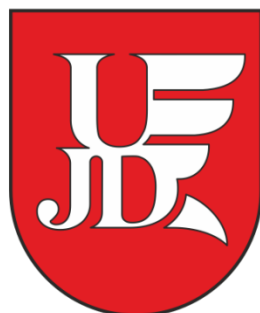


**Uniwersytet Humanistyczno – Przyrodniczy
im. Jana Długosza w Częstochowie
Wydział Nauk Ścisłych, Przyrodniczych i Technicznych**



mgr Marika Turek

**Wykorzystanie bioluminescencyjnych bakterii *A. fischeri* w badaniach
ekotoksyczności ksenobiotyków jonowych i niejonowych**

The use of bioluminescent bacteria *A. fischeri* in the study
of ionic and non-ionic xenobiotics

*Rozprawa doktorska przygotowana w Instytucie Chemii
Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana
Długosza w Częstochowie*

Promotor: **prof. dr hab. Piotr Bałczewski**

Promotor pomocniczy: **dr Ewa Różycka-Sokołowska**

Częstochowa 2022

*Składam najserdeczniejsze podziękowania
mojemu promotorowi, **Panu prof. dr hab.
Piotrowi Bałczewskiemu** za wieloletnią
współpracę i wprowadzenie w świat nauki oraz
za opiekę naukową i cenne uwagi w trakcie
realizacji niniejszej pracy doktorskiej.*

*Dziękuję **Pani dr Ewie Różyckiej-Sokołowskiej**
pełniącej rolę promotora pomocniczego
za niezastąpioną pomoc podczas realizacji badań
naukowych oraz motywację do krytycznego
spojrzenia na problematykę badawczą.*

***Pani dr hab. Barbarze Morzyk-Ociepie
prof. UJD**, kierownikowi studiów doktoranckich
dziękuję za wsparcie w okresie studiów.*



Składam podziękowania dla L'Oréal Polska, Polskiego Komitetu do spraw UNESCO, Ministerstwa Edukacji i Nauki oraz Polskiej Akademii Nauk za otrzymanie stypendium w 20. edycji programu L'Oréal Dla Kobiet i Nauki 2020 w kategorii doktoranckiej



Dziękuję również firmie Polpharma S.A. za przekazanie próbek farmaceutycznych substancji pomocniczych do badań ekotoksykologicznych.



Praca i badania naukowe częściowo finansowane z działalności statutowej dla młodych naukowców Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie w latach 2018, 2019, 2021 oraz ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach realizacji projektu badawczego Preludium 17 nr 2019/33/N/ST5/01602 w latach 2020-2023).

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	9
ABSTRACT	11
WYKAZ SKRÓTÓW.....	13

CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. KSENOBIOTYKI JONOWE I NIEJONOWE W ŚRODOWISKU	16
1.1. Ksenobiotyki jonowe: ciecze jonowe	16
1.2. Ksenobiotyki niejonowe: farmaceutyki	19
1.3. Ksenobiotyki niejonowe: farmaceutyczne substancje pomocnicze.....	23
2. BAKTERIE <i>ALIIVIBRIO FISCHERI</i> W BADANIACH EKOTOKSYCZNOŚCI KSENOBIOTYKÓW	26
2.1. Ciecze jonowe.....	27
2.2. Farmaceutyki.....	32
2.3. Mieszaniny cieczy jonowych i mieszaniny farmaceutyków.....	39
3. METODY QSAR W OCENIE RYZYKA ŚRODOWISKOWEGO	46
3.1. QSAR w analizie ekotoksyczności cieczy jonowych wobec bakterii <i>A. fischeri</i>	49
3.2. QSAR w analizie ekotoksyczności farmaceutyków wobec <i>A. fischeri</i>	54

BADANIA WŁASNE

CELE PRACY	57
1. BAKTERIE <i>ALIIVIBRIO FISCHERI</i> I TEST MICROTOX® W BADANIACH EKOTOKSYCZNOŚCI KSENOBIOTYKÓW	58
1.1. Amoniowe ciecze jonowe.....	60
1.1.1. Wstęp.....	60
1.1.2. Badania ekotoksykologiczne (test Microtox®)	63
1.1.2.1. GRUPA 1: Chiralne i achiralne halogenooctany amoniowe	64
1.1.2.2. GRUPA 2: 2,2'-Tiodioctany amoniowe	70

1.1.2.3. GRUPA 3: fenoksyoctany/(fenylotio)octany amoniowe	72
1.2. Antagonisty receptora angiotensyny II i substancje wypełniające.....	76
1.2.1. Wstęp.....	76
1.2.2. Badania ekotoksykologiczne (opracowanie modyfikacji testu Microtox®).....	82
1.2.2.1. CZĘŚĆ 1: ARBs i ich formułacje farmaceutyczne	86
1.2.2.1.1. Ekotoksyczność czystych substancji czynnych	86
1.2.2.1.2. Ekotoksyczność mas tabletkowych (substancji pomocniczych)	87
1.2.2.1.3. Ekotoksyczność mieszanin – wpływ substancji pomocniczych na toksyczność API	89
1.2.2.1.4. Ekotoksyczność mieszanin typu API-API w nieobecności substancji pomocniczych	92
1.2.2.1.5. Ekotoksyczność mieszanin typu API-API w obecności substancji pomocniczych	93
1.2.2.1.6. Zastosowane modele obliczeniowe.....	95
1.2.2.2. CZĘŚĆ 2: Substancje pomocnicze i ich mieszaniny	97
1.2.2.2.1. Ekotoksyczność pojedynczych substancji pomocniczych	97
1.2.2.2.2. Ekotoksyczność mieszanin typu API-substancja pomocnicza oraz substancja pomocnicza-substancja pomocnicza.....	104
1.2.2.2.2.1. Ekotoksyczność mieszanin walsartanu z substancjami pomocniczymi	106
1.2.2.2.2.2. Ekotoksyczność mieszanin losartanu z substancjami pomocniczymi	109
1.2.2.2.2.3. Ekotoksyczność mieszanin telmisartanu z substancjami pomocniczymi	110
1.2.2.2.2.4. Ekotoksyczność mieszanin wieloskładnikowych.....	112
2. METODY QSAR W OCENIE RYZYKA ŚRODOWISKOWEGO	114
2.1. Amoniowe ciecze jonowe	117

2.2. Antagonisty receptora angiotensyny II.....	121
3. WNIOSKI I PODSUMOWANIE	126

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Dane ogólne	129
2. Amoniowe ciecze jonowe.....	130
2.1. Procedura syntezy cieczy jonowych	130
2.2. Analizy otrzymanych związków	130
2.3. Procedura przeprowadzania standardowego testu Microtox®.....	137
3. Antagonisty receptora angiotensyny II i substancje wypełniające.....	138
3.1. Procedura ekstrakcji antagonistów receptora angiotensyny II i substancji wypełniających z tabletek.....	138
3.2. Analizy substancji czynnych.....	141
3.3. Procedura przeprowadzania zmodyfikowanego testu Microtox®.....	145
3.4. Obliczenia toksyczności mieszanin	147
3.5. Analiza statystyczna	148
DOROBEK NAUKOWY	160
LITERATURA	165
SPIS TABEL.....	182
SPIS SCHEMATÓW	184
SPIS RYSUNKÓW	185

*“How long is it going to take humans
to realize they are poisoning till death
the only planet they know
that can sustain life?”*

- C. Lodeiro, J. L. Capelo, E. Oliveira, C. Nunex,
Environ. Sci. Pollut. Res., **2016**, 23, 24419-24421

STRESZCZENIE

Ekotoksykologia jest prężnie rozwijającą się dziedziną nauki pozwalającą określić toksyczność badanych związków wobec organizmów bytujących w środowisku, a tym samym wpływ tych substancji na środowisko naturalne. Organizmami, które znajdują zastosowanie w badaniach ekotoksyczności są bioluminescencyjne bakterie *Aliivibrio fischeri*, pozwalające na określenie toksyczności ksenobiotyku w oparciu o mierzalny efekt zahamowania bioluminescencji.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie ekotoksyczności niezbadanych dotychczas ksenobiotyków jonowych (amoniowe ciecze jonowe) oraz niejonowych (farmaceutyczne substancje czynne (API) oraz substancje pomocnicze), z wykorzystaniem bakterii *Aliivibrio fischeri*, a także wyprowadzenie równań QSAR (z ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship*) pozwalających na powiązanie cech strukturalnych badanych grup związków z ich aktywnością wobec bakterii *A. fischeri*.

W wyniku przeprowadzonych badań określono wartości EC₅₀ (*A. fischeri*) dla jonowych ksenobiotyków o właściwościach herbicydowych z grupy chiralnych i achiralnych halogenooctanów, 2,2'-tiodioctanów oraz fenoksyoctanów i fenyltiooctanów amoniowych, a także wyprowadzono równanie QSAR pozwalające na ilościowe skorelowanie ekotoksyczności wobec bakterii *A. fischeri* z deskryptorami kwantowo-chemicznymi badanych związków amoniowych. Opracowany model QSAR umożliwia projektowanie jonowych związków herbicydowych o małej ekotoksyczności wobec organizmów wodnych, a zatem bezpieczniejszych dla środowiska.

Badania ekotoksykologiczne z zakresu ksenobiotyków niejonowych oparte były na grupie słabo rozpuszczalnych leków zwanych antagonistami receptora angiotensyny II (ARBs), ich formułacji farmaceutycznych, a także pojedynczych substancji pomocniczych stosowanych w tych formułacjach. Zbadano ekotoksyczność mieszanin: API-API, API-substancja pomocnicza oraz substancja pomocnicza-substancja pomocnicza i odniesiono ją do ekotoksyczności przewidywanej w oparciu o powszechne modele predykcyjne CA i IA. Opracowano również model QSAR dla grupy ARBs i pochodnych bifenyłowych, który pozwoli na wczesną ocenę ryzyka środowiskowego związaną z obecnością tych związków oraz ich pochodnych/metabolitów w ekosystemie. Warto podkreślić, że w przypadku słabo rozpuszczalnych w wodzie

substancji czynnych z grupy ARBs, badania te były możliwe do przeprowadzenia tylko dzięki opracowaniu w ramach tej pracy specjalnej modyfikacji komercyjnego testu Microtox®.

Uzyskane wyniki stanowią oryginalny wkład w stan wiedzy z zakresu ekotoksyczności substancji czynnych z grupy ARBs, których ekotoksyczność w odniesieniu do bakterii *A. fischeri* była do tej pory nieznana. Opracowana i opisana w niniejszej pracy modyfikacja testu Microtox® umożliwia badanie ekotoksyczności związków słabo rozpuszczalnych, w tym leków, wobec których zastosowanie standardowego protokołu wykorzystującego roztwory wodne było niemożliwe. Ponadto, badania ekotoksykologiczne przeprowadzone na grupie amoniowych cieczy jonowych mogą być przydatne do projektowania innych, podobnych strukturalnie związków herbicydowych o charakterze jonowym.

ABSTRACT

Ecotoxicology is a dynamically developing field of science that allows to determine the toxicity of tested compounds towards organisms living in the environment, and thus the impact of these substances on the natural environment. Examples of organisms that are used in ecotoxicity tests are bioluminescent bacteria *Aliivibrio fischeri*, which allow to determine toxicity of xenobiotics based on the measurable effect of inhibition of bioluminescence.

The main purpose of this doctoral dissertation was to determine the ecotoxicity of unexplored ionic xenobiotics (ammonium ionic liquids) and non-ionic ones (pharmaceutical active substances (API) and auxiliary substances), using the above-mentioned bacteria, and to derive the QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) equations allowing to link the structural features of the studied groups of compounds with their activity against *A. fischeri*.

As a result of the conducted research, the EC₅₀ values (*A. fischeri*) of ionic xenobiotics with herbicidal properties from the group of chiral and achiral ammonium haloacetates, 2,2'-thiodiacetates as well as phenoxyacetates and phenylthioacetates were determined. The QSAR equation was developed for quantitative correlation of ecotoxicity to *A. fischeri* with quantum-chemical descriptors of the tested ammonium compounds. As a result, the developed QSAR model will enable the design of ionic herbicidal compounds with low ecotoxicity to aquatic organisms, and therefore safer for the environment.

Ecotoxicological studies in the field of non-ionic xenobiotics were based on the poorly water-soluble drugs from the group of angiotensin II receptor blockers (ARBs), their pharmaceutical formulations, as well as individual excipients used in these formulations. The ecotoxicity of various API-API, API-excipient and excipient-excipient mixtures was tested and compared to ecotoxicity predicted using common CA and IA models. A QSAR model has also been developed for the group of ARBs and biphenyls, which will allow an early assessment of the environmental risk related to the presence of these compounds and their derivatives/metabolites in the ecosystem. It is worth emphasizing that in the case of poorly water soluble active substances from the ARBs

group, these tests were possible only thanks to the development of a special modification of the commercial Microtox® test as a part of this work.

The obtained results constitute an original contribution to the state of the art in the field of ecotoxicity of active substances from the ARBs group, towards *A. fischeri* bacteria, which so far was unknown. The modification of the Microtox® test, developed and described in this doctoral dissertation, allows ecotoxicity testing of poorly soluble compounds, including pharmaceuticals for which the application of a standard protocol using aqueous solutions was impossible. Moreover, ecotoxicological studies carried out on the group of new ammonium ionic liquids may be useful in designing other, structurally similar, ionic herbicidal compounds.

WYKAZ SKRÓTÓW

2,4-D - kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy

A. fischeri - *Aliivibrio fischeri*

API – (z ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*) – farmaceutyczna substancja czynna

ARBs – (z ang. *Angiotensin II Receptor Blockers*) – antagonisty receptora angiotensyny II

BCF – (z ang. *Bioconcentration Factor*) - współczynnik biokoncentracji

C. vulgaris - *Chlorella vulgaris*

CAN - kandesartan

D. magna – *Daphnia magna*

D. rerio – *Danio rerio*

DDD – Definiowana Dawka Dobowa

DMSO – sulfoksyd dimetylowy

E. coli – *Escherichia coli*

EC₅₀ – (z ang. *Effective Concentration*) – stężenie efektywne, w niniejszej pracy odnoszące się głównie do stężenia toksykanta powodującego 50% zahamowanie bioluminescencji populacji bakterii

GHS – (z ang. *Global Harmonised System*) globalnie zharmonizowany system klasyfikacji i oznakowania chemikaliów

H. incongruens – *Heterocypris incongruens*

HCT - hydrochlorotiazyd

ILs – (z ang. *Ionic Liquids*) – ciecze jonowe

IRB - irbesartan

logP – współczynnik podziału *n*-oktanol/woda

LOS-H – losartan w postaci kwasu

LOS-K – losartan w postaci soli potasowej

MCPA – kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy

MCPB - kwas 4-chloro-2-metylofenoksymaśłowy

MCP – kwas 4-chloro-2-metylofenoksypropionowy

MDR – (z ang. *Model Deviation Ratio*) – współczynnik charakteryzujący odchylenie wartości eksperymentalnej od przewidywanej

MLR – (z ang. *Multiple Regression Technique*) – metoda wielokrotnej regresji liniowej

model CA – (z ang. *Concentration Addition*) – model dodanych stężeń

model IA – (z ang. *Independent Action*) – model niezależnego działania

PNEC – (z ang. *Predicted No Effect Concentration*) - przewidywane stężenie niewywołujące skutków negatywnych

QASs – (z ang. *Quaternary Ammonium Salts*) – czwartorzędowe sole amoniowe

QSAR – (z ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship*) – model ilościowy zależności struktura-aktywność

S. capricornutum - *Selenastrum capricornutum*

SPTD – (z ang. *Solid Phase Test Diluent*) – roztwór (diluent) do testu fazy stałej

TEL - telmisartan

VAL - walsartan

CZEŚĆ LITERATUROWA

1. KSENOBIOTYKI JONOWE I NIEJONOWE W ŚRODOWISKU

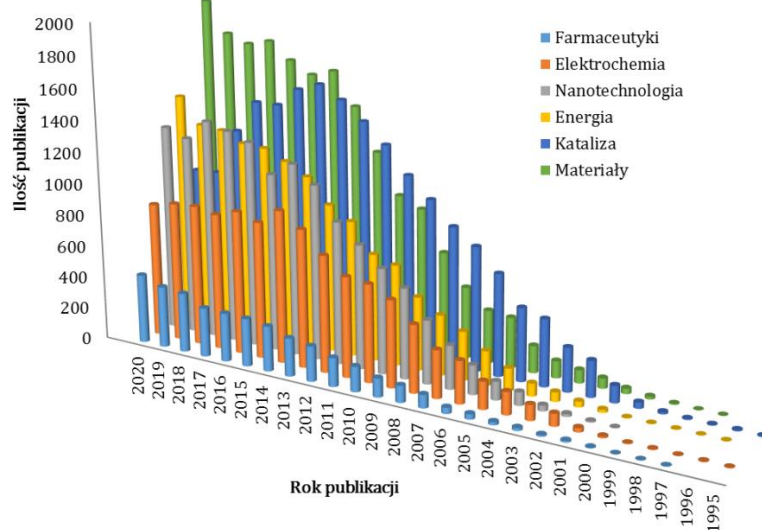
Ksenobiotyki definiowane są jako egzogenne (antropogenne) związki chemiczne niebędące naturalnym składnikiem żywego organizmu lub ekosystemu. ^[1] Obecność ksenobiotyków w środowisku jest skutkiem gwałtownego rozwoju naukowego i technologicznego, który powoduje nadmierne wykorzystywanie zasobów zakłócając naturalny ekosystem. ^[2] Głównymi grupami produktów zanieczyszczających ekosystem pochodzenia antropogennego są związki chemiczne stosowane w rolnictwie (np. herbicydy, insektycydy, nawozy) oraz w przemyśle (np. barwniki, rozpuszczalniki, węglowodory, dodatki do żywności, farmaceutyki), a także produkty odpadowe przy ich produkcji.

1.1. Ksenobiotyki jonowe: ciecze jonowe

W ciągu ostatnich lat wiele uwagi poświęcono cieczom jonowym, czyli organicznym lub organiczno-nieorganicznym solom heteroniowym, które z definicji posiadają temperaturę topnienia poniżej 100 °C. Ciecze jonowe są zwykle zbudowane z organicznego kationu heteroniowego (heteroatom: N, S lub P) i organicznego (np. PF₆⁻, BF₄⁻) lub nieorganicznego (np. Cl⁻, Br⁻, AlCl₄⁻) anionu. Stanowią one obiecującą alternatywę dla tradycyjnych rozpuszczalników organicznych – zarówno pod kątem korzyści dla środowiska, jak i przemysłu. ^[3] Dotychczas, pojawiło się wiele możliwych zastosowań tego typu związków, np. w syntezie organicznej, biokatalizie, elektrochemii, chemii analitycznej i nanotechnologii (**Rys. 1**). ^[4, 5] Ze względu na rosnące zainteresowanie zastosowaniem cieczy jonowych w przemyśle, pojawia się pytanie o bezpieczeństwo ich stosowania oraz wpływ na środowisko.

Niska lotność cieczy jonowych sprawia, że nie zanieczyszczają one powietrza, w przeciwieństwie do lotnych rozpuszczalników organicznych. W związku z tym, że ciecze jonowe, jako substancje jonowe, charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, mogą przedostawać się do gleby oraz wód gruntowych, stanowiąc potencjalne zanieczyszczenie ekosystemów wodnych i lądowych (**Rys. 2**). Mechanizm sorpcji cieczy jonowych przez glebę i osady denne zależy nie tylko od ich właściwości fizykochemicznych, ale także od parametrów gleby, takich jak zawartość materii organicznej i dostępność miejsc sorpcyjnych, oraz temperatury i zasolenia. ^[6] Jak dla

większości ksenobiotyków, biodostępność cieczy jonowych dla organizmów bytujących w środowisku jest uzależniona od ich sorpcji przez glebę.

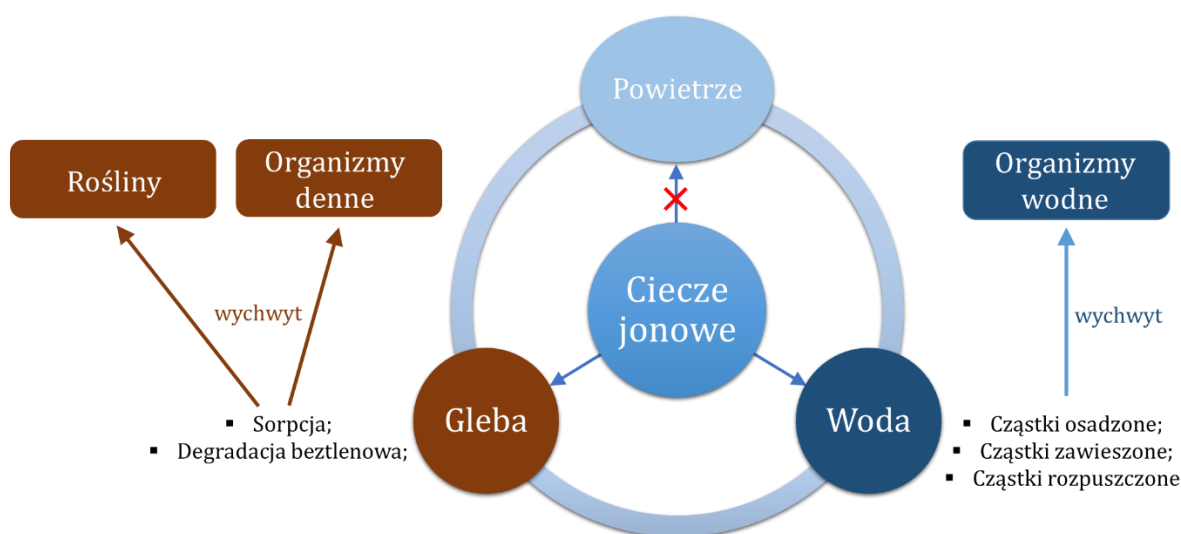


Rys. 1. Ilość publikacji naukowych dotyczących cieczy jonowych w różnych zastosowaniach w latach 1995-2020 [Źródło: Science Finder].

Wykazano, że imidazoliowe i pirydyniowe cieczki jonowe mogą być pochłaniane przez różne typy gleb i osadów morskich – przy czym hydrofobowe długołańcuchowe cieczki jonowe są pochłaniane silniej, niż te z krótkimi, alkilowymi łańcuchami bocznymi i grupami hydroksylowymi. [7-10] W związku z tym, wnioskować można, że transport cieczy jonowych do środowiska może zależeć od ich hydrofobowości/hydrofilowości – te o charakterze hydrofobowym będą zatrzymywane przez glebę i osady, wobec czego staną się trwałymi zanieczyszczeniami tego środowiska, podczas gdy te bardziej hydrofilowe będą swobodnie transportowane do środowiska wodnego. [11] Wśród cieczy jonowych, najlepiej przebadaną grupą wydają się być cieczki metyloimidazoliowe – przede wszystkim pod kątem ekotoksyczności. [12] Najczęściej przeprowadzane są testy ekotoksyczności na organizmach wodnych, przy pomocy których dowiedziono, że toksyczność cieczy jonowych zwiększa się wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Co ciekawe, wykazano również, że toksyczność cieczy jonowych zależy od stopnia zasolenia wody – wysokie stężenie chlorków zapobiega interakcjom kationów ze strukturami ściany komórkowej organizmów wodnych. [13]

Problemem, często podnoszonym w literaturze naukowej, jest fakt słabej biodegradowalności niektórych cieczy jonowych, co ostatecznie może doprowadzać do akumulacji tych związków w glebie. Dotychczas wykazano, że imidazoliowe cieczki

jonowe mogą być degradowane w procesach biotycznych i abiotycznych. [14-16] W związku z brakiem szczegółowych badań dotyczących biodegradacji cieczy jonowych i potencjalną akumulacją niektórych cieczy jonowych w glebie, istotne są badania ekotoksykologiczne wykorzystujące organizmy lądowe. Dowiedziono, że za ekotoksyczność w glebie odpowiedzialne są głównie toksyczne aniony, ze względu na związanie kationu cieczy jonowej przez matrycę glebową, która jest naładowana ujemnie. Ponadto, ekotoksyczność ta może także zależeć od typu gleby. [17]



Rys. 2. Transport i przemiany cieczy jonowych w środowisku [opr. na podstawie [6]].

Ciecze jonowe w 2011 roku zostały określone mianem „zanieczyszczeń na horyzoncie” (ang. *contaminant on the horizon*). [18] Niestety, wciąż nie ma wystarczającej liczby badań, które pozwoliłyby na dokładną analizę wpływu cieczy jonowych na środowisko - przede wszystkim badań dotyczących stężeń pozostałości cieczy jonowych w wodach i gruntach. Jedyne oznaczenia zostały wykonane w 2020 roku dla fluorowych cieczy jonowych^[19], które zostały uznane jako jedne z najbardziej szkodliwych dla środowiska, ze względu na obecność atomów fluoru. Stężenia polifluoroalkilopodstawionych cieczy jonowych oznaczono w kilku niemieckich rzekach – maksymalne stężenie fluorowych anionów w wodzie wynosiło 3.4 µg/L. [19]

1.2. Ksenobiotyki niejonowe: farmaceutyki

Dobrze znanym źródłem chronicznego skażenia środowiska są środki farmaceutyczne, które są zażywane w sposób ciągły, zarówno przez ludzi, jak i zwierzęta. Związki te są szczególnie niebezpieczne ze względu na fakt ich biologicznej aktywności mogącej wywoływać nieprzewidywalne skutki biologiczne u organizmów bytujących w ekosystemie. [20] Dotychczas przeprowadzono wiele badań, które potwierdziły występowanie środków farmaceutycznych w wodach gruntowych, powierzchniowych, ściekach i glebach na całym świecie. [21, 22] Zidentyfikowano kilka, wymienionych poniżej dróg, którymi farmaceutyki mogą przedostawać się do środowiska.

- (1.) Ścieki komunalne – uważane jako pierwotne źródło zanieczyszczenia. [23] Leki, po zażyciu przez człowieka są absorbowane, metabolizowane, a następnie wydalane do sieci kanalizacyjnej. Większość ksenobiotyków trafiająca do oczyszczalni ścieków jest usuwana, jednakże proces ten nie zawsze przebiega w pełni sprawnie. [24]
- (2.) Hodowle zwierząt - odzwierzęce ścieki bytowe, hodowle ryb, użycie antybiotyków, które są także stosowane jako dodatek do pasz dla zwierząt. [25]
- (3.) Ścieki poprodukcyjne uwalniane przez zakłady produkujące leki. [26] Przykładowo, w jednym z zakładów produkcyjnych w Indiach, ścieki wyjściowe zawierały krytycznie wysokie stężenia leków, np. stężenie cyprofloksacyny dochodziło do 31 mg/L. [27]
- (4.) Niewłaściwe dysponowanie zużytymi lekami – czynnik ten znacząco zmienił się na przestrzeni lat dzięki wprowadzeniu wytycznych dotyczących zwracania niepotrzebnych i przeterminowanych leków do punktów aptecznych. Dla przykładu, w Stanach Zjednoczonych w roku 1996, 68% społeczeństwa pozbywało się leków poprzez wrzucenie ich do toalety [28], a spośród 100 zbadanych aptek, tylko 5% miało wprowadzone procedury dotyczące zbierania przeterminowanych leków. W 2016 roku, w ramach ankiety przeprowadzonej wśród amerykańskich studentów stwierdzono, że 25% respondentów pozbywa się niepotrzebnych leków wyrzucając je do kosza, a zaledwie 1% pozbywa się ich poprzez wrzucenie do toalety. [29]

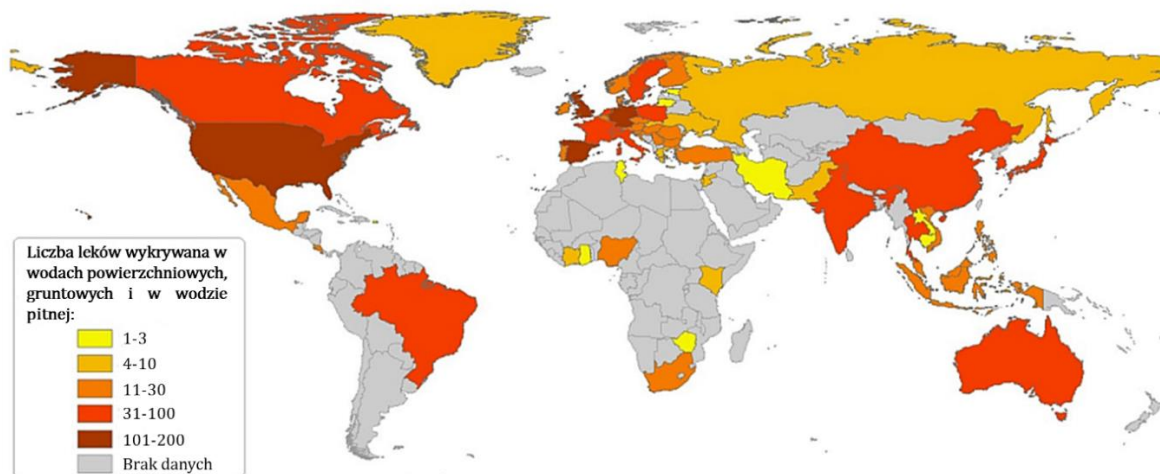
Farmaceutyki są obecne w ściekach, rzekach, a nawet wodzie pitnej w stężeniach dochodzących do zakresu ng-μg/L. Do najczęściej wykrywanych grup leków zaliczyć można antybiotyki, środki przeciwbólowe i hormony. Zauważyć można też tendencję do regionalizacji, tj. antybiotyki są najczęściej wykrywane w rejonie Azji i Pacyfiku, hormony w Afryce, leki przeciwbólowe w Europie Wschodniej, a szereg różnych grup leków w Europie Zachodniej. Przykładowo, do najczęściej wykrywanych farmaceutyków w Stanach Zjednoczonych należą tetracyklina (wykrywana nawet w ściekach oczyszczonych wypływających z oczyszczalni), diklofenak (najczęściej wykrywany lek w ściekach na całym świecie), karbamazepina, sulfametoksazol, ibuprofen i naproksen. ^[30] Na **Rys. 3** przedstawiono zestawienie dotyczące liczby substancji farmaceutycznych wykrywanych w wodach powierzchniowych, gruntowych lub w wodzie pitnej, z podziałem na kraje i regiony świata. Warto zwrócić uwagę, że ponad 100 różnych leków wykryto w wodach kilku krajów europejskich i w Stanach Zjednoczonych. Chociaż farmaceutyki są wykrywane na całym świecie, nie tylko w krajach wysoce rozwiniętych, to jednak istnieje jeszcze wiele rejonów, położonych głównie w Afryce, gdzie w ogóle nie robiono tego typu badań środowiskowych. Stąd możemy przewidywać, że rzeczywista ilość wykrywanych leków jest niedoszacowana. W wielu krajach wykrywa się leki w stężeniach wyższych, niż PNEC (ang. *Predicted No Effect Concentration* – przewidywane stężenie niewywołujące skutków negatywnych), co sugeruje, że miejscowo mogą występować negatywne efekty ekotoksykologiczne. Do leków wykrywanych w stężeniach wyższych niż PNEC zaliczyć można azytromycynę, cyprofloksacynę, diklofenak, sulfametoksazol i wenlafaksynę (**Tabela 1**). ^[31] Stężenia diklofenaku przewyższające nawet 9-krotnie wartość PNEC odnotowano także w Polsce. ^[32, 33]

Tabela 1. Przykładowe stężenia leków wykrywanych w wodach powierzchniowych. ^[31]

Substancja czynna	PNEC* [ng/L]	Stężenie w środowisku Min.-max. [ng/L]	Kraj
Azytromycyna	19	1 - 71.67	Hiszpania
		11.1 - 29.6	Portugalia
Cyprofloksacyna	89	15	Rumunia
		7.7	Włochy
		17.78	Szwecja
		1 - 93.3	Hiszpania
		88.7	Portugalia
Sulfametoksazol	600	1.5 - 125.8	Francja
		140 - 469	Niemcy

		375	Luksemburg
		30	Rumunia
		0.51 - 149	Hiszpania
		7.6	Wielka Brytania
Gemfibrozil	500	6 - 30	Holandia
		3	Polska
		50 - 78	Włochy
		0.91 - 326	Hiszpania
Diklofenak	50	170 - 2550	Niemcy
		28.6 - 470	Polska
		830	Luksemburg
		22.8 - 841.5	Czechy
		0.5 - 330	Hiszpania
		15 - 40	Rumunia
		1.16	Włochy
		32 - 156	Dania
		10 - 50	Holandia
		46 - 700	Finlandia
Wenlafaksyna	38	26.87 - 30.06	Francja
		38	Portugalia
		18	Niemcy
		9 - 119	Finlandia
		16.17 - 17.1	Francja
		66.7 - 159	Portugalia
0.8 - 85.8	Wielka Brytania		
		4 - 45	Hiszpania

* PNEC - przewidywane stężenie niewywołujące skutków negatywnych

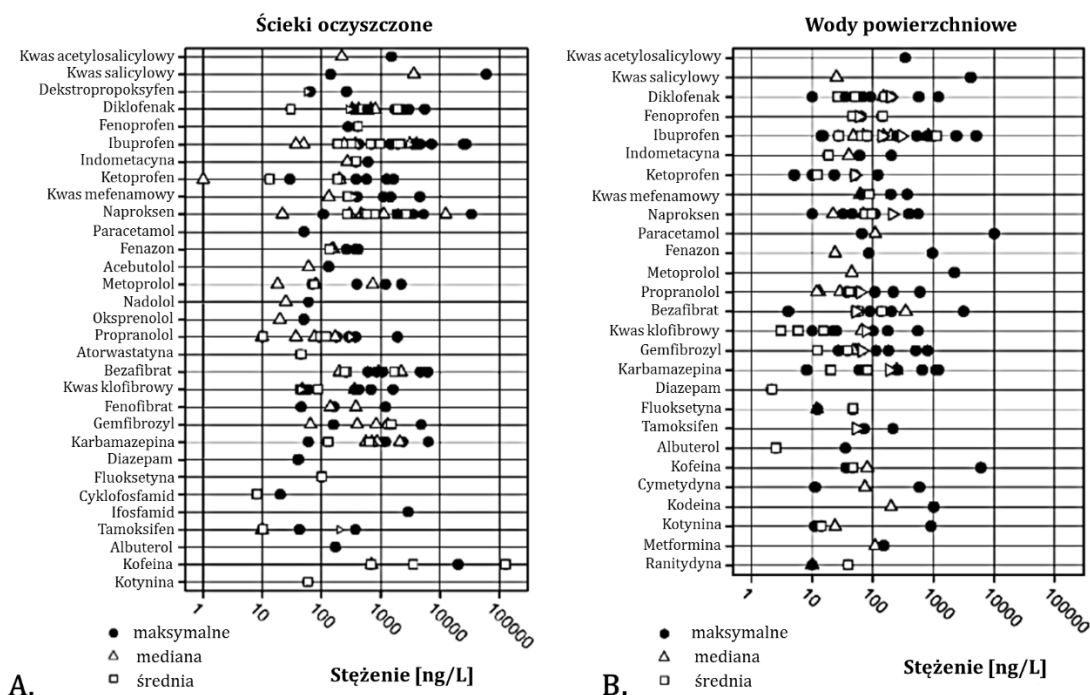


Rys. 3. Zestawienie liczby leków wykrytych w wodach powierzchniowych, gruntowych i w wodzie pitnej z podziałem na kraje i regiony świata [źródło: tłumaczenie ^[30]]

Z kolei na Rys. 4 przedstawiono zestawienie dotyczące stężenia różnych leków w oczyszczonych ściekach oraz wodach powierzchniowych wg danych z lat 1998-2005.

^[20] Zauważyć można, że w oczyszczonych ściekach największe stężenie odnotowano dla

kwasy salicylowego, ibuprofenu, naproksenu i kofeiny – w ilości powyżej 10 µg/L. W wodach powierzchniowych dominuje natomiast kwas salicylowy, paracetamol, kofeina i ibuprofen – w stężeniach ok. 5-10 µg/L. Biorąc pod uwagę poniższe zestawienie wnioskować można, że w środowisku najczęściej występują niesteroidowe leki przeciwzapalne (ibuprofen, naproksen, diklofenak). Spośród leków kardiologicznych najczęściej wykrywane są beta-blokery, tj. propranolol, bisoprolol i metoprolol.



Rys. 4. Zestawienie stężeń leków w oczyszczonych ściekach (A) i wodach powierzchniowych (B) [źródło: tłumaczenie [20]].

Po kilku latach badań monitoringowych i ekotoksykologicznych, farmaceutyki zostały uznane przez Komisję Europejską [34] oraz Komisję Helsińską [35] jako nowo pojawiające się zanieczyszczenia środowiska (ang. *emerging pollutants*). Problem związany z zanieczyszczeniem środowiska lekami jest złożony, przede wszystkim ze względu na ogromną ilość dostępnych farmaceutyków – szacuje się, że znanych jest 11 926 substancji biologicznie czynnych, a zaledwie 713 z nich zostało przebadanych pod kątem występowania w środowisku i ekotoksyczności. [36] Problem obecności farmaceutyków w środowisku wydaje się niedoszacowany ze względu na:

- długotrwałą obecność leków w środowisku oraz ich akumulację w następujących po sobie ogniwach łańcucha pokarmowego (biomagnifikację);

- różne źródła pochodzenia poszczególnych grup leków;
- wzrastający trend dotyczący konsumpcji leków na całym świecie – globalna roczna stopa wzrostu przemysłu farmaceutycznego szacowana jest na 6.5% [37];
- możliwość indukowania przez leki zmian w środowisku.

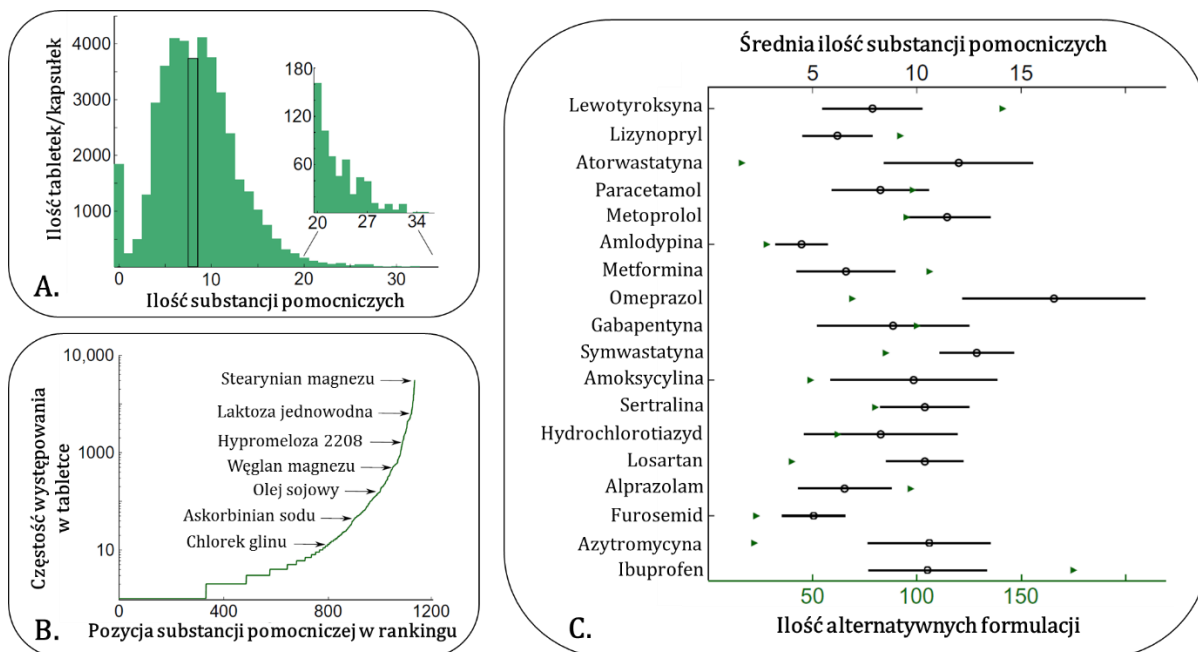
W związku z powyższym podejmowane są próby ograniczenia negatywnego wpływu wywieranego przez farmaceutyki na środowisko. Przede wszystkim, istnieje koncepcja syntezy leków przyjaznych dla środowiska, które po zażyciu i wydaleniu przez człowieka są łatwiej degradowalne i mniej toksyczne dla organizmów bytujących w ekosystemach wodnych – działanie to opiera się na odpowiednich zmianach w strukturze chemicznej leku. Należy jednak pamiętać, aby to działanie nie zmieniło pierwotnej aktywności biologicznej i stabilności modyfikowanego leku. [36] Podobnie, zalecane jest aby leki charakteryzowały się większą biodostępnością i selektywnością działania, co pozwoli na stosowanie mniejszych dawek leków. W tym przypadku, pożądanym jest również stosowanie leków w postaci czystych form enancjomerycznych, które działają bardziej selektywnie – co istotne w ciągu ostatnich 10 lat ilość leków w tej formie znacząco wzrosła. [38] Innym podejściem do minimalizacji problemu obecności leków w środowisku jest synteza proleków, które zaczynają być aktywne dopiero po wprowadzeniu do organizmu. Narastającym problemem jest obecność antybiotyków w środowisku, które przyczyniają się do powstawania antybiotykooporności u bakterii – w tym przypadku sugeruje się stosowanie alternatywnych terapii przeciwbakteryjnych, tj. terapii fagowych, szczepionek przeciwbakteryjnych, enzymów, prebiotyków i preparatów ziołowych. [39]

1.3. Ksenobiotyki niejonowe: farmaceutyczne substancje pomocnicze

Większość badań dotyczących farmaceutyków w środowisku dotyczy samych substancji biologicznie czynnych, jednakże należy pamiętać, że aby wytworzyć gotowy produkt farmaceutyczny o pożądanym właściwościach fizykochemicznych stosuje się szereg substancji pomocniczych, tj. takich jak surfaktanty, lubrykanty, emulgatory czy konserwanty. Wiele z tych substancji używa się także w produktach spożywczych i kosmetycznych. Biorąc pod uwagę ilość zażywanych leków i fakt, że każda formuacja

farmaceutyczna zawiera w swoim składzie kilka, kilkanaście lub nawet kilkadziesiąt substancji pomocniczych, wykonanie oceny ryzyka związanego z występowaniem tych substancji w środowisku wydaje się uzasadnione. ^[40] Aktualnie, regulacje prawne Stanów Zjednoczonych i Unii Europejskiej wymagają, aby substancje pomocnicze były zbadane pod kątem toksykologicznym i spełniały standardy jakości, jednak nie wymaga się przeprowadzania oceny ryzyka środowiskowego – tak, jak ma to miejsce w przypadku substancji czynnych. ^[41]

Dla przykładu, w Szwecji w 7600 produktach farmaceutycznych będących w sprzedaży znajduje się aż 1300 różnych substancji pomocniczych. ^[40] Według raportu z 2019 roku, substancje pomocnicze stanowią średnio 71% masy tabletki – wobec tego przeważają one wagowo w gotowych formulacjach farmaceutycznych. ^[42] Z tego samego raportu, który został opracowany w oparciu o bazę Pillbox wynika, że przeciętna tabletki/kapsułka zawiera 8.8 substancji pomocniczych, a niektóre nawet do 34 substancji pomocniczych (**Rys. 5A**). Najczęściej występującą substancją pomocniczą w tabletkach jest stearynian magnezu (72%), jeden z najpopularniejszych lubrykantów wspomagających proces technologiczny (**Rys. 5B**). Ponadto, różne ilości substancji pomocniczych są stosowane dla tej samej substancji czynnej w zależności od producenta (**Rys. 5C**). Niektóre substancje pomocnicze, tj. cukry, skrobia, celuloza, białka czy glicerol, uważane są powszechnie jako bezpieczne dla środowiska. Inne związki np. konserwanty, ze względu na swoje właściwości hamujące rozwój drobnoustrojów wzbudzają większy niepokój. ^[43] Podobnie, związki o charakterze surfaktantów mogą wywierać pewne efekty biologiczne na organizmy bytujące w środowisku. ^[44]



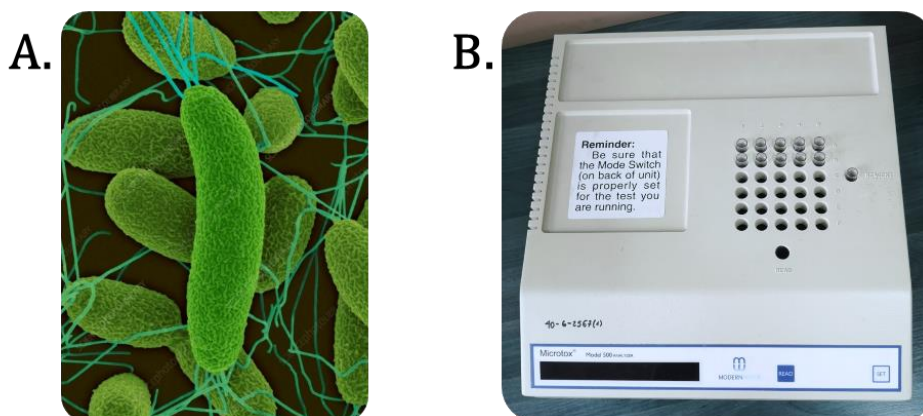
Rys. 5. Rozkład ilości substancji pomocniczych w farmaceutycznych formacjach doustnych (A). Częstość występowania poszczególnych substancji pomocniczych w tabletkach (B). Średnia ilość substancji pomocniczych w osiemnastu najczęściej przepisywanych lekach doustnych w roku 2016 (C). Wartości średnie oznaczono czarnymi kropkami, odchylenie standardowe oznaczono za pomocą czarnych linii. Zielone trójkąty oznaczają liczbę różnych dostępnych preparatów [źródło: tłumaczenie [42]].

W literaturze naukowej dostępnych jest jedynie kilka publikacji traktujących o ekotoksyczności farmaceutycznych substancji pomocniczych. Zwykle są to badania polegające na określeniu ekotoksyczności różnych postaci farmaceutycznych zawierających inne substancje pomocnicze. W toku takich badań stwierdza się, że substancje pomocnicze mogą zwiększać toksyczność leku, być może na drodze interakcji z samą substancją aktywną biologicznie lub na skutek interakcji różnych substancji pomocniczych ze sobą. [45, 46] Warto dodać, że podobne badania przeprowadzono w odniesieniu do gotowych komercyjnych formacji herbicydów i stwierdzono, że substancje pomocnicze mogą być bardziej ekotoksyczne niż sama substancja aktywna. [47, 48]

Obecnie, wiedza na temat ekotoksyczności substancji pomocniczych jest niewielka. Mimo, że substancje te są obecne w stosunkowo niewielkich ilościach w leku i potencjalnie są substancjami bezpiecznymi, sugeruje się, aby ocena ryzyka środowiskowego uwzględniała całą formację farmaceutyczną, obejmującą substancje aktywne biologicznie i substancje pomocnicze, a nie jej pojedyncze składniki. [45]

2. BAKTERIE *ALIIVIBRIO FISCHERI* W BADANIACH EKOTOKSYCZNOŚCI KSENOBIOTYKÓW

Bakterie *Aliivibrio fischeri* (wcześniej nazywane *Vibrio fischeri* i *Photobacterium fischeri*) są Gram-ujemnymi, niepatogennymi bakteriami występującymi powszechnie w subtropikalnych i umiarkowanych środowiskach morskich (**Rys. 6A**). [49] Cechą charakterystyczną tych organizmów jest zdolność do bioluminescencji, która jest bezpośrednio związana z ich metabolizmem. Obecność toksycznych substancji w otoczeniu bakterii powoduje zahamowanie naturalnej bioluminescencji, co sprawia, że bakterie *A. fischeri* mogą być czułymi bioindykatorami stosowanymi w badaniach ekotoksyczności. Test bazujący na bakteriach *A. fischeri* został skomercjalizowany w 1978 roku w postaci testu Microtox® (**Rys. 6B**). [50] Test ten polega na wykonaniu szeregu rozcieńczeń badanego toksykanta i inkubacji z bakteriami *A. fischeri* przez 5, 15 i/lub 30 minut, po czym następuje pomiar bioluminescencji (absorbancja przy $\lambda = 490$ nm). W wyniku testu otrzymywana jest wartość EC_{50} , która jest określana jako stężenie badanego toksykanta powodujące 50% redukcję bioluminescencji. Znając wartość EC_{50} , dany związek może być zakwalifikowany do odpowiedniej kategorii toksyczności ostrej wg wytycznych globalnie zharmonizowanego systemu klasyfikacji i oznakowania chemikaliów (GHS) (**Tabela 2**). [51]



Rys. 6. Bakterie *A. fischeri*, widok ze skaningowego mikroskopu elektronowego, powiększenie x 8000 (A) [źródło: SciencePhoto.com]. Aparat Microtox® Model 500 Analyzer, Modern Water Inc., New Castle, USA (B).

Tabela 2. Klasy toksyczności ostrej wg GHS. [51]

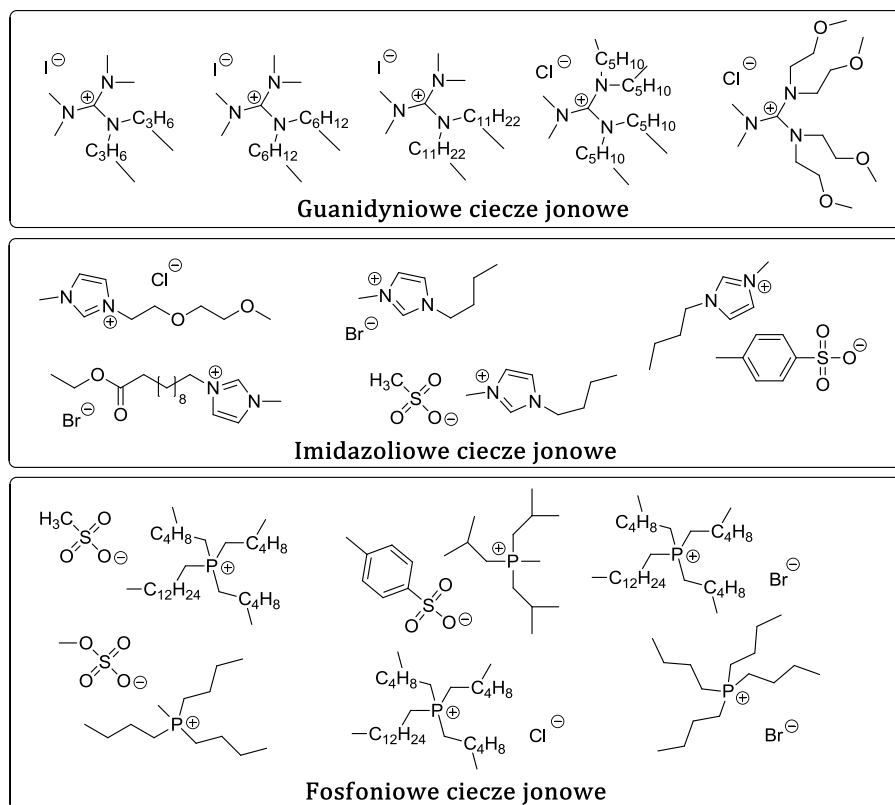
Klasa toksyczności	EC_{50} [mg/L]
I.	$EC_{50} < 1$
II.	$1 < EC_{50} < 10$
III.	$10 < EC_{50} < 100$
Nietoksyczne	$EC_{50} > 100$

Test Microtox® jest stosowany na całym świecie do oceny ostrej i chronicznej toksyczności wody, ścieków, osadów dennych i substancji chemicznych. Dowiedziono, że istnieje korelacja między ekotoksycznością określoną dla *A. fischeri*, a ekotoksycznością określoną dla organizmów wyższych, tj. ryb, skorupiaków i alg. [52] W porównaniu do innych testów, które są stosowane dla organizmów wyższych, test Microtox® jest szybszy (czas trwania jednego pomiaru to ok. 1 godzina), tańszy i nie wymaga hodowania mikroorganizmów w wyspecjalizowanych laboratoriach mikrobiologicznych.

2.1. Ciecze jonowe

Ze względu na swoje potencjalnie szerokie zastosowanie, ciecze jonowe są często badane pod kątem ekotoksykologicznym, również z wykorzystaniem bakterii bioluminescencyjnych *A. fischeri*. W literaturze naukowej, najczęstsze doniesienia dotyczą imidazoliowych, guanidyniowych, fosfoniowych, pirydyniowych i amoniowych cieczy jonowych. Poniżej, przedstawione zostaną wybrane badania ekotoksykologiczne cieczy jonowych z wykorzystaniem *A. fischeri*.

W roku 2012 przebadano toksyczność guanidyniowych, imidazoliowych i fosfoniowych cieczy jonowych (**Rys. 7**), które wykazywały niewielką lub umiarkowaną toksyczność, przy czym stwierdzono, że ciecze guanidyniowe charakteryzowały się największą toksycznością spośród badanych związków. [53] Wartości $EC_{50, 15 \text{ min}}$ dla poszczególnych grup cieczy jonowych zawierały się w następujących zakresach: guanidyniowe (3.72 – 98.24 mg/L), imidazoliowe (4.49 – 901.99 mg/L) i fosfoniowe (6.38 – 237.60 mg/L). Zauważono, że wprowadzenie grupy eterowej lub estrowej do łańcucha bocznego skutkuje obniżeniem toksyczności cieczy fosfoniowych oraz guanidyniowych. Ponadto, w badanej przez naukowców serii związków, ich toksyczność wzrastała wraz ze wzrostem długości łańcuchów alifatycznych kationu. Podobną zależność potwierdzono dla serii metyloimidazoliowych cieczy jonowych. [54]



Rys. 7. Struktury chemiczne guanidyniowych, imidazoliowych i fosfoniowych cieczy jonowych badanych w pracy [53].

Inni naukowcy przebadali toksyczność serii piperidyniowych, piperydiniowych, pirydiniowych i imidazoliowych cieczy jonowych z anionem bromkowym. [55] Dla tej samej długości łańcucha alkilowego połączonego z atomem azotu pierścienia, toksyczność wobec *A. fischeri* wzrastała w następującym szeregu: cieczy jonowe piperidyniowe < piperydiniowe < imidazoliowe < pirydiniowe (z wyjątkiem cieczy jonowych zawierających *n*-oktylowe łańcuchy boczne). Zastosowano dodatkowo analizę QSAR (and. *Quantitative Structure-Activity Relationship*) i dowiedziono, że toksyczność badanej serii cieczy jonowych wzrasta wraz ze wzrostem objętości molowej kationu. Ponadto, wykazano, że toksyczność wzrasta wraz ze wzrostem długości bocznych łańcuchów alkilowych, co potwierdzają także przytoczone wcześniej badania. Silny wpływ długości łańcuchów alkilowych na toksyczność cieczy jonowych argumentowany jest faktem interakcji tych łańcuchów z komponentami ściany komórkowej bakterii *A. fischeri* zbudowanej z dwóch membran (zewnętrznej i wewnętrznej). [56]

Kolejne 24 cieczy jonowe z kationami imidazoliowymi i pirydiniowymi zostały przebadane w 2019. [57] Autorzy starali się określić, jaki wpływ na żywotność *A. fischeri* ma typ anionu, długość łańcucha alkilowego w kationie (C1-C6), występowanie wiązania

podwójnego oraz grup funkcyjnych w łańcuchu alkilowym kationu. W toku analizy stwierdzono, że największy i najbardziej hydrofobowy anion bis(trifluorometylo-sulfonylo)imidowy charakteryzuje się największą toksycznością wobec *A. fischeri*, a najmniejszy anion tiocyjanianowy wykazuje najmniejszą toksyczność ze wszystkich badanych cieczy jonowych. Rozważając efekt kationu, należy stwierdzić, że badane ciecze pirydyniowe były bardziej toksyczne, niż analogiczne ciecze imidazoliowe. Zauważono, że kation odgrywa główną rolę w ekotoksyczności cieczy jonowej. Anion ma na nią wpływ w cieczach jonowych o krótszych łańcuchach alkilowych. Wykazano, że wprowadzenie podwójnego wiązania lub benzylovej grupy funkcyjnej do łańcucha alkilowego ma niewielki wpływ na ekotoksyczność cieczy jonowej.

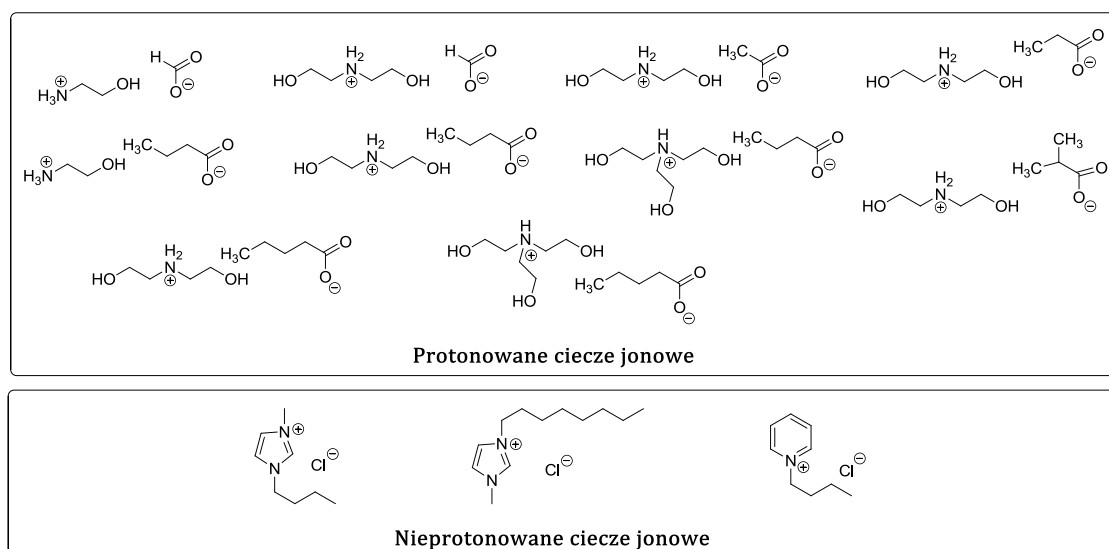
W 2017 roku przeanalizowano toksyczność serii choliniowych, guanidyniowych i tetrametyloguanidyniowych cieczy jonowych z anionami kwasów izostearynowego, dekanowego i neodekanowego. [58] Ciecze jonowe z długimi łańcuchami alkilowymi w strukturze anionu charakteryzowały się większą toksycznością wobec bakterii *A. fischeri*, podczas gdy rozgałęzione ciecze jonowe – mniejszą toksycznością. Wykazano ponownie, że to kation ma większy wpływ na toksyczność wobec badanej bakterii, niż anion.

Seria pirydyniowych, imidazoliowych i choliniowych cieczy jonowych z różną długością łańcuchów alkilowych (C2-C16) została przebadana pod kątem toksyczności wobec *A. fischeri*. [59] Toksyczność badanych związków zależała od długości łańcucha alkilowego. Ciecze, które zawierały powyżej 10 atomów węgla zostały sklasyfikowane jako toksyczne. Toksyczność serii pirydyniowych cieczy jonowych zawierała się w przedziale 4.17 – 866 mg/L, imidazoliowych 4.52 – 1227 mg/L, a choliniowych 4.29 – 1153 mg/L.

Badając imidazoliowe, pirydyniowe i amoniowe ciecze jonowe, wykazano, że pirydyniowe ciecze jonowe były bardziej toksyczne od imidazoliowych, a azotan etyloamoniowy charakteryzował się najmniejszą toksycznością. [60]

Kolejny zespół badał ekotoksyczność serii protonowanych i nieprotonowanych cieczy jonowych (**Rys. 8**). [61] Ciecze protonowane otrzymano w wyniku reakcji kwasowo-zasadowej amin alifatycznych z kwasami karboksylowymi, a ciecze nieprotonowane zostały zsyntezowane w wyniku reakcji czwartorzędowania

atomów azotu imidazoli i pirydyny za pomocą chlorków alkilu. Wykazano, że ciecze nieprotonowane charakteryzują się większą toksycznością (zakres $EC_{50\ 15\ min}$ 0.5 – 295 mg/L), niż ciecze protonowane (zakres $EC_{50\ 15\ min}$ 350 – 2239 mg/L). Tak duża różnica w ekotoksyczności związana może być z bardziej złożoną strukturą cieczy nieprotonowanych, wzbogaconą o układ heterocykliczny z alkilowymi łańcuchami bocznymi.



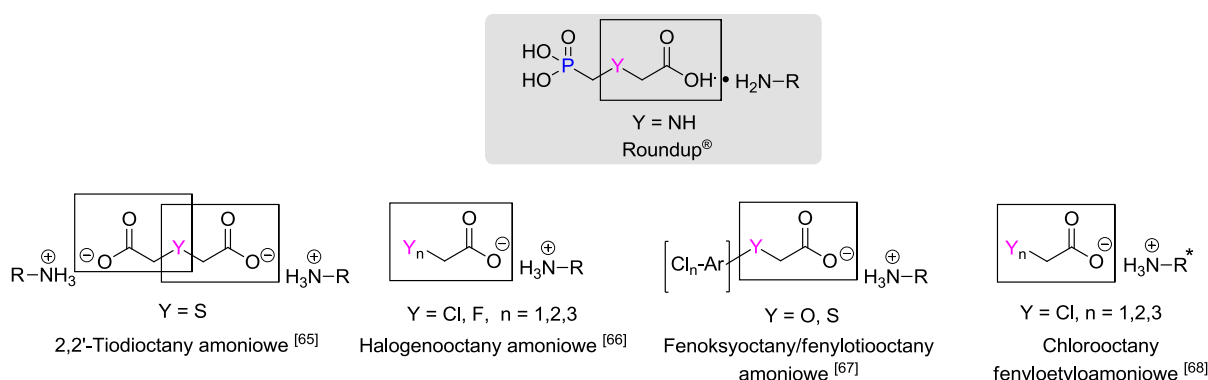
Rys. 8. Struktury chemiczne protonowanych i nieprotonowanych cieczy jonowych badanych w pracy [61].

Podczas badania serii amoniowych cieczy jonowych złożonych z różnej liczby kationów didecyldimetyloamoniowych (od 1 do 3) i anionów azotanowych(III), azotanowych(V) lub cytrynianowych wykazano, że toksyczność wobec *A. fischeri* silnie zależy od ilości kationów w cieczy jonowej – im więcej kationów, tym większa toksyczność. [62] Odwrotną korelację zauważyli autorzy, którzy przebadali serię 26 jedno- i dwukationowych cieczy jonowych. [63] Wykazali oni, że imidazoliowe, pirolidyniowe i pirydyniowe ciecze dwukationowe charakteryzują się mniejszą ekotoksycznością, niż ich jednokationowe analogi.

Istnieje wiele czynników strukturalnych wpływających na toksyczność cieczy jonowych wobec bakterii *A. fischeri*. Najczęściej powtarzającą się zależnością jest wzrost toksyczności wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego. Zależność taką zaobserwowano np. dla kationu *N*-alkilopirydyniowego. Oprócz tego, stwierdzono dobrą korelację toksyczności z całkowitą ilością atomów węgla w kationach: imidazoliowym, pirydyniowym, pirolidyniowym i piperydyniowym. [56]

Nową klasą cieczy jonowych są paramagnetyczne ciecze jonowe, zdolne do reagowania na zewnętrzne pole magnetyczne. Mimo, iż ta grupa cieczy jonowych nie jest jeszcze szeroko stosowana w przemyśle, naukowcy zwrócili uwagę na ich ekotoksyczność. [64] W tym celu przebadano serię magnetycznych cieczy jonowych będących pochodnymi choliniowymi z anionami $[\text{FeCl}_4]^-$, $[\text{MnCl}_4]^{2-}$, $[\text{CoCl}_4]^{2-}$ oraz $[\text{GdCl}_6]^{3-}$. Wartości EC_{50} otrzymane po 30 minutach inkubacji z bakteriami *A. fischeri* mieściły się w zakresie 0.76 – 69.54 mg/L, co pozwoliło zaklasyfikować badane ciecze jonowe jako toksyczne lub umiarkowanie toksyczne.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej zastosowano test *Microtox*[®] do oceny ekotoksykologicznej herbicydowych, chiralnych i achiralnych cieczy jonowych będących analogami strukturalnymi popularnego glifosatu, stosowanego zwykle w postaci soli amoniowych (**Schemat 1**). Koncepcja zmian strukturalnych polegała na całkowitym wyeliminowaniu praktycznie nieodegradowalnego chemicznie i enzymatycznie, wiązania P-C oraz wiązania P-C-N glifosatu, rozważanego tu jako pochodna łatwo wbudowującego się w struktury białkowe, aminokwasu glicyny i zastąpieniu tych wiązań przez inne ugrupowania heteroatomowe zawierające atomy tlenu, siarki lub halogenu. Celem tych badań było znalezienie związków o charakterze herbicydowym, które byłyby bezpieczniejsze dla środowiska, niż powszechnie stosowane herbicydy. W tym celu przebadano serie 2,2'-tiodioctanów [65], halogenooctanów [66], fenoksyoctanów i fenylotiooctanów [67] diizopropylamoniowych, a także serię chiralnych chlorooctanów fenyletyloamoniowych [68]. Wyniki tych badań zostaną szczegółowo przedstawione w rozdziałach **Badania własne i Część eksperymentalna** niniejszej pracy.



Schemat 1. Struktury chemiczne chiralnych i achiralnych cieczy jonowych będących analogami strukturalnymi substancji czynnej stosowanej w preparacie Roundup[®] (sól amoniowa glifosatu), stanowiące przedmiot badań niniejszej pracy doktorskiej. (Grupy R i R* zdefiniowano w rozdziale **Badania własne**)

2.2. Farmaceutyki

Farmaceutyki są produkowane i konsumowane na wielką skalę – przykładowo, światowa roczna konsumpcja popularnego diklofenaku w 2008 roku wyniosła 940 ton. [69] Roczna konsumpcja innego leku przeciwbólowego, ibuprofenu wyniosła w 2000 roku 300 ton w Niemczech, 162 tony w Wielkiej Brytanii, 58 ton w Polsce i 25 ton w Szwajcarii. [70, 71] Tak powszechne użycie farmaceutyków nie może pozostać bez konsekwencji dla środowiska naturalnego. Nawet niewielkie stężenia leków w środowisku mogą wywołać negatywne skutki dla organizmów bytujących w środowisku, które nie były pierwotnym celem działania tych leków. Ponadto, należy pamiętać o efektach synergistycznych i antagonistycznych mieszanin różnych leków, które trafiają razem do środowiska tworząc swoisty „farmaceutyczny koktajl”.

Test Microtox® znajduje zastosowanie w badaniach ekotoksykologicznych głównie dobrze rozpuszczalnych substancji – ze względu na konieczność sporządzenia klarownych roztworów wodnych. W przypadku słabiej rozpuszczalnych związków zaleca się użycie dodatku rozpuszczalników organicznych np. DMSO oraz metanolu i etanolu w stężeniu poniżej 1% (obj.). [72, 73] Istnieje kilka publikacji naukowych dotyczących zastosowania bakterii *A. fischeri* w ocenie ekotoksykologicznej farmaceutyków – zostaną one przytoczone w niniejszym rozdziale.

W 2016 roku zastosowano test Microtox® do oceny ekotoksykologicznej popularnych leków stosowanych w leczeniu ludzi oraz zwierząt. [74] Wśród trzech przebadanych antybiotyków chlorotetracyklina charakteryzowała się największą toksycznością (**Tabela 3**). Leki przeciwzapalne (z wyjątkiem kwasu acetylosalicylowego) wykazywały podobną toksyczność zawierającą się w granicach 13.77 – 15.9 mg/L. Lekami, które można uznać za nietoksyczne dla organizmów wodnych są amoksycylina, sulfametizol, kwas acetylosalicylowy oraz bezafibrat. W przypadku dwóch pierwszych pozostaje problem zagrożenia związanego z wytworzeniem się antybiotykooporności u bakterii.

Inną grupą leków, których ekotoksyczność została przebadana z wykorzystaniem testu Microtox® są chemoterapeutyki – leki przeciwnowotworowe o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i różnym działaniu. [75] Wyniki tych badań

Tabela 3. Wartości EC₅₀ badanych farmaceutyków, otrzymane po 15 minutach inkubacji z bakteriami *A. fischeri*.^[74]

Grupa leków	Substancja czynna	EC ₅₀ 15 min [mg/L]
Antybiotyki	amoksycylina	> 1702
	chlorotetracyklina	12.1
	sulfametizol	581.4
Przeciwzapalne	kwas acetylosalicylowy	267.6
	diklofenak	15.9
	ibuprofen	18.3
Diuretyki	furosemid	33.2
Przeciwdrogawkowe	karbamazepina	94.0
Hipolipidemiczny	bezafibrat	150.7

przedstawiono w **Tabeli 4**. Co ciekawe, silnie działające na człowieka leki przeciwnowotworowe nie wykazywały znaczącej toksyczności dla bakterii *A. fischeri* (z wyjątkiem imatynibu). Problemem w określeniu ekotoksyczności badanych leków była również słaba rozpuszczalność niektórych z nich. Przykładowo, z tego powodu, dla tamoksifenu uzyskano roztwór o maksymalnym stężeniu 0.2 mg/L, wobec tego, udało się jedynie stwierdzić, że lek ten był nietoksyczny w badanym stężeniu. Podobne wyniki zostały uzyskane dla innych leków przeciwnowotworowych, których wartości EC₅₀ nie zostały dokładnie wyznaczone z uwagi na słabą rozpuszczalność, a jedynie określono, że leki te nie są toksyczne w maksymalnym badanym stężeniu. Dodatkowo, autorzy tych badań tłumaczą brak obserwowanej toksyczności faktem, że czas ekspozycji wynoszący 30 minut może być zbyt krótki aby zaobserwować specyficzne efekty, jakie wywołują tego typu leki, np. zakłócanie syntezy DNA poprzez blokowanie syntetazy tymidylanowej lub zakłócanie przetwarzania RNA i procesu syntezy białek. Teza ta jest zgodna z obserwacją Backhaus'a i Grimme'a, którzy wykazali, że 5-fluorouracyl może wykazywać toksyczność wobec *A. fischeri*, ale dopiero po dłuższym czasie ekspozycji. I tak, EC₅₀ po 24 godzinach ekspozycji wynosiło 0.122 mg/L.^[76]

Tabela 4. Wartości EC₅₀ badanych leków przeciwnowotworowych po 30 minutach inkubacji z bakteriami *A. fischeri*.^[75]

Substancja czynna	EC ₅₀ , 30 min [mg/L]	Substancja czynna	EC ₅₀ , 30 min [mg/L]
5-Fluorouracyl	> 100	Imatynib	23.06
Cyklofosfamid	> 100	Metotreksat	> 100
Ifosfamid	> 100	Tamoksifen	> 0.2

Z kolei inne dwie grupy badawcze skupiły się na analizie ekotoksyczności benzoimidazolów – grupy leków przeciw pasożytniczych powszechnie stosowanych w leczeniu weterynaryjnym. Pierwsze badania, z 2006 roku dotyczyły sześciu

benzimidazolów (albendazol, tiabendazol, flubendazol, febantel, fenbendazol i oksafendazol), których toksyczność została oceniona względem *A. fisheri* oraz *Daphnia magna* (organizmu z grupy bezkręgowców słodkowodnych).^[77] Wartości EC₅₀ badanych benzimidazolów zawierają się w zakresie 0.770 – 2.752 mg/L, z wyjątkiem tiabendazolu, który charakteryzuje się mniejszą toksycznością, z wartością EC₅₀ wynoszącą 29.640 mg/L (**Tabela 5**). Warto zwrócić uwagę, że w przypadku słabo rozpuszczalnych w wodzie leków, tj. febantel, flubendazol i tiabendazol, otrzymanie wiarygodnego wyniku w teście Microtox® jest utrudnione. Poprzez pomiar szeregu rozcieńczeń, ostateczny wynik dla tych leków został oszacowany na podstawie dwóch punktów pomiarowych, co znacząco obniża jego wiarygodność. Naukowcy porównali ekotoksyczność leków wobec *A. fisheri* z ekotoksycznością otrzymaną dla *D. magna* – bakterie *A. fisheri* były 10-krotnie mniej wrażliwe na działanie tej grupy związków. Jako, że mechanizm działania badanych leków oraz ich struktura chemiczna (1,3-benzodiazol lub 1*H*-benzimidazol) są podobne, różnice w ich ekotoksyczności mogą być związane z biodostępnością tych związków dla danych organizmów. Sugeruje się, że w osmotycznie skorygowanym roztworze niezbędnym do przeprowadzenia testu Microtox®, biodostępność omawianych leków może być niższa – stąd bakterie są mniej wrażliwe na ich działanie. Druga grupa badaczy badająca benzimidazole określiła ekotoksyczność flubendazolu i fenbendazolu na poziomie EC_{50, 30 min} > 0.3 mg/L.^[78] Było to najwyższe możliwe do zbadania stężenie tych leków, stąd określono tylko wartość minimalną EC₅₀. Wyniki te są zgodne z wynikami otrzymanymi przez poprzednich autorów, gdzie EC₅₀ dla flubendazolu wynosi 0.853 mg/L, a więc powyżej 0.3 mg/L.

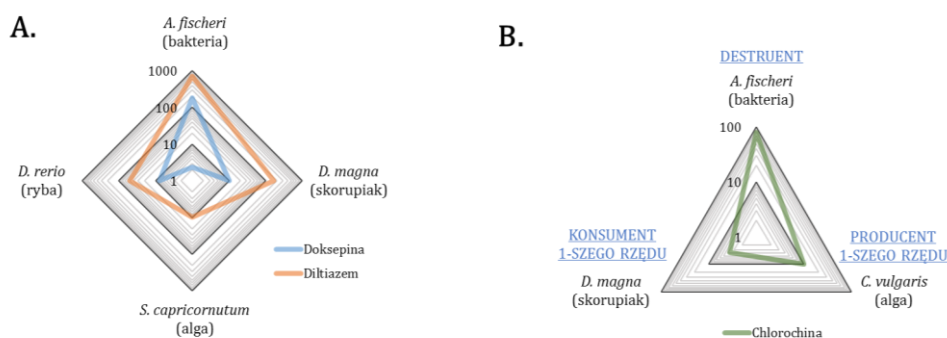
Tabela 5. Wartości EC₅₀ badanych leków przeciw pasożytniczych po 5 i 15 minutach inkubacji z bakteriami *A. fisheri* wraz z 95% przedziałem ufności wyniku podanym w nawiasie.^[77]

Substancja czynna	EC _{50, 5 min} [mg/L]	EC _{50 15 min} [mg/L]
Albendazol	0.770 (0.714 – 0.830)	0.862 (0.763 – 0.975)
Tiabendazol	29.640 ^a	-
Flubendazol	-	0.853 ^a
Febantel	2.752 ^a	-
Fenbendazol	1.571 (1.351 – 1.826)	0.798 (0.561 – 1.135)
Oksafendazol	2.210 (0.435 – 11.250)	1.985 (0.550 – 7.166)

^a – wartość oszacowana na podstawie dwóch punktów pomiarowych, brak 95% przedziału ufności wyniku

W 2018 roku opublikowano badania dotyczące ekotoksyczności diltiazemu (bloker kanału wapniowego, lek hipotensyjny) oraz doksepiny (lek przeciwdepresyjny), w którym porównano toksyczności leków wobec *A. fischeri* i trzech innych bioindykatorów (*D. magna*, *Selenastrum capricornutum*, *Danio rerio*).^[79] Wartości $EC_{50, 30 \text{ min}}$ dla diltiazemu i doksepiny wynosiły odpowiednio 704 i 184 mg/L. Średnie stężenie w środowisku wynosiło 2.6 ng/L dla doksepiny^[80] oraz 41 ng/L dla diltiazemu^[81]. Wartości EC_{50} otrzymane dla tych leków są znacznie wyższe, wobec czego autorzy badań sugerują, że ryzyko środowiskowe związane z obecnością tych substancji jest niewielkie. W porównaniu z innymi organizmami testowymi, bakterie *A. fischeri* były najmniej wrażliwe na działanie obydwóch leków (**Rys. 9A**). Autorzy ponownie stwierdzili, że głównym czynnikiem determinującym ekotoksyczność badanych leków była ich biodostępność skorelowana z rozpuszczalnością w wodzie.

Chlorochina – powszechnie stosowany lek przeciwmalaryczny, został przebadany pod kątem ekotoksykologicznym na organizmach modelowych stanowiących łańcuch troficzny, tj. takich jak bakterie *A. fischeri* (destruenci), algi *Chlorella vulgaris* (producent 1-szego rzędu) oraz skorupiaki *D. magna* (konsument 1-szego rzędu).^[82] Wartości przedstawione na **Rys. 9B** dotyczą następujących czasów ekspozycji: *A. fischeri* (15 minut), *C. vulgaris* (72 godziny) oraz *D. magna* (72 godziny). Ponownie zauważyć można, że bakterie *A. fischeri* były najmniej wrażliwe na badaną substancję ($EC_{50 15 \text{ min}} = 77.92 \text{ mg/L}$), w przeciwieństwie do alg i skorupiaków dla których wartości EC_{50} były poniżej 10 mg/L. Autorzy badania sugerują, że słaba ekotoksyczność chlorochiny wobec bakterii może wynikać z faktu, że nie zakłóca ona bezpośrednio ich procesów metabolicznych. Znajduje to potwierdzenie w badaniach Jjemba, który udowodnił, że ilość bakterii i pierwotniaków w glebie pozostaje na tym samym poziomie lub wzrasta w obecności chlorochiny – mimo, iż wzrost roślin na tejże glebie zostaje zahamowany.^[83] Ostatecznie na podstawie wykonanych badań, chlorochina została zakwalifikowana jako szkodliwa dla organizmów wodnych, mogąca powodować długotrwałe niekorzystne skutki w środowisku wodnym.



Rys. 9. Porównanie wartości EC₅₀ [mg/L] doksepy i diltiazemu (A) oraz chlorochiny (B) dla różnych gatunków organizmów wodnych [źródło: opr. na podstawie [81, 82]]

Kilka grup badawczych skupiło się na ekotoksyczności leków kardiologicznych, których konsumpcja nadal rośnie ze względu na duże obciążenie społeczeństwa chorobami układu sercowo-naczyniowego – w Polsce, leki z tej grupy należą do najczęściej przepisywanych przez lekarzy. [84] W Tabeli 6 zestawiono wartości toksyczności leków kardiologicznych wobec bakterii *A. fischeri*. Najbardziej toksycznymi lekami są propranolol i gemfibrozyl, dla których wartości EC₅₀ wynoszą poniżej 100 mg/L. Spośród badanych leków, atenolol i sotalol wykazywały wartości EC₅₀ powyżej 1000 mg/L, stąd można zaklasyfikować je do związków nie wywołujących niepożądanych, negatywnych skutków w środowisku.

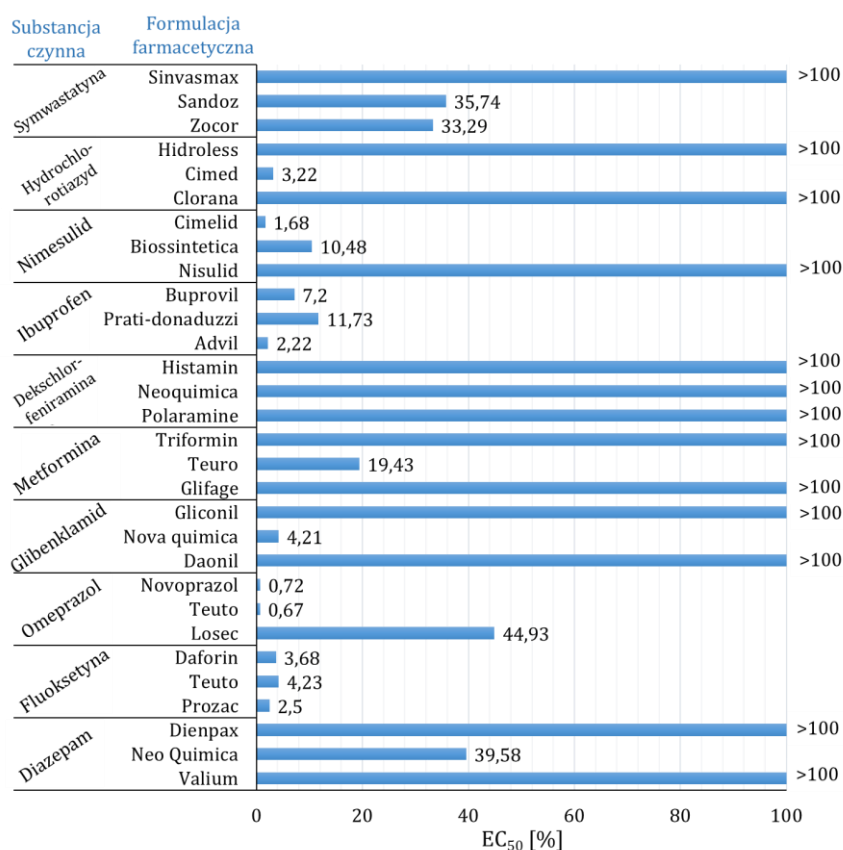
Tabela 6. Wartości EC₅₀ badanych leków kardiologicznych wobec bakterii *A. fischeri*.

Grupa leków	Substancja czynna	Czas ekspozycji	EC ₅₀ [mg/L]	Źródło
β-Blokery	Atenolol	30 min	1304	[85]
	Metoprolol		144	
	Propranolol	15 min	184.4	[86]
		30 min	81	[85]
			61	[87]
	Sotalol	30 min	> 1000	[85]
Obniżające poziom cholesterolu	Klofibrat	15 min	348.87	[88]
	Gemfibrozyl	15 min	45.06	[89]
			31.50	[90]
		30 min	85.74	[91]

Warto pamiętać, że leki trafiając do środowiska tworzą mieszaninę różnych substancji czynnych, które mogą wchodzić ze sobą w interakcje. W tego typu mieszaninach mogą występować efekty synergistyczne i antagonistyczne, które przyczyniają się, odpowiednio, do zwiększenia lub zmniejszenia ogólnej toksyczności mieszaniny leków. W roku 2016 ukazała się publikacja, w której przeanalizowano ekotoksyczność mieszanin leków z wykorzystaniem testu Microtox®. [92] W wyniku

badań stwierdzono, że leki w połączeniu z hormonami wykazują antagonistyczne lub synergistyczne działanie np. ketoprofen z androstendionem i estronem wykazują synergizm działania, podobnie jak gemfibrozyl z progesteronem. Z kolei, antagoniczne efekty obserwowano w mieszaninie gemfibrozylu z estronem. Ponadto, wykazano, że mieszanina diklofenaku i chloramfenikolu była najbardziej toksyczna dla bakterii *A. fischeri*.

Istotnym zagadnieniem jest ekotoksyczność całych formułacji lekowych i wpływ substancji pomocniczych na toksyczność substancji czynnej oraz końcowej formułacji. Niestety, ilość badań w tym zakresie jest znikoma. Istnieje jedna publikacja traktująca o ekotoksyczności różnych formułacji lekowych (generycznych i oryginalnych) dziesięciu popularnych substancji czynnych – diazepam, fluoksetyny, omeprazolu, glibenklamidu, metforminy, dekschlorfeniraminu, ibuprofenu, nimesulidu, hydrochlorotiazidu i symwastatyny. [46] Wyniki otrzymane przez autorów świadczą o tym, że ryzyko ekotoksykologiczne niekoniecznie musi być związane tylko z obecnością substancji czynnych w środowisku, ale także może być związane z substancjami pomocniczymi znajdującymi się w tabletkach. Inni badacze również wspominają o tym, że potencjalnie toksyczny efekt związany z substancjami pomocniczymi jest często pomijany. [40, 45] Na **Rys. 10** przedstawiono wartości EC_{50} uzyskane dla różnych formułacji farmaceutycznych poszczególnych leków wobec *A. fischeri*. Biorąc pod uwagę fakt, że każda formułacja zawiera tę samą ilość substancji czynnej, a różni się tylko składem substancji pomocniczych, wnioskować można, że to obecność substancji pomocniczych wpływa na ostateczną toksyczność całej tabletki. Na podstawie analizy porównawczej toksyczności różnych formułacji, zawierających różne substancje pomocnicze wnioskuje się, że substancjami pomocniczymi, które mogą powodować zwiększenie toksyczności formułacji lekowej są: celuloza mikrokryształiczna, glikolan sodowo-skrobiowy, dwutlenek krzemu i żółty barwnik SICOVIT-10 BASF.



Rys. 10. Wartości EC₅₀ uzyskane po 30 minutach inkubacji bakterii *A. fischeri* z różnymi farmaceutycznymi formulacjami popularnych leków [źródło: opr. na podstawie [46]]

Podsumowując powyższy przegląd literaturowy, można stwierdzić, że test Microtox® znajduje zastosowanie w ocenie ryzyka środowiskowego związanego z obecnością farmaceutyków w środowisku. Zaletą tego testu jest łatwość i szybkość wykonania, a także dobra korelacja z toksycznością uzyskaną dla organizmów wyższych. Głównym czynnikiem limitującym możliwość zastosowania tego testu w analizie leków jest słaba rozpuszczalność substancji czynnych – szacuje się, że praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie jest ponad 40% nowo opracowanych leków [93], a 70-80% jest słabo rozpuszczalna.

W związku z powyższym, wyłoniła się pilna potrzeba opracowania testu toksyczności, za pomocą którego można by badać ekotoksyczność trudno rozpuszczalnych leków i formulacji farmaceutycznych. Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej miały na celu opracowanie nowej modyfikacji testu Microtox®, która pozwoliłaby rozszerzyć zakres jego stosowalności o możliwość badania słabo rozpuszczalnych w wodzie farmaceutyków. Ponadto, do tej pory test Microtox® nie był szeroko stosowany do badania ekotoksyczności całych formulacji lekowych,

ani pojedynczych substancji pomocniczych – w moich badaniach opublikowanych w 2020 roku przedstawiono ekotoksyczność samych substancji czynnych, substancji pomocniczych oraz całych formułacji farmaceutycznych leków przeciwnadciśnieniowych. ^[94] Wyniki tych badań zostaną szczegółowo omówione w rozdziałach **Badania własne i Część eksperymentalna** niniejszej pracy.

2.3. Mieszaniny cieczy jonowych i mieszaniny farmaceutyków

Powszechnie wiadomo, że organizmy żyjące w ekosystemach lądowych i wodnych są narażone na działanie złożonych mieszanin związków chemicznych o zróżnicowanej budowie chemicznej. Z tego względu, ocena właściwości ekotoksykologicznych oparta o badania pojedynczych związków chemicznych wydaje się być daleka od realnej sytuacji. Z drugiej strony, liczba potencjalnych mieszanin chemicznych występujących w środowisku jest niemal nieskończona, stąd nie ma możliwości ich eksperymentalnego przetestowania. Wobec tego, aby oszacować efekt ekotoksykologiczny mieszaniny o znanym składzie stosuje się dwa podstawowe modele: (1) model CA (ang. *Concentration Addition*) oraz (2) model IA (ang. *Independent Action*). ^[95] Uważa się, że model CA jest odpowiedni dla przewidywania toksyczności mieszanin podobnie działających substancji chemicznych, jednakże istnieją prace, w których dobrą dokładność osiągnięto, z wykorzystaniem tego modelu, także dla mieszanin różnie działających związków. ^[96] Model IA, w przeciwieństwie do modelu CA, opiera się na założeniu, że składniki mieszaniny działają w różny sposób na organizm testowy, tj. wywołują efekt biologiczny na poziomie molekularnym poprzez interakcje z różnymi docelowymi miejscami organizmu. Oba modele są przydatne do oceny zagrożenia ekotoksykologicznego związanego z obecnością mieszanin różnych związków chemicznych w środowisku. Do tej pory, modele te zostały zastosowane do przewidywania toksyczności mieszanin pestycydów ^[97-99], cieczy jonowych ^[100, 105] oraz farmaceutyków ^[103, 108, 111-113, 115, 116] wobec bakterii *A. fischeri*. Poniżej, przytoczone zostaną badania dotyczące dwóch ostatnich grup związków.

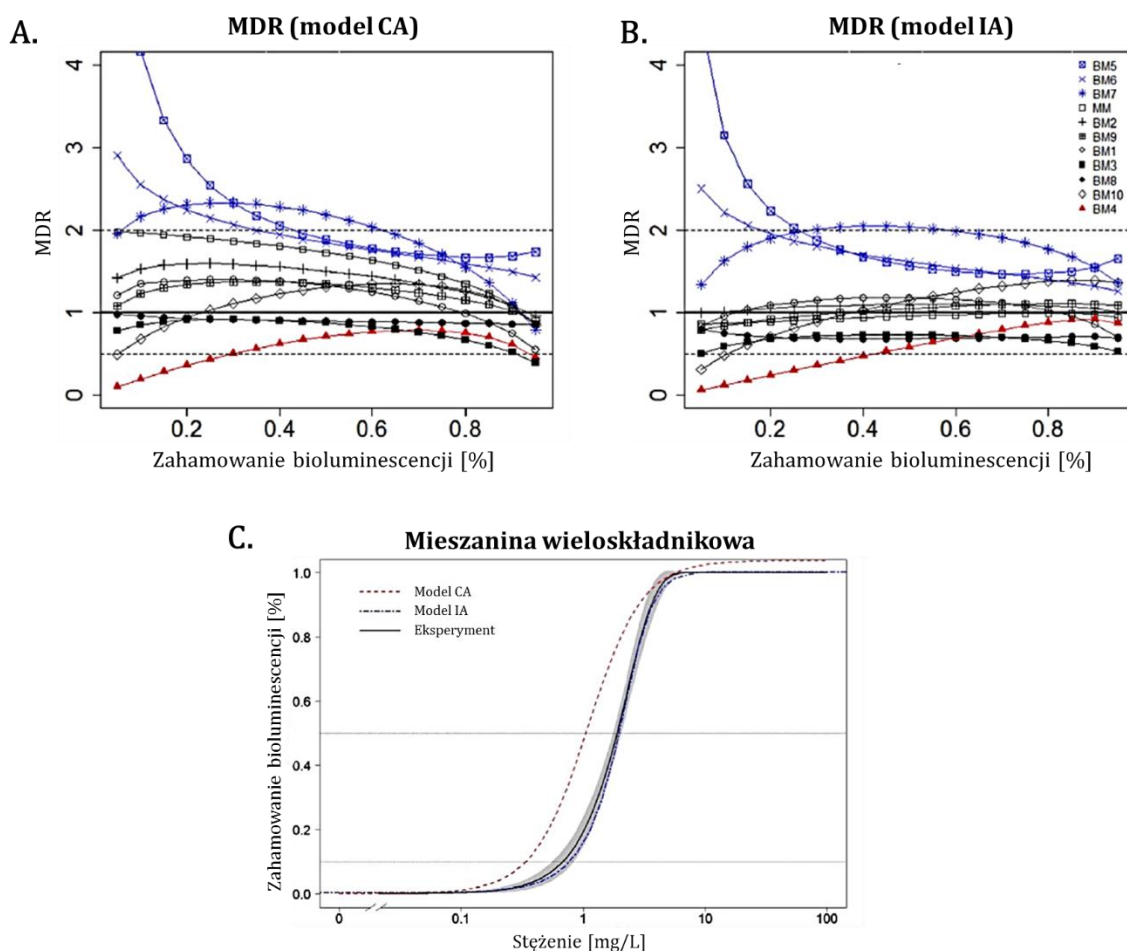
Mieszaniny cieczy jonowych

W odniesieniu do organicznych związków jonowych, rozważano ekotoksyczność powszechnie używanych produktów higieny osobistej. Przykładowo, przebadano

ekotoksyczność serii dwuskładnikowych mieszanin zawierających czwartorzędowe związki jonowe o charakterze antybakteryjnym: chlorek benzylodimetylododecyloamoniowy, bromek decylotrimetyloamoniowy, chlorek didecyloдимetyloamoniowy, chlorek heksadecylotrimetyloamoniowy i bromek tetradecylotrimetyloamoniowy, a także jedną wieloskładnikową mieszaninę zawierającą wszystkie pięć badanych związków jonowych. [100] Pojedyncze związki charakteryzowały się dużą ekotoksycznością wobec bakterii *A. fischeri* – wartości EC_{50} dla prawie wszystkich badanych związków wynosiły poniżej 1 mg/L. Dla dwuskładnikowych mieszanin otrzymano wartości EC_{50} w zakresie 0.33 – 4.37 mg/L, natomiast dla wieloskładnikowej mieszaniny, uzyskano wartość EC_{50} wynoszącą 1.90 mg/L. Autorzy porównali wartości EC_{50} otrzymane eksperymentalnie, z tymi przewidzianymi za pomocą modeli CA i IA. W większości przypadków, obydwa modele dały zgodne wyniki, co stwierdzono już wcześniej w literaturze dla różnych organizmów testowych i związków niejonowych. [101-103] Dobre dopasowanie modeli stwierdzono dla 7 z 11 badanych mieszanin, co także jest zgodne z literaturą, gdzie dobrą korelację modeli CA i IA obserwuje się dla około 80% wyników eksperymentalnych. Aby potwierdzić istnienie synergistycznych i antagonistycznych efektów, w badanych mieszaninach obliczono współczynnik MDR (ang. *Model Deviation Ratio*) – wskazuje on na odchylenie wartości eksperymentalnej od wartości przewidywanej i określa stopień dopasowania modelu. W przypadku działania addytywnego badanych składników mieszaniny, otrzymuje się MDR w przedziale 0.5-2, a współczynnik MDR równy 1 świadczy o doskonałym dopasowaniu wyników eksperymentalnych z obliczonymi oraz o braku oddziaływań między składnikami mieszaniny. W przypadku wartości MDR poniżej 0.5 stwierdza się występowanie efektu antagonistycznego (toksyczność mniejsza, niż przewidywano), a powyżej 2 – efektu synergistycznego (toksyczność większa, niż przewidywano). Większość składników badanych mieszanin wykazywała efekt addytywny, charakteryzujący się wartościami MDR w zakresie 0.5 – 2 (**Rys. 11**). W przypadku mieszaniny BM4 (chlorek benzylodimetylododecyloamoniowy + chlorek didecyloдимetyloamoniowy) zauważyć można, że przy niskich stężeniach wartości współczynnika MDR są niższe niż 0.5, a zatem wskazują na antagonistyczne działanie składników mieszaniny. Przeciwną zależność i synergistyczne działanie obserwowano w przypadku trzech dwuskładnikowych mieszanin zawierających chlorek didecyloдимetyloamoniowy w każdej z nich [BM5 (+ chlorek heksadecylotrimetylo-

amoniowy), BM6 (+ bromek tetradecylotrimetyloamoniowy) i BM7 (+ bromek decylo-trimetyloamoniowy)], gdzie wartości MDR przy niskich stężeniach wzrastały powyżej 2. Warto podkreślić, że dla mieszaniny wieloskładnikowej zawierającej wszystkie pięć jonowych związków, nie zaobserwowano odchyłań od wartości ekotoksyczności przewidywanych z wykorzystaniem modelu IA (**Rys. 11c**). Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi, które mówią o tym, że efekty synergistyczne i antagonistyczne rzadko występują w mieszaninach wieloskładnikowych, a częściej w dwu- i trójskładnikowych. [104]

Inni autorzy zbadali ekotoksyczność chlorków benzalkoniowych (BAC; homologi o różnej długości łańcucha alkilowego C12:C14 w stosunku 60:40) w mieszaninach z często wykrywanymi w środowisku anionowymi surfaktantami, takimi jak: liniowy alkilobenzenosulfonian (LAS), kwas naftalenosulfonowy (NSA), dodecylsulfonian sodu

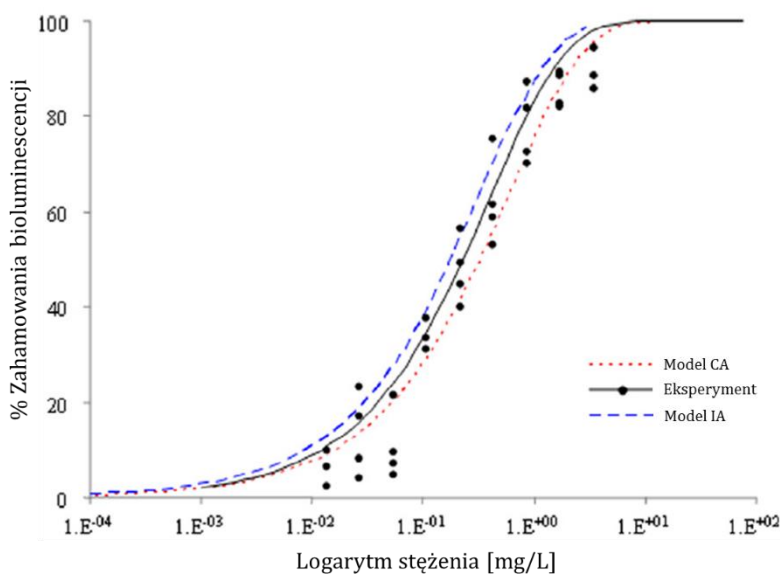


Rys. 11. Wartości MDR uzyskane dla modelu CA (A) oraz IA (B) dla badanych dwu- (BM1-BM10) i wieloskładnikowych mieszanin (MM). Eksperymentalna krzywa i przewidywane krzywe toksyczności dla mieszaniny wieloskładnikowej (C) [źródło: tłumaczenie [100]].

(SDS) i kwas benzenosulfonowy (BSA). [105] Ekotoksyczność pojedynczych składników wobec *A. fischeri* była zróżnicowana, a mianowicie największą toksycznością charakteryzował się główny przedmiot badań – BAC ($EC_{50, 30 \text{ min}} = 0.5 \text{ mg/L}$), mniejszą SDS ($EC_{50, 30 \text{ min}} = 8.2 \text{ mg/L}$), a najmniejszą LAS ($EC_{50, 30 \text{ min}} = 109.7 \text{ mg/L}$). Pozostałe związki, tj. BSA oraz NSA były nietoksyczne w badanym stężeniu. Jednakże, wartości EC_{50} wszystkich mieszanin, w tym mieszanin z nietoksycznymi związkami (BSA oraz NSA) zawierały się w zakresie 0.5 – 1.2 mg/L. Stąd, wnioskować można, że główną rolę w ekotoksyczności mieszanin odgrywają BAC, które silnie oddziałują z warstwą lipidową błony komórkowej bakterii *A. fischeri*.

Mieszaniny farmaceutyków

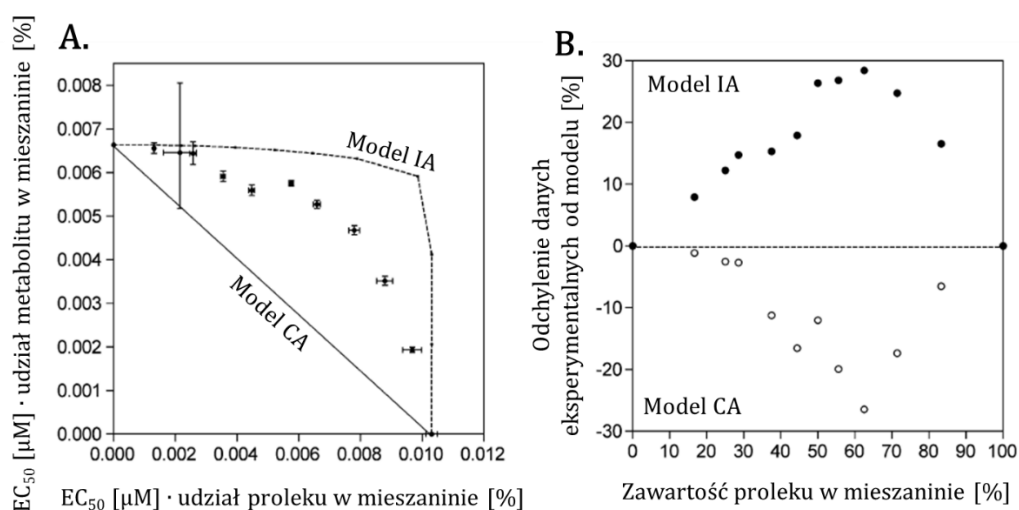
Szczególnie dużym zainteresowaniem w kontekście badań ekotoksykologicznych wobec *A. fischeri* cieszą się mieszaniny farmaceutyków. Przykładowo, w 2014 roku zbadano ekotoksyczność antybiotyków: triklokarbanu i triklosanu oraz triklosanu metylu (metabolitu triklosanu) – pojedynczo, oraz w trójskładnikowej mieszaninie. [103] Pojedyncze składniki charakteryzowały się dość dużą ekotoksycznością – najbardziej toksyczny był triklosan ($EC_{50} = 0.73 \text{ mg/L}$), następnie triklokarban ($EC_{50} = 0.91 \text{ mg/L}$), a najmniej toksyczny był metabolit triklosanu ($EC_{50} = 1.76 \text{ mg/L}$). Przewidywana toksyczność trójskładnikowej mieszaniny została obliczona z wykorzystaniem modeli CA oraz IA, i była bliska wartości eksperymentalnej ($EC_{50} = 0.23 \text{ mg/L}$) (Rys. 12).



Rys. 12. Przewidywane i eksperymentalne wartości toksyczności dla trójskładnikowej mieszaniny antybiotyków i metabolitu antybiotyku [źródło: tłumaczenie [103]].

Spośród dwóch zastosowanych modeli, model IA pozwolił na przewidywanie toksyczności mieszaniny z większą dokładnością ($EC_{50} = 0.25 \text{ mg/L}$), niż model CA ($EC_{50} = 0.33 \text{ mg/L}$). Analizując wykresy przedstawione na **Rys. 12** zauważyć można, że model IA przewiduje większą toksyczność mieszaniny, niż model CA – przeciwnie, niż w większości podobnych doniesień literaturowych. [106, 107]

Analiza ekotoksyczności mieszaniny leku i produktu/produktów jego metabolizmu jest bardzo istotna z punktu oceny ryzyka związanego z koegzystencją tych związków w środowisku. Kolejnymi badaniami, które uwzględniają ten aspekt są badania ekotoksyczności leku przeciwwirusowego – fosforanu oseltamiwiru (w postaci estru etylowego) i jego aktywnego metabolitu – oseltamiwiru w postaci kwasowej. [108] W toku badań, stwierdzono, że prolek charakteryzuje się nieco mniejszą toksycznością ($EC_{50, 30 \text{ min}} = 10.3 \text{ mM}$), niż jego metabolit ($EC_{50, 30 \text{ min}} = 6.6 \text{ mM}$). Do określenia interakcji zachodzących w dwuskładnikowych mieszaninach związków o różnym stosunku molowym składników użyto metody izobogramu (**Rys. 13**). [109] Metoda ta jest powszechnie wykorzystywana w farmacji do określenia interakcji pomiędzy składnikami mieszanin i może być przedstawiona graficznie. [110] Zauważyć można, że wartości EC_{50} mieszaniny uzyskane podczas eksperymentu są wyższe, niż te przewidywane z wykorzystaniem modelu CA (**Rys. 13a**). Ponadto, średnie odchylenie wartości eksperymentalnych wynosi 20-30%, zarówno dla modelu CA, jak i IA (**Rys. 13b**).



Rys. 13. Izobologram dwuskładnikowych mieszanin prolek-metabolit w odniesieniu do testu zahamowania bioluminescencji bakterii *A. fischeri* (A) – narysowana linia ciągła dotyczy wartości przewidywanych metodą CA, linia przerywana dotyczy wartości przewidywanych metodą IA. Odchylenie danych eksperymentalnych od danych przewidywanych za pomocą modeli CA i IA (B) [źródło: tłumaczenie [108]].

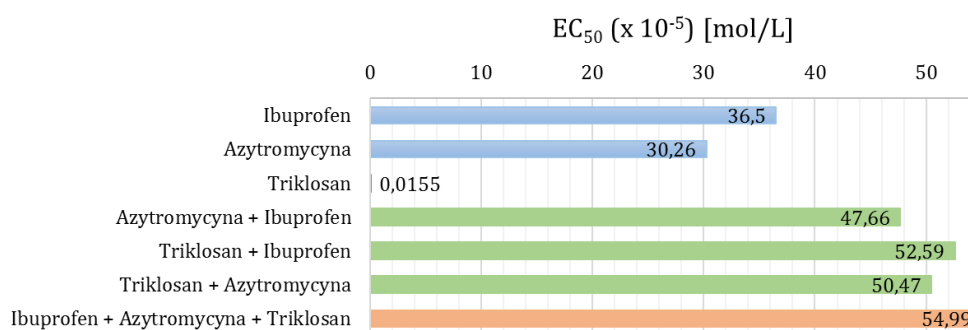
Nie ma wątpliwości, że istotną grupą farmaceutyków, których obecność w środowisku jest alarmująca są antybiotyki. W 2018 roku, przebadano ekotoksyczność mieszanin 16 antybiotyków z trzech grup, takich jak: sulfonamidy (SA), tetracykliny (TC) i środki bakteriostatyczne stosowane razem z sulfonamidami (SAP) (tzw. wzmacniacze sulfonamidów). [111] Wykazano, że składniki mieszaniny typu SA-SAP wykazywały synergizm działania wobec bakterii *A. fischeri*. Natomiast, w mieszaninach typu SA-TC oraz SA-DH obserwowano efekty antagonistyczne. Przebadano także ekotoksyczność mieszanin trójskładnikowych SA-TC-SAP i stwierdzono występowanie efektów synergistycznych między ich składnikami, które w rzeczywistości były wynikiem głównie efektów synergistycznych pomiędzy SA i SAP.

Inni autorzy, również badali ekotoksyczność antybiotyków z grupy sulfonamidów – tym razem w połączeniu z inhibitorami zjawiska *Quorum Sensing* (QS). [112, 113] Inhibitory QS są to związki stanowiące alternatywę dla popularnych antybiotyków. Działają one poprzez hamowanie ekspresji genów regulowanych przez mechanizm QS, czyli mechanizm umożliwiający komunikację między komórkami bakterii, w tym bakterii *A. fischeri*. [114] W toku badań stwierdzono, że sulfonamidy charakteryzują się większą ekotoksycznością, zarówno ostrą, jak i chroniczną, niż inhibitory QS. W przypadku dwuskładnikowych mieszanin zawierających sulfonamidy i inhibitory QS, zauważono, że różne typy inhibitorów QS powodują różne efekty. Inhibitory QS z grupy pochodnych pirolu i pirolidonu wykazywały efekty antagonistyczne i addytywne w połączeniu z sulfonamidami. Inhibitory QS będące pochodnymi furanonu – wykazywały efekty addytywne, antagonistyczne i synergistyczne. Jednakże, w przypadku badania chronicznej toksyczności, obserwowano tylko efekty antagonistyczne. To ważne, z punktu widzenia terapeutycznego doboru składników, ponieważ efektywność działania mieszaniny sulfonamidów z tego typu inhibitorami QS jest zwiększona w początkowym okresie, a z czasem maleje.

Kolejnym zjawiskiem biologicznym studiowanym w odniesieniu do bakterii *A. fischeri* jest zjawisko hormezy, czyli korzystnego działania niskich stężeń toksykanta. W badaniach Lin i współpracowników wykorzystano dwa standardowe modele (CA i IA) do przewidywania efektu hormetycznego w mieszaninach antybiotyków. [115] Okazało się, że przy zastosowaniu w/w modeli nie jest możliwe przewidywanie efektu hormetycznego w mieszaninach, szczególnie w tych, w których zachodzą interakcje.

Autorzy badania, opracowali nowy model, który pozwala przewidywać wspomniany efekt, zarówno dla mieszanin, w których nie zachodzą interakcje pomiędzy składnikami, jak i dla mieszanin, w których takie interakcje występują.

Badania ekotoksyczności mieszanin przeprowadzono również dla trzech powszechnie stosowanych substancji czynnych: ibuprofenu, azytromycyny i triklosanu. [116] Spośród tych trzech, najbardziej toksycznym wobec *A. fischeri* okazał się triklosan – autorzy badania sugerują, że efekt ten spowodowany jest obecnością atomów chloru w strukturze tego związku. Zmierzona ekotoksyczność dwuskładnikowych mieszanin w/w leków była mniejsza, niż przewidywano różnymi modelami – wobec tego stwierdzono występowanie antagonistycznych efektów między składnikami mieszaniny (**Rys. 14**). Występowanie tego samego efektu stwierdzono dla trójskładnikowej mieszaniny ibuprofen/azytromycyna/triklosan.

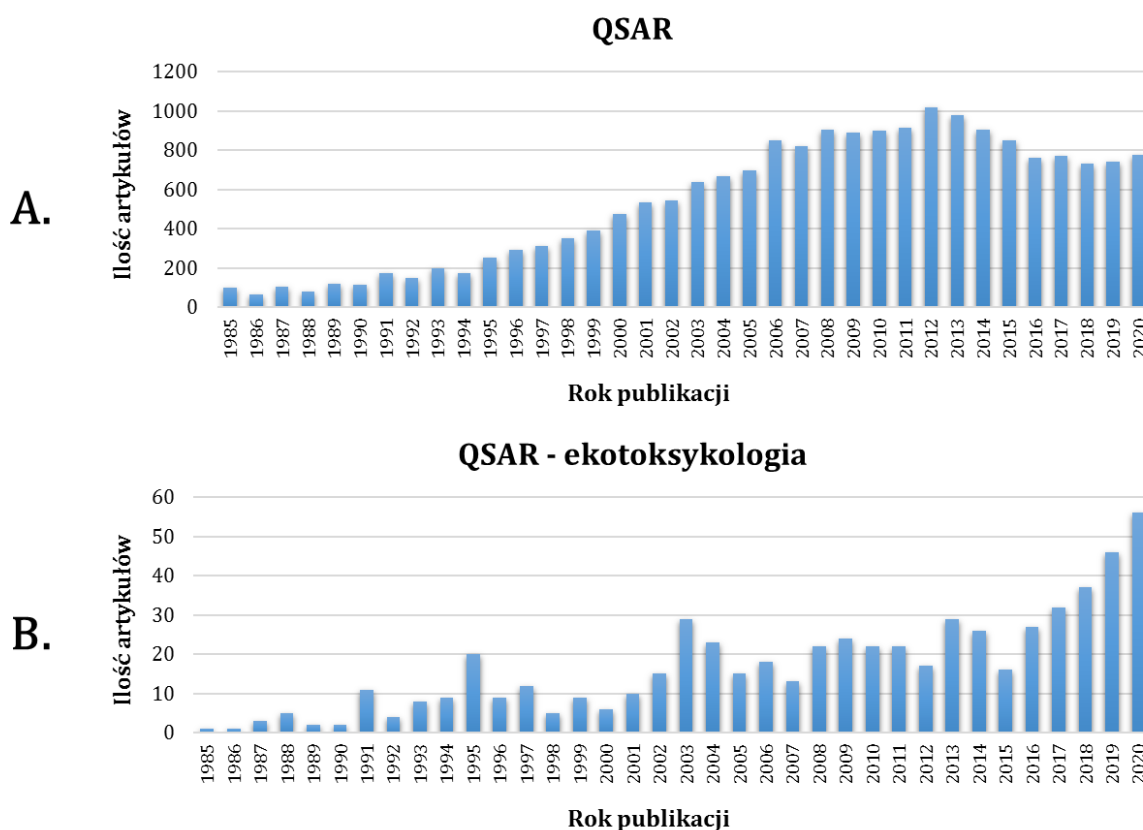


Rys. 14. Wartości EC₅₀ pojedynczych leków (słupki niebieskie), mieszanin dwuskładnikowych (słupki zielone) i mieszaniny trójskładnikowej (słupki pomarańczowy) [źródło: opr. na podstawie [116]].

*W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeanalizowano ekotoksyczność leków z grupy antagonistów receptora angiotensyny II oraz substancji pomocniczych występujących w tabletkach, zarówno w postaci pojedynczych składników, jak i w mieszaninach lek/substancja wypełniająca i substancja wypełniająca/substancja wypełniająca. Ponadto, wyznaczono przewidywane wartości toksyczności dla w/w mieszanin z zastosowaniem modeli CA i IA, oraz wyznaczono współczynniki MDR, aby określić występowanie antagonistycznych i synergistycznych efektów w mieszaninach. Zastosowano opracowaną modyfikację testu Microtox®, pozwalającą na zbadanie ekotoksyczności słabo rozpuszczalnych farmaceutyków wobec bakterii *A. fischeri*. Wyniki tych badań zostaną szczegółowo przedstawione w rozdziałach **Badania własne i Część eksperymentalna** niniejszej pracy.*

3. METODY QSAR W OCENIE RYZYKA ŚRODOWISKOWEGO

Metody modelowania QSAR (ang. *quantitative structure-activity relationship*) odnoszą się do tworzenia predykcyjnych modeli aktywności biologicznej w funkcji pewnych strukturalnych i molekularnych informacji o cząsteczce chemicznej. Powszechnie, pojęcie QSAR używane jest w odniesieniu do projektowania leków, gdzie zyskało szerokie zastosowanie do korelacji informacji molekularnych zarówno z aktywnością biologiczną, jak i właściwościami fizykochemicznymi – w tym aspekcie właściwszym pojęciem jest modelowanie QSPR (ang. *quantitative structure-property relationship*). Modelowanie QSAR jest powszechnie akceptowanym podejściem stosowanym do znalezienia powiązania między elementami strukturalnymi danego związku, a jego aktywnością biologiczną. Metody te znalazły zastosowanie przede wszystkim w agrochemii i chemii farmaceutycznej. [117] Gwałtowny wzrost zainteresowania metodami QSAR nastąpił na przełomie XX/XXI wieku (**Rys. 15A**).



Rys. 15. Ilość wszystkich publikacji naukowych dotyczących modelowania QSAR (A), oraz modelowania QSAR w ekotoksykologii (B) [źródło: Science Finder].

Metodologie QSAR pozwalają na znaczne skrócenie czasu i wysiłku wymaganego np. do wynalezienia nowych leków. Metody te znajdują również zastosowanie w ekotoksykologii, gdzie mogą zastąpić długotrwałe i kosztowne, wstępne badania ekotoksyczności związków chemicznych – na **Rys. 15B** można zauważyć stale rosnący trend w ilości publikacji dotyczących metod QSAR w ekotoksykologii. Duże zainteresowanie metodami QSAR spowodowane może być faktem, że jest to podejście przyjazne dla środowiska pozwalające zredukować ilość niezbędnych eksperymentów chemicznych i badań na zwierzętach. Ponadto, pozwala ono na przewidywanie właściwości nowo zsyntezowanych związków bazując jedynie na ich strukturze chemicznej.

Kluczowym elementem zastosowania metod QSAR jest znalezienie odpowiedniego zestawu deskryptorów, które w odpowiedni sposób reprezentują zmienność właściwości strukturalnych cząsteczki. [118, 119] Analiza QSAR wykorzystuje metody statystyczne w celu uzyskania ilościowych zależności matematycznych pomiędzy strukturą chemiczną, a aktywnością biologiczną. W celu wykonania analizy QSAR należy wybrać odpowiednią grupę związków (zestaw treningowy) o znanych parametrach (deskryptorach), które mogą być skorelowane z cechami molekularnymi. Parametry te mogą być uzyskane w toku obliczeń kwantowo-chemicznych. Tak otrzymane deskryptory mogą zawierać istotne informacje o cząsteczce np. właściwości elektronowe, geometryczne, hydrofobowość, lipofilowość, rozpuszczalność i są one następnie korelowane z obserwowaną aktywnością biologiczną. [120] Opisany powyżej zestaw treningowy służy do skonstruowania modelu, natomiast zestaw testowy do późniejszej walidacji tego modelu.

Jak wspomniano powyżej, deskryptory mogą kodować różne informacje zależne od rodzaju reprezentacji molekularnej i zdefiniowanego algorytmu obliczania (**Tabela 7**). Wyróżnić można następujące grupy deskryptorów [121]:

- (1.) Topologiczne – dwuwymiarowe deskryptory biorące pod uwagę ułożenie atomów w cząsteczce. Kodują w formie numerycznej informacje o wielkości, kształcie i rozgałęzieniu cząsteczki, a także obecności heteroatomów i ilości wiązań wielokrotnych.

- (2.) Geometryczne – obliczane są w oparciu o współrzędne atomów w przestrzeni trójwymiarowej. Kodują one wiele informacji, lecz wymagają wstępnej optymalizacji struktury.
- (3.) Termodynamiczne – uwzględniają efekty energetyczne, tj. ciepło tworzenia, czy entropię cząsteczki.
- (4.) Elektronowe – zwykle obliczane są z użyciem metod chemii kwantowej i dotyczą właściwości elektronowych, tj. ładunek atomowy, energie HOMO i LUMO oraz moment dipolowy.
- (5.) Konstytucyjne – proste deskryptory wyznaczane wyłącznie w oparciu o skład atomowy związku, bez uwzględnienia geometrii lub struktury elektronowej cząsteczki.

Tabela 7. Rodzaje deskryptorów stosowanych w modelowaniu QSAR. [121]

Grupa deskryptorów	Opis	Przykłady
Topologiczne	- obliczane na podstawie grafów molekularnych - reprezentują połączenia atomów w cząsteczce	Indeksy Wienera, Zagreba oraz indeksy połączeń
Geometryczne	- obliczane na podstawie współrzędnych atomów w przestrzeni trójwymiarowej - uwzględniają przestrzenne informacje dotyczące rozmiaru i kształtu cząsteczki oraz rozkładu atomów	Deskryptory WHIM, MoRSE, GETAWAY
Termodynamiczne	- wiążą strukturę chemiczną z obserwowanym efektem chemicznym	Ciepło tworzenia, refrakcyjność molowa, współczynnik podziału <i>n</i> -oktanol/woda (logP)
Elektronowe	- używane w celu opisanie elektronowych aspektów cząsteczki, wiązań lub fragmentów molekularnych	Moment dipolowy, energie HOMO i LUMO
Konstytucyjne	- proste deskryptory odzwierciedlające chemiczną informację dotyczącą cząsteczki bez informacji o połączeniach międzyatomowych	Ilość atomów, ilość wiązań, masa molowa

Metody QSAR można podzielić ze względu na zastosowane narzędzia chemometryczne na:

- metody oparte na regresji: metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), wielokrotnej regresji liniowej (MLR), aproksymacji funkcji genetycznych (GFA);
- metody oparte na klasyfikacji: liniowa analiza dyskryminacyjna (LDA), analiza klasterów (CA);

Metody uczenia maszynowego (ang. *machine learning methods*), np. sztuczne sieci neuronowe są również ważnym narzędziem pozwalającym na stworzenie modeli QSAR.

Procedura modelowania polega na statystycznej korelacji cechy molekularnej z rozważanymi właściwościami biologicznymi/środowiskowymi. Parametrami

statystycznymi, które ostatecznie charakteryzują prawidłowość dopasowania modelu QSAR są: współczynnik determinacji (R^2), skorygowany współczynnik determinacji (R_{adj}^2), sumaryczny błąd kwadratowy (SSE) odzwierciedlający odchylenie wartości przewidywanych od wartości obserwowanych, podstawowy błąd średniokwadratowy (RMSE) używany do wskazania precyzji predykcji oraz test F (Fishera).^[122]

3.1. QSAR w analizie ekotoksyczności cieczy jonowych wobec bakterii *A. fischeri*

Ekotoksyczność cieczy jonowych jest często badana eksperymentalnie, ze względu na zastosowanie tych związków w wielu gałęziach przemysłu. Równocześnie, naukowcy podjęli wysiłki w celu skonstruowania odpowiednich równań QSAR w ogólnej postaci:

$$\log(1/EC_{50}) = ax_1 + bx_2 \dots + c,$$

gdzie: EC_{50} – stężenie powodujące 50% zahamowanie bioluminescencji bakterii; a, b – współczynniki kierunkowe; c – wyraz wolny; x_1, x_2 – deskryptory,

które pozwoliłyby na określenie ekotoksyczności cieczy jonowych wobec bakterii *A. fischeri* – szczególnie ważnego bioindykatora środowiska wodnego. Główna różnica między proponowanymi modelami polega na wybraniu innych deskryptorów w celu wytworzenia modelu. Wszystkie proponowane modele zebrano w **Tabeli 8** i opisano w niniejszym rozdziale.

Dotychczasowe modele QSAR były konstruowane w oparciu o dane dotyczące kilkunastu-kilkudziesięciu cieczy jonowych, aż do zestawu ponad 200 cieczy jonowych. Dla ujednoliconej oceny dokładności i stabilności wyprowadzonych modeli posługiwano się współczynnikiem R^2 . Warto jednak pamiętać, że wysoka, bliska jedności wartość współczynnika R^2 niekoniecznie oznacza, że model jest niezawodny i stabilny.^[123] Większość modeli QSAR skonstruowano w oparciu o technikę regresji wielokrotnej (MLR - ang. *multiple regression technique*), która jest często stosowana ze względu na swoją prostotę, przejrzystość i łatwą interpretację wyników. Technika ta pozwala także na otrzymanie istotnych parametrów statystycznych dla wybranych deskryptorów

Tabela 8. Zestawienie opublikowanych modeli QSAR do przewidywania toksyczności cieczy jonowych wobec *A. fischeri*.

Model	Ilość cieczy jonowych użyta w modelu	Rodzaje cieczy jonowych	Ilość deskryptorów	R ²	Rok publikacji	Źródło
I	28	imidazoliowe, amoniowe, fosfoniowe, choliniowe, pirydyniowe	3	0.78	2006	[124]
II	43	imidazoliowe, pirydyniowe, pirolidyniowe	9	0.92	2007	[125]
III	96	imidazoliowe, pirydyniowe, choliniowe, morfoliniowe, piperydyniowe	15	0.92	2010	[126]
IV	148	fosfoniowe, amoniowe, imidazoliowe, pirydyniowe, morfoliniowe, choliniowe, pirolidyniowe, guanidyniowe	94	0.96	2011	[127]
V i VI	10 i 19	bromki imidazoliowe, pirydyniowe, pirolidyniowe, piperydyniowe, morfoliniowe, tropiniowe i chinuklidyniowe	1	0.93 i 0.86	2012	[56]
VII	110	imidazoliowe, pirydyniowe, guanidyniowe, pirolidyniowe i inne	12	0.94	2012	[128]
VIII	157	choliniowe, fosfoniowe, imidazoliowe, pirydyniowe, piperyniowe i inne	25	0.91	2015	[129]
IX	24	pirolidyniowe, piperydyniowe, pirydyniowe i imidazoliowe	2	0.95	2015	[55]
X	29	imidazoliowe, pirydyniowe, amoniowe	1	0.92	2016	[60]
XI	42	imidazoliowe, amoniowe, pirydyniowe, pirolidyniowe	3	0.78	2016	[130]
XII	213	amoniowe, choliniowe, imidazoliowe, morfoliniowe, melanimowe, fosfoniowe, tropiniowe, piperydyniowe, pirydyniowe, pirolidyniowe, chinuklidyniowe i sulfoniowe	10	0.75	2016	[131]
XIII	110	imidazoliowe, amoniowe, pirydyniowe, pirolidyniowe i inne	5	0.91	2017	[132]
XIV	153	choliniowe, fosfoniowe, imidazoliowe, pirydyniowe, piperyniowe i inne	3	0.88	2019	[133]
XV	153	imidazoliowe, tropiniowe, piperydyniowe, pirydyniowe, pirolidyniowe, chinuklidyniowe i inne	16	0.94	2020	[134]

(tj. wartości P i rozkład t-Studenta), pozwalając w ten sposób na eliminację nieistotnych deskryptorów, które nie mają istotnego wpływu na wydajność modelu.

Pierwsza praca, w której wyprowadzono model QSAR pozwalający przewidzieć ekotoksyczność cieczy jonowych wobec bakterii *A. fischeri* pojawiła się w 2006 roku (Tabela 8, model I). Model ten zawierał w sobie deskryptory dotyczące właściwości elektronowych, przestrzennych, strukturalnych, termodynamicznych i topologicznych,

oraz charakteryzował się współczynnikiem R^2 na poziomie 0.78. Wyprowadzony model skutecznie przewidywał wzrost toksyczności cieczy jonowej spowodowany wydłużeniem łańcucha alkilowego. Wykazał też, że właściwości kationu mają większy wpływ na toksyczność, niż właściwości anionu. Ponadto, wyprowadzony model wskazał, że ciecze amoniowe charakteryzują się mniejszą toksycznością, niż ciecze pirydyniowe i imidazoliowe.

W latach 2007 i 2010, Luis i współpracownicy opracowali dwa nowe modele QSAR w oparciu o technikę MLR (**Tabela 8**, model II i III). Zastosowali oni podejście uwzględniające grupowe wkłady poszczególnych elementów strukturalnych, tj.: kationu, anionu i podstawnika – każda z tych grup została podzielona na dalsze podgrupy w oparciu o działanie toksyczne. W modelu II zastosowano 9 deskryptorów dla 43 cieczy jonowych, w modelu III zwiększono ilość deskryptorów do 15, a zbiór cieczy jonowych do 96. Jednakże, zastosowanie większej ilości deskryptorów i większego zestawu cieczy jonowych nie przyniosło poprawy i oba równania QSAR charakteryzowały się podobnymi wartościami współczynnika R^2 wynoszącymi 0.925 (model II) i 0.924 (model III).

W modelu IV (**Tabela 8**), opracowanym w 2011 roku zastosowano nowe podejście do przewidywania ekotoksyczności cieczy jonowych, wykorzystując analizę dyskryminacyjną cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS-DA – ang. *partial least square-discriminant analysis*) do zbioru 148 cieczy jonowych. Opracowany model osiągnął współczynnik R^2 na poziomie 0.963.

Viboud i współpracownicy, opracowali dwa proste modele do przewidywania ekotoksyczności cieczy jonowych z anionem bromkowym, przy wykorzystaniu tylko jednego deskryptora (**Tabela 8**, model V i VI). W ten sposób, uwzględniając w równaniu QSAR deskryptor dotyczący ilości alifatycznych atomów węgla, osiągnięto współczynnik R^2 wynoszący 0.934, natomiast uwzględniając deskryptor dotyczący ilości atomów węgla w kationie osiągnięto $R^2 = 0.861$. Należy jednak wziąć pod uwagę mały zbiór danych – do powyższych modeli użyto zestawu 10 i 19 cieczy jonowych. Zwiększenie rozmiaru zbioru prawdopodobnie spowodowałoby spadek dokładności modeli. Stąd, modele QSAR opracowywane na większych zbiorach zawierają większą ilość deskryptorów, aby pokryć cały obszar zmienności struktur molekularnych. [135]

Dobłą korelację ($R^2 = 0.936$) przy dużym zbiorze cieczy jonowych (110) osiągnięto w modelu VII (**Tabela 8**). Do rozwinięcia równania QSAR zastosowano ponownie technikę MLR oraz analizę cząstkowych najmniejszych kwadratów. Dwuwymiarowe deskryptory uzyskano przy użyciu oprogramowania Dragon.

Indeksy topologiczne podobne jak w modelach II i III oraz technikę MLR zastosowano w modelu VIII, gdzie wykorzystano zbiór 157 cieczy jonowych do wyprowadzenia równania QSAR o współczynniku $R^2 = 0.908$ (**Tabela 8**, model VIII). Indeksy topologiczne wykorzystane w badaniu zostały uzyskane w oparciu o charakterystykę atomów niewodorowych (wektor CV) oraz ich pozycje (macierz odległości D) w strukturze cząsteczki. Autorzy badania wnioskuje, że technika MLR jest precyzyjna i odpowiednia do przewidywania ekotoksyczności cieczy jonowych wobec bakterii *A. fischeri*.

Dosyć proste równanie QSAR, zawierające dwa deskryptory (energia najniższego nieobsadzonego orbitalu molekularnego oraz objętość molowa) zostało wyprowadzone ze współczynnikiem R^2 wynoszącym 0.954 dla zestawu 24 cieczy jonowych z anionem bromkowym (**Tabela 8**, model IX). Autorzy badania wykazali, że toksyczność cieczy jonowych z anionem bromkowym zmniejsza się wraz z energią najniższego nieobsadzonego orbitalu molekularnego, a zwiększa się wraz z objętością molową kationów. Jeszcze mniejszą ilość deskryptorów (1) zastosowano dla zestawu 29 cieczy jonowych (**Tabela 8**, model X). Użyty deskryptor - ilość atomów węgla w łańcuchu alkilowym, pozwolił na uzyskanie równania QSAR ze współczynnikiem R^2 wynoszącym 0.918. W toku badań, autorzy wykazali, że toksyczność wobec *A. fischeri* wzrasta wraz ze wzrostem długości podstawnika alkilowego kationu, a natura anionu ma mniejszy wpływ na toksyczność.

Liniową kombinację trzech wewnątrznie nieskorelowanych deskryptorów biorących pod uwagę topologię układu oraz ilość atomów tlenu zastosowano do wyprowadzenia równania QSAR dla zestawu 42 cieczy jonowych – uzyskano współczynnik R^2 wynoszący 0.78 (**Tabela 8**, model XI). Wykazano, że chociaż toksyczność zależy głównie od rozmiaru i długości kationu, to jednak znaczący wpływ ma także ilość atomów tlenu w kationie.

Największy zestaw cieczy jonowych, tj. 213 związków, zastosowano do wyprowadzenia równania QSAR w oparciu o wiele jedno- i dwuwymiarowych deskryptorów obejmujących cechy konstytucyjne, parametry połączeń, indeksy informacyjne, indeksy topochemiczne, profile molekularne; dodatkowo użyto także parametry kwantowego topologicznego podobieństwa molekularnego (QTMS – ang. *quantum topological molecular similarity*) (**Tabela 8**, model XII). Dla tak dużego zestawu związków uzyskano równanie QSAR o współczynniku $R^2 = 0.748$.

Trzy ostatnie modele (**Tabela 8**, modele XIII-XV) zostały opracowane w oparciu o technikę MLR z wykorzystaniem dużego zestawu cieczy jonowych (każdy model powyżej 100 związków). Model XIII opracowano przy użyciu pięciu deskryptorów, co pozwoliło na uzyskanie współczynnika R^2 na poziomie 0.906 – autorzy wnioskują, że model ten dobrze przewiduje wzrost toksyczności spowodowany wzrostem długości łańcucha alkilowego. W modelu XIV użyto tylko trzy deskryptory, osiągając równanie QSAR charakteryzujące się współczynnikiem $R^2 = 0.877$ – autorzy porównują dokładność swojego równania z modelem VIII, który wówczas był jednym z najlepszych dostępnych modeli QSAR pozwalających na przewidywanie ekotoksyczności cieczy jonowych wobec *A. fischeri*. Zaletą modelu XIV jest fakt, że otrzymanie potrzebnych deskryptorów jest mniej skomplikowane, niż w przypadku modelu VIII. Satysfakcjonujące parametry statystyczne ($R^2 = 0.936$) otrzymano dla modelu XV – opublikowanego w 2020 roku. W toku badań wykazano, że w przypadku imidazoliowych cieczy jonowych, obecność grupy hydroksylowej lub nienasyconego wiązania w łańcuchu może zmniejszyć toksyczność cieczy jonowych.

Podsumowując, istnieje wiele podejść do stworzenia odpowiedniego równania QSAR pozwalającego na przewidywanie toksyczności cieczy jonowych wobec bakterii *A. fischeri*. Do tej pory, opublikowano 15 modeli QSAR, które zebrano w **Tabeli 8**.

*W ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę wyprowadzenia równania QSAR dla serii diizopropyloamoniowych cieczy jonowych w oparciu o eksperymentalne dane dotyczące ekotoksyczności wobec *A. fischeri* oraz deskryptory uzyskane przy pomocy obliczeń DFT oraz programów ACD/Labs Percepta i OECD QSAR Toolbox. Wyniki tych badań zostaną szczegółowo przedstawione w rozdziałach **Badania własne i Część eksperymentalna** niniejszej pracy.*

3.2. QSAR w analizie ekotoksyczności farmaceutyków wobec *A. fischeri*

Farmaceutyki, bez wątpienia są istotną grupą zanieczyszczeń środowiska – przede wszystkim z tego względu, że są to substancje biologicznie aktywne, które mogą wywoływać niezamierzone efekty na organizmy wodne i lądowe. Modele QSAR są szeroko wykorzystywane w farmacji, przede wszystkim do projektowania leków o pożądanych właściwościach biologicznych. [136, 137] Znalazły one także zastosowanie do określenia efektu ekotoksykologicznego farmaceutyków wobec organizmów, takich jak *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Oncorhynchus mykiss*, *Pimephales promelas* oraz *Danio rerio*. [138-144] Wykazano, że właściwościami, które w dużej mierze determinują ekotoksyczność leków są: hydrofobowość, logP (współczynnik podziału *n*-oktanol-woda) oraz D_{lipw} (współczynnik podziału liposomy-woda przy pH 7).

Niestety, opracowane do tej pory modele QSAR głównie dotyczą ekotoksyczności wobec ryb, alg i skorupiaków. Opracowano tylko jeden model QSAR traktujący o ekotoksyczności wobec bakterii *A. fischeri*, który dodatkowo uwzględnia efekt toksyczności dwuskładnikowych mieszanin leków. [145] W badaniach tych opracowano model QSAR dla trzech poziomów toksyczności – EC₁₀, EC₃₀ i EC₅₀ używając 14 związków chemicznych (10 leków i 4 herbicydów), które dawały łącznie 153 mieszanin. Podejście analizy ryzyka środowiskowego w odniesieniu do mieszanin, a nie pojedynczych leków jest niezwykle istotne, ponieważ środowiskowe toksykanty nigdy nie są izolowane i współistnieją wraz z innymi związkami chemicznymi. Do modelowania QSAR wybrano 9 deskryptorów otrzymanych przy użyciu programu Dragon m.in. sumę odległości geometrycznych między atomami azotu i siarki oraz deskryptory związane z masą atomową, objętością molową, polaryzowalnością i elektrycznością. W wyniku modelowania ustalono, że przy średnim i wysokim efektywnym stężeniu - EC₃₀ i EC₅₀, wzajemne oddziaływanie atomów azotu i siarki miało największy wpływ na toksyczność mieszaniny. Ponadto, na oba te stężenia silnie wpływały zmiany odległości międzyatomowych. Dla stężenia EC₅₀, na toksyczność wpływała silnie molekularna geometria, podczas gdy na toksyczność najniżej efektywnego stężenia EC₁₀ wpływała obecność grup aromatycznych. Wykazano również, że obecność atomów tlenu i chloru w składnikach mieszaniny, skutkuje zwiększeniem jej toksyczności.

Co istotne, żaden z powyższych modeli – zarówno modele QSAR wobec alg, ryb i skorupiaków, jak i model QSAR wobec bakterii, nie rozróżnia nominalnego (C_{nom} - masa wprowadzonej substancji chemicznej w całkowitej objętości medium) i swobodnego (C_{free} – faktyczna masa substancji chemicznej znajdująca się w badanym medium) stężenia farmaceutyków w badanym medium, co mogłoby mieć istotny wpływ na dokładność równania QSAR. Już w 2013 roku, Kwon i współpracownicy zwrócili uwagę, że w przypadku silnie hydrofobowych substancji następuje spadek korelacji między wartościami EC_{50} , a $\log P$.^[146] Wobec tego, oprócz stężenia nominalnego, warto rozpatrywać także aspekt stężenia swobodnego, które przeliczane jest ze stężenia nominalnego z uwzględnieniem wartości K_{lip-w} (współczynnik podziału faza tłuszczowa-woda), zawartości fazy tłuszczowej w bakteriach *A. fischeri* oraz masy bakterii *A. fischeri* w badanym naczyniu. Takie podejście zastosowano podczas wyprowadzania równania QSAR pozwalającego na przewidzenie ekotoksyczności serii węglowodorów aromatycznych wobec bakterii *A. fischeri*. W toku badań stwierdzono, że użycie stężenia swobodnego zamiast nominalnego pozwoliło na zwiększenie współczynnika R^2 wyprowadzonego równania z 0.830 na 0.956.^[147]

*W ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę wyznaczenia ogólnego równania QSAR dla leków przeciwnadciśnieniowych z grupy antagonistów receptora angiotensyny II, które pozwoli także na przewidywanie ekotoksyczności innych leków i związków chemicznych zawierających ugrupowanie bifenyłowe wobec bakterii *A. fischeri*. Wykorzystano deskryptory uzyskane przy pomocy obliczeń DFT oraz programów ACD/Labs Percepta i OECD QSAR Toolbox. Wyniki tych badań zostaną szczegółowo przedstawione w rozdziałach **Badania własne i Część eksperymentalna** niniejszej pracy.*

BADANIA WŁASNE

CELE PRACY

Celem pracy była ocena ekotoksykologiczna ksenobiotyków jonowych i niejonowych przy wykorzystaniu bakterii *A. fischeri* oraz opracowanie modeli QSAR pozwalających na przewidywanie ekotoksyczności tych związków przy zastosowaniu odpowiednich deskryptorów. Postawiony cel pracy był możliwy do zrealizowania poprzez następujące cele cząstkowe:

- opracowanie metodyki umożliwiającej zbadanie słabo rozpuszczalnych związków niejonowych z grupy ARBs przy wykorzystaniu testu Microtox®;
- przeprowadzenie badań ekotoksykologicznych pojedynczych związków niejonowych (API, substancje pomocnicze) oraz mieszanin dwu-, trój- oraz wieloskładnikowych składających się z różnych kombinacji API-API, substancja pomocnicza-substancja pomocnicza oraz API-substancja pomocnicza, a także całych formułacji farmaceutycznych;
- zidentyfikowanie oddziaływań antagonistycznych/synergistycznych występujących w badanych mieszaninach związków niejonowych – przy zastosowaniu predykcyjnych modeli CA i IA;
- przeprowadzenie badań ekotoksykologicznych zsyntezowanych amoniowych cieczy jonowych o potencjalnym działaniu herbicydowym;
- wyznaczenie deskryptorów elektronowych, termodynamicznych i strukturalnych dla dwóch grup związków: 1) amoniowych cieczy jonowych oraz 2) ARBs i analogów bifenylowych;
- ocena zależności pomiędzy aktywnością wobec bakterii *A. fischeri*, a strukturą chemiczną dla dwóch grup związków z wykorzystaniem technik statystycznych.

1. BAKTERIE *ALIIVIBRIO FISCHERI* I TEST MICROTOX® W BADANIACH EKOTOKSYCZNOŚCI KSENOBIOTYKÓW

Bakterie wykazujące zdolność do bioluminescencji są często wykorzystywane do testów ekotoksyczności ze względu na fakt, że są one integralną częścią ekosystemu, a przeprowadzenie testów z ich użyciem jest zwykle szybkie i proste – do tego typu organizmów zaliczyć można bakterie *Aliivibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* oraz *Pseudomonas fluorescens*.^[148] Te pierwsze wykorzystywane są w teście Microtox® i pozwalają na określenie ekotoksyczności badanej próbki w oparciu o pomiar zahamowania bioluminescencji.

Test Microtox®, ale również inne komercyjne testy, tj. LUMISTox™ i ToxAlert® są oparte na specyficznej linii bakterii *A. fischeri* NRRL B-11177, która wykazuje bioluminescencję jako efekt przemian metabolicznych. Produkcja światła przez bakterie jest proporcjonalna do aktywności metabolicznej i każde zahamowanie jej aktywności powoduje odpowiednie obniżenie bioluminescencji – stąd użyteczność tych organizmów w biotestach. Bakterie te występują na całym świecie w środowiskach morskich strefy umiarkowanej i subtropikalnej, jako organizmy swobodnie unoszące się w wodzie, ale także jako symbionty zwierząt morskich np. kałamarnic lub związane z osadami i rozkładającą się materią.^[149]

Proces bioluminescencji bakterii *A. fischeri* katalizowany jest przez enzym lucyferazę, który składa się z dwóch podjednostek α i β , kodowanych odpowiednio przez geny *luxA* i *luxB*.^[150] Enzym ten umożliwia przekształcenie zredukowanej flawiny (FMNH₂) do flawiny (FMN), a długołańcuchowych aldehydów do kwasów tłuszczowych. W tej reakcji emitowane jest światło o długości fali wynoszącej 490 nm^[151]:



Efektywność bioluminescencji bakterii zależy od gęstości populacji, emisja światła jest większa przy dużej koncentracji komórek bakteryjnych. Wynika to z faktu występowania zjawiska QS, które związane jest z komunikowaniem się pomiędzy komórkami bakteryjnymi i wytwarzaniem substancji sygnałowych przez te organizmy.^[150]

Test Microtox® pozwala na ocenę ekotoksyczności substancji chemicznych, ścieków, wód powierzchniowych oraz osadów dennych poprzez wykorzystanie zjawiska zahamowania bioluminescencji bakterii *A. fischeri*. W wyniku pomiaru, otrzymywana jest wartość EC₅₀ badanego toksykanta, odpowiadająca stężeniu, które powoduje 50-procentową redukcję bioluminescencji w trakcie 5 i 15-minutowej ekspozycji (test fazy wodnej) i/lub 30-minutowej ekspozycji (test fazy stałej). Test Microtox® zawiera 17 standardowych protokołów, które pozwalają na ocenę ekotoksykologiczną różnego rodzaju próbek: ścieków, wody pitnej, osadów i związków chemicznych różnego pochodzenia.

W przypadku badania związków chemicznych charakteryzujących się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, najczęściej stosowany jest protokół 81.9% Basic Test, w którym wykorzystywane są roztwory wodne o znanym stężeniu toksykanta. Test polega na pomiarze szeregu rozcieńczeń, a sama nazwa testu związana jest z faktem, że pierwszym badanym stężeniem w tym protokole, jest stężenie próbki wynoszące 81.9%. Bakterie *A. fischeri* są inkubowane z każdym otrzymanym rozcieńczeniem toksykanta, przez okres wynoszący zwykle 5 i 15 minut. Zintegrowane z urządzeniem Microtox® oprogramowanie Microtox® Omni, w oparciu o uzyskane dane, wyznacza wartość EC₅₀, wykorzystując wyprowadzone równanie regresji liniowej. ^[152] Co ważne, do przeprowadzenia tego typu testu wymagane jest sporządzenie klarownych roztworów wodnych o odpowiednio wysokim stężeniu, co stwarza problemy przy słabiej rozpuszczalnych związkach. Dopuszcza się możliwość zastosowania dodatku rozpuszczalników organicznych, tj. metanolu, etanolu czy DMSO w stężeniu nieprzekraczającym 1.5%. Jednakże, wykazano, że nawet stosowanie rozpuszczalników charakteryzujących się niewielką toksycznością może mieć wpływ na wyniki pomiarów. ^[153]

Istnieją również protokoły pozwalające na badanie substancji stałych, jednak docelowo są one przeznaczone do badania osadów dennych. Standardowe protokoły fazy stałej to Microtox® Basic Solid Phase Test oraz Microtox® Solid Phase Test. Pierwszy z nich przeznaczony jest głównie do badania gleb, osadów i innych próbek stałych. Drugi z nich, opracowany do badania tego samego typu próbek, zawiera dodatkowo etap filtracji na kolumnkach. ^[152] Obydwa testy, pozwalają na bezpośredni kontakt bakterii z badanym ciałem stałym, przez co pozwalają na określenie

toksyczności spowodowanej nie tylko przez rozpuszczoną substancję, ale także przez jej nierozpuszczoną lub zaadsorbowaną część.

W niniejszej pracy doktorskiej opracowano modyfikację wyżej wymienionego protokołu Basic Solid Phase Test, która umożliwia zastosowanie tego protokołu do badania słabo rozpuszczalnych substancji np. farmaceutyków. Modyfikacja ta zostanie opisana w szczegółach, w dalszej części pracy.

1.1. Amoniove ciecze jonowe

1.1.1. Wstęp

Czwartorzędowe sole amoniowe, w tym amoniowe ciecze jonowe stanowią interesującą alternatywę dla konwencjonalnych rozpuszczalników ze względu na ich właściwości, tj. niepalność, nietloność i biodegradowalność.^[154] Istotną zaletą tych związków jest również ich „projektowalność”, ponieważ poprzez odpowiedni dobór kationu i anionu, można otrzymać ciecze jonowe o pożądanych właściwościach. Wśród cieczy jonowych, istotną grupę stanowią herbicydowe ciecze jonowe, które łączą w sobie efektywność tradycyjnych herbicydów z pożądanymi cechami cieczy jonowych, tj. niską prężnością par i dobrą rozpuszczalnością w wodzie.^[155] Należy jednak pamiętać, że rosnące zainteresowanie cieczami jonowymi w rolnictwie związane jest z ich nieuniknioną obecnością w ekosystemie wodnym i lądowym, stąd konieczne jest poznanie ekotoksyczności tych potencjalnych zanieczyszczeń środowiska.^[3]

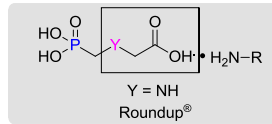
Celem pracy jest synteza czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych, które mogłyby być zastosowane jako przyjazne dla środowiska herbicydy, a także ocena ich ekotoksyczności wobec środowiska wodnego, przy wykorzystaniu bakterii *A. fischeri*. Struktura badanych związków nawiązuje do struktury chemicznej popularnego herbicydu o szerokim spektrum działania – glifosatu, stosowanego w preparacie Roundup®. Anion tego związku, nadający mu właściwości herbicydowe, o ogólnej strukturze (P-C)-N-C-COO⁻ jest pochodną kwasu aminooctowego (glicyny, H₂N-CH₂COOH), a w/w charakterystyczna sekwencja heteroatomów w łańcuchu węglowym determinuje jego aktywność herbicydową. Syntezowane związki składają się z kationu amoniowego oraz modyfikowanego anionu, w którym trudno hydrolizowalne chemicznie i enzymatycznie wiązanie P-C oraz atom azotu ugrupowania (P-C)-N

glifosatu został zamieniony przez inne ugrupowania heteroatomowe zawierające atomy tlenu, siarki lub halogenu (**Rys. 16**):

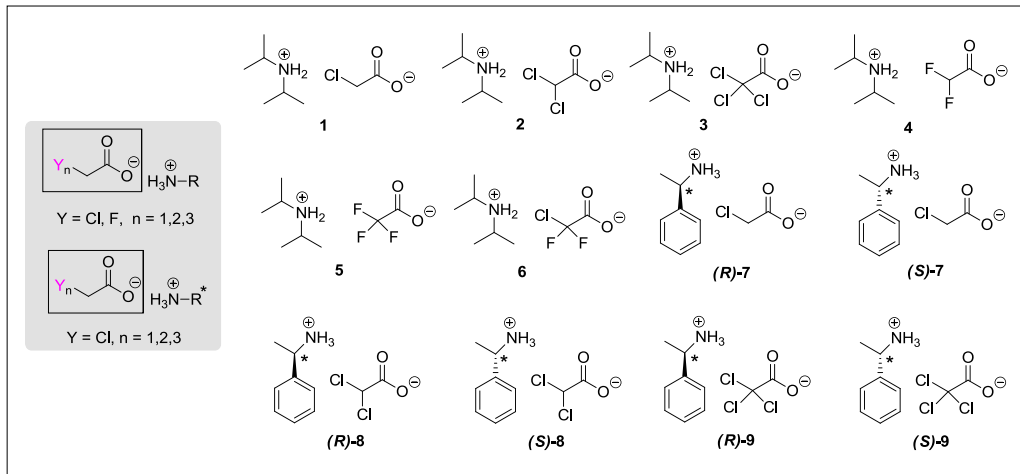
- GRUPA 1 [atom/atomy halogenowe (Y = Cl, F)] – ciecze jonowe, pochodne kwasów halogenooctowych zawierających kation diizopropylamoniowy (achiralne) lub kation (*R*)- lub (*S*)-fenyloetylamoniowy (chiralne);
- GRUPA 2 [atom siarki (Y = S)] – sole zawierające mono- i dianiony 2,2'-tiodioctanowe oraz alifatyczne (trietylo-, diizopropyl-, *t*-butylo-)amoniowe i aromatyczne amoniowe kationy;
- GRUPA 3 [atom tlenu lub siarki (Y = O, S)] – diizopropylamoniowe sole fenoksyoctanów/fenylotiooctanów oraz chiralne metoksyfenylooctany diizopropylamoniowe.

Przedstawione na **Rys. 16** związki zostały otrzymane w wyniku reakcji odpowiedniego kwasu (halogenooctowego, 2,2'-tiodioctowego, fenoksyoctowego, fenylotiooctowego lub metoksyfenylooctowego) z 10-procentowym nadmiarem aminy (diizopropylaminy, diizobutyloaminy, trietyloaminy, *t*-butyloaminy, izochinoliny, (*R*)-/(*S*)-fenyloetylaminy) bez użycia rozpuszczalnika. Pełna analiza związków (¹H, ¹³C NMR, MS, HRMS, analiza elementarna) przedstawiona została w publikacjach będących przedmiotem niniejszej dysertacji [65-68]. W **Części eksperymentalnej** pracy zawarto analizy dotyczące związków, które nie zostały jeszcze opublikowane.

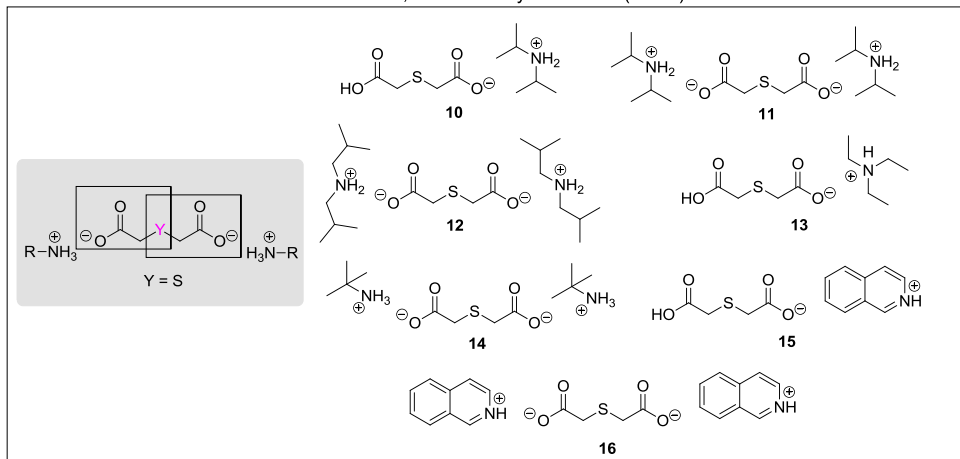
Przedstawiona na **Rys. 16** GRUPA 1 obejmuje achiralne halogenooctany diizopropylamoniowe i chiralne chlorooctany (*R*)-/(*S*)-fenyloetylamoniowe. Same kwasy halogenooctowe są związkami, które można znaleźć w ekosystemach wodnych, np. kwas trichlorooctowy powstaje w wyniku atmosferycznej degradacji chlorofluorowęglowodorów, a kwas chlorooctowy jest produktem fotodegradacji herbicydów. [156] Związki te były intensywnie badane pod kątem wpływu na organizmy wodne. [157-160] Jednakże ich sole amoniowe, nie zostały dokładnie poznane. Istnieje jeden patent dotyczący zastosowania soli amoniowych kwasu trichlorooctowego jako związków o charakterze herbicydowym oraz publikacja opisująca potencjalne zastosowanie tego związku do zwalczania *Agropyron repens* i *Kentucky bluegrass*. [161, 162] Badania serii optycznie czynnych chlorooctanów (*R*)-/(*S*)-fenyloetylamoniowych są bardzo ważne z perspektywy zastosowania tych związków w rolnictwie, jako środków herbicydowych.



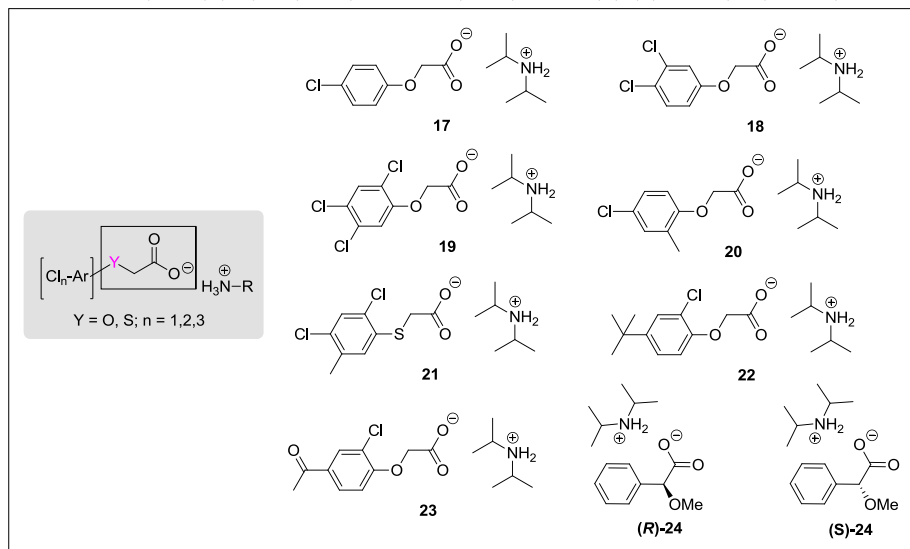
GRUPA 1: Halogenooctany amoniowe (1-6) [66] oraz chlorooctany (*R*)-/(*S*)-fenyloctany [(*R*)-/(*S*)-7-9] [68]:



GRUPA 2: 2,2'-Tiodioctany amoniowe (10-16) [65]:



GRUPA 3: Fenoksyoctany/(fenyltio)octany amoniowe (17-23) [67] oraz (*R*)-/(*S*)-metoksyfenyloctany [(*R*)-/(*S*)-24]:



Rys. 16. Struktury chemiczne badanych związków amoniowych.

Co ciekawe, około 25-30% komercyjnych związków stosowanych w rolnictwie to związki optycznie czynne, jednakże większość z nich nie jest sprzedawana w postaci czystych enancjomerów, a w postaci mieszanin racemicznych. [163-165] Zaniedbywanie faktu chiralności herbicydów jest niekorzystne dla środowiska, głównie z powodu enancjoselektywnej toksyczności herbicydów wobec organizmów docelowych i niedocelowych. Podczas stosowania racemicznych formułacji herbicydowych, pozornie nieaktywny enancjomer może wywoływać negatywne efekty u organizmów niedocelowych, pozostając nadal nietoksycznym dla organizmu docelowego. [166]

W skład GRUPY 2 wchodzi z kolei związki zawierające mono- i dianiony 2,2'-tiodioctanowe oraz kationy: diizopropylamoniowy, diizobutyloamoniowy, trietyloamoniowy, *t*-butyloamoniowy lub izochinoliniowy. Sole 2,2'-tiodioctanowe charakteryzują się doskonałymi właściwościami kompleksującymi i są stosowane jako środki do ekstrakcji metali, materiały paramagnetyczne, środki antybakteryjne i przeciwnowotworowe. [167-170] Jednakże, w dotychczasowej literaturze nie ma danych dotyczących wpływu tych związków na środowisko. Jest to szczególnie istotne ze względu na wymienione wyżej biologiczne działanie 2,2'-tiodioctanów oraz właściwości kompleksujące metale ciężkie, które są toksyczne dla większości żywych organizmów.

GRUPĘ 3 stanowią natomiast fenoksyoctany, fenyltiooctany oraz (*R*)-/(*S*)-metoksyfenyltiooctany diizopropylamoniowe. Pochodne te, w szczególności chlorofenoksyoctany są szeroko wykorzystywane w rolnictwie jako komercyjne związki herbicydowe, np. kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) oraz 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (MCPA), które są często stosowane do pielęgnacji trawników i ogrodów (w postaci soli sodowych, potasowych i amoniowych). [171] W serii badanych połączeń chemicznych, istotne jest również określenie wpływu zamiany heteroatomu na toksyczność związków (atom tlenu w fenoksyoctanach zamieniony na atom siarki w fenyltiooctanach).

1.1.2. Badania ekotoksykologiczne (test Microtox®)

Badania ekotoksykologiczne czwartorzędowych soli amoniowych przeprowadzono z użyciem protokołu 81.9% Basic Test, stosując wodne roztwory badanych związków oraz czas inkubacji 5 i 15 minut. Poniżej, przedstawiono wyniki dla poszczególnych grup badanych związków, wraz ich dyskusją.

1.1.2.1. GRUPA 1: Chiralne i achiralne halogenoocyany amoniowe

Wyniki badań ekotoksykologicznych otrzymane za pomocą testu Microtox® dla serii achiralnych (**1-6**) i chiralnych (**(R)/(S)-7-9**) związków amoniowych przedstawiono w **Tabeli 9**. Dodatkowo, w celach porównawczych zbadano ekotoksyczność fluorków nieorganicznych (amonu i potasu) – aby sprawdzić toksyczny efekt związany z atomami fluoru w postaci jonowej, a także siarczanów amoniowych - aby zaobserwować efekt związany z kationem (oraz z anionem, uznając, że siarczany są biologicznie neutralne).

Tabela 9. Wartości EC₅₀ [mg/L] otrzymane po 5 i 15 minutach ekspozycji bakterii *A. fischeri*, wraz z 95% przedziałem ufności przedstawionym w nawiasie – związki z GRUPY 1.

Badany związek	EC ₅₀ [mg/L]		Kategoria toksyczności [51] a)	Źródło:
	5 min	15 min		
Związki achiralne				
1	169.4 (38.59 - 469.6)	147.5 (15.12 - 1445)	Brak toksyczności ostrej	[66]
2	21950.5 (7187 - 95992)	12691 (10130 - 15032)		
3	9273.1 (529.9 - 173551)	5426.4 (305.1 - 38171)		
4	256.8 (80.45 - 819.7)	230.9 (62.91 - 847.2)		
5	31666 (10827 - 92617)	28525 (18332 - 44387)		
6	733.6 (266.2 - 2373)	2715 (798.1 - 11657)		
fluorek amonu	3298 (2184 - 4980)	3126 (1706 - 5728)	III	
fluorek potasu	13.80 (4.062 - 46.86)	12.95 (4.014 - 41.76)		
siarczan bis(diizopropylamoniowy)	650.4 (398.0 - 1062)	708.0 (403.4 - 1243)	Brak toksyczności ostrej	[68]
Związki chiralne				
(R)-7	737.8 (605.8 - 898.5)	557.4 (508.6 - 610.8)	Brak toksyczności ostrej	[68]
(S)-7	6943 (2011 - 23969)	4757 (867.0 - 16283)		
(R)-8	988.5 (849.9 - 1150)	801.8 (693.4 - 927.1)		
(S)-8	2098 (310.9 - 14155)	1880 (407.1 - 8681)		
(R)-9	618.5 (516.7 - 740.2)	503.8 (464.9 - 545.9)		
(S)-9	3083 (316.5 - 30034)	1834 (111.1 - 30271)		
siarczan bis[(R)-fenyloetyloamoniowy]	12.36 (9.30 - 16.43)	13.81 (10.18 - 18.74)	III	
siarczan bis[(S)-fenyloetyloamoniowy]	946.8 (435.4 - 2059)	1089 (216.2 - 5489)	Brak toksyczności	

			ostrej	
Formulacje glifosatu				
Glifosat (kwas)	-	17.5 (15.8 - 19.5)	III	[172]
Sól izopropylaminowa glifosatu	-	162 (150 - 177)	Brak toksyczności ostrej	
Roundup®	-	24.9 (23.9 - 26.0)	III	

a) Kategorie toksyczności ostrej: I. Substancja bardzo toksyczna, $EC_{50} < 1.0$ mg/L; II. Substancja toksyczna, $1 < EC_{50} < 10$; III. Substancja szkodliwa, $10 < EC_{50} < 100$ mg/L [51]

Aniony siarczanowe zostały wybrane ze względu na ich nietoksyczność – według Europejskiej Agencji Chemikaliów (ECHA) np. siarczan sodu zostaje zredukowany w cyklu siarkowym i nie musi być klasyfikowany pod kątem toksyczności dla środowiska. [173]

Zauważyć można, że wszystkie badane związki amoniowe, zarówno chiralne, jak i achiralne mogą zostać zaklasyfikowane jako całkowicie nietoksyczne dla środowiska na podstawie przyjętej klasyfikacji – wszystkie z nich posiadają wartości EC_{50} powyżej 100 mg/L.

W przypadku związków achiralnych, najbardziej toksycznym jest ten zawierający jeden atom chloru (**1**), natomiast najmniej toksycznym – związek zawierający trzy atomy fluoru (**5**). Najbardziej zaskakujące są duże różnice w toksyczności szeregu chlorooctanów różniących się tylko ilością atomów chloru w anionie, gdzie stosunek wartości $EC_{50, 15 \text{ min}}$ dla serii związków **3 : 2 : 1** wynosi 37 : 86 : 1. Podobną różnicę zauważyć można dla dwóch fluoroctanów, gdzie stosunek wartości $EC_{50, 15 \text{ min}}$ **5 : 4** wynosi 123 : 1. Ponadto, trifluoroctan (**5**) jest 5-razy mniej toksyczny, niż analogiczny trichlorooctan (**3**). Jest to dosyć nieoczekiwany wynik, ze względu na fakt, że związki fluorowe tworzą silniejsze wiązania wodorowe, w porównaniu do związków zawierających atomy chloru – a co z tym związane, powinno obserwować się silniejsze interakcje związków fluorowych z układami biologicznymi. Co ciekawe, jedynie w przypadku chlorodifluoroctanu (**6**) zaobserwowano, że wartość EC_{50} po 15 minutach jest wyższa, niż po 5 minutach ekspozycji. Istnieje kilka opisanych cieczy jonowych, których EC_{50} wobec *A. fisheri* zwiększa się po 5 minutach [174-176], jednakże różnice w toksyczności między dwoma okresami inkubacji nie są tak zauważalne, jak w przypadku chlorodifluoroctanu **6**. Efekt zmniejszania się wrażliwości bakterii *A. fisheri* na badany związek wraz ze wzrostem czasu ekspozycji opisywany jest

w literaturze naukowej jako zjawisko regeneracji bakterii w wyniku ich adaptacji do toksycznego związku. Jednym ze znanych mechanizmów adaptacji, który pozwala na ochronę komórki przed szkodliwym działaniem toksykanta jest reakcja *cis-trans* izomeryzacji błonowych kwasów tłuszczowych. [177, 178] Dotychczas, w literaturze naukowej nie skupiono się na ekotoksyczności związków fluorowych wobec *A. fischeri*, stąd dodatkowo zbadano ekotoksyczność fluorków amonu (NH_4F) i potasu (KF), w których fluor ma charakter jonowy i tworzy znacznie silniejsze wiązania wodorowe niż fluor związany kowalencyjnie z atomem węgla, jak np. we fluorooctanach 4-6. Zaobserwowano dużą różnicę w ekotoksyczności tych dwóch badanych fluorków, wartość EC_{50} dla KF była aż 240 razy mniejsza, niż dla NH_4F . Zatem, fluorek potasu KF może zostać zaklasyfikowany do III klasy toksyczności, natomiast fluorek amonu NH_4F może zostać uznany za nietoksyczny. W przypadku obydwu fluorków, nie zaobserwowano zwiększonej bioluminescencji po 15 minutach ekspozycji, stąd można sądzić, że efekt ten jest specyficzny jedynie dla chlorodifluorooctanu 6.

Badane, chiralne związki amoniowe [(R)-/(S)-7-9] okazały się całkowicie nietoksyczne dla środowiska wodnego. Wszystkie (R)-enancjomery były znacznie bardziej toksyczne dla bakterii *A. fischeri*, niż analogiczne (S)-enancjomery. Zależność tą można było również obserwować dla chiralnych siarczanów, które zostały zsyntezowane w celach porównawczych. Powszechnie wiadomo, że większość hormonów i enzymów jest enancjoselektywna – stąd chiralne związki wprowadzone do organizmu w postaci czystych enancjomerów lub w postaci mieszaniny reagują w inny sposób. [179] W przypadku badanych związków, można wnioskować, że (S)-enancjomery są łatwiej metabolizowane i degradowane przez specyficzne enzymy *A. fischeri*. Enancjoselektywna toksyczność różnego typu związków nie została dotąd dobrze poznana w odniesieniu do bakterii *A. fischeri*. Istnieją doniesienia dotyczące innych organizmów morskich pokazujące, że (R)-enancjomery związków herbicydowych, tj. diklofop i laktofen były bardziej toksyczne, odpowiednio wobec cyjanobakterii *Microcystis aeruginosa* [180] oraz alg *Scenedesmus obliquus* [181]. Z kolei odwrotna zależność została stwierdzona dla (S)-enancjomerów metolachloru i diklofopu metylowego, które były bardziej toksyczne wobec alg *S. obliquus*, niż ich (R)-enancjomery. [182] Również (S)-enancjomery napropamidu, acetochloru i propizochloru [183] oraz metolachloru [184] wykazywały większą toksyczność

dla cyjanobakterii *M. aeruginosa*, niż ich (*R*)-analogi. Istnieją doniesienia naukowe sugerujące, że enancjoselektywna toksyczność chwastobójczych cieczy jonowych zależy od ich stężenia, rodzaju badanego gatunku chwastu i rodzaju anionu. [185] W oparciu o powyższe badania nie można jednoznacznie stwierdzić, że enancjoselektywna toksyczność zależy głównie od rodzaju badanego organizmu. Wydaje się raczej, że jest ona związana ze specyficzną budową chemiczną danego herbicydu i jego interakcjami z chiralnym środowiskiem biologicznym. W przypadku badanych soli amoniowych największą enancjoselektywnością działania charakteryzował się monochlorooctan (**R**)-7, który był 9-krotnie bardziej toksyczny, niż jego enancjomer (**S**)-7.

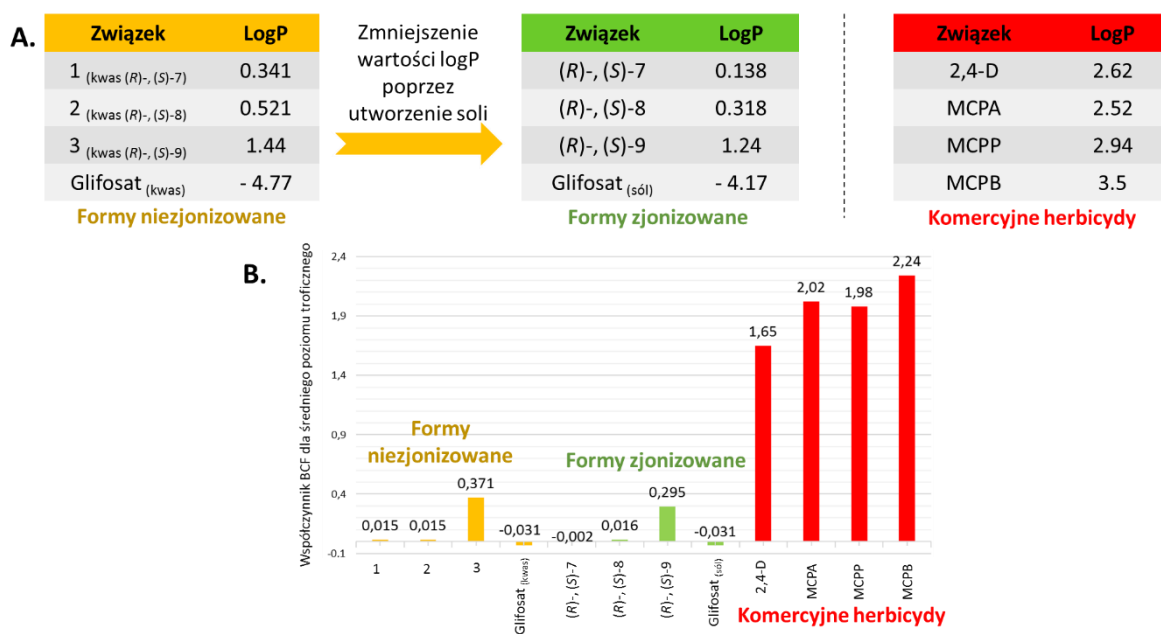
W literaturze dowiedziono, że azotowe kationy aromatyczne są bardziej toksyczne dla bakterii *A. fischeri* niż azotowe kationy alifatyczne. [186] Taką zależność zaobserwować można dla zsyntezowanych di- i trichlorooctanów, gdzie związki z kationem diizopropylamoniowym (**2** i **3**) są mniej toksyczne niż analogiczne związki z azotowym aromatycznym kationem fenyletyloamoniowym ((**R**)-/**(S)**-**8-9**). Zależność ta nie sprawdza się w przypadku monochlorooctanu diizopropylamoniowego (**1**), który jest bardziej toksyczny od analogicznych związków z azotowym kationem aromatycznym ((**R**)-/**(S)**-**7**).

Aby przeanalizować wpływ kationów diizopropylamoniowego oraz fenyletyloamoniowego na ekotoksyczność soli diizopropylamoniowych oraz fenyletyloamoniowych, zsyntezowano siarczany diizopropylamoniowy oraz enancjomeryczne siarczany (*R*)- i (*S*)-fenyletyloamoniowe. Wiedząc, że toksyczność anionu siarczanowego, a tym samym jego udział w toksyczności całego związku jest znikomy, można stwierdzić, że kation diizopropylamoniowy jest bardziej toksyczny niż kation (*S*)-fenyletyloamoniowy, a co ciekawe mniej toksyczny niż kation (*R*)-fenyletyloamoniowy. Toksyczność siarczanu (*R*)-fenyletyloamoniowego jest 79-krotnie wyższa niż (*S*)-enancjomeru – można więc sądzić, że to chiralny kation wnosi istotny wkład w ogólną toksyczność soli amoniowej.

Aniony badanych soli, będące pochodnymi kwasu octowego są strukturalnie spokrewnione z powszechnie stosowanym herbicydem, glifosatem. Porównując toksyczność różnych form glifosatu (kwas, sól izopropylamoniowa, Roundup®) (**Tabela 9**) zauważyć można, że zsyntezowane chiralne i achiralne związki są mniej toksyczne dla środowiska wodnego, niż wszystkie pochodne glifosatu. Jedynym

zsyntezowanym związkem, który jest bardziej toksyczny od soli izopropylamoniowej glifosatu jest monochlorooctan **1**.

Ponadto, aby wykazać „zielony charakter” zsyntezowanych soli przeprowadzono obliczenia wartości logP (współczynnik podziału *n*-oktanol/woda) oraz BCF (ang. *bioconcentration factor* – współczynnik biokoncentracji) dla soli, odpowiadających im form kwasowych oraz komercyjnych fenoksy-herbicydów przy użyciu oprogramowania OECD QSAR Toolbox. Współczynniki te charakteryzują tendencję do bioakumulacji danego związku. Wykazano, że obydwie wartości uległy zmniejszeniu na skutek przekształcenia kwasu w sól, co dowodzi, że sole są formami o mniejszym potencjale bioakumulacji (**Rys. 17**). Warto również podkreślić, że zsyntezowane związki charakteryzują się dużo niższymi wartościami logP oraz BCF, niż komercyjne herbicydy (2,4-D, MCPA, MCPP, MCPB).



Rys. 17. (A.) Przewidywane wartości logP dla form kwasowych (żółta tabela), zsyntezowanych soli (zielona tabela) oraz komercyjnych herbicydów (czerwona tabela); (B.) Przewidywane wartości współczynnika BCF dla średniego poziomu troficznego. Wartości obliczone przy wykorzystaniu oprogramowania OECD QSAR Toolbox.

Ekotoksyczność mieszanin racemicznych

Jako, że większość herbicydów jest stosowana w praktyce w formie mieszanin racemicznych, obliczono toksyczność mieszanin (*rac*)-7, (*rac*)-8, (*rac*)-9 i (*rac*)-SO₄ dla zsyntezowanych par (R)- i (S)-enancjomerów, z zastosowaniem modelu CA, który pozwala na przewidywanie toksyczności dwuskładnikowych mieszanin z wysoką

precyzją. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 10**. W przypadku par enancjomerów znacząco różniących się ekotoksycznością (np. (*R*)-enancjomer toksyczny, (*S*)-enancjomer mniej lub w ogóle nietoksyczny) ostateczna toksyczność mieszaniny racemicznej, pomimo obecności mniej toksycznego enancjomeru nadal pozostaje dosyć wysoka. Taką zależność obserwujemy dla (**rac**)-**7** oraz (**rac**)-**SO₄** i w tych przypadkach użycie enancjomerycznie czystych formułacji herbicydowych niosłoby za sobą szereg korzyści dla środowiska. Należy przy tym pamiętać, że mniej toksyczny enancjomer powinien nadal wykazywać odpowiednią aktywność biologiczną dla organizmu docelowego np. aktywność herbicydową.

Tabela 10. Ekotoksyczność mieszanin racemicznych zsyntezowanych soli amoniowych, obliczona z wykorzystaniem modelu CA.

Organizm	Związek	Punkt końcowy pomiaru	Wartość eksperymentalna [mg/L]	Wartość przewidywana [mg/L]
<i>Aliivibrio fischeri</i>	(<i>R</i>)-7	EC ₅₀ , 15 min	557.4	-
	(<i>S</i>)-7		4757	
	(rac)-7		-	
	(<i>R</i>)-8		801.8	-
	(<i>S</i>)-8		1880	
	(rac)-8		-	
	(<i>R</i>)-9		503.8	-
	(<i>S</i>)-9		1834	
	(rac)-9		-	
	(<i>R</i>)-SO ₄ *		13.81	-
	(<i>S</i>)-SO ₄ *		1089	
	(rac)-SO ₄ *		-	

* (*R*)-/(*S*)-/(**rac**)-SO₄ – formy enancjomeryczne i forma racemiczna siarczanu bis(fenyloetyloamoniowego)

Właściwości herbicydowe i fitotoksyczne zsyntezowanych związków zostały opisane w publikacjach [66, 68]. Na uwagę zasługuje fakt, że oprócz mniejszej toksyczności wobec bakterii *A. fischeri*, zsyntezowane związki, w szczególności (**S**)-**7**, charakteryzują się także mniejszą fitotoksycznością działania na rośliny uprawne oraz porównywalnym, a nawet silniejszym działaniem chwastobójczym niż glifosat.

Wnioski do podrozdziału 1.1.2.1.:

- ✓ Wszystkie zsyntezowane chiralne i achiralne sole amoniowe są całkowicie nietoksyczne dla bakterii *A. fischeri* ($EC_{50} > 100$ mg/L).
- ✓ (*R*)-enancjomery są znacznie bardziej toksyczne dla bakterii *A. fischeri*, niż analogiczne (*S*)-enancjomery – obserwuje się nawet 9-krotną różnicę w toksyczności obu enancjomerów.
- ✓ Na podstawie przeprowadzonych obliczeń można stwierdzić, że zsyntezowane chiralne sole charakteryzują się mniejszym potencjałem bioakumulacji niż komercyjne herbicydy (2,4-D, MCPA, MCPP, MCPB), a użycie enancjomerycznie czystej formułacji herbicydowej byłoby szczególnie uzasadnione w przypadku związków (*R*)-7 i (*S*)-7.

1.1.2.2. GRUPA 2: 2,2'-Tiodioctany amoniowe

Wyniki badań ekotoksykologicznych otrzymane za pomocą testu Microtox® dla serii 2,2'-tiodioctanów przedstawiono w Tabeli 11. Zauważyć można zróżnicowaną toksyczność zsyntezowanych związków, począwszy od całkowicie nieszkodliwych (11, 12, 14), przez te zaliczane do III klasy toksyczności (10, 13), a skończywszy na

Tabela 11. Wartości EC_{50} [mg/L] otrzymane po 5 i 15 minutach ekspozycji bakterii *A. fischeri*, wraz z 95% przedziałem ufności przedstawionym w nawiasie – związki z GRUPY 2.

Badany związek	EC_{50} [mg/L]		Kategoria toksyczności [51] a)	Źródło:
	5 min	15 min		
10	34.56 (23.44 - 50.96)	34.00 (27.62 - 41.86)	III	[65]
11	65807 (12120 - 357317)	87300 (906.1 - 8411208)	Brak toksyczności ostrej	
12	442.5 (329.9 - 593.4)	359.3 (255.0 - 506.5)	Brak toksyczności ostrej	
13	64.62 (41.86 - 99.76)	59.34 (49.80 - 70.70)	III	
14	279.5 (190.1 - 411.0)	268.5 (219.8 - 327.9)	Brak toksyczności ostrej	
15	3.600 (1.441 - 8.994)	4.088 (0.8333 - 20.05)	II	
16	2.648 (2.115 - 3.316)	2.907 (2.295 - 3.680)		

a) Kategorie toksyczności ostrej: I. Substancja bardzo toksyczna, $EC_{50} < 1.0$ mg/L; II. Substancja toksyczna, $1 < EC_{50} < 10$; III. Substancja szkodliwa, $10 < EC_{50} < 100$ mg/L [51]

związkach toksycznych zaliczanych do II klasy toksyczności (**15**, **16**). Do całkowicie nieszkodliwych związków zaliczyć można wszystkie związki o strukturze disoli, zawierające dwa kationy, jedynym wyjątkiem jest disól **16**, która wykazuje największą toksyczność spośród wszystkich zsyntezowanych związków. Disól **16** jest również bardziej toksyczna od analogicznej monosoli **15** – zapewne ze względu na fakt występowania dwóch aromatycznych kationów izochinoliniowych. Odwrotna zależność obserwowana jest dla alifatycznych monosoli **10** i disoli **11** zawierających kation diizopropylamonioowy - disól jest znacznie mniej toksyczna, niż monosól. Obserwacja ta jest zgodna z literaturą, gdzie obserwuje się dużą toksyczność cieczy jonowych zawierających aromatyczne kationy. [60, 186, 187] Spośród aromatycznych kationów, bakterie *A. fischeri* są bardziej wrażliwe na sole zawierające aromatyczne pierścienie 6-członowe (np. kationy pirydyniowe) niż 5-członowe (np. kationy imidazoliowe). [56, 188] Autorzy tłumaczą, że duża toksyczność aromatycznych soli amoniowych wobec bakterii *A. fischeri* spowodowana jest ich podobieństwem do kationowych surfaktantów, które zwiększają przepuszczalność błon biologicznych bakterii. [54, 189]

W odniesieniu do soli z łańcuchami alkilowymi w kationie, dowiedziono, że ich toksyczność wzrasta wraz z wydłużaniem tego łańcucha. [5, 60, 189] Długie łańcuchy alkilowe zwiększają lipofilowość cieczy jonowych, co wzmaga ich interakcje z błoną komórkową. W wyniku tych interakcji dochodzi do przerwania błony komórkowej i wycieku zawartości komórki, a ostatecznie do śmierci komórki. [3, 190] Opisana zależność ma również odzwierciedlenie w niniejszych badaniach, gdzie już nieznaczne wydłużenie długości łańcucha od izopropylu do izobutyłu, odpowiednio w disolach (**11**) i (**12**), spowodowało istotny wzrost toksyczności.

W publikacji [65] dotyczącej związków GRUPY 2 zawarto dodatkowe badania ekotoksyczności wobec małżoraczków dennych *Heterocypris incongruens* (test Ostracodtoxkit F™) oraz badania aktywności przeciw patogenom bakteryjnym i grzybiczym: *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani* i *Escherichia coli*, a także *Trichoderma viridis*. Zsyntezowane związki charakteryzowały się małą toksycznością wobec *H. incongruens*, jedynie związki z aromatycznymi kationami zaliczyć można do kategorii III toksyczności ostrej. Badane związki nie wykazywały aktywności wobec patogenów

grzybiczych i bakteryjnych. Co ważne, nie były one toksyczne dla *Trichoderma viridis*, który jest stosowany w rolnictwie do wspomaganie wzrostu roślin uprawnych. [191]

Wnioski do podrozdziału 1.1.2.2.:

- ✓ Zsyntezowane sole charakteryzowały się zróżnicowaną toksycznością: od związków całkowicie nieszkodliwych **11, 12, 14** ($EC_{50} = 268.5 - 87300$ mg/L), przez te zaliczane do III klasy toksyczności **10, 13** ($EC_{50} = 34.00 - 59.34$ mg/L), kończąc na związkach toksycznych zaliczanych do II klasy **15, 16** ($EC_{50} = 2.65 - 4.09$ mg/L).
- ✓ Zaobserwowano znane z literatury zjawisko wzrostu toksyczności wraz z wydłużeniem długości łańcucha podstawnika alkilowego oraz większej toksyczności kationów aromatycznych niż alkilowych.

1.1.2.3. GRUPA 3: Fenoksyoctany/(fenylotio)octany amoniowe

Wyniki badań ekotoksykologicznych dla związków z GRUPY 3 przedstawiono w **Tabeli 12**. Sześć spośród badanych związków [**17, 18, 20, 23, (R)-24, (S)-24**] zaliczyć można do związków całkowicie nietoksycznych, podczas gdy trzy pozostałe (**19, 21, 22**) należą do III klasy toksyczności. Ponadto, zauważyć można, że zsyntezowane związki są w większości mniej toksyczne niż komercyjne herbicydowe kwasy chlorofenoksyoctowe oraz chlorofenole (**Tabela 13**).

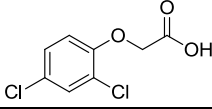
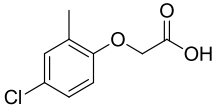
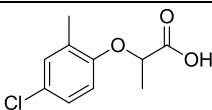
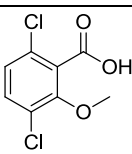
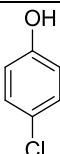
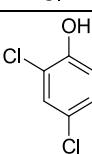
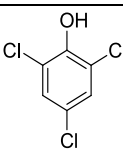
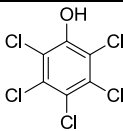
Tabela 12. Wartości EC_{50} [mg/L] otrzymane po 5 i 15 minutach ekspozycji bakterii *A. fischeri*, wraz z 95% przedziałem ufności przedstawionym w nawiasie – związki z GRUPY 3.

Badany związek	EC_{50} [mg/L]		Kategoria toksyczności [51] a)	Źródło:
	5 min	15 min		
17	138.9 (87.72 - 220.1)	160.8 (119.0 - 217.3)	Brak toksyczności ostrej	[67]
18	106.9 (74.79 - 152.8)	104.7 (77.54 - 1412)		
19	60.02 (44.72 - 80.57)	52.27 (37.11 - 73.63)	III	
20	155.8 (118.4 - 205.1)	176.2 (137.6 - 225.6)	Brak toksyczności ostrej	
21	27.72 (17.99 - 42.72)	33.75 (29.93 - 38.06)	III	
22	67.59 (55.14 - 82.85)	68.18 (60.38 - 76.99)		
23	104.3 (20.74 - 524.5)	144.9 (19.51 - 1075)	Brak toksyczności ostrej	
(R)-24	3974 (2941 - 5369)	3807 (2766 - 5239)		
(S)-24	5394 (3898 - 7465)	4883 (3912 - 6095)		

a) Kategorie toksyczności ostrej: I. Substancja bardzo toksyczna, $EC_{50} < 1.0$ mg/L; II. Substancja toksyczna, $1 < EC_{50} < 10$; III. Substancja szkodliwa, $10 < EC_{50} < 100$ mg/L [51] b) Wyniki nieopublikowane

W przypadku serii chlorofenoksyoctanów wykazano, że toksyczność zwiększa się wraz ze wzrostem ilości atomów chloru grupy fenylowej, w kolejności: **17 < 18 < 19**. Podobną zależność wzrostu toksyczności wraz ze wzrostem liczby atomów chloru, jaką obserwowano dla chlorofenoksyoctanów, stwierdzono także dla innej serii aromatycznych związków, tj. komercyjnych chlorofenoli 4-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP (**Tabela 13**) – w tej grupie, pentachlorofenol (PCP) zawierający 5 atomów chloru okazał się najbardziej toksyczny. Takiej zależności nie stwierdzono dla serii opisywanych w podrozdziale **1.1.2.1.** chlorooctanów diizopropylowych (związki **1, 2, 3**), gdzie toksyczność wzrastała w szeregu **2 : 3 : 1**.

Tabela 13. Literaturowe wartości EC_{50} [mg/L] dla kwasów chlorofenoksyoctowych oraz chlorofenoli otrzymane po 15 minutach ekspozycji bakterii *A. fischeri*.

Związek	Komercyjny skrót	Struktura	$EC_{50, 15 \text{ min}}$ [mg/L]	Kategoria toksyczności [51] a)	Źródło	
Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy	2,4-D		31.54	III	[192]	
			21.1			
Kwas 4-chloro-2-metylofenoksyoctowy	MCPA		11.6		[193]	
Kwas 4-chloro-2-metylo-2-fenoksypropionowy	MCPP		72.19		[192]	
Kwas 3,6-dichloro-2-metoksybenzoesowy	Dikamba		56.52			
4-Chlorofenol	4-CP		1.9		II	[193]
2,4-Dichlorofenol	2,4-DCP		3.7			
2,4,6-Trichlorofenol	2,4,6-TCP		10.7			
Pentachlorofenol	PCP		0.6			

a) Kategorie toksyczności ostrej: I. Substancja bardzo toksyczna, $EC_{50} < 1.0$ mg/L; II. Substancja toksyczna, $1 < EC_{50} < 10$; III. Substancja szkodliwa, $10 < EC_{50} < 100$ mg/L [51]

Na przykładzie związków **17** oraz **20**, które różnią się obecnością grupy metylowej można stwierdzić, że wprowadzenie grupy metylowej do pierścienia fenylogo ma niewielki wpływ na toksyczność wobec bakterii *A. fischeri* (obniżenie toksyczności o niecałe 10%). Dużo większe obniżenie ekotoksyczności spowodowane jest przez wprowadzenie grupy metylowej w pozycji α do grupy karboksylowej w związku MCPA, w wyniku którego otrzymuje się związek MCPP. Ten pierwszy jest ok. 6-krotnie bardziej toksyczny, niż MCPP. Warto zauważyć, że zsyntezowany związek **20** jest 16-razy mniej toksyczny, niż analogiczny komercyjny kwas MCPA. Podobną zależność można stwierdzić dla otrzymanego związku **18** zawierającego dwa atomy chloru w pierścieniu aromatycznym i analogicznego komercyjnego związku posiadającego dwa atomy chloru (2,4-D) – sól amoniowa **18** kwasu 2,4-D jest 4-krotnie mniej toksyczna dla bakterii *A. fischeri* niż sam kwas 2,4-D. Warto zauważyć, że spośród pary związków **22** oraz **23**, związek podstawiony grupą *t*-butylową w pierścieniu fenylogo **22** charakteryzuje się dwukrotnie większą toksycznością niż związek **23** zawierający grupę acetylową w tej pozycji.

Dwa spośród badanych związków, **(S)**-**24** i **(R)**-**24** były związkami optycznie czynnymi. Podobnie jak w przypadku chiralnych związków z GRUPY 1, **(R)**-enancjomer charakteryzował się większą toksycznością wobec bakterii, niż **(S)**-enancjomer. Enancjoselektywna toksyczność związków metoksyfenylooctanowych nie jest aż tak wysoka jak w przypadku związków z GRUPY 1 – **(S)**-**24** jest ok. 1.3-razy mniej toksyczny, niż **(R)**-**24**. Jednakże, wynik ten potwierdza tezę, że **(S)**-enancjomery mogą być łatwiej metabolizowane i mniej szkodliwe dla bakterii *A. fischeri*.

Nieoczekiwanie, dużą różnicę w ekotoksyczności zaobserwowano dla podobnych strukturalnie związków **19** (fenoksyoctan z trzema atomami chloru) oraz **21** (fenyloctan z dwoma atomami chloru i jedną grupą metylową). Jako, że wprowadzenie grupy metylowej powodowało tylko niewielkie zmniejszenie toksyczności (na przykładzie związków **17** oraz **20**), można wnioskować, że większa toksyczność związku **21** spowodowana jest zamianą atomu tlenu z grupy fenoksylowej na atom siarki. Tak powstały fenyloctan **21** jest najbardziej toksycznym związkiem w GRUPIE 3.

Aby dokładniej przeanalizować wpływ zamiany atomu tlenu na atom siarki policzono wartości współczynnika podziału *n*-oktanol/woda ($\log P$) dla wszystkich

O,S-analogów zsyntezowanych związków – szczegółowe informacje dotyczące tej analizy zamieszczono w publikacji. [67] Obliczone wartości logP korelowały liniowo z eksperymentalnymi wartościami EC₅₀ wobec *A. fischeri*, stąd wyprowadzono ogólne równanie, dzięki któremu obliczono wartości EC₅₀ dla bakterii *A. fischeri*, dla pozostałych *O/S*-analogów. Okazało się, że pochodne fenyltiooctanowe charakteryzowały się znacznie wyższymi wartościami logP, a zatem były one bardziej lipofilowe, niż odpowiednie fenoksyoctany – to ważne, ponieważ związki o dużej lipofilowości mają większą zdolność do interakcji z błoną fosfolipidową komórki bakteryjnej, a zatem charakteryzują się większą toksycznością. [194, 195] W toku analizy, wykazano, że modyfikacja polegająca na zamianie heteroatomów *O/S* ma kluczowe znaczenie i powoduje większą toksyczność fenyltiooctanów w porównaniu do fenoksyoctanów.

W publikacji [67] rozszerzono analizę ekotoksyczności związków z GRUPY 3 o przewidywane wartości toksyczności dla dwóch wyższych organizmów wodnych: ryby *Pimephales promelas* oraz rozwielitki *Daphnia magna*. Wykazano, że badane związki są bardziej toksyczne dla wyższych organizmów niż dla bakterii *A. fischeri*. Wobec organizmów wyższych zaobserwowano ten sam trend – toksyczność badanych związków wzrastała wraz ze wzrostem ilości atomów chloru w grupie fenylowej. Inaczej, niż w przypadku bakterii, wprowadzenie dodatkowej grupy metylowej do związku **17** skutkowało niewielkim wzrostem toksyczności. Co ważne, również dla organizmów wyższych zaobserwowano większą toksyczność wszystkich *S*-analogów, w porównaniu do *O*-analogów.

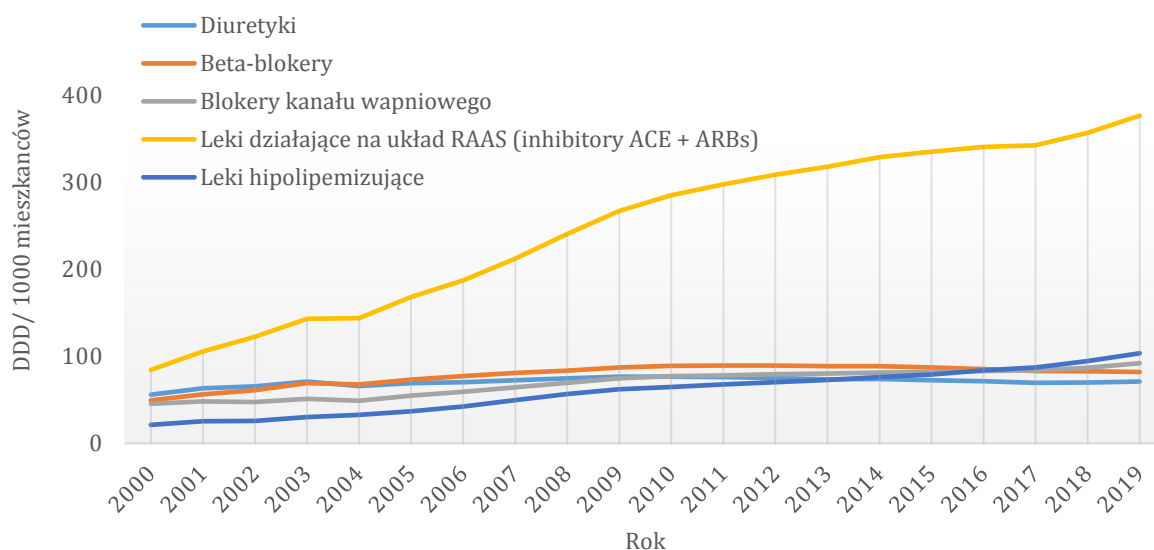
Wnioski do podrozdziału 1.1.2.3.:

- ✓ Sześć spośród zsyntezowanych soli (**17**, **18**, **20**, **23**, **(R)/(S)-24**) zaliczyć można do związków całkowicie nietoksycznych dla bakterii *A. fischeri* (EC₅₀ = 104.7 – 4883 mg/L), podczas gdy trzy pozostałe (**19**, **21**, **22**) do III klasy toksyczności (EC₅₀ = 33.75 – 68.18 mg/L).
- ✓ Dla serii chlorofenoksyoctanów wykazano, że ekotoksyczność wzrasta wraz ze wzrostem ilości atomów chloru grupy fenylowej.
- ✓ W przypadku chiralnych metoksyfenyltiooctanów **(R)/(S)-24** nie stwierdzono znaczącej enancjoselektywności działania – (*S*)-enancjomer był zaledwie 1.3-razy mniej toksyczny, niż (*R*)-enancjomer.

1.2. Antagonisty receptora angiotensyny II i substancje wypełniające

1.2.1. Wstęp

Szacuje się, że 30% ogółu populacji oraz ponad 50% ludzi w wieku powyżej 80 lat cierpi na nadciśnienie. [196] Nie dziwi więc fakt, że leki przeciwnadciśnieniowe, w tym antagonisty receptora angiotensyny II (ARBs) są jednymi z najczęściej przepisywanych leków na całym świecie. Dla przykładu, konsumpcja walsartanu (leku z grupy ARBs) w Niemczech w latach 2002-2009 wzrosła o ponad 250% [197], podczas gdy w USA o 100% (2001-2010) [196]. Na **Rys. 18** przedstawiono wzrost konsumpcji leków działających na układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS) na tle innych leków przeciwnadciśnieniowych, tj. diuretyków, beta-blokerów i blokerów kanału wapniowego. Dane dotyczą konsumpcji w Niemczech w latach 2000-2019, która została wyrażona poprzez parametr definiowanej dawki dobowej (DDD). Parametr ten wyraża średnią dobową dawkę podtrzymującą dla leku stosowanego w swoim głównym wskazaniu u człowieka dorosłego. [198]



Rys. 18. Konsumpcja leków przeciwnadciśnieniowych w Niemczech w latach 2000-2019.[199]
DDD – definiowana dawka dobowa (wyjaśnienie w tekście).

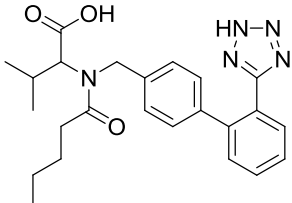
Obecność farmaceutyków w środowisku niesie ze sobą wiele zagrożeń, ponieważ tego typu zanieczyszczenia, mimo iż są obecne w niewielkich ilościach mogą negatywnie wpływać na organizmy, które nie były pierwotnym celem ich działania (tzw. organizmy niedocelowe). Środki farmaceutyczne zaprojektowane są w ten sposób, aby wykazywać znaczne działanie biologiczne na organizm człowieka przy niskich stężeniach. Jako, że niektóre z receptorów zwierzęcych są podobne do ludzkich, podejrzewa się, że leki

obecne w środowisku mogą wpływać na organizmy niższego rzędu. [20, 200-202] Co więcej, o ile wpływ poszczególnych leków na organizm człowieka jest znany, o tyle ich wpływ na organizmy wodne i lądowe jest trudny do przewidzenia – można się spodziewać, że mogą w różny sposób zaburzać funkcjonowanie ekosystemów, w zależności od ich struktury chemicznej i mechanizmu działania.

Dotychczas, większość badań dotyczących ekotoksyczności farmaceutyków poświęcono lekom z grupy β -blokerów. W literaturze naukowej podkreślono duże braki danych dotyczących innych grup leków przeciwnadciśnieniowych, w tym badanych przez mnie ARBs. [203] Większość badań ekotoksykologicznych prowadzono zgodnie z klasycznym podejściem opartym na pomiarze ekotoksyczności pojedynczej substancji, który może zawyżać/zaniżać rzeczywistą toksyczność badanego leku, a tym samym niedokładnie określać jego wpływ na środowisko. W odniesieniu do grupy ARBs, ukazały się dwa badania dotyczące wpływu mieszanin farmaceutycznych zawierających ARBs na środowisko. W jednym z badań, Letzel i współpracownicy zbadali ekotoksyczność mieszaniny pięciu ARBs na *Daphnia magna* i *Salmonella typhimurium*. [197] W innej pracy oceniono ekotoksyczność dwuskładnikowej mieszaniny losartanu (leku z grupy ARBs) oraz propranololu (leku z grupy β -blokerów). [204]

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przebadano ekotoksyczność wobec *A. fischeri* najczęściej zażywanych w Polsce leków z grupy ARBs: walsartanu (VAL), losartanu (LOS-K, LOS-H), telmisartanu (TEL), kandesartanu (CAN) i irbesartanu (IRB), a także ich mieszanin z substancjami pomocniczymi i hydrochlorotiazidem (HCT), które są stosowane w formulacjach farmaceutycznych razem w ARBs (**Tabela 14**). Ponadto, zbadano ekotoksyczność całych tabletek zawierających ARBs oraz poszczególnych substancji pomocniczych.

Tabela 14. Struktury chemiczne badanych leków z grupy ARBs oraz HCT wraz z ich rozpuszczalnością w wodzie.

Nazwa	Struktura chemiczna	Rozpuszczalność w wodzie [mg/mL] ^{a)}
Walsartan (VAL)		0.0234

Losartan-K ^{b)} (LOS-K)		0.0216
Losartan-H ^{c)} (LOS-H)		0.0039
Irbesartan (IRB)		0.00884
Kandesartan ^{d)} (CAN)		0.00204
Telmisartan (TEL)		0.0035
Hydrochlorotiazyd (HCT)		2.24

a) Źródło: ALOGPS (DrugBank); b) w postaci soli potasowej; c) w postaci kwasu; d) w postaci estru cyleksetylowego

Ważnym zagadnieniem dotyczącym obecności farmaceutyków w środowisku jest obecność substancji pomocniczych (wypełniających), które są obecne w każdej formulacji farmaceutycznej. Mają one różne funkcje, np. zapewniają odpowiednią objętość formulacji, chronią substancję czynną, zapewniają jej odpowiednie uwalnianie, poprawiają biodostępność oraz ułatwiają jej podawanie. [205] Wpływ substancji pomocniczych na środowisko jest rzadko omawiany, Carlsson i współpracownicy wykazali duże luki w wiedzy dotyczącej ekotoksyczności substancji pomocniczych. [40] Dodatkowo, inni autorzy zasugerowali, że potencjał toksykologiczny formulacji farmaceutycznych może być związany nie z obecnością samej substancji czynnej,

a z substancjami pomocniczymi – tym samym pokazując, że pozornie neutralne składniki mogą być bardziej toksyczne dla środowiska niż substancje czynne. [46]

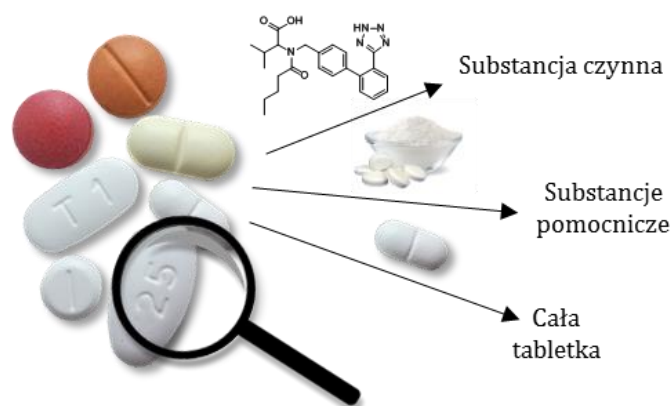
Powyższe informacje skłaniają do przeprowadzenia dokładnych badań dotyczących toksyczności substancji wypełniających oraz ich interakcji z substancjami czynnymi (w przypadku niniejszej dysertacji – leków z grupy ARBs). W ramach niniejszej pracy doktorskiej przebadano następujące grupy związków:

CZĘŚĆ 1: Badania całych formułacji farmaceutycznych ARBs (Rys. 19):

- (1.) Leki z grupy ARBs (VAL, LOS-K, TEL) oraz hydrochlorotiazyd (HCT) stosowany w preparatach złożonych razem z ARBs – w postaci czystych substancji czynnych (**Tabela 13**) otrzymanych poprzez ekstrakcję z komercyjnych formułacji farmaceutycznych (VAL, TEL i HCT: pełna metodyka ekstrakcji oraz analizy związków zostały przedstawiona w materiałach dodatkowych publikacji [94]). LOS-K został użyty w formie odczynnika ze względu na protonowanie soli potasowej (LOS-K) podczas ekstrakcji rozpuszczalnikiem, co prowadziło do tworzenia się kwasu LOS-H. Przebadano leki w postaci pojedynczych składników, a także w mieszaninach dwuskładnikowych ARB + HCT.
- (2.) Formułacje farmaceutyczne leków z pkt. 1 w postaci preparatów prostych (VAL, LOS-K, TEL, HCT) oraz preparatów złożonych (VAL + HCT, LOS-K + HCT, TEL + HCT). Skład badanych formułacji farmaceutycznych przedstawiono w **Tabeli 15**.
- (3.) Mieszaniny substancji pomocniczych preparatów prostych, wymienionych w pkt. 2, otrzymane jako masa tabletkowa pozostała po wyekstrahowaniu z niej substancji czynnej.

Określono również przewidywaną toksyczność mieszanin za pomocą modeli CA (ang. *Concentration Addition*, model dodatku stężeń) oraz IA (ang. *Independent Action*, model niezależnego działania) (podstawy modeli opisano w **podrozdziale 2.3. Części literaturowej**) i porównano ją z toksycznościami otrzymanymi eksperymentalnie.

Uzupełniająco, w celu dokonania analizy porównawczej, przeanalizowano ekotoksyczności leków z grupy ARB, tj.: LOS-H, IRB, CAN, które nie zostały przebadane w publikacji.[94] LOS-H został otrzymany poprzez przekształcenie soli potasowej (LOS-K) w formę kwasową, CAN wyizolowano z formułacji farmaceutycznej – dokładne procedury przedstawiono w **Części eksperymentalnej** niniejszej pracy.



Rys. 19. Schemat graficzny ilustrujący podejście badawcze stosowane w CZEŚCI 1 badań farmaceutyków.

Tabela 15. Farmaceutyczne formułacje (tabletki) użyte w testach ekotoksykologicznych. Masy tabletek zaprezentowano jako wartość średnia \pm odchylenie standardowe ($n = 10$).

API	Formulacja	Masa pojedynczej tabletki [mg]	Lista substancji wypełniających (rdzeń tabletki)	Producent
VAL	Valtap (160 mg)	342.08 \pm 2.67	celuloza mikrokrystaliczna, sorbitol, węglan magnezu, powidon K25, preżelowana skrobia kukurydziana, stearylofumarany sodu, laurylosiarczan sodu, krospowidon, koloidalna krzemionka bezwodna	Zentiva KS
VAL + HCT	Valtap HCT (160 mg + 12.5 mg)	349.09 \pm 3.09	celuloza mikrokrystaliczna, węglan magnezu, powidon K25, preżelowana skrobia kukurydziana, stearylofumarany sodu, laurylosiarczan sodu, krospowidon, koloidalna krzemionka bezwodna	
LOS-K	Lozap (50 mg)	207.74 \pm 0.75	celuloza mikrokrystaliczna, mannitol, krospowidon, koloidalna krzemionka bezwodna, talk, stearynian magnezu	
LOS-K + HCT	Lozap HCT (50 mg + 12.5 mg)	399.44 \pm 3.94	mannitol, celuloza mikrokrystaliczna, krospowidon, krospowidon sodowa, powidon, stearynian magnezu	
TEL	Telmizek (80 mg)	481.46 \pm 4.73	mannitol, powidon, meglumina, wodorotlenek potasu, stearynian magnezu	Adamed Pharma SA
TEL + HCT	Telmizek COMBI (80 mg + 25 mg)	701.87 \pm 2.22	stearynian magnezu, wodorotlenek potasu, meglumina, powidon, glikolan sodowo-skrobiowy, celuloza mikrokrystaliczna, mannitol	
HCT	Hydrochlorothiazidum Polpharma (25 mg)	199.09 \pm 2.85	laktoza jednowodna, skrobia kukurydziana, talk, koloidalna krzemionka bezwodna, stearynian magnezu	Polpharma SA

CZEŚĆ 2: Badania poszczególnych substancji pomocniczych w mieszaninach z API

Biorąc pod uwagę luki w wiedzy dotyczącej ekotoksyczności samych substancji pomocniczych, zastosowano opracowaną modyfikację testu Microtox[®] do oceny ekotoksykologicznej kilkunastu pojedynczych substancji pomocniczych najczęściej stosowanych w przemyśle farmaceutycznym (Tabela 16), obecnych również w badanych formułacjach zebranych w Tabeli 15.

Oprócz ekotoksyczności pojedynczych składników określono także ekotoksyczność mieszanin (ARB = VAL, LOS-K lub TEL):

(1.) Dwuskładnikowych:

- ✓ ARB + substancja pomocnicza;

- ✓ substancja pomocnicza + substancja pomocnicza.

(2.) Trójskładnikowych:

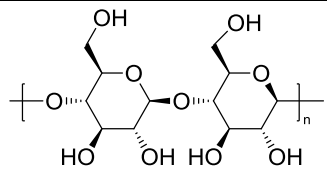
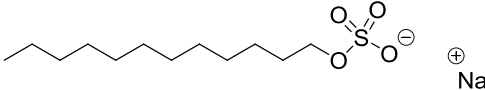
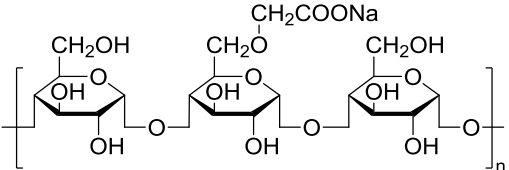
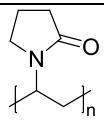
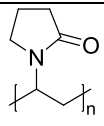
- ✓ ARB + 2 x substancja pomocnicza;
- ✓ 3 x substancja pomocnicza.

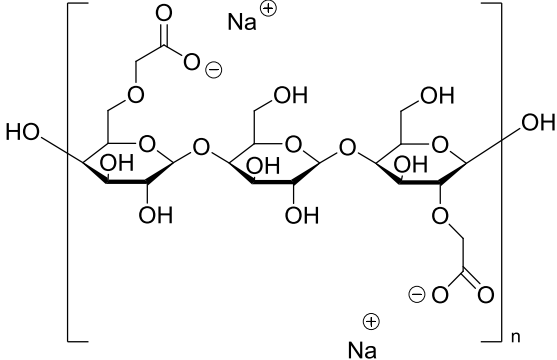
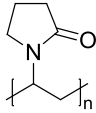
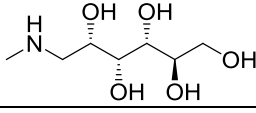
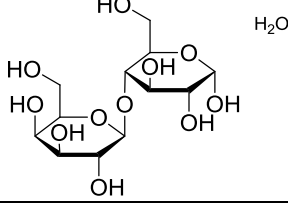
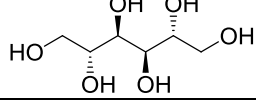
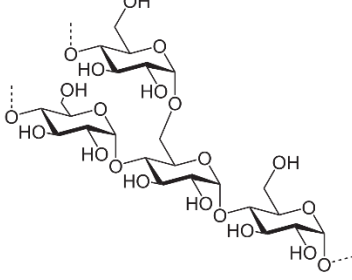
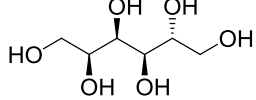
(3.) Wieloskładnikowych:

- ✓ wszystkie substancje pomocnicze występujące w komercyjnej formulacji farmaceutycznej;
- ✓ ARB + wszystkie substancje pomocnicze występujące w komercyjnej formulacji farmaceutycznej.

Dodatkowo, w celu sprawdzenia, jak rozmiar cząstek krzemionki, stosowanej jako substancja pomocnicza w formulacjach farmaceutycznych, wpływa na toksyczność wobec *A. fischeri*, zbadano ekotoksyczność dwóch form krzemionki: w postaci nanoproszku oraz w postaci koloidalnej (LUDOX).

Tabela 16. Substancje pomocnicze użyte w badaniach ekotoksykologicznych.

Nazwa	Struktura chemiczna
Celuloza mikrokrystaliczna typ PH102	
Laurylosiarczan sodu	
Glikolan sodowo-skrobiowy	
Koloidalna krzemionka bezwodna (Aerosil R200)	$[\text{SiO}_2]_n$
Powidon K25	 masa cząsteczkowa ~ 24 000 g
Powidon K30	 masa cząsteczkowa ~ 40 000 g

Kroskarmeloza sodowa	
Krospowidon typ A	 polimer sieciowany
Meglumina	
Talk	$Mg_3(OH)_2Si_4O_{10}$
Węglan magnezu (ciężki)	$MgCO_3 + Mg(OH)_2$
Laktoza jednowodna	
Mannitol	
Preżelowana skrobia kukurydziana	
Sorbitol	

1.2.2. Badania ekotoksykologiczne (opracowanie modyfikacji testu Microtox®)

Jako, że leki z grupy ARBs charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w wodzie (Tabela 14, rozdział 1.2.1.), przeprowadzenie standardowego testu Microtox® z wykorzystaniem roztworów wodnych badanych substancji byłoby niemożliwe.

Jedynym sposobem umożliwiającym przeprowadzenie tego typu testu jest przygotowanie klarownych roztworów badanych związków z wykorzystaniem ultradźwięków lub podwyższonej temperatury. Niestety takie podejście opiera się na wprowadzeniu nienaturalnego zaburzenia do układu, a także może inicjować pewne uboczne reakcje, a przez to wpływać na końcową toksyczność badanego związku. Aby ominąć te problemy, w ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano modyfikację testu Microtox® fazy stałej (Microtox® Basic Solid Phase Test). Standardowa procedura Microtox® Basic Solid Phase Test dedykowana jest badaniu ekotoksyczności gleb i osadów dennych. [206] W opracowanej modyfikacji, naturalna próbka badanej gleby/osadu dennego zostały zastąpione sztucznie przygotowaną próbką, będącą odpowiednikiem gleby/osadu dennego, składającą się ze znanej ilości badanego farmaceutyku oraz piasku kwarcowego stanowiącego neutralną, nietoksyczną matrycę. Dokładny opis stosowanej metodyki przedstawiono w **Części eksperymentalnej** niniejszej dysertacji. Opracowana metodologia jest przedmiotem krajowego zgłoszenia patentowego oraz zgłoszenia międzynarodowego w trybie PCT:

- **M. Turek**, P. Bałczewski, E. Różycka-Sokołowska, M. Koprowski, K. Owsianik, Zgłoszenie patentowe, Sposób biotestowania ekotoksyczności substancji i mieszanin skondensowanych oraz jego zastosowanie w ekotoksykologii, P.433623, 22.04.2020;
- **M. Turek**, P. Bałczewski, E. Różycka-Sokołowska, M. Koprowski, K. Owsianik, Patent Application, A method for biotesting of a condensed phase substances and/or mixtures ecotoxicity and use of the method in ecotoxicology, PCT/PL2021/000025, 22.04.2021 (na podstawie P.433623, 22.04.2020).

Metodologia ta pozwala na bezpośredni kontakt próbki stałej z bakteriami *A. fischeri*, przez co możliwe jest określenie toksyczności spowodowanej nie tylko przez substancję rozpuszczoną w medium, ale także substancję zawieszoną w roztworze lub zaadsorbowaną na piasku. Przeprowadzone badania ekotoksykologiczne są odzwierciedleniem rzeczywistej sytuacji, gdzie organizmy bytujące w środowisku są wystawione na działanie zanieczyszczeń farmaceutycznych, które mogą być rozpuszczone, zawieszone w ciekłym medium i/lub zaadsorbowane na stałej matrycy np. glebowej. Opracowany test może również posłużyć do badania toksyczności dowolnej substancji chemicznej posiadającej cechę słabej rozpuszczalności.

Jak wspomniano powyżej, zastosowane podejście nazywane jest testem bezpośredniego kontaktu fazy stałej z badanym organizmem – pozwala ono na określenie całkowitej toksyczności pochodzącej z rozpuszczonych i nierozpuszczonych, organicznych i nieorganicznych zanieczyszczeń badanej próbki. [207, 208] Dotychczas, większość analiz fazy stałej opierała się na pośredniej analizie ekstraktów lub eluatów, gdzie używano wody/rozpuszczalników organicznych do wymycia toksykantów z fazy stałej i badania otrzymanego eluatu. [209] Tego typu podejście zaniedbuje synergistyczne/antagonistyczne interakcje organizmu testowego z fazą stałą. [210]

Istnieje kilka komercyjnych testów opierających się na bezpośrednim kontakcie organizmu testowego z badaną próbką: Microtox® Basic Solid Phase Test [211], Toxi-Chromo Test™ [212] i Ostracodtoxkit F™ [213] (**Tabela 17**). Test Microtox® Basic Solid Phase Test opisano powyżej. Drugi test, Toxi-Chromo Test™ jest biotestem kolorymetrycznym opartym na specjalnie opracowanych liniach bakteryjnych *Escherichia coli* produkujących β -galaktozydazę. Procedura ta pozwala bakteriom wzrastać w bezpośrednim kontakcie z badaną stałą próbką. Wykazano, że wyniki otrzymane w testach Microtox® Basic Solid Phase Test oraz Toxi-Chromo Test™ są ze sobą skorelowane. [208] Trzeci test, Ostracodtoxkit F™ opiera się na zastosowaniu małżoraczków dennych *Heterocypris incongruens* i został opracowany do badania osadów dennych. Czułość tego testu jest porównywalna z innymi, niekomercyjnymi testami wykorzystującymi skorupiaki *Hyalella azteca* lub larwy *Chironomus riparius*. Niepodważalną zaletą testu Microtox®, w porównaniu do innych komercyjnych testów jest krótki czas pomiaru pojedynczej próbki – około 1 godziny. W przypadku Toxi-Chromo Test™ czas ten wynosi 2.5 godziny, natomiast dla testu Ostracodtoxkit F™ czas ten wydłuża się do 8 dni. Dodatkowo, test Microtox® oraz Toxi-Chromo Test™ nie wymagają hodowania organizmów testowych w wyspecjalizowanych laboratoriach mikrobiologicznych. Wykazano, że test Toxi-Chromo Test™ jest mniej czuły niż test Microtox®. [214] Podsumowując, Microtox® Basic Solid Phase Test jest szybszy i bardziej czuły, niż inne komercyjne testy fazy stałej, takie jak Toxi-Chromo Test™ oraz Ostracodtoxkit F™, jednak w swojej oryginalnej wersji ogranicza się jedynie do badania gleb i osadów dennych. Podejście oparte na bezpośrednim kontakcie fazy stałej

z organizmem testowym, włączając użycie Microtox® Basic Solid Phase Test nie było dotychczas stosowane w badaniach farmaceutyków.

Tabela 17. Porównanie komercyjnych testów bezpośredniego kontaktu z fazą stałą.

Test	Korelacja toksyczności z wyższymi organizmami	Czas trwania testu	Punkt końcowy testu	Przykłady zastosowań
Microtox® Basic Solid Phase Test (<i>A. fischeri</i>)	Korelacja z bezkręgowcami dennymi (<i>C. riparus</i> , <i>H. azteca</i> , <i>Hexagenia spp.</i> , <i>T. tubifex</i>) ^[215]	~ 1 h	Zahamowanie bioluminescencji po 5-30 minutach, EC ₅₀	Gleby zanieczyszczone wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi ^[216, 217] , osady denne w różnych diluentach ^[218] , osady denne po remediacji ^[219] , osady denne ^[220, 221] , pozostałości po oczyszczaniu wody pitnej ^[222]
Toxi-Chromo Test™ (<i>E. coli</i>)	Korelacja z bezkręgowcami dennymi (<i>C. riparus</i> , <i>H. azteca</i> , <i>Hexagenia spp.</i> , <i>T. tubifex</i>) ^[215] ; Słaba korelacja z <i>D. magna</i> ^[223]	~ 2.5 h	Zahamowanie absorbancji po 90 minutach, EC ₅₀	Karbamazepina i produkty jej degradacji ^[224] , osady denne ^[225]
Ostracodtoxkit F™ (<i>H. incongruens</i>)	Korelacja tylko z innymi bezkręgowcami <i>H. azteca</i> oraz larwami <i>C. riparus</i> ^[226]	8 dni (włączając inkubację cyst)	Zahamowanie wzrostu po 6 dniach, EC ₅₀ ; Śmiertelność po 6 dniach, LC ₅₀	Ciecze jonowe ^[65, 66] , osady ściekowe ^[227] , gleby ^[228] , ścieki z oczyszczalni ścieków ^[229, 230] , osady denne ^[231]

Oprócz komercyjnych testów, w literaturze naukowej opisano także inne próby opracowania testów bezpośredniego kontaktu fazy stałej. Przykładowo, istnieją doniesienia o użyciu rekombinowanej bakterii *Nitrosomonas europaea* jako bioindykatora w teście fazy stałej dla badania toksyczności zanieczyszczeń glebowych *in situ*.^[210] Próbowano również wprowadzić modyfikacje standardowych testów fazy wodnej, aby umożliwić bezpośredni kontakt zawieszonyj próbki z badanym organizmem. Dotychczas, tego typu modyfikacje były wprowadzone głównie w celu badań gleb/osadów dennych zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Dla przykładu, organizmy *Daphnia magna* zostały wystawione na działanie gleb zanieczyszczonych kadmem i cynkiem – w toku badań wykazano, że zawieszony cząstki metali wykazują większą toksyczność, niż rozpuszczone.^[232] Inny organizm, *Chironomus riparius*, został wykorzystany do badania toksyczności pyłu krzemionkowego.^[233] Podobne badania przeprowadzono na glebach zanieczyszczonych olejem napędowym wykorzystując *Dictyostelium discoideum* jako organizm testowy.^[234]

W niniejszej dysertacji zastosowano modyfikacje protokołu Microtox® Basic Solid Phase Test (dokładną procedurę przedstawiono w **Części eksperymentalnej** niniejszej pracy) do oceny ekotoksyczności czystych substancji czynnych z grupy ARBs,

pojedynczych substancji pomocniczych stosowanych tabletkach, całych formułacji farmaceutycznych w postaci tabletek oraz mieszanin ARBs z substancjami pomocniczymi.

1.2.2.1. CZĘŚĆ 1: ARBs i ich formułacje farmaceutyczne

1.2.2.1.1. Ekotoksyczność czystych substancji czynnych

W Tabeli 18 przedstawiono wyniki badań ekotoksykologicznych przeprowadzonych z zastosowaniem opracowanej modyfikacji testu Microtox® Basic Solid Phase Test dla czystych form ARBs oraz hydrochlorotiazidu (HCT) stosowanego w leczeniu skojarzonym wraz z ARBs.

Tabela 18. Wartości EC₅₀ badanych związków wobec bakterii *A. fischeri* (modyfikowany protokół Microtox® Basic Solid Phase Test) po 5, 15 i 30 minutach ekspozycji.

API	EC ₅₀ [mg/L]			Kategoria toksyczności [51] b)
	5 min	15 min	30 min	
VAL	143.20 ^a	234.83 ^a	150.5	Nietoksyczne
LOS-K	583.88 ^a	659.02 ^a	276.7	
LOS-H	864.0	216.0	105.4	
TEL	196.52 ^a	99.70 ^a	77.31	III
IRB	1423.00	1345.00	1268.40	Nietoksyczne
CAN	1572	1465	1433	
HCT	2082.73 ^a	1487.02 ^a	-	

a) – wyniki opublikowane w pracy^[94]

b) Kategorie toksyczności ostrej: I. Substancja bardzo toksyczna, EC₅₀ < 1.0 mg/L; II. Substancja toksyczna, 1 < EC₅₀ < 10; III. Substancja szkodliwa, 10 < EC₅₀ < 100 mg/L^[51]

Zauważyć można, że toksyczność badanych leków wzrasta w szeregu: HCT < CAN < IRB < LOS-K < VAL < LOS-H < TEL. Warto zwrócić uwagę na fakt, że wszystkie leki z grupy ARBs okazały się bardziej toksyczne niż diuretyczny HCT. Niska toksyczność tego związku wobec bakterii *A. fischeri* może być związana z obecnością tylko jednego pierścienia fenyłowego w jego strukturze chemicznej w porównaniu do obecności kilku aromatycznych ugrupowań, tetrazolowego, imidazolowego oraz grupy bifenylowej w strukturach ARBs. Wykazano ponadto, że sól potasowa (LOS-K) jest mniej toksyczna od formy kwasowej (LOS-H) – taka zależność była poprzednio obserwowana w przypadku soli amoniowych i ich analogów kwasowych.^[67] Dla wszystkich badanych leków obserwuje się spadek wartości EC₅₀ (wzrost toksyczności) wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji, co oznacza, że bakterie nie są w stanie zaadaptować się do obecności wprowadzonego toksykanta^[235] i ukazuje potrzebę prowadzenia badań z wydłużonym do 30 minut czasem ekspozycji.

Dotychczas, ze względu na słabą rozpuszczalność leków z grupy ARBs, nie zostały one przebadane z zastosowaniem klasycznego testu Microtox®. W literaturze

naukowej znajdują się dane dotyczące ekotoksyczności ARBs wobec alg, skorupiaków oraz ryb. Większość z badanych substancji została przebadana pod kątem toksyczności wobec *Daphnia magna* – z danych literaturowych można wnioskować, że toksyczność wobec tego organizmu (immobilizacja, 48 godzin) wzrasta w szeregu LOS-K < HCT = VAL < TEL. [236-239] Ponownie, TEL jest najbardziej toksyczny wobec badanego organizmu. Warto również podkreślić, że organizmy *D. magna* są nieco bardziej wrażliwe na badane API – omawiane wartości IC₅₀ dla *D. magna* zawierają się w zakresie 18-331 mg/L, podczas gdy zakres ten dla bakterii *A. fischeri* wynosi 77.31-1433 mg/L. Generalnie, na podstawie dostępnej literatury, taką samą zależność można stwierdzić dla alg, gdzie TEL jest najbardziej toksyczny, VAL i HCT mogą być uważane jako średnio toksyczne, natomiast LOS-K jako nietoksyczny. Pełne zestawienie dotychczasowych badań ekotoksykologicznych omawianych API zebrano w materiałach dodatkowych publikacji własnej. [94]

1.2.2.1.2. Ekotoksyczność mas tabletkowych (substancji pomocniczych)

W ramach badań niniejszej dysertacji, określono także toksyczność masy tabletkowej powstałej na skutek ekstrakcji API (VAL, LOS-K, TEL, HCT) (**Tabela 19**). Toksyczność badanej masy tabletkowej stanowiącej mieszaninę substancji pomocniczych o składzie przedstawionym w **Tabeli 15** wzrasta w szeregu: masa tabletkowa (m.t.) HCT < (m.t.) LOS-K < (m.t.) TEL < (m.t.) VAL. Należy przy tym podkreślić, że wszystkie wartości EC_{50, 15 min} są rzędu kilku-kilkunastu tysięcy mg/L, co świadczy o braku toksyczności samej mieszaniny wypełniającej, z wyjątkiem masy tabletkowej formułacji VAL, gdzie wartość ta jest bliska 1000 mg/L. Toksyczności mas tabletkowych są zróżnicowane, przykładowo toksyczność masy tabletkowej VAL jest 32 razy większa, niż toksyczność masy tabletkowej HCT i 14 razy większa niż toksyczność masy tabletkowej TEL. Zróżnicowanie to z pewnością spowodowane jest innym składem każdej z formułacji farmaceutycznej – zarówno obecnością innych substancji pomocniczych, jak i różną ich procentową zawartością. Na tle innych mas tabletkowych, masa tabletkowa zawarta w formułacji VAL wykazuje relatywnie wysoką toksyczność. Można podejrzewać, że ta wyższa toksyczność związana jest z obecnością celulozy mikrokrystalicznej lub koloidalnej krzemionki bezwodnej, które nie są obecne w formułacjach HCT i TEL, a są głównym składnikiem formułacji VAL. Podobną relację znaleźli Jacob i współpracownicy, którzy wymienili kilka substancji pomocniczych,

takich jak celuloza mikrokrystaliczna, glikolan sodowo-skrobiowy, dwutlenek krzemu i żółty barwnik sicovit-10BASF jako potencjalnie toksyczne dla *A. fischeri*. [46] Masa tabletkowa LOS-K w odniesieniu do masy tabletkowej VAL nie wykazuje dużej toksyczności, jest od niej 11 razy mniej toksyczna. Jednak, jest także prawie 2-krotnie bardziej toksyczna niż masa tabletkowa TEL i 4 razy bardziej toksyczna niż masa tabletkowa HCT. Masa wypełniająca LOS-K ponownie zawiera w swoim składzie

Tabela 19. Wartości EC₅₀ badanych formułacji farmaceutycznych wobec bakterii *A. fischeri* (modyfikowany protokół Microtox® Basic Solid Phase Test) po 5 i 15 minutach ekspozycji. Dane eksperymentalne przedstawiono jako wartość średnią ± odchylenie standardowe (n = 3). Wyniki opublikowane w pracy własnej [94].

API	Formulacja	Diluent ^{a)}	EC ₅₀ [mg/L]		Wzrost toksyczności w porównaniu do czystej API	
			5 min	15 min	EC ₅₀ 5min	EC ₅₀ 15 min
VAL	Czysty VAL	SPTD	143.20 ± 38.83	234.83 ± 90.66		
		4% (v/v) MeOH/SPTD	132.46 ± 75.19	118.92 ± 59.46		
	Formulacja VAL (tabletki, 160 mg)	SPTD	23.04 ± 2.03	19.36 ± 1.41	6.21	12.13
		4% (v/v) MeOH/SPTD	79.54 ± 12.56	58.93 ± 13.37	1.66	2.02
	Formulacja VAL + HCT (tabletki, 160 mg + 12.5 mg)	SPTD	45.42 ± 11.33	39.82 ± 13.39	3.15	5.90
		4% (v/v) MeOH/SPTD	70.64 ± 10.59	56.44 ± 5.25	1.87	2.11
	Czysty VAL + HCT (160 mg + 12.5 mg)	SPTD	851.89 ± 330.92	720.29 ± 298.17	0.17	0.33
		4% (v/v) MeOH/SPTD	123.55 ± 31.77	146.09 ± 39.38	1.07	0.81
	Masa tabletkowa VAL ^b	SPTD	2776.89 ± 945.91	1100.44 ± 219.48		
		4% (v/v) MeOH/SPTD	2557.41 ± 1264.30	1106.36 ± 206.18		
LOS-K	Czysty LOS-K	SPTD	583.88 ± 72.65	659.02 ± 26.71		
	Formulacja LOS-K (tabletki, 50 mg)		675.81 ± 192.68	874.27 ± 244.54	0.86	0.75
	Formulacja LOS-K + HCT (tabletki, 50 mg + 12.5 mg)		410.74 ± 41.61	406.77 ± 33.94	0.70	0.62
	Czysty LOS-K + HCT (50 mg + 12.5 mg)		438.71 ± 47.59	427.96 ± 47.18	0.75	0.65
	Masa tabletkowa LOS-K ^b		8056.67 ± 1065.05	8754.33 ± 938.09		
TEL	Czysty TEL	SPTD	196.52 ± 73.02	99.70 ± 27.33		
	Formulacja TEL (tabletki, 80 mg)		1040.41 ± 219.22	321.94 ± 80.43	5.29	3.23
	Formulacja TEL + HCT (tabletki, 80 mg + 25 mg)		2045.40 ± 1081.42	635.52 ± 429.21	0.10	0.16
	Czysty TEL + HCT (80 mg + 25 mg)		2288 ± 554.56	801.20 ± 133.62	0.08	0.12
	Masa tabletkowa TEL ^b		20519.29 ± 6994.69	15722.54 ± 6181.09		
HCT	Czysty HCT	SPTD	2082.73 ± 157.66	1487.02 ± 162.88		
		4% (v/v) MeOH/SPTD	2797.53 ± 144.70	2055.70 ± 101.10		
	Formulacja HCT (tabletki, 25 mg)	SPTD	1716.47 ± 204.47	1017.90 ± 40.41	1.21	1.46
		4% (v/v) MeOH/SPTD	1369.23 ± 273.28	852.05 ± 282.92	0.49	0.41
	Masa tabletkowa HCT ^b	SPTD	33232.00 ± 569.20	36119.67 ± 7455.79		

^{a)} SPTD – Solid Phase Test Diluent, ^{b)} Substancje pomocnicze pozostałe po ekstrakcji substancji czynnej

potencjalnie ekotoksyczną celulozę mikrokrystaliczną oraz koloidalną krzemionkę bezwodną – jednak w mniejszej ilości, niż w masie tabletkowej VAL, co uzasadniałoby

mniejszą toksyczność masy tabletkowej LOS-K, niż VAL. Generalnie uważa się, że amorficzne nanocząstki krzemionki, w przeciwieństwie do krystalicznych [240] są bezpieczne dla organizmów wodnych.[241, 242] Zagadnienie to, dotyczące zależności toksyczności od rozmiaru cząstek krzemionki zostanie rozwinięte w dalszej części niniejszej dysertacji. Masa wypełniająca TEL charakteryzowała się brakiem toksyczności, z wartością $EC_{50, 15 \text{ min}}$ na poziomie 15 722 mg/L – nie zawierała ona w swoim składzie celulozy mikrokrystalicznej, ani koloidalnej krzemionki bezwodnej. Podobnie masa tabletkowa HCT, zawierająca głównie laktozę i skrobię modyfikowaną charakteryzuje się brakiem toksyczności ($EC_{50, 15 \text{ min}} = 36 119 \text{ mg/L}$). Masa ta zawiera również niewielką ilość koloidalnej krzemionki, jednakże można podejrzewać, że nie wpływa ona na zwiększenie toksyczności całej masy tabletkowej.

1.2.2.1.3. Ekotoksyczność mieszanin – wpływ substancji pomocniczych na toksyczność API

W ramach badań określono wpływ substancji pomocniczych na toksyczność API. W tym celu porównano toksyczność czystych API z toksycznością całej formułacji farmaceutycznej danej API – badane formy różniły się zatem tylko obecnością masy wypełniającej lub jej brakiem. Znając ekotoksyczność samych mas tabletkowych (mieszaniny substancji pomocniczych powstałych po wyekstrahowaniu API), obliczono przewidywane toksyczności dla formułacji farmaceutycznej jako dwuskładnikowej mieszaniny czystej API + masy tabletkowej z zastosowaniem modeli CA i IA (**Tabela 20**). Wyznaczono także współczynniki MDR (ang. *model deviation ratio*), pokazujące w sposób ilościowy odchylenie wartości przewidywanej od eksperymentalnej i pozwalające na sklasyfikowanie oddziaływań występujących w badanych próbkach (antagonistyczne, synergistyczne, addytywne).

Na podstawie przeprowadzonych badań zauważyć można, że substancje pomocnicze wywierają różny wpływ na toksyczność API – obserwuje się zarówno efekty synergistyczne (VAL), antagonistyczne (TEL), jak i addytywne (LOS-K, HCT) (**Tabela 20**). W przypadku VAL wykazano, że toksyczność czystej substancji jest niższa niż toksyczność jego formułacji farmaceutycznej (VAL + masa tabletkowa). Ta różnica jest najbardziej uwidoczniła w przypadku wyników otrzymanych z zastosowaniem SPTD,

Tabela 20. Przewidywana toksyczność mieszanin obliczona z zastosowaniem modeli CA i IA wraz z wartościami MDR (odchylenie wartości eksperymentalnej od przewidywanej). Wyniki opublikowane w pracy [94].

API	Formulacja	Diluent ^a	Obliczona wartość EC ₅₀ mieszaniny – model CA [mg/L]		MDR (CA)		Obliczona wartość EC ₅₀ mieszaniny – model IA [mg/L]		MDR (IA)		Efekt przewidywany wg modelu CA (15 min)	Efekt przewidywany wg modelu IA (15 min)	Wartość p ^b
			5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min			
Wpływ substancji pomocniczych na toksyczność API													
VAL	Formulacja VAL (tabletki, 160 mg)	SPTD	287.92	402.71	12.50	20.80	93.69	130.32	4.06	6.73	synergistyczny	synergistyczny	0.04
		4% (v/v) MeOH/SPTD	267.43	226.54	3.36	3.84	99.48	105.64	1.25	1.79	synergistyczny	addytywny	0.18
LOS-K	Formulacja LOS-K (tabletki, 50 mg)	SPTD	1974.47	2212.62	2.92	2.53	854.06	972.63	1.26	1.11	synergistyczny	addytywny	0.18
TEL	Formulacja TEL (tabletki, 80 mg)		1128.47	581.51	1.08	1.81	232.76	126.47	0.22	0.39	addytywny	antagonistyczny	0.03
HCT	Formulacja HCT (tabletki, 25 mg)		11546.74	9203.51	6.73	9.04	1685.81	1737.15	0.98	1.71	synergistyczny	addytywny	0.02
Wpływ HCT na toksyczność ARBs (czyste API)													
VAL	Czysty VAL + HCT (160 mg + 12.5 mg)	SPTD	153.57	250.10	0.18	0.35	169.68	203.98	0.20	0.28	antagonistyczny	antagonistyczny	0.05
		4% (v/v) MeOH/SPTD	142.32	127.64	1.16	0.87	119.10	97.51	0.96	0.67	addytywny	addytywny	0.32
LOS-K	Czysty LOS-K + HCT (50 mg + 12.5 mg)	SPTD	682.05	741.61	1.55	1.73	497.70	539.15	1.13	1.26	addytywny	addytywny	0.02
TEL	Czysty TEL + HCT (80 mg + 25 mg)		250.54	128.17	0.11	0.16	153.64	96.16	0.07	0.12	antagonistyczny	antagonistyczny	0.006
Wpływ substancji pomocniczych i HCT na toksyczność ARBs													
VAL	Formulacja VAL + HCT (tabletki, 160 mg + 12.5 mg)	SPTD	24.81	20.84	0.55	0.52	29.96	24.78	0.66	0.62	addytywny	addytywny	0.04
		4% (v/v) MeOH/SPTD	85.37	63.20	1.21	1.12	79.84	64.07	1.13	1.13	addytywny	addytywny	0.03
LOS-K	Formulacja LOS-K + HCT (tabletki, 50 mg + 12.5 mg)	SPTD	769.06	899.66	1.87	2.21	464.05	523.22	1.13	1.22	synergistyczny	addytywny	0.49
TEL	Formulacja TEL + HCT (tabletki, 80 mg + 25 mg)		1231.54	406.86	0.60	0.64	487.85	169.02	0.24	0.27	addytywny	antagonistyczny	0.26

^a SPTD – Solid Phase Test Diluent, ^b – współczynniki p uzyskane w teście t-studenta dla dwóch sparowanych prób wartości EC_{50, 15 min} wskazujących na statystycznie istotne (p < 0.05) lub nieistotne (p > 0.05) różnice w odniesieniu do czystej API

gdzie obserwuje się 12-krotny wzrost toksyczności formułacji farmaceutycznej VAL, w porównaniu do czystej formy leku. Różnica ta jest statystycznie istotna ($p < 0.05$), a współczynnik MDR > 2 (model CA) pozwala na potwierdzenie występowania oddziaływań synergistycznych między VAL, a masą tabletkową. To może świadczyć o tym, że nie sama substancja czynna (VAL), a substancje pomocnicze obecne w tablecie, lub ich interakcje z VAL mogą być odpowiedzialne za toksyczny efekt farmaceutycznej formułacji VAL.

W przypadku LOS-K i HCT, toksyczność samej API i jej formułacji farmaceutycznej jest porównywalna ($p > 0.05$). W oparciu o obliczenia prowadzone z wykorzystaniem modelu IA obserwuje się efekt addytywny, tj. wspólne działanie dwóch składników nie powoduje wzmocnienia, ani osłabienia obserwowanego toksycznego efektu. Cytowani wcześniej autorzy przeanalizowali toksyczność dwóch formułacji HCT, generycznej i oryginalnej, wobec bakterii *A. fischeri*.^[46] W wyniku badań stwierdzono, że tylko formułacja generyczna była toksyczna, w odróżnieniu od całkowicie nietoksycznej formułacji oryginalnej. Generyczny produkt zawierał substancje pomocnicze, tj. siarczan laurylu, glikolan sodowo-skrobiowy, laktoza, celuloza mikrokrystaliczna i krzemionka. Autorzy wnioskujeją, że większa toksyczność generycznej formułacji jest spowodowana obecnością w/w substancji pomocniczych. Różnica toksyczności dwóch formułacji tej samej API, zawierających różne substancje pomocnicze, skłania więc do szczegółowego zbadania ekotoksyczności pojedynczych substancji pomocniczych, jak i ich mieszanin – badania te zostaną przedstawione w **podrozdziale 1.2.2.2.** niniejszej dysertacji.

W przypadku TEL substancje pomocnicze mają zupełnie inny wpływ na jego toksyczność. Czysty TEL okazał się być 3.5-razy bardziej toksyczny, niż jego formułacja farmaceutyczna, przy czym różnica ta jest istotna statystycznie ($p < 0.05$) i zgodnie z modelem IA obserwuje się efekt antagonistyczny (MDR < 0.5). Formułacja TEL zawiera w swoim składzie niewiele substancji pomocniczych, tj. mannitol, powidon, meglumina, wodorotlenek potasu oraz stearynian magnezu. Nie zawiera natomiast celulozy mikrokrystalicznej i krzemionki, które w przypadku innych badanych formułacji ARBs wiązane były ze zwiększeniem ich toksyczności. Czynnikiem powodującym zmniejszenie toksyczności API w połączeniu z substancjami pomocniczymi jest również adsorpcja TEL na ich powierzchni, co powoduje osłabienie procesu rozpuszczania i dyfuzji TEL.

To z kolei, przyczynia się do zmniejszonej biodostępności TEL dla bakterii *A. fischeri*. [243] Tego typu mechanizm adsorpcji został wykazany dla stearynianu magnezu, gdzie właściwości antybakteryjne chlorku cetylopirydyniowego zmniejszały się na skutek adsorpcji na cząsteczkach stearynianu magnezu. [244] Wspomniany stearynian magnezu jest składnikiem formulacji TEL i może przyczyniać się do zmniejszenia jej toksyczności w porównaniu do czystego TEL.

1.2.2.1.4. Ekotoksyczność mieszanin typu API-API w nieobecności substancji pomocniczych

Kolejnym istotnym zagadnieniem jest ekotoksyczność dwuskładnikowych mieszanin ARBs z HCT, który jest stosowany razem z ARB w preparatach złożonych. Powszechnie wiadomo, że obserwowana toksyczność mieszaniny może być większa lub mniejsza, niż toksyczność oczekiwana, wynikająca ze wspólnego działania – świadczy to o występowaniu efektów synergistycznych i antagonistycznych w mieszaninach. [95] To uzasadnia badanie efektów ekotoksykologicznych mieszanin API, które mogą znajdować się wspólnie w środowisku, zamiast toksyczności pojedynczych związków. Wyniki badań przedstawione w **Tabeli 20** wskazują, że w mieszaninach HCT z VAL (w SPTD) oraz TEL występują oddziaływania antagonistyczne ($p < 0.05$) – co potwierdzają obliczenia z wykorzystaniem zarówno modelu CA, jak i IA. Antagonistyczny efekt manifestowany jest poprzez obniżenie toksyczności mieszaniny ARB + HCT w porównaniu do toksyczności oczekiwanej. Tego typu zależności nie obserwuje się w przypadku LOS-K, gdzie stwierdzono występowanie efektu addytywnego z HCT, który manifestuje się brakiem wpływu toksyczności względem toksyczności oczekiwanej. Co ciekawe, antagonistyczny efekt obserwowany dla mieszaniny HCT i VAL w SPTD, nie jest zauważalny w 4% (v/v) roztworze MeOH/SPTD, gdzie obserwuje się efekt addytywny, a różnica toksyczności czystego VAL oraz czystej mieszaniny VAL + HCT nie jest statystycznie istotna ($p > 0.05$). Ponownie, świadczy to o dominującym wpływie większej ilości aromatycznych ugrupowań, tetrazolowego oraz grupy bifenylowej w strukturze VAL w porównaniu do struktury HCT.

Dotychczas, nie prowadzono badań naukowych dotyczących toksyczności mieszanin ARBs wobec bakterii *A. fischeri*. Bakterie te były wykorzystywane do badania toksyczności mieszanin antybiotyków, diuretyków, leków hipolipidemicznych, przeciwzapalnych oraz przeciwdrgawkowych – wykazując w nich występowanie

interakcji antagonistycznych i addytywnych. [74, 245] Co ciekawe, w przypadku wielu często stosowanych farmaceutyków np. ibuprofenu, naproksenu, diklofenaku czy kwasu salicylowego, wykazano, że toksyczność pojedynczych API dla *A. fischeri* nie jest wysoka, jednakże gdy leki te są zastosowane w postaci mieszanin, ze względu na występowanie synergistycznych efektów stają się one bardziej toksyczne dla wspomnianych bakterii. [246] Ciekawym zjawiskiem, zaobserwowanym dla dwuskładnikowych mieszanin leków i pestycydów, jest „zjawisko inwersji”, które manifestuje się występowaniem efektów synergistycznych w niskich stężeniach toksykanta oraz efektów addytywnych/antagonistycznych w wysokich stężeniach. [247]

Toksyczność mieszanin ARBs została przebadana z wykorzystaniem organizmów *Daphnia magna*, *Salmonella typhimurium* [197] oraz *Lemna minor* [204]. Wykazano, że mieszanina pięciu ARBs wraz z produktami ich degradacji nie wykazywała toksyczności chronicznej wobec *D. magna*, ani genotoksyczności wobec *S. typhimurium* TA 98 i TA 100. [197] Badania wykorzystujące *L. minor* wskazują na antagonistyczne interakcje pomiędzy LOS-K oraz propranololem, jednakże autorzy pracy podkreślają fakt, że zarówno model CA, jak i model IA nie pozwoliły na precyzyjne określenie toksyczności mieszanin. [204] W badaniach będących przedmiotem niniejszej dysertacji wykazano, że w mieszaninie LOS-K i HCT występują efekty addytywne. Toksyczności mieszanin, przewidywane zarówno modelem CA, jak i IA były w zgodzie z eksperymentalnymi wynikami otrzymanymi dla tych mieszanin. Dla tego przykładu można wykazać, że predykcja z zastosowaniem modelu IA jest bardziej zgodna z danymi eksperymentalnymi (MDR w przedziale 1.13-1.26) niż predykcja z zastosowaniem modelu CA (MDR w przedziale 1.55-1.73). Należy również zwrócić uwagę na fakt, że według przeglądu literaturowego, w przypadku ponad 60% mieszanin opisanych w literaturze, toksyczność wobec *A. fischeri* nie mogła zostać prawidłowo scharakteryzowana, ani przez model CA, ani IA. [248]

1.2.2.1.5. Ekotoksyczność mieszanin typu API-API w obecności substancji pomocniczych

Aby w pełni przeanalizować interakcje pomiędzy ARBs i HCT, zbadano toksyczność dwuskładniowych formułacji farmaceutycznych ARB + HCT – formułacje te oprócz API zawierają także substancje pomocnicze. Porównując ekotoksyczność tych

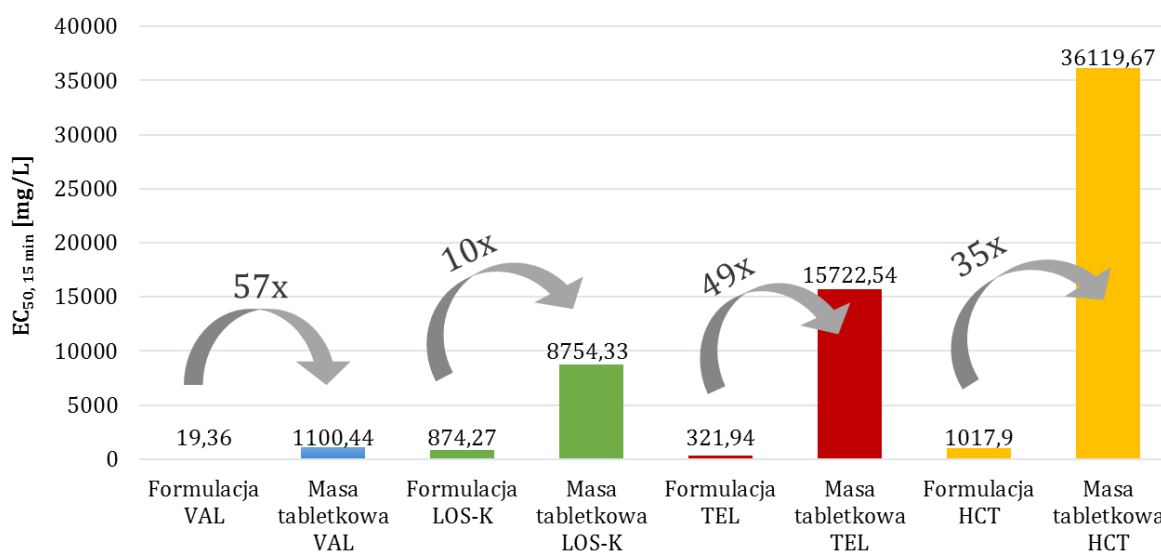
formulacji z czystą mieszaniną ARB + HCT możliwe jest zaobserwowanie efektów występujących pomiędzy ARB i HCT w obecności substancji pomocniczych.

Porównując toksyczność formulacji VAL + HCT z toksycznością czystej mieszaniny VAL + HCT, można zauważyć statystycznie istotne różnice – próbka, w której zawarte są substancje pomocnicze, jest bardziej toksyczna od analogicznej próbki bez substancji pomocniczych (**Tabela 20**). Przewidywana toksyczność formulacji VAL + HCT z wykorzystaniem modelu CA i IA wskazuje na istnienie efektu addytywnego. Warto podkreślić, że w przypadku czystej mieszaniny VAL + HCT obserwowano efekt antagonistyczny (w SPTD) – zależność ta pokazuje, że obecność substancji pomocniczych w formulacji ma wpływ na jej końcową toksyczność. W przypadku dwuskładnikowej formulacji VAL + HCT, wpływ substancji pomocniczych można określić jako neutralizujący antagonistyczne interakcje pomiędzy VAL i HCT. Inny wpływ substancji wypełniających stwierdzono dla samego VAL, gdzie obserwuje się głównie synergistyczne oddziaływania między VAL a masą tabletkową.

Podobnie, addytywny efekt, a tym samym brak wpływu substancji wypełniających obserwuje się w przypadku LOS-K, gdzie nie występują statystycznie istotne różnice ($p > 0.05$) między toksycznością formulacji LOS-K + HCT, a mieszaniną LOS-K + HCT. Brak statystycznie istotnych różnic stwierdzono także w przypadku formulacji TEL + HCT oraz czystej mieszaniny TEL + HCT, jednakże w oparciu o toksyczności przewidywane z wykorzystaniem modelu IA obserwuje się efekty antagonistyczne między TEL i HCT w otoczeniu substancji pomocniczych.

Określenie toksycznego efektu związanego z substancjami pomocniczymi stosowanymi w formulacjach farmaceutycznych jest trudne ze względu na mnogość użytych związków, zróżnicowanie ich struktury chemicznej oraz właściwości fizykochemicznych. Generalnie można wnioskować, że substancje pomocnicze nie są inertnymi substancjami i mogą wchodzić w różnorakie interakcje z API – oprócz interakcji fizykochemicznych mogą brać udział w niepożądanych reakcjach chemicznych, takich jak hydroliza, epimeryzacja, izomeryzacja i polimeryzacja, generując w ten sposób różne zanieczyszczenia chemiczne. [205] Do tej pory nie określono precyzyjnie mechanizmów interakcji API-substancje pomocnicze. Uważa się, że interakcje te mogą być zarówno korzystne pod kątem ekotoksykologicznym, tj. obecność substancji pomocniczych powoduje niwelację synergistycznych/antago-

nistycznych efektów, lub niekorzystne, gdzie substancje pomocnicze wywołują synergistyczne efekty zwiększające ekotoksyczność ostatecznej formuacji farmaceutycznej. Tego typu zależności wykazano także w niniejszej pracy. Należy podkreślić, że w przypadku analizowanych próbek same substancje pomocnicze (masa tabletkowa) są o wiele mniej toksyczne niż formuacja farmaceutyczna, która je zawiera (API + masa tabletkowa) (**Rys. 20**). Zwraca to uwagę na fakt, że istotną rolę w zmianie toksyczności muszą odgrywać specyficzne oddziaływania API-substancje pomocnicze.

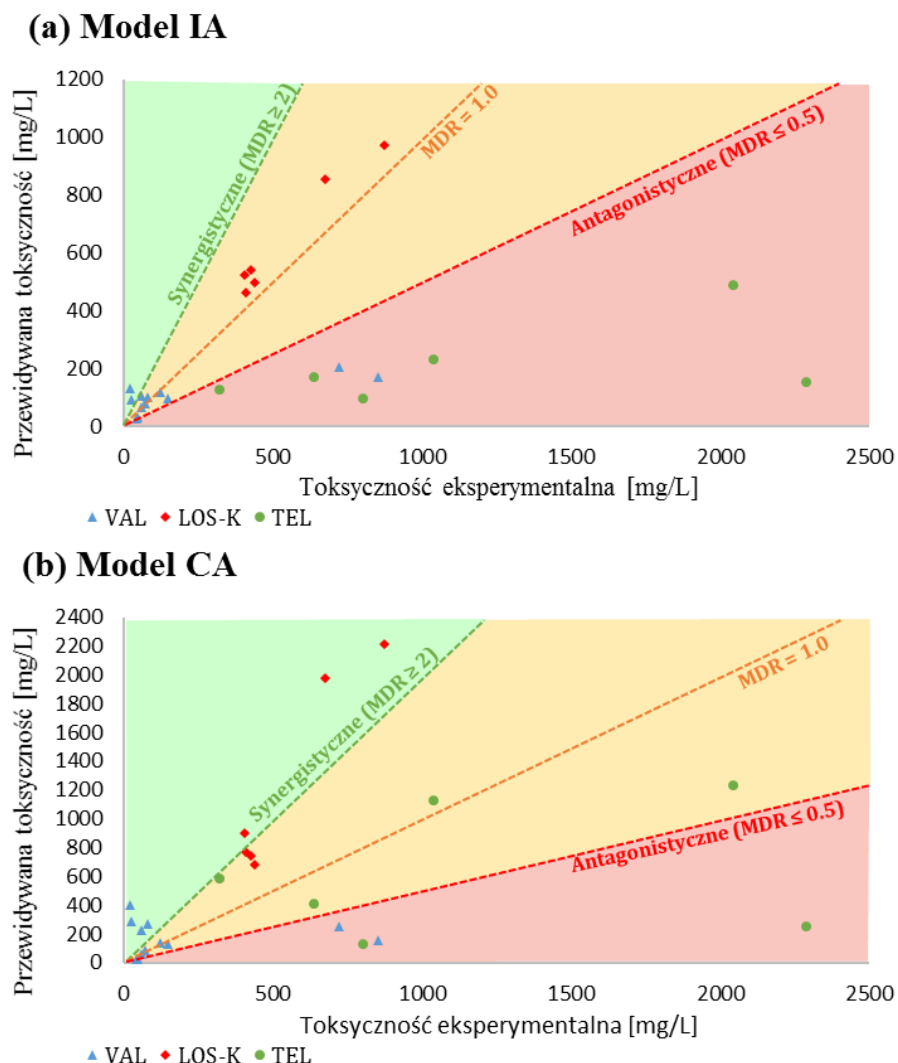


Rys. 20. Porównanie ekotoksyczności wobec *A. fischeri* całej formuacji farmaceutycznej danej API z toksycznością samej masy tabletkowej (mieszanki substancji pomocniczych). Na wykresie zaznaczono różnice toksyczności między formuacją API, a jej masą tabletkową.

1.2.2.1.6. Zastosowane modele obliczeniowe

W niniejszej pracy zastosowano zarówno model CA (ang. *Concentration Addition*, model dodanych stężeń), jak i IA (ang. *Independent Action*, model niezależnego działania) do przewidywania ekotoksyczności mieszanin APIs. Generalnie uważa się, że model IA jest zaprojektowany dla mieszanin związków chemicznych, które mają inne cele molekularne, podczas gdy model CA dla mieszanin związków działających wg podobnego mechanizmu. W niniejszych badaniach ze względu na fakt, że nieznanne są mechanizmy działania i cele molekularne w odniesieniu do *A. fischeri* dla mieszanin wielu różnorodnych związków chemicznych stosowanych w kompozycjach farmaceutycznych, koniecznym było jednoczesne zastosowanie dwóch modeli predykcyjnych. W przypadku przedstawionych badań, dokładność przewidywania

toksyczności z wykorzystaniem obydwóch modeli została przedstawiona na **Rys. 21**, z podziałem na poszczególne ARBs (VAL, LOS-K, TEL).



Rys. 21. Podsumowanie dokładności przewidywania toksyczności z wykorzystaniem modelu (A.) IA oraz (B.) CA w odniesieniu do trzech badanych leków z grupy ARBs. Linie przerywane dotyczą wartości MDR – linia pomarańczowa wskazuje na MDR = 1 (całkowity brak interakcji). Poniżej tej linii obserwuje się efekty antagonistyczne (MDR < 0.5, linia czerwona), a powyżej efekty synergistyczne (MDR > 2, linia zielona) [94].

Zauważyć można, że model IA pozwala na przewidywanie toksyczności z większą precyzją, co jest szczególnie widoczne w przypadku LOS-K i TEL, gdzie obserwuje się niemal liniową zależność. Ponadto, efekty zidentyfikowane w mieszaninach poszczególnych ARBs są bardziej spójne w przypadku tego modelu, podczas gdy zastosowanie modelu CA prowadzi do większej zmienności zidentyfikowanych interakcji. Z pomocą modelu CA wnioskować można, że w przypadku wszystkich mieszanin TEL obserwuje się efekty antagonistyczne, natomiast w przypadku mieszanin LOS-K – efekty synergistyczne. W przypadku mieszanin VAL obserwuje się efekty

każdego typu tj. synergistyczne, addytywne i antagonistyczne. Większa precyzja modelu IA może być także potwierdzona przez mniejszy zakres otrzymanych wartości MDR – w przypadku modelu IA współczynnik MDR wynosił maksymalnie 6.73, natomiast w przypadku modelu CA sięgał on aż do 20.80. Większa precyzja modelu IA w obliczeniach toksyczności mieszanin została także zauważona w innych pracach dotyczących bakterii *A. fischeri*. [248] Jest to niewątpliwie związane z operowaniem wielu mechanizmów działania i istnieniem przynajmniej kilku celów molekularnych w *A. fischeri*, w odniesieniu do działających na nie złożonych mieszanin formułacji farmaceutycznych, zarówno tych handlowych jak i wytworzonych sztucznie na potrzeby badawcze.

Wnioski do podrozdziału 1.2.2.1.:

- ✓ Opracowana modyfikacja standardowego protokołu Microtox® Basic Solid Phase Test pozwala na rzetelną ocenę ekotoksyczności słabo rozpuszczalnych API, zarówno w badaniach pojedynczych związków, jak i mieszanin.
- ✓ Zaobserwowano występowanie interakcji antagonistycznych między ARB, a HCT – substancji, które są dystrybuowane razem w lekach dwuskładnikowych.
- ✓ Wykazano, że problem bezpieczeństwa środowiskowego związanego z substancjami pomocniczymi stosowanymi w farmacji powinien zostać dokładnie przeanalizowany, szczególnie ze względu na fakt występowania interakcji między substancjami pomocniczymi oraz między API, a substancjami czynnymi.
- ✓ W przypadku leków z grupy ARBs można wnioskować, że model IA pozwala na przewidywanie ekotoksyczności mieszanin API z większą precyzją niż model CA.

1.2.2.2. CZĘŚĆ 2: Substancje pomocnicze i ich mieszaniny

1.2.2.2.1. Ekotoksyczność pojedynczych substancji pomocniczych

W Tabeli 21 zebrano wartości EC_{50} uzyskane za pomocą modyfikowanego protokołu Microtox® Basic Solid Phase Test po 5, 15 i 30 minutach ekspozycji bakterii *A. fischeri* na poszczególne substancje pomocnicze. Większość z badanych substancji pomocniczych powszechnie stosowanych w formułacjach farmaceutycznych, wg globalnie zharmonizowanego systemu klasyfikacji i oznakowania chemikaliów (GHS) [51] jest nietoksyczna (wartości EC_{50} powyżej 100 mg/L). Jednakże widoczne jest zróżnicowanie otrzymanych wartości wśród związków zaliczonych do nietoksycznych – od kilkuset mg/L, nawet do kilkudziesięciu tysięcy mg/L, wobec tego należy z uwagą przyjrzeć się również niektórym substancjom, które znajdują się u progu tej granicy. Dwie z analizowanych substancji pomocniczych zaliczono do III kategorii toksyczności

(substancje szkodliwe) – meglumina i węglan magnezu o wartościach EC₅₀ w przedziale 10-100 mg/L. Niepokojącym wynikiem jest toksyczność wykazywana przez laurylosiarczan sodu (SLS) – związek ten może być scharakteryzowany jako bardzo toksyczny, o wartości EC₅₀ poniżej 1 mg/L.

Tabela 21. Wartości EC₅₀ badanych substancji pomocniczych wobec bakterii *A. fischeri* (modyfikowany protokół Microtox® Basic Solid Phase Test) po 5, 15 i 30 minutach ekspozycji wraz z 95% przedziałem ufności oraz współczynnikami determinacji R².

Substancja pomocnicza	EC ₅₀ [mg/L]; (95% przedział ufności); współczynnik R ²			Kategoria toksyczności [51] (na podstawie EC _{50 30 min})
	5 min	15 min	30 min	
Laurylosiarczan sodu (SLS)	1.371 (0.7002 – 2.686) 0.8893	0.8004 (0.2147 – 2.985) 0.7246	0.5544 (0.1138 – 2.702) 0.6931	I
Meglumina	28.56 (15.58 – 52.37) 0.8641	19.66 (7.958 – 48.57) 0.7499	18.05 (7.237 – 45.02) 0.7516	III
Węglan magnezu (ciężki)	109.8 (55.61 – 216.6) 0.9360	86.42 (58.99 – 126.6) 0.9678	65.60 (44.19 – 97.37) 0.9738	
Krzemionka, nanoproszek	100.2 (47.07 – 213.2) 0.8138	242.6 (141.7 – 415.3) 0.8882	226.4 (162.7 – 315.1) 0.9574	
Kroskarmeloza sodowa	1348 (807.5 – 2249) 0.9163	1325 (808.0 – 2174) 0.9196	1400 (622.2 – 3150) 0.7960	Nietoksyczne
Talk	14683 (305.1 – 706681) 0.2736	2229 (829.2 – 5993) 0.6733	494.3 (196.6 – 1243) 0.7517	
Powidon K30	2218 (1879 – 2619) 0.9915	1768 (405.3 – 7709) 0.7765	1130 (228.1 – 5600) 0.4681	
Powidon K25	2120 (1291 – 3483) 0.9033	1749 (689.7 – 4434) 0.7225	1559 (556.7 – 4287) 0.7872	
Celuloza mikrokrystaliczna typ PH102	1966 (742.0 – 5207) 0.8784	1908 (741.0 – 4914) 0.8827	1958 (760.8 – 5037) 0.8848	
Koloidalna krzemionka bezwodna (Aerosil R200)	3294 (1802 – 6021) 0.9372	3108 (1808 – 5344) 0.9473	2681 (1618 – 4443) 0.9501	
Krzemionka koloidalna, LUDOX SM-30	8238 (4220-16081) 0.9016	4776 (3078 – 7408) 0.9421	3794 (2481 – 5800) 0.9400	
Mannitol	12563 (1419 – 111263) 0.6267	5404 (346.9 – 84181) 0.3225	4253 (209.9 – 86162) 0.2195	
Glikolan sodowo-skrobiowy (typ A)	10184 (4729 – 21928) 0.9539	11725 (6045 – 22743) 0.9710	12541 (5559 – 28296) 0.9601	
Laktoza jednowodna	11705 (1477 – 92754) 0.9880	13999 (227.4 – 861937) 0.9596	16363 (186.6 – 1434691) 0.9584	
Skrobia kukurydziana preżelowana	46929 (19696 – 111815) 0.9855	39287 (10516 – 146768) 0.9070	42202 (3925 – 453734) 0.7540	
Krospowidon (typ A)	27795 (274.0 – 2819364) 0.5875	64863 (9.993 – 421001866) 0.6420	49855 (35.11 – 70801223) 0.7010	
Fumaran stearylowo-sodowy	56456 *	12815 (38.84 – 4457999) 0.9221	80534 (2479 – 2616211) 0.8896	
Sorbitol	Nietoksyczny w badanym stężeniu 31 061 mg/L, hormeza			

* wartość obliczona z wykorzystaniem dwóch punktów pomiarowych, brak 95% przedziału ufności oraz R²;

Kategorie toksyczności ostrej: I. Substancja bardzo toksyczna, EC₅₀ < 1.0 mg/L; II. Substancja toksyczna, 1 < EC₅₀ < 10; III. Substancja szkodliwa, 10 < EC₅₀ < 100 mg/L [51]

Laurylosiarczan sodu (SLS) jest stosowany w farmacji jako surfaktant anionowy, emulsyfikator, solubilizator, lubrykant oraz czynnik do przygotowywania postaci leku o modyfikowanym uwalnianiu. [249] Związek ten jest dopuszczony jako substancja pomocnicza w preparatach do użytku zewnętrznego, pastach do zębów, szamponach oraz tabletkach, średnio w ilościach od 0.2-2% (w/w), nawet do 25% (w/v) w szamponach. [250] Jak inne badane substancje pomocnicze jest on zaliczany do bezpiecznych związków z listy GRAS (ang. *generally recognized as safe*). Jako, że jest to związek powierzchniowo czynny, tak wysoką toksyczność wobec bakterii *A. fischeri* z dużym prawdopodobieństwem można wytłumaczyć właściwościami bakteriostatycznymi SLS i jego zdolnościami do tworzenia porów w błonach bakteryjnych, przez które może wpływać zawartość cytoplazmy, powodując śmierć komórki. Mimo, że źródła literaturowe sugerują działanie SLS głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, w wyniku przeprowadzonych badań można stwierdzić, że wykazuje on właściwości antybakteryjne także w odniesieniu do Gram-ujemnych bakterii *A. fischeri*. [249, 251] Biorąc pod uwagę skalę produkcji SLS i szereg jego zastosowań w przemyśle farmaceutycznym oraz kosmetycznym, wynik ten jest niepokojący z punktu widzenia bezpieczeństwa środowiskowego. Toksyczność SLS, zarówno w odniesieniu do człowieka, jak i środowiska, była tematem wielu publikacji naukowych, a także stała się obiektem dyskusji w przestrzeni publicznej.[252] W odniesieniu do opublikowanych danych ekotoksykologicznych wobec różnych organizmów wodnych, wartości LC₅₀ (LC – ang. *lethal concentration*, stężenie letalne) dla SLS zawierają się w przedziale 1 – 13.9 mg/L [253-257], a więc związek zaliczyć można do II klasy toksyczności. Warto jednak pamiętać, że wartości toksyczności poszczególnych związków dla organizmów wodnych nie odpowiadają bezpośrednio toksyczności gotowych produktów farmaceutycznych, czy kosmetycznych. Przykładowo, może to oznaczać, że potencjalnie toksyczny SLS po zastosowaniu w pewnym rozcieńczeniu w preparacie może okazać się nietoksyczny dla organizmów wodnych. Należy również pamiętać o oddziaływaniach synergistycznych/antagonistycznych poszczególnych substancji mogących występować w gotowym produkcie. Efekty te, wraz z toksycznością SLS w pewnych mieszaninach zostaną omówione w dalszej części tego rozdziału.

Dwie spośród badanych substancji pomocniczych – meglumina i węglan magnezu (ciężki) zaliczyć można do III kategorii toksyczności, a więc do związków szkodliwych

dla środowiska wodnego. Meglumina jest 1-metyloaminową pochodną sorbitolu, stosowaną w farmacji jako czynnik regulujący pH oraz solubilizator. Substancja ta znajduje się na liście substancji GRAS i jest dopuszczona do stosowania jako substancja pomocnicza w kapsułkach, tabletkach oraz zastrzykach. [258] Jednak, w literaturze naukowej traktującej o ekotoksyczności brak jest badań poświęconych temu związkowi. Istnieją badania na modelach zwierzęcych sugerujące, że meglumina zażywana w wysokich dawkach może posiadać właściwości lecznicze w leczeniu takich chorób jak otyłość, cukrzyca oraz niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby. [258, 259] Jak wspomniano wcześniej, meglumina jest pochodną sorbitolu, stąd spodziewać można byłoby się podobnej ekotoksyczności tych dwóch związków. W toku przeprowadzonych badań wykazano, że sorbitol jest całkowicie nietoksyczny w badanym stężeniu, jego wartość EC_{50} wynosi ponad 31 061 mg/L, podczas gdy dla megluminy wartość ta wynosi zaledwie 18.05 mg/L. Związki te w swojej strukturze chemicznej różnią się tylko grupą metyloaminową, która nadaje megluminie właściwości zasadowe, niekorzystne dla bakterii *A. fischeri*. Takich właściwości nie wykazuje sorbitol, który w warunkach pomiarowych powoduje pojawienie się zjawiska hormezy, czyli korzystnego działania niskich dawek. [260] Drugim badanym związkiem zaliczanym do III kategorii toksyczności jest ciężki węglan magnezu, w skład którego wchodzi $MgCO_3$ z 40-50% dodatkiem $Mg(OH)_2$. [261] Jest on dopuszczony do stosowania w formulacjach farmaceutycznych (tabletkach, kapsułkach) w ilościach do 45% wagowych. [88] Pełni on funkcję czynnika pochłaniającego (np. aromaty) oraz stabilizatora. [250] Duża toksyczność tego związku prawdopodobnie związana jest, podobnie jak w przypadku megluminy, z zasadowym odczynem węglanu magnezu (**Tabela S5, materiały dodatkowe**), co wiąże się z niekorzystnymi warunkami dla bakterii.

W rozważaniach **podrozdziału 1.2.2.1.** wytypowano celulozę mikrokrystaliczną oraz bezwodną, koloidalną krzemionkę jako związki potencjalnie powodujące zwiększenie toksyczności formulacji farmaceutycznej. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że celuloza mikrokrystaliczna z wartością $EC_{50, 30 \text{ min}}$ na poziomie 1958 mg/L oraz bezwodna, koloidalna krzemionka z $EC_{50, 30 \text{ min}} = 2681 \text{ mg/L}$ są związkami nietoksycznymi dla środowiska, chociaż ich wartości EC_{50} nie są aż tak wysokie jak dla innych nietoksycznych substancji pomocniczych. Celuloza

mikrokrystaliczna jest częściowo zdepolimeryzowaną formą celulozy, otrzymywaną z prekursora α -celulozy. Badana celuloza mikrokrystaliczna typu PH-102 charakteryzuje się średnim rozmiarem cząstek na poziomie 100 μm i jest stosowana w farmacji jako substancja wiążąca, rozsadzająca, absorbująca, wypełniająca, poślizgowa i zapobiegająca przywieraniu. [262] Jako, że celuloza jest naturalnym komponentem roślin i występuje w środowisku przyjmuje się, że substancja ta jest bezpieczna dla środowiska [263], jednakże w literaturze naukowej brak jest badań ekotoksykologicznych poświęconych temu związkowi. Podejrzewa się, że celuloza mikrokrystaliczna, ze względu na swoje niewielkie rozmiary może wykazywać zwiększone właściwości absorpcyjne i wnikać do komórek przez jej pory, ulegać bioakumulacji i zaburzać funkcjonowanie komórek. W roku 1997 Komisja Europejska wydała dyrektywę zakazującą stosowania cząstek celulozy mikrokrystalicznej o wielkości poniżej 5000 nm (5 μm). [264] Krzemionka koloidalna stosowana jest w farmacji jako środek przeciwbrylający, stabilizator emulsji, środek poślizgowy, zawieszający, stabilizator oraz środek zwiększający lepkość. [265] W niniejszej dysertacji, badania ekotoksykologiczne przeprowadzono na stosowanym w farmacji produkcie Aerosil R200 zawierającym zagregowaną krzemionkę koloidalną o pierwotnym rozmiarze cząstek ok. 12 nm. [266] Dodatkowo, w celu ustalenia wpływu rozmiaru cząstek oraz formy krzemionki koloidalnej na toksyczność wobec bakterii *A. fischeri* zbadano ekotoksyczność dwóch innych form krzemionki: płynnej formy LUDOX SM-30 (rozmiar cząstek 7 nm) oraz nanoproszku (rozmiar cząstek 10-15 nm). Biorąc pod uwagę fakt, że LUDOX SM-30 zawiera 30% wagowych SiO_2 , jego wartość $\text{EC}_{50\ 30\ \text{min}}$ wynosząca 3794 mg/L w przeliczeniu na czysty SiO_2 wynosi 1138.2 mg/L. W Tabeli 22 zestawiono wartości EC_{50} wobec bakterii *A. fischeri* różnych form krzemionki wraz z wielkością jej cząstek.

Tabela 22. Wartości EC_{50} różnych form krzemionki wobec *A. fischeri* w zależności od wielkości cząstek.

Forma krzemionki	Wielkość cząstek [nm]	Wartość $\text{EC}_{50, 30\ \text{min}}$ [mg/L]	Test	Źródło
Nanoproszek	10-15	226.4	opracowana modyfikacja Microtox® Basic Solid Test	ta praca
LUDOX SM-30 (30% koloidalny roztwór amorficznej krzemionki)	7	1138.2*		
Aerosil R200 (hydrofilowy pył krzemionkowy)	12	2681		
Proszek	60-100	333.82	metoda wykorzystująca opracowany przez autorów luminometr	[241]
Mezoporowata krzemionka	60-150	319.68		
Proszek	50	> 1000	test podstawowy Microtox® dla wodnych ekstraktów	[242]
Proszek	100			

* w przeliczeniu na czysty SiO_2

Dotychczas, krzemionka była przedmiotem wielu badań, głównie ze względu na fakt, że nanocząstki SiO₂ są jednymi z najczęściej produkowanych nanomateriałów. [267, 268] Znajdują one swoje zastosowanie w produktach ceramicznych, szklanych, kosmetycznych, a także w medycynie oraz farmacji. [269, 270] Krzemionka koloidalna, np. Aerosil R200, jest stosowana w farmacji jako środek poślizgowy do produkcji proszków, kapsułek i tabletek. [271, 272] Ze względu na mały rozmiar cząstek pierwotnych, jak i aglomeratów, są one silnie adsorbowane na powierzchniach większych cząstek. [273] Jako, że krzemionki stosowane są w postaci nanocząstek, w literaturze naukowej podejmowane były tematy dotyczące bezpieczeństwa stosowania tego typu związków, a także ich ekotoksyczności. Safekordi i współpracownicy zbadali ekotoksyczność dwóch rodzajów krzemionki wobec *A. fischeri*: w postaci proszku oraz krzemionki mezoporowatej, otrzymując dla obu tych form zbliżone wartości EC₅₀ (**Tabela 22**). [241] Warto podkreślić, że autorzy tych badań nie wykorzystywali aparatu Microtox®, a pomiary oparte były o opracowany przez autorów luminometr. Z kolei, Casado i współpracownicy zbadali dwie formy krzemionki o różnej wielkości cząstek przy wykorzystaniu protokołu Microtox® odnoszącego się do wodnych ekstraktów badanego toksykanta. [242] Wykazali oni, że badane formy SiO₂ nie są toksyczne w maksymalnym badanym stężeniu wynoszącym 1000 mg/L. Wyniki przedstawione w **Tabeli 22** służą do celów porównawczych, jednak należy pamiętać, że nie wszystkie zostały uzyskane przy pomocy tego samego protokołu badawczego, stąd ilościowe porównywanie zamieszczonych wyników może być nieco mylące. W odniesieniu do wyników uzyskanych w niniejszej pracy doktorskiej zauważyć można dużo większą toksyczność natywnej, sproszkowanej krzemionki od form stosowanych komercyjnie w farmacji, tj. Aerosil R200. Wynika to prawdopodobnie z większej dostępności nanoproszku SiO₂ dla bakterii – nie tworzy on aglomeratów, ani układów koloidalnych. Mimo, iż preparat Aerosil R200 posiada podobną pierwotną wielkość cząstek SiO₂ (12 nm) do badanego proszku (10-15 nm), to jest od niego 10-krotnie mniej toksyczny – wynika to z faktu aglomeracji krzemionki w hydrofilowym preparacie, co wiąże się z jej mniejszą dostępnością dla bakterii. Z kolei preparat LUDOX SM-30, mimo iż posiada krzemionkę o najmniejszej wielkości cząstek (7 nm) charakteryzuje się toksycznością 5-krotnie mniejszą, niż nanoproszek SiO₂. Prawdopodobnie związane jest to z koloidalnymi właściwościami preparatu LUDOX, a zatem mniejszą dostępnością SiO₂ dla bakterii. Preparat LUDOX został także przebadany przez zespół van Hoecke pod kątem

ekotoksyczności wobec zielonych alg, gdzie wykazano, że ta forma krzemionki jest dla nich toksyczna. Autorzy badania nie stwierdzili wychwytu cząstek SiO₂ do komórek, lecz ich adsorbcję na ścianach komórkowych badanych organizmów. [274] Zbadano również wpływ SiO₂ o wielkości cząstek 20 i 50 nm na organizmy wodne *Daphnia magna*. Autorzy badania wykazali brak toksyczności ostrej badanej krzemionki w stężeniu do 100 mg/L, jednak zaobserwowano znaczące zmiany fizjologiczne i behawioralne u dorosłych i młodych osobników *D. magna*. [275] Przede wszystkim obserwowano zmianę wydajności pływania, wielkości osobników, osłabienie reprodukcji – czynniki te stanowiły poparcie hipotezy, że SiO₂ ma negatywny wpływ na *D. magna*. Inni autorzy wykazali, że zarówno formy amorficzne, jak i krystaliczne SiO₂ mogą doprowadzać do zwłóknienia węzłów chłonnych u szczurów. [276] Warto jednak podkreślić, że przewidywane stężenie nanocząstek SiO₂ w środowisku wodnym wynosi 562 ng/L (Europa Północna) oraz 2600 ng/L (Europa Południowo-Wschodnia) – są to największe stężenia spośród wszystkich analizowanych nanocząstek (Al₂O₃, CeO₂, tlenki żelaza), jednak wciąż o wiele niższe, niż wartości EC₅₀ uzyskane dla różnych form krzemionki. [277]

Analizując wyniki badań przedstawione w **Tabeli 21** warto zwrócić uwagę na 3 substancje pomocnicze z grupy powidonów – powidon K25, powidon K30 oraz krospowidon (typ A). Są one syntetycznymi polimerami winylopirolidonu, stosowanymi jako nośniki do dyspergowania i zawieszania leków, a także jako środki rozsadzające i spajające. W zależności od stopnia polimeryzacji wyróżniamy powidon – rozpuszczalny w wodzie, liniowy polimer o masie cząsteczkowej od 8000 do 10000 daltonów oraz krospowidon – nierozpuszczalny w wodzie, usieciowany polimer winylopirolidonu o masie większej niż 700000 daltonów. [278] W obrębie powidonów, w farmacji stosuje się powidony o różnej wartości K (badane w pracy: powidon K25 i powidon K30), która związana jest ze stopniem polimeryzacji, średnią masą cząsteczkową i lepkością. [279] W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że toksyczność powidonów wobec *A. fischeri* rośnie w szeregu krospowidon < powidon K25 < powidon K30, wykazując wartości EC_{50, 30 min} odpowiednio: 49855 mg/L < 1599 mg/L < 1130 mg/L (**Tabela 21**). Nie jest wynikiem zaskakującym mała toksyczność krospowidonu – jest to polimer usieciowany, słabo rozpuszczalny, a zatem o małej dostępności dla *A. fischeri*. Toksyczności powidonu K25 oraz K30 można uznać za porównywalne, szczególnie

rozważając wartości po 5 i 15 minutach ekspozycji. Polimery nie różnią się znacząco od siebie – powidon K30 posiada większą masę cząsteczkową oraz wyższy stopień polimeryzacji, jednak obydwie formy powidonu posiadają cząsteczki podobnej wielkości (powyżej 50 μm) oraz charakteryzują się właściwościami kompleksującymi.

1.2.2.2.2. Ekotoksyczność mieszanin typu API-substancja pomocnicza oraz substancja pomocnicza-substancja pomocnicza

Przeprowadzono analizę składu trzech formułacji farmaceutycznych badanych w **podrozdziale 1.2.2.1.** (Valtap, Lozap oraz Telmizek) i przebadano ekotoksyczność mieszanin dwuskładnikowych zawierających API + substancje pomocniczą występującą w danej formułacji. Z racji dużej ilości możliwych kombinacji, nie badano mieszanin ze związkami o bardzo dużej wartości EC_{50} (nietoksycznych). tj. sorbitolu, skrobi kukurydzianej przeżelowanej, krospowidonu i fumaranu stearylowo-sodowego. W dalszej kolejności zbadano ekotoksyczność mieszanin dwuskładnikowych typu substancja pomocnicza/substancja pomocnicza, do których wykorzystano substancje pomocnicze wykazujące interakcje z API. Przeanalizowano również ekotoksyczność mieszanin trójskładnikowych typu 3x substancja pomocnicza lub API/2x substancja pomocnicza. Skład mieszanin odpowiadał składowi deklarowanemu przez producenta danego preparatu farmaceutycznego, przy czym, jako, że producenci farmaceutyków zastrzegają sobie prawo do niedefiniowania ilościowej zawartości poszczególnych substancji pomocniczych, ilości te zostały dobrane zgodnie z zaleceniami dotyczącymi procentowej zawartości poszczególnych substancji pomocniczych w formułacji. Wyniki badań ekotoksykologicznych mieszanin przedstawiono w **Tabeli 23.** Poniżej zostaną one omówione z podziałem na trzy API (VAL, LOS-K, TEL) oraz porównane z wartościami przewidywanymi z wykorzystaniem modeli CA i IA.

Tabela 23. Wartości EC_{50} badanych mieszanin zawierających substancje pomocnicze wobec bakterii *A. fischeri* (modyfikowany protokół Microtox® Basic Solid Phase Test) po 5, 15 i 30 minutach ekspozycji wraz z 95% przedziałami ufności oraz współczynnikami determinacji R^2 .

API	Mieszanina	Skład % mieszaniny w odniesieniu do całej tabletki	EC_{50} [mg/L]; (95% przedział ufności); współczynnik R^2		
			5 min	15 min	30 min
VAL	Mieszaniny: VAL + substancja pomocnicza				
	VAL + celuloza mikrokrystaliczna	47% + 23%	319.0 (132.3 – 769.0) 0.7959	382.5 (103.6 – 1412) 0.6419	307.9 (84.13 – 1127) 0.5859

	VAL + węglan magnezu	47% + 5%	24619 (2674 - 226629) 0.9616	15105 (1060 - 215266) 0.7598	7855 (1295 - 47651) 0.7972	
	VAL + powidon K25	47% + 5%	675.2 (371.7 - 1226) 0.8966	571.3 (289.3 - 1128) 0.8580	1046 (158.5 - 6907) 0.9717	
	VAL + laurylosiarczan sodu	47% + 1%	34.75 (29.38 - 41.10) 0.9936	29.39 (22.48 - 38.41) 0.9898	28.91 (19.82 - 42.16) 0.9802	
	VAL + krzemionka koloidalna	47% + 1%	130.7 (128.3 - 133.2) 1.0000	111.6 (49.01 - 254.2) 0.9937	58.97 (39.42 - 88.23) 0.9747	
Mieszaniiny: substancja pomocnicza + substancja pomocnicza						
	węglan magnezu + powidon K25	5% + 5%	240.6 (154.5 - 374.6) 0.9557	154.8 (59.19 - 404.6) 0.8587	85.99 (9.907 - 746.4) 0.7819	
	węglan magnezu + krzemionka koloidalna	5% + 1%	114.1 (24.14 - 539.1) 0.7982	118.3 (83.90 - 166.8) 0.9662	71.10 (4.159 - 1215) 0.6047	
	powidon K25 + krzemionka koloidalna	5% + 1%	11 028 (1181 - 102957) 0.7085	5845 (2560 - 13343) 0.7972	6199 (3114 - 12342) 0.8622	
Mieszaniiny trójskładnikowe						
	powidon K25 + krzemionka koloidalna + węglan magnezu	5% + 1% + 5%	553.4 (385.5 - 794.4) 0.9563	353.1 (206.4 - 600.7) 0.9238	305.8 (171.3 - 546.0) 0.8825	
	VAL + powidon K25 + krzemionka koloidalna	47% + 5% + 1%	258.4 (115.0 - 580.4) 0.7962	179.6 (66.95 - 482.0) 0.7297	163.8 (74.04 - 362.3) 0.8299	
Mieszaniiny wieloskładnikowe						
	wszystkie substancje pomocnicze VAL ¹	23% + 12% + 5% + 5% + 5% + 2% + 1% + 2% + 1%	164.4 (131.0 - 206.3) 0.9797	81.22 (69.57 - 94.82) 0.9915	59.26 (53.52 - 65.50) 0.9964	
	VAL + wszystkie substancje pomocnicze ¹	47% + 23% + 12% + 5% + 5% + 5% + 2% + 1% + 2% + 1%	129.2 (107.9 - 154.6) 0.9880	67.63 (56.89 - 80.40) 0.9915	47.85 (35.84 - 63.89) 0.9819	
LOS-K	Mieszaniiny: LOS-K + substancja pomocnicza					
	LOS-K + celuloza mikrokrystaliczna	24% + 38%	931.2 (809.2 - 1072) 0.9945	770.0 (167.0 - 3550) 0.9752	771.6 (79.31 - 7506) 0.9457	
	LOS-K + mannitol	24% + 20%	691.8 (637.7 - 750.6) 0.9981	618.2 (530.2 - 720.8) 0.9937	546.6 (440.5 - 678.4) 0.9887	
	LOS-K + krzemionka koloidalna	24% + 1%	391.8 (279.7 - 548.8) 0.9876	294.1 (275.9 - 313.5) 0.9992	278.8 (227.9 - 341.2) 0.9971	
	LOS-K + talk	24% + 1%	440.7 (327.2 - 593.6) 0.9733	319.7 (232.4 - 440.0) 0.9717	260.3 (180.9 - 374.5) 0.9479	
	Mieszaniiny wieloskładnikowe					
	wszystkie substancje pomocnicze LOS-K ²	38% + 20% + 5% + 1% + 1% + 1%	1519 (1300 - 1774) 0.9914	1838 (1454 - 2324) 0.9796	2101 (1631 - 2708) 0.9763	
LOS-K + wszystkie substancje pomocnicze ²	24% + 38% + 20% + 5% + 1% + 1% + 1%	800.4 (475.0 - 1349) 0.9140	621.8 (336.9 - 1148) 0.8510	536.9 (268.5 - 1074) 0.8129		
TEL	Mieszaniiny: TEL + substancja pomocnicza					
	TEL + mannitol	17% + 45%	13602 (46.14 - 4009769) 0.8602	13882 (3052 - 63153) 0.9893	15401 (2575 - 92096) 0.9872	
	TEL + powidon K25	17% + 5%	4017 (3018 - 5347) 0.9859	4583 (3454 - 6080) 0.9856	4566 (3455 - 6034) 0.9861	
	TEL + meglumina	17% + 30%	66.42 (27.66 - 159.5) 0.7661	53.11 (9.586 - 294.2) 0.5387	48.05 (6.499 - 355.2) 0.3256	
	Mieszaniiny: substancja pomocnicza + substancja pomocnicza					
	mannitol + powidon K25	45% + 5%	9620 (355.2 - 260504) 0.6879	34 023 (42.72 - 27097494) 0.9664	brak toksyczności	

mannitol + meglumina	45% + 30%	136.2 (26.70 – 694.9) 0.9633	83.17 (26.37 – 262.2) 0.7808	73.14 (20.99 – 254.9) 0.7226
meglumina + powidon K25	30% + 5%	1.058 (0.5888 – 1.901) 0.9588	0.9118 (0.6509 – 1.277) 0.9879	1.011 (0.– 1.440) 0.9856
Mieszanki wieloskładnikowe				
wszystkie substancje pomocnicze TEL ³	45% + 5% + 30% + 2% + 1%	85.27 (46.67 – 155.8) 0.8943	57.73 (17.69 – 188.4) 0.7822	48.25 (13.97 – 166.6) 0.8052
TEL + wszystkie substancje pomocnicze ³	17% + 45% + 5% + 30% + 2% + 1%	75.47 (11.90 – 478.8) 0.7019	73.78 (3.562 – 1528) 0.2907	50.19 (6.503 – 387.3) 0.2873

¹ wszystkie substancje pomocnicze VAL: celuloza mikrokrystaliczna, sorbitol, węglan magnezu, powidon K25, przeżelowana skrobia kukurydziana, fumaran skrobiowo-sodowy, laurylosiarczan sodu, krospowidon, koloidalna krzemionka bezwodna;

² wszystkie substancje pomocnicze LOS-K: celuloza mikrokrystaliczna, mannitol, krospowidon, koloidalna krzemionka bezwodna, talk, stearynian magnezu;

³ wszystkie substancje pomocnicze TEL: mannitol, powidon K25, meglumina, wodorotlenek potasu, stearynian magnezu.

1.2.2.2.1. Ekotoksyczność mieszanin walsartanu z substancjami pomocniczymi

Eksperymentalne wartości ekotoksyczności dla mieszanin zawierających walsartan (VAL) przedstawiono w **Tabeli 23**. W **Tabeli 24** przedstawiono natomiast wartości $EC_{50, 30 \text{ min}}$ obliczone z wykorzystaniem modeli CA i IA wraz z obliczonymi współczynnikami MDR pozwalającymi na scharakteryzowanie występujących oddziaływań antagonistycznych, addytywnych względnie synergistycznych.

Tabela 24. Przewidywana toksyczność mieszanin VAL oraz substancji pomocniczych obecnych w formułacjach VAL obliczona z zastosowaniem modeli CA i IA wraz z wartościami MDR (odchylenie wartości eksperymentalnej od przewidywanej).

Mieszanka	$EC_{50, 30 \text{ min}}$ [mg/L]			MDR		Efekt przewidywany	
	Eksperymentalna	Model CA	Model IA	Model CA	Model IA	Model CA	Model IA
VAL + celuloza mikrokrystaliczna	307.9	216.0	114.1	0.70	0.37	addytywny	antagonistyczny
VAL + węglan magnezu	7855	133.8	16.54	0.02	0.002	antagonistyczny	antagonistyczny
VAL + powidon K25	1046	164.8	184.1	0.16	0.18	antagonistyczny	antagonistyczny
VAL + laurylosiarczan sodu	28.91	22.68	0.06	0.78	0.002	addytywny	antagonistyczny
VAL + krzemionka koloidalna	58.97	153.5	122.3	2.60	2.07	synergistyczny	synergistyczny
węglan magnezu + powidon K25	85.99	125.9	55.59	1.46	0.65	addytywny	addytywny
węglan magnezu + krzemionka koloidalna	71.10	78.33	18.11	1.10	0.25	addytywny	antagonistyczny
powidon K25 + krzemionka koloidalna	6199	1676	530.2	0.27	0.08	antagonistyczny	antagonistyczny
powidon K25 + krzemionka koloidalna + węglan magnezu	305.8	137.8	44.0	0.45	0.14	antagonistyczny	antagonistyczny
VAL + powidon K25 + krzemionka koloidalna	163.8	167.8	155.17	1.02	0.95	addytywny	addytywny

Klasyfikacja efektów: synergistyczne ($MDR \geq 2$), addytywne ($0.5 < MDR < 2$), antagonistyczne ($MDR \leq 0.5$).

Przebadano 5 dwuskładnikowych mieszanin VAL z substancjami pomocniczymi występującymi w formulacji farmaceutycznej Valtap. Obliczenia prowadzone z wykorzystaniem zarówno modelu CA jak i IA wskazują na występowanie synergistycznych efektów w mieszaninie VAL z krzemionką koloidalną. Jest to jedyna dwuskładnikowa mieszanina VAL, w której zidentyfikowano oddziaływania tego typu, sprawiające, że eksperymentalna toksyczność mieszaniny ($EC_{50, 30 \text{ min}} = 56.97 \text{ mg/L}$) jest mniejsza od przewidywanej toksyczności ($EC_{50, 30 \text{ min}} = 153.5 \text{ mg/L}$ (CA); 122.3 mg/L (IA)). Warto przypomnieć, że wartości $EC_{50, 30 \text{ min}}$ dla pojedynczych składników tej mieszaniny, VAL i krzemionki koloidalnej wynoszą odpowiednio: 150.5 mg/L (**Tabela 18**) oraz 2681 mg/L (**Tabela 21**). Znając właściwości fizykochemiczne obu substancji podejrzewać można, że obecność krzemionki koloidalnej o właściwościach hydrofilowych powoduje zmniejszenie hydrofobowości VAL oraz ułatwienie wniknięcia do komórek bakteryjnych. Chcąc sprawdzić czy krzemionka koloidalna wykazuje synergizm działania z innymi składnikami tabletki, zbadano ekotoksyczność dwuskładnikowych mieszanin krzemionki koloidalnej z węglanem magnezu oraz powidonem K25. Otrzymane wyniki wskazują na antagonistyczne interakcje w mieszaninie krzemionki z powidonem K25 oraz addytywne/antagonistyczne interakcje w mieszaninie z węglanem magnezu (w tym przypadku, zastosowane modele CA i IA wskazują na inne efekty). Można podejrzewać, że znaczące obniżenie toksyczności mieszaniny krzemionki z powidonem K25 w stosunku do wartości przewidywanych spowodowane jest tworzeniem aglomeratów – zarówno krzemionka, jak i polimeryczny powidon K25 posiadają takie tendencje. Fakt tworzenia aglomeratów i występowanie oddziaływań van der Waalsa w polimerowych dyspersjach krzemionki potwierdzono w literaturze naukowej stwierdzając, że jest to utrudnienie ograniczające zastosowanie SiO_2 . [280, 281] Co ciekawe, te antagonistyczne oddziaływania są również obserwowane w mieszaninie trójskładnikowej powidon K25 + krzemionka koloidalna + węglan magnezu, co również można wytłumaczyć aglomeracją składników, która powoduje ich mniejszą dostępność dla bakterii. Efekt ten jest bardziej widoczny w mieszaninie dwuskładnikowej (bez węglanu magnezu), gdzie wartość eksperymentalna $EC_{50, 30 \text{ min}}$ jest 4-11 razy większa od wartości przewidywanej, niż w mieszaninie trójskładnikowej, gdzie wartość eksperymentalna $EC_{50, 30 \text{ min}}$ jest 2-7 razy większa od wartości przewidywanej. Co ciekawe, synergizm działania VAL i krzemionki koloidalnej nie jest zauważalny w trójskładnikowej mieszaninie VAL + powidon K25 +

krzemionka koloidalna. W tym przypadku, można podejrzewać, że synergistyczny efekt działania VAL z krzemionką znosi się z antagonistycznym efektem występującym między powidonem K25, a krzemionką – w wyniku czego, w trójskładnikowej mieszance obserwujemy efekt addytywny.

W dwuskładnikowych mieszaninach VAL z celulozą mikrokrystaliczną i laurylosiarczanem sodu obserwuje się addytywne działanie składników – w tym przypadku model CA pozwolił na precyzyjne określenie toksyczności mieszanin. W obydwóch przypadkach model IA znacząco zaniża przewidywane wartości toksyczności, stąd wskazuje on na antagonistyczne efekty.

Zarówno model CA, jak i IA pozwoliły na stwierdzenie występowania efektów antagonistycznych w mieszaninach VAL z węglanem magnezu oraz powidonem K25. Eksperymentalne wartości EC_{50} mieszanin są znacznie wyższe, niż te obliczone z wykorzystaniem w/w modeli, co wskazuje na fakt występowania oddziaływań powodujących zmniejszenie faktycznej toksyczności mieszaniny. Efekt ten jest mocno zauważalny w przypadku mieszaniny VAL + węglan magnezu, gdzie toksyczność eksperymentalna jest 59 razy mniejsza od wartości przewidywanej z wykorzystaniem modelu CA, który uznano za bardziej zbliżony z wynikami eksperymentalnymi. Efekt ten może być wytłumaczony zmianą pH badanej mieszaniny – VAL jest związkiem o charakterze kwasowym, natomiast węglan magnezu związkiem o charakterze zasadowym. W wyniku połączenia tych związków otrzymano mieszaninę o pH zbliżonym do neutralnego, mniej szkodliwym dla bakterii *A. fischeri* (**Tabela S5, materiały dodatkowe**).

Generalnie można zauważyć, że w przypadku VAL, wartości EC_{50} przewidywane z wykorzystaniem modelu IA są o wiele niższe, niż wartości eksperymentalne. Stąd obliczone wartości MDR dla modelu IA częściej wskazują na występowanie efektów antagonistycznych.

1.2.2.2.2. Ekotoksyczność mieszanin losartanu z substancjami pomocniczymi

Eksperymentalne wartości ekotoksyczności dla mieszanin LOS-K przedstawiono w **Tabeli 23**. W **Tabeli 25** przedstawiono natomiast wartości $EC_{50, 30 \text{ min}}$ obliczone z wykorzystaniem modeli CA i IA wraz z współczynnikami MDR.

Tabela 25. Przewidywana toksyczność mieszanin LOS-K obliczona z zastosowaniem modeli CA i IA wraz z wartościami MDR (odchylenie wartości eksperymetalnej od przewidywanej).

Mieszanina	$EC_{50, 30 \text{ min}}$ [mg/L]			MDR		Efekt przewidywany	
	Eksperymentalna	Model CA	Model IA	Model CA	Model IA	Model CA	Model IA
LOS-K + celuloza mikrokrystaliczna	771.6	584.1	167.3	0.76	0.22	addytywny	antagonistyczny
LOS-K + mannitol	546.6	481.2	197.5	0.88	0.36	addytywny	antagonistyczny
LOS-K + krzemionka koloidalna	278.8	287.0	143.7	1.03	0.52	addytywny	addytywny
LOS-K + talk	260.3	281.7	46.61	1.08	0.18	addytywny	antagonistyczny

Klasyfikacja efektów: synergistyczne ($MDR \geq 2$), addytywne ($0.5 < MDR < 2$), antagonistyczne ($MDR \leq 0.5$).

W przypadku LOS-K przebadano 4 mieszaniny dwuskładnikowe z różnymi substancjami pomocniczymi. Mniejsza ilość mieszanin niż w przypadku VAL wynika z faktu, że formuacja farmaceutyczna Lozap (substancja czynna: LOS-K) zawierała mniejszą ilość substancji pomocniczych, niż np. formuacja Valtap (substancja czynna: VAL). Co ciekawe, według założeń modelu CA, wszystkie mieszaniny LOS-K wykazywały efekt addytywny, tj. nie obserwowano zwiększenia, ani zmniejszenia toksyczności mieszaniny względem oczekiwanej wartości. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że LOS-K, jako jedyny badany ARBs występuje w postaci soli potasowej, przez co charakteryzuje się lepszą rozpuszczalnością i mniejszą hydrofobowością, stąd wprowadzenie drugiego związku nie zmienia znacząco toksyczności, ani dostępności LOS-K dla bakterii.

Podobnie jak w przypadku mieszanin VAL, również dla serii mieszanin LOS-K, wartości przewidywane z wykorzystaniem modelu IA są znacznie niższe, niż wartości eksperymetalne, co sugeruje występowanie efektów antagonistycznych.

1.2.2.2.3. Ekotoksyczność mieszanin telmisartanu z substancjami pomocniczymi

Eksperymentalne wartości ekotoksyczności dla mieszanin TEL przedstawiono w **Tabeli 23**. W **Tabeli 26** przedstawiono natomiast wartości $EC_{50, 30 \text{ min}}$ obliczone z wykorzystaniem modeli CA i IA wraz ze współczynnikami MDR.

Tabela 26. Przewidywana toksyczność mieszanin TEL oraz substancji pomocniczych obecnych w formulacji TEL obliczona z zastosowaniem modeli CA i IA wraz z wartościami MDR (odchylenie wartości eksperymentalnej od przewidywanej).

Mieszanina	$EC_{50, 30 \text{ min}}$ [mg/L]			MDR		Efekt przewidywany	
	Eksperymentalna	Model CA	Model IA	Model CA	Model IA	Model CA	Model IA
TEL + mannitol	15401	269.01	2.02	0.02	0.0001	antagonistyczny	antagonistyczny
TEL + powidon K25	4566	98.61	64.81	0.02	0.01	antagonistyczny	antagonistyczny
TEL + meglumina	48.05	24.97	0.54	0.52	0.01	addytywny	antagonistyczny
mannitol + powidon K25	34 023*	3626.35	815.81	0.11	0.02	antagonistyczny	antagonistyczny
mannitol + meglumina	73.14	44.84	17.97	0.61	0.25	addytywny	antagonistyczny
meglumina + powidon K25	1.011	21.02	41.71	20.79	41.26	synergistyczny	synergistyczny

Klasyfikacja efektów: synergistyczne ($MDR \geq 2$), addytywne ($0.5 < MDR < 2$), antagonistyczne ($MDR \leq 0.5$).

* próbka charakteryzująca się brakiem toksyczności przy czasie ekspozycji 30 minut – przedstawiono wartość $EC_{50, 15 \text{ min}}$

W przypadku TEL przebadano ekotoksyczność trzech dwuskładnikowych mieszanin TEL + substancja pomocnicza. Zarówno model CA, jak i IA pozwalają na zidentyfikowanie efektów antagonistycznych w mieszaninach TEL z mannitolem oraz powidonem K25. Obserwowana toksyczność tych mieszanin jest, odpowiednio, 57 i 46 razy mniejsza, niż ta przewidywana z wykorzystaniem modelu CA. Różnice między toksycznością eksperymentalną, a przewidywaną są jeszcze większa w przypadku obliczeń z zastosowaniem modelu IA i wynoszą one, odpowiednio, 7700 oraz 70 – przewidywane wartości EC_{50} z zastosowaniem tego modelu, ponownie są znacząco niższe. Podobnie jak w przypadku VAL, TEL również wykazuje efekt antagonistyczny w połączeniu z powidonem K25, prawdopodobnie z tego samego powodu, tj. tworzenia aglomeratów utrudniających dostępność TEL dla bakterii. Zarówno TEL, jak i VAL posiadają w swojej strukturze ugrupowania hydroksylowe, które mogą oddziaływać z grupami karbonyłowymi powidonu K25, ułatwiając agregację – tego typu oddziaływania są znane dla powidonu i polifenoli. [282] Zaskakująca jest wysoka eksperymentalna wartość EC_{50} dla mieszaniny TEL z mannitolem. Podczas gdy, wartości $EC_{50, 30 \text{ min}}$ pojedynczych składników wynoszą: 77.31 mg/L (TEL, **Tabela 18**) oraz 4253 mg/L

(mannitol, **Tabela 19**), ich mieszanina charakteryzuje się wartością 15 401 mg/L (**Tabela 23**) – zauważalne są efekty antagonistyczne występujące między TEL, a mannitolem, który uważany jest jako składnik zupełnie inertny w stosunku do API. ^[283] Antagonistyczny efekt obserwowany jest również w mieszaninie mannitolu z powidonem K25 (**Tabela 26**).

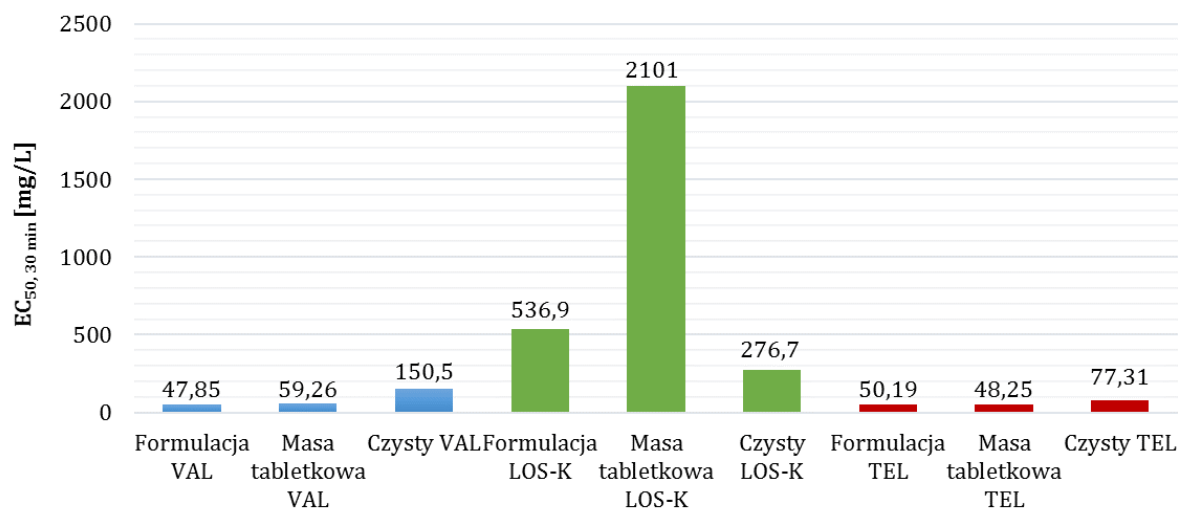
W mieszaninach zawierających megluminę (TEL + meglumina, mannitol + meglumina), wg obliczeń z zastosowaniem modelu CA nie obserwuje się występowania efektów antagonistycznych/synergistycznych. Natomiast w mieszaninie dwóch substancji pomocniczych meglumina + powidon K25 obserwuje się silnie synergistyczne oddziaływania (ponownie model IA przeszacowuje przewidywane wartości). Efekt ten można tłumaczyć zmianą pH mieszaniny w stosunku do wartości pH pojedynczych substancji (**Tabela S5, materiały dodatkowe**). Meglumina jest związkiem zasadowym o dużej toksyczności w stosunku do bakterii *A. fischeri*. Powidon K25 (zaw. 5% w mieszaninie) jest związkiem słabo toksycznym o kwasowym pH wynoszącym ok. 4. W badanej mieszaninie ilościowo przeważa meglumina (zaw. 30% w mieszaninie) o pH blisko 11, stąd pH mieszaniny wykazuje dość silny charakter zasadowy, który powoduje zmiany strukturalne w powidonie K25, przyczyniając się do jego mniejszej rozpuszczalności, a zatem wkład powidonu K25 w ostateczną toksyczność mieszaniny jest nieznaczny.^[284]

Podsumowując, dla wszystkich badanych mieszanin ARBs (VAL, LOS-K, TEL) zastosowanie modelu CA pozwoliło na obliczenie toksyczności mieszanin z większą dokładnością, model IA znacząco zawyżał lub zaniżał przewidywane wartości toksyczności. To samo dotyczy mieszanin substancji pomocniczych, gdzie toksyczności przewidywane z wykorzystaniem modelu IA były znacząco przeszacowane. Podobne wyniki otrzymano w innych badaniach mieszanin leków wobec bakterii *A. fischeri*, gdzie stwierdzono, że model CA daje bliższe prognozy toksyczności i powinien być zalecany do modelowania toksyczności mieszanin leków o odmiennym działaniu. ^[285] Jednakże, dokładność predykcji zastosowanych modeli zależy od rodzaju badanych substancji i może zdarzyć się, że ani model CA, ani IA nie pozwoli na dokładne przewidzenie toksyczności mieszaniny. ^[286] Warto przypomnieć, że model IA został stworzony dla mieszanin związków chemicznych, które mają inne cele molekularne, podczas gdy

model CA dla mieszanin związków działających wg podobnego mechanizmu. Można podejrzewać, że w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem bakterii *A. fisheri* cele molekularne badanych leków ujednolicają się i ich mechanizmy toksycznego działania są podobne, zwykle skupione na błonie bakteryjnej – stąd obserwowana jest wyższa precyzja związana z modelem CA.

1.2.2.2.2.4. Ekotoksyczność mieszanin wieloskładnikowych

Dla wszystkich ARBs zbadano ekotoksyczność wieloskładnikowych mieszanin mających odzwierciedlać ich faktyczną formułę farmaceutyczną, tj. sporządzono mieszaninę wszystkich substancji wypełniających (ekotoksyczność samej wypełniającej masy tabletkowej) oraz tą samą mieszaninę z dodatkiem API (ekotoksyczność całej tabletki) (**Tabela 23**). Wyniki przedstawiono graficznie na **Rys. 22**. Zauważyć można tendencję, która już wcześniej była obserwowana w badaniach przedstawionych w CZĘŚCI I (**podrozdział 1.2.2.1, Rys. 20, Tabela 19**) – w przypadku VAL formuła farmaceutyczna (substancje pomocnicze + VAL) charakteryzuje się większą toksycznością, niż czysty VAL. Odwrotną zależność i większą toksyczność API w stosunku do formuły farmaceutycznej obserwuje się w przypadku LOS-K i TEL. Wynika to z różnego składu badanych formuły. Różnica między toksycznością całej formuły farmaceutycznej, a jej wypełniającą masą tabletkową (mieszaniną substancji pomocniczych) była znacząca w przypadku badań opisanych w CZĘŚCI I (**Rys. 20**). W przypadku formuły otrzymanych poprzez zmieszanie poszczególnych substancji pomocniczych różnice te są nieznaczne, zauważalne głównie w przypadku LOS-K (**Rys. 22**). Warto zauważyć, że toksyczność formuły farmaceutycznych otrzymanych poprzez zmieszanie poszczególnych substancji pomocniczych (zarówno z, jak i bez API) nie jest identyczna z wartościami otrzymanymi dla komercyjnych formuły w CZĘŚCI I. Najprawdopodobniej wynika to z faktu niemożliwego do odtworzenia składu poszczególnych formuły farmaceutycznych – mimo, iż znany jest skład jakościowy preparatu farmaceutycznego, dokładne ilości stosowanych składników pomocniczych są tajemnicą producenta.



Rys. 22. Porównanie ekotoksyczności wobec *A. fischeri* całej formulacji farmaceutycznej zawierającej dany składnik API (otrzymanej poprzez zmieszanie poszczególnych substancji pomocniczych z API) z toksycznością samej masy tabletkowej (mieszanki substancji pomocniczych bez API) oraz czystą API.

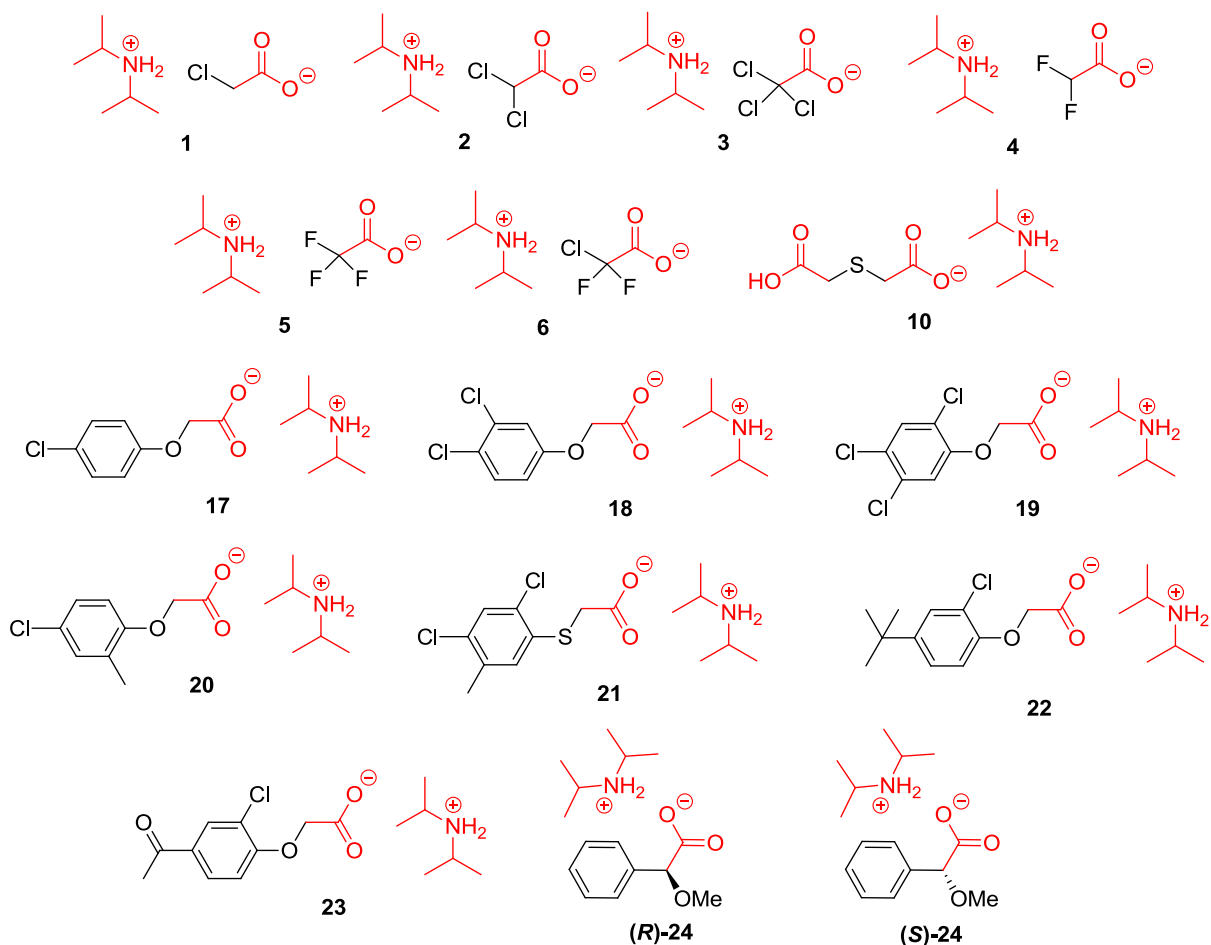
Wnioski do podrozdziału 1.2.2.2.:

- ✓ Wykazano dużą ekotoksyczność niektórych substancji pomocniczych stosowanych w komercyjnych formulacjach farmaceutycznych, tj. laurylosiarczanu sodu, megluminy i węgla magnezu.
- ✓ Toksyczność SiO₂ zależy zarówno od wielkości cząstek, jak i jej formy komercyjnej. Podobnie, toksyczność powidonów związana jest z ich usieciowaniem i stopniem polimeryzacji.
- ✓ Wykazano istnienie szeregu efektów antagonistycznych i synergistycznych w badanych mieszaninach, m.in. efekt synergistyczny między VAL, a krzemionką koloidalną oraz meglumina i powidonem K25.
- ✓ Model CA pozwala na przewidywanie ekotoksyczności mieszanin z większą precyzją, niż model IA. Wyniki otrzymane z zastosowaniem modelu IA były przeszacowane, jednak nierzadko przewidywany efekt był zgodny z tym przewidywanym modelem CA.

2. METODY QSAR W OCENIE RYZYKA ŚRODOWISKOWEGO

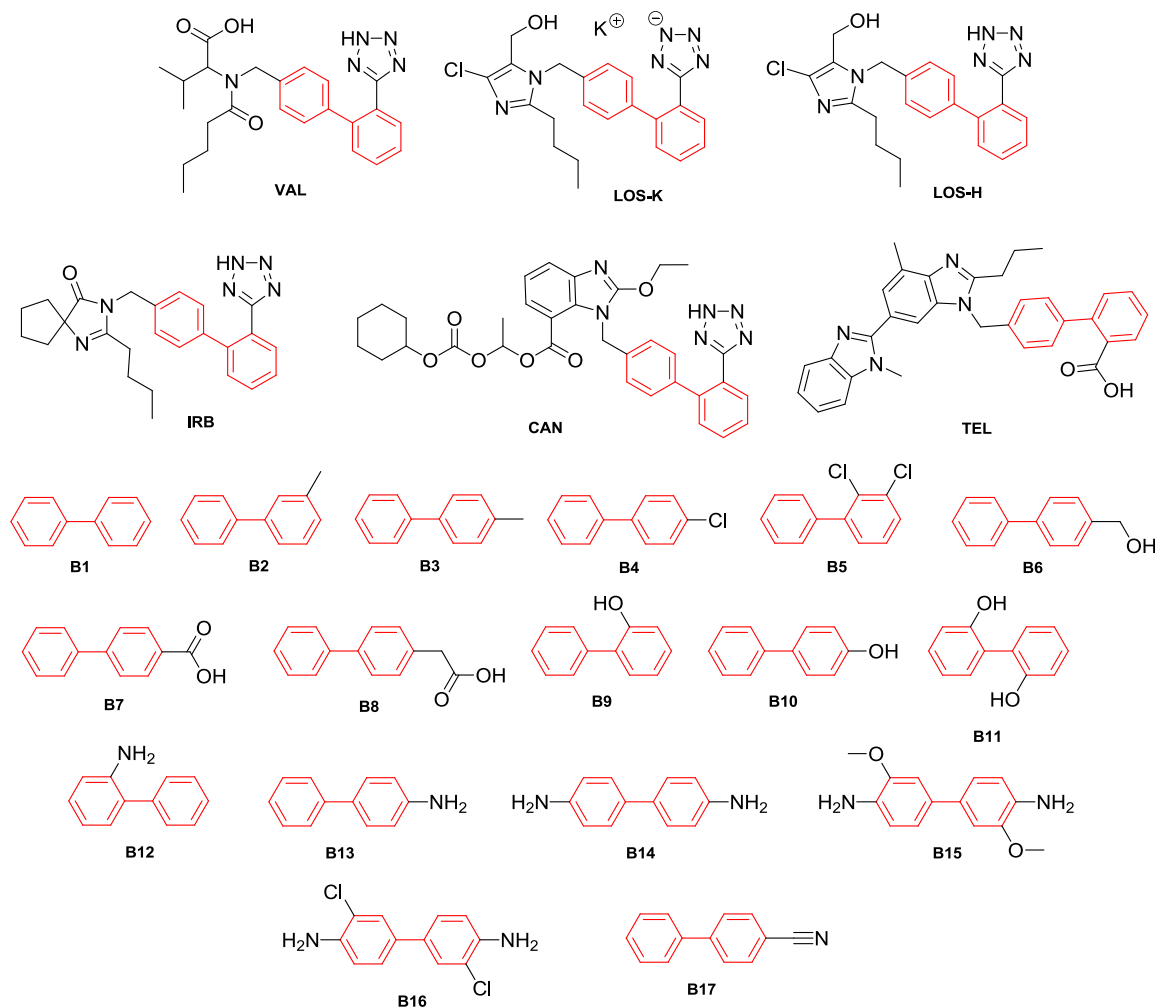
W ramach niniejszej pracy podjęto próbę korelacji wartości EC₅₀ uzyskanych w wyniku badań toksyczności wobec bakterii *A. fischeri* z deskryptorami dwóch grup związków wymienionych poniżej. W przypadku grupy amoniowych cieczy jonowych, które są związkami o charakterze herbicydowym, opracowanie odpowiedniego modelu QSAR da możliwość projektowania jonowych związków herbicydowych o małej ekotoksyczności wobec organizmów wodnych, a zatem bezpieczniejszych dla środowiska. Z kolei, opracowanie modelu QSAR dla grupy ARBs i pochodnych bifenylowych pozwoli na wczesną ocenę ryzyka środowiskowego związaną z obecnością tych związków oraz ich pochodnych/metabolitów w ekosystemie.

1.) Grupa amoniowych cieczy jonowych obejmuje 16 związków, których cechą wspólną jest posiadanie kationu diizopropylamoniowego oraz anionu w postaci kwasu karboksylowego. Ich ekotoksyczność wobec bakterii *A. fischeri* została zbadana i opisana w **podrozdziale 1.1.2. Badań własnych** niniejszej dysertacji. W skład badanej grupy wchodzi: halogenooctany (**1-6**), 2,2'-tiodioctan (**10**), fenoksyoctany i fenylotiooctan (**17-23**) oraz optycznie czynne metoksyfenylooctany (**(R)-24, (S)-24**) (**Rys. 23**).



Rys. 23. Struktury chemiczne związków z grupy amoniowych cieczy jonowych.
Na czerwono zaznaczono wspólne elementy strukturalne.

2.) Grupa antagonistów receptora angiotensyny II (ARBs) i ich prostych analogów strukturalnych obejmuje 6 związków z grupy ARBs (**VAL, LOS-K, LOS-H, IRB, CAN, TEL**) oraz 17 związków z grupy bifenyli (**B1-B17**) (**Rys. 24**), które zostały wybrane ze względu na podobieństwo strukturalne do ARBs, a mianowicie obecność w cząsteczce szkieletu bifenylowego. Ekotoksyczność wobec bakterii *A. fischeri* dla związków z grupy ARBs została zbadana i opisana w **podrozdziale 1.2.2.1.1. Badań własnych** niniejszej dysertacji, natomiast w przypadku związków z grupy bifenyli jej wartości zostały zaczerpnięte z pracy opublikowanej przez Kaisera i Palabrice w 1991 roku. [287]



Rys. 24. Struktury chemiczne związków z grupy ARBs oraz bifenyli. Na czerwono zaznaczono wspólne elementy strukturalne.

Konieczne z punktu widzenia konstrukcji równań QSAR deskryptory elektronowe, termodynamiczne oraz strukturalne zostały obliczone dla powyższych związków z wykorzystaniem programów: Gaussian 09 [288], ACD/Labs Percepta 14.0.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Ontario, Canada), OECD QSAR Toolbox 4.5 (OECD, Francja; ECHA, Finlandia; LMC, Bułgaria). W przypadku amoniowych cieczy jonowych, obliczenia prowadzono dla anionów, z wyjątkiem obliczeń prowadzonych w programie ACD/Labs Percepta, gdzie ze względu na ograniczenia programu, obliczenia prowadzono dla anionu w formie sprotonowanej.

W celu wyznaczenia współczynników równań QSAR posłużono się oprogramowaniem Statistica wersja 5.0.96. (StatSoft Polska Sp. z o. o. 2022). Współczynniki modelu zostały oszacowane za pomocą zbioru uczącego stanowiącego ok. 85% związków z badanej grupy, z wykorzystaniem algorytmu krokowej regresji

wielorakiej (analizy krokowej postępującej). Regresja krokowa postępująca pozwala na oszacowanie zależności regresyjnej metodą regresji krokowej z dołączaniem zmiennych. Zmienne niezależne są wprowadzane lub usuwane z zależności krok po kroku, aż do otrzymania zależności zawierającej tylko zmienne niezależne istotnie wpływające na zmienną zależną. Zbiór testowy, który służył walidacji otrzymanego równania QSAR stanowiło pozostałe 15% związków z badanej grupy.

Jak wspomniano w **podrozdziale 3.2. Części literaturowej**, ważne jest odróżnienie stężenia nominalnego od stężenia swobodnego badanego związku. To podejście jest szczególnie istotne dla związków hydrofobowych o wartości logP powyżej 5.0. W przypadku badanych amoniowych cieczy jonowych wartości logP mieszczą się w zakresie od -0.23 do 4.04, natomiast w przypadku grupy ARBs i bifenyli tylko trzy spośród 23 badanych związków przekraczają wartość 5.0, pozostałe wartości logP mieszczą się w zakresie 1.47-4.61. W związku z powyższym, do skonstruowania modeli QSAR wykorzystano nominalne stężenia EC₅₀ wyznaczone w toku badań eksperymentalnych.

2.1. Amoniowe cieczy jonowe

Schemat procedury postępowania w celu wyznaczenia równania QSAR dla grupy amoniowych cieczy jonowych przedstawiono na **Rys. 25**. Jako zmienną zależną przyjęto eksperymentalnie wyznaczoną wartość EC_{50, 15 min} wobec bakterii *A. fischeri*, wyrażoną w postaci logarytmicznej. Jako zestaw zmiennych niezależnych użyto łącznie 18 deskryptorów, spośród których wymienić można następujące deskryptory (**Tabela 27**):

- elektronowe: μ , E_{HOMO}, E_{LUMO}, GAP, ZPVE, E_{Therm}, E_{Tot}, α , χ ;
- termodynamiczne (fizykochemiczne): logP, MR, Hansch, ΔH_f , S⁰, pKa;
- strukturalne (geometryczne): V, d, VdWS.

Otrzymane równanie przedstawiono poniżej:

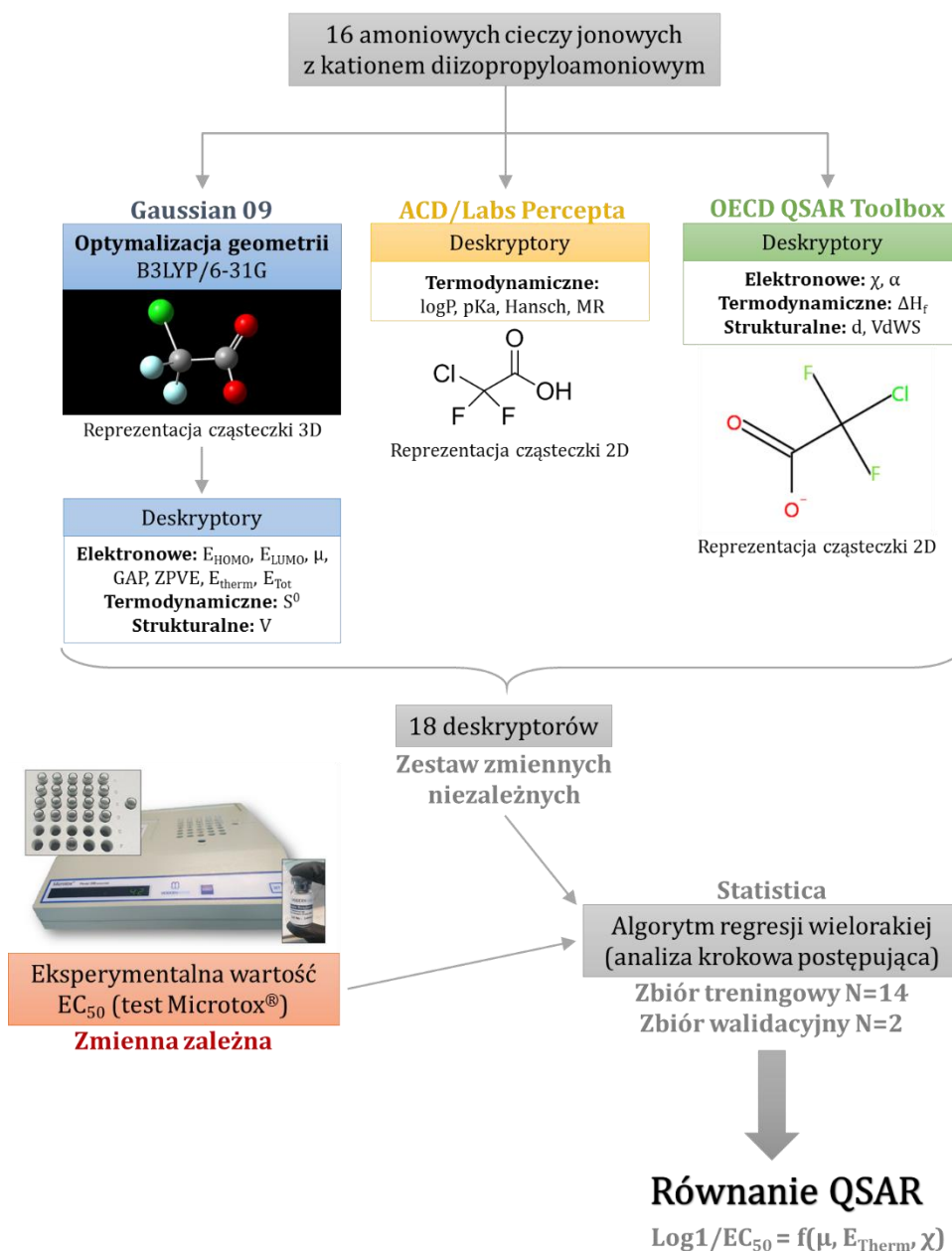
$$\log 1/EC_{50} = (9.63 \pm 3.16) + (0.209 \pm 0.058) \cdot \mu - (0.029 \pm 0.009) \cdot E_{Therm} + (1.288 \pm 0.495) \cdot \chi \quad (1.)$$

p = 0.005 p = 0.007 p = 0.026

n = 14, R = 0.87, R² = 0.75, F = 10.283, p < 0.002, błąd std. estymacji = 0.568

Równanie (1.) koreluje z wartością log₁/EC₅₀ następujące deskryptory: moment dipolowy, energię termiczną oraz elektroujemność. Kwadrat współczynnika korelacji

R^2 jest satysfakcjonujący, biorąc pod uwagę małą ilość badanych przypadków. Obliczona wartość statystyki $F = 10.283$ przekracza wartość krytyczną $F_{0.05, 3, 10} = 3.71$ [289], przy poziomie istotności $\alpha = 0.05$, stąd można dowiedzieć, że zależność między \log_1/EC_{50} , a deskryptorami zawartymi w równaniu (1.) jest statystycznie istotna.



Rys. 25. Schemat procedury postępowania w celu wyznaczenia równania QSAR dla grupy amoniowych cieczy jonowych.

Na Rys. 26 przedstawiono wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem wartości przewidywanych modelem opisanym za pomocą równania (1.). Opracowane

Tabela 27. Deskryptory molekularne obliczone dla grupy amoniowych cieczy jonowych.

Związek	log 1/EC ₅₀ mol/L	Gaussian 09									ACD/Labs Percepta 14.0.0.				QSAR Toolbox 4.5				
		V	E _{HOMO}	E _{LUMO}	GAP	μ	ZPVE	S°	E _{Therm}	E _{Tot}	logP	pKa	Hansch	MR	ΔH _f	d	χ	VdWS	α
		cm ³ / mol	eV			D	kcal/ mol	cal/ mol/K	kcal/ mol	Hartree	-				kcal/m ol	Å	eV	Å ²	m ³
1	3.12	50.62	-1.09	4.41	5.50	4.65	24.75	75.44	28.04	-688.02	0.20	2.6	0.27	10.51	-101	5.56	-5.60	90.1	0.209
2	1.26	86.40	-1.66	3.06	4.71	5.21	18.66	84.12	22.68	-1147.60	0.89	1.4	0.43	15.31	-102	6.16	-5.99	108	0.224
3	1.69	89.33	-2.20	1.98	4.18	4.95	11.88	90.94	16.73	-1607.17	1.52	0.1	1.12	20.17	-100	6.34	-6.43	121	0.241
4	2.93	51.60	-0.99	5.45	6.45	4.64	20.97	78.03	24.46	-426.87	0.12	1.3	0.37	5.94	-194	5.25	-5.84	86.8	0.194
5	0.88	56.60	-1.43	5.19	6.62	4.56	15.52	82.23	19.43	-526.10	0.66	0	0.57	6.11	-234	5.27	-6.34	89.4	0.200
6	1.93	60.03	-1.84	3.55	5.39	4.53	14.15	85.72	18.41	-886.46	0.89	0.2	1.17	10.80	-187	5.74	-6.58	102	0.218
10	34.00	86.94	-1.20	2.14	3.34	11.49	57.97	97.02	63.68	-854.40	-0.23	3.3	-0.12	24.48	-186	6.29	-4.89	149	0.422
17	160.8	137.77	-1.02	2.26	3.29	14.86	78.49	106.60	85.25	-994.20	1.94	3.1	2.26	36.80	-109	6.94	-4.75	180	0.585
18	104.7	145.58	-1.19	1.72	2.92	15.75	72.30	113.60	79.85	-1453.77	2.87	3.0	2.96	41.70	-113	7.60	-4.97	196	0.601
19	52.27	137.90	-1.77	1.82	3.59	11.87	66.12	119.01	74.40	-1913.35	3.49	2.9	3.44	46.59	-117	8.36	-5.16	212	0.606
20	176.2	152.88	-1.05	2.44	3.49	14.28	95.97	115.92	103.84	-1033.51	2.55	3.1	2.72	41.63	-111	7.74	-4.91	199	0.670
21	33.75	159.65	-1.30	1.79	3.09	17.38	87.71	125.46	96.81	-1816.06	4.04	3.6	3.83	52.65	-79.5	8.21	-4.91	224	0.712
22	68.18	163.37	-0.80	2.74	3.55	21.08	155.87	124.82	165.25	-691.83	3.03	3.1	3.26	50.29	-120	7.09	-4.52	246	0.875
23	144.9	155.21	-1.13	1.03	2.16	15.64	108.38	116.73	116.51	-687.23	1.05	3.0	1.18	41.93	-139	7.00	-5.14	207	0.727
(R)-24	3807	137.62	-0.85	3.23	4.09	10.78	102.31	105.51	109.20	-573.91	1.84	4.3	1.73	36.53	-108	7.56	-4.82	184	0.649
(S)-24	4883	112.04	-0.95	3.35	4.30	8.09	102.46	106.37	109.39	-573.92	1.84	4.3	1.73	36.53	-109	7.57	-4.82	183	0.651

V – objętość molowa;

E_{HOMO}, E_{LUMO} – energia najwyższego obsadzonego orbitala molekularnego (HOMO) i najniższego nieobsadzonego orbitala molekularnego (LUMO);

GAP – różnica pomiędzy energiami HOMO i LUMO (przerwa energetyczna);

μ – moment dipolowy;

ZPVE – energia wibracyjna punktu zerowego, różnica energii pomiędzy najniższym punktem na powierzchni energii potencjalnej (PES), a energią bezwibracyjnego poziomu energii;

S° - entropia;

E_{Therm} – energia termiczna;

E_{Tot} – energia całkowita;

logP – współczynnik podziału n-oktanol/woda;

pKa – ujemny logarytm dziesiętny ze stałej dysocjacji;

Hansch – stała Hanscha opisująca wartość logP przy wykorzystaniu wartości cząstkowych logP fragmentów molekularnych;

MR – refrakcja molowa;

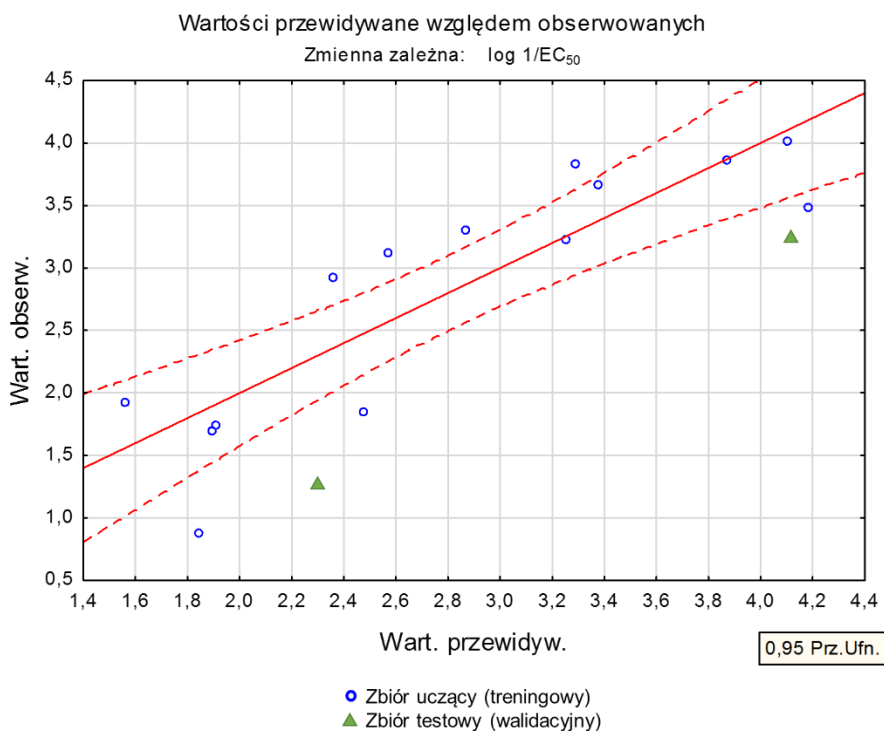
ΔH_f – ciepło tworzenia;

d – efektywna średnica cząsteczki;

χ – elektroujemność;

VdWS – powierzchnia van der Waalsa;

α – objętościowa polaryzowalność cząsteczkowa.



Rys. 26. Wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem wartości przewidywanych modelem opisanym za pomocą równania (1.) przedstawiony dla zbioru uczącego i testowego.

równanie QSAR dostatecznie pozwala na przewidywanie ekotoksyczności wobec bakterii *A. fischeri* amoniowych cieczy jonowych posiadających kation diizopropylamoniowy i może zostać wykorzystane do projektowania nowych, bezpieczniejszych dla środowiska cieczy jonowych posiadających w strukturze ten kation i anion będący pochodną kwasu karboksylowego, szczególnie kwasu octowego i fenoksyoctowego.

Według wyprowadzonego równania QSAR (1.), ekotoksyczność cieczy jonowych z kationem diizopropylamoniowym wobec bakterii *A. fischeri* zależy od momentu dipolowego (μ), energii termicznej (E_{Therm}) oraz elektroujemności (χ) anionu. Moment dipolowy opisuje zdolność cząsteczki do orientacji w zewnętrznym polu elektrycznym i jest wielkością wektorową charakteryzującą dipol elektryczny. W wyprowadzonym modelu QSAR (1.) obserwuje się dodatni współczynnik deskryptora μ , a więc wraz ze wzrostem momentu dipolowego wzrasta wartość $\log 1/EC_{50}$ (wzrasta toksyczność związku). Taką samą zależność opisano w modelu QSAR dotyczącym ekotoksyczności wobec organizmu *D. magna* dla zbioru 24 cieczy jonowych. ^[55] Korelację momentu dipolowego z toksycznością wobec organizmów wodnych można wytłumaczyć faktem, że wraz ze wzrostem momentu dipolowego wzrasta intensywność oddziaływań

międzycząsteczkowych, a co z tym związane, także oddziaływać np. z błoną komórkową bakterii *A. fischeri*. [290, 291] Podobnie jak w przypadku momentu dipolowego, równanie (1.) wskazuje, że wraz ze wzrostem elektroujemności (χ) wzrasta toksyczność cieczy jonowych wobec *A. fischeri*. Elektroujemność definiowana jest jako tendencja do przyciągania elektronów, stąd można podejrzewać, że podobnie jak w przypadku momentu dipolowego – im większa elektroujemność, tym większe prawdopodobieństwo wystąpienia interakcji z ujemnie naładowaną błoną bakterii *A. fischeri*, a zatem większa toksyczność badanego związku. Jedynym deskrytorem negatywnie korelującym z $\log 1/EC_{50}$ w równaniu (1.) jest energia termiczna – wraz z jej wzrostem maleje toksyczność związku. Zależność ta jest zgodna z literaturą, w której wraz ze wzrostem energii (całkowitej, elektronowej) maleje aktywność biologiczna badanych związków. [55, 292]

2.2. Antagonisty receptora angiotensyny II

Schemat procedury postępowania w celu wyznaczenia równania QSAR dla grupy antagonistów receptora angiotensyny i ich prostych analogów bifenyłowych przedstawiono na **Rys. 27**. Jako zmienną zależną przyjęto eksperymentalnie wyznaczoną wartość $EC_{50, 15 \text{ min}}$ wobec bakterii *A. fischeri*, wyrażoną w postaci logarytmicznej. W przypadku związku **B1**, ze względu na brak literaturowej wartości EC_{50} po 15 minutach ekspozycji, wykorzystano wartość po 30 minutach ekspozycji. Jako zestaw zmiennych niezależnych użyto 14 deskryptorów z następujących grup (**Tabela 28**):

- elektronowych: μ , E_{HOMO} , E_{LUMO} , GAP, ZPVE, E_{Therm} , E_{Tot} , α ;
- termodynamicznych (fizykochemicznych): $\log P$, MR, S^0 , $\log S_0$, $\log P_{o/w}$;
- strukturalnych (geometrycznych): V.

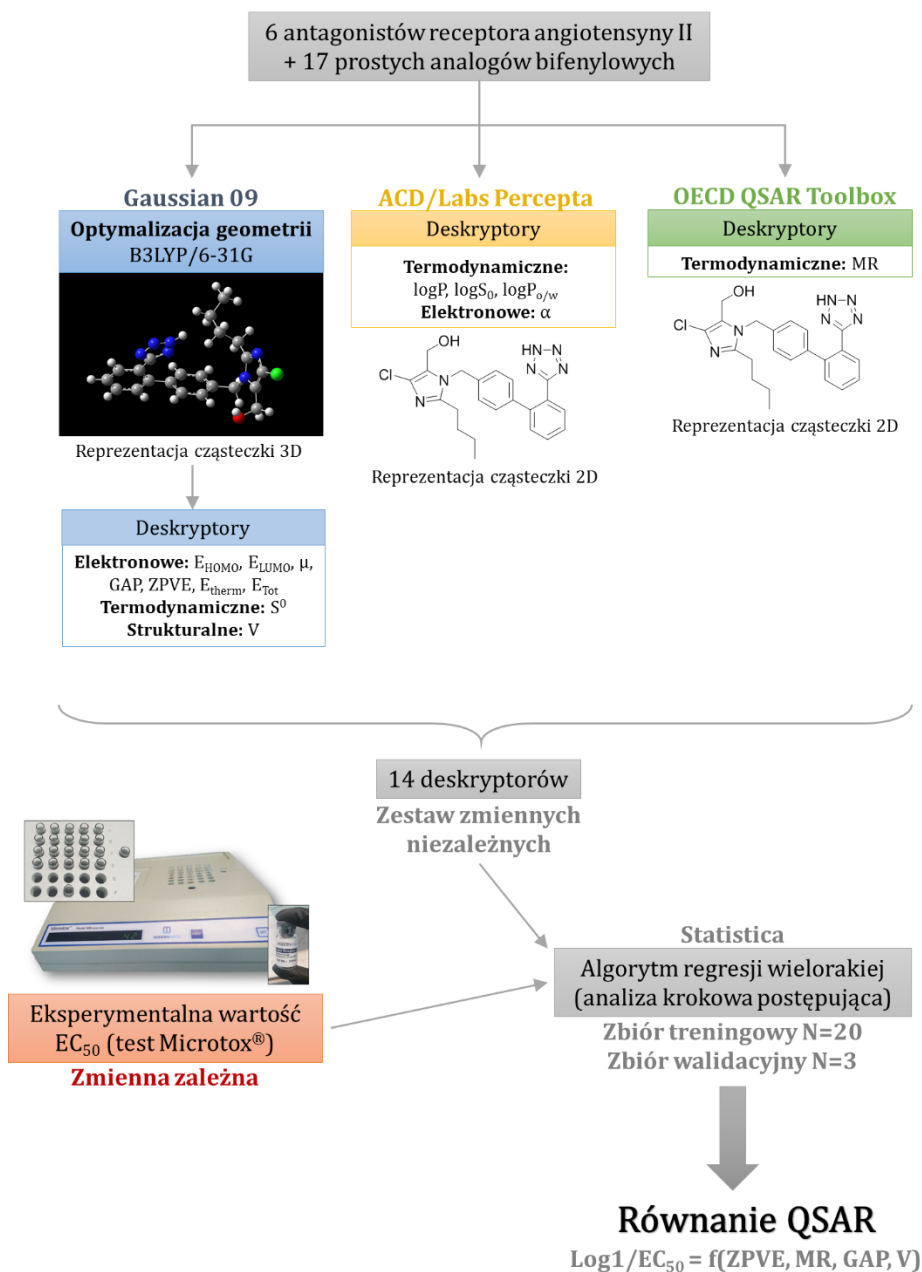
Otrzymane równanie przedstawiono poniżej:

$$\log 1/EC_{50} = (-2.87 \pm 2.28) - (0.067 \pm 0.010) \cdot ZPVE + (0.205 \pm 0.036) \cdot MR + (1.417 \pm 0.390) \cdot GAP - (0.019 \pm 0.006) \cdot V \quad (2.)$$

$$p_{ZPVE} = 0.000009, p_{MR} = 0.00005, p_{GAP} = 0.002, p_V = 0.007$$

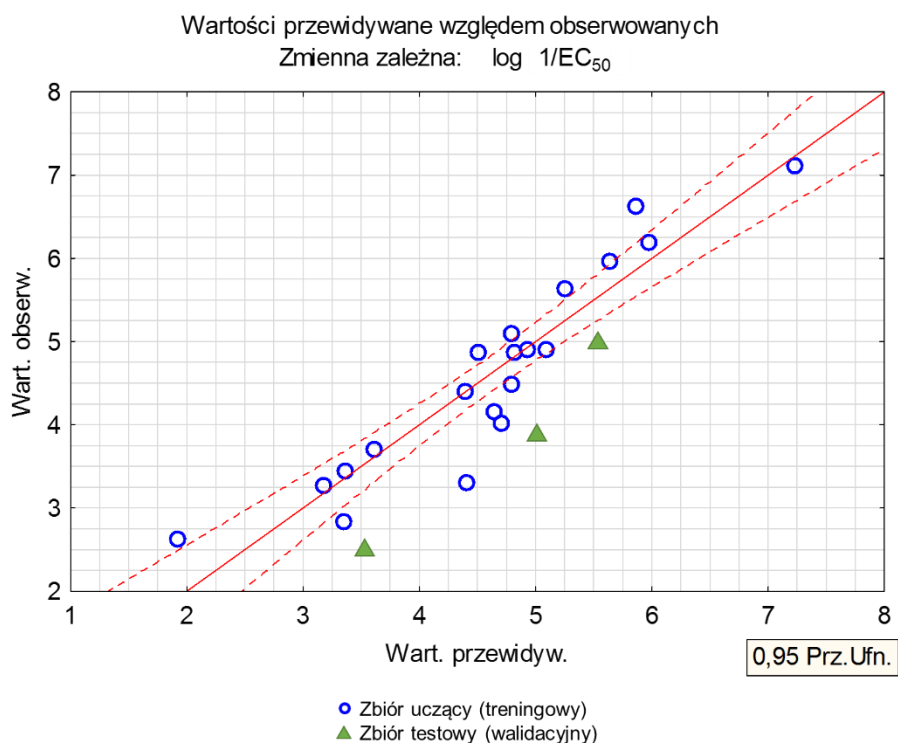
$$n = 20, R = 0.93, R^2 = 0.87, F = 24.394, p < 0.0000, \text{ błąd std. estymacji} = 0.513$$

Równanie (2.) koreluje z wartością $\log 1/EC_{50}$ następujące deskryptory: energię wibracyjną punktu zerowego (ZPVE), refrakcję molową (MR), przerwę energetyczną (GAP) oraz objętość molową (V). Kwadrat współczynnika korelacji $R^2 = 0.87$ świadczy o dobrym dopasowaniu prostej regresji do danych doświadczalnych. Obliczona wartość statystyki $F = 24.394$ przekracza wartość krytyczną $F_{0.05, 4, 15} = 3.06$ [289], przy poziomie istotności $\alpha = 0.05$, stąd można wnioskować, że zależność między $\log 1/EC_{50}$, a deskryptorami zawartymi w równaniu (2.) jest statystycznie istotna.



Rys. 27. Schemat procedury postępowania w celu wyznaczenia równania QSAR dla grupy amoniowych cieczy jonowych.

Na **Rys. 28** przedstawiono wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem wartości przewidywanych modelem opisanym za pomocą równania (2.). Wyrowadzone równanie QSAR z powodzeniem pozwala na przewidywanie ekotoksyczności wobec bakterii *A. fischeri* związków zawierających ugrupowania bifenylowe, w tym antagonistów receptora angiotensyny II i może zostać wykorzystane do przewidywania ekotoksyczności leków z tej grupy, co jest istotne z punktu widzenia projektowania nowych leków.



Rys. 28. Wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem wartości przewidywanych modelem opisanym za pomocą równania (2.) przedstawiony dla zbioru uczącego i testowego.

Według wyprowadzonego równania QSAR (2.) ekotoksyczność związków z grupy ARBs wobec bakterii *A. fischeri* zależy od energii wibracyjnej punktu zerowego (ZPVE), refrakcji molowej (MR), przerwy energetycznej (GAP) oraz objętości molowej (V). Analizując współczynniki równania (2.) zauważyć można, że ekotoksyczność związku wzrasta wraz ze wzrostem MR oraz GAP. MR jest wielkością określającą polaryzację jednego mola substancji w polu elektromagnetycznym, wzrasta ona wraz z rozmiarem i masą molową cząstek. ^[293] Uważa się, że MR ma istotny wpływ na występowanie sił

Tabela 28. Deskryptory molekularne obliczone dla grupy antagonistów receptora angiotensyny II oraz bifenyli.

Związek	log 1/EC ₅₀	Gaussian 09									ACD/Labs Percepta 14.0.0.				QSAR Toolbox 4.5
		V	E _{HOMO}	E _{LUMO}	GAP	μ	ZPVE	S°	E _{Therm}	E _{Tot}	logP	α	logS ₀	logP _{o/w}	MR
	mol/L	cm ³ /mol	eV			D	kcal/mol	cal/ mol/K	kcal/mol	Hartree	-	Å ³	-		m ³ /mol
VAL	3.27	277.05	-6.83	-1.62	5.21	4.84	320.05	204.48	339.17	-1431.02	3.87	47.82	-4.25	2.58	124
LOS-K	2.84	348.13	-5.39	-1.00	4.39	9.58	261.53	196.06	279.60	-2315.05	3.58	46.87	-4.43	3.12	118
LOS-H	3.31	287.37	-6.24	-1.55	4.69	4.87	269.50	188.45	286.42	-1715.68	3.58	46.87	-4.43	3.12	118
IRB	2.50	275.96	-6.36	-1.52	4.84	1.37	315.85	199.59	333.63	-1372.83	3.40	49.73	-3.45	4.55	124
CAN	2.62	437.92	-5.94	-1.61	4.33	9.31	402.82	253.08	427.73	-2057.22	5.86	65.59	-5.23	5.00	166
TEL	3.71	353.56	-5.47	-1.56	3.91	3.00	356.02	220.59	377.06	-1644.66	7.00	61.25	-7.37	7.78	154
B1	4.91	126.73	-6.08	-0.67	5.41	0.00	115.44	92.80	120.90	-463.20	3.82	20.16	-4.38	4.32	51.0
B2	5.09	141.90	-6.00	-0.63	5.37	0.41	132.77	103.20	139.41	-502.51	4.58	22.07	-4.86	4.97	56.9
B3	5.00	129.23	-5.91	-0.59	5.32	0.49	132.75	103.50	139.40	-502.51	4.58	22.07	-4.86	4.97	56.9
B4	6.20	139.32	-6.29	-0.99	5.30	2.34	109.26	100.28	115.53	-922.78	4.61	39.00	-4.89	4.85	55.2
B5	7.12	161.89	-6.65	-1.05	5.60	2.98	102.98	107.34	110.06	-1382.34	5.10	24.04	-5.83	5.47	59.3
B6	4.87	156.72	-5.89	-0.58	5.31	2.07	135.44	108.99	142.73	-577.69	2.76	22.71	-2.99	2.69	58.2
B7	4.16	138.56	-6.43	-1.72	4.71	2.56	124.47	107.81	131.72	-651.71	3.54	22.90	-3.98	2.56	57.7
B8	4.01	164.30	-6.06	-0.74	5.32	1.43	142.10	119.45	150.33	-691.01	3.25	24.56	-3.55	3.16	62.0
B9	5.63	116.51	-5.81	-0.58	5.23	1.84	117.66	98.11	123.87	-538.39	3.08	20.90	-3.32	2.41	52.8
B10	4.87	148.94	-6.02	-0.69	5.33	2.01	116.90	97.37	122.92	-538.39	3.13	20.90	-3.32	2.41	52.8
B11	4.91	143.78	-5.94	-0.73	5.21	0.75	119.85	103.81	126.82	-613.58	2.28	21.65	-2.39	0.52	54.6
B12	4.40	127.67	-5.12	-0.37	4.75	1.86	125.88	99.25	132.28	-518.54	2.69	21.84	-4.00	2.53	55.7
B13	4.49	111.16	-5.03	-0.23	4.80	1.54	125.81	99.55	132.27	-518.54	2.71	21.84	-4.00	2.53	55.7
B14	3.84	139.96	-4.50	0.26	4.76	0.00	136.06	106.73	143.57	-573.88	1.47	23.52	-2.69	0.80	60.3
B15	3.44	193.21	-4.29	0.24	4.53	1.88	177.11	132.11	187.89	-802.85	1.97	28.81	-3.37	0.67	75.0
B16	6.62	190.26	-5.06	-0.38	4.68	2.24	124.33	119.82	133.25	-1493.04	3.41	27.40	-4.43	2.04	68.6
B17	5.97	115.10	-6.56	-1.68	4.88	5.22	114.41	102.34	121.03	-555.42	3.51	22.21	-4.43	3.93	55.9

V – objętość molowa;

E_{HOMO}, E_{LUMO} – energia najwyższego obsadzonego orbitala molekularnego (HOMO) i najniższego nieobsadzonego orbitala molekularnego (LUMO);

GAP – różnica pomiędzy energiami HOMO i LUMO (przerwa energetyczna);

μ – moment dipolowy;

ZPVE – energia wibracyjna punktu zerowego, różnica energii pomiędzy najniższym punktem na powierzchni energii potencjalnej (PES), a energią bezwibracyjnego poziomu energii;

S° – entropia;

E_{Therm} – energia termiczna;

E_{Tot} – energia całkowita;

logP – współczynnik podziału n-oktanol/woda;

α – objętościowa polaryzowalność cząsteczkowa;

logS₀ – rozpuszczalność własna związku (ang. *intrinsic solubility*);

logP_{o/w} – współczynnik podziału olej/woda;

MR – refrakcja molowa.

dyspersyjnych, które w efekcie przyczyniają się do pojawiania się specyficznych interakcji pomiędzy badaną cząsteczką, a pewnymi strukturami bakterii *A. fischeri*. [294] GAP - różnica energii pomiędzy najwyższym obsadzonym orbitalem (HOMO), a najniższym nieobsadzonym orbitalem (LUMO) odzwierciedla stabilność molekuł i jest jednym z głównych parametrów związanych z oddziaływaniami za pośrednictwem elektronów. Większa przerwa energetyczna (GAP) sprawia, że cząsteczka jest bardziej stabilna w odniesieniu do reakcji z biocząsteczkami [295], stąd wraz ze wzrostem GAP na skutek interakcji z błonami bakteryjnymi wzrasta toksyczność badanych związków. Odwrotną zależność i spadek toksyczności badanego związku wraz ze wzrostem wartości deskryptora obserwuje się dla ZPVE oraz V. Zaproponowany model QSAR (2.) wskazuje, że im mniejsza objętość molowa (V) związku, tym jest on bardziej toksyczny dla bakterii *A. fischeri*, co związane jest z lepszą adsorpcją i dystrybucją tego typu związków. W odniesieniu do deskryptora ZPVE, podobny wniosek wykazano w badaniach QSAR, gdzie powiązano wzrost wartości ZPVE ze spadkiem toksyczności wobec ryb *Poecilia reticulata*. [296]

Wnioski do podrozdziału 2.1. oraz 2.2.:

- ✓ Opracowano modele QSAR pozwalające na skorelowanie toksyczności wobec bakterii *A. fischeri* z deskryptorami obliczonymi dla 1) amoniowych cieczy jonowych, 2) ARBs i ich analogów bifenylowych;
- ✓ W przypadku grupy amoniowych cieczy jonowych otrzymano równanie o współczynniku korelacji $R^2 = 0.75$ uwzględniające deskryptory takie jak: moment dipolowy, energia termiczna i polaryzowalność;
- ✓ W przypadku antagonistów receptora angiotensyny II i ich prostych analogów bifenylowych uzyskano równanie o współczynniku korelacji $R^2 = 0.87$ uwzględniające deskryptory takie jak: energia wibracyjna punktu zerowego, refrakcja molowa, przerwa energetyczna oraz objętość molowa;

3. WNIOSKI I PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki eksperymentalne zostały podsumowane z podziałem na dwie badane grupy związków:

I. Amoniowe ciecze jonowe:

1. Chiralne i achiralne halogenooctany amoniowe:

- wszystkie zsyntezowane związki są całkowicie nietoksyczne dla bakterii *A. fischeri* ($EC_{50} > 100$ mg/L) i charakteryzują się mniejszym potencjałem bioakumulacji niż komercyjne herbicydy;
- obserwuje się dużą enancjoselektywność toksyczności - (*R*)-enancjomery są nawet 9-krotnie bardziej toksyczne dla bakterii *A. fischeri* niż analogiczne (*S*)-enancjomery.

2. 2,2'-Tiodioctany amoniowe:

- związki charakteryzują się zróżnicowaną toksycznością – od związków całkowicie nieszkodliwych, przez te zaliczane do III klasy toksyczności, kończąc na związkach toksycznych zaliczanych do II klasy;
- obserwuje się wzrost toksyczności wraz z wydłużeniem długości łańcucha podstawnika alkilowego oraz większą toksyczność kationów aromatycznych od alkilowych.

3. Fenoksyoctany/(fenylotio)octany amoniowe:

- związki zaliczyć można do całkowicie nietoksycznych lub do III klasy toksyczności;
- obserwuje się wzrost toksyczności wraz ze wzrostem ilości atomów chloru grupy fenylowej.

II. Antagonisty receptora angiotensyny II i substancje wypełniające:

- Opracowana modyfikacja standardowego protokołu Microtox® Basic Solid Phase Test pozwala na rzetelną ocenę ekotoksyczności słabo rozpuszczalnych API, zarówno w badaniach pojedynczych związków, jak i mieszanin;
- Zaobserwowano występowanie interakcji antagonistycznych między ARB, a HCT – substancji, które są dystrybuowane razem w lekach dwuskładnikowych;
- Wykazano, że problem bezpieczeństwa środowiskowego związanego z substancjami pomocniczymi stosowanymi w farmacji powinien zostać dokładnie przeanalizowany,

szczególnie ze względu na fakt występowania interakcji między substancjami pomocniczymi oraz między API a substancjami czynnymi;

- Wykazano dużą ekotoksyczność niektórych substancji pomocniczych, tj. takich jak laurylosiarczan sodu, meglumina czy węglan magnezu;
- Toksyczność SiO₂ zależy zarówno od wielkości cząstek, jak i jej formy komercyjnej. Podobnie toksyczność powidonów związana jest z ich usieciowaniem i stopniem polimeryzacji;
- Wykazano istnienie szeregu efektów antagonistycznych i synergistycznych w badanych mieszaninach m.in. efekt synergistyczny między VAL, a krzemionką koloidalną oraz megluminą i powidonem K25.

W ramach przeprowadzonych obliczeń opracowano z kolei modele QSAR pozwalające na skorelowanie toksyczności wobec bakterii *A. fischeri* z deskryptorami obliczonymi dla 1) amoniowych cieczy jonowych, 2) ARBs i ich analogów bifenylowych.

- W przypadku grupy amoniowych cieczy jonowych otrzymano równanie o współczynniku korelacji $R^2 = 0.75$ uwzględniające deskryptory takie jak: moment dipolowy, energia termiczna i polaryzowalność;
- W przypadku antagonistów receptora angiotensyny II i ich prostych analogów bifenylowych uzyskano równanie o współczynniku korelacji $R^2 = 0.87$ uwzględniające deskryptory takie jak: energia wibracyjna punktu zerowego, refrakcja molowa, przerwa energetyczna oraz objętość molowa.

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. DANE OGÓLNE

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR (200 i 500 MHz), ^{13}C NMR (50 i 125 MHz) oraz ^{19}F (188 MHz) rejestrowane były na aparacie Bruker AV 200 oraz AV 500 w rozpuszczalnikach deuterowanych CDCl_3 , MeOD lub D_2O . Przesunięcia chemiczne (δ) wyrażono w ppm względem TMS jako wzorca wewnętrznego.

Widma masowe wykonano przy użyciu spektrometru Finigan Mat 95 wykorzystując technikę jonizacji wiązką elektronów (EI), rozpylania laserowego (LSI), elektrorozpylania (ES) oraz bombardowania szybkimi atomami (FAB). Widma masowe wysokiej rozdzielczości (HRMS) wykonano przy użyciu spektrometru Synapt G2-Si (Waters) z wykorzystaniem techniki elektrorozpylania (ES) oraz kwadrupolowego analizatora czasu przelotu (TOF), w trybie detekcji dodatnich i ujemnych jonów. Wyniki pomiarów przetwarzano przy użyciu oprogramowania MassLynx 4.1 (Waters) wbudowanego w urządzenie.

Temperatury topnienia dla związków w stanie stałym zmierzono za pomocą aparatu Boetiusa oraz aparatu Stuart® SMP11.

Analiza elementarna prowadzona była z wykorzystaniem analizatora EuroVector model 301.

Badania ekotoksykologiczne z wykorzystaniem bakterii bioluminescencyjnych *Aliivibrio fischeri* i testu Microtox® prowadzono na aparacie Microtox® Model 500 Analyzer (MODERNWATER Inc., New Castle, USA) przy wykorzystaniu standardowego protokołu 81.9% Basic Test (dla związków amoniowych) oraz opracowanej modyfikacji protokołu Basic Solid Phase Test (dla antagonistów receptora angiotensyny II oraz substancji wypełniających).

2. AMONIOWE CIECZE JONOWE

2.1. Procedura syntezy cieczy jonowych

Przedstawione na **Rys. 16** związki zostały otrzymane w wyniku reakcji odpowiedniego kwasu (halogenooctowego, 2,2'-tiodioctowego, fenoksyooctowego, fenylotiooctowego lub (*R*)- i (*S*)-metoksyfenylooctowego) z 10-procentowym nadmiarem aminy (diizopropylaminy, diizobutyloaminy, trietyloaminy, *t*-butyloaminy, izochinoliny, (*R*)- i (*S*)-fenyloetyloaminy) bez użycia rozpuszczalnika. Reakcja prowadzona była w temperaturze pokojowej (**1-3, 6, (*R*)-7 (*S*)-7**), z chłodzeniem (**4, 5, (*R*)-8, (*S*)-8, (*R*)-9, (*S*)-9**) lub w podwyższonej temperaturze (**10-16, 17-23, (*R*)-24, (*S*)-24**). Następnie, nadmiar aminy został odparowany (opcjonalnie), a powstały produkt wysuszony pod próżnią. [65-68]

2.2. Analizy otrzymanych związków

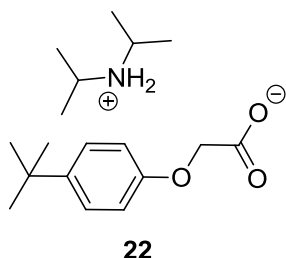
W **Tabeli 29** zebrano wykonane analizy zsyntezowanych związków oraz źródła, w którym zostały one opisane. W niniejszej pracy doktorskiej, przedstawiono wyłącznie analizy dotyczące nieopublikowanych dotychczas związków.

Tabela 29. Wykonane analizy zsyntezowanych związków amoniowych wraz ze źródłem, w którym zostały opisane.

Związek	Temp. topnienia	¹ H NMR	¹³ C NMR	¹⁹ F NMR	MS	HRMS	Analiza elementarna	Źródło
1	+	+	+	-	+	+	+	[66]
2	+	+	+	-	+	+	+	
3	+	+	+	-	+	+	+	
4	+	+	+	+	+	+	+	
5	+	+	+	+	-	-	+	
6	+	+	+	+	-	-	+	
(<i>R</i>)-7	+	+	+	-	+	+	+	[68]
(<i>S</i>)-7	- (olej)	+	+	-	+	-	+	
(<i>R</i>)-8	+	+	+	-	+	-	+	
(<i>S</i>)-8	+	+	+	-	+	-	+	
(<i>R</i>)-9	+	+	+	-	+	-	+	
(<i>S</i>)-9	+	+	+	-	+	-	+	[65]
10	+	+	+	-	+	+	-	
11	+	+	+	-	+	+	-	
12	+	+	+	-	+	+	-	
13	+	+	+	-	+	+	-	
14	+	+	+	-	+	+	+	
15	+	+	+	-	+	+	-	
16	+	+	+	-	+	+	-	[67]
17	+	+	+	-	+	+	+	

18	+	+	+	-	+	+	+	
19	+	+	+	-	+	+	+	
20	+	+	+	-	+	+	+	
21	+	+	+	-	+	+	+	
22								ta praca
23	+	+	+	-	+	+	+	
(R)-24								
(S)-24								
Związki zsyntezowane w celach porównawczych:								
siarczan bis(diizopropyl oamoniowy)	+	+	+	-	-	+	+	[68]
siarczan bis[(R)-fenyloetyloamoniowy]	+	+	+	-	-	+	+	
siarczan bis[(S)-fenyloetyloamoniowy]	+	+	+	-	-	+	+	

**Analizy związków dotychczas nieopublikowanych
w literaturze własnej:**



4-*tert*-Butylofenoksyoctan diizopropylamoniowy (22)

t.t. 108-110 °C;

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 1.16 (12H, d, ³J_{H-H} = 8.0 Hz, 4xCH₃), 1.25 (9H, s, 3xCH₃), 3.06 (2H, sept, ³J_{H-H} = 6.0 Hz, 2xCH), 4.43 (2H, s, CH₂), 6.77 (2H, d, J = 8.0 Hz, 2xH_{Ar}), 7.22 (2H, d, J = 8.0 Hz, 2xH_{Ar}), 7.24 (1H, s, CH);

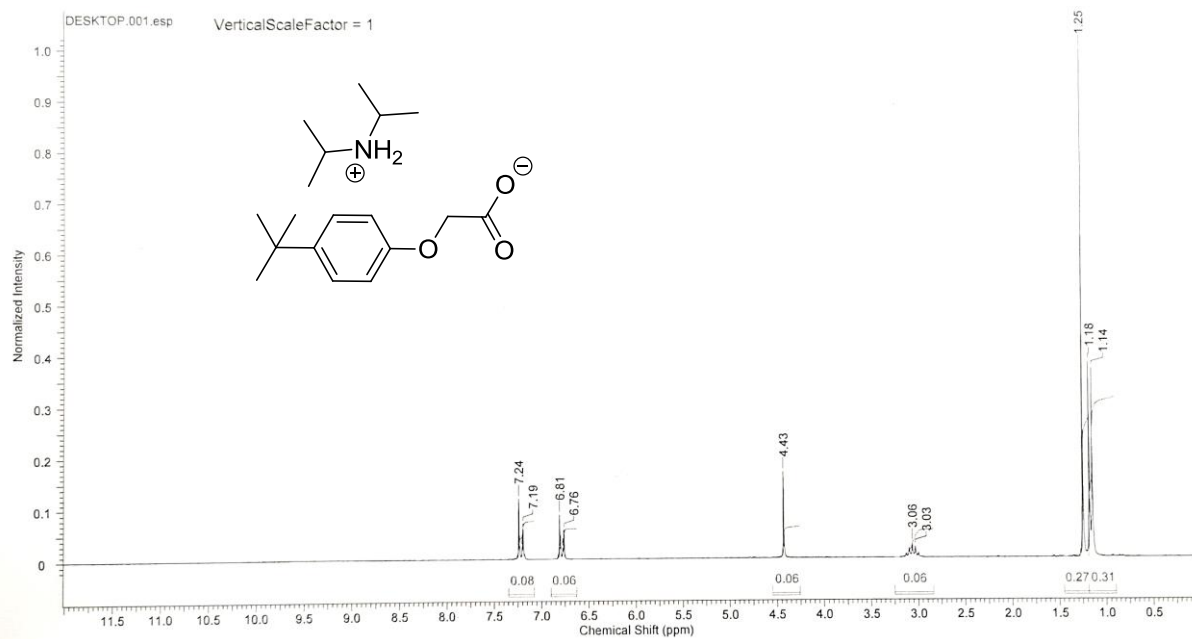
¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 18.90 (CH₃CH), 31.58 (CH₃C), 34.04 (CH₃C), 46.27 (CH), 67.17 (CH₂), 114.02 (CH_{Ar}), 126.02 (CH_{Ar}), 143.20 (C_{Ar}), 156.39 (C_{Ar}), 173.96 (COO⁻);

MS - FAB (+): *m/z* (%) = 102 (K⁺, 100); 310 (M+H⁺, 20);

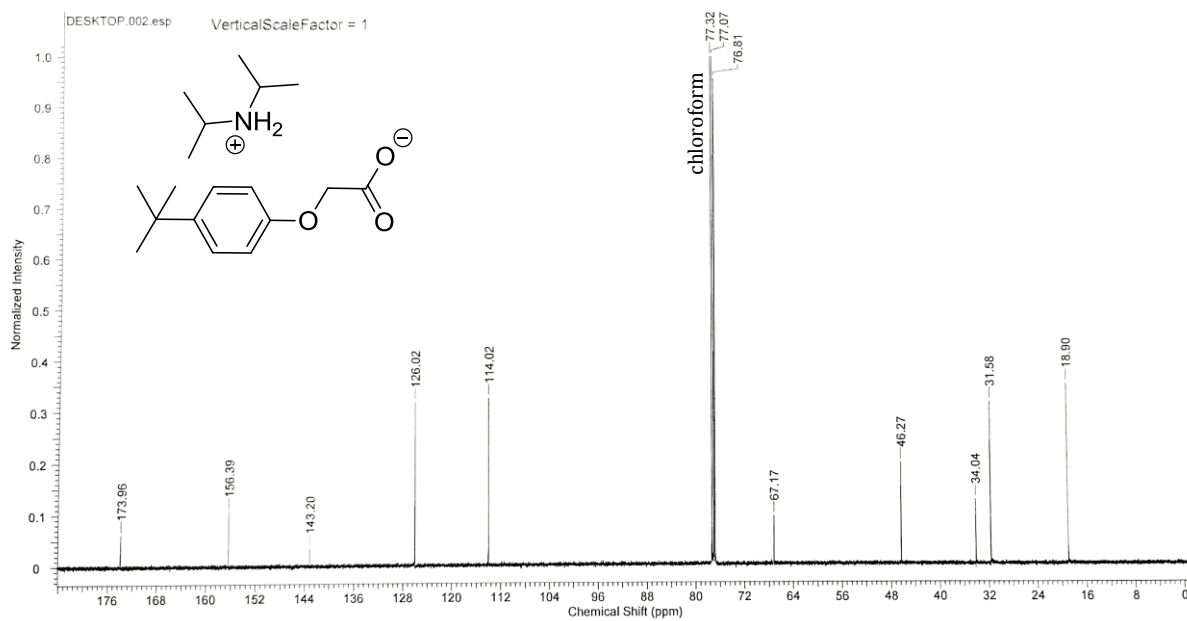
MS - FAB (-): *m/z* (%) = 207 (A⁻, 100); 415 (2A⁻ + H⁺, 25);

HRMS (EI) (*m/z*): obliczone dla [A⁻ = C₁₂H₁₅O₃⁻]: 207.10212; zmierzone: 207.10240.

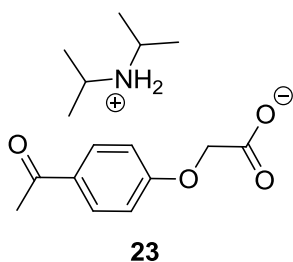
Analiza elementarna dla C₁₈H₃₂NO₃ obliczone: C, 69.86 %; H, 10.10 %; N, 4.53 %; zmierzone: C, 69.73 %; H, 10.09 %; N, 4.41 %.



Rys. 29. Widmo ^1H NMR związku 22.



Rys. 30. Widmo ^{13}C NMR związku 22.



4-Acetylofenoksyoctan diizopropylamoniowy (23)

t.t. 117-120 °C;

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 1.16 (12H, d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, 4x CH_3), 2.52 (3H, s, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$), 3.11 (2H, sept, $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz, 2xCH), 4.52 (2H, s, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 6.89 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, 2x H_{Ar}), 7.87 (2H, d, $J =$

8.0 Hz, 2x H_{Ar}), 9.30 (2H, vbrs, + NH_2);

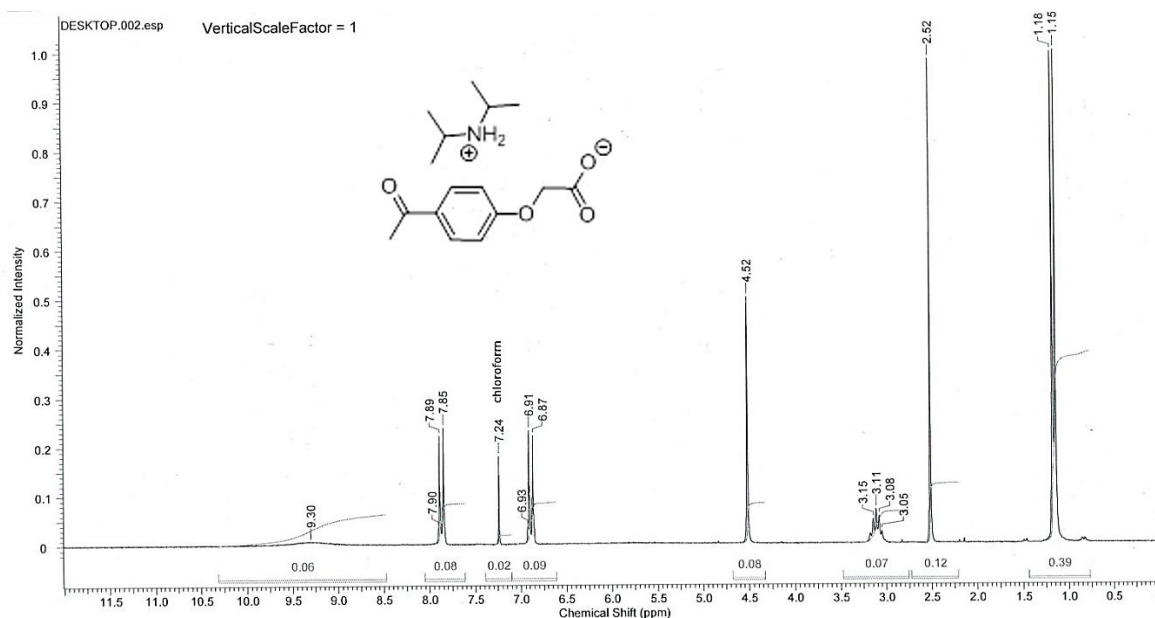
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 18.86 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}$), 26.40 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{C}(\text{O})$), 46.43 (CH_2), 66.94 (CH), 114.35 (CH_{Ar}), 130.38 (C_{Ar}), 130.46 (CH_{Ar}), 162.56 (C_{Ar}), 172.80 (COO^-), 196.81 ($\underline{\text{C}}(\text{O})\text{CH}_3$);

MS - FAB (+): m/z (%) = 102 (K^+ , 100); 195 (A^- , 2 H^+ , 30); 296 ($\text{M}+\text{H}^+$, 5);

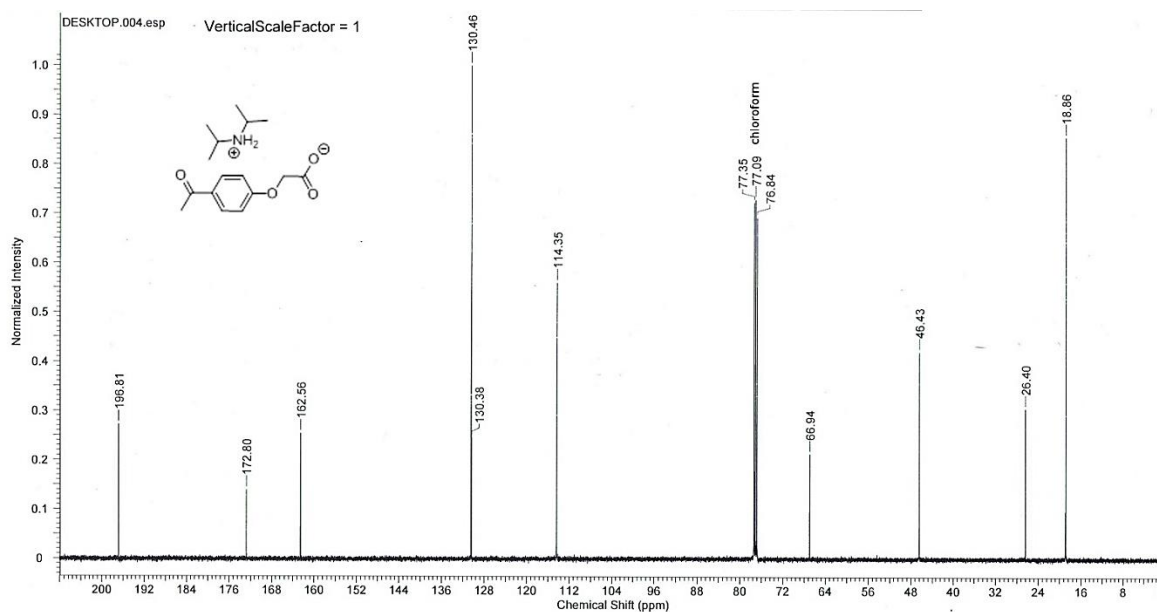
MS - FAB (-): m/z (%) = 135 (A^- - CH_2COO (58), 56); 193 (A^- , 100); 387 (2 A^- + H^+ , 15);

HRMS (EI) (m/z): obliczone dla [$\text{A}^- = \text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4^-$]: 193.04919; zmierzone: 193.05008.

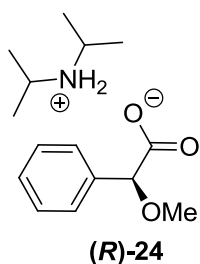
Analiza elementarna dla $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ obliczone: C, 65.06 %; H, 8.53 %; N, 4.74 %; zmierzone: C, 65.04 %; H, 8.57 %; N, 4.79 %.



Rys. 31. Widmo $^1\text{H NMR}$ związku 23.



Rys. 32. Widmo ^{13}C NMR związku 23.



(R)-(-)- α -Metoksyfenyloctan diizopropylamoniowy ((R)-24)

t.t. 98-100 °C;

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 1.06 (12H, 2xd, $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ = 6.0 Hz, 4xCH₃), 3.00 (2H, sept, 2xCH), 3.30 (3H, s, CH₃), 4.52 (1H, s, CH(OMe)), 7.17-7.27

(3H, m, 3xH_{Ar}), 7.42 (2H, d, J = 8.0 Hz, 2xH_{Ar}), 9.00 (2H, vbrs, +NH₂);

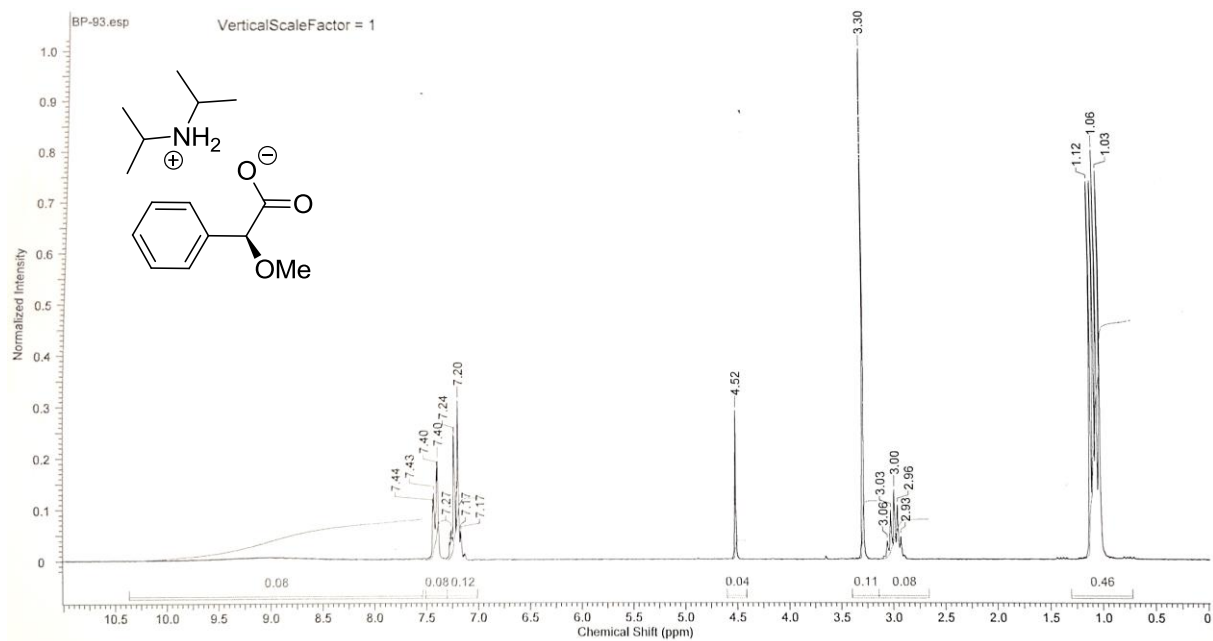
^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 18.73 (CH₃CH), 45.86 (CH), 56.50 (O-CH₃), 85.39 (CH(OMe)), 127.07 (CH_{Ar}), 127.77 (CH_{Ar}), 140.05 (C_{Ar}), 175.24 (COO⁻);

MS - FAB (+): m/z (%) = 102 (K⁺, 100);

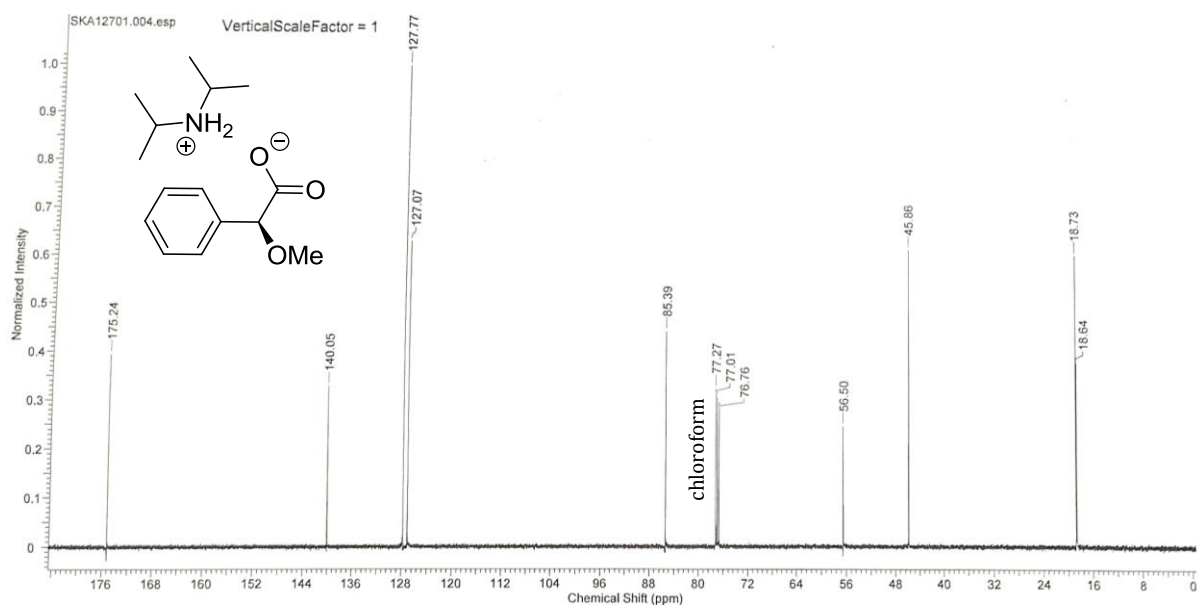
MS - FAB (-): m/z (%) = 165 (A⁻, 100); 183 (A⁻ + H₂O, 68);

HRMS (EI) (m/z): obliczone dla [A⁻ = C₉H₉O₃⁻]: 165.05517; zmierzone: 165.05488.

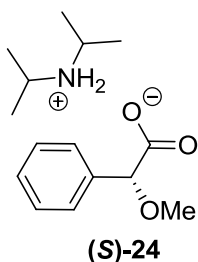
Analiza elementarna dla C₁₅H₂₅NO₃ obliczone: C, 67.38 %; H, 9.42 %; N, 5.24 %; zmierzone: C, 67.42 %; H, 9.48 %; N, 5.27 %.



Rys. 33. Widmo ¹H NMR związku (R)-24.



Rys. 34. Widmo ¹³C NMR związku (R)-24.



(S)-(+)- α -Metoksyfenyloctan diizopropylamoniowy ((S)-24)

t.t. 98-100 °C;

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ = 1.06 (12H, 2xd, $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ = 6.0 Hz, 4xCH₃), 3.00 (2H, sept, 2xCH), 3.30 (3H, s, CH₃), 4.52 (1H, s, CH(OMe)), 7.18-7.27 (3H, m, 3xH_{Ar}), 7.42 (2H, d, J = 8.0 Hz, 2xH_{Ar}), 8.90 (2H, vbrs, +NH₂);

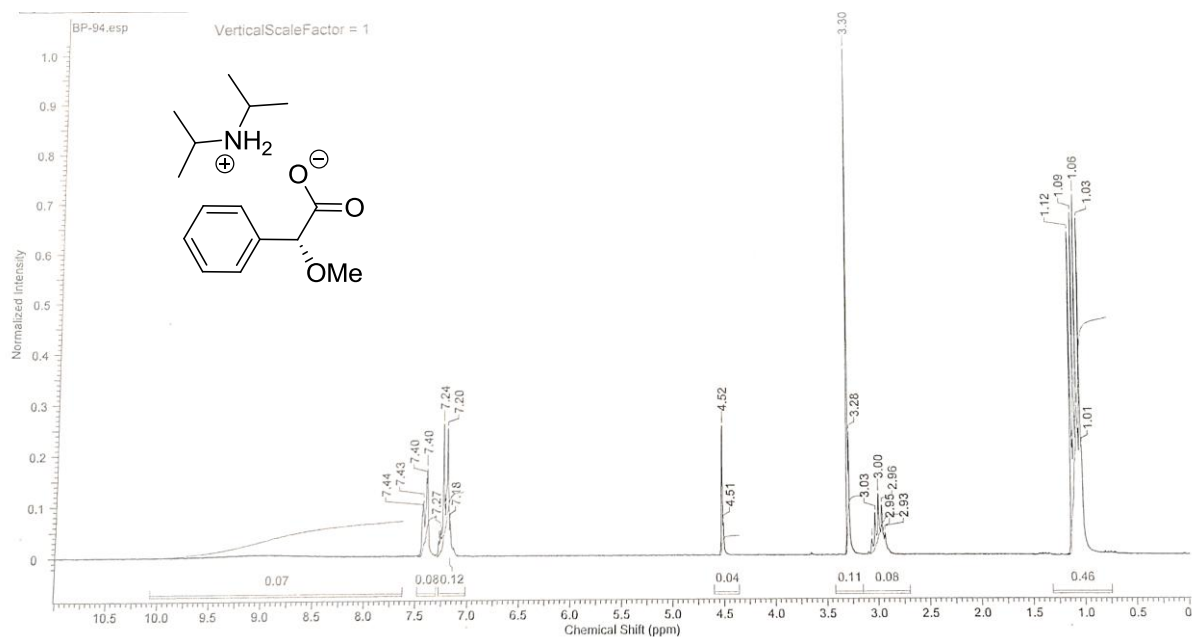
^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 18.60 (CH₃CH), 45.84 (CH), 56.49 (O-CH₃), 85.37 (CH(OMe)), 127.06 (CH_{Ar}), 127.75 (CH_{Ar}), 140.03 (C_{Ar}), 175.22 (COO⁻);

MS - FAB (+): m/z (%) = 102 (K⁺, 100);

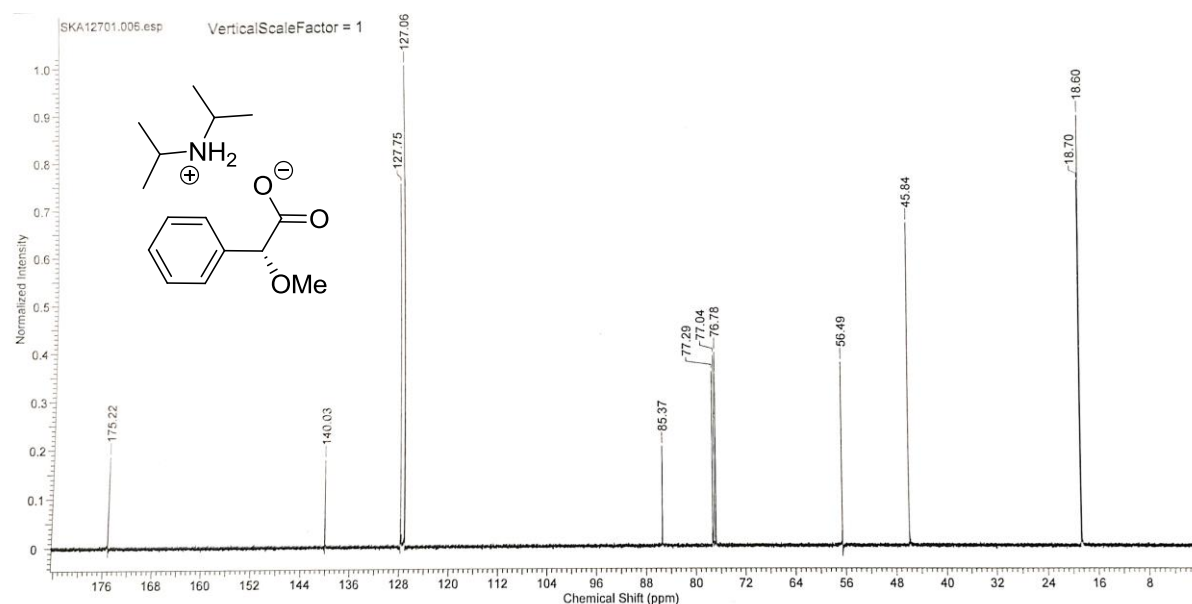
MS - FAB (-): m/z (%) = 165 (A⁻, 100); 183 (A⁻ + H₂O, 25);

HRMS (EI) (m/z): obliczone dla [A⁻ = C₉H₉O₃]: 165.05517; zmierzone: 165.05529.

Analiza elementarna dla C₁₅H₂₅NO₃ obliczone: C, 67.38 %; H, 9.42 %; N, 5.24 %; zmierzone: C, 67.48 %; H, 9.57 %; N, 5.26 %.



Rys. 35. Widmo ^1H NMR związku (S)-24.



Rys. 36. Widmo ^{13}C NMR związku (S)-24.

2.3. Procedura przeprowadzania standardowego testu Microtox®

Do badań ekotoksykologicznych zastosowano test Microtox® bazujący na pomiarze zahamowania bioluminescencji bakterii *A. fischeri* (linia NRRL B-11177). Pomiar bioluminescencji wykonywano na aparacie Microtox® Model 500 Analyzer (MODERNWATER Inc., New Castle, USA) (Rys. 37). Jako, że otrzymane sole amoniowe charakteryzowały się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, do testu wykorzystano roztwory wodne tych związków. Zakres badanych stężeń został oszacowany za pomocą wstępnego testu przesiewowego - 81.9% Screening Test. Wartości EC_{50} zostały wyznaczone z wykorzystaniem protokołu 81.9% Basic Test.



Rys. 37. Aparat Microtox® Model 500 Analyzer.

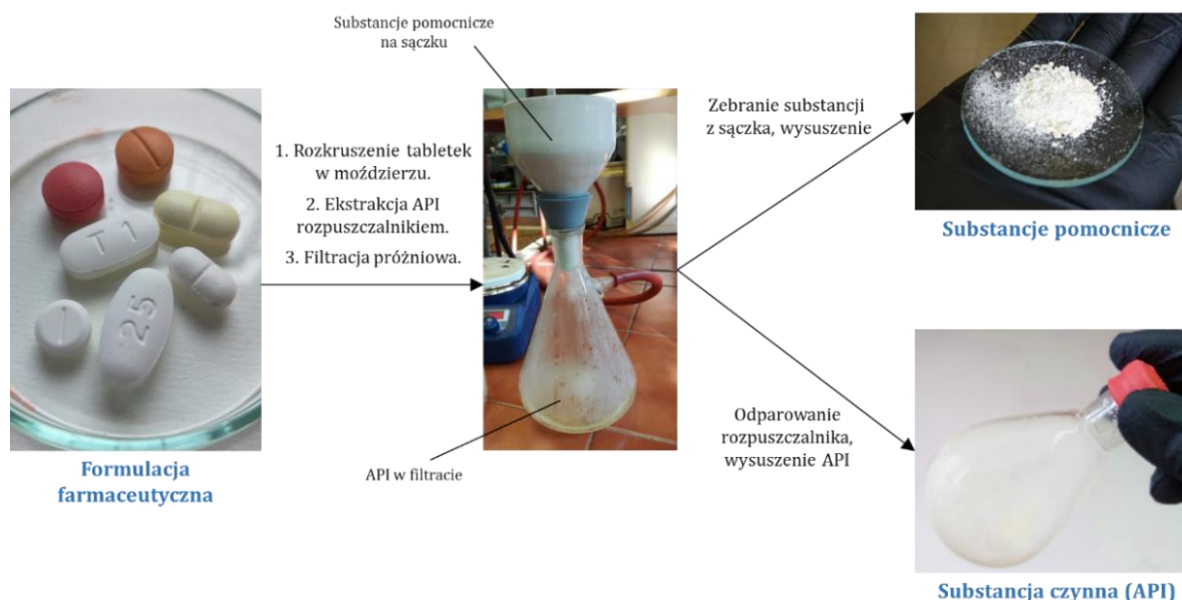
Protokół 81.9% Basic Test przewiduje sporządzenie wyjściowego roztworu badanego związku – w przypadku zsyntezowanych związków amoniowych były to stężenia od 100 mg/L do 10 000 mg/L, w zależności od toksyczności związku. Dla każdego związku sporządzono serię dwukrotnych rozcieńczeń (9 badanych rozcieńczeń dla każdego związku). Zgodnie z procedurą, użyto liofilizowanych bakterii, które zostały rekonstruowane za pomocą odpowiedniego roztworu NaCl. Bakterie wstępnie inkubowano przez 15 minut w diluencji, po czym zmierzono ich bioluminescencję (bioluminescencja w czasie „zero”, bez dodatku toksykanta). Następnie, każde „rozcieńczenie” badanego związku zostało przeniesione do odpowiedniej kuwety z zawiesiną bakterii. Zmierzono bioluminescencję bakterii po 5 oraz 15 minutach inkubacji z toksykantem. Następnie, wykorzystując oprogramowanie Microtox Omni Software™ obliczono procent zahamowania bioluminescencji po czasie 5 i 15 minut. Następnie, przy pomocy tego oprogramowania, korzystając z wyznaczonego równania regresji otrzymano wartość EC₅₀ [mg/L] odnoszącą się do stężenia toksykanta, które powoduje 50-procentowe zahamowanie bioluminescencji populacji bakterii *A. fischeri*.

3. ANTAGONISTY RECEPTORA ANGIOTENSYNY II I SUBTANCJE WYPEŁNIAJĄCE

3.1. Procedura ekstrakcji antagonistów receptora angiotensyny II i substancji wypełniających z tabletek

W celu wyekstrahowania substancji czynnej z preparatu farmaceutycznego, tabletki rozkruszono w moździerzu, a następnie użyto odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego selektywnie rozpuszczającego tylko substancję czynną: acetonitrylu (VAL), metanolu (LOS-K), chloroformu (TEL) lub etanolu (HCT) (**Rys. 38**). Ekstrakcję przeprowadzono kilkakrotnie, stosując filtrację próżniową w ostatnim etapie. Substancja stała pozostała na sączku zawierała substancje pomocnicze - została zebrana i wysuszona. Z otrzymanego filtratu odparowano rozpuszczalnik, a powstałą substancję stałą oczyszczono na kolumnie chromatograficznej lub poprzez krystalizację. Struktury chemiczne otrzymanych substancji czynnych i ich czystość potwierdzono analizami FT-IR, NMR, HRMS oraz zmierzono temperaturę topnienia – analizy te wraz z dodatkowymi informacjami dotyczącymi procedury ekstrakcji przedstawiono w publikacji ^[94] (**Tabela**

30). W przypadku LOS-K zastosowano handlową substancję czynną (Sigma-Aldrich) ze względu na protonowanie soli potasowej LOS-K na etapie ekstrakcji substancji czynnej z tabletek i tworzenia formy kwasowej LOS-H. Wyżej wymieniony metanol został użyty w celu wymycia LOS-K z formułacji farmaceutycznej i otrzymania czystej masy tabletkowej zawierającej mieszaninę substancji pomocniczych.



Rys. 38. Schemat graficzny ilustrujący procedurę izolacji substancji pomocniczych (masy tabletkowej) oraz substancji czynnej z formułacji farmaceutycznej.

Substancje pomocnicze użyte w CZĘŚCI 2 badań ekotoksykologicznych otrzymano z Zakładów Farmaceutycznych POLPHARMA S.A. w postaci czystych odczynników. ARBs wykorzystane w badaniach uzupełniających zostały zakupione (IRB), wyekstrahowane z preparatu farmaceutycznego (CAN) lub otrzymane w procesie przekształcenia soli w kwas (LOS-H). Poniżej przedstawiono procedurę otrzymywania tych związków oraz ich analizy (badania nieopublikowane).

Tabela 30. Wykonane analizy ekstrahowanych/syntezyowanych leków wraz ze źródłem, w którym zostały opisane.

API	Temp. top.	FT-IR	¹ H NMR	¹³ C NMR	HRMS	Źródło
VAL	+	+	+	+	+	[94]
TEL	+	+	+	+	+	
HCT	+	+	+	+	+	
LOS-K	Odczynnik zakupiony					Ta praca
CAN	+	+	+	+	+	
LOS-H	+	+	+	+	+	
IRB	Odczynnik zakupiony					

Otrzymywanie LOS-H

LOS-H (forma kwasowa losartanu) została otrzymana z certyfikowanego materiału odniesienia LOS-K (sól potasowa losartanu) firmy Sigma-Aldrich w reakcji protonowania z zastosowaniem kwasu salicylowego (SAL-H). Równomolowe ilości LOS-K i SAL-H zmieszano, zalano etanolem i ogrzewano w refluksie przez 1 godzinę. Następnie, mieszaninę krystalizowano i zebrano kryształki SAL-K (salicynian potasu) w postaci igiełek, jako produktu ubocznego oraz kryształki LOS-H w postaci dużych prostokątnych kryształków (**Rys. 39**). Kryształy LOS-K przemyto wodą na lejku Büchnera, zmierzono temperaturę topnienia (183-184 °C, zgodnie z literaturą [297]) i wykonano analizy FT-IR oraz ^1H , ^{13}C NMR w DMSO- d_6 oraz HRMS, które potwierdziły czystość otrzymanego LOS-H. Struktura otrzymanego LOS-H została także potwierdzona przez analizę rentgenowską i była identyczna ze strukturą zdeponowaną w bazie krystalograficznej CSD (kod CSD: OCAHAC).



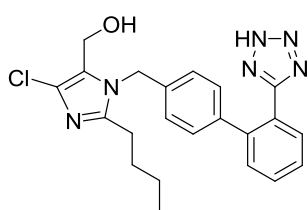
Rys. 39. Otrzymane kryształki LOS-H.

Ekstrakcja CAN z preparatu farmaceutycznego

Kandesartan (CAN) w postaci estru cyleksetylowego został wyizolowany z preparatu Atacand 16 mg firmy AstraZeneca AB, Szwecja, zawierającego po 16 mg kandesartanu cyleksetylu w każdej tabletkie. Tabletki zostały rozkruszone w moździerzu, a substancję czynną w nich zawartą ekstrahowano kilkakrotnie acetonem, filtrując próżniowo zawiesinę z wykorzystaniem lejka Büchnera. Zebrane frakcje filtratu przesączono przez lejek Schotta z warstwą żelu krzemionkowego w celu dodatkowego oczyszczenia substancji czynnej. Wydajność przeprowadzonej ekstrakcji wyniosła 59% w przeliczeniu na ilość substancji czynnej zawartej w tabletkie. Wysuszony CAN został poddano analizom FT-IR, ^1H , ^{13}C NMR oraz HRMS. Zmierzono także temperaturę topnienia, wyniosła ona 180-186 °C, zgodnie z literaturą (183-185 °C). [298]

3.2. Analizy substancji czynnych

Procedury ekstrakcji oraz analizy związków VAL, TEL i HCT zostały przedstawione w materiałach dodatkowych publikacji. [94] Poniżej przedstawiono analizy dla związków, które nie wchodziły w skład w/w publikacji i nie były dotąd opublikowane (LOS-H, CAN), a stanowiły przedmiot badań ekotoksykologicznych zamieszczonych w niniejszej dysertacji.



Losartan, forma kwasowa (LOS-H)

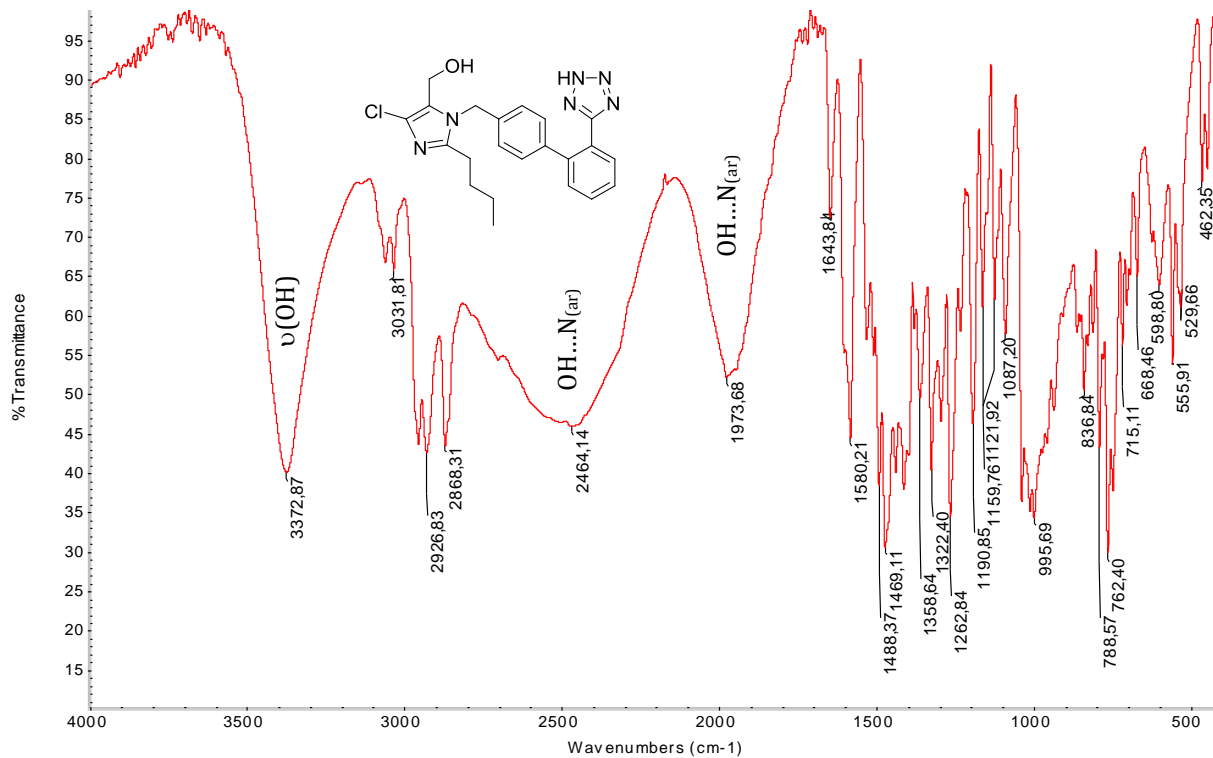
t.t. 183-184 °C

^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ = 1.80 (3H, t, CH_3), 1.23 (2H, sext, CH_2CH_3), 1.45 (2H, quin, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.46 (2H, t, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 4.33 (2H, s, CH_2OH), 5.24 (2H, s, CH_2N), 7.02-7.09 (4H, m, 4xHar), 7.52-7.59 (2H, m, 2xHar), 7.65-7.70 (2H, m, 2xHar), 16.30 (1H, brs, NH);

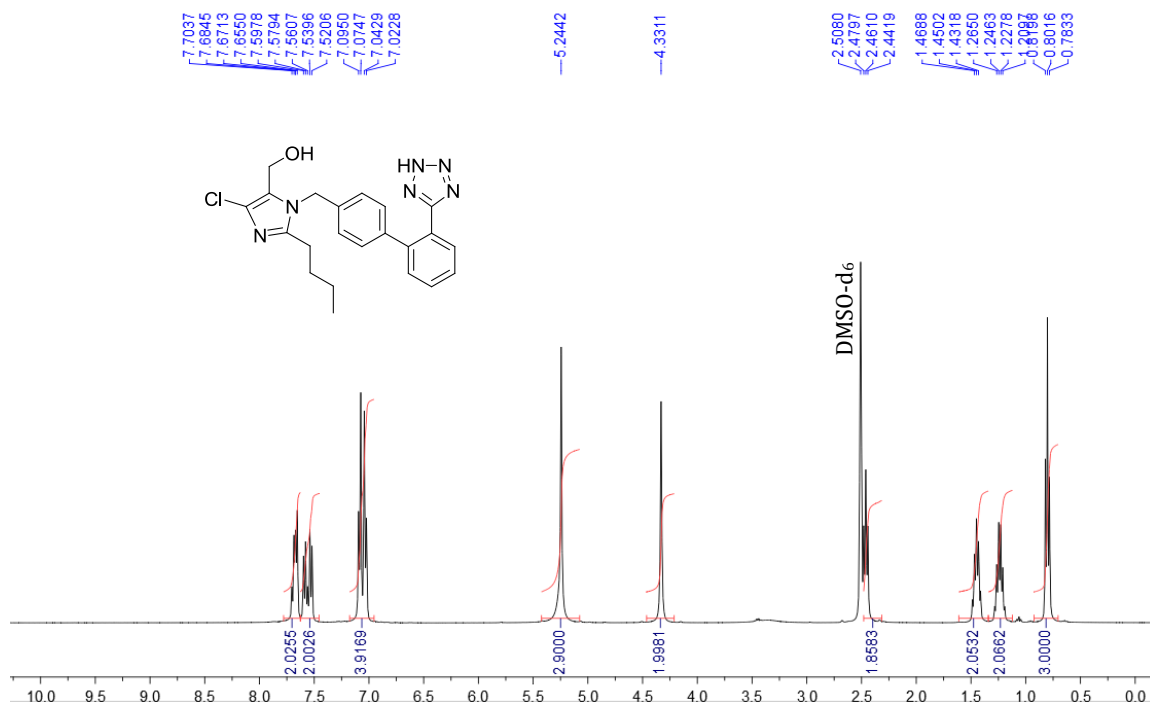
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 14.08 (C-1), 19.02 (C-2), 22.09 (C-4), 26.25 (C-3), 29.47 (C-9), 46.87 (C-8), 51.81 (C-17), 55.38 (C-6), 56.50 (C-14), 123.96 (C-12), 125.71 (C-20), 126.11 (C-19), 126.75 (C-18), 128.07 (C-11), 128.30 (C-15), 129.59 (C-21), 131.05 (C-16), 131.54 (C-10), 136.67 (C-13), 138.88 (C-7), 141.50 (C-5), 147.85 (C-22);

MS - ES (+): m/z (%) = 423, 425 [(M + H) $^+$, $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$, 100, 33];

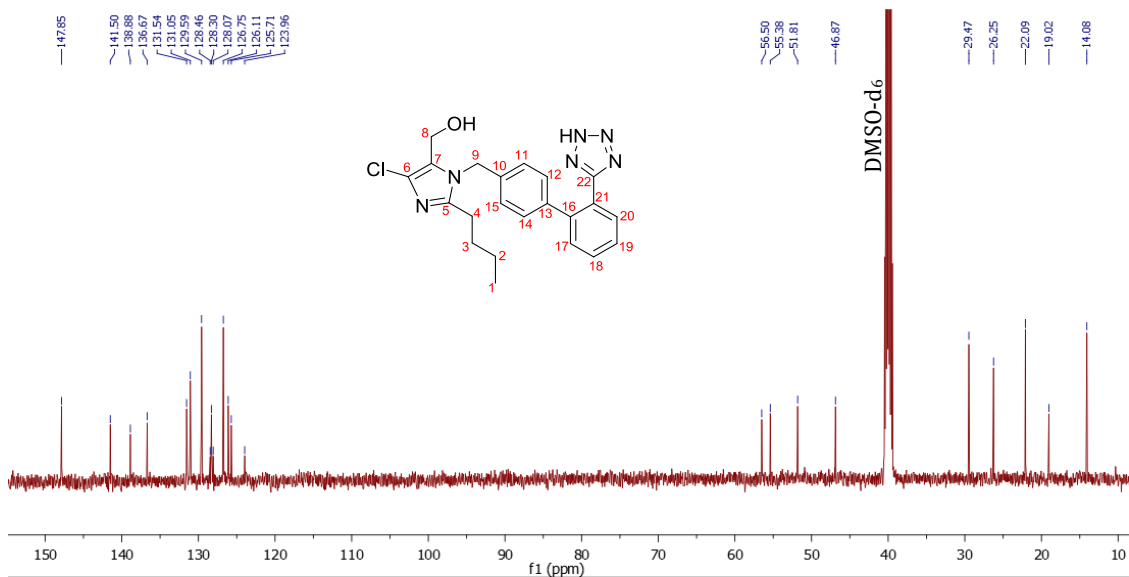
HRMS (TOF MS ES+) (m/z): obliczone dla $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{OCl}$ [M+H] $^+$: 423.1700; zmierzone: 423.1700.



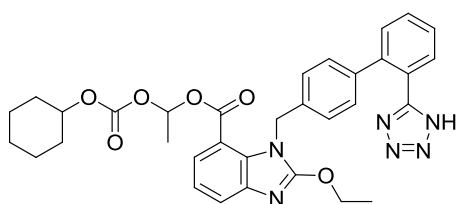
Rys. 40. Widmo FT-IR związku LOS-H.



Rys. 41. Widmo ^1H NMR związku LOS-H.



Rys. 42. Widmo ^{13}C NMR związku LOS-H.



Kandesartan (CAN) w postaci estru cyleksetylowego

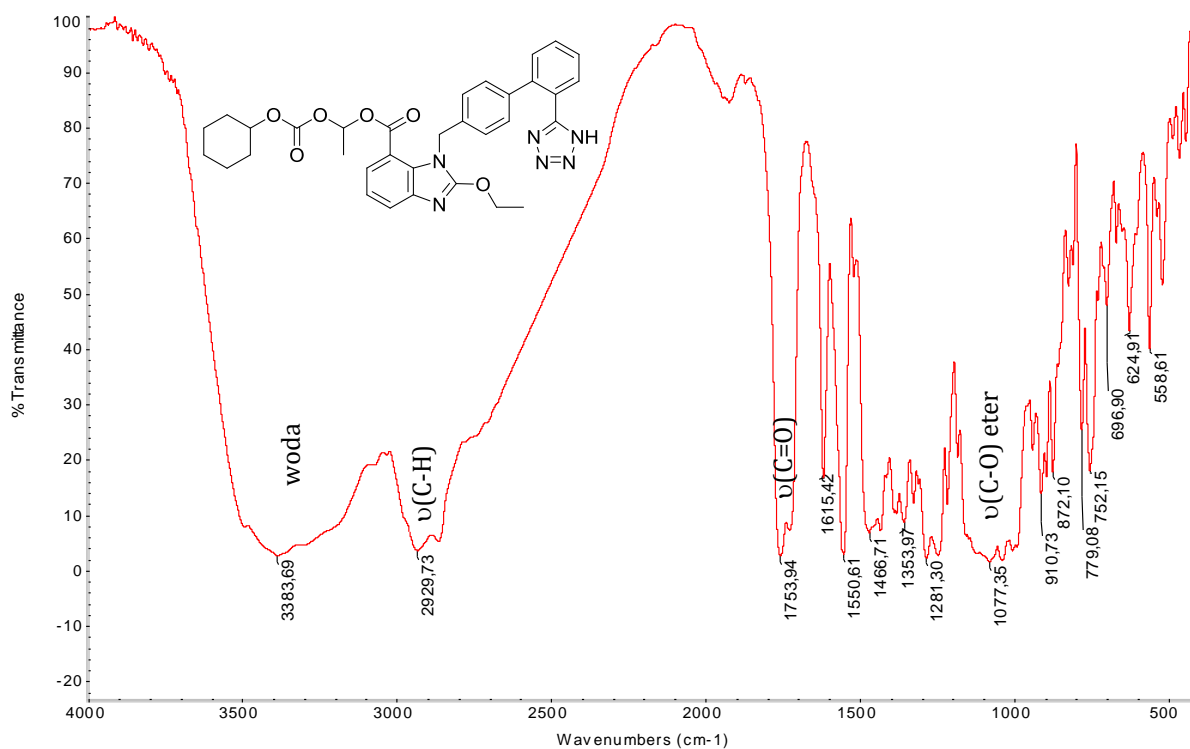
t.t. 180-186 °C

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 1.15-1.40 (6H, m, 3 x CH_2 cykloheksan) 1.41 (6H, 2 x t, 2 x CH_3), 1.61 (2H, s, CH_2 cykloheksan), 1.82 (2H, s, CH_2 cykloheksan), 4.57 (1H, pent, CH), 4.61 (2H, q, CH_2CH_3), 5.50 (2H, s, CH_2N), 6.79 (1H, q, CHCH_3), 6.87 (2H, d, 2 x H_{ar}), 6.99 (2H, d, 2 x H_{ar}), 7. (1H, t, H_{ar}), 7.42-7.63 (4H, m, 4 x H_{ar}), 7.73 (1H, d, H_{ar});

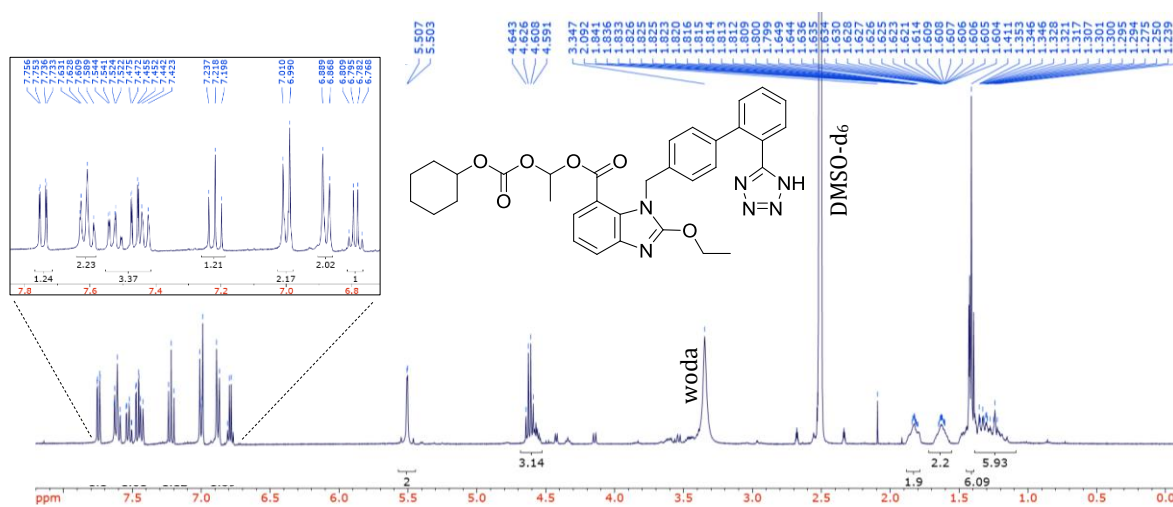
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ = 14.05 (C-1), 19.59 (C-12), 23.40 (C-16, C-18), 23.44 (C-17), 31.34 (C-15, C-19), 46.73 (C-20), 67.23 (C-2), 77.26 (C-14), 92.37 (C-11), 114.58 (C-8), 121.38 (C-28), 126.92 (C-5), 128.24 (C-6), 129.55 (C-7), 131.02 (C-23, C-25), 131.09 (C-30, C-31), 131.41 (C-29, C-22, C-26), 131.76 (C-9), 136.49 (C-27, C-32), 138.84 (C-21), 141.34 (C-4, C-24), 142.23 (C-13), 152.42 (C-3), 158.86 (C-33), 164.05 (C-10);

MS - ES (+): m/z (%) = 611 [(M + H) $^+$, 100], 633 [(M + Na) $^+$, 45];

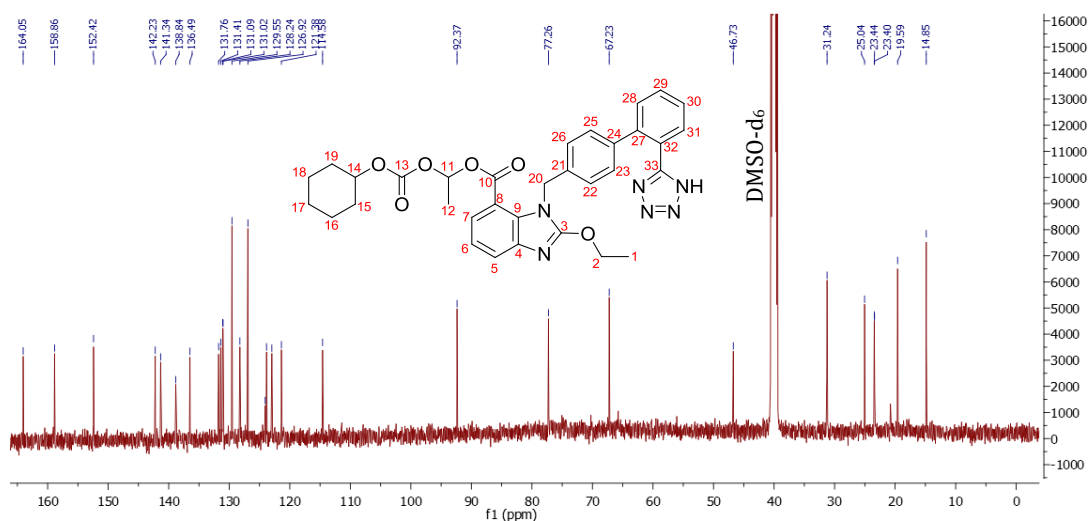
HRMS (TOF MS ES+) (m/z): obliczone dla $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_6$ [M+H] $^+$: 611.2618; zmierzone: 611.2629.



Rys. 43. Widmo FT-IR związku CAN.



Rys. 44. Widmo ¹H NMR związku CAN.



Rys. 45. Widmo ^{13}C NMR związku CAN.

3.3. Procedura przeprowadzania zmodyfikowanego testu Microtox®

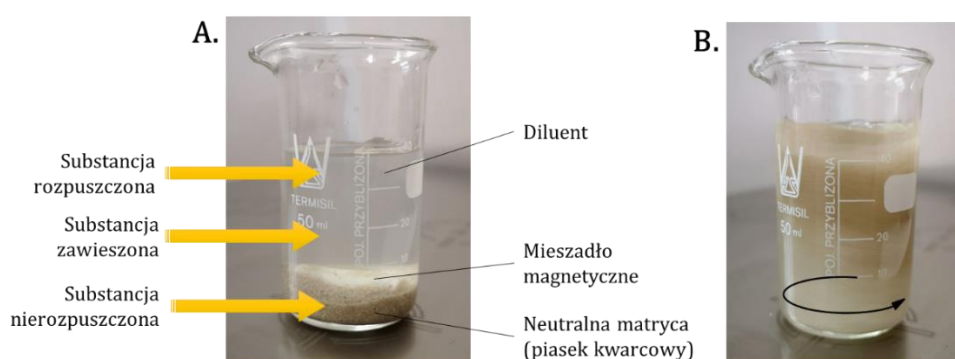
W badaniach ekotoksykologicznych użyto bakterii *Aliivibrio fischeri* (NRRL B-11177). Pomiar zahamowania bioluminescencji prowadzono z wykorzystaniem aparatu Microtox® Model 500 Analyzer (MODERNWATER Inc., New Castle, USA) opisanego w **podrozdziale 2.3. Części eksperymentalnej**.

Ze względu na fakt, że badane substancje czynne są w większości słabo rozpuszczalne w wodzie niemożliwe było zastosowanie procedury wykorzystującej roztwory wodne badanego związku (81.9% Basic Test) – tak jak w przypadku badanych soli amoniowych. Wobec tego zastosowano protokół Basic Solid Phase Test (BSPT), który pozwala na bezpośredni kontakt bakterii z badaną próbką w postaci zawiesiny. W standardowym protokole BSPT 7 g badanej próbki (gleb, osadów dennych) jest zawieszane w 35 mL diluentu – w ten sposób powstaje wstępna zawiesina badanej próbki. Jako, że standardowy protokół BSPT przeznaczony jest wyłącznie do badania 7-gramowych próbek gleby i osadów dennych, wprowadzono pewne modyfikacje pozwalające na zastosowanie tego testu do badania słabo rozpuszczalnych API. W pierwszym etapie przygotowano 7 g matrycy „zanieczyszczonej” znaną ilością badanej API. W tym przypadku, jako inertną matrycę, zamiast gleby, zastosowano piasek kwarcowy o wielkości ziaren 0.2-0.7 mm (wielkość określona z wykorzystaniem

skaningowego mikroskopu elektronowego). Zanieczyszczona matryca została przygotowana poprzez zmieszanie:

- odpowiedniej ilości formułacji farmaceutycznych ARBs lub ARB + HCT, w ilości od 1 do 8 rozkruszonych tabletek (masa pojedynczej tabletki zawierała się w przedziale 0.2-0.7 g), w zależności od toksyczności badanej API;
- analogicznej ilości czystej API, czystych mieszanin ARB + HCT, wyizolowanych substancji pomocniczych (CZĘŚĆ 1 badań) lub pojedynczych substancji pomocniczych oraz ich mieszanin z ARBs lub innymi substancjami pomocniczymi (CZĘŚĆ 2 badań)

oraz dopełnienie do masy 7 g z użyciem piasku kwarcowego. Dalsze etapy testu prowadzone były w oparciu o standardowy protokół BSPT. Wszystkie przygotowane próbki zostały zawieszone w 35 mL diluentu Solid Phase Test Diluent (SPTD). W przypadku najslabiej rozpuszczalnych próbek VAL i HCT, przygotowano dodatkowe serie zawieszono w roztworze 4% (v/v) MeOH/SPTD (**Rys. 46A**). Reprezentatywna próbka (2 mL) do dalszych rozcieńczeń, zawierająca zarówno fazę ciekłą, jak i stałą została pobrana w trakcie mieszania zawiesiny próbki na mieszadle magnetycznym ze środka utworzonego wiru (**Rys. 46B**). Seria rozcieńczonych roztworów została następnie wykorzystana do wyznaczenia wartości EC_{50} (EC – ang. *effective concentration*), które odnosi się do stężenia toksykanta powodującego 50% zahamowanie bioluminescencji populacji bakterii.



Rys. 46. Zanieczyszczona matryca zawierająca badaną substancję zawieszona w diluencie (A.); Proces mieszania zanieczyszczonej matrycy z badaną substancją na mieszadle magnetycznym (B.).

Dodatkowe pomiary w 4% (v/v) MeOH/SPTD prowadzono dla VAL i HCT. W przypadku VAL, zebranie reprezentatywnej próbki z zawiesiny VAL w standardowym SPTD było trudne ze względu na hydrofobowe właściwości tej substancji, której pewne

ilości utrzymywały się na powierzchni roztworu, nawet podczas mieszania na mieszadle magnetycznym. W przeciwieństwie do VAL, zawiesina HCT w SPTD była homogeniczna, lecz pomiary te przeprowadzono także w 4% (v/v) MeOH/SPTD w celach porównawczych. W celu potwierdzenia braku toksyczności związanej z piaskiem kwarcowym używanym jako matryca do przygotowywania próbek, przeprowadzono kontrolne badanie ekotoksyczności piasku kwarcowego w SPTD oraz 4% (v/v) MeOH/SPTD.

Zahamowanie bioluminescencji mierzono po 5, 15 i/lub 30 minutach ekspozycji bakterii na badaną próbkę. Wartości EC_{50} , wraz z odpowiadającymi im 95% przedziałami ufności wyznaczono z wykorzystaniem oprogramowania Microtox Omni Software™.

3.4. Obliczenia toksyczności mieszanin

Toksyczność badanych mieszanin ARBs (VAL, LOS-K, TEL) z HCT (z/bez substancji pomocniczych) została obliczona przy pomocy modeli CA (ang. *concentration addition*) i IA (ang. *independent action*) oraz porównana z wartościami eksperymentalnymi. [299] Przewidywanie efektu toksycznego dwuskładnikowej mieszaniny w założeniach modelu CA opiera się na wykorzystaniu poniższego wzoru:

$$EC_{50,mix} = \left(\frac{p_A}{EC_{50,A}} + \frac{p_B}{EC_{50,B}} \right)^{-1} \quad (3.)$$

gdzie: $EC_{50,mix}$ – całkowite stężenie mieszaniny, które powoduje 50% zahamowanie bioluminescencji; p_A – ułamek masowy związku A w mieszaninie; p_B – ułamek masowy związku B w mieszaninie; $EC_{50,A}$ – wartość EC_{50} związku A użytego pojedynczo (z/bez substancji pomocniczych); $EC_{50,B}$ – wartość EC_{50} związku B użytego pojedynczo.

W przypadku modelu IA zastosowano poniższy wzór:

$$E(c_{mix}) = 1 - [(1 - e_A)(1 - e_B)] \quad (4.)$$

gdzie: $E(c_{mix})$ – całkowity efekt toksyczny mieszaniny w danym stężeniu; e_A – efekt wywoływany przez związek A w tym stężeniu; e_B – efekt wywoływany przez związek B w tym stężeniu. $E(c_{mix})$ został obliczony z wykorzystaniem krzywych dawka-odpowieź wyznaczonej dla każdego pojedynczego składnika mieszaniny.

Stosunek ARBs do HCT w sztucznie zanieczyszczonych matrycach (matryca + ARB + HCT) był identyczny jak w badanych dwuskładnikowych formułacjach ARBs z HCT. Toksyczność formułacji APIs została obliczona z wykorzystaniem wartości EC_{50} czystych APIs (bez substancji pomocniczych) oraz wartości EC_{50} odpowiednich substancji pomocniczych (masy tabletkowej). Toksyczność każdej z czystych mieszanin ARB + HCT została obliczona z wykorzystaniem wartości EC_{50} czystych API (bez substancji pomocniczych). Toksyczność mieszanin ARB + HCT w formułacji farmaceutycznej (z substancjami pomocniczymi) została obliczona z wykorzystaniem wartości EC_{50} uzyskanych dla farmaceutycznej formułacji danej API (z substancjami pomocniczymi). W przypadku mieszaniny VAL + HCT, toksyczność mieszanin została obliczona dla dwóch zastosowanych diluentów (SPTD oraz 4% (v/v) MeOH/SPTD).

Wartość współczynnika MDR (ang. *model deviation ratio*) pozwalająca na klasyfikację efektów synergistycznych i antagonistycznych obserwowanych w badanych mieszaninach została obliczona wg wzoru:

$$MDR = \frac{EC_{50,mix} \text{ obliczona}}{EC_{50,mix} \text{ eksperymentalna}} \quad (5.)$$

gdzie: $EC_{50,mix} \text{ obliczona}$ – wartość EC_{50} obliczona z wykorzystaniem modelu CA/IA; $EC_{50,mix} \text{ eksperymentalna}$ – wartość EC_{50} otrzymana w wyniku przeprowadzenia testu Microtox[®]. W oparciu o wartość współczynnika MDR, efekty zostały sklasyfikowane jako: synergistyczne ($MDR \geq 2$), addytywne ($0.5 < MDR < 2$) lub antagonistyczne ($MDR \leq 0.5$).^[300]

3.5. Analiza statystyczna

Wartości EC_{50} zostały obliczone z wykorzystaniem oprogramowania Microtox Omni Software[™] w oparciu o analizę regresji liniowej. Dla każdego pomiaru, w celu oceny jakości otrzymanych wyników wyznaczono 95% przedział ufności oraz współczynnik determinacji (R^2). Statystyczne opracowanie danych eksperymentalnych prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania OriginPro 16. Statystycznie istotne różnice między otrzymanymi wynikami określono za pomocą testu t-Studenta dla prób zależnych na poziomie istotności $\alpha = 0.05$. Wyniki przedstawiono w materiałach dodatkowych niniejszej dysertacji.

MATERIAŁY DODATKOWE

Tabela S1. Wartości EC₅₀ badanych związków wobec bakterii *A. fischeri* otrzymane po 5 i 15 minutach ekspozycji, wraz z 95% przedziałem ufności i współczynnikiem determinacji (R²). CZĘŚĆ 1 badań.

API	Postać	Diluent	Powtórzenie	EC ₅₀ 5 min [mg/L] (95% przedział ufności)	EC ₅₀ 15 min [mg/L] (95% przedział ufności)	Współczynnik determinacji (R ²) 5; 15 min
VAL	VAL (czysty)	SPTD	1.	169.24 (79.80-358.82)	341.70 (338.33-358.97)	0.8281; 0.9987
			2.	172.06 (102.02-290.17)	242.80 (103.75-568.26)	0.9527; 0.9927
			3.	88.31 (83.90-92.91)	120.04 (99.20-145.28)	0.9997; 0.9995
			Średnia:	143.20 ± 38.83	234.83 ± 90.66	
		4% (v/v) MeOH/SPTD	1.	84.08 (15.83-446.55)	84.35 (19.19-370.77)	0.9509; 0.9615
			2.	238.66 (102.09-557.85)	202.56 (119.71-342.94)	0.9493; 0.9236
			3.	74.63 (32.10-173.60)	69.81 (28.30-172.31)	0.8853; 0.8625
			Średnia:	132.46 ± 75.19	118.92 ± 59.46	
	Formulacja VAL Valtap 160mg	SPTD	1.	22.03 (15.25-31.93)	19.81 (13.81-28.66)	0.9765; 0.9779
			2.	25.87 (18.09-37.01)	20.82 (16.87-25.70)	0.9770; 0.9925
			3.	21.23 (14.72-30.63)	17.46 (12.09-25.22)	0.9975; 0.9974
			Średnia:	23.04 ± 2.03	19.36 ± 1.41	
		4% (v/v) MeOH/SPTD	1.	76.84 (47.80-123.33)	58.59 (39.23-87.45)	0.9692; 0.9723
			2.	65.69 (51.64-83.56)	42.73 (30.67-59.56)	0.9950; 0.9887
			3.	96.10 (54.38-169.84)	75.49 (58.18-97.97)	0.9809; 0.9859
			Średnia:	79.54 ± 12.56	58.93 ± 13.37	
	Formulacja VAL + HCT Valtap + HCT 160mg + 12.5mg	SPTD	1.	41.30 (33.12-51.48)	32.84 (27.05-39.88)	0.9932; 0.9936
2.			35.83 (16.67-70.73)	28.06 (17.61-44.70)	0.9265; 0.9610	

	4% (v/v) MeOH/SPTD		3.	62.12 (54.40-70.93)	58.56 (50.89-67.27)	0.9985; 0.9980	
			Średnia:	45.42 ± 11.33	39.82 ± 13.39		
			1.	66.41 (47.60-92.69)	49.01 (28.88-83.15)	0.9567; 0.9012	
			2.	60.31 (26.47-137.41)	59.90 (20.03-179.06)	0.9588; 0.9124	
			3.	85.20 (45.50-160.30)	60.41 (31.60-115.23)	0.8737; 0.8472	
	Średnia:	70.64 ± 10.59	56.44 ± 5.25				
	VAL + HCT (czyste)	SPTD		1.	1319.49 (979.90-1799.12)	1141.56 (343.41-3841.24)	0.9873; 0.9722
				2.	601.34 (543.51-673.93)	493.39 (496.40-591.11)	0.9964; 0.9910
				3.	634.85 (478.34-852.45)	525.92 (391.91-714.59)	0.9743; 0.9728
				Średnia:	851.89 ± 330.92	720.29 ± 298.17	
		4% (v/v) MeOH/SPTD		1.	82.64 (15.64-436.60)	94.16 (8.187-1083)	0.8457; 0.7053
				2.	127.90 (35.39-462.50)	154.60 (67.10-356.2)	0.8513; 0.9894
				3.	160.10 (30.91-829.10)	189.50 (6.673-5383)	0.9675; 0.9040
				Średnia:	123.55 ± 31.77	146.09 ± 39.38	
	Masa tabletkowa VAL (Valtap)	SPTD		1.	3262.95 (373.80-28268.33)	1030.60 (299.37-3546.18)	0.7455; 0.7324
				2.	3613.18 (11.19-1166244)	1397.27 (769.29-2537.51)	0.8330; 0.9232
				3.	1454.53 (688.89-3071.08)	873.45 (538.93-1415.55)	0.8857; 0.9298
				Średnia:	2776.89 ± 945.91	1100.44 ± 219.48	
		4% (v/v) MeOH/SPTD		1.	2631.03 (1870.49-3861.60)	1283.24 (831.89-1980.35)	0.9942; 0.9585
				2.	4067.73 (419.97-39403.15)	1218.68 (423.99-3503.70)	0.8216; 0.8413
3.				973.47 (448.62-2112.30)	817.17 (714.67-934.39)	0.8961; 0.9946	
Średnia:				2557.41 ± 1264.30	1106.36 ± 206.18		
LOS-K	LOS-K (czysty)	SPTD	1.	490.17 (307.45-780.93)	653.65 (319.89-1335.30)	0.9196; 0.9188	
			2.	594.25 (343.09-1028.98)	694.10 (541.64-889.82)	0.9101; 0.9906	
			3.	667.23 (490.17-908.21)	629.33 (172.93-2289.90)	0.9858; 0.9691	

	Formulacja LOS-K Lozap 50mg		Średnia:	583.88 ± 72.65	659.02 ± 26.71	
			1.	939.60 (524.11-1684.61)	1200.95 (711.35-2026.57)	0.9391; 0.9535
			2.	484.79 (220.39-1066.60)	612.64 (222.60-1685.46)	0.8247; 0.7855
			3.	603.02 (396.55-916.69)	809.21 (528.07-1239.42)	0.9536; 0.9450
	Średnia:		675.81 ± 192.68	874.27 ± 244.54		
	Formulacja LOS-K + HCT Lozap HCT 50mg+12.5mg		1.	362.64 (132.21-995.00)	369.86 (138.29-989.29)	0.8247; 0.8353
			2.	464.14 (152.14-1415.71)	451.79 (177.57-1149.29)	0.9761; 0.9832
			3.	405.43 (186.83-926.54)	398.65 (146.34-1029.42)	0.9221; 0.9302
			Średnia:	410.74 ± 41.61	406.77 ± 33.94	
	LOS-K + HCT (czyste)		1.	469.36 (345.79-637.07)	454.21 (319.93-644.86)	0.9713; 0.9622
			2.	371.50 (253.93-543.36)	361.71 (223.43-585.50)	0.9476; 0.9155
			3.	475.28 (315.35-702.42)	467.97 (302.13-673.26)	0.9853; 0.9468
			Średnia:	438.71 ± 47.59	427.96 ± 47.18	
	Masa tabletkowa LOS-K (Lozap)		1.	7876 (5450-11381)	8155 (6173-10774)	0.9740; 0.9890
			2.	6852 (4239-11073)	8029 (7380-8735)	0.9413; 0.9990
			3.	9442 (7412-12029)	10079 (4406-23054)	0.9930; 0.9267
Średnia:		8056.67 ± 1065.05	8754.33 ± 938.09			
TEL	TEL (czysty)	SPTD	1.	272.50 (201.95-367.58)	122.49 (81.35-184.37)	0.9644; 0.9470
			2.	97.95 (69.88-137.32)	61.27 (56.38-66.64)	0.9609; 0.9978
			3.	219.10 (158.43-302.95)	115.35 (81.90-162.46)	0.9593; 0.9575
			Średnia:	196.52 ± 73.02	99.70 ± 27.33	
	Formulacja TEL Telmizek 80mg		1.	1350.42 (694.83-2917.53)	245.45 (137.69-470)	0.8760; 0.8534
			2.	888.15 (345.42-2283.92)	287.27 (131.38-627.85)	0.7721; 0.7611

	Formulacja TEL + HCT Telmizek COMBI 80mg + 25mg		3.	882.66 (309.95-2514.33)	433.10 (162.47-1154.76)	0.7252; 0.7495
			Średnia:	1040.41 ± 219.22	321.94 ± 80.43	
			1.	1452.00 (846.24-2488.80)	444.48 (299.40-659.76)	0.9300; 0.9397
			2.	1131.40 (617.76-2035.20)	232.08 (142.80-377.16)	0.9024; 0.9143
			3.	3562.80 (1364.40-9304.80)	1230.00 (727.08-2079.60)	0.8727; 0.9165
			Średnia:	2045.40 ± 1081.42	635.52 ± 429.21	
	TEL + HCT (czysty)		1.	2184.00 (1386.00-3441.60)	783.84 (536.88-1144.44)	0.9455; 0.9437
			2.	1666.90 (909.12-3054.00)	646.92 (417.6-1007.28)	0.8840; 0.9322
			3.	3013.20 (1762.80-5149.20)	972.84 (671.40-1410.00)	0.9456; 0.9587
			Średnia:	2288 ± 554.56	801.20 ± 133.62	
	Masa tabletkowa TEL (Telmizek)		1.	13265.75 (5660.11-31076.53)	10607.42 (9428.82-11931.88)	0.9955; 0.9999
			2.	29970.85 (7984.38-112402.5)	24418.95 (5107.28-116825.2)	0.8859; 0.8303
			3.	18321.27 (2804.18-110638.1)	12141.25 (1379.51-106850.6)	0.8003; 0.9667
			Średnia:	20519.29 ± 6994.69	15722.54 ± 6181.09	
	HCT	HCT (czysty)	SPTD	1.	1859.78 (250.31-13821.41)	1629.90 (450.66-5897.01)
2.				2193.42 (599.28-8028.17)	1259.06 (354.13-4353.31)	0.8515; 0.8162
3.				2195.02 (1481.60-3250.22)	1571.95 (1022.00-2418.51)	0.9932; 0.9809
Średnia:				2082.73 ± 157.66	1487.02 ± 162.88	
			4% (v/v) MeOH/SPTD	1.	2704.54 (2278.02-3210.27)	1914.00 (808.93-4528.32)

			2.	2686.16 (67.12-107480)	2110.01 (1008.05-4418.01)	0.8921; 0.9281		
			3.	3001.90 (2153.64-4125.78)	2143.08 (742.64-45174.25)	0.9289; 0.8988		
			Średnia:	2797.53 ± 144.70	2055.70 ± 101.10			
	Formulacja HCT Hydrochlorothiazidum Polpharma (25 mg)	SPTD		1.	1653.84 (1221.23-2238.12)	1022.48 (856.77-1220.11)	0.9909; 0.9950	
				2.	1503.31 (507.97-4449.10)	966.29 (626.58-1489.74)	0.9225; 0.9685	
				3.	1992.28 (1307.12-3037.90)	1064.94 (706.24-1605.95)	0.9825; 0.9725	
				Średnia:	1716.47 ± 204.47	1017.90 ± 40.41		
		4% (v/v) MeOH/SPTD		1.	1771.98 (512.44-6128.28)	1251.88 (522.33-2999.59)	0.8702; 0.8975	
				2.	1286.68 (450.98-3670.06)	665.21 (478.91-923.82)	0.8927; 0.9740	
				3.	1130.03 (436.42-3125.74)	639.06 (247.25-1020.13)	0.9124; 0.9267	
				Średnia:	1369.23 ± 273.28	852.05 ± 282.92		
		Masa tabletkowa HCT (Hydrochlorothiazidum Polpharma)	SPTD		1.	33040 (6010-181625)	40843 (7700-216654)	0.7768; 0.8111
					2.	32651 (8095-131691)	41922 (7246-242548)	0.8397; 0.8169
					3.	34005 (14466-79934)	25594 (7198-91002)	0.9775; 0.9887
					Średnia:	33232.00 ± 569.20	36119.67 ± 7455.79	

Tabela S2. Statystyczne opracowanie otrzymanych danych eksperymentalnych (test t-Studenta dla prób zależnych, $\alpha = 0.05$). CZĘŚĆ 1 badań.

EC50 5 min						EC50 15 min						
		VAL (czysty)	Formulacja VAL	VAL + HCT (czyste)	Formulacja VAL + HCT			VAL (czysty)	Formulacja VAL	VAL + HCT (czyste)	Formulacja VAL + HCT	
SPTD						SPTD						
SPTD	VAL (czysty)					SPTD	VAL (czysty)					
	Formulacja VAL	R = 0.87 Stat $t = 4.53$ p = 0.02					Formulacja VAL	R = 0.70 Stat $t = 3.40$ p = 0.04				
	VAL + HCT (czyste)	R = 0.65 Stat $t = 3.17$ p = 0.04	R = 0.72 Stat $t = 3.53$ p = 0.04				VAL + HCT (czyste)	R = 0.61 Stat $t = 2.97$ p = 0.05	R = 0.69 Stat $t = 3.33$ p = 0.04			
	Formulacja VAL + HCT	R = 0.56 Stat $t = 2.74$ p = 0.06	R = 0.51 Stat $t = 2.55$ p = 0.06	R = 0.70 Stat $t = 3.41$ p = 0.04			Formulacja VAL + HCT	R = 0.55 Stat $t = 2.70$ p = 0.06	R = 0.37 Stat $t = 1.96$ p = 0.09	R = 0.65 Stat $t = 3.18$ p = 0.04		
4% (v/v) MeOH/SPTD						4% (v/v) MeOH/SPTD						
4% (v/v) MeOH/SPTD	VAL (czysty)					4% (v/v) MeOH/SPTD	VAL (czysty)					
	Formulacja VAL	R = 0.15 Stat $t = 0.87$ p = 0.24					Formulacja VAL	R = 0.21 Stat $t = 1.18$ p = 0.18				
	VAL + HCT (czyste)	R = 0.06 Stat $t = 0.16$ p = 0.44	R = 0.46 Stat $t = 2.30$ p = 0.07				VAL + HCT (czyste)	R = 0.11 Stat $t = 0.55$ p = 0.32	R = 0.70 Stat $t = 3.38$ p = 0.04			
	Formulacja VAL + HCT	R = 0.18 Stat $t = 1.05$ p = 0.20	R = 0.92 Stat $t = 5.04$ p = 0.02	R = 0.59 Stat $t = 2.87$ p = 0.05			Formulacja VAL + HCT	R = 0.28 Stat $t = 1.53$ p = 0.13	R = 0.07 Stat $t = 0.25$ p = 0.41	R = 0.75 Stat $t = 3.68$ p = 0.03		
4% (v/v) MeOH/SPTD						4% (v/v) MeOH/SPTD						
					Masa tabletkowa VAL						Masa tabletkowa VAL	
SPTD	VAL (czysty)	R = 0.07 Stat $t = 0.24$ p = 0.41				SPTD	VAL (czysty)	R = 0.30 Stat $t = 1.64$ p = 0.12				
	Formulacja VAL		R = 0.95 Stat $t = 5.56$				Formulacja VAL		R = 0.77 Stat $t = 3.79$			

			p = 0.01												
	VAL + HCT (czyste)			R = 0.59 Stat <i>t</i> = 2.86 p = 0.05											
	Formulacja VAL + HCT			R = 1.00 Stat <i>t</i> = 40.38 p = 0.0003											
	Masa tabletkowa VAL							R = 0.95 Stat <i>t</i> = 0.65 p = 0.29							
	VAL + HCT (czyste)														
	Formulacja VAL + HCT														
	Masa tabletkowa VAL													R = 0.64 Stat <i>t</i> = 0.05 p = 0.48	
EC₅₀ 5 min															
		LOS-K (czysty)	Formulacja LOS-K	LOS-K + HCT (czyste)	Formulacja LOS-K + HCT										
		SPTD													
SPTD	LOS-K (czysty)														
	Formulacja LOS-K	R = 0.10 Stat <i>t</i> = 0.51 p = 0.33													
	LOS-K + HCT (czyste)	R = 0.05 Stat <i>t</i> = 2.31 p = 0.07	R = 0.66 Stat <i>t</i> = 2.03 p = 0.09												
	Formulacja LOS-K + HCT	R = 0.51 Stat <i>t</i> = 3.91 p = 0.03	R = 0.94 Stat <i>t</i> = 1.61 p = 0.12	R = 0.05 Stat <i>t</i> = 0.07 p = 0.48											
EC₅₀ 15 min															
		LOS-K (czysty)	Formulacja LOS-K	LOS-K + HCT (czyste)	Formulacja LOS-K + HCT										
		SPTD													
SPTD	LOS-K (czysty)														
	Formulacja LOS-K	R = 0.21 Stat <i>t</i> = 1.18 p = 0.18													
	LOS-K + HCT (czyste)	R = 0.97 Stat <i>t</i> = 4.46 p = 0.02	R = 0.67 Stat <i>t</i> = 2.93 p = 0.05												
	Formulacja LOS-K + HCT	R = 0.74 Stat <i>t</i> = 15.65 p = 0.002	R = 0.94 Stat <i>t</i> = 2.39 p = 0.07	R = 0.05 Stat <i>t</i> = 0.03 p = 0.49											
EC₅₀ 5 min															
		TEL (czysty)	Formulacja TEL	TEL + HCT (czyste)	Formulacja TEL + HCT										
		SPTD													
SPTD	TEL (czysty)														
	Formulacja TEL	R = 0.73 Stat <i>t</i> = 6.88 p = 0.01													
	TEL + HCT (czyste)	R = 0.96 Stat <i>t</i> = 5.73 p = 0.01	R = 0.14 Stat <i>t</i> = 2.82 p = 0.05												
	Formulacja TEL + HCT	R = 0.50 Stat <i>t</i> = 2.48 p = 0.07	R = 0.40 Stat <i>t</i> = 1.20 p = 0.18	R = 0.11 Stat <i>t</i> = 0.60 p = 0.30											
EC₅₀ 15 min															
		TEL (czysty)	Formulacja TEL	TEL + HCT (czyste)	Formulacja TEL + HCT										
		SPTD													
SPTD	TEL (czysty)														
	Formulacja TEL	R = 0.20 Stat <i>t</i> = 3.94 p = 0.03													
	TEL + HCT (czyste)	R = 1.00 Stat <i>t</i> = 8.66 p = 0.006	R = 0.80 Stat <i>t</i> = 8.01 p = 0.008												
	Formulacja TEL + HCT	R = 0.34 Stat <i>t</i> = 1.83 p = 0.10	R = 0.91 Stat <i>t</i> = 1.24 p = 0.17	R = 0.14 Stat <i>t</i> = 0.78 p = 0.26											

		EC ₅₀ 5 min						EC ₅₀ 15 min			
		HCT (czysty)	Formulacja HCT	HCT (czysty)	Formulacja HCT			HCT (czysty)	Formulacja HCT	HCT (czysty)	Formulacja HCT
		SPTD		4% (v/v) MeOH/SPTD				SPTD		4% (v/v) MeOH/SPTD	
SPTD	HCT (czysty)		R = 0.45 Stat <i>t</i> = 2.26 p = 0.08			SPTD	HCT (czysty)		R = 0.92 Stat <i>t</i> = 5.05 p = 0.02		
	Formulacja HCT						Formulacja HCT				
4% (v/v) MeOH/SPTD	HCT (czysty)	R = 0.46 Stat <i>t</i> = 6.41 p = 0.01			R = 0.56 Stat <i>t</i> = 4.99 p = 0.06	4% (v/v) MeOH/SPTD	HCT (czysty)	R = 0.51 Stat <i>t</i> = 3.47 p = 0.04			R = 0.88 Stat <i>t</i> = 4.66 p = 0.02
	Formulacja HCT		R = 0.44 Stat <i>t</i> = 1.11 p = 0.19				Formulacja HCT		R = 0.04 Stat <i>t</i> = 0.83 p = 0.25		

Tabela S3. Parametry krzywych uzyskane dla mieszanin (przewidywanie toksyczności w oparciu o model IA). CZĘŚĆ 1 badań.

Mieszanina	$E_{mix} = a \cdot \ln(c_{mix}) + b$					
	EC ₅₀ , 5 min			EC ₅₀ , 15 min		
	a	b	R ²	a	b	R ²
VAL + masa tabletkowa	0.2014	-0.4153	0.95	0.2214	-0.5795	0.92
VAL + masa tabletkowa *	0.2485	-0.6444	0.97	0.2523	-0.6761	0.93
VAL + HCT (czyste)	0.2491	-0.7419	0.97	0.2808	-0.9933	0.97
VAL + HCT (czyste)*	0.2666	-0.7746	0.96	0.2498	-0.6439	0.95
VAL + HCT (formulacja)	0.3451	-0.6731	0.97	0.3214	-0.5306	0.96
VAL + HCT (formulacja)*	0.2774	-0.7152	0.99	0.2793	-0.6613	0.97
LOS-K + masa tabletkowa	0.5732	-3.3725	0.98	0.7409	-4.5998	0.97
LOS-K + HCT (czyste)	0.3520	-1.6864	0.98	0.3934	-1.9761	0.98
LOS-K + HCT (formulacja)	0.2685	-1.1480	0.98	0.3237	-1.5261	0.97
TEL + masa tabletkowa	0.1665	-0.4076	0.99	0.1786	-0.3645	0.97
TEL + HCT (czyste)	0.1771	-0.3942	0.98	0.1784	-0.3146	0.97
TEL + HCT (formulacja)	0.1249	-0.2737	1.00	0.1188	-0.1092	1.00
HCT formulacja	0.2554	-1.3988	0.99	0.3019	-1.7524	0.99

* diluent: 4% (v/v) MeOH/SPTD

Tabela S4. Parametry krzywych uzyskane dla mieszanin (przewidywanie toksyczności w oparciu o model IA). CZĘŚĆ 2 badań.

$E_{mix} = a \cdot \ln(C_{mix}) + b$			
Mieszanina	EC _{50, 30 min}		
	a	b	R ²
VAL + celuloza mikrokrystaliczna	0.1816	-0.3603	0.98
VAL + węgiel magnezu	0.1193	0.1653	0.93
VAL + powidon K25	0.2298	-0.6985	0.96
VAL + laurylosiarczan sodu	0.0736	0.7035	0.87
VAL + krzemionka koloidalna	0.2236	-0.5748	0.99
węgiel magnezu + powidon K25	0.1729	-0.1947	0.98
węgiel magnezu + krzemionka koloidalna	0.1176	0.1594	0.99
powidon K25 + krzemionka koloidalna	0.2562	-1.1072	0.99
powidon K25 + krzemionka koloidalna + węgiel magnezu	0.1784	-0.1751	0.95
VAL + powidon K25 + krzemionka koloidalna	0.3348	-1.1889	0.95
LOS-K + celuloza mikrokrystaliczna	0.1630	-0.3345	0.97
LOS-K + mannitol	0.1687	-0.3917	0.99
LOS-K + krzemionka koloidalna	0.1552	-0.2710	0.97
LOS-K + talk	0.1163	0.0532	0.95
TEL + mannitol	0.0316	0.4778	1.00
TEL + powidon K25	0.0857	0.1425	1.00
TEL + meglumina	0.0745	0.5460	1.00
mannitol + powidon K25	0.2221	-0.9890	1.00
mannitol + meglumina	0.1565	0.0479	1.00
meglumine + powidon K25	0.2166	-0.3081	0.97

Tabela S5. Wartości pH próbek ARBs, substancji pomocniczych oraz mieszanin wykorzystywanych w testach ekotoksykologicznych (test Microtox®).

ARB/substancja pomocnicza	pH	Mieszanina	pH
VAL	4.970	VAL + celuloza mikrokrystaliczna	4.256
LOS-K	7.750	VAL + węgiel magnezu	7.408
TEL	8.036	VAL + powidon K25	3.990
celuloza mikrokrystaliczna	6.722	VAL + laurylosiarczan sodu	3.961
laurylosiarczan sodu	6.779	VAL + krzemionka koloidalna	4.298
węgiel magnezu (ciężki)	10.257	węgiel magnezu + powidon K25	9.559
glikolan sodowo-skrobiowy (typ A)	6.183	węgiel magnezu + krzemionka koloidalna	9.231
krzemionka koloidalna (AEROSIL R200)	4.421	powidon K25 + krzemionka koloidalna	3.919
powidon K25	3.889	powidon K25 + krzemionka koloidalna + węgiel magnezu	9.061
powidon K30	3.607	VAL + powidon K25 + krzemionka koloidalna	4.246
croscarmellose sodium	4.347	LOS-K + celuloza mikrokrystaliczna	7.101
krospowidon (typ A)	6.045	LOS-K + mannitol	6.980
meglumina	10.830	LOS-K + krzemionka koloidalna	7.405
talk	9.082	LOS-K + talk	6.987
laktoza jednowodna	5.113	TEL + mannitol	7.007
mannitol	6.390	TEL + powidon K25	5.450
preżelowana skrobia kukurydziana	5.432	TEL + meglumina	10.180
krzemionka nanoproszek	4.681	mannitol + powidon K25	6.373
koloidalna krzemionka LUDOX SM-30	9.172	mannitol + meglumina	10.493
sorbitol	7.446	meglumina + powidon K25	10.161

wszystkie substancje pomocnicze VAL	9.718
VAL + wszystkie substancje pomocnicze	5.157
wszystkie substancje pomocnicze LOS-K	7.433
LOS-K + wszystkie substancje pomocnicze	7.509
wszystkie substancje pomocnicze TEL	9.897
TEL + wszystkie substancje pomocnicze	10.033

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje (publikacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej wyłuszczone):

1. M. Turek*, M. Krzyczmonik, P. Bałczewski*, *New hopes in cancer battle - a review of new molecules and treatment strategies*, Medicinal Chemistry, 2016, 12(8), 700-719, DOI: 10.2174/1573406412666160502153700 (IF = 2.745, 70 pkt MEN)
2. M. Turek, D. Szczęsna, M. Koprowski, P. Bałczewski*, *Synthesis of 1-indanones with a broad range of biological activity*, Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2017, 13, 451-494, DOI: 10.3762/bjoc.13.48 (IF = 2.883, 70 pkt MEN)
3. M. Turek, R. Biczak, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, B. Marciniak, M. Deska, J. Skalik, P. Bałczewski*, *Ammonium haloacetates - An alternative to glyphosate?*, Chemosphere, 2018, 194, 650-656, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.055 (IF = 7.086, 100 pkt MEN)
4. R. Biczak, M. Turek, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, B. Marciniak, M. Deska, P. Krupa, I. Jatulewicz, J. Skalik, P. Bałczewski*, *An influence of structural changes in ammonium cations on ecotoxicity of 2,2'-thiodiacetate mono and bis-salts*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 155, 37-42, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.02.062 (IF = 6.291, 100 pkt MEN)
5. P. Bałczewski*, R. Biczak, M. Turek, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, B. Marciniak, M. Deska, J. Skalik, *Ammonium 2,2'- thiodiacetates - selective and environmentally safe herbicides*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 163, 408-416, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.093 (IF = 6.291, 100 pkt MNiSzW)
6. M. Turek*, P. Bałczewski, *Farmaceutyczne kokryształy antagonistów receptora angiotensyny II*, Chemistry. Environment. Biotechnology., 2019, 22, 13-19, DOI: 10.16926/cebj.2019.22.02 (5 pkt MEN)
7. M. Turek, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, R. Biczak, J. Skalik, K. Owsianik, B. Marciniak, P. Bałczewski*, *Ecotoxicity of ammonium chlorophenoxyacetate derivatives towards aquatic organisms: Unexpected enhanced toxicity upon oxygen by sulfur replacement*, Journal of Hazardous

Materials, 2020, 382, 121086, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121086 (IF = 10.588, 200 pkt MEN)

- 8. M. Turek*, E. Różycka-Sokołowska, K. Owsianik, B. Marciniak, P. Bałczewski*, *Modification of the Microtox® Basic Solid Phase Test: a New Application for the Ecotoxicological Studies on Poorly Soluble Antihypertensive Drugs*, Journal of Hazardous Materials, 2020, 122839, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122839 (IF = 10.588, 200 pkt MEN)**
9. M. Turek*, E. Różycka-Sokołowska*, M. Koprowski, B. Marciniak, P. Bałczewski*, *Role of Hydrogen Bonds in Formation of Co-amorphous Valsartan/Nicotinamide Compositions of High Solubility and Durability with Anti-hypertension and Anti-COVID-19 Potential*, Molecular Pharmaceutics, 2021, 18(5), 1970-1984, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01096 (IF = 4.939, 140 pkt MEN)
- 10. M. Turek, R. Biczak, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, K. Owsianik, B. Marciniak, P. Bałczewski*, *The need to change the approach to the safe use of herbicides by developing chiral and environmentally friendly formulations: a series of enantioselective (R)- and (S)-phenylethylammonium chloroacetates*, Green Chemistry, 2022, DOI: 10.1039/D1GC03970A (IF = 10.182, 200 pkt MEN)**

Zgłoszenia patentowe międzynarodowe:

1. M. Turek, P. Bałczewski, E. Różycka-Sokołowska, M. Makowska-Janusik, M. Koprowski, K. Owsianik, Patent Application, *A solid co-amorphous dispersion of valsartan, a method for synthesizing the same and a medical use of the dispersion*, PCT/PL2021/000028, 29.04.2021 (na podstawie P.433749, 29.04.2020)
2. M. Turek, P. Bałczewski, E. Różycka-Sokołowska, M. Koprowski, K. Owsianik, Patent Application, *A method for biotesting of a condensed phase substances and/or mixtures ecotoxicity and use of the method in ecotoxicology*, PCT/PL2021/000025, 22.04.2021 (na podstawie P.433623, 22.04.2020)

Zgłoszenia patentowe krajowe:

1. M. Turek, P. Bałczewski, E. Różycka-Sokołowska, M. Makowska-Janusik, M. Koprowski, K. Owsianik, Zgłoszenie patentowe, *Stała ko-amorficzna dyspersja walsartanu, sposób jej syntezy oraz jej medyczne zastosowanie*, P.433749, 29.04.2020
2. M. Turek, P. Bałczewski, E. Różycka-Sokołowska, M. Koprowski, K. Owsianik, Zgłoszenie patentowe, *Sposób biotestowania ekotoksyczności substancji i mieszanin skondensowanych oraz jego zastosowanie w ekotoksykologii*, P.433623, 22.04.2020

Projekty badawcze:

1. Narodowe Centrum Nauki, Preludium 17, 2019/33/N/ST5/01602:
 - kierownik projektu (*w trakcie*);
 - tytuł projektu: *Ko-kryształizacja i ko-amorfizacja antagonistów receptora angiotensyny II prowadząca do lepiej rozpuszczalnych związków o dwufunkcyjnym działaniu*;
 - kwota finansowania: 210 000 zł.
2. Inkubator Innowacyjności 4.0, „*Dostosowanie innowacyjnej technologii biotestowania ekotoksyczności substancji do analizy toksyczności ścieków*”:
 - współwykonawca projektu;
 - realizacja grudzień 2020 – maj 2021;
 - kwota finansowania 50 000 zł.

Stypendia zewnętrzne

Stypendium w 20. edycji programu L'Oréal Dla Kobiet i Nauki 2020 w kategorii doktoranckiej.

Konferencje naukowe – komunikaty ustne

1. M. Turek, *Ekotoksyczność cieczy jonowych pochodnych kwasów 1-halogenooctowych*, II Częstochowskie Forum Młodych #Nauka.LubięTo!, 13.06.2017, Częstochowa (wystąpienie ustne)

2. M. Turek, E. Różycka-Sokołowska, M. Koprowski, B. Marciniak, P. Bałczewski, *The role of hydrogen bonds in formation of co-amorphous antihypertension compositions*, European Meeting on Physical Organic Chemistry „Chemistry in the Confined Space”, 13-17.09.2021r., Karpacz, Poland (wystąpienie ustne)

Konferencje naukowe – postery

1. M. Turek, K. Giełzak-Koćwin, *Badanie własności związków kompleksowych wybranych biopierwiastków ze składnikami napojów energetyzujących*, VI Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, 11.06.2015, Łódź
2. R. Biczak, B. Pawłowska, M. Turek, P. Bałczewski, E. Różycka-Sokołowska, M. Deska, B. Marciniak, *Fitotoksyczność trichlorooctanu diizopropyloamoniowego dla roślin wyższych*, 59. Zjazd Naukowy PTChem, 19-23.09.2016, Poznań
3. B. Pawłowska, R. Biczak, M. Turek, P. Bałczewski, B. Marciniak, M. Deska, E. Różycka-Sokołowska, *Określenie fitotoksyczności chlorodifluorooctanu diizopropyloamoniowego*, 59. Zjazd Naukowy PTChem, 19-23.09.2016, Poznań
4. B. Pawłowska, P. Bałczewski, M. Turek, R. Biczak, M. Deska, B. Marciniak, E. Różycka-Sokołowska, *Toksyczność czwartorzędowych soli amoniowych dla bakterii luminescencyjnych*, 59. Zjazd Naukowy PTChem, 19-23.09.2016, Poznań
5. R. Biczak, P. Bałczewski, B. Pawłowska, B. Marciniak, E. Różycka-Sokołowska, M. Deska, M. Turek, *Reakcja skorupiaków na czwartorzędowe sole amoniowe z kationem diizopropyloamoniowym*, 59. Zjazd Naukowy PTChem, 19-23.09.2016, Poznań
6. B. Pawłowska, R. Biczak, M. Turek, P. Bałczewski, B. Marciniak, M. Deska, E. Różycka-Sokołowska, *Comparison of phytotoxicity of bis(alkylammonium) 2,2'-thiodioacetates*, The 6th International Conference Ecological & Environmental Chemistry 2017, 2-3.03.2017, Chisinau, Republic of Moldova
7. R. Biczak, B. Pawłowska, M. Turek, P. Bałczewski, B. Marciniak, M. Deska, E. Różycka-Sokołowska, *(Eco)toxicity of isoquinolinium 2,2'-thiodiacetate to organisms from different trophic levels*, The 6th International Conference Ecological & Environmental Chemistry 2017, 2-3.03.2017, Chisinau, Republic of Moldova

8. M. Turek, P. Bałczewski, *Ecotoxicity of antihypertensive drugs combined with excipients utilizing luminescent bacteria Vibrio fischeri (Microtox® test)*, XXII International Symposium, Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds, 22.11.2019, CBMM PAN Łódź
9. M. Turek, E. Różycka-Sokołowska, M. Koprowski, B. Marciniak, P. Bałczewski, *Obliczenia QTAIM w analizie oddziaływań farmaceutycznych układów ko-amorficznych*, 63. Zjazd PTChem, 13-16.09.2021r., Łódź

LITERATURA

- [1] S. Fetzner, *Biodegradation of xenobiotics*, w: Doelle, Da Silva (red.), *UNESCO Encyclopedia of Life Support Systems, Biotechnology*, EOLSS Publishers, Oxford, UK, 2002.
- [2] A. Sikandar, K. Shehzadi, Q. Arshad, K. Munir, *Int. J. Sci. Res.* 4(2) (2013) 2250–2253.
- [3] M. C. Bubalo, K. Radošević, I. R. Redovniković, J. Halambek V. G. Srček, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 99 (2014) 1-12.
- [4] N. V. Plechkova, K. R. Seddon, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 123-150.
- [5] T. P. Pham, C. W. Cho, Y. S. Yun, *Water Res.* 44(2) (2010) 352-372.
- [6] M. Amde, J.-F. Liu, L. Pang, *Environ. Sci. Technol.* 49(21) (2015) 12611–12627.
- [7] J. J. Beaulieu, J. L. Tank, M. Kopacz, *Chemosphere* 70(7) (2008) 1320-1328.
- [8] D. J. Gorman-Lewis, J. B. Fein, *Environ. Sci. Technol.* 38(8) (2004) 2491–2495.
- [9] M. Matzke, K. Thiele, A. Müller, J. Filser, *Chemosphere* 74 (2009) 568–574.
- [10] W. Mroziak, A. Kotłowska, W. Kamysz, P. Stepnowski, *Chemosphere* 88 (2012) 1202–1207.
- [11] P. Stepnowski, W. Mroziak, J. Nichthäuser, *Environ.Sci.Technol.* 41 (2007) 511–516.
- [12] R. F. Frade, C. A. Afonso, *Hum. Exp. Toxicol.* (2010) 1038-1054.
- [13] A. Latala, M. Nedzi, P. Stepnowski, *Green Chem.* 12 (2010) 60–64.
- [14] S. Kumar, W. Ruth, B. Sprenger, I. U. Krag, *Chimi. Oggi* 24 (2006) 24–26.
- [15] A. Modelli, A. Sali, P. Galletti, C. Samorì, *Chemosphere* 73(8) (2008) 1322-1327.
- [16] S. Steudte, P. Stepnowski, C.-W. Cho, J. Thöming, S. Stolte, *Chem. Commun.* 48 (2012) 9382-9384.
- [17] M. Matzke, S. Stolte, J. Arning, U. Uebers, J. Filser, *Ecotoxicology* 18(2) (2009) 197-203.
- [18] S. D. Richardson, T. A. Ternes, *Anal. Chem.* 83(12) (2011) 4614–4648.
- [19] I. J. Neuwald, D. Zahn, T. P. Knepper, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 4881–4892.
- [20] K. Fent, A. A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122–159.
- [21] P. Łukaszewicz, A. Białk-Bielińska, J. Dołżonek, J. Kumirska, M. Caban, P. Stepnowski, *Anal. Bioanal. Chem.* 410(6) (2018) 1697-1707.

- [22] M. Patel, R. Kumar, K. Kishor, T. Mlsna, C. U. Pittman Jr., D. Mohan, *Chem. Rev.* 119(6) (2019) 3510–3673.
- [23] N. H. Tran, K. Y.-H. Gin, H. H. Ngo, *Sci. Tot. Environ.* 538 (2015) 38-57.
- [24] L. F. Angeles, R. A. Mullen, I. J. Huang, C. Wilson, W. Khunjar, H. I. Sirotkin, A. E. McElroy, D. S. Aga, *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 6 (2020) 62-77.
- [25] F. Kaczala, S. E. Blum, *Curr. Anal. Chem.* 12(3) (2016) 169-182.
- [26] D. Li, M. Yang, J. Hu, L. Ren, Y. Zhang, K. Li, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 80-86.
- [27] D. G. Larsson, C. de Pedro, N. Paxeus, *J. Hazard. Mater.* 148(3) (2007) 751–755.
- [28] D. A. Kuspis, E. Krenzelok, *Vet. Hum. Toxicol.* 8 (1996) 48–48.
- [29] C. Vatovec, E. V. Wagoner, C. Evans, *J. Environ. Manage.* 198 (2017) 348-352.
- [30] T. aus der Beek, F.-A. Weber, A. Bergmann, S. Hickmann, I. Ebert, A. Hein, A. Küster, *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (2016) 823-835.
- [31] D. O’Flynn, J. Lawler, A. Yusuf, A. Parle-McDermott, D. Harold, T. Mc Cloughlin, L. Holland, F. Regan, B. White, *Anal. Methods* 13 (2013) 575-594.
- [32] A. Kot-Wasik, A. Jakimska, M. Śliwka-Kaszyńska, *Environ. Monit. Assess.* 188(12) (2016) 661.
- [33] I. Baranowska, K. Kowalski, *Pol. J. Environ. Stud.* 20 (2011) 21–28.
- [34] European Commission, Directorate-General for Environment, K. Kümmerer, *Options for a strategic approach to pharmaceuticals in the environment: final report*, Publications Office, 2019.
- [35] International Initiative on Water Quality-IIWQ, *Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region A status report*, 2017.
- [36] M. Caban, P. Stepnowski, *Environ. Chem. Lett.* 19 (2021) 3115–3138.
- [37] United Nations Environment Programme, *Global Chemicals Outlook II*, 2019.
- [38] E. Sanganyado, Z. Lu, Q. Fu, D. Schlenk, J. Gan, *Water Res.* 124 (2017) 527-542
- [39] L. Czaplewski, R. Bax, M. Clokie, M. Dawson, H. Fairhead, V. A. Fischetti, S. Foster, B. F. Gilmore, R. E. W. Hancock, D. Harper, I. R. Henderson, K. Hilpert, B. V. Jones, A. Kadioglu, D. Knowles, S. Ólafsdóttir, D. Payne, S. Projan, S. Shaunak, J. Silverman, C. M. Thomas, T. J. Trust, P. Warn, J. H. Rex, *Lancet Infect. Dis.* 16(2) (2016) 239-251.
- [40] C. Carlsson, A. K. Johansson, G. Alvan, K. Bergman, T. Kühler, *Sci. Total Environ.* 364(1-3) (2006) 88-95.

- [41] K. C. Wirz, M. Studer, J. O. Straub, *Sustain. Chem. Pharm.* 1 (2015) 28-35.
- [42] D. Reker, S. M. Blum, C. Steiger, K. E. Anger, J. M. Sommer, J. Fanikos, G. Traverso, *Sci. Transl. Med.* 11(483) (2019) 6753.
- [43] J. Alverson, A. C. Cohen, *J. Econ. Entomol.* 95 (2002) 256-60.
- [44] T. Cserhádi, E. Forgács, G. Oros, *Environ. Int.* 28(5) (2002) 337-48.
- [45] A. Silva, L. H. M. L. M. Santos, C. Delerue-Matos, S. A. Figueiredo, *Environ. Technol.*, 35(24) (2014) 3124-3129.
- [46] R. S. Jacob, L. V. de Souza Santos, A. F. R. de Souza, L. C. Lange, *Environ. Technol.*, 37(21). (2016) 2760-2767.
- [47] A. K. Grisolia, M. R. Bilich, L. M. Formigli, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59 (2004) 123-126.
- [48] S. Beggel, I. Werner, R. E. Connon, J. P. Geist, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 3169-3175.
- [49] M. Abbas, M. Adil, S. Ehtisham-Ul-Haque, B. Munir, M. Yameen, A. Ghaffar, G. A. Shar, M. Asif Tahir, M. Iqbal, *Sci. Total Environ.* 626 (2018) 1295-1309.
- [50] A. A. Bulich, D. L. Isenberg, *ISA Trans.* 20(1) (1981) 29-33.
- [51] United Nations (UN), *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals. ST/SG/AC10/30/Rev.4*, United Nations, New York, Geneva, 2011.
- [52] K. L. E. Kaiser, *Environ. Health Perspect.* 106 (1998) 583-591.
- [53] S. P. Ventura, C. S. Marques, A. A. Rosatella, C. A. Afonso, F. Gonçalves, J. A. Coutinho, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76 (2012) 162-168.
- [54] J. Ranke, K. Mölter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser, B. Jastorff, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58(3) (2004) 396-404.
- [55] C. Wang, Z. Wei, L. Wang, P. Sun, Z. Wang, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115 (2015) 112-118.
- [56] S. Viboud, N. Papaiconomou, A. Cortesi, G. Chatel, M. Draye, D. Fontvieille, *J. Hazard. Mater.* 215-216 (2012) 40-48.
- [57] N. Delgado-Mellado, M. Ayuso, M. M. Villar-Chavero, J. Garcia, F. Rodriguez, *SN Appl. Sci.* 1 (2019) 896.
- [58] A. Rantamäki, S. K. Ruokonen, E. Sklavounos, L. Kyllonen, A. W. T. King, S. K. Wiedmer, *Sci. Rep.* 7 (2017) 46673.
- [59] D. K. A. Kusumahastuti, M. Sihtmäe, I. V. Kapitanov, Y. Karpichev, N. Gathergood, A. Kahru, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172 (2019) 556-565.

- [60] M. G. Montalbán, J. M. Hidalgo, M. Collado-González, F. G. D. Baños, G. Villora, *Chemosphere* 155 (2016) 405-414.
- [61] B. Peric, J. Sierra, E. Martí, R. Cruañas, M. A. Garau, J. Arning, U. Bottin-Weber, S. Stolte, *J. Hazard. Mater.* 261 (2013) 99-105.
- [62] A. Jakubowska, E. Grabińska-Sota, *Desalination Water Treat.* 117 (2018) 202-210.
- [63] M. G. Montalbán, G. Villora, P. Licence, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150 (2018) 129-135.
- [64] T. E. Sintra, M. Nasirpour, F. Siopa, A. A. Rosatella, F. Gonçalves, J. A. P. Coutinho, C. A. M. Afonso, S. P. M. Ventura, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 143 (2017) 315-321.
- [65] R. Biczak, M. Turek, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, B. Marciniak, M. Deska, P. Krupa, I. Jatulewicz, J. Skalik, P. Bałczewski, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 155 (2018) 37-42.
- [66] M. Turek, R. Biczak, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, B. Marciniak, M. Deska, J. Skalik, P. Bałczewski, *Chemosphere* 194 (2018) 650-656.
- [67] M. Turek, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, R. Biczak, J. Skalik, K. Owsianik, B. Marciniak, P. Bałczewski, *J. Hazard. Mater.* 382 (2020) 121086.
- [68] M. Turek, R. Biczak, B. Pawłowska, E. Różycka-Sokołowska, K. Owsianik, B. Marciniak, P. Bałczewski, *Green Chem.* 24 (2022) 1693-1703.
- [69] Y. Zhang, S.-U. Geißen, C. Gal, *Chemosphere*, 73(8) (2008) 1151-1161.
- [70] M. Wiczerzak, B. Kudłak, J. Namieśnik, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 45 (2015) 131.
- [71] J. Dębska, A. Kot-Wasik, J. Namieśnik, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34 (2004) 51.
- [72] Y. Dong, J. Wang, L. Ding, Y. Liu, *Procedia Environ. Sci.* 18 (2013) 143-148.
- [73] Modern Water Inc, New Castle, United States, Microtox® Acute Toxicity Basic Test Procedures.
- [74] V. Di Nica, S. Villa, A. Finizio, *Environ. Toxicol. Chem.* 36(3) (2017) 807-814.
- [75] A. Białk-Bielińska, E. Mulkiewicz, M. Stokowski, S. Stolte, P. Stepnowski, *Chemosphere* 189 (2017) 689-698.
- [76] T. Backhaus, L. H. Grimme, *Chemosphere* 38 (1999) 3291-3301.
- [77] S. J. Oh, J. Park, M. J. Lee, S. Y. Park, J.-H. Lee, K. Choi, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 (2006) 2221-2226.

- [78] M. Wagil, A. Białk-Bielińska, A. Puckowski, K. Wychodnik, J. Maszkowska, E. Mulkiewicz, J. Kumirska, P. Stepnowski, S. Stolte, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 2566–2573.
- [79] N. Ros, L. Lomba, M. P. Ribate, E. Zuriaga, C. B. García, B. Giner, *AIMS Environ. Sci.*, 5(4) (2018) 229-243.
- [80] V. Dulio, J. Slobodnik, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16 (2009) S132–S135.
- [81] J. M. Conley, S. J. Symes, M. S. Schorr, S. M. Richards, *Chemosphere* 73 (2008) 1178–1187.
- [82] J. L. Zurita, Á. Jos, A. del Peso, M. Salguero, M. López-Artíguez, G. Repetto, *Aquat. Toxicol.* 75(2) (2005) 97-107.
- [83] P. K. Jjemba, *Chemosphere* 46 (2002) 1019–1025.
- [84] Główny Urząd Statystyczny, Stan zdrowia ludności Polski w 2014 r., Warszawa, 2016, ISBN 978-83-7027-611-9.
- [85] B. I. Escher, N. Bramaz, M. Richter, J. Lienert, *Environ. Sci. Technol.* 40(23) (2006) 7402–7408.
- [86] M. C. Calleja, G. Persoone, P. Geladi, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26 (1994) 69–78.
- [87] B. Ferrari, R. Mons, B. Vollat, B. Fraysse, N. Paxēaus, R. L. Giudice, A. Pollio, J. Garric, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004) 1344-1354.
- [88] S. A. Ortiz de García, G. P. Pinto, P. A. García-Encina, R. Irusta-Mata, *Ecotoxicology* 23(8) (2014) 1517-33.
- [89] J. L. Zurita, G. Repetto, A. Jos, M. Salguero, M. López-Artíguez, A. M. Cameán, *Aquat. Toxicol.* 81(1) (2007) 106-15.
- [90] M. Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirapu, M. Vilanova, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938(1-2) (2001) 187-197.
- [91] M. Isidori, A. Nardelli, L. Pascarella, M. Rubino, A. Parrella, *Environ. Int.* 33(5) (2007) 635-641.
- [92] M. Wiczerzak, B. Kudłak, J. Namieśnik, *Monatsh. Chem.* 147(8) (2016) 1455–1460.
- [93] K. T. Savjani, A. K. Gajjar, J. K. Savjani, *ISRN Pharm.* 2012 (2012) 195727.
- [94] M. Turek, E. Różycka-Sokołowska, K. Owsianik, B. Marciniak, P. Bałczewski, *J. Hazard. Mater.* 399 (2020) 122839.

- [95] T. Backhaus, J. Sumpter, H. Blanck, *On the Ecotoxicology of Pharmaceutical Mixtures*, w: K. Kümmerer (red.), *Pharmaceuticals in the Environment*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [96] T. Backhaus, R. Altenburger, W. Boedeker, M. Faust, M. Scholze, L. H. Grimme, *Environ. Toxicol. Chem.* 19(9) (2000) 2348-2356.
- [97] M. Sigurnjak, Š. Ukić, M. Cvetnić, M. Markić, M. Novak Stankov, B. Rasulev, H. Kušić, A. Lončarić Božić, M. Rogošić, T. Bolanča, *Chemosphere* 240 (2020) 124973.
- [98] X. Zhou, W. Sang, S. Liu, Y. Zhang, H. Ge, *J. Environ. Sci.* 22(3) (2010) 433-440.
- [99] S. Villa, S. Migliorati, G. S. Monti, M. Vighi, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86 (2012) 93-100.
- [100] V. Di Nica, J. Gallet, S. Villa, V. Mezzanotte, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142 (2017) 567-577.
- [101] T. Backhaus, M. Faust, M. Scholze, P. Gramatica, M. Vighi, L. H. Grimme, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (2004) 258-264.
- [102] J. B. Carbajo, J. A. Perdigón-Melón, A. L. Petre, R. Rosal, P. Letón, E. García-Calvo, *Water Res.*, 72 (2015) 174-185.
- [103] S. Villa, M. Vighi, A. Finizio, *Chemosphere*, 108 (2014) 239-244.
- [104] T. Backhaus, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369 (2014) 20130585.
- [105] H. Sütterlin, R. Alexy, K. Kümmerer, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71(2) (2008) 498-505.
- [106] M. Faust, R. Altenburger, T. Backhaus, H. Blanck, W. Boedeker, P. Gramatica, V. Hamer, M. Scholze, M. Vighi, L. H. Grimme, *Aquat. Toxicol.* 56(1) (2001) 13-32.
- [107] M. Junghans, T. Backhaus, M. Faust, M. Scholze, L. H. Grimme, *Pest. Manag. Sci.* 59 (2003) 1101-1110.
- [108] B. I. Escher, N. Bramaz, J. Lienert, J. Neuwoehner, J. O. Straub, *Aquat Toxicol.* 96(3) (2010) 194-202.
- [109] R. Altenburger, W. Bödeker, M. Faust, L. H. Grimme, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20(1) (1990) 98-114.
- [110] J. Enko, Wpływ interakcji kwasu askorbinowego i wybranych ekstraktów roślinnych na ich aktywność przeciwutleniającą i przeciwdrobnoustrojową, Praca doktorska, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, 2017.
- [111] D. Wang, X. Wu, Z. Lin, Y. Ding, *Environ. Res.* 162 (2018) 127-134.

- [112] T. Wang, Y. Liu, D. Wang, Z. Lin, Q. An, C. Yin, Y. Liu, *J. Hazard. Mater.* 310 (2016) 56-67.
- [113] T. Wang, D. Wang, Z. Lin, Q. An, C. Yin, Q. Huang, *Chemosphere* 150 (2016) 159-167.
- [114] P. Lipa, M. Koziel, M. Janczarek, *Postępy Biochem.* 63(4) (2017) 242-260.
- [115] X. Zou, Z. Lin, Z. Deng, D. Yin, *Chemosphere* 90(7) (2013) 2070-2076.
- [116] Y. Dong, Z. Fang, Y. Xu, Q. Wang, X. Zou, *Emerg. Contam.* 5 (2019) 297-302.
- [117] U. Muhammad, A. Uzairu, D. E. Arthur, *J. Anal. Pharm. Res.* 7(2) (2018) 240-242.
- [118] P. Gramatica, E. Giani, E. Papa, *J. Mol. Graph.* 25(6) (2007) 755-766.
- [119] P. Gramatica, *QSAR Comb. Sci.* 26 (2007) 694-701.
- [120] R. Todeschini, V. Consonni, *Molecular Descriptors for Chemoinformatics*, USA, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
- [121] Danishuddin, A. U. Khan, *Drug Discov. Today* 21(8) (2016) 1291-1302.
- [122] R. Satpathy, *Environ. Chem. Lett.* 17 (2019) 123-128.
- [123] K. Roy, R. N. Das, P. Ambure, R. B. Aher, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 152 (2016) 18-33.
- [124] D. J. Couling, R. J. Bernot, K. M. Docherty, J. K. Dixon, E. J. Maginn, *Green Chem.* 8 (2006) 82-90.
- [125] P. Luis, I. Ortiz, R. Aldaco, A. Irabien, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67(3) (2007) 423-429.
- [126] P. Luis, A. Garea, A. Irabien, *J. Mol. Liq.* 152(1-3) (2010) 28-33.
- [127] M. Alvarez-Guerra, A. Irabien, *Green Chem.* 13 (2011) 1507-1516.
- [128] R. N. Das, K. Roy, *Toxicol. Res.* 1 (2012) 186-195.
- [129] F. Yan, Q. Shang, S. Xia, Q. Wang, P. Ma, *J. Hazard. Mater.* 286 (2015) 410-415.
- [130] M. Grzonkowska, A. Sosnowska, M. Barycki, A. Rybinska, T. Puzyn, *Chemosphere* 159 (2016) 199-207.
- [131] R. N. Das, T. E. Sintra, J. A. P. Coutinho, S. P. M. Ventura, K. Roy, P. L. A. Popelier, *Toxicol. Res.* 5 (2016) 1388-1399.
- [132] O. B. Ghanem, M. I. A. Mutalib, J.-M. Lévêque, M. El-Harbawi, *Chemosphere*, 170 (2017) 242-250.
- [133] M. Jafari, M. H. Keshavarz, H. Salek, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 182 (2019) 109429.

- [134] T. Lan, X. Yan, F. Yan, S. Xia, Q. Jia, Q. Wang, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 205 (2020) 111187.
- [135] M. I. A. Mutalib, O. B. Ghanem, *Ecotoxicity of Ionic Liquids Towards Vibrio fischeri: Experimental and QSAR Studies*, w: S. Handy (red.) *Progress and Developments in Ionic Liquids*, London, United Kingdom, IntechOpen, 2017.
- [136] D. G. Sprous, R. K. Palmer, J. T. Swanson, M. Lawless, *Curr. Top. Med. Chem.* 10(6) (2010) 619-637.
- [137] K. L. Ojha, R. Sharma, M. R. Bhawsar, *IJRBS* 2 (2012) 1-12.
- [138] K. Khan, E. Benfenati, K. Roy, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 168 (2019) 287-297.
- [139] L. Lomba, M. P. Ribate, E. Zuriaga, C. B. García, B. Giner, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 15(172) (2019) 232-239.
- [140] H. Sanderson, M. Thomsen, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79 (2007) 331-335.
- [141] J. Lienert, K. Gudel, B. I. Escher, *Environ. Sci. Technol.* 41(12) (2007) 4471-4478.
- [142] H. Sanderson, D. J. Johnson, C. J. Wilson, R. A. Brain, K. R. Solomon, *Toxicol. Lett.* 144(3) 2003 383-395.
- [143] H. Sanderson, R. A. Brain, D. J. Johnson, C. J. Wilson, K. R. Solomon, *Toxicology* 203(1-3) (2004) 27-40.
- [144] M. Cleuvers, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59(3) (2004) 309-315.
- [145] M. S. Bureš, Š. Ukić, M. Cvetnić, V. Prevarić, M. Markić, M. Rogošić, H. Kušić, T. Bolanča, 275 (2021) 115885.
- [146] S.-Y. Lee, H.-J. Kang, J.-H. Kwon, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94 (2013) 116-122.
- [147] Y. Wang, X. Yang, J. Wang, Y. Cong, J. Mu, F. Jin, *J. Hazard. Mater.* 308 (2016) 149-56.
- [148] S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, *Environ. Int.* 32(2) (2006) 265-268.
- [149] M. J. McFall-Ngai, *Annu. Rev. Microbiol.* 68 (2014) 177-194.
- [150] A. Czyż, G. Węgrzyn, *Postepy Biochem.* 47(3) (2001) 263-270.
- [151] S. Inouye, *FEBS Letters* 347 (1994) 163-168.
- [152] Modern Water Inc, New Castle, United States, Microtox® Acute Toxicity Procedures: 81.9% Basic Test, Basic Solid Phase Test, Solid Phase Test.
- [153] A. Mariscal, M. T. Peinado, M. Carnero-Varo, J. Fernandez-Crehuet, *Chemosphere* 50 (2003) 349- 54.
- [154] J. Dupont, R. F. de Souza, P. A. Z. Suarez, *Chem. Rev.* 102(10) (2002) 3667-3692.

- [155] A. Syguda, A. Gielnik, A. Borkowski, M. Woźniak-Karczewska, A. Parus, A. Piechalak, A. Olejnik, R. Marecik, Ł. Ławniczak, Ł. Chrzanowski, *New J. Chem.* 42 (2018) 9819-9827.
- [156] M. L. Hanson, K. R. Solomon, *Environ. Pollut.* 130(3) (2004) 385-401.
- [157] M. L. Hanson, P. K. Sibley, D. A. Ellis, N. A. Fineberg, S. A. Mabury, K. R. Solomon, D. C. Muir, *Aquat. Toxicol.* 56(4) (2002) 241-255.
- [158] M. L. Hanson, P. K. Sibley, D. A. Ellis, S. A. Mabury, D. C. G. Muir, K. R. Solomon, *Aquat. Toxicol.* 61(3-4) (2002) 251-273.
- [159] M. L. Hanson, P. K. Sibley, S. A. Mabury, K. R. Solomon, D. C. G. Muir, *Sci. Total Environ.* 285(1-3) (2002) 247-250.
- [160] M. L. Hanson, P. K. Sibley, S. A. Mabury, D. C. G. Muir, K. R. Solomon, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55(1) (2003) 46-63.
- [161] J. A. Kelly, patent amerykański, *Amine salts of trichloroacetic acid*, Patent US 2697721 A, 1951.
- [162] R. F. Carlson, J. E. Moulton, *Mich. State Univ. Agric. Exp. Stn. Q. Bull.* 38(8) (1948) 413-421.
- [163] A. W. Garrison, *Environ. Sci. Technol.* 40(1) (2006) 16-23.
- [164] M. A. U. Asad, M. Lavoie, H. Song, Y. Jin, Z. Fu, H. Qian, *Sci. Total Environ.* 580 (2017) 1287-1299.
- [165] B. S. Sekhon, *J. Pestic. Sci.* 31(1) (2009) 1-12.
- [166] H. Qian, H. Hu, Y. Mao, J. Ma, A. Zhang, W. Liu, Z. Fu, *Chemosphere* 76(7) (2009) 885-892.
- [167] M. Arıcı, O. Z. Yeşilel, E. Acar, N. Dege, *Polyhedron* 127 (2017) 293-301.
- [168] F. Hosseinabadi, M. Ghadermazi, M. Taran, Z. Derikvand, *Inorganica Chim. Acta* 443 (2016) 186-197.
- [169] R. N. Patel, A. Singh, K. K. Shukla, D. K. Patel, V. P. Sondhiya, S. Dwivedi, *J. Sulphur Chem.* 31 (2010) 299-313.
- [170] C. E. Carraher Jr., M. R. Roner, N. Pham, A. Moric-Johnson, *J. Macromol. Sci. A* 51 (2014) 547-556.
- [171] S. Karanth, *Chlorophenoxy Herbicides*, w: P. Wexler (red.) *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, 2014.
- [172] M. T. K. Tsui, L. M. Chu, *Chemosphere* 52(7) (2003) 1189-1197.

- [173] European Chemicals Agency (ECHA), *Ecotoxicological Summary of Sodium Sulfate* [dostęp on-line 09.03.2022r.: www.echa.europa.eu].
- [174] M. V. S. Oliveira, B. T. Vidal, C. M. Melo, R. C. M. de Miranda, C. M. F. Soares, J. A. P. Coutinho, S. P. M. Ventura, S. Mattedi, Á. S. Lima, *Chemosphere* 147 (2016) 460-466.
- [175] S. P. M. Ventura, C. S. Marques, A. A. Rosatella, C. A. M. Afonso, F. Gonçalves, J. A. P. Coutinho, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76 (2012) 162-168.
- [176] S.P. M. Ventura, F. A. e Silva, A. M. M. Gonçalves, J. L. Pereira, F. Gonçalves, J. A. P. Coutinho, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102 (2014) 48-54.
- [177] T. J. Denich, L. A. Beaudette, H. Lee, J. T. Trevors, *J. Microbiol. Methods* 52 (2003) 149-182.
- [178] Y. M. Zhang, C. O. Rock, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 222-233.
- [179] L. A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.* 2(2) (2006) 85-100.
- [180] J. Ye, L. Wang, Z. Zhang, W. Liu, *Environ. Sci. Technol.* 47(8) (2013) 3893-3901.
- [181] C. Cheng, L. Huang, R. Ma, Z. Zhou, J. Diao, *Algal Res.* 10 (2015) 72-79.
- [182] X. Cai, W. Liu, G. Sheng, *J. Agric. Food Chem.* 56(6) (2008) 2139-2146.
- [183] J. Xie, L. Zhao, K. Liu, F. Guo, W. Liu, *Sci. Total Environ.* 626 (2018) 860-866.
- [184] S. Chen, L. Zhang, H. Chen, Z. Chen, Y. Wen, *J. Agric. Food Chem.* 67(6) (2019) 1631-1637.
- [185] S. Fang, Y. Zhang, S. Zhao, L. Qiang, M. Chen, L. Zhu, *Environ. Toxicol. Chem.* 35(12) (2016) 3005-3013.
- [186] S. P. M. Ventura, A. M. M. Gonçalves, T. Sintra, J. L. Pereira, F. Gonçalves, J. A. P. Coutinho, *Ecotoxicology* 22(1) (2013) 1-12.
- [187] F. J. Hernández-Fernández, J. Bayo, A. Pérez de los Ríos, M. A. Vicente, F. J. Bernal, J. Quesada-Medina, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116 (2015) 29-33.
- [188] S. P. F. Costa, P. C. A. G. Pinto, R. A. S. Lapa, M. L. M. F. S. Saraiva, *J. Hazard. Mater.* 284 (2015) 136-142.
- [189] K. M. Docherty, C. F. Kulpa Jr., *Green Chem.* 7 (2005) 185-189.
- [190] A. Latała, P. Stepnowski, M. Nędzi, W. Mrozik, *Aquatic Toxicol.* 73 (2005) 91-98.
- [191] R. R. Waghunde, R. M. Shelake, A. N. Sabalpara, *Afr. J. Agric. Res.* 11 (2016) 1952-1965.
- [192] P. Westlund, D. Nasuhoglu, S. Isazadeh, V. Yargeau, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 74(4) (2018) 557-567.

- [193] A. M. Polo , M. Tobajas, S. Sanchis, A. F. Mohedano, J. J. Rodríguez, *Biodegradation* 22(4) (2011) 751-761.
- [194] K. Roy, R. N. Das, P. L. A. Popelier, *Chemosphere* 112 (2014) 120-127.
- [195] M. C. Bubalo, K. Radošević, I. R. Redovniković, I. Slivac, V. G. Srček, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 68(3) (2017) 171-179.
- [196] Q. Gu, V. L. Burt, C. F. Dillon, S. Yoon, *Circulation* 126 (2012) 2105–2114.
- [197] A. Bayer, R. Asner, W. Schüssler, W. Kopf, K. Weib, M. Sengl, M. Letzel, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 108300-10839.
- [198] OECD Health Statistics 2021, Definitions, Sources and Methods, Total pharmaceutical consumption by DDDs [dostęp on-line 09.03.2022r.: <http://www.oecd.org/health/health-data.htm>].
- [199] OECD.Stat Web Browser, Pharmaceutical consumption [dostęp on-line 09.03.2022r.: https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC].
- [200] E. Devic, L. Paquereau, R. Steinberg, D. Caput, Y. Audigier, *FEBS Lett.* 417(2) (1997) 184-190.
- [201] J. G. Nickerson, S. G. Dugan, G. Drouin, T. W. Moon, *Eur. J. Biochem.*, 268(24) (2001) 6465-6472.
- [202] Y. Yarden, H. Rodriguez, S. K. Wong, D. R. Brandt, D. C. May, J. Burnier, R. N. Harkins, E. Y. Chen, J. Ramachandran, A. Ullrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83(18) (1986) 6795-6799.
- [203] A. A. Godoy, F. Kummrow, P. A. Pamplin, *Chemosphere* 138 (2015) 281-291.
- [204] A. A. Godoy, .F. Kummrow, P. A. Z. Pamplin, *Ecotoxicology* 24(5) (2015) 1112-1123.
- [205] C. G. Abrantes, D. Duarte, C. P. Reis, *J. Pharm. Sci.* 105(7) (2016) 2019-2026.
- [206] K. R. Beg, S. Ali, *Am. J. Environ. Sci.* 4(4) (2008) 383-387.
- [207] G. Bitton, E. Garland, I.-C. Kong, J. L. Morel , B. Koopman, *J. Soil Contam.* 5(4) (2008) 385-394.
- [208] K. K. Kwan, B. J. Dutka, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55(3) (1995) 338-346.
- [209] R. Shoji, H. Nakayama, Y. Sakai, S. Mohri, M. Yamada, *J. Environ. Sci. Health A* 43(9) (2008) 1048-1053.
- [210] K. K. Brandt, A. Pedersen, J. Sørensen, *Appl. Environ. Microbiol.* 68(7) (2002) 3502-3508.

- [211] Microtox® M500. Modern Water Inc, New Castle, United States, www.modernwater.com.
- [212] Toxi-Chromo Test™, Environmental Bio-Detection Products Inc, Canada.
- [213] Ostracodtoxkit F™, MicroBioTests, Belgium. www.microbiotests.com.
- [214] B. Koopman, G. Bitton, R. J. Dutton, C. L. Logue, *Water Sci. Techn.* 20(137) (1988).
- [215] K. E. Day, B. J. Dutka, K. K. Kwan, N. Batista, T. B. Reynoldson, J. L. Metcalfe-Smith, *J. Great Lakes Res.* 21(2) (1995) 192-206.
- [216] C. M. Acheson, Q. Zhou, Y. Shan, G. D. Sayles, M. J. Kupferle, *Environ. Toxicol. Chem.* 23(2) (2004) 245-251.
- [217] C. Lors, J.-F. Ponge, M. M. Aldaya, D. Damidot, *Environ. Pollut.* 159(10) (2011) 2974-2981.
- [218] A. V. Ghirardini, M. Girardini, D. Marchetto, C. Pantani, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72(3) (2009) 851-861.
- [219] Y. Mamindy-Pajany, F. Geret, M. Roméo, C. Hurel, N. Marmier, *Chemosphere* 86(11) (2012) 1112-1116.
- [220] R. Guerra, A. Pasteris, M. Ponti, D. Fabbri, L. Bruzzi, *Environ. Int.* 33(4) (2007) 469-473.
- [221] M. C. Casado-Martinez, K. F. Burga-Pérez, R. Bebon, J.-F. Féraud, E. L. M. Vermeirssen, I. Werner, *Chemosphere* 151 (2016) 220-224.
- [222] N. Yuan, C. Wang, Y. Pei, *J. Environ. Manage.* 182 (2016) 21-28.
- [223] D. W. Rodgers, J. Schröder, L. Vereecken Sheehan, *Comparison of Daphnia magna, rainbow trout and bacterial-based toxicity tests of Ontario Hydro aquatic effluents*, w: W. Chow, R. W. Brocksen, J. Wisniewski, *Clean Water: Factors that Influence Its Availability, Quality and Its Use*, Springer, Dordrecht, 1996.
- [224] V. S. Bessa, I. S. Moreira, S. Murgolo, G. Mascolo, P. M. L. Castro, *Sci. Total Environ.* 690 (2019) 739-747.
- [225] H. Heida, R. van der Oost, *Water Sci. Technol.* 34 (1996) 109-116.
- [226] Ostracodtoxkit F™ Instruction. MicroBioTests, Belgium [dostęp online 09.03.2022r.: <https://www.microbiotests.com/toxkit/freshwater-sediment-toxicity-test-with-ostracodtoxkit-f/>].
- [227] P. Oleszczuk, *Waste Manage.* 28(9) (2008) 1645-1653.

- [228] M. Radziemska, A. Bęś, Z. M. Gusiatin, A. Cerdà, Z. Mazur, J. Jeznach, P. Kowal, M. Brtnický, *Sci. Total Environ.* 688 (2019) 37-45.
- [229] B. Kudłak, M. Wieczerzak, G. Yotova, S. Tsakovski, V. Simeonov, J. Namieśnik, *Chemosphere* 160 (2016) 181-188.
- [230] G. Płaza, G. Nałęcz-Jawecki, K. Ulfig, R. L. Brigmon, *Chemosphere* 59(2) (2005) 289-296.
- [231] W. Niyommaneerat, F. Nakajima, T. Tobino, K. Yamamoto, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 143 (2017) 266-274.
- [232] C. Rivetti, C. Gómez-Canela, S. Lacorte, S. Díez, W. L. Lázaro, C. Barata, *Aquat. Toxicol.* 161 (2015) 41-50.
- [233] A. Lillicrap, I. Allan, B. Friede, Ø. Garmo, A. Macken, *Sci. Total Environ.* 468-469 (2014) 358-367.
- [234] A. Rodríguez-Ruiz, F. Dondero, A. Viarengo, I. Marigómez, *Environ. Toxicol. Chem.* 35(6) (2016) 1413-1421.
- [235] I. Kurvet, A. Ivask, O. Bondarenko, M. Sihtmäe, A. Kahru, *Sensors* 11(8) (2011) 7865-7878.
- [236] L. Minguez, J. Pedelucq, E. Farcy, C. Ballandonne, H. Budzinski, M. P. Halm-Lemeille, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(6) (2016) 4992-5001.
- [237] FDA, *Review of environmental assessment for Cozaar Tablettes (50 and 100 mg Losartan Potassium) NDA 20-386/SE1-032*, 2002 [dostęp on-line 09.03.2022r.: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/20-386S032_Cozaar_EAfonsi.pdf].
- [238] Boehringer Ingelheim GmbH internal report No U98-3266.
- [239] Daphnia Magna Reproduction Test Inhibition with HCTZ DS (Semi-static), NOTOX Project 485927, NOTOX B. V. Brixham Environmental Laboratory, UK, AstraZeneca Report BD4133.
- [240] D. Napierska, L. C. Thomassen, D. Lison, J. A. Martens, P. H. Hoet, *Part. Fibre Toxicol.* 7 (2010) 39.
- [241] A. K. Safekordi, H. Attar, E. Binaeian, *ICCEES'2012* (2012) 60-65.
- [242] M. P. Casado, A. Macken, H. J. Byrne, *Environ. Int.* 51 (2013) 97-105.
- [243] N. Fathima, H. K. Qureshi, N. Anitha, V. Rao, T. Mamatha, J. V. Rao, *Int. J. Appl. Pharm. Sci. Res.* 1(6) (2011) 66-71.
- [244] R. M. E. Richards, J. Z. Xing, K. M. B. Mackay, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1258-1264.

- [245] Š. Ukić, M. Sigurnjak, M. Cvetnić, M. Markić, M. Novak Stankov, M. Rogošić, B. Rasulev, A. Lončarić Božić, H. Kušić, T. Bolanča, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 185 (2019) 109696.
- [246] A. H. Dökmeci, I. Dökmeci, H. Ibar, *Environ. Process.* 1 (2014) 95–103.
- [247] I.-H. Baek, Y. Kim, S. Baik, J. Kim, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16 (2019) 208.
- [248] N. Cedergreen, A. M. Christensen, A. Kamper, P. Kudsk, S. K. Mathiassen, J. C. Streibig, H. Sørensen, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1621-1632.
- [249] European Medicines Agency (EMA), *Sodium laurilsulfate used as an excipient*, raport EMA/CHMP/351898/2014 corr. 1, 2017.
- [250] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, W. G. Cook, M. E. Quinn (red.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th edition*, Pharmaceutical Press, London, 2012.
- [251] P. Fagundes, T. K. Carniel, L. R. Mazon, J. M. M. de Mello, L. L. Silva, F. Dalcanton, G. L. Colpani, M. Zanetti, M. A. Fiori, *MSF* 1012 (2020) 500–505.
- [252] C. A. M. Bondi, J. L. Marks, L. B. Wroblewski, H. S. Raatikainen, S. R. Lenox, K. E. Gebhardt, *Environ. Health Insights.* 9 (2015) 27-32.
- [253] M. A. Lewis, *Water Res.* 25(1) (1991) 101–13.
- [254] M. A. Lewis, *Water Res.* 26(8) (1992) 1013–23.
- [255] P. D. Abel, *J. Fish. Biol.* 6 (1974) 279–98.
- [256] M. S. Warne, A. D. Schifko, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44 (1999) 196–206.
- [257] Y. J. Zheng, L. Chen, Y. P. Chen, R. Huang, *J. Agro-Environ. Sci.* 25 (2006) 496–498.
- [258] K. Manley, A. Bravo-Nuevo, A. R. Minton, S. Sedano, A. Marcy, M. Reichman, A. Tobia, C. M. Artlett, S. K. Gilmour, L. D. Laury-Kleintop, G. C. Prendergast, *J. Cell. Biochem.* (2019).
- [259] A. Bravo-Nuevo, A. Marcy, M. Huang, F. Kappler, J. Mulgrew, L. Laury-Kleintop, M. Reichman, A. Tobia, G. C. Prendergast, *PLoS ONE* 9(2) (2014) e90031.
- [260] L. Flohr, A. B. de Castilhos Júnior, W. G. Matias, *Sci. World J.*, 2012 (2012) 643904.
- [261] C. Unluer, A. Al-Tabbaa, *J. Therm. Anal. Calorim.* 115 (2014) 595–607.
- [262] A. Y. Chaerunisaa, S. Sriwidodo, M. Abdassah, *Microcrystalline Cellulose as Pharmaceutical Excipient*, w: U. Ahman, J. Akhtar (red.) *Pharmaceutical Formulation Design – Recent Practices*, IntechOpen, London, 2019.

- [263] FSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): V. Bampidis, G. Azimonti, M. L. Bastos, H. Christensen, B. Dusemund, M. Kos Durjava, M. Kouba, M. López-Alonso, S. López Puente, F. Marcon, B. Mayo, A. Pechová, M. Petkova, F. Ramos, Y. Sanz, R. E. Villa, R. Woutersen, G. Bories, J. Gropp, C. Nebbia, M. L. Innocenti, G. Aquilina, *EFSA Journal* 18(7) (2020) 6209.
- [264] Komisja Europejska, Raport Komisji Naukowej ds. Żywności, Opinion on Microcrystalline Cellulose, 1997 [dostęp on-line 09.03.2022r.: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_7_out25_en.pdf]
- [265] EFSA ANS Panel: M. Younes, P. Aggett, F. Aguilar, R. Crebelli, B. Dusemund, M. Filipič, M. J. Frutos, P. Galtier, D. Gott, U. Gundert-Remy, G. G. Kuhnle, J.-C. Leblanc, I. T. Lillegaard, P. Moldeus, A. Mortensen, A. Oskarsson, I. Stankovic, I. Waalkens-Berendsen, R. A. Woutersen, M. Wright, P. Boon, D. Chrysafidis, R. Gürtler, P. Mosesso, D. Parent-Massin, P. Tobback, N. Kovalkovicova, A. M. Rincon, A. Tard, C. Lambré, *EFSA Journal* 16(1) (2018) 5088.
- [266] I. F. Guha, *Effects of Silica Nanoparticle Surface Treatment and Average Diameter on the Physical and Mechanical Properties of Poly(dimethylsiloxane)-Silica Nanocomposites*, praca dyplomowa, Massachusetts Institute of Technology, 2010.
- [267] A. A. Keller, A. Lazareva, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 1(1) (2014) 65–70.
- [268] E. Inshakova, O. Inshakov, *MATEC Web of Conferences* 129 (2017) 02013.
- [269] V. Selvarajan, S. Obuobi, R. L. P. Ee, *Front. Chem.* 8 (2020) 602.
- [270] X. Yang, X. Liu, A. Zhang, D. Lu, G. Li, Q. Zhang, Q. Liu, G. Jiang, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1620.
- [271] A.-K. Müller, J. Ruppel, C.-P. Drexel, I. Zimmermann, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34(4-5) (2008) 303-308.
- [272] S. Jonat, P. Albers, A. Gray, P. C. Schmidt, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63(3) (2006) 356-9.
- [273] K. Meyer, I. Zimmermann, *Powder Technol.* 139(1) (2004) 40-54.
- [274] K. Van Hoecke, K. A. C. De Schampelaere, P. Van der Meeren, S. Lucas, C. R. Janssen, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1948-1957.

- [275] Y. Kim, A. Samadi, E. H. Gwag, J. Park, M. Kwak, J. Park, T. G. Lee, Y. J. Kim, *Micromachines* 12 (2021) 1105.
- [276] M. Rosenbruch, *Exp. Toxicol. Pathol.* 44(1) (1992) 10-14.
- [277] Y. Wang, B. Nowack, *Environ. Toxicol. Chem.* 37(5) (2018) 1387-1395.
- [278] R. Awasthi, S. Manchanda, P. Das, V. Velu, H. Malipeddi, K. Pabreja, T. D. J. A. Pinto, G. Gupta, K. Dua, *9-Poly(vinylpyrrolidone)*, w: A. Parambath, *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*, Woodhead Publishing, 2018.
- [279] M. Kurakula, G. S. N. K. Rao, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 60 (2020) 102046.
- [280] V. S. Gowri, L. Almeida, T. Amorim, N. Carneiro, A. P. Souto, M. F. Esteves, *J. Appl. Polym. Sci.* 124 (2012) 1553-1561.
- [281] R. L. Sala, T. M. Arantes, E. Longo, E. R. Leite, C. M. Paranhos, E. R. Camargo, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 462 (2014) 45-51.
- [282] M. H. Rezadoost, M. Kordrostami, H. H. Kumleh, *Biotech.* 6 (2016) 61.
- [283] H. L. Ohrem, E. Schornick, A. Kalivoda, R. Ognibene, *Pharm. Dev. Technol.* 19(3) (2014) 257-62.
- [284] T. G. Bunting, D. A. Centrone, R. S. Sackler, A. Halpern, patent europejski, *Irradiation of povidone and povidone-iodine*, Patent EP 0096474 B2, 1982.
- [285] A. Białk-Bielińska, Ł. Grabarczyk, E. Mulkiwicz, A. Puckowski, S. Stolte, P. Stepnowski, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2021).
- [286] J. Drzymała, J. Kalka, *Chemosphere* 259 (2020) 127407.
- [287] K. L. E. Kaiser, V. S. Palabrica, *Water Qual. Res. J.* 26(3) (1991) 361-431.
- [288] Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R.

- Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [289] K. Chmielewski, S. Berczyński, *Statystyka matematyczne, ćwiczenia laboratoryjne z wykorzystaniem pakietu Statistica PL*, Wydawnictwo Uczelniane Politechniki Szczecińskiej, Szczecin, 2001.
- [290] M. Feng, R. Qu, C. Wang, L. Wang, Z. Wang, *Aquat Toxicol.* 140-141 (2013) 314-23.
- [291] K. H. Sippel, F. A. Quioco, *Protein Sci.* 24(7) (2015) 1040–1046.
- [292] N. O. Eddy, *Sci. Afr.* 10 (2020) e00587.
- [293] Z. Almi, S. Belaidi, T. Lanez, N. Tchouar, *Int. Lett. Chem. Phys. Astron.* 37 (2014) 113-124.
- [294] J. A. Padrón, R. Carrasco, R. F. Pellón, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5(3) (2002) 258-266.
- [295] M. M. Lynam, M. Kutty, J. Damborsky, J. Koca, P. Adriaens, *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 988-997.
- [296] M. O. Pierre, B. Kafoumba, N. N. Kouakou, Z. Nahossé, *Chem. Sci. Int. J.*, 27(1) (2019) 1-13.
- [297] A. R. Al-Majed, E. Assiri, N. Y. Khalil, H. A. Abdel-Aziz, *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* 40 (2015) 159-94.
- [298] Candesartan, PubChem [dostęp on-line 09.03.2022r.: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Candesartan>]
- [299] M. C. Berenbaum, *J. Theor. Biol.* 114(3) (1985) 413-431.
- [300] L. Carles, M. Joly, F. Bonnemoy, M. Lereboure, F. Donnadieu, I. Batisson, P. Besse-Hoggan, *J. Hazard. Mat.* 354 (2018) 42-53.

SPIS TABEL

Tabela 1. Przykładowe stężenia leków wykrywanych w wodach powierzchniowych. [31]	20
Tabela 2. Klasy toksyczności ostrej wg GHS. [51]	26
Tabela 3. Wartości EC ₅₀ badanych farmaceutyków, otrzymane po 15 minutach ekspozycji z bakteriami <i>A. fischeri</i> . [74]	33
Tabela 4. Wartości EC ₅₀ badanych leków przeciwnowotworowych po 30 minutach inkubacji z bakteriami <i>A. fischeri</i> . [75]	33
Tabela 5. Wartości EC ₅₀ badanych leków przeciw pasożytniczych po 5 i 15 minutach inkubacji z bakteriami <i>A. fischeri</i> wraz z 95% przedziałem ufności wyniku podanym w nawiasie. [77]	34
Tabela 6. Wartości EC ₅₀ badanych leków kardiologicznych wobec bakterii <i>A. fischeri</i>	36
Tabela 7. Rodzaje deskryptorów stosowanych w modelowaniu QSAR. [121]	48
Tabela 8. Zestawienie opublikowanych modeli QSAR do przewidywania toksyczności cieczy jonowych wobec <i>A. fischeri</i>	50
Tabela 9. Wartości EC ₅₀ [mg/L] otrzymane po 5 i 15 minutach ekspozycji bakterii <i>A. fischeri</i> , wraz z 95% przedziałem ufności przedstawionym w nawiasie – związki z GRUPY 1.....	64
Tabela 10. Ekotoksyczność mieszanin racemicznych zsyntezowanych soli amoniowych, obliczona z wykorzystaniem modelu CA.....	69
Tabela 11. Wartości EC ₅₀ [mg/L] otrzymane po 5 i 15 minutach ekspozycji bakterii <i>A. fischeri</i> , wraz z 95% przedziałem ufności przedstawionym w nawiasie – związki z GRUPY 2.....	70
Tabela 12. Wartości EC ₅₀ [mg/L] otrzymane po 5 i 15 minutach ekspozycji bakterii <i>A. fischeri</i> , wraz z 95% przedziałem ufności przedstawionym w nawiasie – związki z GRUPY 3.....	72
Tabela 13. Literaturowe wartości EC ₅₀ [mg/L] dla kwasów chlorofenoksyoctowych oraz chlorofenoli otrzymane po 15 minutach ekspozycji bakterii <i>A. fischeri</i>	73
Tabela 14. Struktury chemiczne badanych leków z grupy ARBs oraz HCT wraz z ich	

rozpuszczalnością w wodzie.....	77
Tabela 15. Farmaceutyczne formułacje (tabletki) użyte w testach ekotoksykologicznych. Masy tabletek zaprezentowano jako wartość średnia ± odchylenie standardowe (n = 10).....	80
Tabela 16. Substancje pomocnicze użyte w badaniach ekotoksykologicznych.....	81
Tabela 17. Porównanie komercyjnych testów bezpośredniego kontaktu z fazą stałą.....	85
Tabela 18. Wartości EC ₅₀ badanych związków wobec bakterii <i>A. fischeri</i> (modyfikowany protokół Microtox® Basic Solid Phase Test) po 5, 15 i 30 minutach ekspozycji.....	86
Tabela 19. Wartości EC ₅₀ badanych formułacji farmaceutycznych wobec bakterii <i>A. fischeri</i> (modyfikowany protokół Microtox® Basic Solid Phase Test) po 5 i 15 minutach ekspozycji. Dane eksperymentalne przedstawiono jako wartość średnią ± odchylenie standardowe (n = 3). Wyniki opublikowane w pracy własnej [94].	88
Tabela 20. Przewidywana toksyczność mieszanin obliczona z zastosowaniem modeli CA i IA wraz z wartościami MDR (odchylenie wartości eksperymentalnej od przewidywanej). Wyniki opublikowane w pracy [94].	90
Tabela 21. Wartości EC ₅₀ badanych substancji pomocniczych wobec bakterii <i>A. fischeri</i> (modyfikowany protokół Microtox® Basic Solid Phase Test) po 5, 15 i 30 minutach ekspozycji wraz z 95% przedziałem ufności oraz współczynnikami determinacji R ²	98
Tabela 22. Wartości EC ₅₀ różnych form krzemionki wobec <i>A. fischeri</i> w zależności od wielkości cząstek.....	101
Tabela 23. Wartości EC ₅₀ badanych mieszanin zawierających substancje pomocnicze wobec bakterii <i>A. fischeri</i> (modyfikowany protokół Microtox® Basic Solid Phase Test) po 5, 15 i 30 minutach ekspozycji wraz z 95% przedziałami ufności oraz współczynnikami determinacji R ²	104
Tabela 24. Przewidywana toksyczność mieszanin VAL oraz substancji pomocniczych obecnych w formułacjach VAL obliczona z zastosowaniem modeli CA i IA wraz z wartościami MDR (odchylenie wartości eksperymentalnej od przewidywanej).....	106
Tabela 25. Przewidywana toksyczność mieszanin LOS-K obliczona z zastosowaniem modeli CA i IA wraz z wartościami MDR (odchylenie wartości eksperymentalnej od przewidywanej).....	109
Tabela 26. Przewidywana toksyczność mieszanin TEL oraz substancji pomocniczych obecnych w formułacji TEL obliczona z zastosowaniem modeli CA i IA wraz z wartościami MDR (odchylenie wartości eksperymentalnej od przewidywanej).....	110

Tabela 27. Deskryptory molekularne obliczone dla grupy amoniowych cieczy jonowych...	119
Tabela 28. Deskryptory molekularne obliczone dla grupy antagonistów receptora angiotensyny II oraz bifenyli.....	124
Tabela 29. Wykonane analizy zsyntezowanych związków amoniowych wraz ze źródłem, w którym zostały opisane.....	130
Tabela 30. Wykonane analizy ekstrahowanych/syntezowanych leków wraz ze źródłem, w którym zostały opisane.....	139
Tabela S1. Wartości EC ₅₀ badanych związków wobec bakterii <i>A. fischeri</i> otrzymane po 5 i 15 minutach ekspozycji, wraz z 95% przedziałem ufności i współczynnikiem determinacji (R ²). CZĘŚĆ 1 badań.....	150
Tabela S2. Statystyczne opracowanie otrzymanych danych eksperymentalnych (test t-Studenta dla prób zależnych, $\alpha = 0.05$). CZĘŚĆ 1 badań.....	155
Tabela S3. Parametry krzywych uzyskane dla mieszanin (przewidywanie toksyczności w oparciu o model IA). CZĘŚĆ 1 badań.....	157
Tabela S4. Parametry krzywych uzyskane dla mieszanin (przewidywanie toksyczności w oparciu o model IA). CZĘŚĆ 2 badań.....	158
Tabela S5. Wartości pH próbek ARBs, substancji pomocniczych oraz mieszanin wykorzystywanych w testach ekotoksykologicznych (test Microtox®).....	158

SPIS SCHEMATÓW

Schemat 1. Struktury chemiczne chiralnych i achiralnych cieczy jonowych będących analogami strukturalnymi substancji czynnej stosowanej w preparacie Roundup® (sól amoniowa glifosatu), stanowiące przedmiot badań niniejszej pracy doktorskiej. (Grupy R i R* zdefiniowane w rozdziale Badania własne).....	31
---	----

SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1. Ilość publikacji naukowych dotyczących cieczy jonowych w różnych zastosowaniach w latach 1995-2020 [Źródło: Science Finder].....	17
Rys. 2. Transport i przemiany cieczy jonowych w środowisku [opr. na podstawie ^[6]].....	18
Rys. 3. Zestawienie liczby leków wykrytych w wodach powierzchniowych, gruntowych i w wodzie pitnej z podziałem na kraje i regiony świata [źródło: tłumaczenie ^[30]].....	21
Rys. 4. Zestawienie stężeń leków w oczyszczonych ściekach (A) i wodach powierzchniowych (B) [źródło: tłumaczenie ^[20]].....	22
Rys. 5. Rozkład ilości substancji pomocniczych w farmaceutycznych formułacjach doustnych (A). Częstość występowania poszczególnych substancji pomocniczych w tabletkach (B). Średnia ilość substancji pomocniczych w osiemnastu najczęściej przepisywanych lekach doustnych w roku 2016 (C) [źródło: tłumaczenie ^[42]].....	25
Rys. 6. Bakterie <i>A. fischeri</i> , widok ze skaningowego mikroskopu elektronowego, powiększenie x 8000 (A) [źródło: SciencePhoto.com]. Aparat Microtox® Model 500 Analzyer, Modern Water Inc., New Castle, USA (B).....	26
Rys. 7. Struktury chemiczne guanidyniowych, imidazoliowych i fosfoniowych cieczy jonowych badanych w pracy [53].....	28
Rys. 8. Struktury chemiczne protonowanych i nieprotonowanych cieczy jonowych badanych w pracy [61].....	30
Rys. 9. Porównanie wartości EC ₅₀ [mg/L] doksepiny i diltiazemu (A) oraz chlorochiny (B) dla różnych gatunków organizmów wodnych [źródło: opr. na podstawie ^[81] i ^[82]].....	36
Rys. 10. Wartości EC ₅₀ uzyskane po 30 minutach inkubacji bakterii <i>A. fischeri</i> z różnymi farmaceutycznymi formułacjami popularnych leków [źródło: opr. na podstawie [46]].....	38
Rys. 11. Wartości MDR uzyskane dla modelu CA (A) oraz IA (B) dla badanych dwu- (BM1-BM10) i wieloskładnikowych mieszanin (MM). Eksperymentalna krzywa i przewidywane krzywe toksyczności dla mieszaniny wieloskładnikowej (C) [źródło: tłumaczenie ^[100]].....	41
Rys. 12. Przewidywane i eksperymentalne wartości toksyczności dla trójskładnikowej mieszaniny antybiotyków i metabolitu antybiotyku [źródło: tłumaczenie ^[103]].....	42
Rys. 13. Izobologram dwuskładnikowych mieszanin prolek-metabolit w odniesieniu do testu zahamowania bioluminescencji bakterii <i>A. fischeri</i> (A) – narysowana linia ciągła	

dotyczy wartości przewidywanych metodą CA, linia przerywana dotyczy wartości przewidywanych metodą IA. Odchylenie danych eksperymentalnych od danych przewidywanych za pomocą modeli CA i IA (B) [źródło: tłumaczenie ^[108]]	43
Rys. 14. Wartości EC ₅₀ pojedynczych leków (słupki niebieskie), mieszanin dwuskładnikowych (słupki zielone) i mieszaniny trójskładnikowej (słupki pomarańczowy) [źródło: opr. na podstawie ^[116]]	45
Rys. 15. Ilość wszystkich publikacji naukowych dotyczących modelowania QSAR (A) oraz modelowania QSAR w ekotoksykologii (B) [źródło: Science Finder]	46
Rys. 16. Struktury chemiczne badanych związków amoniowych	62
Rys. 17. (A.) Przewidywane wartości logP dla form kwasowych (żółta tabela), zsyntezowanych soli (zielona tabela) oraz komercyjnych herbicydów (czerwona tabela); (B.) Przewidywane wartości współczynnika BCF dla średniego poziomu troficznego. Wartości obliczone przy wykorzystaniu oprogramowania OECD QSAR Toolbox	68
Rys. 18. Konsumpcja leków przeciwnadciśnieniowych w Niemczech w latach 2000-2019 ^[199] . DDD – definiowana dawka dobową (wyjaśnienie w tekście)	76
Rys. 19. Schemat graficzny ilustrujący podejście badawcze stosowane w CZĘŚCI 1 badań farmaceutyków	80
Rys. 20. Porównanie ekotoksyczności wobec <i>A. fischeri</i> całej formulacji farmaceutycznej danej API z toksycznością samej masy tabletkowej (mieszaniny substancji pomocniczych). Na wykresie zaznaczono różnice toksyczności między formulacją API, a jej masą tabletkową	95
Rys. 21. Podsumowanie dokładności przewidywania toksyczności z wykorzystaniem modelu (A.) IA oraz (B.) CA w odniesieniu do trzech badanych leków z grupy ARBs. Linie przerywane dotyczą wartości MDR – linia pomarańczowa wskazuje na MDR = 1 (całkowity brak interakcji). Poniżej tej linii obserwuje się efekty antagonistyczne (MDR < 0.5, linia czerwona), a powyżej efekty synergistyczne (MDR > 2, linia zielona) ^[94] .	96
Rys. 22. Porównanie ekotoksyczności wobec <i>A. fischeri</i> całej formulacji farmaceutycznej zawierającej dany składnik API (otrzymanej poprzez zmieszanie poszczególnych substancji pomocniczych z API) z toksycznością samej masy tabletkowej (mieszaniny substancji pomocniczych bez API) oraz czystą API	113
Rys. 23. Struktury chemiczne związków z grupy amoniowych cieczy jonowych. Na czerwono zaznaczono wspólne elementy strukturalne	115
Rys. 24. Struktury chemiczne związków z grupy ARBs oraz bifenyli. Na czerwono zaznaczono wspólne elementy strukturalne	116

Rys. 25. Schemat procedury postępowania w celu wyznaczenia równania QSAR dla grupy amoniowych cieczy jonowych.....	118
Rys. 26. Wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem wartości przewidywanych modelem opisanym za pomocą równania (1.) przedstawiony dla zbioru uczącego i testowego.....	120
Rys. 27. Schemat procedury postępowania w celu wyznaczenia równania QSAR dla grupy amoniowych cieczy jonowych.....	122
Rys. 28. Wykres rozrzutu wartości obserwowanych względem wartości przewidywanych modelem opisanym za pomocą równania (2.) przedstawiony dla zbioru uczącego i testowego.....	123
Rys. 29. Widmo ¹ H NMR związku 22	132
Rys. 30. Widmo ¹³ C NMR związku 22	132
Rys. 31. Widmo ¹ H NMR związku 23	133
Rys. 32. Widmo ¹³ C NMR związku 23	134
Rys. 33. Widmo ¹ H NMR związku (R)-24	135
Rys. 34. Widmo ¹³ C NMR związku (R)-24	135
Rys. 35. Widmo ¹ H NMR związku (S)-24	136
Rys. 36. Widmo ¹³ C NMR związku (S)-24	137
Rys. 37. Aparat Microtox® Model 500 Analizer.....	137
Rys. 38. Schemat graficzny ilustrujący procedurę izolacji substancji pomocniczych (masy tabletkowej) oraz substancji czynnej z formulacji farmaceutycznej.....	139
Rys. 39. Otrzymane kryształki LOS-H.....	140
Rys. 40. Widmo FT-IR związku LOS-H.....	142
Rys. 41. Widmo ¹ H NMR związku LOS-H.....	142
Rys. 42. Widmo ¹³ C NMR związku LOS-H.....	143
Rys. 43. Widmo FT-IR związku CAN.....	144
Rys. 44. Widmo ¹ H NMR związku CAN.....	144

Rys. 45. Widmo ^{13}C NMR związku CAN..... 145

Rys. 46. Zanieczyszczona matryca zawierająca badaną substancję zawieszona w diluencie (A.); Proces mieszania zanieczyszczonej matrycy z badaną substancją na mieszadle magnetycznym (B.)..... 146