

Određivanje toksičnosti farmaceutika u okolišu

Borojević, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:156900>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tea Borojević

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tea Borojević

ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI FARMACEUTIKA U OKOLIŠU

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Dr. sc. Mirta Čizmić, asistent

Dr. sc. Dajana Kučić, znan. sur.



Ovaj rad sufinanciran je od strane Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-2353 i od strane Vlade Republike Hrvatske projektom ReHOHMem, a izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2016./2017. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger.



Vlada
Republike
Hrvatske

**Izravna uporaba komunalne otpadne vode za navodnjavanje membranskim tehnologijama
(ReHOHMem)**

Projekt se financira u sklopu Programa Vlade Republike Hrvatske za poticanje istraživačkih i razvojnih aktivnosti u području klimatskih promjena za razdoblje od 2015. do 2016. godine

**Sadržaj ove publikacije isključiva je odgovornost Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije*



REPUBLIKA HRVATSKA
MINISTARSTVO ZAŠTITE
OKOLIŠA I ENERGETIKE



ministarstvo znanosti
obrazovanja i sporta



FOND ZA ZAŠTITU OKOLIŠA I
ENERGETSKU UČINKOVITOST



HRZZ
Hrvatska zaklada
za znanost

ZAHVALA:

Zahvaljujem svojoj mentorici i profesorici, izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na ponuđenoj temi, stručnom vodstvu, pomoći, povjerenju, ohrabrenju i trudu koji mi je pružila tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Mariji Vuković-Domanovac i tehničkoj suradnici Marijani Vidaković sa Zavoda za industrijsku ekologiju na pruženoj pomoći i savjetima.

Zahvaljujem se svojoj kolegici Josipi Papac na prenesenom znanju, strpljenju i prijateljstvu.

Zahvaljujem svojim roditeljima i obitelji na odgoju, trudu, podršci, ljubavi, razumijevanju i pomoći koju mi pružaju.

Posebno se želim zahvaliti svojoj najboljoj prijateljici Dorotei Čuk na beskrajnoj podršci tijekom čitavog studiranja i što je vjerovala u mene i kada ja sama nisam.

SAŽETAK

ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI FARMACEUTIKA U OKOLIŠU

Stres, loša prehrana, nedovoljno kretanja i sjedilački način života uzrok su sve više oboljenja. Uz porast broja oboljelih, raste i broj različitih novih bolesti što rezultira povećanom konzumacijom farmaceutika. Rast potrošnje farmaceutika raste iz godine u godinu, tim više što u farmaceutike spadaju i sredstva za osobnu njegu koja se kontinuirano koriste u velikim količinama. Sve te tvari prije ili kasnije završe u okolišu i onečišćuju ga. Najviše farmaceutika završava u vodnom okolišu, koji najviše utječe na sva živa bića.

Problem je nemogućnost praćenja metaboličkog puta farmaceutika u vodi, zbog podložnosti farmaceutika različitim fizikalno-kemijskim reakcijama. Otpadne vode zagađene farmaceuticima ne mogu se dovoljno učinkovito obraditi klasičnim metodama obrade otpadnih voda. Naime, klasične metode obrade otpadnih voda ne mogu ukloniti male molekule farmaceutika. Također, ne postoje zakonske regulative koje propisuju maksimalno dopuštene koncentracije farmaceutika u okolišu.

Zbog navedenih razloga, vrlo je važno provoditi analize vode i razvijati nove metode obrade voda, kako bi osigurali što dulji i kvalitetniji život u svim dijelovima ekosustava.

Cilj ovog rada je odrediti toksičnost aktivnih supstanci farmaceutika navedenih u Provedbenoj odluci komisije (EU) 2015/495 o utvrđivanju popisa praćenja za tvari za koje je potrebno praćenje diljem Unije u području vodne politike u skladu s Direktivom 2008/105/EZ. To su makrolidni antibiotici (azitromicin, klaritromicin, eritromicin), herbicidi (trialat, oksadiazon), insekticidi (metiokarb, klotianidin, acetamiprid, tiaklopid, tiametoksam, imidaklopid), antioksidansi (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol), nesteroidni antireumatici (diklofenak), estrogenski hormoni (estron, etinilestradiol-17 α , estradiol-17 β) i sredstva za zaštitu od sunca (2-etil-heksil-6-metoksicinamat). Toksičnost se određivala bioluminiscentnim bakterijama *Vibrio fischeri* koje su osjetljive na organska onečišćenja i njihova prisutnost uzrokuje smanjenje njihove luminiscencije. Mjerenja su pokazala kako svi farmaceutici, osim 2-etil-heksil-6-metoksicinamata uzrokuju inhibiciju bakterijske kulture, a najtoksičniji je metiokarb.

Ključne riječi:

farmaceutici, voda, toksičnost, luminiscencija, Vibrio fischeri, insekticidi, herbicidi, antibiotici, hormoni, NSAR, antioksidansi

ABSTRACT

TOXICITY DETERMINATION OF PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT

Stress, bad nutrition, lack of movement and sedentary lifestyle are the cause of more and more illnesses. With the increase in the number of patients, there is a growing number of new diseases leading to increased pharmaceutical consumption. Growth in pharmaceutical consumption grows year after year, and more so in pharmaceuticals, but also personal care products that are used in large quantities.

All these substances sooner or later end up in the environment and pollute it. Most pharmaceuticals end up in a water environment that affects every living creature.

The problem is the inability of monitoring the metabolic pathway of pharmaceuticals in water because of the susceptibility of the drug to various physico-chemical reactions.

Wastewater, that is polluted by pharmaceuticals can not be efficiently treated by conventional wastewater treatment methods. Classic methods of wastewater treatment can not remove small drug molecules. Also, there are no legal regulations that prescribe maximum permissible concentrations of pharmaceuticals in the environment.

For these reasons, it is very important to conduct water analysis and develop new water treatment methods to ensure the longer and better quality of life of all parts of the ecosystem.

The aim of this research is to determine the toxicity of the active substances listed in Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 on the basis of watch lists for substances that need monitoring across the EU in the field of water policy according to Directive 2008/105 / EC. They are macrolide antibiotics (azithromycin, clarithromycin, erythromycin), herbicides (trialat, oxadiazone), insecticides (methiocarb, clotianidine, acetamiprid, thiacloprid, thiamethoxam, imidacloprid), antioxidants (2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol), nonsteroidal anti-inflammatory drugs (diclofenac), estrogen hormones (estrone, ethinylestradiol-17 α , estradiol-17 β) and suncreening agents (2-ethylhexyl-6-methoxycinnamate). Toxicity was determined by bioluminescence bacteria *Vibrio fischeri* that are sensitive to organic pollutants and their presence causes reduction of their luminescence. Measurements have shown that all pharmaceuticals except 2-ethylhexyl-6-methoxycinnamate cause bacterial culture inhibition. The most toxic compound is methiocarb.

Keywords:

pharmaceuticals, water, toxicity, luminescence, Vibrio fischeri, insecticides, herbicides, antibiotics, hormones, NSAIDs, antioxidants

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. FARMACEUTICI	2
2.1.1. FARMACEUTICI U VODAMA	3
2.1.2. ISPITIVANI FARMACEUTICI	5
2.2. TOKSIČNOST	19
2.2.1. TOKSIČNOST FARMACEUTIKA	20
2.2.2. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI	22
2.2.3. <i>Vibrio fischeri</i>	24
2.2.4. BIOLUMINISCENTNA METODA – DIN 38412 - L34	25
2.2.5. ISKAZIVANJE TOKSIČNOSTI	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO	28
3.1. MATERIJALI	28
3.1.1. KORIŠTENE KEMIKALIJE	28
3.1.2. ISPITIVANI FARMACEUTICI	29
3.2. INSTRUMENT ZA PROVEDBU TOKSIČNOSTI	30
3.3. POSTUPAK ODREĐIVANJA TOKSIČNOSTI	31
3.3.1. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE	31
3.3.2. PRIPREMA OTOPINE ZA RESUSPENZIJU	31
3.3.3. PRIPREMA RADNE OTOPINE ZA RESUSPENZIJU I OTOPINE REFERENTNIH TVARI	32
3.3.4. PRIPREMA TEMELJNIH STANDARDNIH OTOPINA I RADNIH OTOPINA FARMACEUTIKA	33
3.3.5. STERILNA TEHNIKA RADA	34
3.3.6. AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA	34
3.3.7. PRECJEPLJIVANJE BAKTERIJSKE KULTURE	34
3.3.8. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE	35
3.4. MJERENJE TOKSIČNOSTI	35
3.4.1. PRIPREMA MJERENJA	35
3.4.2. PRIPREMA GEOMETRIJSKOG NIZA	36
3.4.3. MJERENJE I OČITAVANJE REZULTATA	36
4. REZULTATI I OBRADA REZULTATA	38
4.1. REZULTATI ISPITIVANJA MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA	38
4.2. REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI INSEKTICIDA	41

4.3.	REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI HERBICIDA	48
4.4.	REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI NESTEROIDNIH ANITREUMATIKA.....	50
4.5.	REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI ANTIOKSIDANSA	51
4.6.	REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI ESTROGENSKIH HORMONA	52
4.7.	REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI SREDSTVA ZA ZAŠTITU OD SUNCA.....	55
5.	ZAKLJUČAK	58
6.	LITERATURA	60
7.	DODACI.....	63
7.1.	POPIS SLIKA.....	63
7.2.	POPIS TABLICA	64

1. UVOD

Voda je neophodna za život, u svakom svom obliku, te je zbog nemogućnosti života bez nje ključna zaštita i očuvanje tog „izvora života“. To je prepoznala i Europska unija koja je izdala Okvirnu direktivu o vodama (ODV). ODV je glavni dokument na nivou Europske zajednice na području vodne politike. Između ostalog uspostavlja osnovne principe zaštite voda od onečišćenja. Strategija sprečavanja onečišćenja voda uključuje listu od 45 prioriternih tvari ili grupe tvari koje predstavljaju značajan rizik za vodni okoliš. Posebno mjesto zauzimaju „nove onečišćujuće tvari“ gdje su svrstani i farmaceutici.

Oni obuhvaćaju velik broj kemijskih spojeva koji se upotrebljavaju u humanoj i veterinarskoj medicini, sredstva za osobnu higijenu kao i sredstva koja se upotrebljavaju u kućanstvu u svrhu poboljšanja kvalitete svakodnevnog života. Posljedica upotrebe farmaceutika je njihova prisutnost u okolišu gdje zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava podliježu abiotičkim (hidroliza i fotoliza) ili biotičkim (biološka razgradnja bakterijama i gljivicama) procesima razgradnje. Rezultat navedenih procesa vodi smanjenju koncentracije početne molekule farmaceutika te nastanku novih spojeva koji mogu biti više ili manje stabilni i toksični u odnosu na početnu molekulu farmaceutika. Unatoč tome što su farmaceutici prvenstveno namijenjeni liječenju, metaboliti i razgradni produkti pokazuju visoku razinu toksičnosti iako su u okolišu prisutni u vrlo niskim koncentracijama. Zato je važno razviti i cjelokupan sustav praćenja takvih spojeva u okolišu.

Potrošnja lijekova u cijelom svijetu sve je veća iz godine u godinu. U Republici Hrvatskoj je prema posljednjem Izvješću o potrošnji lijekova za 2015. godinu bilo potrošeno ukupno 5.266.937.944 kuna na lijekove, dok je 2014. godine ta potrošnja iznosila 5.005.884.342 kuna.

Podaci o toksičnom utjecaju farmaceutika na čovjeka su istraženi i jasno definirani, ali toksičnost za okoliš nije utvrđena. Najveći razlog tome je nemogućnost potpunog kontroliranja ispuštanja farmaceutika iz industrije i kućanstava u okoliš, stoga je vrlo važno kontinuirano analizirati uzorke vode i utvrditi maksimalno dopuštene količine u okolišu. U tome pomaže ekotoksikologija pomoću koje izravno možemo pratiti utjecaj farmaceutika i produkata razgradnje na živa bića. [1, 2]

2. OPĆI DIO

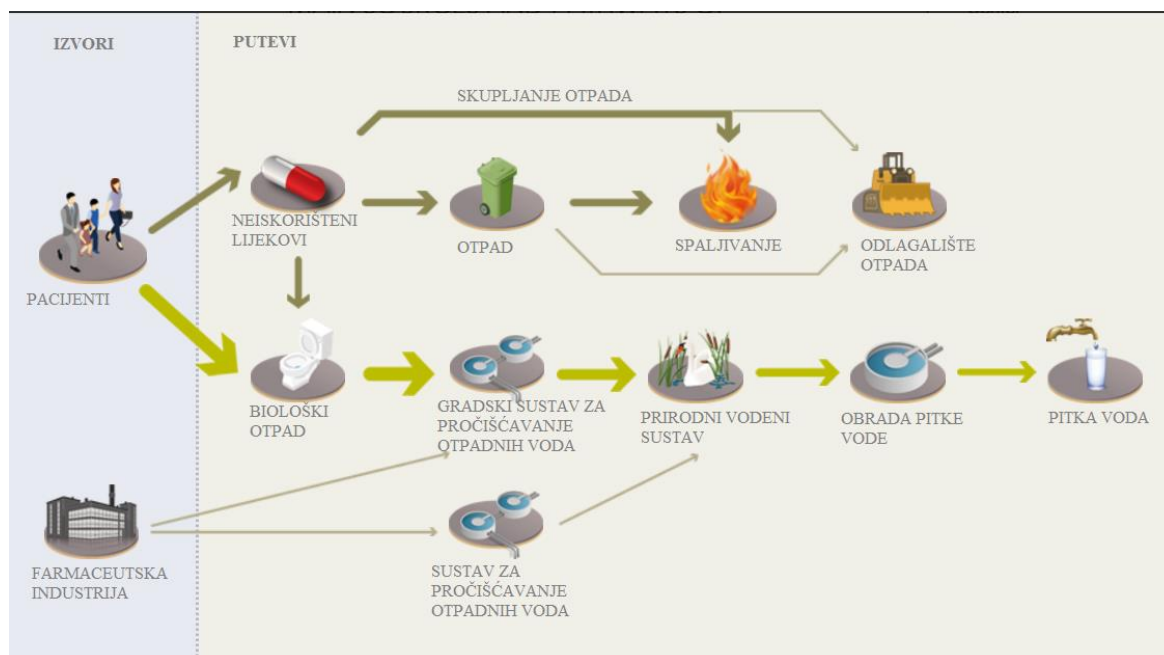
2.1. FARMACEUTICI

Farmaceutici obuhvaćaju sve terapijske lijekove namijenjene ljudima, životinjama, te dodatke prehrani. Proizvodi za osobnu njegu uključuju sve kemijske spojeve koji se nalaze u mirisima, losionima, šamponima, kozmetici, kremama za sunčanje i sapunima.

U svijetu se prema nekim procjenama za humanu medicinu koristi oko 4000 aktivnih farmaceutskih supstanci koje imaju različitu terapijsku primjenu, čija godišnja proizvodnja iznosi više od 100000 tona. Većina modernih lijekova su mali organski spojevi molekulske mase ispod 500 Da, koji su umjereno topljivi u vodi i liofilni. Liofilnost im je ključna kako bi bili bioraspoloživi i biološki aktivni. Razvijeni su da bi već u malim dozama postigli određene farmakološke učinke, pa zbog svojih svojstava često uzrokuju nenamjeravane posljedice za živi svijet. Pripadaju grupi mikrozagađivala, budući da su u vodenoj sredini prisutni u mikrogramskim ili nanogramskim koncentracijama. Potrošnja im sve više raste zbog sve veće starosti stanovništva, zbog porasta broja stanovništva, rasta potrošnje i tržišta proizvodnje, istjecanja patenata, novih neistraženih bolesti. [3, 4]

U ovom radu je određena toksičnost različitih skupina farmaceutika na bakterije *Vibrio fischeri*, a to su makrolidni antibiotici (azitromicin, klaritromicin, eritromicin), herbicidi (trialat, oksadiazon), insekticidi (metiokarb, klotianidin, acetamiprid, tiaklopid, tiametoksam, imidaklopid), antioksidansi (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol), nesteroidni antireumatici (diklofenak), estrogenski hormoni (estron, etinilestradiol-17 α , estradiol-17 β) i sredstva za zaštitu od sunca (2-etilheksil-6-metoksicinamat). Analizirani su svi farmaceutici za koje je potrebno praćenje diljem Unije u području vodne politike u skladu s Direktivom 2008/105/EZ Europskog parlamenta i Vijeća. [5]

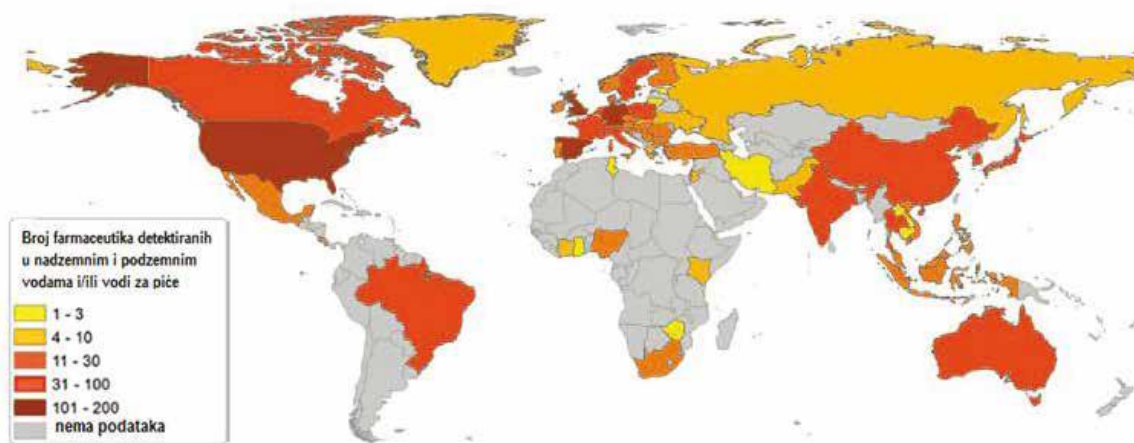
2.1.1. FARMACEUTICI U VODAMA



Slika 1. Tok dospijevanja farmaceutika u okoliš [6]

Nakon primjene, farmaceutski aktivni proizvodi se izlučuju kroz jetru ili bubrege kao smjesa osnovnog aktivnog spoja i metabolita koji je često polarniji, hidrofilniji, a time i toksičniji za okoliš od izvornog lijeka. Velik dio farmaceutika i njihovih metabolita, nakon upotrebe se ispušta nepromijenjen ili u obliku razgradnih produkata koji se teško uklanjaju klasičnim metodama obrade otpadnih voda. Ovisno o učinkovitosti obrade otpadnih voda i kemijskom sastavu farmaceutika, farmaceutici mogu dospjeti u površinske i podzemne vode (**Slika 1.**). Važan način ulaska farmaceutika u okoliš su bolnice, nepropisno odlaganje neiskorištenih lijekova, te farme na kojima se lijekovi, posebice antibiotici, dodaju životinjskoj hrani u svrhu poboljšano g rasta, bolje iskoristivosti prehrane, te radi liječenja ili preveniranja bolesti. Upotrebom stajskog gnojiva antibiotici se mogu prenijeti na poljoprivredno zemljište, a ispiranjem zemljišta i u podzemne vode. Farmaceutici mogu dospjeti u tlo i gnojenjem poljoprivrednih površina aktivnim muljem koji je produkt obrade komunalnih otpadnih voda. Izvor zagađenja površinskih i podzemnih voda je i farmaceutska industrija. Farmaceutici su nađeni u ispuštima nakon obradbe otpadnih voda, površinskim vodama, podzemnim vodama, tlu i naposljetku, u vodovodnoj, pitkoj vodi. Koncentracije koje su pronađene su niske, ali raste zabrinutost zbog moguće bioakumulacije i dugoročnog utjecaja na ljude i vodene organizme. Pronađene količine su daleko ispod one toksične za ljude, ali sve je veći utjecaj na ekosustave (**Slika 2.**). Antibiotici i estrogenski hormoni su skupine farmaceutika koje se najviše

koriste, ispuštaju se u velikim količinama i dugo opstaju u okolišu zbog nemogućnosti biološke razgradnje. Zbrinjavanje takvih voda vrlo je specifično i složeno te redovito zahtijeva kombinaciju različitih postupaka obrade otpadnih voda kako bi se ove vode učinile neškodljive te zadovoljili propisani zakonski kriteriji za ispust u okoliš. [3-5]



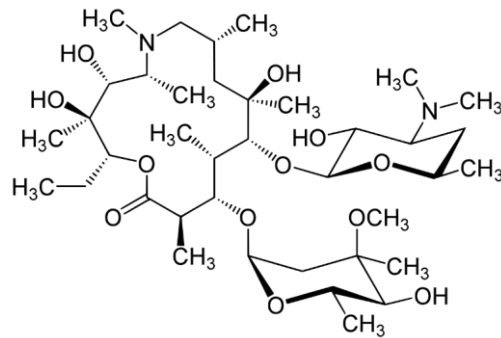
Slika 2. Broj farmaceutika detektiranih u nadzemnim i podzemnim vodama i/ili vode za piće [4]

2.1.2. ISPITIVANI FARMACEUTICI

2.1.2.1. MAKROLIDNI ANTIBIOTICI

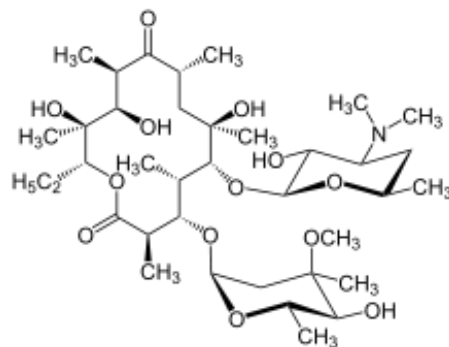
Makrolidni antibiotici sastoje se od makrocikličkog prstena (14-16 C atoma) s dvije pridružene molekule šećera. Makrolidni antibiotici su složene smjese vrlo sličnih antibiotika, koje se razlikuju po šećerima koji su supstituirani na ugljikove atome u osnovnoj strukturi. Prvi otkriven makrolidni antibiotik bio je eritromicin. Makrolidi selektivno djeluju na bakterijske ribosome vezanjem za podjedinice 50S. Tako zaustavljaju sintezu bjelančevina time što se ulaze u proces translokacije peptidil tRNK na ribosomu inhibirajući aktivnost enzima peptidiltransferaze koji stvara peptidne veze između aminokiselina. Ovisno o koncentraciji djeluju bakteriostatski i baktericidno. Učinkovito djeluju na gram-pozitivne bakterije (pneumokoke, streptokoke, korinebakterije, listerije, *Clostridium* sp.), a vrlo slabo na gram-negativne bakterije (*Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*). Kao aktivne tvari lijekova koriste se za ljude i životinje, a primjenjuju se u obliku soli ili estera. Najbolje se resorbiraju iz tankog crijeva, najviše koncentracije koncentracije postižu u serumu kroz najkasnije dva sata od konzumacije, ovisno o prisutnosti hrane u crijevima ili obliku lijeka koji je primijenjen. Makrolidni antibiotici i njihovi metaboliti se izlučuju putem žuči i jetre više od 60 %, a mokraćom se izlučuje manje od 10%. Najpoznatiji makrolidni antibiotici su: eritromicin, azitromicin, klaritromicin, spiramicin, tulatromicin i tilozin. U ovom radu ispitivani su azitromicin, eritromicin i klaritromicin. [7]

Azitromicin (**Slika 3.**) je iz skupine makrolidnih antibiotika, sintetiziran u Plivi 1980. godine. Njegovo baktericidno djelovanje je otkriveno u prvim godinama nakon sintetiziranja i 1988. izbačen je na tržište pod imenom Sumamed, jedan od najpoznatijih lijekova na svijetu. U svojim izdanjima različitih farmaceutskih kompanija azitromicin je već godinama najkorišteniji antibiotik u SAD-u. Primjenjuje se u liječenju infekcija koje uzrokuju bakterije i drugi mikroorganizmi, poput: infekcije pluća, ždrijela ili nosa, infekcije uha, infekcije kože i mekih tkiva te spolno prenosivih bolesti uzrokovanih klamidijom. [8]



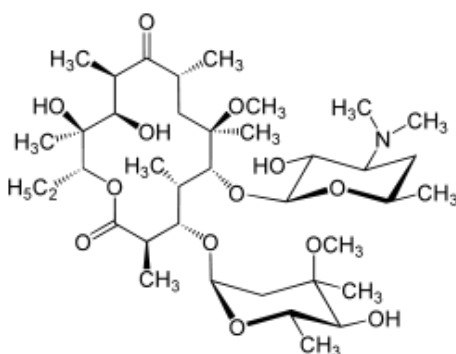
Slika 3. Struktura molekule azitromicina [9]

Eritromicin (**Slika 4.**) je prvi otkriveni makrolidni antibiotik koji se sastoji od makrocikličkog prstena, te šećera kladinoze i dezozamina. Eritromicin se primjenjuje u liječenju velikog broja različitih infektivnih bolesti kao što su: infekcije gornjeg i donjeg dijela dišnog sustava, upale uha (upale srednjeg i vanjskog uha, mastoiditis), upale usne šupljine, upale oka, infekcije kože i potkožnog tkiva, gastrointestinalne infekcije te protiv ostalih infekcija poput uretritisa, šarlaha, gonoreje, difterije i sifilisa. [10]



Slika 4. Struktura molekule eritromicina [9]

Klaritromicin (**Slika 5.**) je sintetiziran 1980.-e godine kao derivat eritromicina i njegovo ime zapravo je 6-O-metileritromicin. Cilj njegove sinteze bio je napraviti lijek koji će biti stabilniji od eritromicina u kiseloj želičanoj sredini. Prema podacima WHO-a jedan je od lijekova s najmanje zabilježenih nuspojava, a s jednom od najširih upotreba. Klaritromicin se koristi u liječenju infekcija kao što su: infekcije gornjih i donjih dišnih puteva, infekcije kože i potkožnog tkiva, infekcije uzrokovane bakterijom *Helicobacter pylori* povezane s bolešću dvanaesnika. Više se koristi za liječenje životinja nego ljudi. [11]



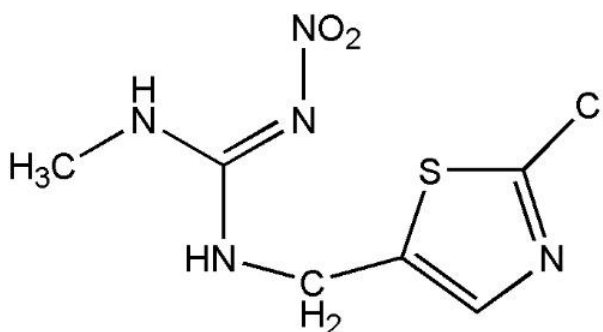
Slika 5. Struktura molekule klaritromicina [9]

2.1.2.2. INSEKTICIDI

Insekticidi su vrsta farmaceutika kemijskog ili biološkog podrijetla čija je funkcija suzbijanje štetnih kukaca-insekata na različitim poljoprivrednim kulturama. Glavni cilj upotrebe insekticida je spriječiti hranjenje insekata na kulturi, a to se sprječava prekidom neke životne funkcije insekta što dovodi do njegovog ugibanja. Prema početnom djelovanju insekticidi se dijele na one s inicijalnim i rezidualnim djelovanjem. Rezidualno djelovanje je sporije, ali trajnije i učinkovitije jer se na taj način insekticid dulje zadržava u kulturi. Prema mjestu primjene razlikujemo insekticide za tretiranje biljaka, drva, tla i sjemenja, žita i zrnatih mahunarki u skladištima i za fumigaciju. [12, 13]

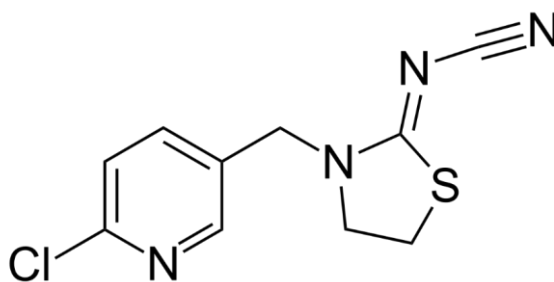
Najrašireniji insekticidi na svijetu, neonikotinoidi, naziv su dobili prema svojoj kemijskoj sličnosti nikotinu. Osim po strukturalnoj sličnosti, slično im je i djelovanje jer djeluju na središnji živčani sustav insekata. Djeluju tako što utječu na prijenos stimulansa u živčanomsustavu insekta. Pogotovo djeluje na blokadu nikotinergijskih živčanih puteva. Ova blokada vodi do nagomilavanja acetilholina, važnog neurotransmitera, što rezultira paralizom insekta te vrlo često ismrti. Taj način je efikasan kod direktnog kontakta i putem oralnog uzimanja. Provedena su različita istraživanja o štetnosti ove skupine farmaceutika na ostale životinje. Neonikotinoidi su dokazani uzrok masovnog pomora pčela, no osim njima, mogu škoditi i malim pticama, leptirima i vodenim beskrležnjacima. Vrlo su toksični čak i u minimalnim koncentracijama u tragovima stoga je njihova upotreba u Hrvatskoj zabranjena. U ovom radi ispitivani su klotianidin, tiakloprid, imidakloprid, acetamipid i tiametoksam. [14, 15]

Klotianidin (**Slika 6.**) je najvažniji predstavnik neonikotinoidea. On je insekticid strukturom sličan nikotinu, kao i ostali predstavnici te skupine, ali znatno manje toksičan od njega. Klotianidin je alternativa organofosfatima, karbamatima i piretroidnim pesticidima. To predstavlja manje rizike za sisavce, uključujući ljude, u usporedbi s organofosfatima i karbamatima. Pomaže u sprječavanju štetnika insekata da povećaju otpornost na organofosfatne i piretroidne pesticide. Međutim, neonikotinoidea prašina koja se oslobađa tijekom primjene može se zadržati u obližnjim poljima do nekoliko godina i utjecati na biljke i životinje, poput pčela, te na njih djelovati toksično. Znatne količine klotianidina pronađene su analizom peludi ili nektara pčela. Visok rizik je i primjena klotianidina na usjeve kukuruza i uljane repice zbog nedovoljno istraženog utjecaja na čovjeka. Klotianidin je alternativa organofosfatima, karbamatima i piretroidnim pesticidima. To predstavlja manje rizike za sisavce, uključujući ljude, u usporedbi s organofosfatima i karbamatima koji su daleko toksičniji. Pomaže u sprječavanju štetnika insekata da povećaju otpornost na organofosfatne i piretroidne pesticide. [16]



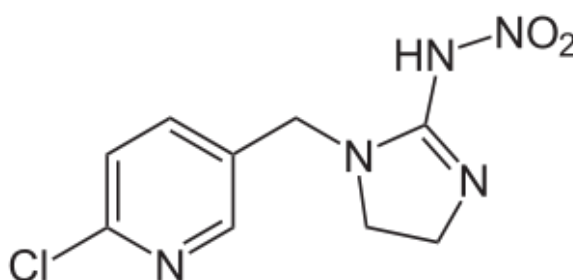
Slika 6. Struktura molekule klotianidina [9]

Tiakloprid (**Slika 7.**) je vrsta insekticida iz skupine neonikotinoidea koji djeluje tako da ometa prijenos podražaja u živčanom sustavu. Visoko je učinkovit na niskim i visokim temperaturama. Vrlo brzo ulazi u tkivo biljke, a djeluje i na insekte čim dođu u kontakt s tretiranom biljkom. Nije opasan za oprašivače te se može primijeniti i u cvatnji. Učinkovito suzbija lisne uši na voćkama, rajčici, paprici, krumpiru, krastavcima, lubenicama i ružama. Manje je toksičan od klotianidina, a učinkovitiji je od organofosfatnih i karbamatnih insekticida. [17]



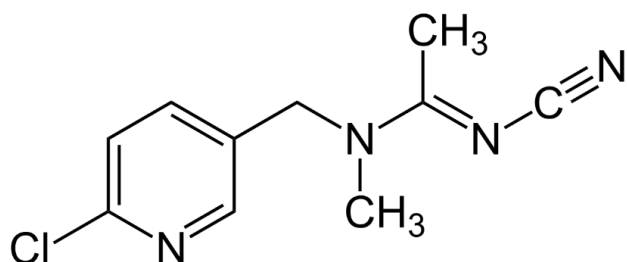
Slika 7. Struktura molekule tiakloprida [9]

Imidakloprid (**Slika 8.**) je sistematski insekticid koji djeluje kao neutrotoksin za insekte. Pošto se imidakloprid puno jače veže na neuroreceptore insekata nego na neuroreceptore sisavaca, ovaj insekticid je daleko otrovniji za insekte. Danas je imidakloprid jedan od najrasprostranjenijih i najviše korištenih insekticida na svijetu. Prodaje se pod mnogim trgovačkim imenima za razne upotrebe; može se primijeniti putem injekcije u tlo, drvo, premazom po kori drveća, lišća, posipanjem po tlu u obliku granula ili kao tekućina, kao i za primjenu premazivanjem pesticida po sjemenu biljaka prije sađenja. Druge upotrebe uključuju primjenu za temelje građevina za zaštitu od termita, za zaštitu vrtova, zaštitu kućnih životinja (pasa i mačaka) od buha, te zaštitu drveća od insekata. [18]



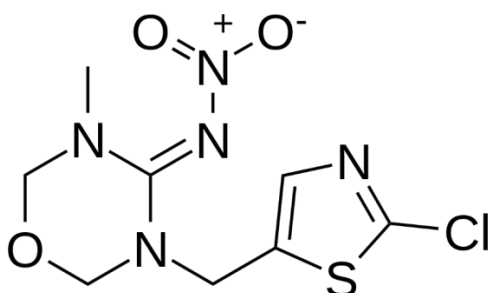
Slika 8. Struktura molekule imidakloprida [9]

Acetamiprid (**Slika 9.**) pripada neonikotinoidnoj klasi insekticida, koji djeluje kao selektivni agonisti za nikotinske acetilkoline receptore u insektima. Razvijen je 1990.-ih godina u Japanu i proširili su se na cijeli svijet. Unatoč njegovoj uporabi širom svijeta, nije dovoljno istražena toksičnost, pogotovo za ljude. Kliničke posljedice akutnog trovanja acetamipridom uopće nisu definirane i zbog toga je vrlo važan nadzor i praćenje toka acetamiprida u okolišu. [19]



Slika 9. Struktura molekule acetamiprida [9]

Tiametoksam (**Slika 10.**) je insekticid širokog spektra, što znači da ga biljke brzo apsorbiraju i prenose na sve dijelove, uključujući pelud. Insekt može apsorbirati tiametoksam u trbuhu nakon hranjenja ili izravnim kontaktom, uključujući i njegov trahealni sustav. Spoj ometa nikotinskih acetilkolinskih receptora u središnjem živčanom sustavu i na kraju paralizira mišiće insekata. Selektivna toksičnost neonikotinoida kao što je tiametoksam za insekte je veća od sisavaca zbog veće osjetljivosti receptora acetilkolina insekata. Tiametoksam je definirankao netoksičan za ribu i alge, blago toksičan za ptice, vrlo toksičan za insekte i jako toksičan za pčele. Otrovan je za život u vodi pogotovo nakog duljeg ispuštanja ili bioakumulacije. [20]

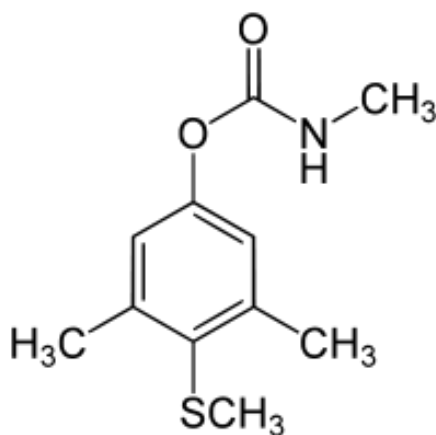


Slika 10. Struktura molekule tiametoksama [9]

Karbamatni pesticidi su dobiveni iz karbaminske kiseline i ubijaju insekte na sličan način kao organofosfatni insekticidi jer djeluju na središnji živčani sustav. Oni se naširoko koriste u kućama, vrtovima i poljoprivredi. Njihov način djelovanja je inhibicija kolinesteraznih enzima, što utječe na prijenos živčanog impulsa. Prvi karbamat, karbaril, uveden je 1956. godine, a najviše se koristi diljem svijeta od svih ostalih karbamata. Zbog relativno niske razine karbamilne oralne i kožne toksičnosti za čovjeka i širokog djelotvornog spektra na insekte, imao je široku primjenu u okruženju travnjaka i vrtova. Glavni put ulaska karbamata u organizam je inhalacijom ili gutanjem, te sekundarno putem kože. Dermalna izloženost je manje toksična od inhalacije ili gutanja. Oticanje mišića, vrtoglavica, znojenje i mučnina su prvi simptomi koji se javljaju pri kraćoj izloženosti. Glavobolja, salivacija, povraćanje, bolovi

u trbuhu i proljev često su istaknuti na višim razinama izloženosti. U ovom radu izmjerena je toksičnost metiokarba. [21]

Metiokarb (**Slika 11.**) je pesticid karbamata koji se koristi protiv ptica i insekticida od 1960.-ih. Počeo se koristiti kao zamjena organokloridima koji su bili vrlo toksični za biljne vrste na područjima njegove primjene. Kao i ostali karbamati, metiokarb inhibira reverzibilnu aktivnost acetilkolinesteraze koja rezultira kolinergijskom stimulacijom što čini metiokarb potentnim neurotoksinom. Metiokarb je također poznat otrov za vodene organizme, te se njegov metabolički put u vodi tek treba istražiti. Budući da je metiokarb široko korišten kao insekticid na poljoprivrednim posjedima, također su proučeni rizici za okoliš kako bi se utvrdili sigurnosni rizici za ljudsko zdravlje. Sudbina metiokarba u vodi i tlu određena je iz metabolita nastalih aerobnom razgradnjom, fotolizom, adsorpcijom i ispiranjem. U tlu je poluživot metiokarba manji od dva dana, ali se njegova prisutnost ne može detektirati tek nakon 217 dana kada se sav metabolizira u CO₂. U vodi poluživot metiokarba ovisi o pH, ali pri pH 7 iznosi oko 28 dana. [22]



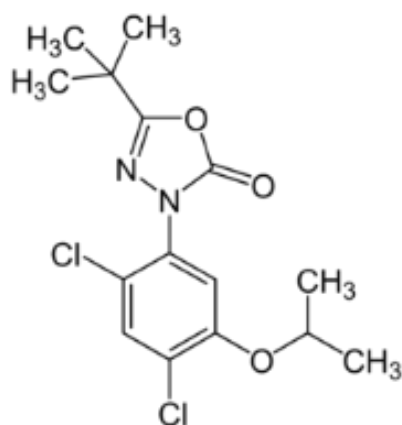
Slika 11. Struktura molekule metiokarba [9]

2.1.2.3. HERBICIDI

Herbicidi su pesticidi koji se koriste za ubijanje neželjenih biljaka - korova. Selektivni herbicidi ubijaju određene biljke dok ostavljaju željeni usjev relativno zdravim. Obično se koriste kada je korov u ranim fazama razvoja. Herbicidi koji se upotrebljavaju za čišćenje otpadnih površina nisu neselektivni i ubijaju sve biljke s kojima dolaze u dodir. Neke biljke proizvode prirodne herbicide, kao što je orah. Herbicidi su naširoko korišteni u poljoprivredi i na travnjacima i parkovima kojima upravlja grad. Primjenjuju se u programima kontrole vegetacije za održavanje autocesta i željeznica. Manja količina se koristi u šumarstvu,

pašnjačkim sustavima i upravljanju područjima koja se izdvajaju kao stanište divljih životinja. Toksičnost za čovjeka i životinje može proizaći iz neprikladne primjene, od izravnog kontakta s terenskim radnicima, inhalacijom iz zraka, nepravilnim skladištenjem ili potrošnjom hrane koja je na bilo koji način došla u dodir s određenim herbicidom. Herbicidi mogu doći i u dodir s vodom te putem padalina i podzemnih voda doći do vode za piće, stoga su potrebne česte kontrole vode. U ovom radu ispitivani su oksadiazon i trialat. [23, 24]

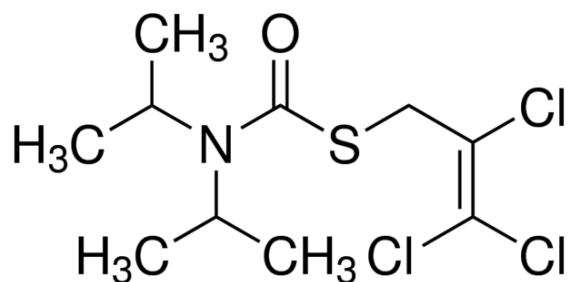
Oksadiazon (**Slika 12.**) je herbicid namijenjen za primjenu prije rasta korova ili iznimno odmah nakon pojave korova. Kada se primjenjuje na tlo tijekom tih faza, oksadiazon kontrolira i inhibira rast nekih nepoželjnih korova, kao što su listovi, šibljice, trave ili grmovi. Oksadiazon je inhibitor protoporfirinogen oksidaze, esencijalnog enzima u rastu biljaka i na taj način sprječava njihov rast. Nikada se ne smije ispuštati izravno u odvod ili gdje je prisutna površinska voda jer može zagađivati izvore pitke vode. Oksadiazon se može koristiti za kontrolu korova na utvrđenom višegodišnjem travnjaku i registriran je za komercijalnu uporabu u rasadnicima, travnjaku, neprehrambenim kulturama i gradskim zelenim površinama. Oksadiazon je označen kao praktički netoksičan za sisavce, slabo toksičan za ptice, a umjereno do visoko toksičan za ribe. Pretjerana izloženost oksadiazona može izazvati iritaciju kože, oka i nosa. Također je klasificiran kao „vjerojatno da je kancerogen za ljude“ na temelju laboratorijskih testova izvedenih na miševima i štakorima, gdje su se nakon dugotrajne, ponovljene izloženosti na nekim jedinkama pojavio tumor jetre. [25]



Slika 12. Struktura molekule oksadiazona [9]

Trialat (**Slika 13.**) pripada kemijskoj klasi tiokarbamata. To je selektivni herbicid prije svega koji se koristi za suzbijanje korova u poljoprivrednim usjevima. Koristi se selektivno za kontrolu divljih zobi, crne trave i godišnje livadne trave u ječmu, pšenici, grašaku, leći, raži,

kukuruzu, repi, mrkvi i luku. Trialat je dostupan kao emulzijski koncentrat i u granulama različitih veličina. Trialat je slabo topljiv u vodi, ali se dobro adsorbira na tlo. Međutim, ako postoji značajna vlaga ili niska razina organske tvari u tlu, trialat se može desorbirati i takvim situacijama moguća su onečišćenja podzemnih voda. U područjima gdje su velike kiše, ili gdje je vodeni stol blizu površine na kojoj se koristi trialat, on može ući u podzemne vode. Trialat je vrlo toksičan za ribu i druge vodene organizme. U vodi dolazi do bioakumulacije trialata što dovodi do potpunog pomora riba. [26]

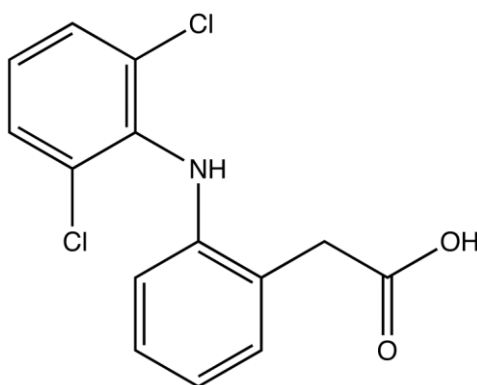


Slika 13. Struktura molekule trialata [9]

2.1.2.4. NESTEROIDNI ANTIREUMATICI

Nesteroidni antireumatici ili nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAR) su pouzdano djelotvorni lijekovi koji čine najbrojniju skupinu lijekova, oko pedesetak preparata. Primjenjuju se za liječenje bolova, povišene tjelesne temperature, svih muskuloskeletnih bolesti i kao tromboprolifaksa. Svakodnevno se konzumiraju diljem cijelog svijeta za smanjenje vrlo širokog spektra bolova, te je u populaciji rasprostranjeno uvjerenje kako se ne radi o potencijalno opasnim lijekovima koji zahtijevaju oprez pri uzimanju. Nesteroidni antireumatici su skupina lijekova koji imaju jednaka svojstva i jednako se ponašaju u organizmu, iako pripadaju različitim kemijskim skupinama. Većinom su derivati slabih kiselina. Možemo ih podijeliti na derivate octene kiseline i srodne spojeve (diklofenak, indometacin), derivate enolne kiseline (piroksikam, tenoksikam, meloksikam), derivate propionske kiseline (ibuprofen, ketoprofen, naproksen) i koksibe. Apsorbiraju se gotovo u potpunosti iz gastrointestinalnog trakta, metaboliziraju u jetri i uglavnom izlučuju kroz bubrege. Djelovanje im se temelji na inhibiciji sinteze prostaglandina blokadom enzima ciklooksigenaze u ciklusu arahidonske kiseline. U ovom radu analizirana je toksičnost diklofenaka. [27]

Diklofenak (**Slika 14.**) pripada skupini lijekova pod nazivom nesteroidni protuupalni lijekovi, odnosno nesteroidni antireumatici (NSAR), a djeluje tako da uklanja bol (analgetsko djelovanje) i smanjuje upalu (antiinflamatorno djelovanje). Diklofenak se koristi za ublažavanje boli i smanjenja upale kod reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, akutnog napada gihta, ankilozantnog spondilitisa, bolova u leđima, uganuća, iščašenja, sportskih ozljeda, prijeloma, upala tetiva i ostalih zglobnih struktura. Također se koristi za liječenje boli i upale nakon stomatoloških i manjih kirurških zahvata. Diklofenak se koristi i kao aktivni sastojak nekih lijekova za ublažavanje napadaja migrene, međutim djeluje ako se kozumira nakon početka napadaja, ali ne utječe na obične glavobolje ni na samu učestalost napadaja migrene. [28, 29]

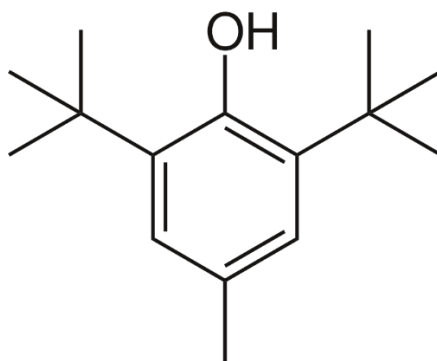


Slika 14. Struktura molekule diklofenaka [9]

2.1.2.5. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. Slobodni radikali su kemijski spojevi velike reaktivnosti uslijed prisutnosti nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci. Nastaju svakodnevno u organizmu u procesu oksidacije hrane u stanicama, odnosno stvaranja energije neophodne za život. Vezivanjem slobodnih radikala na lipide, ugljikohidrate, bjelančevine i genetski materijal nastaju nove lančane reakcije i može doći do oštećenja tkiva. Nagomilavanje slobodnih radikala narušava zdravlje i ubrzava starenje, stoga je nužna upotreba antioksidansa. Glavni je mehanizam djelovanja antioksidansa stupanje u reakciju sa slobodnim radikalima, oslabljujući ih i deaktivirajući. Antioksidansi usporavaju starenje, snižavaju razinu kolesterola, smanjuju rizik nastanka raka, pomažu suzbijanju razvoja tumora, štite srce i krvne žile, pomažu kod kroničnih plućnih bolesti. Najvažniji prirodni antioksidansi su vitamin C, vitamin E, selen, cink i koenzim Q. U ovom radu ispitivana je toksičnost 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenola. [30]

2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (**Slika 15.**) koristi se kao antioksidans u proizvodima kao što su kozmetička, farmaceutska industrija, kod proizvodnje guma, električnog transformatorskog ulja, te kod tekućina za balzamiranje. U naftnoj industriji, gdje je poznat kao dodatak gorivu AO-29, koristi se u hidrauličkim tekućinama, turbinskim i prijenosnim uljima i mlaznim gorivima. 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol se također koristi za sprječavanje stvaranja peroksida u dietil eteru i drugim laboratorijskim kemikalijama. [31]



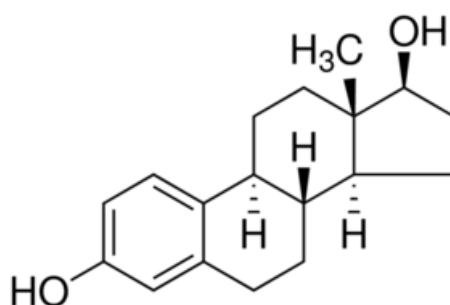
Slika 15. Struktura molekule 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenola [9]

2.1.2.6. ESTROGENSKI HORMONI

Ženski spolni hormoni i estrogeni smatraju se najmoćnijim endokrino aktivnim spojevima. Steroidni hormoni zbog svoje nepolarosti lako difuzijom prolaze kroz staničnu membranu u stanicu gdje se vežu za estrogenske receptore. Najviše se koriste u kontracepcijskim pripravcima i u terapiji nekih vrsta raka i hormonskih poremećaja. I prirodni i sintetički hormoni, u konjugiranom ili nekonjugiranom obliku, izlučuju se urinom sisavaca i ulaze u okoliš ispuštima postrojenja za obradu otpadnih voda ili neobrađenim ispuštima. Estrogenski odziv u ribama uzrokuju koncentracije manje od onih koje današnji uređaji mogu detektirati u okolišu. Sve češće su povezivani s određenim zabrinjavajućim učincima na razmnožavanje i razvoj zametaka, poput feminizacije muških jedinki, smanjene plodnosti ili hermafroditizma. Od prirodnih hormona najpoznatiji su estradiol-17 β , estriol i estron, a od polusintetskih etinilestradiol-17 α . Od prve mjesečnice do menopauze glavni hormon je estradiol-17 β , a u menopauzi u tijelu nalazimo više estrona. U ovom radu ispitivani su estradiol-17 β , estron i etinilestradiol-17 α . [3, 32]

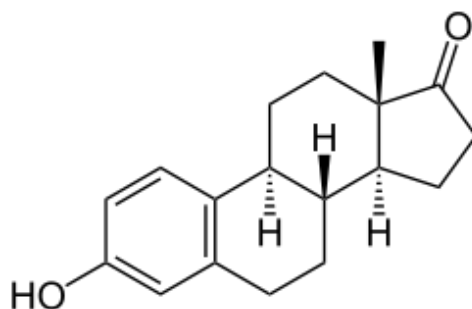
Estradiol-17 β (**Slika 16.**) nastaje iz testosterona i estrona, koji nastaju iz androstendiona. Najjači estrogenski učinak ima upravo estradiol-17 β zbog čega se smatra glavnim estrogenom. Estradiol je prvi izoliran hormon 1935. godine. Prvi je hormon koji je postao

dostupan kao lijek, u obliku estradiol benzoata 1936. godine. Estradiol-17 β , kakav se koristi danas, nije bio uveden do 1975. godine. Estradiol-17 β je lijek i prirodni steroidni hormon. Koristi se uglavnom u hormonskoj nadomjesnoj terapiji za menopauzu, hipogonadizam i transrodne žene. Estradiol-17 β se može uzimati kroz usta, kao gel ili flaster koji se primjenjuje na kožu, kroz vaginu, injekcijom u mišić, ili upotrebom implantata koji se stavlja u masno tkivo tijela. Nuspojave estradiola-17 β kod žena uključuju smanjenje i povećanje grudi, glavobolju, zadržavanje tekućine i mučninu. Muškarci i djeca koja su izložena estradiolu mogu razviti simptome feminizacije, kao što je razvoj dojki, a muškarci također mogu doživjeti hipogonadizam i neplodnost. Estradiol-17 β se ne smije upotrebljavati kod žena koje su trudne, doje ili kod raka dojke. [33]



Slika 16. Struktura molekule estradiola-17 β [9]

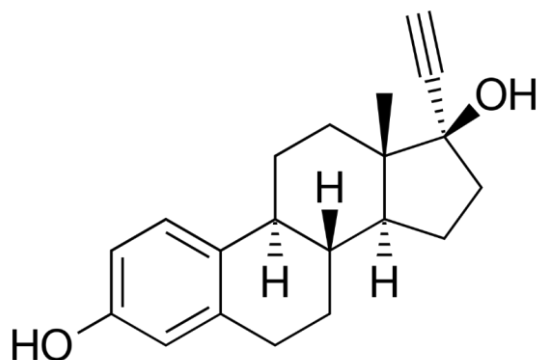
Estron (**Slika 17.**) je jedan od tri estrogena koji se prirodno pojavljuju, a drugi su estradiol i estriol. Estron se sintetizira iz androstenediona pomoću sustava aromataznog enzima u jajnicima i posteljicama, a također se sintetizira iz estradiola pomoću 17-hidroksisteroid dehidrogenaze u jetri. Serumske koncentracije estrona u žena u premenopauzama variraju prema menstrualnom ciklusu i postaju najdominantniji estrogen u žena u menopauzi. [34]



Slika 17. Struktura molekule estrona [9]

Etinilestradiol-17 α (**Slika 18.**) je estrogen i sintetički derivat estradiola-17 β , steroidnog hormona i glavnog endogenog estrogena kod ljudi. Etinilestradiol-17 α se koristi kao lijek i

sastoji se od gotovo svih formulacija kombiniranih pilula za kontracepciju, što ga čini gotovo jedinim sintetskim estrogenom koji se koristi za tu svrhu. Patentiran je 1935. godine i uveden je u medicinsku uporabu 1943. godine, a u oralnim kontraceptivima počeo se koristiti 1964. godine. Estrogeni usmjeravaju razvoj ženskog genotipa u embriogenezi i pubertetu. Učinkovitost oralne primjene etinilestradiola je olakšana etinilnom supstitucijom na položaju C-17, koja inhibira metabolizam jetrenog metabolizma. Etinilestradiol se također brzo i gotovo potpuno apsorbira iz gastrointestinalnog trakta. [35]

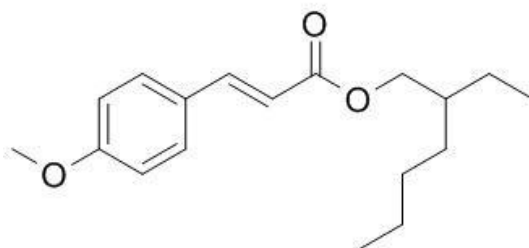


Slika 18. Struktura molekule etinilestradiola-17 α [9]

2.1.2.7. SREDSTVA ZA ZAŠTITU OD SUNCA

Sredstva za zaštitu od sunca kombiniraju organske i anorganske kemikalije kako bi filtrirale različite vrste zraka sunca tako da što manja količina dođe do dubljih slojeva ljudske kože. Najčešće su u obliku krema ili losiona, te ulja u spreju. Organski sastojci sredstava štite od određenih vrsta UV zraka dok anorganska sredstva u potpunosti odbijaju i raspršuju sunčeve zrake svojim reflektirajućim česticama. Reflektirajuće čestice obično se sastoje od cinkovog ili titanovog oksida. Dio sunčeve svjetlosti koji se filtrira ili blokira sredstvima za zaštitu od sunca je ultraljubičasto zračenje. Postoje tri područja ultraljubičastog svjetla. UV-A prodire duboko u kožu i može dovesti do raka i preranog starenja kože, UV-B koji uzrokuje opekline i UV-C u potpunosti apsorbira zemaljska atmosfera. Organske molekule u kremi za sunčanje apsorbiraju ultraljubičasto zračenje, benzofenoni apsorbiraju UV-A, cinamati UV-B, para-aminobenzojeva kiselina UV-B, a antranilati obje vrste zračenja. U ovom radu ispitivana je toksičnost 2-etil-heksil-4-metoksicinamata. [36]

2-etil-heksil-4-metoksicinamat (**Slika 19.**) je ester dobiven reakcijom metoksicimetine kiseline i 2-etilheksanola. U obliku je prozirne ili svijetložute viskozne tekućine, netopljive u vodi. Aktivni je sastojak mnogih krema za sunčanje i balzama za usne zbog dokazane zaštite protiv UV-B sunčevih zraka. Zbog svoje učinkovite zaštite kože, koristi se i za brže zarastanje rana i smanjenje ožiljaka. U sredstvima za zaštitu od sunca koristi se zajedno s titanovim oksidom i oksibenzonom, no zbog toksičnosti oksibenzona taj se sastojak nastoji izbaciti iz upotrebe. [37]



Slika 19. Struktura molekule 2-etil-heksil-4-metoksicinamata [9]

2.2. TOKSIČNOST

Rene Truhaut je definirao ekotoksikologiju 1977. kao granu toksikologije koja je usredotočena na istraživanje toksičnih učinaka nastalih kao posljedica prisutnosti prirodnih ili umjetno stvorenih štetnih tvari (zagađivala) na ljude, životinje, biljke, mikroorganizme i sve ostale sastavne dijelove ekosustava, u jednom cjelovitom kontekstu. Ciljevi toksikologije su obuhvaćeni unutar tri osnovna područja i mogu biti znanstveni, tehnološki i praktični ciljevi.

Xsenobiotik je tvar koja se pojavljuje u okolišu, a koja nije nastala u njemu i nije sastavni dio određenog biološkog sustava. Taj se naziv u toksikologiji koristi za sve farmaceutike.

Otrov je tvar čiji su učinci na neki organizam štetni ili opasni.

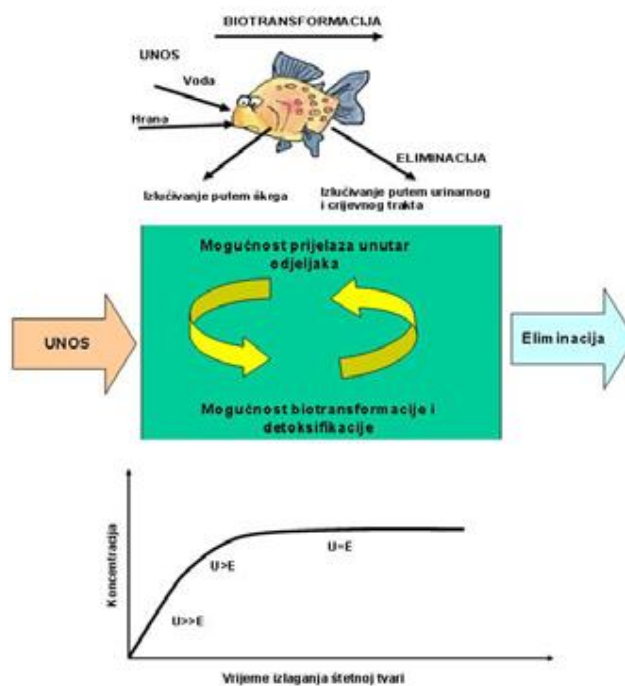
Štetna tvar je tvar štetna za ljudsko zdravlje ili okoliš, s dokazanim akutnim i kroničnim toksičnim učincima, vrlo nadražujuća, kancerogena, mutagena, nagrizaјуća, zapaljiva i eksplozivna tvar, ili tvar koja u određenoj dozi i/ili koncentraciji ima takva svojstva.

Zagađenje je unos stranih tvari u okoliš i prirodu koje direktno utječu na kemijske procese.

Onečišćenje okoliša je promjena stanja okoliša koja je posljedica štetnog djelovanja ili izostanaka potrebnog djelovanja, ispuštanja, unošenja ili odlaganja štetnih tvari, ispuštanja energije i utjecaja drugih zahvata i pojava nepovoljnih po okoliš.

Razumijevanje i mogućnost predviđanja nakupljanja štetnih tvari (akumulacije) u okolišu je važno zbog toga jer su učinci tih tvari posljedica njihove koncentracije. Osnovni procesi o kojima ovisi nakupljanje štetnih tvari u živim organizmima (bioakumulacija) su unos, biotransformacija, detoksifikacija i eliminacija.

Bioakumulacija (**Slika 20.**) je neto akumulacija štetne tvari u i na organizam iz svih izvora uključujući vodu, zrak i čvrste faze (hrana, tlo, sediment i fino suspendirane čestice u zraku ili vodi) u okolišu. Biokoncentracija je pojam koji je sličan pojmu bioakumulacija, ali je ograničen na akumulaciju tvari isključivo iz vode. [38]



Slika 20. Osnovni procesi bioakumulacije [38]

2.2.1. TOKSIČNOST FARMACEUTIKA

Onečišćenja mora i oceana potječu uglavnom s kopna, što je posljedica proizvodnje kemikalija (oko 300×10^6 t/god.). Rijeke u mora unose raznovrsne štetne tvari (industrijske kemikalije, otpadne vode iz sela i gradova, poljoprivredna gnojiva i pesticide), koje se za vrijeme oborina ili otapanja snijega površinski ispiru iz tla i dalje transportiraju vodotocima. Osobito pesticidi i industrijski otpad mogu poremetiti genetiku morskih organizama i prouzročiti promjenu spolova ili dvospolnost. S obzirom na napučenost obalnih područja, poseban izvor zagađenja su komunalne i kanalizacijske vode iz priobalnih gradova, turističkih naselja i industrije, a nerijetko je morsko dno mjesto odlaganja čvrstog kućnog ili industrijskog otpada. Tako su često najbogatiji, najraznolikiji i najraznovrsniji ekosustavi na čijim obalama milijuni ljudi traže odmor, najjače onečišćeni. Iako je koncentracija farmaceutika u vodenim ekosustavima niska, kontinuirano ispuštanje može dovesti do dugoročnog rizika za vodene, ali i sve druge organizme, stoga se ovaj problem posljednjih nekoliko godina smatra jednom od prioritarnih problema životne sredine. Nakon što dospije u okoliš, koncentracija nekog lijeka ili metabolita u pojedinom dijelu ekosustava ovisi o njegovoj biogeokemijskoj reaktivnosti, tj. o otpornosti na fotokemijsku i mikrobiološku

razgradnju te afinitetu vezanja na krute čestice. Farmaceutici koji pokazuju tendenciju sorbiranja na krute matrice akumuliraju se u tlu i sedimentima, dok se topljive tvari transportiraju u površinske i podzemne vode gdje su podložne daljnjoj biotičkoj transformaciji.

Praćenje toksičnosti farmaceutika u okolišu je važno kako bi se na vrijeme mogao procijeniti rizik onečišćenje okoliša i spriječiti ga.

Rizik je vjerojatnost i ozbiljnost štetnog djelovanja opasnosti na zdravlje ljudi i/ili okoliš. Rizik za prirodu je vjerojatnost da će neki zahvat posredno ili neposredno prouzročiti štetu u prirodi.

Procjena rizika je znanstveno utemeljen proces ocjenjivanja potencijalnih štetnih učinaka neke opasnosti. Sastoji se od četiri faze: identifikacije opasnosti, karakterizacije opasnosti, procjene izloženosti i karakterizacije rizika. Razina rizika proizlazi iz vjerojatnosti da opasnost uzrokuje oštećenje zdravlja i težine posljedičnog oštećenja zdravlja (rizik = težina štete \times vjerojatnost nastanka štete). Procjena opasnosti je proces kojim se, uzimajući u obzir sve vidove rada i radnih uvjeta, određuje rizik oštećenja.

Problem zaštite živih bića od sve učestalijih izlaganja nepovoljnim utjecajima okoline postaje sve aktualniji. Promatrajući i djelujući na ukupnu interakciju čovjeka i okoline, može se očekivati i pravovremeno zaustavljanje opasnosti. Živa bića i okolina su komponente istog – nedjeljivog sustava. S druge strane, učinci štetnih tvari na zdravlje i na okoliš, osim što mogu biti međusobno povezani, mogu se uočiti i spriječiti. To su upravo temeljne pretpostavke za praćenje promjena (monitoring). Monitoring je pojam kojim se obuhvaća motrenje utjecaja okolišnih čimbenika u nekom vremenu. Tako je npr. kontinuirano mjerenje koncentracija nekih zagađivala u vodi, tlu, sedimentu ili zraku tijekom jedne godine u praksi najčešće nazivano okolišni monitoring. Danas u svijetu postoje različite metode praćenja koncentracija štetnih tvari i uglavnom se radi o instrumentalnim fizikalno-kemijskim mjerenjima. Međutim, u nekim zemljama se sve češće provodi i biološka metoda praćenja - odnosno uporaba živih bića u postupcima mjerenja, što se naziva biomonitoring.

Biomarkeri su općenito mjerljive promjene parametara bioloških sustava. Oni su definirani kao ksenobiotski inducirane promjene u tkivima ili biokemijskim komponentama ili procesima, strukturama ili funkcijama koje se mogu mjeriti u biološkom sustavu ili uzorku. [3, 4, 38]

2.2.2. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI

Moguća su mjerenja akutne i kronične toksičnosti određene kemijske supstance. Akutna izloženost je jednokratni unos otrova u organizam, odnosno akutnom se smatra svaka izloženost kroz jedan dan ili kraće vrijeme. Subakutna izloženost je višekratan unos unutar 1 mjeseca (do 30 dana). Subkronična izloženost je višekratan unos u vremenskom periodu od 1-3 mjeseca (do 90 dana). Kronična izloženost je duže izlaganje otrovu odnosno unos otrova kroz duži period (obično više od 3 mjeseca). U ovom radu ispitivana je akutna toksičnost farmaceutika.

Toksičnost može biti uzrokovana kemijskim, fizikalnim, biološkim parametrima ili njihovom kombinacijom. Razvijeno je mnogo metoda utvrđivanja biološke toksičnosti vode, kao što su testovi na bakterijama, algama, biljkama, ribama i beskralješnjacima. Neka od takvih mjerenja toksičnosti farmaceutika obrađenih u ovom radu već su provedena u svijetu i navedena su u **Tablici 1.** [38-41]

Tablica 1. Metode utvrđivanja toksičnosti vode sa živim organizmima

FARMACEUTIK	METODA TOKSIČNOSTI	TOKSIČNOST
diklofenak	DIN 38412 –L34	hepatotoksičan
trialat		potencijalno kancerogen za ljude
oksidiazon	<i>Pseudomonas fluorescens strain CG5</i> – bakterija	potencijalno kancerogen za ljude
azitromicin		hepatotoksičan
eritromicin		hepatotoksičan
klaritromicin	DIN EN ISO 15088 ; DIN EN ISO 6341	hepatotoksičan
metiokarb		kancerogen, ne za ljude
imidakloprid	razni vodeni beskralježnjaci	kancerogen, ne za ljude
tiakloprid		kancerogen
tiametoksam	GB/T 15441–1995	nije kancerogen
klotianidin	nekoliko načina	kancerogen, ne za ljude
acetamiprid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – bakterija	kancerogen, ne za ljude
estron	ISO 10253	kancerogen
estradiol-17 β	<i>Danio rerio</i> – slatkovodna riba zebrica	kancerogen
etinilestradiol-17 α	dagnje	kancerogen
2,6-di- <i>tert</i> -butil-4- metilfenol	miševima i štakorima	kancerogen, za neke životinje
2-etil-heksil-4- metoksicinamat	<i>Daphnia magna</i> – test akutne toksičnosti	kancerogen, ne za ljude

2.2.3. *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri je bioluminiscentna, gram-negativna bakterija u obliku štapića pronađena pretežito u morskim sredinama. To je heterotrofna bakterija koje se pokreće pomoću jedne polarne flagele. Bakterija je ključni istraživački organizam za ispitivanje mikrobiološke bioluminiscencije, kvorskog senzora i simbioze bakterija i životinja. Ime je dobila po Bernhardu Fischeru, njemačkom mikrobiologu. Morska bakterija *Vibrio fischeri* najbolje je poznata kao specifični simbiot u svjetlosnim organima određenih lignja (**Slika 21.**) i riba gdje proizvodi luminescenciju ekspresijom *lux operona*, malom skupinom gena koji se nalaze u nekoliko bakterija iz skupine *Vibrionaceae*. Luminescenciju kontrolira akihomoserinski lakton, koji je otkriven u *V. fischeri*, ali je uobičajena značajka domaćina povezanih bakterija u brojnim rodovima. *Vibrionaceae* sadrže nekoliko desetaka vrsta koje se često nalaze povezane sa životinjskim tkivom. Za razliku od mnogih simbioznih bakterija, *V. fischeri* je već desetljećima proučavana na fiziološkoj i genetskoj razini. Najcjelovitije razumijevanje simbioznih asocijacija *V. fischeri* su one sa sepiolidnim lignjama. Ove simbioze uključuju monospecifične populacije *V. fischeri* ekstracelularno uzgojenih, ali unutar epitelnih kripti, u specijaliziranom organu domaćina. Lignje su opsežno proučavane zbog lakoće pokretanja, a s njima i bakterije *Vibrio fischeri*. [42-44]



Slika 21. Lignja *Euprymna scolopes* u simbiozi s bakterijom *Vibrio fischeri* [45]

2.2.4. BIOLUMINISCENTNA METODA – DIN 38412 - L34

Određivanje biološke toksičnosti pomoću svjetlećih bakterija opisano je u DIN-ovim standardima i temelji se na pronalaženju učinaka niza razrjeđenja uzorka otpadne vode na emitiranje svjetlosti od fluorescentnih bakterija. Za određivanje toksičnosti navedenih farmaceutika u ovom radu korištena je njemačka standardna metoda po DIN-u (DIN 38 412-L34). To je praktična bioluminiscentna metoda koja spada među testove kratkog trajanja, jer traje samo 30 minuta. Kao test organizmi korištene su fluorescentne bakterije *Vibrio fischeri*.

Bioindikator, fluorescentne bakterije *Vibrio fischeri*, emitiraju svjetlost ujednačenog intenziteta, danju i noću, kao normalni sastavni dio svog metabolizma. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma nastalog kao posljedica djelovanja toksične tvari. [46, 47]

2.2.5. ISKAZIVANJE TOKSIČNOSTI

Toksičnost se najčešće iskazuje kraticama doza ili koncentracija koje uzrokuju štetno djelovanje određenog postotka populacije. Prema zakonskim propisima, doza otrova koja izaziva smrt kod 50 % pokusnih životinja naziva se LD_{50} (**eng.** *lethal dose*). Ta vrijednost se odnosi samo na jednokratnu dozu unesenu tijekom 24 sata, ili na višekratnu dozu s unosom unutar 24 sata, ako se istražuje slabo toksična ili djelomično toksična tvar. Stoga se mora naglasiti da su štetni učinci ipak mogući kod kronične izloženosti pokusne životinje čak i primjenom doze koja je manja od one koja izaziva štetno djelovanje pri jednokratnoj primjeni. LD_{50} je doza koja ubija 50 % organizama ili 50 % životinja koje su bile izložene otrovu i najčešće se izražava u mg/kg tjelesne težine.

U literaturi se spominju i druge važne kratice za doze ili koncentracije kao što su:

- EC_{50} (**eng.** *effect concentration*) – koncentracija tvari koja rezultira 50 % štetnim učinkom na populaciju.

- $LOEC$ (**eng.** *lowest observable effect concentration*) – najniža koncentracija koja izaziva vidljivi štetni učinak; $LOED$ je kratica s istim značenjem kao $LOEC$, ali se odnosi na vrijednost doze.

- $NOEC$ (**eng.** *no observable effect concentration*) – vrijednost koncentracije tvari koja ne izaziva vidljivi štetni učinak; kratica $NOED$ se odnosi na vrijednost doze.

Broj u indeksu EC , ED , LC i LD ovisi o potrebama istraživanja i mjerenja, te o samom analitičaru koji odlučuje koje će vrijednosti mjeriti.

U ovom radu potrebno je izmjeriti početne luminiscencije bakterijske suspenzije, u te otopine pipetirati otopinu farmaceutika i mjeriti luminiscenciju nakon određenog vremena inkubacije, u ovom slučaju 30 minuta.

Nakon toga se uz pomoć gotovih matematičkih izraza računa postotak inhibirane kulture nakon određenog vremena što nam ujedno i predstavlja os ordinatu na grafu toksičnosti otopine određenog farmaceutika dok je na apcisi logaritam koncentracije otopine farmaceutika.

Iz grafa se kasnije očitaju vrijednosti EC_{20} i EC_{50} koje uzrokuju 20 %, odnosno 50 % inhibicije bakterijske kulture što nam omogućava lakšu interpretaciju rezultata i definiranje utjecaja uzorka na ispitivanu bakterijsku kulturu. Također, očita se i $LOEC$ za svako mjerenje farmaceutika kako bi lakše usporedili toksičnost farmaceutika. [38, 42, 46]

Iz očitane EC_{50} vrijednosti izračuna se TU prema formuli (1) [43]:

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

Prikaz određivanih fizikalno-kemijskih veličina:

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

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

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

fK – faktor korekcije

$$fK = l_tK/l_0K$$

l_c – ispravljeni fK

$$l_c = fK \times l_0$$

I – postotak inhibicije luminiscencije nakon inkubacije u vremenu t

$$I = (l_c - l_t) \times 100/l_c$$

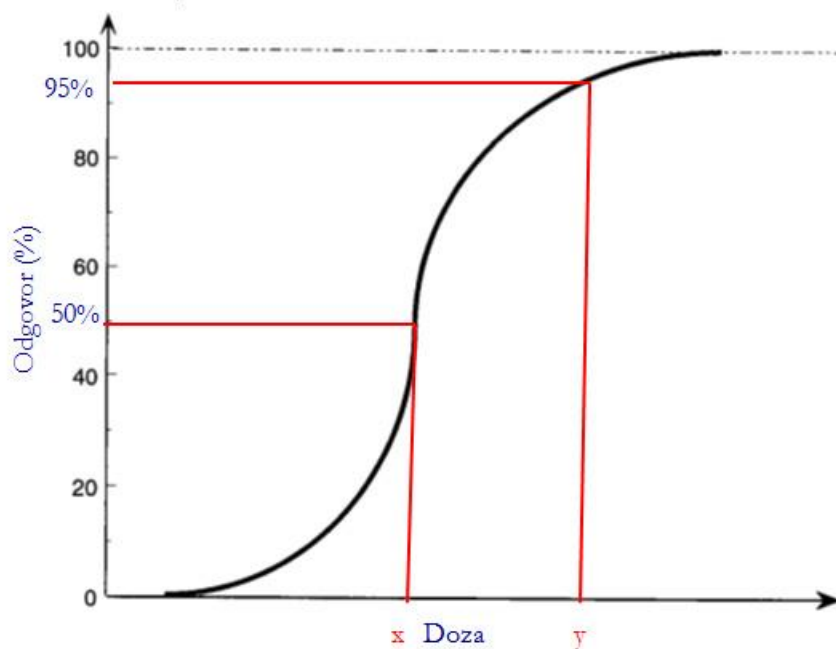
TU – jedinice toksičnosti (**eng.** *toxicity units*)

$LOEC$ – najniža koncentracija koja izaziva vidljivi štetni učinak

EC_{20} – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 20 % inhibicije

EC_{50} – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50 % inhibicije

Slika 22 prikazuje uobičajenu krivulju toksičnosti. Krivulja toksičnosti prikazuje odnos doze i odgovora, i kod normalne razdiobe ima oblik slova S. Kod doze X, odgovor se javlja kod 50 % populacije, a kod doze y, odgovor se javlja kod 95 % populacije. U ovom radu dobiveni su odnosi doza i odgovora za farmaceutike i računalno su nacrtane krivulje toksičnosti.



Slika 22. Krivulja toksičnosti

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. KORIŠTENE KEMIKALIJE

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

NAZIV	KEMIJSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVODAČ
natrijev klorid	NaCl	p.a.	Lach-Ner, Češka
kalcijev klorid	CaCl ₂	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev karbonat	CaCO ₃	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev dihidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	p.a.	Kemika, Hrvatska
magnezijev sulfat	MgSO ₄	p.a.	T.T.T., Hrvatska
agar	C ₁₄ H ₂₄ O ₉	p.a.	Liofilchem, Italija
D-glukoza	C ₆ H ₁₂ O ₆	p.a.	Lach-Ner, Češka
pepton	-	p.a.	Biolife, Italija
D-rafinoza pentahidrat	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	99 %	Lach-Ner, Češka
glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	p.a.	Lach-Ner, Češka
kvašćev ekstrakt	C ₁₉ H ₁₄ O ₂	p.a.	Biolife, Italija
metanol	CH ₃ OH	HPLC čistoća	J.T. Baker, Nizozemska
etanol	C ₂ H ₅ OH	HPLC čistoća	J.T. Baker, Nizozemska
deionizirana voda	H ₂ O	p.a.	Mili Q
cinkov sulfat heptahidrat	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	p.a.	Lach-Ner, Češka

3.1.2. ISPITIVANI FARMACUETICI

Tablica 3. Svojstva ispitivanih farmaceutika

FARMACEUTIK	KEMIJSKA FORMULA	CAS BROJ	MOLEKULSKA MASA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
azitromicin	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	83905-01-5	748,996	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
eritromicin	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	114-07-8	733,937	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
klaritromicin	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	81103-11-9	747,964	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
imidaklopid	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	105827-78-9; 138261-41-3	255,662	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
tiaklopid	$C_{10}H_9ClN_4S$	111988-49-9	252,72	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
klotianidin	$C_6H_8ClN_5O_2S$	210880-92-5	249,673	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
acetamiprid	$C_{10}H_{11}ClN_4$	135410-20-7 ; 160430-64-8	222,676	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
tiametoksam	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	153719-23-4	291,71	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
metiokarb	$C_{11}H_{15}NO_2S$	2032-65-7	225,306	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
oksadiazon	$C_{15}H_{18}Cl_2N_2O_3$	19666-30-9	345,22	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
tri-alat	$C_{10}H_{16}Cl_3NOS$	2303-17-5	304,654	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
etinilestradiol-17 α	$C_{20}H_{24}O_2$	57-63-6	296,41	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
estradiol-17 β	$C_{18}H_{24}O_2$	50-28-2	272,388	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
estron	$C_{18}H_{22}O_2$	53-16-7	270,372	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
diklofenak	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	15307-86-5	296,147	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol	$C_{15}H_{24}O$	128-37-0	220,356	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
2-etil-heksil-4-metoksicinamat	$C_{18}H_{26}O_3$	5466-77-3	290,403	≥ 98 %	Sigma-Aldrich

3.2. INSTRUMENT ZA PROVEDBU TOKSIČNOSTI

U ovom radu za mjerenje toksičnosti korišten je instrument LUMIStox 300 (**Slika 23.**). LUMIStox 300 je mjerni instrument koji je razvijen za mjerenje luminiscencije (jačine svjetlosti) luminiscentnih bakterija. Zajedno s termostatskim blokom LUMIStherm za inkubaciju uređaj odgovara tehničkim zahtjevima DIN 38412 L34 i L341 te međunarodnom standardu ISO DIS 11348. Dr. Lange LUMIStox 300 koristi luminiscentne bakterijske testove za akutnu analizu LUMISmini (LCK484) i test TOX (LCK488), kao i ispitivanje luminiscentnih bakterija za kroničnu toksičnost, LUMIS24-tox (LCK486), može se procijeniti ovim instrumentom. LUMIStox 300 kombinira mjerni instrument-luminometar i računalo za obradu podataka. Baš kao i računalo, LUMIStox 300 ima svoj vlastiti operativni sustav. Na disketi se nalaze svi potrebni podaci i programi za rad instrumenta. Uređaj bez diskete ne funkcionira, a za programska proširenja ili ažuriranja koriste se nove diskete. LUMIStox 300 ima ugrađenu funkciju fotometra i automatsko mjerenje koje omogućuju prepoznavanje efekata boja u luminiscentnom testu bakterija i uzima u obzir korekciju u slučaju obojene otopine. Također omogućuje unaprijed procijenjenu učinkovitost određenih boja na mjerenje i može se koristiti za određivanje optičke gustoće bakterijskih suspenzija u svrhu procjene inhibicije rasta u luminiscentnom bakterijskom testu za kroničnu toksičnost LUMIS24-toks (LCK486). LUMIStox 300 ima automatski referentni upravljački sustav s kojim se provjerava funkcioniranje cijelog mjerenja prije svake serije luminescentnih bakterija. [48]



Slika 23. Instrument za provedbu toksičnosti LUMIStox 300 s termostatskim blokom LUMIStherm

3.3. POSTUPAK ODREĐIVANJA TOKSIČNOSTI

3.3.1. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE

Hranjiva podloga za održavanje čiste kulture priprema se otapanjem sastojaka iz **Tablice 4** u destiliranoj vodi uz zagrijavanje do vrenja. Zagrijavanje se provodi u vodenoj kupelji kako neotopljeni kalcijev karbonat nebi zagorio. Čim dođe do vrenja hranjivu podlogu treba maknuti od izvora topline kako otopina nebi iskipila. Hranjiva podloga se sterilizira 15 minuta u autoklavu na 121 °C. Sterilizirana hranjiva podloga ohladi se na 45 °C i izlije u sterilizirane Petrijeve zdjelice u sloj maksimalne debljine 0,5 cm. Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom čuvaju se u hladnjaku na 4 °C. Hranjiva podloga može se čuvati u hladnjaku u Erlenmyerovoj tikvici neizlivena. Prije izljevanja podlogu treba otopiti u vodenoj kupelji s povremenim protresanjem tikvice kako kalcijev karbonat na dnu nebi zagorio. pH vrijednost otopine za resuspenziju, radne otopine i otopine referentnih tvari mora iznositi između 6,8 i 7,2.

Tablica 4. Sastav hranjive podloge

Sastojci	u 1000 mL
NaCl	30 g
agar	15 g
glicerol	10 g
pepton	5 g
kvašćev ekstrakt	5 g
CaCO ₃	3 g

3.3.2. PRIPREMA OTOPINE ZA RESUSPENZIJU

Otopina za resuspenziju je hranjiva izosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture. U destiliranoj vodi se otope sastojci iz **Tablice 5**. Otopina se prokuha, ohladi, profiltrira. Otopina se sterilizira u autoklavu 15 minuta na 121 °C. Tako pripremljena otopina može se čuvati u hladnjaku na 4 °C do dva tjedna ili do pojave zamućenja. Unaprijed priređena i sterilizirana otopina mineralnih sastojaka i glicerola, bez šećera, može se čuvati neograničeno dugo, a šećeri se u njoj otope prije uporabe. Otopina se također može čuvati zamrznuta u malim bočicama. Prije korištenja otopine iz zamrznutih bočica obavezno provjeriti pH.

Tablica 5. Sastav otopine za resuspenziju

Sastojci	u 1000 mL
NaCl	36 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
glicerol	0,5 mL
glukoza	10 g
rafinoza	10 g

3.3.3. PRIPREMA RADNE OTOPINE ZA RESUSPENZIJU I OTOPINE REFERENTNIH TVARI

Radna otopina je 2 % NaCl, a koristi se pripremu niza razrijeđenja. Radna otopina priprema se otapanjem 20 g NaCl u 1 L deionizirane vode. Otopina referentnih tvari je otopina ZnSO₄ · 7H₂O u deioniziranoj vodi, masene koncentracije 25 mg/L. Otopina referentnih tvari koristi se za provjeru valjanosti bakterijske kulture. Kivete za provjeru toksičnosti moraju biti u termostatiranom bloku na 15 °C barem 15 minuta prije početka izvođenja testa. pH vrijednost uzorka mora biti između 6 i 8,5, a vrijednost se podešava s NaOH ili HCl.

3.3.4. PRIPREMA TEMELJNIH STANDARDNIH OTOPINA I RADNIH OTOPINA FARMACEUTIKA

Temeljne standardne otopine farmaceutika masene koncentracije 200 mg/L pripremaju se otapanjem 2 mg farmaceutika u metanolu HPLC čistoće u tikvicama od 10 mL (**Tablica 6.**). Radne otopine od 100 mg/L pripremaju se u redeioniziranoj vodi (MiliQ) u tikvicama od 10 mL.

Tablica 6. Odvagane mase zadanih farmaceutika na preciznoj analitičkoj vagi

Farmaceutik	Odvagana masa/g
klaritromicin	0,0020
azitromicin	0,0021
eritromicin	0,0020
estron	0,0020
estradiol-17 β	0,0021
diklofenak	0,0019
etinilestradiol-17 α	0,0022
2-etil-heksil-4-metoksicinamat	0,0202
metiokarb	0,0023
oksadiazon	0,0022
tri-alat	0,0021
imidaklopid	0,0021
tiaklopid	0,0023
tiametoksam	0,0020
acetamiprid	0,0021
klotianidin	0,0020
2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol	0,0020

3.3.5. STERILNA TEHNIKA RADA

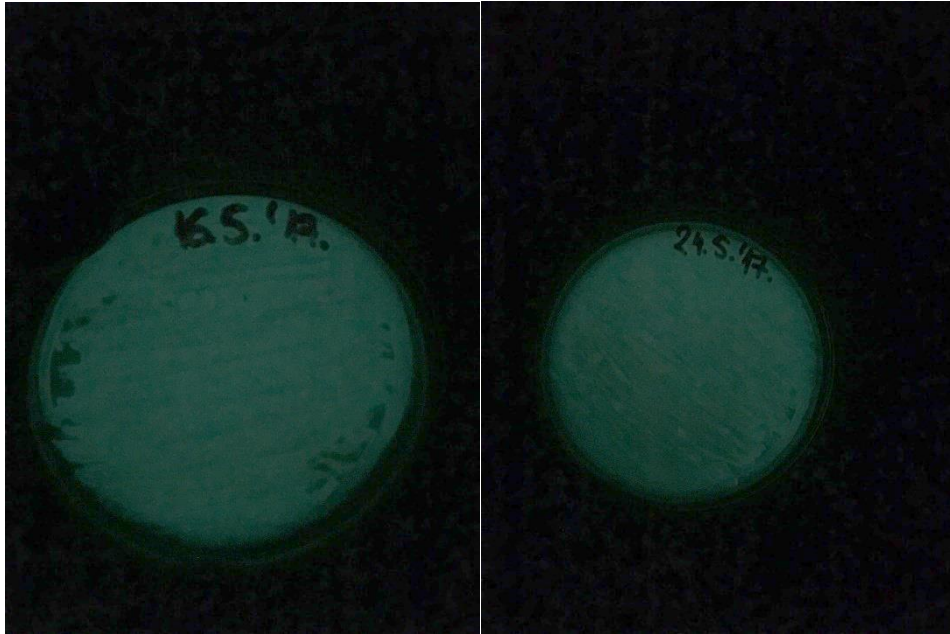
Sterilna tehnika rada je nužna kako bi se osobe i radna okolina zaštitile od mikroorganizama, te kako bi se ispitivani uzorci i pribor zaštitili od kontaminacije iz zraka. Sterilna tehnika rada podrazumijeva rad uz upaljeni plamenik na površini očišćenoj etanolom (anisolom, antiseptikom). Plamenik mora biti upaljen na oksidirajućem plamenu. Eza koja se koristi mora se prvo spaliti u unutrašnjem plamenu, a zatim cijelom dužinom zažariti u vanjskom dijelu plamena. Sav pribor mora se nalaziti u neposrednoj blizini plamenika, a sve radnje se obavljaju brzo kako bi mogućnost kontaminacije bila što manja i uz veliki oprez da se nešto nebi zapalilo.

3.3.6. AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA

Koristi se sterilna tehnika rada. Kiveta s liofiliziranim zamrznutim bakterijama izvadi se iz zamrzivača i u nju se odmah ulije 1-2 mL 2 % NaCl ili dobivene otopine za reaktivaciju. Priređena suspenzija odmah se nosi na termostatiranje na 15 °C 15 minuta kako bi se kultura adaptirala. Nakon 15 minuta provjeri se aktivnost kulture mjerenjem relativne luminiscencije programom LU na uređaju LUMIStox 300. Izmjerena luminiscencija mora biti veća od 1000. Takva suspenzija se izlije na sterilnu hranjivu podlogu i razvuće sterilnom ezom po podlozi cik-cak pokretima. Kultura se održava u Petrijevim zdjelicama na temperaturi 15 do 22 °C uz temperaturni optimum 18 °C. Pri navedenim uvjetima kultura je upotrebljiva najmanje dva, a najviše devet dana od precjepljivanja, a optimalna luminiscencija i stabilnost bakterijske suspenzije opaža se od drugog do četvrtog dana.

3.3.7. PRECJEPLJIVANJE BAKTERIJSKE KULTURE

Bakterijska kultura može se pripremiti i precjepljivanjem iz jedne Petrijeve zdjelice u kojoj je bakterija već uzgojena u drugu sa čistom sterilnom podlogom. Koristi se sterilna tehnika rada. Za optimalno precjepljivanje koristi se već pripremljenu bakterijsku suspenziju i bakterijsku kulturu u Petrijevoj zdjelici (**Slika 24.**). Na čistu hranjivu podlogu kapaljkom nanese se 4-5 kapi suspenzije i razvuće sterilnom ezom po podlozi cik-cak pokretima. Ušicom eze zatim se zahvati grudica čiste kulture povlačenjem po duljini oko 3 cm, te se grudica razvuće po hranjivoj podlozi navlaženoj bakterijskom suspenzijom.



Slika 24. Hranjive podloge s vidljivim luminiscentnim kolonijama bakterije *Vibrio fischeri* starim 24 sata

3.3.8. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

Epruveta sa čepom se napuni do 2/3, otopinom za resuspenziju. Ušicom eze se zahvati grudica čiste kulture povlačenjem u duljini oko 1 cm, te se resuspendira u pripremljenoj epruveti u kojoj se nalazi otopina za resuspenziju. Ostavi se pola sata u termostatu na 15 °C, kako bi se bakterijska kultura adaptirala.

3.4. MJERENJE TOKSIČNOSTI

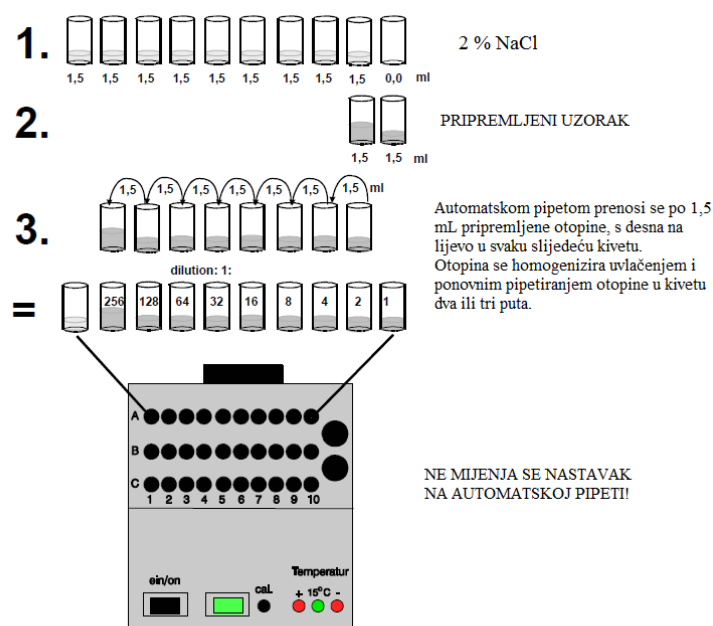
3.4.1. PRIPREMA MJERENJA

Na glavnom izborniku LUMISTox 300 uređaja odabere se program LU za mjerenje relativne luminiscencije, te se na taj način provjeri aktivnost bakterijske kulture. Luminiscencija mora biti najmanje 1000, a najviše 10 000, da se može započeti test.

Test valjanosti bakterijske kulture izvodi se svaki puta prije postavljanja testa. U referentnu kivetu stavi se 0,5 mL otopine 2 % NaCl i 0,5 mL inokuluma. U test kivetu stavi se 0,5 mL otopine $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ i 0,5 mL inokuluma. Ostavi se na termostatiranom bloku 15 minuta te se na LUMISTox uređaju pokrene SCRn program. Očita se vrijednost. Sadržaj test kivete u odnosu na sadržaj referentne kivete mora imati između 20 % i 80 % luminiscencije.

3.4.2. PRIPREMA GEOMETRIJSKOG NIZA

U prvu kivetu stavi se 2/3 kivete 2 % NaCl, a u zadnju 2/3 uzorka razrijeđenog onoliko puta koliko se utvrdi preliminarnim ispitivanjima (najveća koncentracija). U sve ostale kivete stavi se po 1,5 mL 2 % NaCl. U A nizu napravi se niz željenih razrjeđenja počevši od najmanjeg do najvećeg, tako da se po 1,5 mL dobro homogeniziranog uzorka prebacuje iz kivete u kivetu iz smjera kivete broj 10 prema 1. U sve ostale kivete B i C niza stavi se po 0,5 mL inokuluma. (Slika 25.)

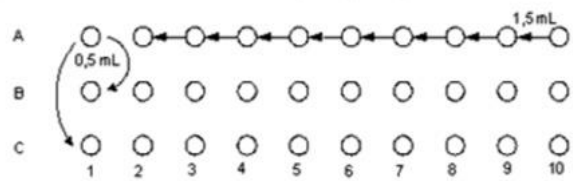


Radna otopina za resuspenziju, 2 % NaCl uvijek se nalazi u A1. Uzorak najviše koncentracije, u ovom slučaju nerazrijeđene otopine, nalazi se krajnje desno, A10.

Slika 25. Priprema geometrijskog niza razrjeđenja [48]

3.4.3. MJERENJE I OČITAVANJE REZULTATA

Na uređaju LUMISTox 300 odabire se program (Tablica 7.) EC koji mjeri luminiscenciju uzoraka i postave se zadani uvjeti. Nakon očitavanja prve kivete B1, na luminometar se stavlja druga C1, a iz kivete A1 u kivetu B1 pipetira se 0,5 mL otopine. Nakon očitavanja kivete C1, na luminometar se stavlja kiveta B2, a u C1 se pipetira 0,5 mL otopine iz A1. I tako za svaki uzorak do kraja mjerenja. Rezultati se očitavaju i odmah zapisuju za izmjereni uzorak prije promjene kivete i prije pipetiranja iz reda A. Nakon 30 minuta ponovo se izmjeri luminiscencija svih uzoraka, redom od B1, C1, pa sve do kraja postavljenog geometrijskog niza (Slika 26.).



Slika 26. Princip mjerenja toksičnosti uz pripremljeni geometrijski niz [49]

Tablica 7. Podešeni uvjeti EC programa za mjerenje luminiscencije

Eksperimentalni uvjeti EC programa na uređaju LUMISTox 300	
dilution steps	8
type of dilution	2
unit	%
inic. conc.	100%
time of inc.	1. 30 min
	2. 0 min

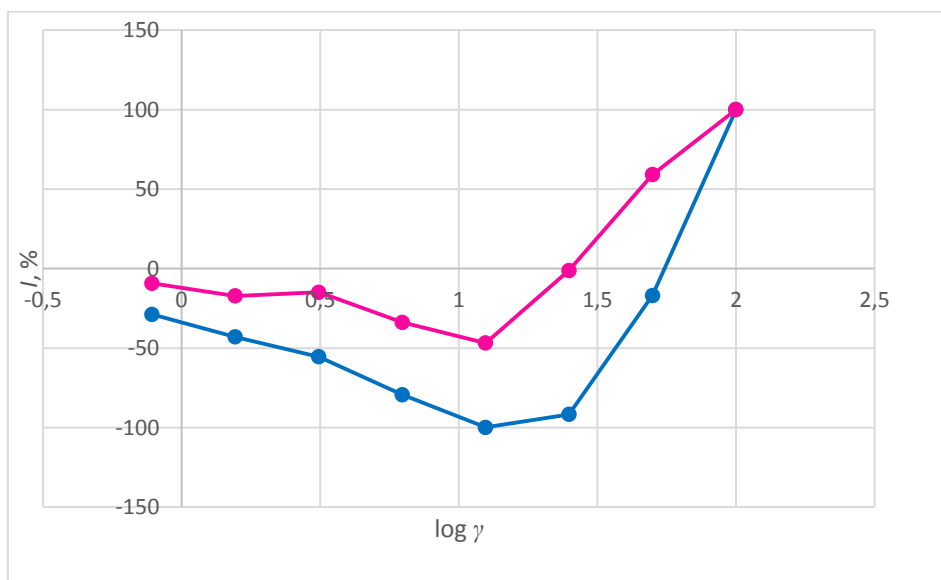
4. REZULTATI I OBRADA REZULTATA

4.1. REZULTATI ISPITIVANJA MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA

Kod analize makrolidnih antibiotika primjećuju se najmanja relativna standardna odstupanja prilikom mjerenja toksičnosti za otopinu klaritromicina, dok se najveća odstupanja primjećuju za otopinu eritromicina. Moguće je da je do velikih odstupanja došlo jer je ponovljeno mjerenje otopine eritromicina bilo 24 sata nakon prvog, dok su ostala mjerenja provedena u razmaku od jednog sata. Još jedan razlog može biti nestabilnost same bakterijske kulture i nekorištenje kulture iz iste Petrijeve zdjelice.

Slika 27 prikazuje grafički prikaz toksičnosti otopine azitromicina. Iz prikaza je vidljivo da otopine niskih koncentracija ne uzrokuju inhibiciju bakterijske kulture, ali porastom koncentracije raste i toksičnost pa originalna otopina od 100 mg/L uzrokuje inhibiciju čitave kulture.

U **Tablici 8** su prikazana relativna standardna odstupanja za dva provedena mjerenja i vidljivo je da su relativno velika, pogotovo u području koncentracije koja uzrokuje inhibiciju 20 % kulture što iznosi 28,11 %. Razlikuju se i minimalne koncentracije koje uzrokuju inhibiciju kulture koje iznose 100 mg/L za prvo mjerenje i 50 mg/L za drugo mjerenje.

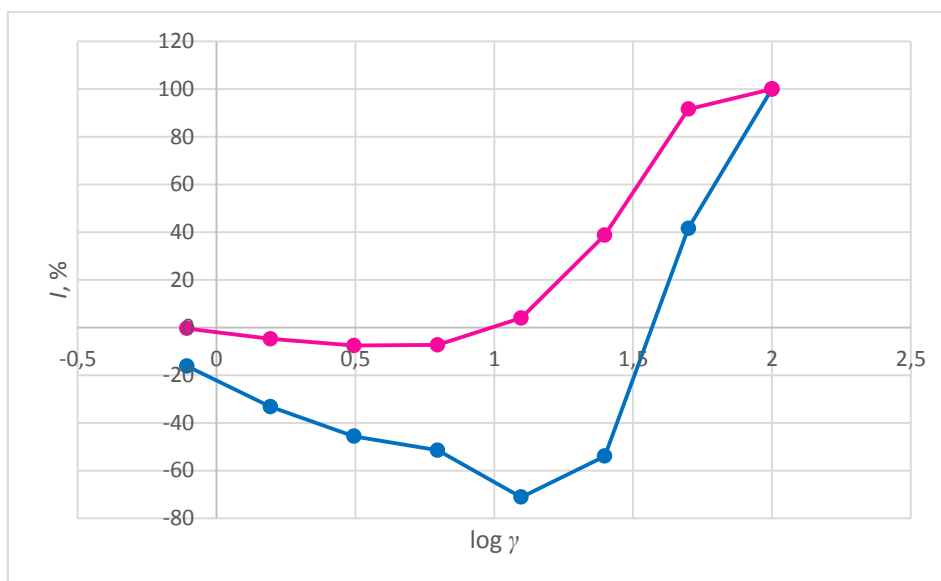


Slika 27. Graf usporedbe toksičnosti otopine azitromicina

Tablica 8. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu azitromicina

Farmaceutik	Azitromicin				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	63,10	74,99	1,33	100	99,96
2. mjerenje	31,62	42,17	2,37	50	59,06
RSD, %	28,11	11,69	-		

Slika 28 prikazuje grafički prikaz toksičnosti otopine eritromicina početne koncentracije 100 mg/L. Iz samog prikaza, ali i iz **Tablice 9** vidljiva su velika relativna standardna odstupanja između mjerenja. Odstupanje je veće kod koncentracije koja uzrokuje 20 % inhibicije kulture i iznosi 59,21 %. Niske koncentracije ne uzrokuju inhibiciju bakterijske kulture, no velika je razlika kod najnižih koncentracija koje uzrokuju toksičnost.

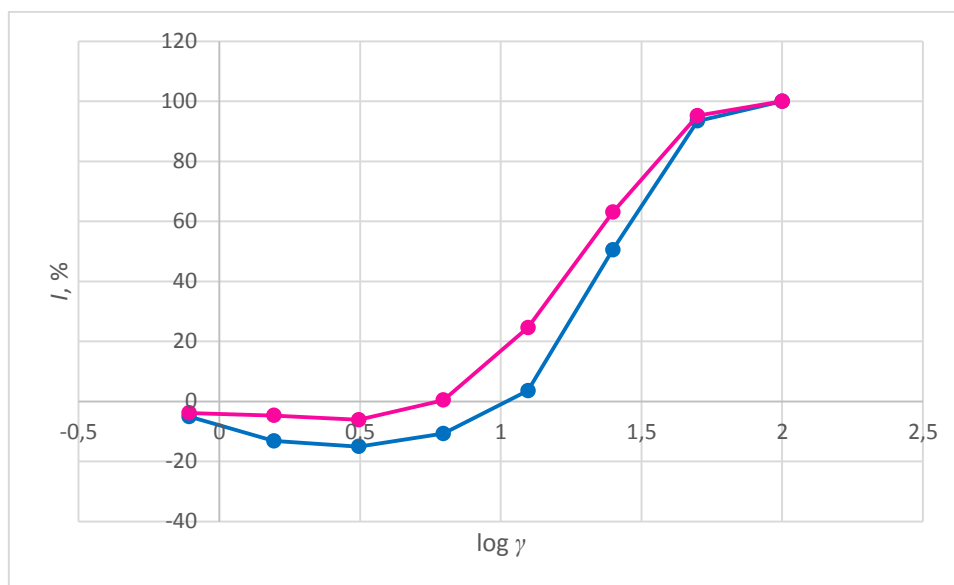


Slika 28. Graf usporedbe toksičnosti otopine eritromicina

Tablica 9. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu eritromicina

Farmaceutik	Eritromicin				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	40,97	59,56	1,68	50	41,53
2. mjerenje	16,78	29,85	3,35	12,5	3,96
RSD, %	59,21	46,99	-		

Na **Slici 29** je graf toksičnosti klaritromicina. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da pri niskim koncentracijama ne dolazi do inhibicije kulture. U **Tablici 10** su prikazane vrijednosti odstupanja između mjerenja koja su u prihvatljivim granicama, pogotovo pri koncentraciji koja uzrokuje 50 % inhibicije bakterijske kulture i iznosi svega 11,69 % .



Slika 29. Graf usporedbe toksičnosti otopine klaritromicina

Tablica 10. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu klaritromicina

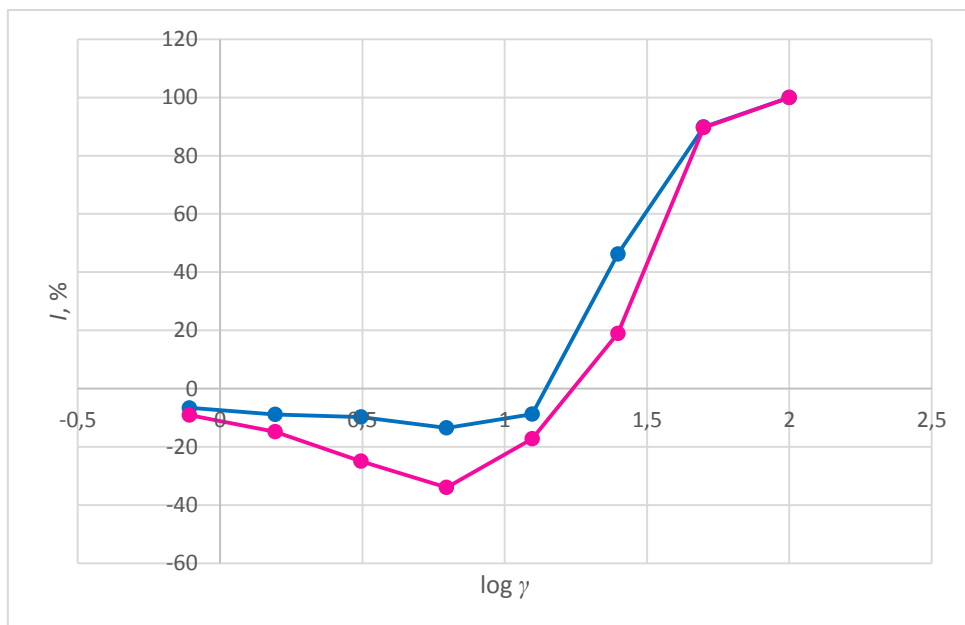
Farmaceutik	Klaritromicin				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	15,85	24,95	4	12,5	3,58
2. mjerenje	10,59	21,14	4,73	6,25	0,41
RSD, %	28,11	11,69	-		

4.2. REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI INSEKTICIDA

Insekticidi nisu farmaceutici, već ksenobiotici, ali se proizvode u farmaceutskim industrijama za veterinarsku medicinu te ih se stoga vrlo često može naći u otpadnim vodama tih tvrtki. Također, analizirani su i zato što se nalaze na popisu tvari za koje je potrebno praćenje diljem Unije u području vodne politike.

Iz rezultata mjerenja toksičnosti insekticida iz skupine neonikotinoida vidljivo je najtoksičniji farmaceutik acetamiptid, koji jedini iz skupine pokazuje inhibiciju kulture u cijelom području koncentracija od 0,781 mg/L do 100 mg/L. Najveća odstupanja između mjerenja primjećena su kod acetamprida, a najmanja kod tiakloprida, gdje ih uopće nema.

Na **Slici 30** je prikazan graf toksičnosti klotianidina iz kojeg je vidljivo da pri niskim koncentracijama ne dolazi do inhibicije kulture. Krivulje oba mjerenja prate isti trend, odstupanje između mjerenja se smanjuje porastom koncentracije otopine, te se vrijednosti toksičnosti za otopinu koncentracije od 50 mg/L otopina podudaraju, a radna otopina koncentracije 100 mg/L uzrokuje inhibiciju čitave kulture. U **Tablici 11** prikazane su najniže koncentracije koje uzrokuju inhibiciju kulture i koncentracije oba mjerenja se podudaraju, dok su vrijednosti inhibicije za te koncentracije jako različite i iznose 46,28 % i 19,00 %.

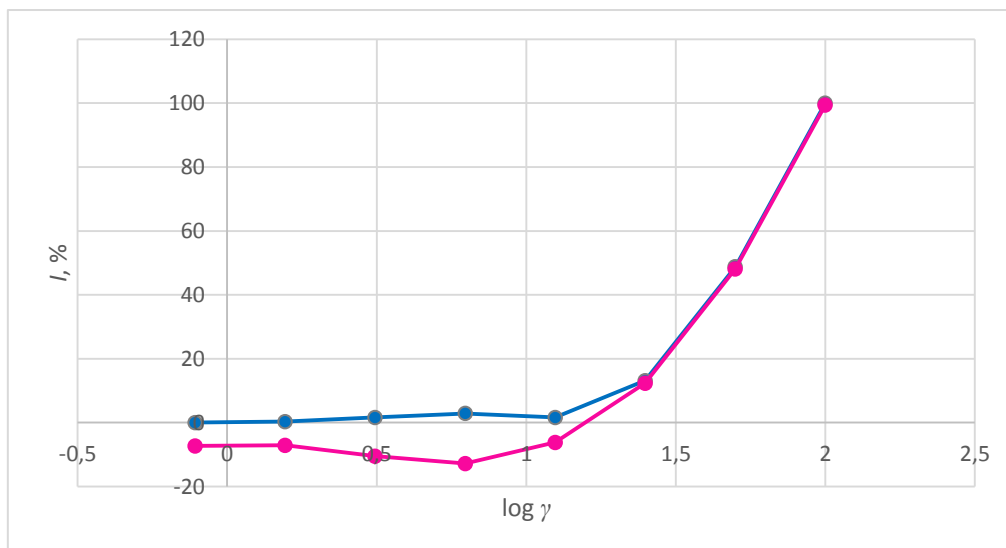


Slika 30. Graf usporedbe toksičnosti otopine klotianidina

Tablica 11. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu klotianidina

Farmaceutik	Klotianidin				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	17,78	26,61	3,76	25	46,28
2. mjerenje	25,12	33,50	2,99	25	19
RSD, %	24	16,21	-		

Na **Slici 31** je prikazan graf toksičnosti tiakloprida iz kojeg je vidljivo potpuno preklapanje rezultata oba mjerenja toksičnosti. U **Tablici 12** su prikazane i minimalne vrijednosti koje uzrokuju inhibiciju kulture i te se vrijednosti jako razlikuju, unatoč tome što povećanja inhibicije za oba mjerenja prate isti trend i što kod visokih koncentracija nema odstupanja između izmjerenih vrijednosti.

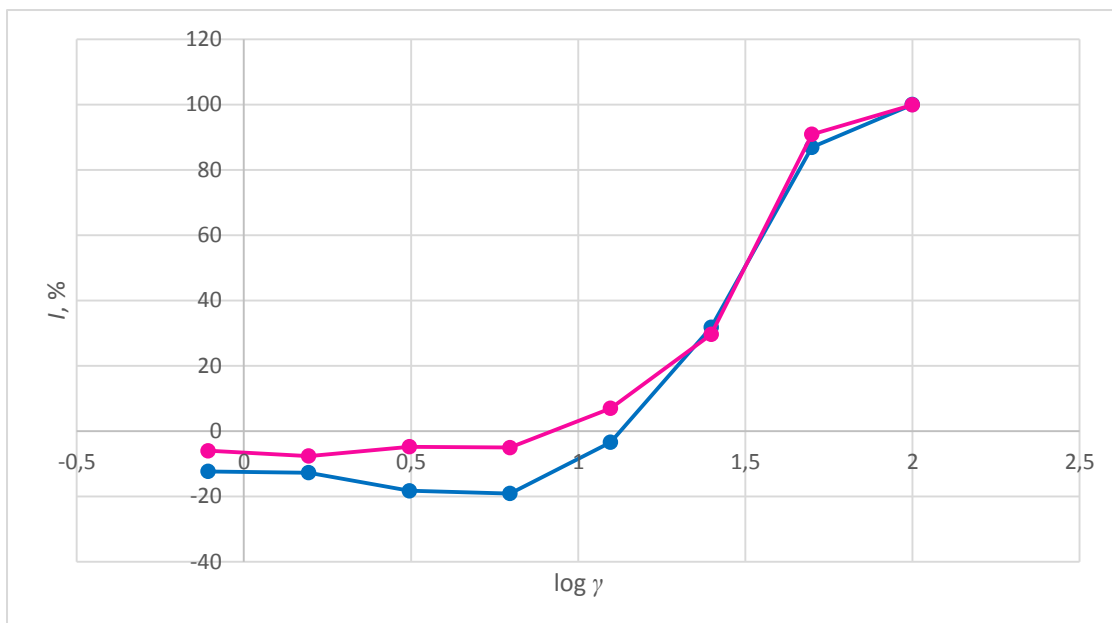


Slika 31. Graf usporedbe toksičnosti otopine tiakloprida

Tablica 12. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu tiakloprida

Farmaceutik	Tiakloprid				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	28,18	51,29	1,95	0,78	0,04
2. mjerenje	28,18	51,29	1,95	25	48,12
RSD, %	0	0	-		

Iz grafičkog prikaza toksičnosti otopine imidakloprida na **Slici 32** primjećuje se velika sličnost izmjerenih vrijednosti toksičnosti, što se može potvrditi izračunatim vrijednostima odstupanja prikazanih u **Tablici 13** koja iznose, za koncentraciju koja uzrokuje 20 % inhibiciju 8,13 %, te za koncentraciju koja uzrokuje 50 % inhibiciju toga odstupanja nema, te iznosi 0 %. Vidljivo je također da najniže koncentracije imidakloprida ne uzrokuju inhibiciju bakterijske kulture.

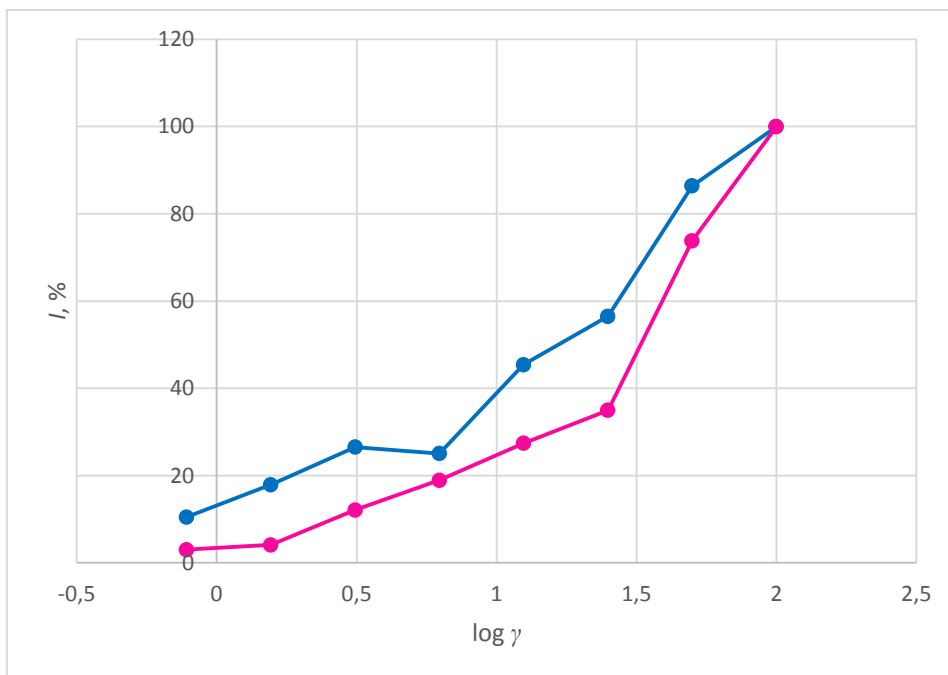


Slika 32. Graf usporedbe toksičnosti otopine imidakloprida

Tablica 13. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu imidakloprida

Farmaceutik	Imidakloprid				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	17,78	31,62	3,16	25	31,77
2. mjerenje	19,95	31,62	3,16	12,5	6,98
RSD, %	8,13	0	-		

Iz **Slike 33** koja prikazuje graf toksičnosti otopine acetamiprida vidljiva su velika odstupanja između koncentracija koje uzrokuju 20 %, ali i 50 % inhibicije bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. **Tablica 14** prikazuje očitane i izračunate vrijednosti parametara toksičnosti. U oba mjerenja čak i najniže koncentracije su uzrokovale inhibiciju i to od 10,52 % za prvo mjerenje i 3,04 % za drugo mjerenje. Uzevši u obzir ostale farmaceutike iz skupine neonikotinoidea, acetamiprid pokazuje najveću toksičnost.

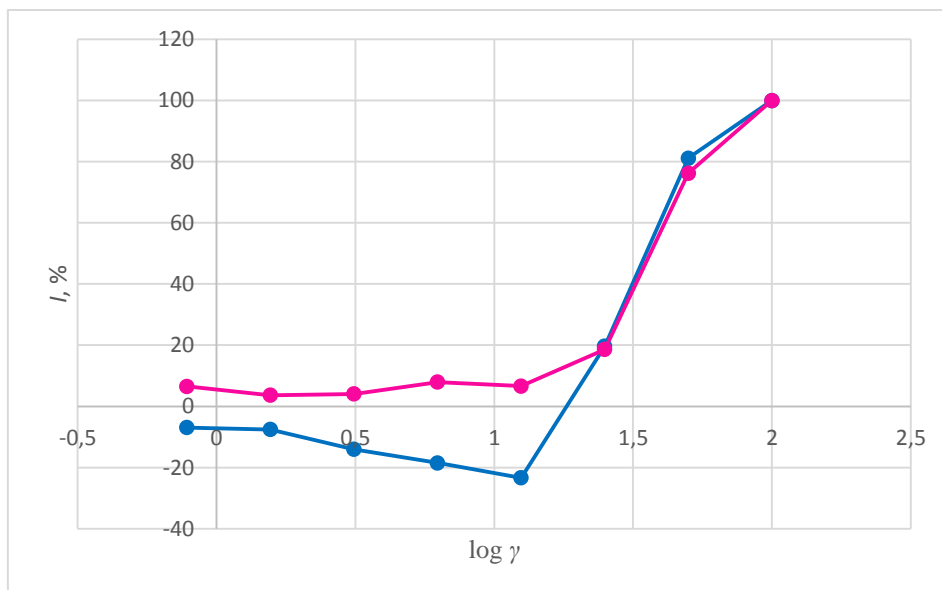


Slika 33. Graf usporedbe toksičnosti otopine acetamiprida

Tablica 14. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu acetamiprida

Farmaceutik	Acetamiprid				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	1,78	17,78	5,62	0,781	10,52
2. mjerenje	6,68	33,5	2,98	0,781	3,04
RSD, %	81,99	43,34	-		

Slika 34 prikazuje graf usporedbe toksičnosti otopine tiametoksama te su primjećena mala odstupanja između mjerenja. Iz **Tablice 15** vidljivo je da odstupanja između EC_{20} vrijednosti nema, a za EC_{50} iznose malih 4,07 %. Krivulje oba mjerenja pokazuju isti trend rasta, jedine razlike su u području niskih koncentracija gdje u prvom mjerenju tiametoksam ni ne uzrokuje inhibiciju bakterijske kulture, a u drugom mjerenju uzrokuje inhibiciju u čitavom području koncentracija.

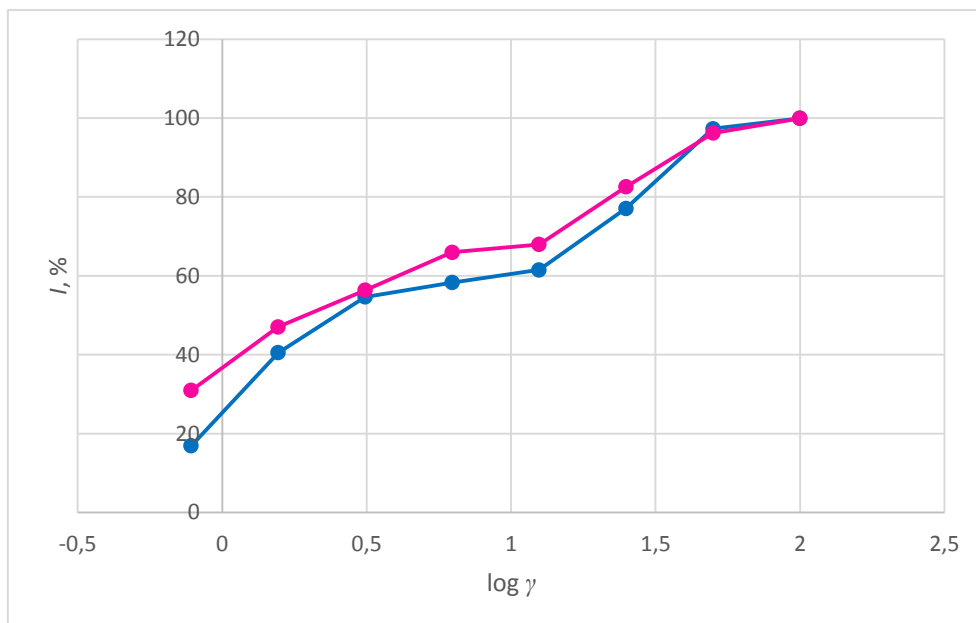


Slika 34. Graf usporedbe toksičnosti otopine tiametoksama

Tablica 15. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu tiametoksama

Farmaceutik	Tiametoksam				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	24,38	33,50	2,98	25	19,66
2. mjerenje	24,38	35,50	2,82	0,781	6,53
RSD, %	0	4,07	-		

Slika 35 prikazuje usporedbu grafičkih prikaza dva mjerenja otopine metiokarba. Vidljivo je da metiokarb uzrokuje inhibiciju i pri niskim koncentracijama, da sa porastom koncentracije raste inhibicija te da već otopina od 50 mg/L uzrokuje inhibiciju skoro čitave kulture. Iz **Tablice 16** vidljivo je da EC_{20} vrijednost za drugo mjerenje nije mogla biti očitana jer i najmanja mjerena koncentracija inhibira 30,96 % kulture.



Slika 35. Graf usporedbe toksičnosti otopine metiokarba

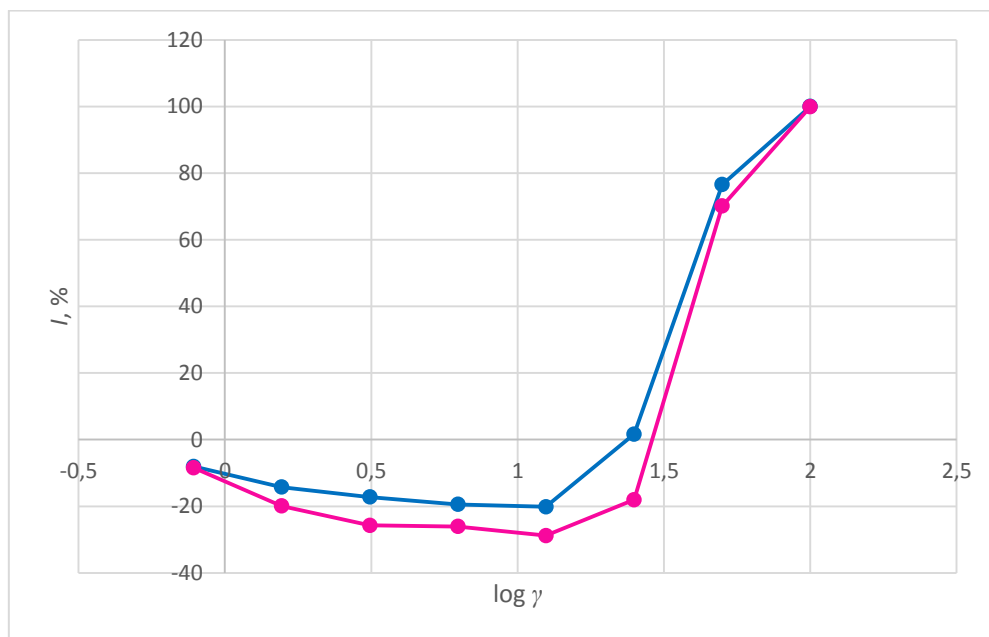
Tablica 16. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu metiokarba

Farmaceutik	Metiokarb				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	0,93	2,51	39,81	0,781	16,91
2. mjerenje	-	1,78	56,24	0,781	30,96
RSD, %	-	24,18	-	-	-

4.3. REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI HERBICIDA

Kao i insekticidi, herbicidi se ne smatraju farmaceuticima, međutim zbog proizvodnje u istim pogonima dospijevaju u okoliš. Herbicidi se koriste i u poljoprivredi, na usjevima, te se padalinama ispiru s biljaka i dospijevaju u vodeni sustav. Izmjerena je toksičnost trialara i oksadiazona, a trialat pokazuje veću toksičnost od oksadiazona.

Iz **Slike 36** vidljivo je da otopina oksadiazona ne uzrokuje inhibiciju bakterijske kulture pri niskim koncentracijama. Podaci o tome prikazani su u **Tablici 17**, gdje se primjećuje velika razlika u inhibiciji koju uzrokuje *LOEC*. Za prvo mjerenje *LOEC* iznosi 25 mg/L, s inhibicijom 1,62 %, a za drugo mjerenje 50 mg/L s inhibicijom od čak 70,12 %. Odstupanja izmjerenih vrijednosti smanjuju se s porastom koncentracije, pa tako originalna otopina od 100 mg/L uzrokuje inhibiciju čitave kulture.

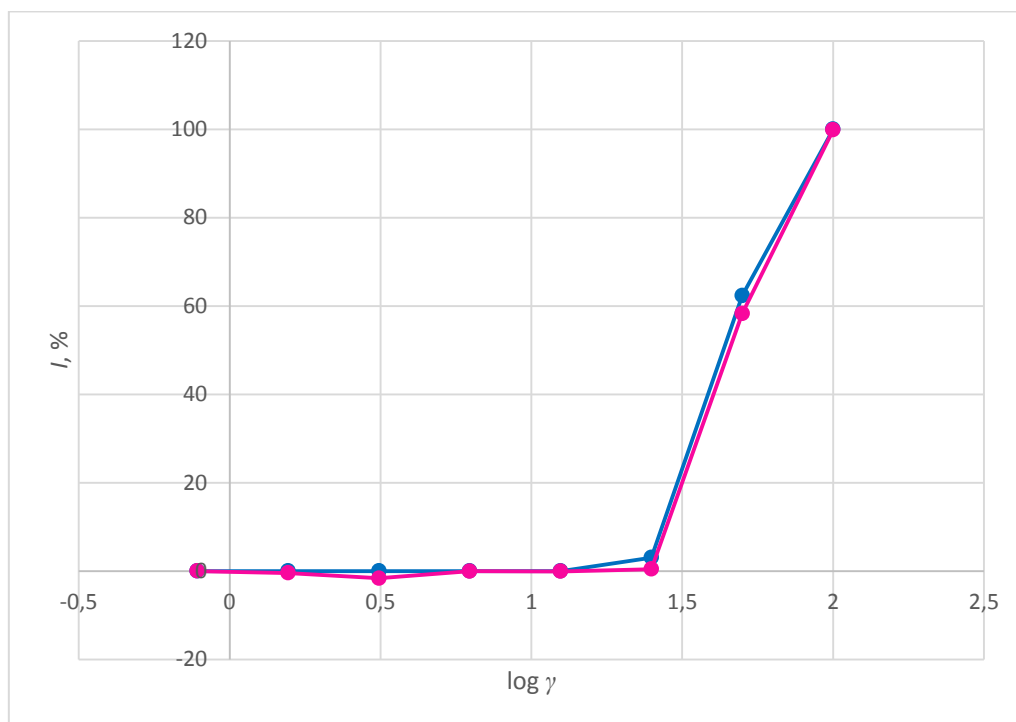


Slika 36. Graf usporedbe toksičnosti otopine oksadiazona

Tablica 17. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , *LOEC* s pripadajućom *I*, te izračunate *TU* za otopinu oksadiazona

Farmaceutik	Oksadiazon				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	<i>TU</i>	<i>LOEC</i> ,mg/L	<i>I</i> , %
1. mjerenje	29,85	37,59	2,66	25	1,62
2. mjerenje	35,48	40,97	2,44	50	70,12
RSD, %	12,18	6,1		-	

Slika 37 prikazuje graf toksičnosti otopine trialata. Iz prikaza je vidljivo preklapanje krivulja u gotovo svim izmjerenim točkama. **Tablica 18.** sadrži izmjerene i izračunate vrijednosti parametara toksičnosti, te sadrži i podatke o odstupanju EC_{20} i EC_{50} vrijednosti koja su vrlo mala. Također, iz **Slike 37** i **Tablice 18** vidi se da čitavo područje koncentracija uzrokuje inhibiciju bakterijske kulture. Nagli rast primjećuje se u otopini trialata od 25 mg/L.



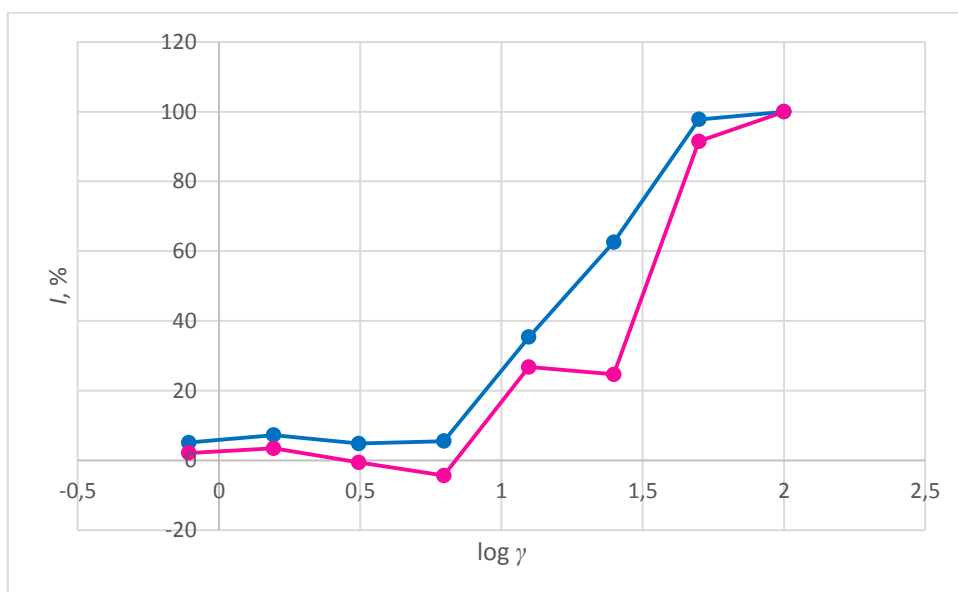
Slika 37. Graf usporedbe toksičnosti otopine trialata

Tablica 18. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu trialata

Farmaceutik	Trialat				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	31,26	40,74	2,46	0,781	0,03
2. mjerenje	31,62	42,17	2,37	0,781	0,03
RSD, %	0,81	2,44		-	

4.4. REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI NESTEROIDNIH ANITREUMATIKA

Slika 38 prikazuje grafički prikaz usporedbe toksičnosti otopine diklofenaka. Vidljivo je da krivulje prate isti trend, osim 25 mg/L otopine u kojoj dolazi do velikog odstupanja i pada u postotku inhibirane kulture, zbog kojeg dolazi do većeg odstupanja EC_{50} vrijednosti. Iz **Tablice 19** možemo očitati brojčane vrijednosti koncentracija koje uzrokuju određeni postotak inhibicije. U prvom mjerenju diklofenak uzrokuje inhibiciju bakterijske kulture u čitavom području koncentracija, dok kod drugog mjerenja, osim navedenog velikog odstupanja, dolazi do povećanja luminiscencije bakterija kod 6,25 mg/L otopine.



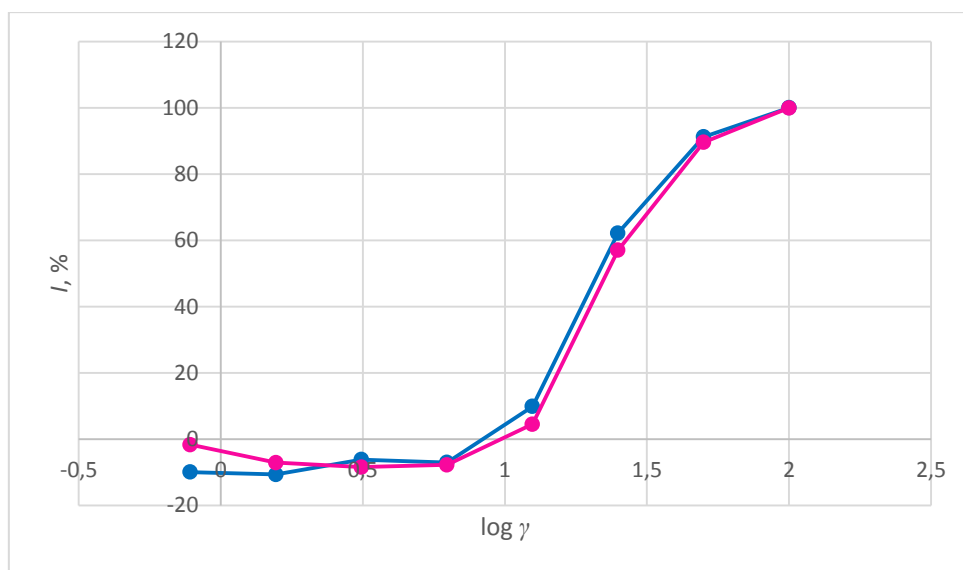
Slika 38. Graf usporedbe toksičnosti otopine diklofenaka

Tablica 19. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu diklofenaka

Farmaceutik	Diklofenak				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	8,41	17,78	5,62	0,78	5,1
2. mjerenje	10,59	33,50	2,98	0,78	2,13
RSD, %	16,21	43,34	-	-	-

4.5. REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI ANTIOKSIDANSA

Iz **Slike 39** vidljive su krivulje toksičnosti otopine 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenola koje slijede isti trend s vrlo malim odstupanjima. Ta su odstupanja izračunata i prikazana u **Tablici 20** te iznose 4,07 % za EC_{20} i 4,19 % za EC_{50} . $LOEC$ vrijednosti za oba mjerenja se poklapaju i iznose 0,781 mg/L, dok se pripadajuće vrijednosti inhibicije razlikuju i za prvo mjerenje inhibicija iznosi 9,91 %, a za drugo mjerenje 4,52 %.



Slika 39. Graf usporedbe toksičnosti otopine 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenola

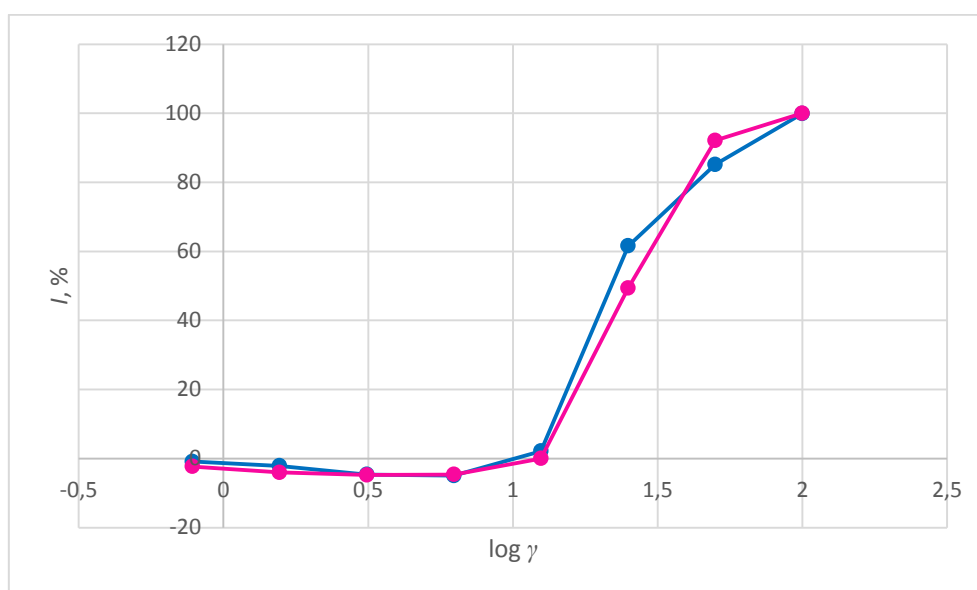
Tablica 20. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu 2,6-di-*tert*-butila-4-metilfenola

Farmaceutik	2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	14,54	21,14	4,73	12,5	9,91
2. mjerenje	15,40	22,39	4,47	12,5	4,52
RSD, %	4,07	4,19	-		

4.6. REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI ESTROGENSKIH HORMONA

Estrogenski hormoni najviše se koriste u kontracepcijskim pripravcima. Problem je to što se izlučuju urinom sisavaca i tako dospijevaju u okoliš. Zbog dokazano toksičnog utjecaja na vodene organizme, vrlo je važno pratiti toksičnost otpadnih voda, kako bi se spriječio negativan utjecaj na ljude. Prirodni hormoni estradiol-17 β i estron su iste toksičnosti, a sintetski hormon etinilestradiol-17 α je dvostruko manje toksičnosti. To je pozitivno jer je sintetiziran kako bi se s istim farmaceutskim djelovanjem, toksičnost svelo na minimum.

Slika 40 je grafički prikaz dva mjerenja otopine estradiola-17 β . Vidljivo je da krivulje prate isti trend i da su odstupanja mala, što je i izračunato i prikazano u **Tablici 21**. Osim vrlo sličnih vrijednosti EC_{20} , EC_{50} i TU , u oba mjerenja najniža koncentracija koja je uzrokovala inhibiciju bakterijske kulture bila je 12,5 mg/L, što ukazuje na to da otopina estradiola-17 β pri vrlo niskim koncentracijama ne uzrokuje inhibiciju bakterijske kulture.

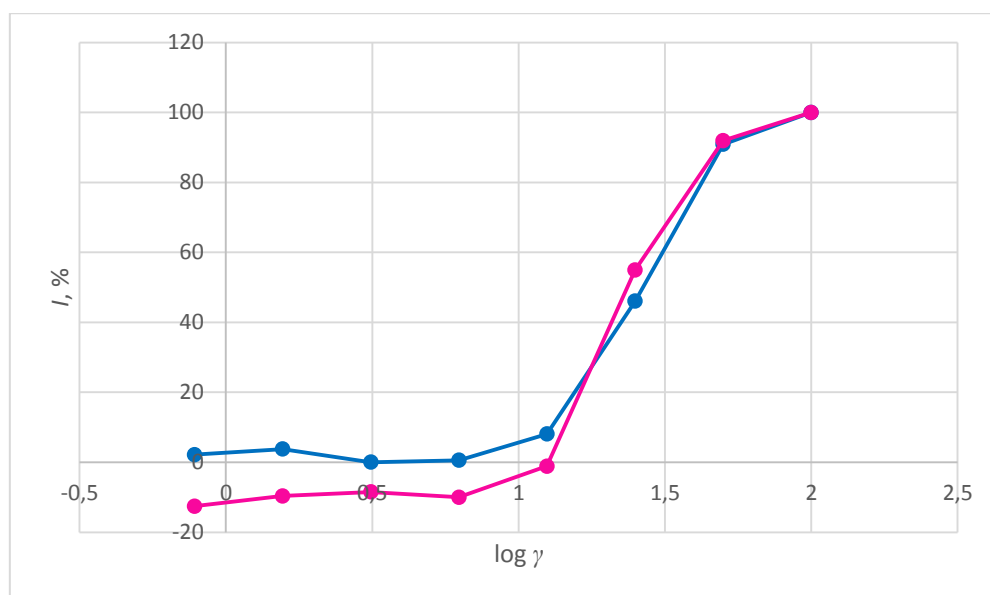


Slika 40. Graf usporedbe toksičnosti estradiola-17 β

Tablica 21. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu estradiola-17 β

Farmaceutik	Estradiol-17 β				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	14,96	22,39	4,47	12,5	2,15
2. mjerenje	16,31	25,12	3,98	12,5	0,02
RSD, %	6,10	8,13	-	-	-

Slika 41 prikazuje graf usporedbe toksičnosti otopine estrona i vidljivo je da krivulje slijede isti trend, ali i da su pri niskim koncentracijama odstupanja velika. Ta su odstupanja prikazana u **Tablici 22**. *LOEC* vrijednosti se jako razlikuju, u prvom mjerenju iznosi 0,781 mg/L i ta otopina u cijelom području koncentracija pokazuje inhibiciju kulture, dok je u drugom mjerenju ta vrijednost 25 mg/L, što govori o tome da pri niskim koncentracijama dolazi do rasta luminiscencije kulture.

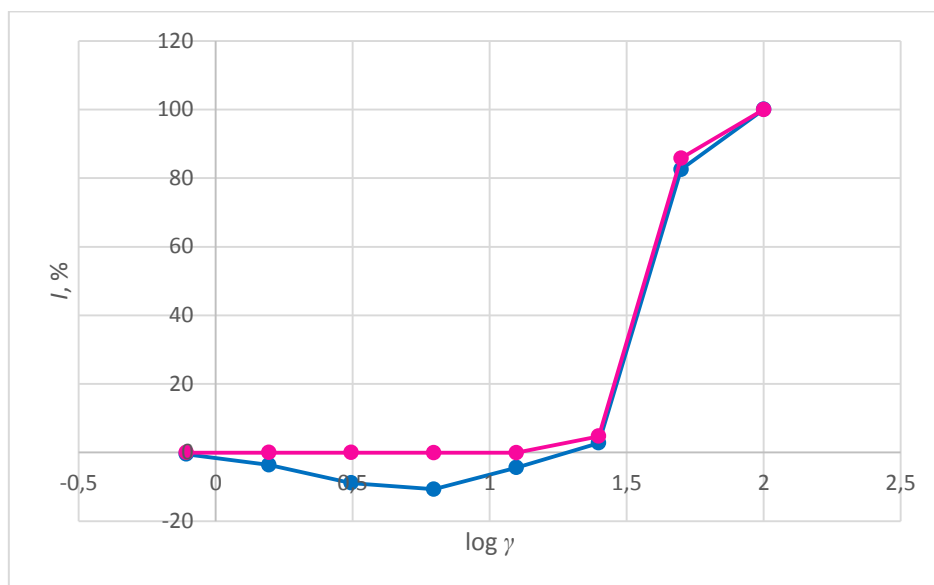


Slika 41. Graf usporedbe toksičnosti otopine estrona

Tablica 22. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , *LOEC* s pripadajućom *I*, te izračunate *TU* za otopinu estrona

Farmaceutik	Estron				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	<i>TU</i>	<i>LOEC</i> , mg/L	<i>I</i> , %
1. mjerenje	14,96	25,12	3,98	0,78	2,17
2. mjerenje	15,85	22,39	4,47	25	54,99
RSD, %	4,07	8,13		-	

Iz grafa usporedbe toksičnosti otopine etinilestradiola-17 α prikazanog na **Slici 42** primjećujemo gotovo potpuno preklapanje krivulja pri visokim koncentracijama. Iz **Tablice 23** vidljivo je da nema nikakvih odstupanja vrijednosti parametara toksičnosti. Jedina razlika je vidljiva u postotku inhibicije koju uzrokuje *LOEC*. Za prvo mjerenje ta inhibicija iznosi 2,77 %, a za drugo mjerenje 4,71 %.



Slika 42. Graf usporedbe toksičnosti otopine etinilestradiola-17 α

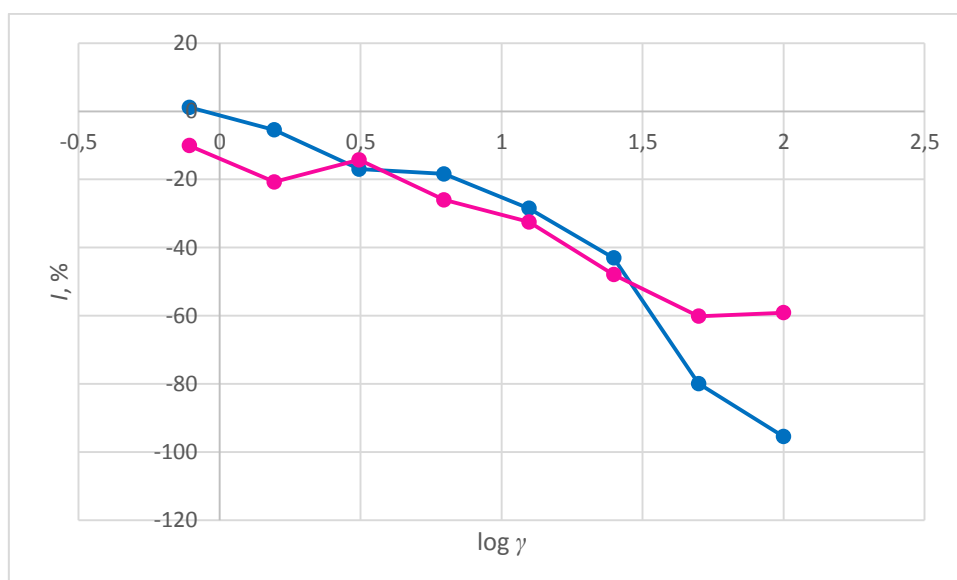
Tablica 23. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , *LOEC* s pripadajućom *I*, te izračunate *TU* za otopinu etinilestradiola-17 α

Farmaceutik	Etinilestradiol 17- α				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	<i>TU</i>	<i>LOEC</i> , mg/L	<i>I</i> , %
1. mjerenje	28,18	35,48	2,82	25	2,77
2. mjerenje	28,18	35,48	2,82	25	4,71
RSD, %	0	0	-	-	-

4.7. REZULTATI ISPITIVANJA TOKSIČNOSTI SREDSTVA ZA ZAŠTITU OD SUNCA

Sredstva za zaštitu od sunca dio su sredstava za osobnu njegu. Smatraju se netoksičnima, no toksičnost njihovih razgradnih produkata u vodi još nije ispitana. U ovom radu ispitivana je toksičnost 2,6-etil-heksil-4-metoksicinamata, jednog od najvažnijih sastojaka losiona i krema za sunčanje.

2,6-etil-heksil-4-metoksicinamat ne pokazuje inhibiciju bakterijske kulture, što je i vidljivo iz grafičkog prikaza na **Slici 43**. Zbog toga, **Tablica 24** je gotovo prazna jer se vrijednosti parametara toksičnosti nisu mogli izmjeriti, niti izračunati. Porastom koncentracije otopine, raste i luminiscencija bakterijske kulture.



Slika 43. Graf usporedbe toksičnosti otopine 2-etil-heksil-4-metoksicinamata

Tablica 24. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu 2-etilheksil-4-metoksicinamata

Farmaceutik	2-etil-heksil-4-metoksicinamat				
	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
1. mjerenje	-	-	-	-	-
2. mjerenje	-	-	-	-	-
RSD, %	-	-	-		

4.8. ODREĐIVANJE PARAMETARA TOKSIČNOSTI ZA ISPITIVANE FARMACEUTIKE

Tablica 25 sadrži podatke o svim izmjerenim farmaceuticima, kako bi se njihova toksičnost mogla usporediti. S obzirom da je početna koncentracija radnih otopina za sve farmaceutike 100 mg/L, metodom geometrijskog niza i sva razrjeđenja su ista i zato se dobiveni rezultati mogu uspoređivati. Kao najbolji parametar za usporedbu koristi se parametar utjecaja toksičnosti odnosno *TU*.

Od makrolidnih antibiotika najveću toksičnost pokazuje klaritromicin, a najmanju azitromicin. Klaritromicin pokazuje toksičnost od $TU=4,37$, a azitromicin $TU=1,85$.

Od predstavnika skupine neonikotinoida najveću toksičnost ima acetamiprid $TU=4,30$, relativno novi insekticid iz ove skupine, još neistraženih štetnih učinaka na okoliš. Najmanju toksičnost pokazao je tiakloprid $TU=1,95$, a slijede ga tiametoksam, imidakloprid i klotianidin.

Daleko najveću toksičnost pokazuje metiokarb $TU=48,03$, 10 – 30 puta veću od ostalih farmaceutika. U količini manjoj od 1 mg/L uzrokuje inhibiciju 20 % bakterijske kulture.

Trialat s izmjerenom vrijednosti od $TU=4,83$ pokazuje skoro dva puta veću toksičnost od oksadiazona, s vrijednošću $TU=2,55$. Ta razlika je također vidljiva u najmanjoj koncentraciji koja uzrokuje inhibiciju kulture, *LOEC*.

Diklofenak, nesteroidni antireumatik pokazuje toksičnost $TU=4,30$. Otprilike je iste toksičnosti kao estrogenski hormoni i trialat.

Uzevši u obzir da je veoma važan antioksidans, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol pokazuje relativno veliku toksičnost od $TU=4,60$, s jednim od najvećih EC_{20} i EC_{50} vrijednosti.

U skupini estrogenih hormona, najmanju toksičnost pokazuje polusintetski derivat estradiola- 17β , etinilestradiol- 17α , s vrijednošću $TU=2,82$ dok estron i estradiol- 17β imaju istu toksičnost $TU=4,23$.

2-etil-heksil-4-metoksicinamat nije pokazao toksičnost i ne inhibira bakterijsku kulturu, već joj povećava luminiscenciju.

Uspoređujući sve analizirane farmaceutike, neovisno o vrsti, najtoksičniji je metiokarb s vrijednošću toksičnosti $TU=48,03$, a najmanje toksičan je azitromicin s vrijednošću $TU=1,85$. 2-etil-heksil-4-metoksicinamat nije toksičan i uzrokuje povećanje luminiscencije bakterijske

kulture. Farmaceutici, osim navedenih imaju vrijednosti toksičnosti od $TU=1,85 - 4,83$, dok većina farmaceutika ima vrijednost toksičnosti između $TU=4-5$.

Tablica 25. Parametri toksičnosti dobiveni za ispitivane spojeve za dva uzastopna mjerenja na bakterijama *Vibrio fischeri*: EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU

Farmaceutik	EC_{20} , mg/L	EC_{50} , mg/L	TU	$LOEC$, mg/L	I , %
azitromicin	47,36	58,58	1,85	75,00	79,51
eritromicin	28,88	44,71	2,52	31,25	22,75
klaritromicin	13,22	23,04	4,37	9,38	2,00
klotianidin	21,45	30,05	3,38	25,00	32,64
tiaklopid	28,18	51,29	1,95	12,89	24,08
imidaklopid	18,87	31,62	3,16	18,75	19,38
acetamiprid	4,23	25,64	4,30	0,78	6,78
tiametoksam	24,38	34,49	2,90	12,89	13,10
metiokarb	0,93	2,15	48,03	0,78	23,94
oksadiazon	32,67	39,28	2,55	37,50	35,87
trialat	31,44	41,45	4,83	0,78	0,03
diklofenak	9,50	25,64	4,30	0,78	3,62
2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol	14,97	21,76	4,60	12,50	7,22
estradiol-17 β	15,64	23,75	4,23	12,50	1,08
estron	15,41	23,75	4,23	12,89	28,58
etinilestradiol-17 α	28,18	35,48	2,82	25,00	3,74
2-etil-heksil-4-metoksicinamat	-	-	-	-	-

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je određena toksičnost različitih skupina ksenobiotika na bakterije *Vibrio fischeri*, a to su makrolidni antibiotici (azitromicin, klaritromicin, eritromicin), herbicidi (trialat, oksadiazon), insekticidi (metiokarb, klotianidin, acetamiprid, tiaklopid, tiametoksam, imidaklopid), antioksidansi (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol), nesteroidni antireumatici (diklofenak), estrogenski hormoni (estron, etinilestradiol-17 α , estradiol-17 β) i sredstva za zaštitu od sunca (2-etil-heksil-6-metoksicinamat). Analizirani su svi spojevi s popisa za tvari za koje je potrebno praćenje diljem Unije u području vodne politike u skladu s Direktivom 2008/105/EZ.

1. Za mjerenje toksičnosti navedenih farmaceutika koristile su se bakterije *Vibrio fischeri*, koje prirodno luminisciraju, te se mjerila promjena njihove luminiscencije dodatkom različitih koncentracija otopina farmaceutika. Luminiscencija je mjerena luminometrom LUMIStox 300, a sve mjerene otopine su termostatirane na 15 °C u termostatu LUMIStherm.
2. Primijećeno je da do manjih odstupanja između mjerenja dolazi kada je test valjanosti bakterijske kulture nekoliko postotaka ispod ili iznad zadanih granica od 20 – 80 %. Do najvećih odstupanja dolazi kada otopina ZnSO₄ · 7H₂O uzrokuje inhibiciju oko 40 % bakterijske kulture. Iz tog razloga provedeno je ponavljanje mjerenja i svi farmaceutici su mjereni dva puta. S obzirom da se radi o živim organizmima mjerenja bi se trebala ponoviti i više od dva puta.
3. Iz skupine makrolidnih antibiotika analizirani su azitromicin, eritromicin i klaritromicin. Najveću toksičnost pokazuje klaritromicin, a najmanju azitromicin, što je pozitivno jer je azitromicin jedna od najkorištenijih aktivnih tvari u proizvodnji lijekova u svijetu.
4. Analizirani su najvažniji predstavnici neonikotinoida – klotianidin, tiaklopid, imidaklopid, acetamiprid i tiametoksam. Najveću toksičnost ima acetamiprid, relativno novi insekticid iz ove skupine, još neistraženih štetnih učinaka na okoliš. Najmanju toksičnost pokazao je tiaklopid, a slijede ga tiametoksam, imidaklopid i klotianidin.
5. Izmjeren je samo jedan predstavnik karbamatnih pesticida, metiokarb, i pokazao je veću toksičnost od svih ostalih ksenobiotika i daleko je najtoksičniji ksenobiotik obrađen u ovom radu, iako je i ranije navedeno da je vrlo toksičan za vodene organizme.

6. Od herbicida u ovom radu obrađeni su oksadiazon i trialat. Trialat je pokazao veću toksičnost od oksadiazona.
7. Diklofenak je jedan od najkorištenijih nesteroidnih antireumatika i često se ispušta u okoliš. Njegova toksičnost slična je vrijednostima većine farmaceutika mjerenih u ovom radu.
8. Od estrogenskih supstancija u ovom radu mjereni su estradiol-17 β , estron i etinilestradiol-17 α . Najmanju toksičnost pokazuje polusintetski derivat estradiola-17 β , etinilestradiol-17 α , što potvrđuje i razloge primarne sinteze tog hormona, smanjenje toksičnosti estrogenih supstancija koje su jedna od skupina farmaceutika koja se najviše ispušta u okoliš. Međutim, zbog nepoznavanja metaboličkog puta etinilestradiola-17 α , ne može se generalizirati i sa sigurnošću potvrditi njegova manja ili veća toksičnost u odnosu na prirodne hormone.
9. 2,6-etil-heksil-4-metoksicinamat jedini je ispitivani spoj koji nije pokazao toksičnost, što je pozitivno jer je on aktivni sastojak krema za sunčanje koje su jedan od najkorištenijih proizvoda za osobnu njegu. Također, najviše se koristi na plažama i bazenima pa izravno dospijeva u vodu u velikim količinama i važno je da se unatoč rezultatima kontinuirano prati.
10. Važnost praćenja farmaceutika i ksenobiotika u okolišu sve više prepoznaju kako ljudi, tako i institucije. Metabolički putevi mnogih ksenobiotika još nisu istraženi, nema ni regulacije maksimalno dopuštenih koncentracija navedenih ksenobiotika u okolišu, stoga je ključno nastaviti s ovakim i mnogim drugim mjerenjima, kako bi spriječili onečišćenje i štetan utjecaj za živi svijet.
11. Podaci iz ovog rada mogu koristiti za određivanje maksimalni dopuštene koncentracije u vodi, kao i pomoći u analizi realnih uzoraka ispitivanih spojeva iz okoliša, s obzirom da su mjerene otopine čistih aktivnih tvari.

6. LITERATURA

- [1] **J. Papac, M. Halužan, K. Perović,**
Određivanje ekotoksičnosti farmaceutika u vodi, Rad za Rektorovu nagradu, Zagreb, 2017.
- [2] **M. Periša i S. Babić,**
Farmaceutici u okolišu, *Kemija u Industriji* 65 (9-10) (2016) 471–482
- [3] **M. Kaštelan–Macan, M. Petrović,**
Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str.75., 85.
- [4] **S. Zrnčević,**
Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode* 24(2016) 96 119-136
- [5] **K. Vella,**
Provedbena odluka komisije (EU) 2015/495 od 20. ožujka 2015. o utvrđivanju popisa praćenja za tvari za koje je potrebno praćenje diljem Unije u području vodne politike u skladu s Direktivom 2008/105/EZ Europskog parlamenta i Vijeća, Bruxelles, 2015.
- [6] **Farmaceutici u vodi,**
http://en.sanofi.com/csr/planet/priorities/pharma_environment/pharma_environment.aspx
(pristupljeno lipanj 2017.)
- [7] **Makrolidi,**
<http://www.jelena-surana.com/predavanja/Makrolidi.pdf> (pristupljeno travanj 2017.)
- [8] **Azitromicin,**
<https://www.krenizdravo.rtl.hr/korisno/upute/azitromicin-belupo-250500mg-uputa-o-lijeku>
(pristupljeno travanj 2017.)
- [9] **Strukture farmaceutika,**
<https://en.wikipedia.org> (pristupljeno travanj 2017.)
- [10] **Eritromicin,**
<http://lijevski-lijecenje.blogspot.hr/search/label/ERITROMICIN> (pristupljeno travanj 2017.)
- [11] **Klaritromicin,**
<http://lijevski-lijecenje.blogspot.hr/search/label/klaritromicin> (pristupljeno travanj 2017.)
- [12] **Insekticidi,**
<http://www.genera.hr/hr/54/insekticidi/#.WRs1A2iGNPY> (pristupljeno svibanj 2017.)
- [13] **Insekticidi,**
<https://www.agroklub.com/zastitna-sredstva/insekticidi-3/> (pristupljeno svibanj 2017.)
- [14] **Neonikotinoidi,**
<https://www.agroklub.ba/pcelarstvo/sada-je-i-sluzbeno-neonikotinoidi-su-stetni/22748/>
(pristupljeno svibanj 2017.)
- [15] **Neonikotinoidi,**
<https://www.hrvatski-fokus.hr/index.php/znanost/18076-bayer-proizvodi-kontraceptive-za-pcele> (pristupljeno svibanj 2017.)
- [16] **Klotianidin,**
<https://en.wikipedia.org/wiki/Clothianidin> (pristupljeno svibanj 2017.)
- [17] **Tiakloprid,**
<https://www.agroklub.com/zastitna-sredstva/aktivne-tvari/tiakloprid-178/> (pristupljeno svibanj 2017.)
- [18] **Imidakloprid,**
<http://npic.orst.edu/factsheets/imidagen.html> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [19] **T. Imamura, Y. Yanagawa, K. Nishikawa, N. Matsumoto, T. Sakamoto,**
Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans *Acute poisoning with acetamiprid, Clinical Toxicology* (2010) 48, 851–853

- [20] **Tiametoksam**,
<https://en.wikipedia.org/wiki/Thiamethoxam> (pristupljeno svibanj 2017.)
- [21] **Karbamati**,
<http://edis.ifas.ufl.edu/pi088> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [22] **Metiokarb**,
https://en.wikipedia.org/wiki/Methiocarb#Environmental_toxicity (pristupljeno lipanj 2017.)
- [23] **Herbicidi**,
<http://www.genera.hr/hr/54/herbicidi/#.WTwRrmiGNPY> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [24] **Herbicidi**,
<https://www.sciencedaily.com/terms/herbicide.htm> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [25] **Oksadiazon**,
http://www.domyownpestcontrol.com/oxadiazon-c-114_454.html (pristupljeno lipanj 2017.)
- [26] **Trialat**,
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/pyrethrins-ziram/triallate-ext.html> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [27] **NSAR**,
<http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/9792/Nesteroidni-antireumatici-lijekovi-koje-olako-uzimamo.html> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [28] **Diklofenak**,
http://www.farmal.hr/Cms_Data/Contents/farmal/Folders/documents/upute_za_lijekove/~contents/PCXJ69C62T8BDMAZ/diklofenak-retard-100-mg-tbl-pil-odobreno-18.12.09..pdf (pristupljeno lipanj 2017.)
- [29] **Diklofenak**,
<https://www.drugs.com/diclofenac.html> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [30] **Antioksidansi**,
<http://www.adiva.hr/antioksidansi-spasioci-naseg-tijela.aspx> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [31] **2,6-di-tert-butil-4-metilfenol**,
https://en.wikipedia.org/wiki/Butylated_hydroxytoluene#Antioxidant (pristupljeno lipanj 2017.)
- [32] **Estrogenski hormoni**,
<https://hr.wikipedia.org/wiki/Estrogeni> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [33] **Estradiol-17 β** ,
[https://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol_\(medication\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol_(medication)) (pristupljeno lipanj 2017.)
- [34] **Estron**,
<https://www.caymanchem.com/product/10006485> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [35] **Etinilestradiol-17 α** ,
<https://www.caymanchem.com/product/10006486> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [36] **Sredstva za zaštitu od sunca**,
<https://www.thoughtco.com/how-does-sunscreen-work-607902> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [37] **2-etil-heksil-4-metoksicinamat**,
https://en.wikipedia.org/wiki/Octyl_methoxycinnamate (pristupljeno lipanj 2017.)
- [38] **L. Foglar**,
 Ekotoksikologija, Skripta za studente,
https://www.fkit.unizg.hr/download/repository/Ekotoksikologija_SKRIPTA_LF%5B1%5D.pdf
- [39] **Toksičnost farmaceutika**,
<http://www.sciencedirect.com/> (pristupljeno ožujak 2017.)
- [40] **Toksičnost farmaceutika**,
<https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/epi-suitetm-estimation-program-interface> (pristupljeno ožujak 2017.)

- [41] **Toksičnost farmaceutika**,
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristupljeno ožujak 2017.)
- [42] **M. Farré, D. Ašperger, L. Kantiani, S. González, M. Petrović, D. Barceló**,
Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyltriclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*, *Anal Bioanal Chem* (2008) 390:1999–20073
- [43] ***Vibrio fischeri***,
https://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_fischeri (pristupljeno lipanj 2017.)
- [44] **E. G. Ruby, M. Urbanowski, J. Campbell, A. Dunn, M. Faini, R. Gunsalus, P. Lostroh, C. Lupp, J. McCann, D. Millikan, A. Schaefer, E. Stabb, A. Stevens, K. Visick, C. Whistler, E. P. Greenberg**,
Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners, *PNAS*, vol. 102, no. 8, (2005), 3004-3009
- [45] **Lignja *Euprymna scolopes***
<https://pl.pinterest.com/> (pristupljeno lipanj 2017.)
- [46] **K. Perović**,
Određivanje toksičnosti antiparazitika i antibiotika u vodi bakterijama *Vibrio fischeri*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
- [47] **S. Korunić-Košćina, M. Mioč, V. Bobić**,
Ekotoksičnost kao biološki pokazatelj onečišćenja rafinerijskih otpadnih voda, *Goriva i maziva* 42 (2003) 153-176.
- [48] **Dr. Bruno Lange GmbH**,
LUMISTox 300 Operating Manual, Germany, 1999.
- [49] **J. Papac**,
Biorazgradnja antiparazitika u vodi, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.

7. DODACI

7.1. POPIS SLIKA

- Slika 1.** Tok dospijevanja farmaceutika u okoliš
Slika 2. Broj farmaceutika detektiranih u nadzemnim i podzemnim vodama
Slika 3. Struktura molekule azitromicina
Slika 4. Struktura molekule eritromicina
Slika 5. Struktura molekule klaritromicina
Slika 6. Struktura molekule klotianidina
Slika 7. Struktura molekule tiakloprida
Slika 8. Struktura molekule imidakloprida
Slika 9. Struktura molekule acetamiprida
Slika 10. Struktura molekule tiametoksama
Slika 11. Struktura molekule metiokarba
Slika 12. Struktura molekule oksadiazona
Slika 13. Struktura molekule trialata
Slika 14. Struktura molekule diklofenaka
Slika 15. Struktura molekule 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenola
Slika 16. Struktura molekule estradiola-17 β
Slika 17. Struktura molekule estrona
Slika 18. Struktura molekule etinilestradiola-17 α
Slika 19. Struktura molekule 2-etil-heksil-4-metoksicinamata
Slika 20. Osnovni procesi bioakumulacije
Slika 21. Lignja *Euprymna scolopes* u simbiozi s bakterijom *Vibrio fischeri*
Slika 22. Krivulja toksičnosti
Slika 23. Instrument za provedbu toksičnosti LUMIS_{tox} 300 s termostatskim blokom LUMIS_{therm}
Slika 24. Hranjive podloge s vidljivim luminiscentnim kolonijama bakterije *Vibrio fischeri* starim 24 sata
Slika 25. Priprema geometrijskog niza razrjeđenja
Slika 26. Princip mjerenja toksičnosti uz pripremljeni geometrijski niz
Slika 27. Graf usporedbe toksičnosti otopine azitromicina
Slika 28. Graf usporedbe toksičnosti otopine eritromicina
Slika 29. Graf usporedbe toksičnosti otopine klaritromicina
Slika 30. Graf usporedbe toksičnosti otopine klotianidina
Slika 31. Graf usporedbe toksičnosti otopine tiakloprida
Slika 32. Graf usporedbe toksičnosti otopine imidakloprida
Slika 33. Graf usporedbe toksičnosti otopine acetamiprida
Slika 34. Graf usporedbe toksičnosti otopine tiametoksama
Slika 35. Graf usporedbe toksičnosti otopine metiokarba
Slika 36. Graf usporedbe toksičnosti otopine oksadiazona
Slika 37. Graf usporedbe toksičnosti otopine trialata
Slika 38. Graf usporedbe toksičnosti otopine diklofenaka
Slika 39. Graf usporedbe toksičnosti otopine 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenola
Slika 40. Graf usporedbe toksičnosti otopine estradiola-17 β
Slika 41. Graf usporedbe toksičnosti otopine estrona
Slika 42. Graf usporedbe toksičnosti otopine etinilestradiola-17 α
Slika 43. Graf usporedbe toksičnosti otopine 2-etil-heksil-4-metoksicinamata

7.2. POPIS TABLICA

Tablica 1. Metode određivanja toksičnosti vode sa živim organizmima

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

Tablica 3. Svojstva ispitivanih farmaceutika

Tablica 4. Sastav hranjive podloge

Tablica 5. Sastav otopine za resuspenziju

Tablica 6. Odvagane mase zadanih farmaceutika na preciznoj analitičkoj vagi

Tablica 7. Podešeni uvjeti EC programa za mjerenje luminiscencije

Tablica 8. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu azitromicina

Tablica 9. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu eritromicina

Tablica 10. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu klaritromicina

Tablica 11. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu klotianidina

Tablica 12. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu tiakloprida

Tablica 13. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu imidakloprida

Tablica 14. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu acetamiprida

Tablica 15. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu tiametoksama

Tablica 16. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu metiokarba

Tablica 17. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu oksadiazona

Tablica 18. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu trialata

Tablica 19. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu diklofenaka

Tablica 20. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenola

Tablica 21. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu estradiola-17 β

Tablica 22. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu estrona

Tablica 23. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu etinilestradiola-17 α

Tablica 24. Očitane vrijednosti EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU za otopinu 2-etil-heksil-4-metoksicinamata

Tablica 25. Parametri toksičnosti dobiveni za ispitivane spojeve za dva uzastopna mjerenja na bakterijama *Vibrio fischeri*: EC_{20} , EC_{50} , $LOEC$ s pripadajućom I , te izračunate TU

ŽIVOTOPIS

Tea Borojević [REDACTED] S odličnim uspjehom završava Osnovnu školu Žitnjak, te XVI. gimnaziju u Zagrebu. Na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje se 2014. godine kao redovna studentica sveučilišnog preddiplomskog studija Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila je u Plivi, na odjelu Kontrole kvalitete. Tečno govori engleski i španjolski jezik, dobro se služi francuskim, a poznaje i osnove ruskog jezika. Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije i računalno je pismena.