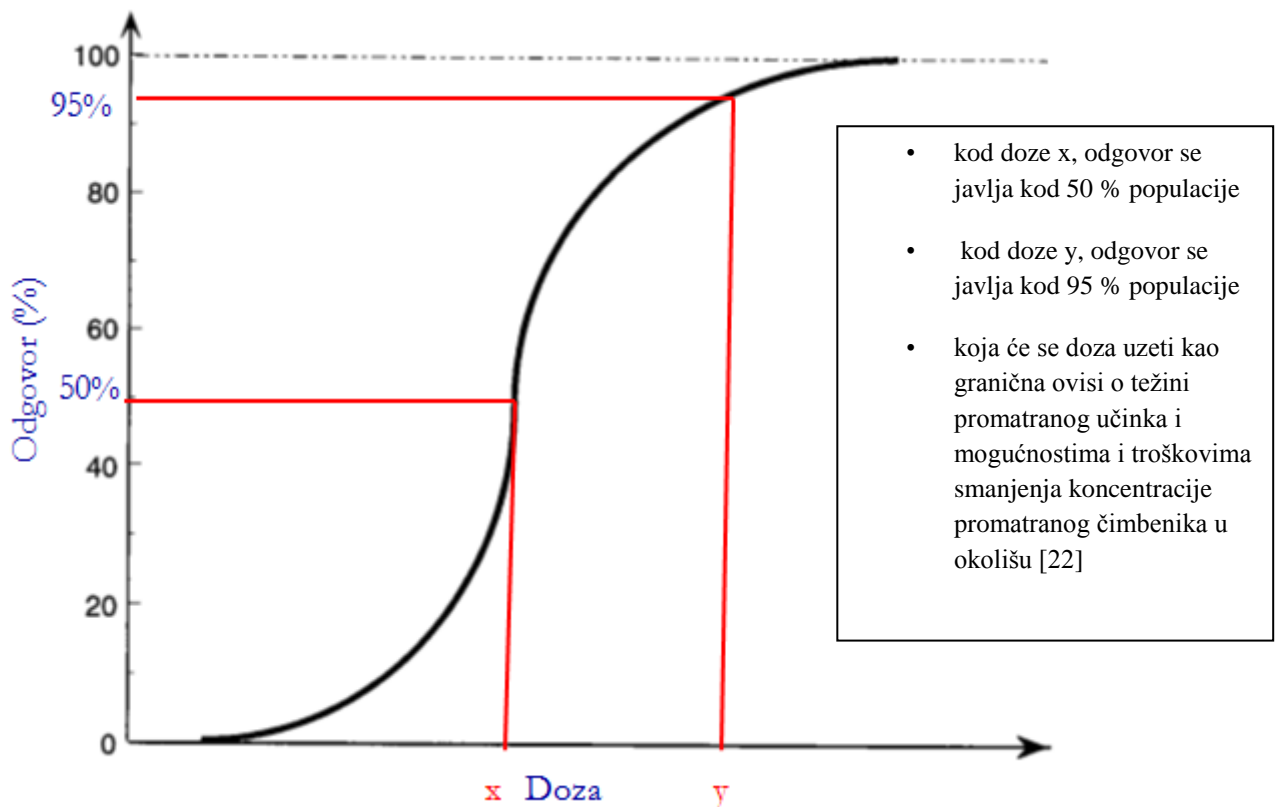
Postoje dvije vrste testova toksičnosti:

- akutni
- kronični.

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 rasta, ponašanja, reprodukcije i sl. Traje minimalno 7 dana. [22]

2.4.1. Krivulja toksičnosti

Krivulja toksičnosti (Slika 7.) pokazuje međuovisnost DOZE i ODGOVORA. Najčešće (kod normalne razdiobe) ima karakteristični oblik slova „S“. [22]



Slika 7. Krivulja toksičnosti (općenito)

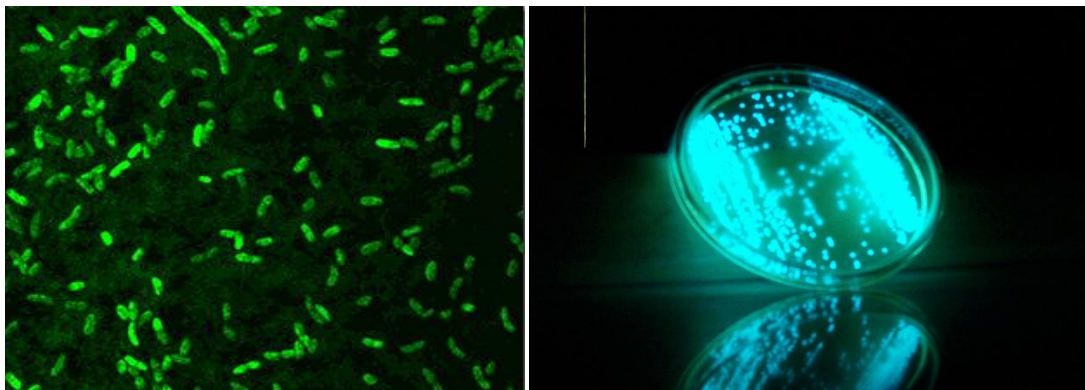
2.4.2. Bioluminiscentna metoda - DIN 38412-L-34

Za određivanje toksičnosti u ovom radu korištena je njemačka standardna metoda po DIN-u (DIN 38412-L-34). To je bioluminiscentna metoda koja se ubraja u testove kratkog trajanja i s

obzirom na vrijeme trajanja testa od 30 minuta ima veliku prednost u odnosu na ostale „*short term*“ metode koje obično traju 48 ili 96 sati. Kao test organizmi koriste se bakterije *Vibrio fischeri* za koje je karakteristično da prirodno emitiraju svjetlost ujednačenog intenziteta, danju i noću, kao normalni sastavni dio svog metabolizma. Uzrok tome je enzim luciferaza. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma nastalog kao posljedica djelovanja toksina. [21]

2.4.3. Luminiscentne bakterije – *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri su Gram negativne štapićaste bakterije koje su isključivo prisutne u morskom ekosustavu (Slika 8.). Imaju bioluminiscentna svojstva, heterotrofne su i pokreću se uz pomoć flagella. Slobodno su živuće jedinice koje žive kao saprofiti razlažući organsku tvar. Pretežno se nalaze u simbiozi s raznim ribama i glavonošcima. Zanimljiv primjer njihove simbioze pronalazimo u Tihom oceanu gdje bakterije žive unutar dvije različite životinje: noćnoj lignji vrste *Euprymna scolopes* i ribi vrste *Monocentris japonica* koja nastanjuje grebenska staništa. U lignji, koja se noću hrani blizu morske površine, jedan soj ove vrste bakterija sačinjava svjetlosni organ koji oponaša mjesečevu svjetlost i služi joj kao zaštita od gladnih predatora u vodama ispod nje. U grebenske ribe, drugi soj bakterije formira svjetlosni organ unutar čeljusti i pomaže pri osvjetljavanju tamnih dijelova grebena kojima se riba noću kreće u potrazi za hranom. [22, 23]



Slika 8. Bakterije *Vibrio fischeri*

2.4.4. Definicije vezane za toksičnost

Svaka analitička metoda podrazumijeva definiranje određenih fizikalno-kemijskih veličina koje se u tom slučaju ispituju. Tako je prilikom određivanja toksičnosti potrebno odrediti početnu luminiscenciju bakterijske suspenzije kako bi kasnije mogli pratiti kako otopina ispitivanog farmaceutika, odnosno uzorka djeluje na ispitivanu bakterijsku kulturu. Nakon toga se uz pomoć gotovih matematičkih izraza računa postotak inhibirane kulture nakon određenog vremena što nam ujedno i predstavlja os ordinatu na grafu toksičnosti otopine određenog farmaceutika dok je na apscisi logaritam koncentracije otopine farmaceutika.

Iz grafa se kasnije očitaju vrijednosti EC20 i EC50 koje uzrokuju 20 %, odnosno 50 % inhibicije 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

$$fK = l_tK/l_0K$$

l_c – ispravljeni fK

$$l_c = fK \times l_0$$

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

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

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

EC20 – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 20 % inhibicije.

EC50 – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50 % inhibicije

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

KEMIKALIJE	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
natrijev klorid	NaCl	p.a.	Lach-ner, Češka
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	p.a.	Lach-ner, Češka
kalij dihidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcij klorid	CaCl ₂	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcij karbonat	CaCO ₃	p.a.	Kemika, Hrvatska
magnezij sulfat	MgSO ₄	p.a.	T.T.T., Hrvatska
cink sulfat heptahidrat	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	p.a.	Lach-ner, Češka
Metanol	CH ₃ OH	HPLC čistoća	J.T. Baker, Nizozemska
D-glukoza	C ₆ H ₁₂ O ₆	p.a.	Lach-ner, Češka
Agar	C ₁₄ H ₂₄ O ₉	p.a.	Liofilchem, Italija
kvaščevo ekstrakt	C ₁₉ H ₁₄ O ₂	p.a.	Biolife, Italija
Pepton	-	p.a.	Biolife, Italija
D(+) - rafinoza pentahidrat	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	99 %	Alfa Aesar, Njemačka

3.1.2. Fizikalno – kemijska svojstva ispitivanih farmaceutika

Tablica 4. Podatci o korištenim farmaceuticima

Farmaceutik	Molekulska formula	CAS broj	Mw, g/mol	Topljivost, mg/L	Čistoća	Proizvođač
Albendazol	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	54965-21-8	265,33	40,76	99 %	Veterina d.o.o.
Cefdinir	C ₁₄ H ₁₃ N ₅ O ₅ S ₂	91832-40-5	395,41	180,1	≥95 %	Sigma Aldrich
Febantel	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S	58306-30-2	446,48	33,92	≥99 %	Veterina d.o.o.
Nitrofurantoin	C ₈ H ₆ N ₄ O ₅	67-20-9	238,16	1382	98 %	Acros Organics
Prazikvantel	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂	55268-74-1	312,41	88,38	≥99 %	Veterina d.o.o.

3.2. Instrumenti za provedbu toksičnosti [24]

Toksičnost je određivana na mjernom instrumentu LUMIStox 300 s bakterijama koje imaju sposobnost luminiscencije (Slika 9.).

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 9. Uređaj za provedbu toksičnosti (LUMIStox 300)

3.3. Metode rada [24]

3.3.1. Priprema hranjive podloge

Sve sastojke (Tablica 5.) 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 do vrenja, zagrijati direktno na azbestnoj mrežici nad plamenikom. Čim dođe do vrenja treba

odmah maknuti kako sadržaj ne bi iskipio. 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 izlijevanja 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).

Tablica 5. Sastav hranjive podloge

Sastojci	u 1000 mL
NaCl	30 g
Agar	15 g
Glicerol	10 g
CaCO ₃	5 g
Pepton	5 g
Kvašćev ekstrakt	3 g

3.3.2. Priprema otopine za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture. U destiliranoj vodi otope se sastojci (Tablica 6.). Otopina se prokuha, ohladi i profiltrira. Sterilizira se u autoklavu.

Tako pripremljena čuva se u hladnjaku na 4 °C do 2 tjedna ili do pojave zamućenja, a može se i smrznuti u manjim bočicama (100 mL) i duže očuvati. Unaprijed priređena i sterilizirana otopina mineralnih sastojaka i glicerola (bez šećera) može se čuvati neograničeno dugo, a šećeri se u njoj otope prije uporabe.

Tablica 6. Sastav otopine za resuspenziju

Sastojci	u 1000 mL
NaCl	36 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
Glicerol	0,5 mL
Glukoza	10 g
Rafinoza	10 g

3.3.3. Priprema standardnih i radnih otopina

Otopina standarda za provjeru valjanosti bakterijske suspenzije priprema se kao otopina masene koncentracije 25 mg/L odvagom soli $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 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.

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).

Temeljna standardna otopina 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 od 100 ppm pripremaju se u redeioniziranoj MiliQ vodi.

Odvage svakog farmaceutika na preciznoj analitičkoj vagi iznosile su:

$$m(\text{albendazol}) = 0,0060 \text{ g}$$

$$m(\text{cefdinir}) = 0,0020 \text{ g}$$

$$m(\text{febantel}) = 0,00205 \text{ g}$$

$$m(\text{nitrofurantoin}) = 0,0020 \text{ g}$$

$$m(\text{praziquantel}) = 0,00203 \text{ g}$$

3.3.4. Aktivacija liofiliziranih bakterija

Bakterijsku suspenziju pripremamo sterilnom tehnikom rada. Upali se plamenik (oksidirajući plamen), a radna se površina pobriše etanolom. To se izvodi jako pažljivo da se nešto ne bi zapalilo budući da se radi u blizini plamenika. Pripremi se sav potreban pribor. Prema propisu, priprava suspenzije se mora odvijati brzo. U kivetu koja je netom izvađena iz zamrzivača pipetira se izvađena otopina za resuspenziju (na temperaturi najviše do 8 °C) te se pripravljena suspenzija dobro homogenizira na stolnoj mućkalici i stavi na 15 min na termostat koji je prethodno namješten na radnu temperaturu od 15 °C. Nakon 15 min 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 količinski ne zadovoljavaju naše metode analize, pripremljena suspenzija se koristi za uzgoj svježe bakterijske kulture.

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

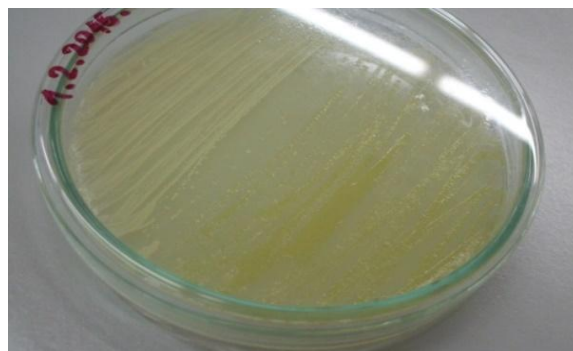
Kultura se održava u Petrijevim zdjelicama na temperaturi od 15 °C do 22 °C uz temperaturni optimum od 18 °C. Petrijeva posuda se postavi poklopcem prema dolje zbog kondenzacije vlage na stjenkama stakla. Pri navedenim uvjetima, kultura je upotrebljiva najmanje dva, a najviše devet dana od precjepljivanja. 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.

3.3.5. Priprema bakterijske suspenzije

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 10.), 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).

Nakon toga se kreće s radom i mjerenjima.



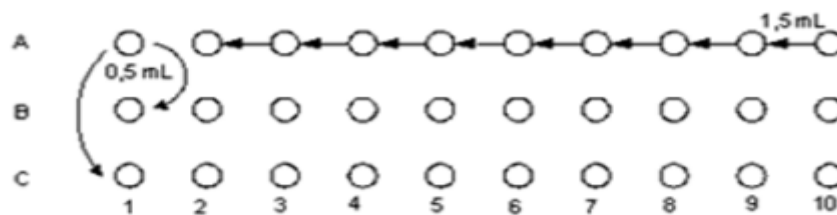
Slika 10. Hranjiva podloga sa vidljivim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (žute kolonije, kultura stara 2 dana)

3.4. Radni postupci

3.4.1. 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 11.).

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.



Slika 11. Geometrijski niz

3.4.2. Očitavanje rezultata

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 termostatiranom 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.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Budući da svi ispitivani farmaceutici (antihelmintici i antibiotici) imaju sve veću primjenu u svakodnevnom životu, oni često završavaju u otpadnim vodama. Zbog toga je potrebno ispitivanje i kontinuirano praćenje njihove toksičnosti. U ovom radu je ispitivana toksičnost čistih aktivnih supstanci farmaceutika albendazola, cefdinira, febantela, nitrofurantoina i prazikvantela. Ispitivanja čistih aktivnih supstanci se provode kako bi se lakše moglo pratiti kretanje njihovih metabolita i razgradnih produkata nakon što dospiju u otpadne vode, odnosno kako bi se moglo odrediti da li se njihova toksičnost povećala ili nije s obzirom na osnovnu tvar.

Toksičnost farmaceutika određivana je uz pomoć bakterija *Vibrio fischeri* koje su uzgajane na prethodno pripremljenim hranjivim podlogama. Za rad su se većinom koristile kulture starosti 2 dana nakon precjepljivanja budući da u tom periodu bakterijska suspenzija pokazuje optimalnu luminiscenciju.

Sama metoda određivanja toksičnosti farmaceutika je vrlo jednostavna, ali do problema je ponekad dolazilo u uzgajanju kultura bakterija *Vibrio fischeri* koje su bez pravila ponekad svijetlile, a ponekad ne. Za takvo ponašanje se nije moglo naći objašnjenje budući da su uvjeti rada uvijek bili isti. Pripremljena hranjiva podloga uvijek je bila istog sastava, prije precjepljivanja bi se hranjiva podloga uvijek nakapala s nekoliko kapi NaCl-a kako bi se bakterijske kulture lakše rasporedile *cik-cak* potezima i jednostavno zbog toga što takve bakterije isključivo obitavaju u morskom okolišu tako da im je veća količina NaCl-a i potrebna. Optimalna temperatura njihovog rasta je također uvijek bila jednaka, a iznosila je 18 °C. Iz svega toga je ponekad proizlazila odlična luminiscencija pripremljene bakterijske suspenzije, a ponekad bakterijska suspenzija jednostavno nije bila iskoristiva za rad što je onda uključivalo ponovno aktiviranje liofiliziranih bakterija, njihovo precjepljivanje na hranjivu podlogu i čekanje da bakterijska kultura ponovno izraste.

U radu je prvo 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.

Najmanja koncentracija otopine farmaceutika je bila razrijeđena 128x (0,78 ppm-ska otopina), a najveću koncentraciju je imala originalna otopina farmaceutika, odnosno radna otopina (100

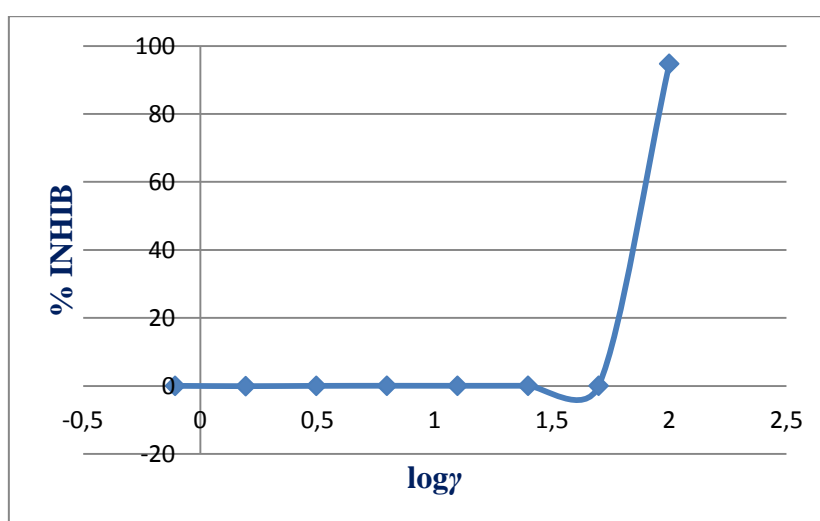
ppm, izuzev albendazola čija je radna otopina imala koncentraciju od 300 ppm) koja je bila pripremljena otapanjem izračunate količine temeljne standardne otopine u MiliQ vodi.

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

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 (Slika 12.). To se provelo u cilju isključivanja potencijalnog utjecaja otapala na proces provedbe toksičnosti testa izlažući bakterijsku suspenziju različitim koncentracijama otapala.

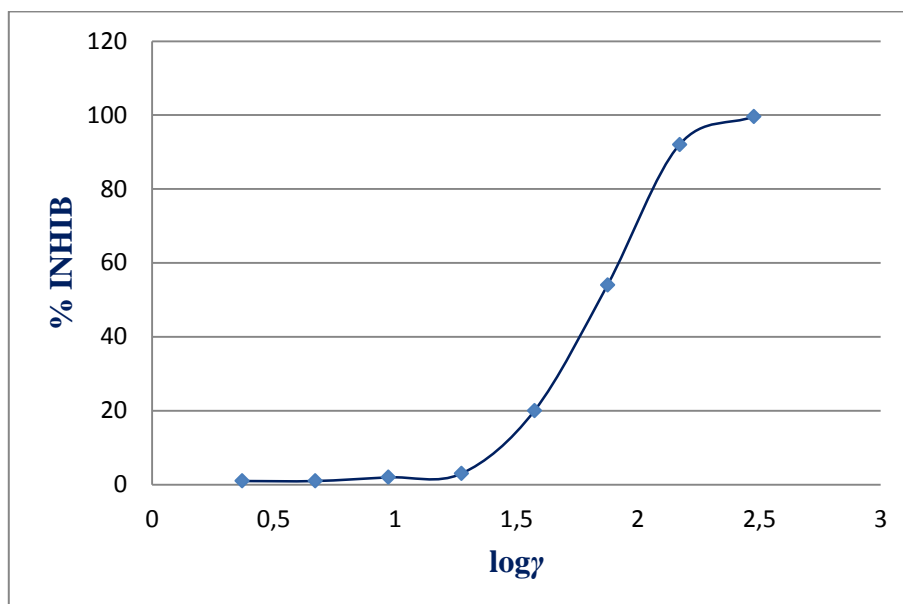
Sva ispitivanja na pojedinim farmaceuticima provedena su dva puta radi provjere ponovljivosti. Uz grafove, tablično su navedene i vrijednosti EC20 i EC50 za svako mjerenje koje predstavljaju koncentracije uzorka u testu koje uzorkuju 20 %, to jest 50 % inhibicije prisutnih bakterija *Vibrio fischeri*. 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 dat i prikaz tablice sa srednjim vrijednostima EC20 i EC50 koje su izračunate na temelju provedenih mjerenja.



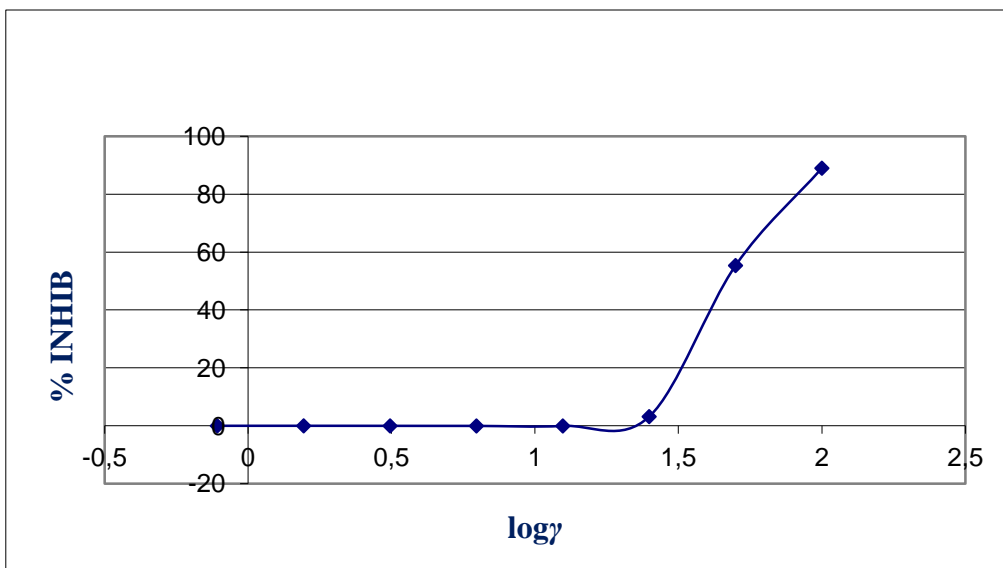
Slika 12. Graf toksičnosti otopine metanola

Slika 13 prikazuje graf toksičnosti otopine albendazola početne koncentracije 300 ppm. Iz grafa je vidljivo kako je u čitavom području razrjeđenja prisutna inhibicija bakterijske kulture, s tim da se ona, kako se povećavamo prema manjim razrjeđenjima također povećava tako da 300 ppm-ska otopina uzrokuje inhibiciju gotovo čitave bakterijske kulture.



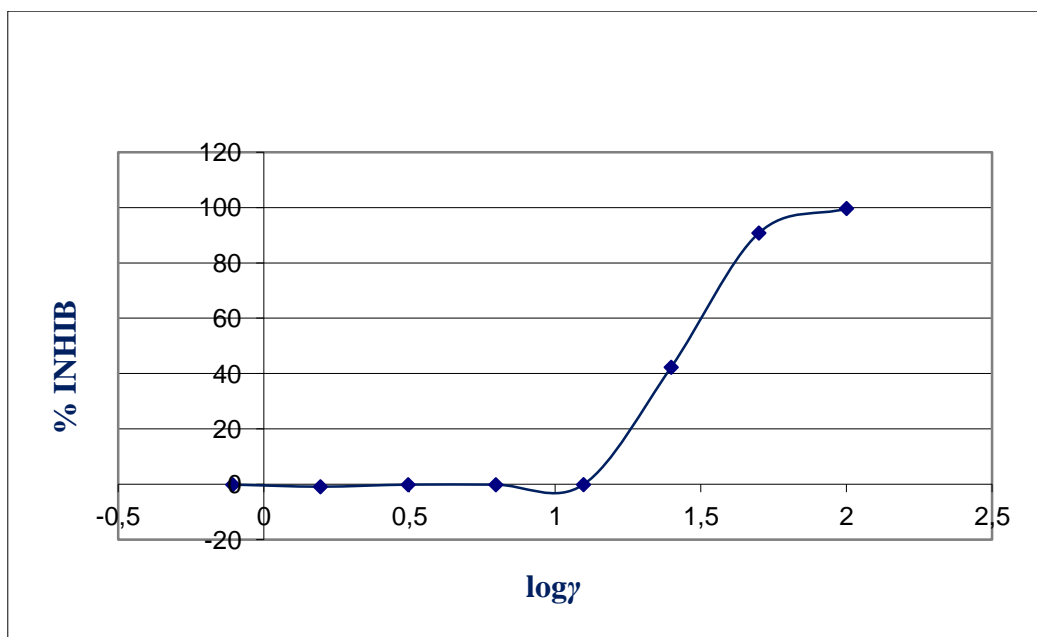
Slika 13. Graf toksičnosti otopine albendazola

Slika 14 prikazuje graf toksičnosti otopine cefdinira. Iz grafa je vidljivo da veća razrjeđenja ne utječu na inhibiciju testirane bakterijske suspenzije dok manja razrjeđenja, kako se sve više približavamo originalnom uzorku farmaceutika (100 ppm), uzrokuju sve veću inhibiciju koja se očituje u smanjenju luminiscencije bakterija *Vibrio fischeri*.



Slika 14. Graf toksičnosti otopine cefdinira

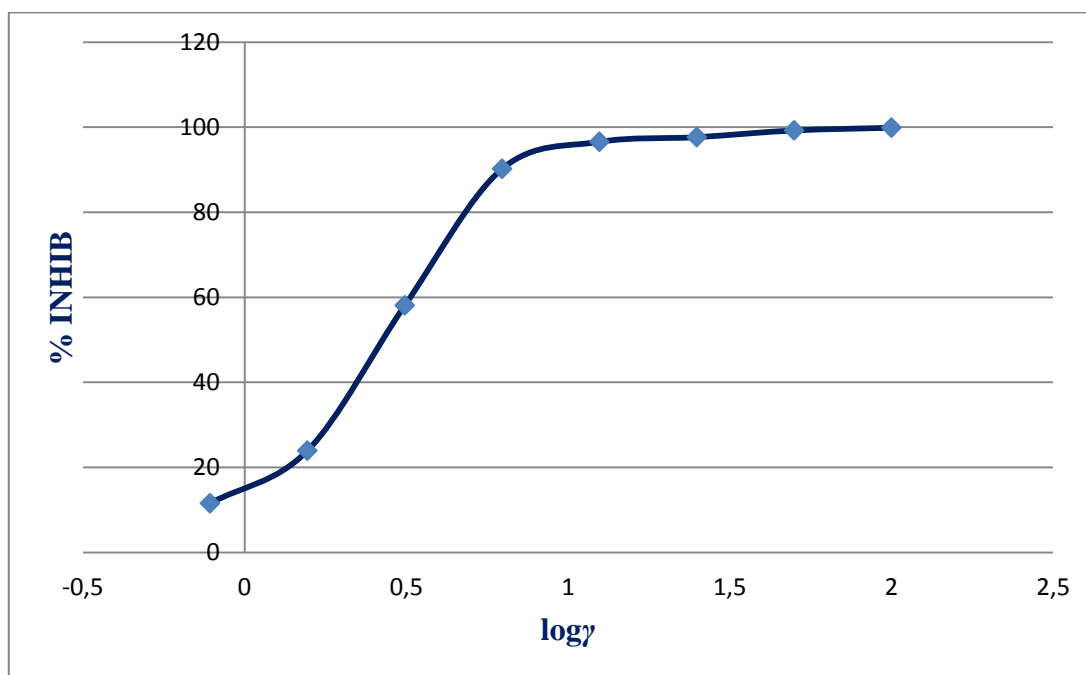
Slika 15 prikazuje graf toksičnosti otopine febantela gdje na krivulji toksičnosti vidimo kako veća razrjeđenja također ne utječu na inhibiciju testiranih organizama kao i kod ispitivanja toksičnosti cefdinira, dok veće koncentracije farmaceutika uzrokuju inhibiciju bakterijske suspenzije tako da originalna otopina farmaceutika koncentracije 100 ppm uzrokuje inhibiciju bakterijske suspenzije gotovo 100%.



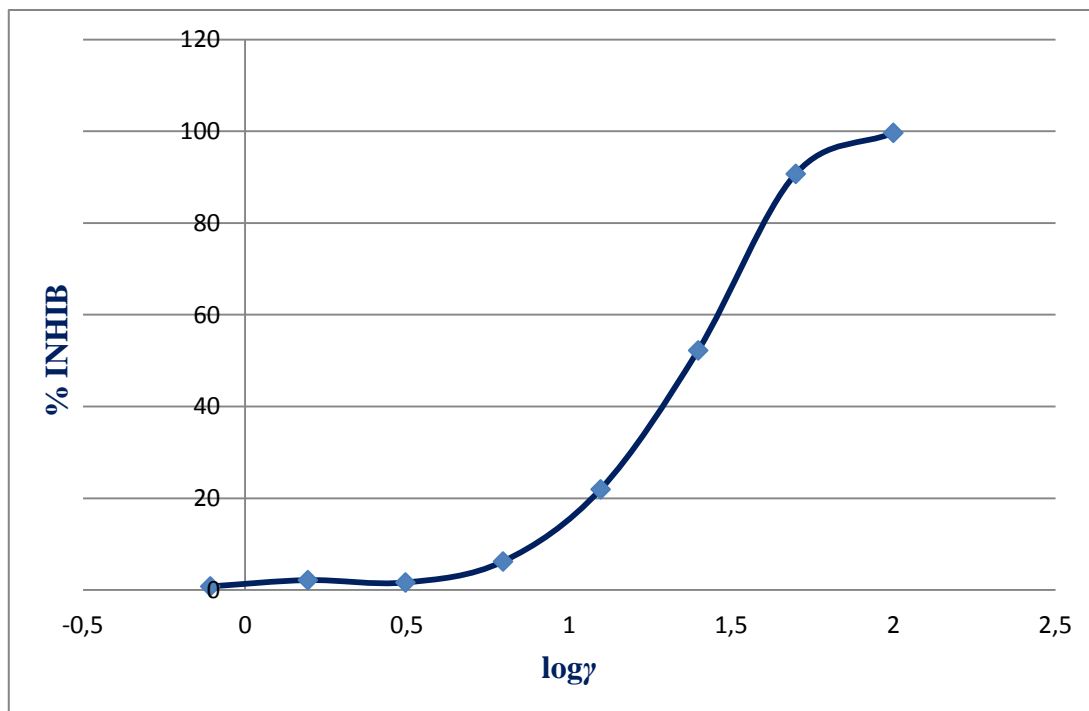
Slika 15. Graf toksičnosti otopine febantela

Na Slikama 16 i 17 prikazani su grafovi toksičnosti za otopine nitrofurantoina i prazikvantela. Od svih promatranih grafova, krivulja toksičnost za nitrofurantoin pokazuje najveći porast tako da čak i otopina masene koncentracije od 0,78 ppm (razrijeđeno 128x obzirom na original od 100 ppm) uzrokuje inhibiciju od 11,56 % testiranih organizama dok se od 6,25 ppm-ske do 100 ppm-ske otopine nitrofurantoina inhibicija testiranih organizama povećava od 90 do 100 %.

Kod otopine prazikvantela krivulja toksičnosti prikazuje blaži porast s obzirom na krivulju toksičnosti otopine nitrofurantoina, ali opet vidimo da i jako velika razrjeđenja uzrokuju malu inhibiciju testiranih organizama. Tako otopina masene koncentracije od 0,78 ppm uzrokuje inhibiciju od 0,83 %.



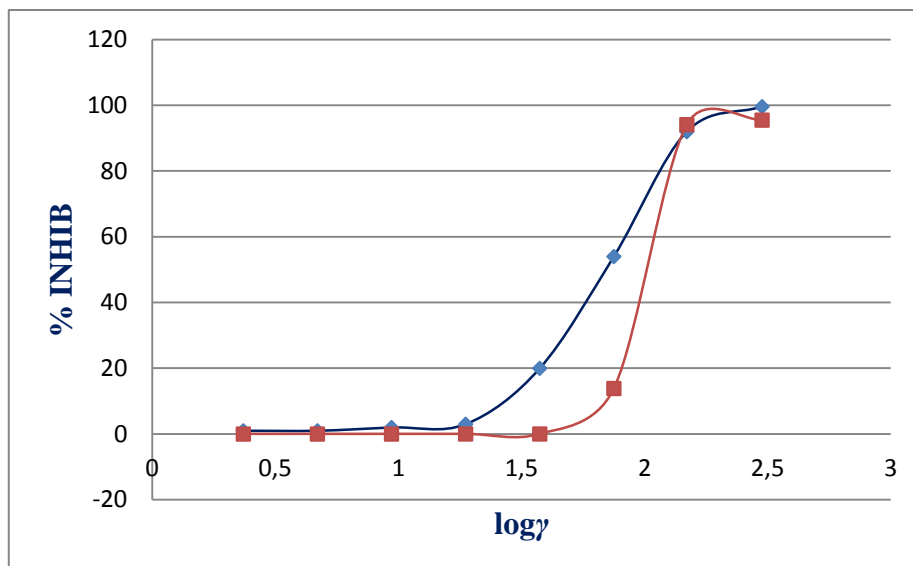
Slika 16. Graf toksičnosti otopine nitrofurantoina



Slika 17. Graf toksičnosti otopine prazikvantela

Ponovljivost rezultata je prikazana na Slikama 18, 19, 20, 21 i 22 dok se ispod svake slike nalaze i Tablice 7, 8, 9, 10 i 11 sa izmjerenim vrijednostima EC20 i EC50 izraženim u ppm-ima te RSD vrijednosti koje su izračunate s obzirom na broj mjerenja između dijelova krivulje koji odgovaraju onoj koncentraciji farmaceutika koja uzrokuje inhibiciju 20 %, odnosno 50 % ispitivane bakterijske populacije.

Odstupanja ukazuju na moguću nestabilnost bakterijske kulture prilikom mjerenja kroz duže vrijeme. Stoga su za sve farmaceutike ponovljena ispitivanja toksičnosti minimalno dva puta čime se htjela utvrditi i ponovljivost ispitivanja toksičnosti na *Vibrio fischeri* bakterijama.

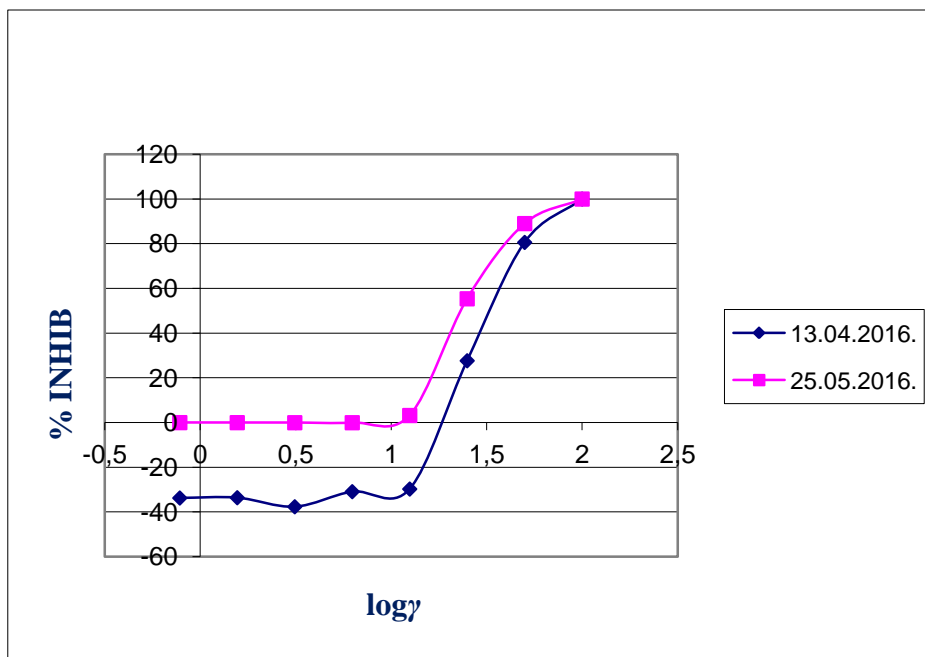


Slika 18. Graf usporedbe toksičnosti otopine albendazola

Tablica 7. Očitani EC20 i EC50 prilikom dva mjerenja toksičnosti otopine albendazola te izračunati RSD

Farmaceutik	Albendazol	
	EC20, ppm	EC50, ppm
Mjerenje		
1.	37,15	67,61
2.	83,18	100
RSD, %	51,8	27,3

Iz Tablice 7 vidimo veća odstupanja u mjerenju između koncentracija koje uzrokuju inhibiciju 20 % bakterijske kulture u iznosu od 51,8 %. To odstupanje možemo primijetiti i na grafu gdje su krivulje prvog i drugog mjerenja podosta udaljene dok se u području koncentracija koje uzrokuju inhibiciju 50 % bakterijske kulture one počinju približavati jedna prema drugoj i izračunato odstupanje iznosi 27,3 %.

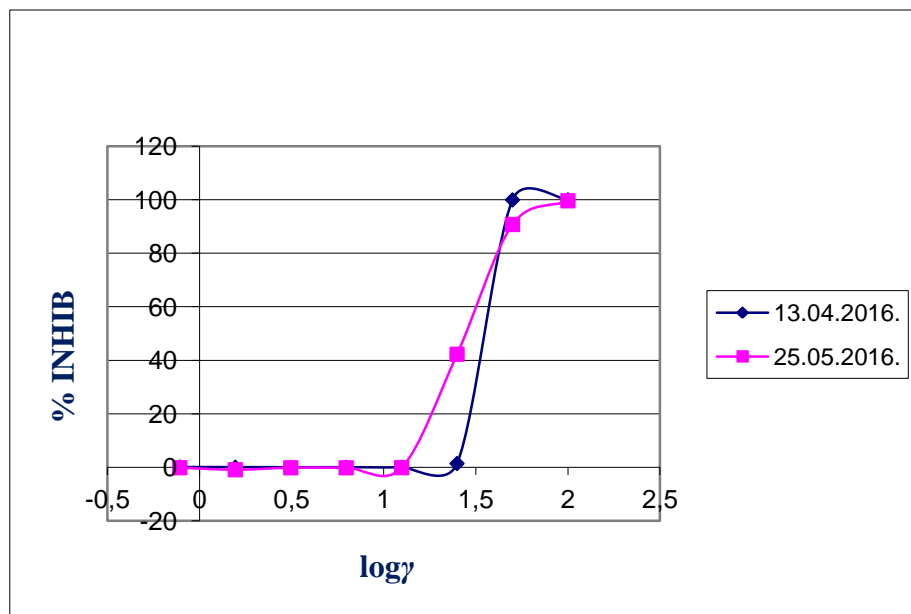


Slika 19. Graf usporedbe toksičnosti otopine cefdinira

Tablica 8. Očitani EC20 i EC50 prilikom dva mjerenja toksičnosti otopine cefdinira te izračunati RSD

Farmaceutik	Cefdinir	
	EC20, ppm	EC50, ppm
Mjerenje		
1.	23,44	32,36
2.	16,6	22,39
RSD, %	24,2	25,8

Kod izvršenih mjerenja toksičnosti otopine cefdinira, odstupanja između one koncentracije farmaceutika koja uzorkuje inhibiciju 20 % i 50 % ispitivane bakterijske kulture su dosta slična i iznose 24,2 % za EC20 i 25,8 % za EC50. Veća odstupanja mogu se pripisati nestabilnosti bakterijske kulture tijekom mjerenja.

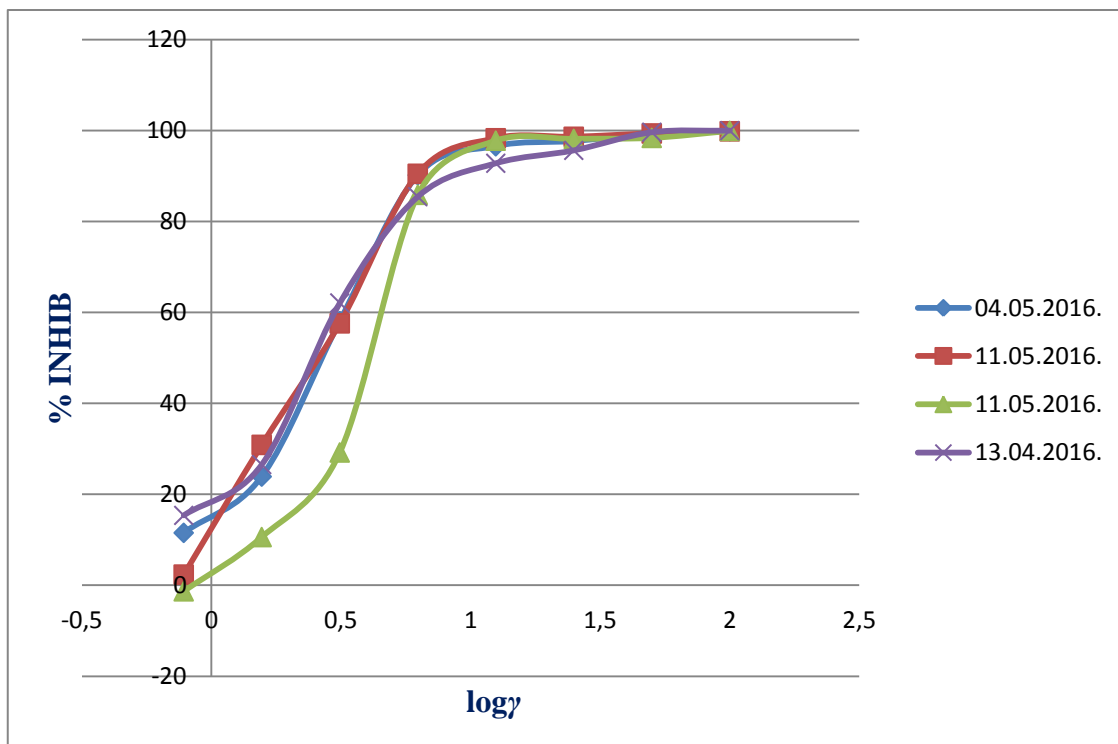


Slika 20. Graf usporedbe toksičnosti otopine febantela

Tablica 9. Očitani EC20 i EC50 prilikom dva mjerenja toksičnosti otopine febantela te izračunati RSD

Farmaceutik	Febantel	
	EC20, ppm	EC50, ppm
Mjerenje		
1.	29,51	31,62
2.	17,78	25,12
RSD, %	35,1	16,2

Prvo i drugo mjerenje otopine febantela pokazuje da je odstupanje između koncentracija koje uzrokuju inhibiciju 20 % bakterijske kulture skoro 2 puta veće od odstupanja između koncentracija koje uzrokuju inhibiciju 50 % bakterijske kulture. Iz grafa je vidljivo kako idemo prema većim koncentracijama da su i odstupanja između krivulja pojedinog mjerenja sve manja.

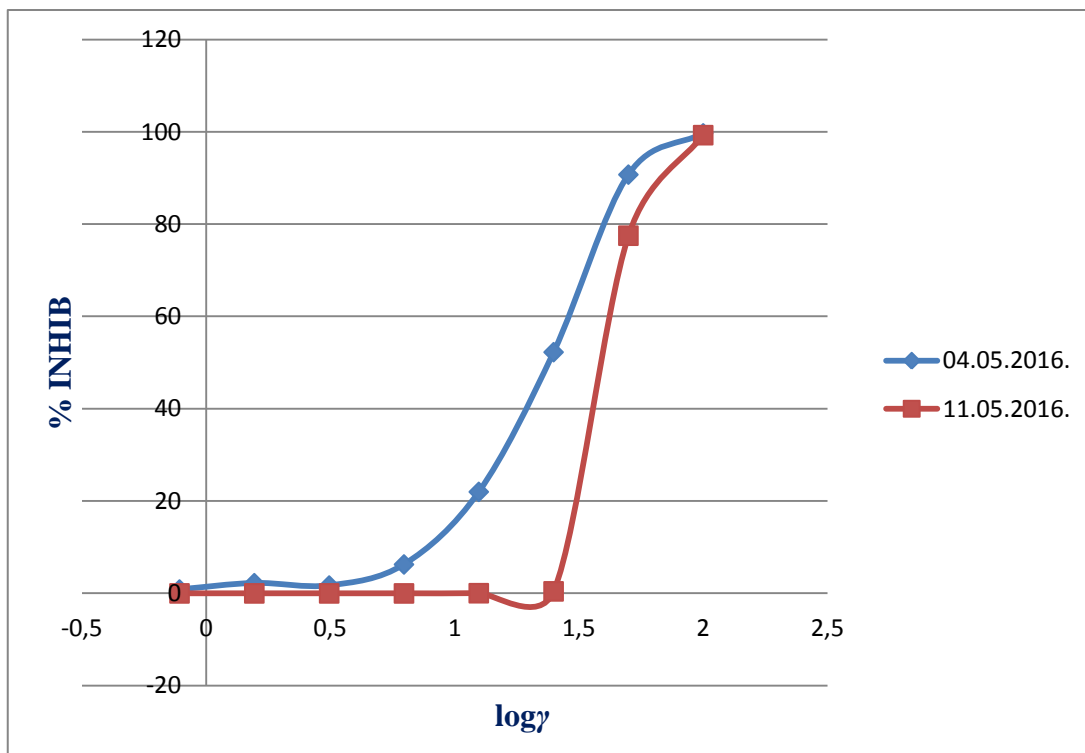


Slika 21. Graf usporedbe toksičnosti otopine nitrofurantoina

Tablica 10. Očitani EC20 i EC50 prilikom četiri mjerenja toksičnosti otopine nitrofurantoina te izračunati RSD

Farmceutik	Nitrofurantoin	
	EC20, ppm	EC50, ppm
Mjerenje		
1.	1,12	2,09
2.	1,29	2,63
3.	1,17	2,45
4.	2,51	3,98
RSD, %	43,5	29,6

Tablica 10 prikazuje kako je tijekom određivanja toksičnosti otopine nitrofurantoina jako veliko odstupanje između koncentracija koje uzrokuju inhibiciju 20 % bakterijske kulture i ono iznosi 43,5 %. Kako idemo prema višim koncentracijama, vrijednost odstupanja se smanjuje tako da odstupanje između koncentracija koje uzrokuju inhibiciju 50 % bakterijske kulture između četiri mjerenja iznosi 29,6 %.



Slika 22. Graf usporedbe toksičnosti otopine prazikvantela

Tablica 11. Očitani EC20 i EC50 prilikom dva mjerenja toksičnosti otopine prazikvantela te izračunati RSD

Farmaceutik	Prazikvantel	
	EC20, ppm	EC50, ppm
Mjerenje		
1.	11,22	24,55
2.	29,51	38,90
RSD, %	63,5	32,0

Kod otopine prazikvantela vidimo najveće odstupanje tokom prvog i drugog mjerenja između onih koncentracija koje uzrokuju inhibiciju 20 % bakterijske kulture u iznosu od 63,5 %. Ukoliko usporedimo sa odstupanjima kod ostalih otopina farmaceutika između koncentracija koje uzrokuju istu inhibiciju od 20 %, vidimo da je odstupanje kod otopine prazikvantela najveće. Što se tiče odstupanja između koncentracija koje uzrokuju inhibiciju 50 % bakterijske populacije, ono je također veće i iznosi 32,0 %.

U Tablici 12 navedene su srednje vrijednosti EC20 i EC50 za sve otopine ispitivanih farmaceutika. EC20 i EC50 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 četiri mjerenja budući da je on u odnosu na ostale farmaceutike pokazivao najveću toksičnost i pri manjim koncentracijama, odnosno pri većim razrjeđenjima.

EC se očitavao iz svake pojedine krivulje toksičnosti promatranog farmaceutika te su se za krajnji rezultat uzimale srednje vrijednost očitanih koncentracija u ppm odnosno u mg/L.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako nitrofurantoin pokazuje najveću toksičnost budući da je već pri masenoj koncentraciji od svega 1,52 ppm inhibirano 20 % bakterijske kulture dok je pri koncentraciji od 2,79 ppm inhibirano 50 % bakterijske kulture.

Albendazol pokazuje najmanju toksičnost jer je pri koncentraciji od 60,16 ppm inhibirano 20 % bakterijske kulture dok je pri koncentraciji od 83,8 ppm inhibirano 50 % bakterijske kulture.

Cefdinir, febantel i prazikvantel prikazuju slične rezultate pri kojima inhibira 20 %, odnosno 50% bakterijske populacije.

Tablica 12. Izračunate srednje vrijednosti EC20 i EC50 za svaki pojedini farmaceutik

	Farmaceutik	EC20, ppm	EC50, ppm
1.	Albendazol	60,16	83,8
2.	Cefdinir	20,02	27,38
3.	Febantel	23,65	28,37
4.	Nitrofurantoin	1,52	2,79
5.	Prazikvantel	20,37	31,73

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu određivana je toksičnost čistih aktivnih supstanci otopina farmaceutika albendazola, cefdinira, febantela, nitrofurantoina i prazikvantela u vodenim otopinama te se na temelju provedenih eksperimenata može zaključiti:

1. U ovom radu korištene su bakterije *Vibrio fischeri* koje su jako osjetljive na prisutnost organskih onečišćenja za određivanje toksičnosti antiparazitika i antibiotika koji se često koriste i u humanoj i u veterinarskoj medicinskoj praksi.

2. Nitrofurantoin od svih ispitivanih farmaceutika pokazuje najveću toksičnost budući da i pri izrazito niskim koncentracijama uzrokuje inhibiranje bakterijske kulture - EC50 kod 2,79 ppm.

3. Albendazol pokazuje najmanju toksičnost jer do inhibiranja bakterijske kulture dolazi pri visokim koncentracijama u usporedbi s ostalim ispitivanim farmaceuticima.

4. Cefdinir, febantel i prazikvantel pokazuju slične rezultate prilikom određivanja toksičnosti te pri jako velikim razrjeđenjima inhibiraju malo ili nimalo bakterijske kulture.

5. Kod ponovljivosti mjerenja uočavamo veća odstupanja između koncentracija koje uzrokuju 20 %, odnosno 50 % inhibicije ispitivane bakterijske kulture. Odstupanja se kreću, ovisno o ispitivanom farmaceutiku, između 16,2 i 63,5 %. Matematički gledano, radi se o velikim odstupanjima ako se promatraju postotci. Međutim, prilikom razvoja analitičkih metoda u kojima se koriste živi organizmi, vrlo je teško ostvariti preciznost u rezultatima prilikom ponovljenih mjerenja zbog nepredvidljivosti živih organizama koji se koriste u radu. Ukoliko u obzir uzmemo još i da su koncentracije farmaceutika bile vrlo niske i izražene u ppm, onda odstupanja i nisu toliko velika budući da je ppm-ske otopine inače vrlo teško detektirati te se veća odstupanja mogu time opravdati.

6. Određivanje toksičnosti pojedinih farmaceutika, odnosno njihovih čistih aktivnih supstanci je od izuzetne važnosti budući da zakonska regulativna za njihove maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) još nije uspostavljena te se na ovaj način može pratiti što se događa sa farmaceuticima nakon upotrebe prilikom dospijevanja u otpadne vode. U hrvatskom zakonodavstvu je potrebno uvođenja zakonske regulative koja definira maksimalno dopuštene koncentracije farmaceutika u okolišu, a sve u cilju što boljeg očuvanja okoliša, a naposljetku i ljudskog zdravlja.

6. LITERATURA

- [1] K. Trudeau, Prirodni lijekovi za koje „oni“ ne žele da vi znate, V.B.Z. studio, Zagreb, 2007., str.28.
- [2] V. Žerjav (2012). Utjecaj lijekova na okoliš i postupci zbrinjavanja. 12. Hrvatska konferencija o kvaliteti i 3. Znanstveni skup hrvatskog društva za kvalitetu, 396 – 397, <<https://issuu.com/kvaliteta.net/docs/rad47>> (pristup: lipanj 2016.)
- [3] Farmaceutici na: <http://www.inovativnaskola.eu/uploads/pracenje-stanja-okolisa.pdf> pristupljeno lipanj 2016.
- [4] G. Čogelja Čajo, V. Osrečki, S. Tomić, Utjecaj lijekova na okoliš, Kemija u industriji 59 (2010) 351-354.
- [5] Farmaceutici na: <http://www.hrzz.hr/default.aspx?id=78&pid=2353&rok=2014-09> pristupljeno lipanj 2016.
- [6] Potrošnja lijekova na: http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/%20-%20Tablica_2 pristupljeno lipanj 2016.
- [7] M. Kaštelan–Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str.75.
- [8] V. Kovačević, D.Vrsaljko, Formulacijsko inženjerstvo, Funkcionalna svojstva produkta, Nastavni materijal za predavanja na web stranici <https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/2012_-13_Nastavni_materijali_poglavlja_FUNKCIONALNA_SVOJSTVA_PRODUKTA_kolegija_Formulacijsko_inzenjerstvo_.pdf> (pristup: lipanj 2016.)
- [9] T. Milekić, Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.
- [10] Antibiotici na: <http://www.centarzdravlja.hr/zdrav-zivot/lijekovi/antibiotici/definicija> pristupljeno lipanj 2016.
- [11] Prisutnost lijekova na: <http://www.hdkvaliteta.hr/file/document/documentFile/vesna-zerjav-potrosnja-lijekova-postupci-zbrinjavanja-i-utjecaj-na-okolis.pdf> pristupljeno lipanj 2016.
- [12] Farmaceutici u okolišu na: http://www.cecra.dh.pmf.uns.ac.rs/pdfww2010/farmaceutici_tehnologije1.pdf pristupljeno lipanj 2016.
- [13] Učinak farmaceutika u okolišu na: http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8981/t_blank pristupljeno lipanj 2016.

- [14] I. Kaselj, Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2012.
- [15] Albendazol na: <http://www.stetoskop.info/antihelmintici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm> pristupljeno lipanj 2016.
- [16] A. Meena, K. Sharma, M. Kandaswamy, S. Rajagopal, R. Mullangi, Formulation development of an albendazole self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) with enhanced systemic exposure, *Acta Pharmaceutica* 62 (2012) 563-580.
- [17] J. Park, H. J. Park, W. Cho, K.-H. Cha, Y.-S. Kang, S.-J. Hwang, Preparation and characterization of amorphous cefdinir using spray-drying and SAS-process, *International Journal of Pharmaceutics* 396 (2010) 239-245.
- [18] Febantel na: <http://veterina.com.hr/?p=27654> pristupljeno lipanj 2016.
- [19] D. S. Patel, N. Sharma, M. C. Patel, B. N. Patel, P. S. Shrivastav, M. Sanyal, Quantitation of nitrofurantoin in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Acta Pharmaceutica* 63 (2013) 141-158.
- [20] Prazikvantel na: <http://www.stetoskop.info/antihelmintici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm> pristupljeno lipanj 2016.
- [21] S. Korunić-Košćina, M. Mioč, V. Bobić, Ekotoksičnost kao biološki pokazatelj onečišćenja rafinerijskih otpadnih voda, *Goriva i maziva* 42 (2003) 153-176.
- [22] S. Papić, Moderne analitičke tehnike u analizi okoliša, Toksičnost, nastavni materijali na web-u (2016).
- [23] *Vibrio fischeri* na: <http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=3> pristupljeno lipanj 2016.
- [24] I. Đurić, Uklanjanje farmaceutika naprednim oksidacijskim procesima, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2010.

7. DODATCI

7.1. Popis slika

- Slika 1.** Glavni tokovi humanih i veterinarskih farmaceutika u okolišu – **str. 5**
- Slika 2.** Molekulska struktura albendazola – **str. 6**
- Slika 3.** Molekulska struktura cefdinira – **str. 7**
- Slika 4.** Molekulska struktura febantela – **str. 7**
- Slika 5.** Molekulska struktura nitrofurantoina – **str. 8**
- Slika 6.** Molekulska struktura prazikvantela – **str. 9**
- Slika 7.** Krivulja toksičnosti (općenito) – **str. 11**
- Slika 8.** Bakterije *Vibrio fischeri* – **str. 12.**
- Slika 9.** Uređaj za provedbu toksičnosti (LUMIStox 300) – **str. 15**
- Slika 10.** Hranjiva podloga sa vidljivim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (žute kolonije, kultura stara 2 dana) – **str. 18**
- Slika 11.** Geometrijski niz – **str. 19**
- Slika 12.** Graf toksičnosti otopine metanola – **str. 21**
- Slika 13.** Graf toksičnosti otopine albendazola – **str. 22**
- Slika 14.** Graf toksičnosti otopine cefdinira – **str. 23**
- Slika 15.** Graf toksičnosti otopine febantela – **str. 23**
- Slika 16.** Graf toksičnosti otopine nitrofurantoina – **str. 24**
- Slika 17.** Graf toksičnosti otopine prazikvantela – **str. 25**
- Slika 18.** Graf usporedbe toksičnosti otopine albendazola – **str. 25**
- Slika 19.** Graf usporedbe toksičnosti otopine cefdinira – **str. 26**
- Slika 20.** Graf usporedbe toksičnosti otopine febantela – **str. 26**
- Slika 21.** Graf usporedbe toksičnosti otopine nitrofurantoina – **str. 27**
- Slika 22.** Graf usporedbe toksičnosti otopine prazikvantela – **str. 27**

7.2. Popis Tablica

Tablica 1. Ukupna potrošnja lijekova u 2014. Godini u RH izražena financijski, u kunama, po glavnim skupinama ATK klasifikacije – **str. 2**

Tablica 2. Pregled različitih vrsta standardnih bioindikatora – **str. 10 i 11**

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija – **str. 14**

Tablica 4. Podatci o korištenim farmaceuticima – **str. 14**

Tablica 5. Sastav hranjive podloge – **str. 16**

Tablica 6. Sastav otopine za resuspenziju – **str. 16 i 17**

Tablica 7. Očitani EC20 i EC50 prilikom dva mjerenja toksičnosti otopine albendazola te izračunati RSD – **str. 26**

Tablica 8. Očitani EC20 i EC50 prilikom dva mjerenja toksičnosti otopine cefdinira te izračunati RSD – **str. 27**

Tablica 9. Očitani EC20 i EC50 prilikom dva mjerenja toksičnosti otopine febantela te izračunati RSD – **str. 28**

Tablica 10. Očitani EC20 i EC50 prilikom četiri mjerenja toksičnosti otopine nitrofurantoina te izračunati RSD – **str. 29**

Tablica 11. Očitani EC20 i EC50 prilikom dva mjerenja toksičnosti otopine prazikvantela te izračunati RSD – **str. 30**

Tablica 12. Izračunate srednje vrijednosti EC20 i EC50 za svaki pojedini farmaceutik – **str. 31**

Životopis

Rođena sam 31.12.1994. 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. Od stranih jezika se koristim engleskim i talijanskim u govoru i pismu. Računalno sam pismena.