

# Određivanje toksičnosti azitromicina nakon naprednih oksidacijskih procesa

---

Perović, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:778545>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

Klara Perović

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, lipanj 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Klara Perović

**ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI AZITROMICINA NAKON NAPREDNIH  
OKSIDACIJSKIH PROCESA**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

Doc. dr. sc. Davor Dolar

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-2353 i izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2017./2018. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger.



## ZAHVALA:

*Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na ponovno iskazanom povjerenju tijekom izrade diplomskog rada, izrazitoj susretljivosti i stručnom vodstvu.*

*Zahvaljujem asistentici, dr. sc. Mirti Čizmić na pruženoj pomoći i pojašnjenjima tijekom rada.*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac i tehničkoj suradnici Marijani Vidaković sa Zavoda za industrijsku ekologiju na pruženoj pomoći oko oko priprema za određivanje toksičnosti.*

*Zahvaljujem se tehničkim suradnicama Zavoda za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Najviše od svega zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci i ljubavi koju mi pružaju i što svaku životnu situaciju čine lakšom. Uz Vas sve ima smisla!*

## SAŽETAK

### ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI AZITROMICINA NAKON NAPREDNIH OKSIDACIJSKIH PROCESA

Azitromicin (AZM) je makrolidni antibiotik širokog spektra djelovanja čije je prisustvo detektirano u vodnom okolišu. Pripada skupini „novih onečišćujućih tvari“ te se vrlo teško uklanja konvencionalnim metodama obrade otpadnih voda. Iako su farmaceutici u okolišu općenito prisutni u niskim koncentracijama, njihovo dugoročno ispuštanje može ostaviti neizbrisive posljedice na sve okolišne sastavnice, ali i na ljudsko zdravlje. Kako bi se spriječio njihov ulazak u okoliš, potreban je razvoj i primjena novih i učinkovitih metoda koje će u kombinaciji s konvencionalnim metodama obrade uspjeti učinkovito ukloniti navedene tvari.

Jedna od metoda koja se pokazala učinkovitom pri uklanjanju farmaceutika jesu napredni oksidacijski procesi. Cilj ovog rada bilo je odrediti toksičnost vodene otopine azitromicina početne masene koncentracije od 10 mg/L nakon provođenja dvije vrste naprednih oksidacijskih procesa, direktne UV-fotolize i fotokatalize s  $\text{TiO}_2$  uz primjenu UV-A i UV-C zračenja. Procjena toksičnosti provedena je korištenjem bioluminiscentne metode za određivanje akutne toksičnosti s bakterijama *Vibrio fischeri*. Osim navedenog, pomoću tekućinske tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s tandemskom spektrometrijom masa detektirani su i identificirani nastali razgradni produkti ispitivanog spoja nakon tretiranja naprednim oksidacijskim postupcima. Određivanje toksičnosti je u ovom slučaju od ključne važnosti budući da nastali razgradni produkti mogu biti toksičniji od polaznih tvari.

Ispitivanjima se pokazalo kako nitijedna od ispitivanih otopina azitromicina nakon primjene naprednih oksidacijskih procesa nije toksična, bez obzira na prisutnost nastalih razgradnih produkata. Nastajanje razgradnih produkata zabilježeno je tijekom provođenja procesa fotokatalize s  $\text{TiO}_2$  pri valnoj duljini zračenja od 254 nm.

#### **Ključne riječi:**

*azitromicin, farmaceutici, napredni oksidacijski procesi, direktna UV-fotoliza, fotokataliza s  $\text{TiO}_2$ , toksičnost, razgradni produkti*

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF AZITHROMYCIN TOXICITY AFTER ADVANCED OXIDATION PROCESSES

Azithromycin (AZ) is a wide-spectrum macrolide antibiotic which presence is detected in the aquatic environment. It belongs to the group of „new emerging contaminants“ and it is very difficult removed by conventional wastewater treatment methods. Even though pharmaceuticals are generally present in the environment in low concentrations, their long-term discharge can leave irreversible consequences on all environmental constituents and also on human health. In order to prevent their entry into the environment, development and application of new and effective methods will be required and which, in combination with conventional treatment methods, will be effective in removing these substances.

One of the methods that has proved effective in removal of pharmaceuticals are advanced oxidation processes. The aim of this paper was to determine the toxicity of aqueous azithromycin solution with initial mass concentration of 10 mg/L after performing two types of advanced oxidation processes, direct UV photolysis and photocatalysis with TiO<sub>2</sub> by using UV-A and UV-C radiation. The toxicity determination was performed by using a bioluminescent method for the determination of acute toxicity with *Vibrio fischeri* bacteria. Also, by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, degradation products were detected and identified after the treatment with advanced oxidation processes. In this case, toxicity determination is of crucial importance since the established degradation products may be more toxic than the starting substances.

Studies have shown that none of the tested solutions of azithromycin after the application of advanced oxidation processes is toxic, regardless of the presence of formed degradation products. The formation of degradation products was recorded during the photolytic process with TiO<sub>2</sub> at a wavelength of radiation of 254 nm.

#### **Key words:**

*azithromycin, pharmaceuticals, advanced oxidation processes, direct UV photolysis, photocatalysis with TiO<sub>2</sub>, toxicity, degradation products*

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	3
2.1. Osnovno o farmaceuticima .....	3
2.1.1. Antibiotici .....	5
2.1.1.1. Azitromicin .....	5
2.2. Farmaceutici u okolišu .....	7
2.2.1. Analitičke metode identifikacije i kvantifikacije farmaceutika u okolišu .....	11
2.2.2. Rizici za organizme, ljudsko zdravlje i ekosustav koji se javljaju prilikom dospjeća farmaceutika u okoliš .....	11
2.3. Mogući procesi obrade otpadnih voda onečišćenih farmaceutskim spojevima .....	13
2.3.1. Napredni oksidacijski procesi .....	14
2.3.1.1. UV zračenje .....	16
2.3.1.1.1. Direktna UV-fotoliza .....	17
2.3.1.1.2. Fotokataliza s TiO <sub>2</sub> .....	18
2.3.1.2. Fotokataliza s TiO <sub>2</sub> .....	18
2.4. Toksičnost farmaceutika u okolišu .....	21
2.4.1. Provedba biotestova pri ispitivanju toksičnosti farmaceutika u okolišu .....	21
2.4.2. Ispitivanje akutne toksičnosti na bakterijama <i>Vibrio fischeri</i> .....	23
2.4.3. Grafički prikaz toksičnosti i definicije povezane s toksičnošću .....	25
2.5. Procjena rizika za okoliš .....	27
2.6. Osvrt na zakonodavstvo u području zaštite okoliša .....	28
2.6.1. Gospodarenje s farmaceutskim otpadom .....	29
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	31
3.1. Materijali .....	31
3.1.1. Kemikalije .....	31
3.1.2. Farmaceutik – azitromicin .....	31
3.1.3. Djelatni mikroorganizmi – bakterijska kultura <i>Vibrio fischeri</i> .....	32



3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj bakterijske kulture <i>Vibrio fischeri</i> .....	32
3.1.5. Otopine potrebne za određivanje toksičnosti.....	33
3.1.5.1. Otopina za resuspenziju .....	33
3.1.5.2. Otopina referentnih tvari i radna otopina .....	34
3.2. Instrumenti za provedbu toksičnosti.....	34
3.3. Radni postupci određivanja toksičnosti bakterijama <i>Vibrio fischeri</i> .....	36
3.3.1. Sterilna tehnika rada.....	36
3.3.2. Aktivacija liofiliziranih bakterija.....	36
3.3.3. Precjepljivanje bakterijske kulture .....	36
3.3.4. Priprema bakterijske suspenzije .....	37
3.3.5. Provođenje testa toksičnosti .....	37
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>39</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>50</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>51</b>
<b>7. DODATAK .....</b>	<b>57</b>
7.1. Popis slika.....	57
7.2. Popis tablica.....	57
7.3. Popis kratica i simbola.....	58
Životopis.....	59

# 1. UVOD

Voda je od esencijalne važnosti za sve poznate oblika života i iako površinu Zemlje čini više od 70 % vode, samo je oko 0,0082 % vode pitko i lako dostupno ljudima. Zbog nedostatka vode, provode se brojna istraživanja koja ispituju kvalitetu voda i utjecaj potencijalnih onečišćujućih tvari na njenu kvalitetu.<sup>1</sup>

Posebnu pozornost znanstvene zajednice privukle su tzv. „nove onečišćujuće tvari“ poput farmaceutika, pesticida, insekticida, sredstava za osobnu higijenu i sredstava koji se upotrebljavaju u kućanstvima, a čije je nesavjesno korištenje podiglo njihove koncentracije u različitim ekološkim matricama.<sup>2</sup> Zbog visoke molekularne složenosti, takvi spojevi imaju visoku otpornost na uobičajene metode obrade otpadnih voda koje se primjenjuju u postojećim postrojenjima za obradu otpadnih voda.<sup>3</sup>

Onečišćujuće tvari koje izazivaju najveću zabrinutost su farmaceutici, posebice antibiotici, a čija je prisutnost u okolišu posljedica sve veće svjetske potražnje za farmaceuticima. Među češće korištenim farmaceuticima, svoje je mjesto pronašao i azitromicin, antibiotik sa širokim spektrom djelovanja u liječenju raznih infekcija, a čije se korištenje često preporučuje. Budući da se nakon primjene ne razgrađuje u ljudskom tijelu, izlučuje se u gotovo nepromijenjenom obliku te se zajedno s ostalim otpadnim tvarima kanalizira u sustav otpadnih voda.<sup>2</sup> Iako su farmaceutici u okolišu prisutni u niskim koncentracijama, mogu imati dugoročan utjecaj na izložene vodene organizme i ljudsko zdravlje te je stoga vrlo važno razviti cjelokupan sustav njihova praćenja u okolišu.<sup>4,5</sup>

Jedna od najčešće korištenih analitičkih metoda za određivanje farmaceutika u uzorcima iz okoliša, posebice polarnih i termički nestabilnih farmaceutika, je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) vezana sa spektrometrijom masa (MS) koja ima niže granice dokazivanja te omogućuje odrediti molekulsku masu farmaceutika, kao i strukturu nepoznatih spojeva.<sup>6</sup>

Budući da su otpadne vode onečišćene farmaceuticima otporne na konvencionalne metode obrade, vrlo je bitno razviti metodu koja će učinkovito uklanjati prisutne farmaceutike. U tome su se vrlo učinkoviti pokazali napredni oksidacijski procesi (eng. *Advanced Oxidation Processes*, AOP). Njihovo djelovanje se temelji na upotrebi visoko

reaktivnih hidroksilnih radikala ( $OH\cdot$ ) koji mogu oksidirati teško razgradive spojeve.<sup>2</sup> U najčešće korištene napredne oksidacijske procese ubrajamo UV fotolizu samu ili kombiniranu s  $H_2O_2$  kao jakim oksidansom, Fenton i foto-Fenton procese, kao i heterogenu fotokatalizu.<sup>7</sup>

Prilikom uklanjanja farmaceutika iz otpadne vode primjenom naprednih oksidacijskih procesa, vrlo je bitno tijekom čitavog odvijanja procesa pratiti toksičnost otpadne vode, budući da oksidacijom farmaceutika mogu nastati razgradni i transformacijski produkti koji mogu biti čak toksičniji od početne molekule farmaceutika. Jedna od najčešće primjenjivanih standardnih metoda za određivanje akutne toksičnosti farmaceutika je DIN 38412-L-34, a koja se temelji na mjerenju inhibicije svjetlosti bioluminiscentnih bakterija *Vibrio fischeri*.

Glavni cilj ovoga rada bio je odrediti toksičnost vodene otopine azitromicina početne masene koncentracije aktivne tvari od 10 mg/L nakon primjene dvije vrste naprednih oksidacijskih procesa, direktne UV-fotolize i fotokatalize s  $TiO_2$ . Kao izvor UV zračenja primijenjene su dvije različite UV lampe koje emitiraju svjetlost valne duljine u iznosu od 254 nm (UV-C) i 365 nm (UV-A). Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima te je ispitivana njihova toksičnost, ali su i primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s tandemskom spektrometrijom masa (HPLC-MS/MS) detektirani i identificirani razgradni produkti nastali oksidacijom azitromicina tijekom odvijanja procesa. Korištena je vodena otopina azitromicina masene koncentracije od 10 mg/L, budući da se pretpostavlja da je to koncentracija azitromicina koja zaostaje u pročišćenoj otpadnoj vodi nakon konvencionalnog tretmana obrade otpadne vode.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Osnovno o farmaceuticima

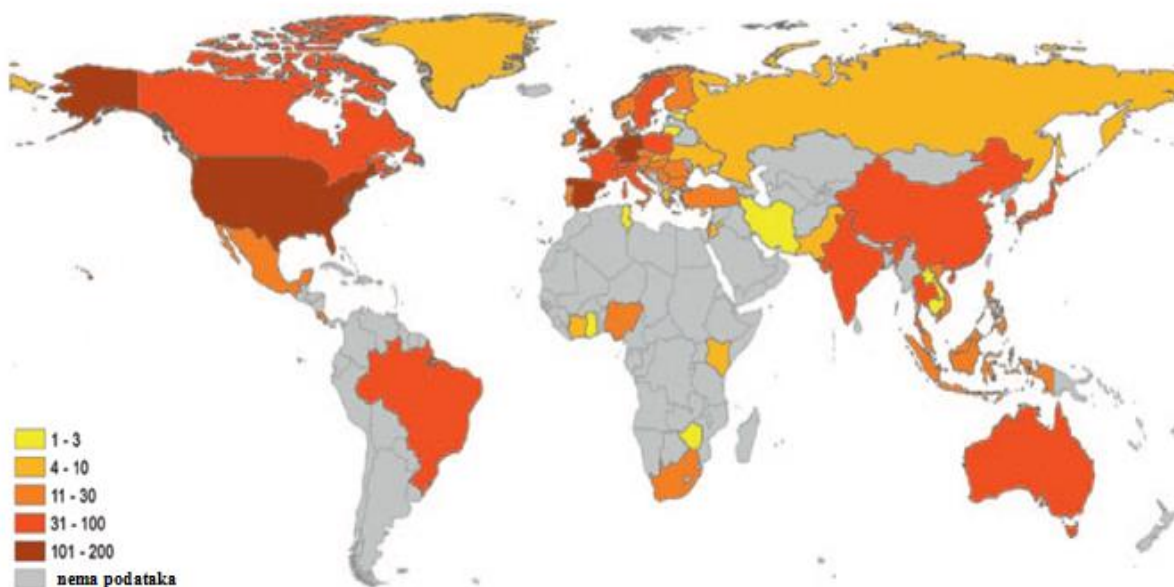
Farmaceutici ili lijekovi su velika grupa kemijskih spojeva koji obuhvaćaju razne lijekove i dodatke prehrani, a namijenjeni su korištenju u humanoj medicini i veterini. S obzirom na podrijetlo dijelimo ih na prirodne, polusintetske i sintetske, a na tržištu se pojavljuju u obliku tableta ili tekućina. U određenim količinama i pod određenim uvjetima služe za dijagnosticiranje, liječenje, sprječavanje ili ublažavanje bolesti u čovjeka ili životinja. Umjereno su topljivi i lipofilni kako bi bili biološki aktivni i bioraspoloživi, a također su i postojani kako bi se izbjegla njihova razgradnja prije postizanja željenih zdravstvenih učinaka.<sup>8,9</sup>

Kod farmaceutika je vrlo bitno naglasiti da se svaki gotovi proizvod sastoji od jedne ili više farmaceutskih aktivnih tvari (eng. *Active Pharmaceutical Ingredients*, API), pomoćnih sredstava i raznih dodataka kao što su anorganske soli ili druge organske kemikalije poput šećera, mirisa, pigmenta i boja. S kemijskog gledišta, farmaceutski aktivne tvari pokrivaju veliki broj organskih spojeva male molekulske mase od 200 do 500 Daltona s različitim fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima, pri čemu njihova struktura značajno utječe na sudbinu farmaceutika u okolišu.<sup>10</sup>

Od sredine 90-ih godina, došlo je do skoro trostrukog povećanja broja studija koje istražuju pojavu, utjecaje i moguće rizike prilikom dospjeća farmaceutika u okoliš. Na taj se način pomaknula pozornost s konvencionalnih prioritarnih onečišćujućih tvari kao što su poliklorirani bifenili i policiklički aromatski ugljikovodici na tzv. „nove onečišćujuće tvari“ među kojima su se, osim farmaceutika, još pronašla i sredstva za osobnu higijenu te sredstva koja se upotrebljavaju u kućanstvima (eng. *Pharmaceuticals and Personal Care Products*, PPCPs). Zbog svojstava poput toksičnosti, bioakumulacije u organizmima i postojanosti u okolišu predstavljaju potencijalnu opasnost za ekosustav, a dodatan problem je u tome što za takve tvari još uvijek nisu uspostavljene zakonske regulative koje kontroliraju njihove maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) u okolišu.<sup>6,11</sup>

Ovisno o učinkovitosti obrade i fizikalno-kemijskim svojstvima farmaceutika, farmaceutski aktivne tvari mogu dospjeti u površinske i podzemne vode čime ugrožavaju sustav opskrbe pitkom vodom (**Slika 1.**).<sup>9</sup> Iako su u okolišu prisutni u niskim, mikrogramskim ili nanogramskim koncentracijama, njihov kontinuiran unos može rezultirati povećanim

koncentracijama te negativnim i dugoročnim utjecajima na izložene organizme.<sup>6,9</sup> Bez obzira na niske koncentracije u kojima su prisutni u vodi, danas je ipak moguće detektirati takve spojeve zbog iznimnih poboljšanja analitičkih metoda detekcije.<sup>12</sup>



**Slika 1.** Broj farmaceutika detektiranih u površinskim ili podzemnim vodama i/ili vodi za piće<sup>13</sup>

Farmaceutici predstavljaju ključan element moderne medicine, a u sljedećih 10 do 50 godina može se iz više razloga očekivati povećanje njihovog korištenja, a time posljedično i povećanje njihovog otpuštanja u okoliš. Prvo, povećanjem broja starijih ljudi povećava se i upotreba lijekova. Osim toga, s povećanjem životnog standarda i povećanjem dostupnosti lijekova, njihova upotreba će se povećati diljem svijeta, osobito u brzo rastućim gospodarstvima. Što se tiče trenutnog stanja, analize farmaceutskog tržišta pokazuju da je za zdravstvenu zaštitu ljudi diljem svijeta odobreno oko 4.000 različitih farmaceutskih aktivnih spojeva, čija godišnja proizvodnja iznosi više od 100.000 tona.<sup>10,13</sup>

Prema Izvješćima o potrošnji lijekova koje je objavila Agencija za lijekove i medicinske proizvode, HALMED, u Republici Hrvatskoj se 2016. godine potrošilo ukupno 5.802,981.059 kuna na lijekove, 2015. godine 5.266,937.944 kuna, a 2014. godine je ta potrošnja iznosila 5.005,884.342 kuna. Iz navedenih podataka je vidljivo kako se godišnja potrošnja lijekova povećava iz godine u godinu.<sup>14</sup>

### 2.1.1. Antibiotici

Antibiotici označavaju sva prirodna ili sintetska terapijska sredstva koja se koriste za uništavanje ili inhibiciju rasta mikroorganizama, a primjenjuju se u dovoljno niskim koncentracijama kako bi se izbjeglo oštećenje organizma domaćina. Imaju široku primjenu u liječenju bakterijskih bolesti.<sup>15,16</sup>

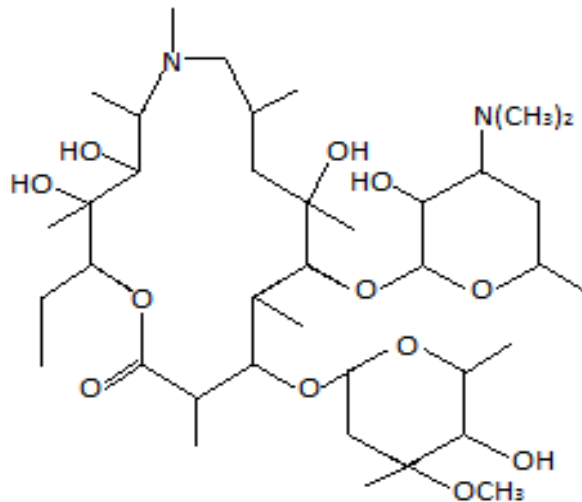
Jedna od podjela antibiotika je na baktericidne, koji se koriste za uništavanje bakterija, i bakteriostatske koji inhibiraju rast bakterija. Klasifikacija antibiotika se uglavnom vrši s obzirom na strukturu ili mehanizam djelovanja antibiotika. Tako razlikujemo podskupine poput beta-laktama, kinolona, makrolida, sulfonamida, tetraciklina i drugih. Antibiotici su složene molekule koje unutar sebe mogu imati više različitih funkcija, pa tako s promjenom pH-vrijednosti mogu biti neutralni, anioni, kationi ili zwitter ioni. S promjenom pH-vrijednosti mogu se mijenjati i ostala fizikalna, kemijska i biološka svojstva antibiotika poput aktivnosti, fotoreaktivnosti, sorpcije i toksičnosti.<sup>17</sup>

Potrošnja antibiotika diljem svijeta se procjenjuju u stotinama tisuća tona godišnje. Unutar humane medicine, antibiotici su treći po redu najčešće propisivanih farmaceutika (oko 6 %), a u veterinarskoj medicini čine više od 70 % propisivanih farmaceutika. Povećana potrošnja antibiotika u posljednjim desetljećima dovela je do povećanja broja istraživanja koji se bave proučavanjem njihova utjecaja na okoliš. Antibiotici vrlo lako pronalaze svoj put u vodenim sustavima, a budući da su u okolišu postojani i nisu biorazgradivi, predstavljaju veliku prijetnju za kvalitetu vode u urbanim društvima. Jednom kada dospiju u okoliš, njihova sudbina i utjecaj na ekosustav ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, klimatskim uvjetima, pH-vrijednostima, tipu tla i raznim drugim čimbenicima.<sup>15,18</sup> U radu je od antibiotika obrađen azitromicin.

#### 2.1.1.1. Azitromicin

Azitromicin (AZM) (**Slika 2.**) je djelatna tvar makrolidnog antibiotika *Sumameda* (tržišna marka u Hrvatskoj), a jedno je od najvećih dostignuća u hrvatskoj znanstvenoj povijesti. Zbog iznimnog terapijskog djelovanja smatra se jednim od najuspješnijih antibiotika na svijetu. Za njegov izum zaslužan je znanstveni tim s Istraživačkog instituta hrvatske farmaceutske tvrtke PLIVE, a tim su činili: dr. sc. S. Đokić, mr. sc. G. Kobrehel, dr. sc. G. Lazarevski i dr. sc. Z. Tamburašev. Azitromicin je na tržište stavljen u suradnji sa svjetskom

farmaceutskom tvrtkom Pfizerom. Patentna zaštita za azitromicin kao djelatnu tvar, temeljena na PLIVINIM patentnim prijavama iz 1979. i 1981. te Pfizerovoj patentnoj prijavi iz 1982., istekla je polovicom prošlog desetljeća u većini svjetskih zemalja. To je omogućilo drugim farmaceutskim tvrtkama da izađu na tržište sa svojim generičkim formulacijama.



**Slika 2.** Molekulska struktura azitromicina

Azitromicin je ujedno i prvi predstavnik nove klase 15-eročlanih makrolida, nazvane azalidi po dušiku uvedenom u eritromicinski prsten. Dobiven je tijekom nekoliko sintetskih koraka: oksimacijom eritromicina A, Beckmannovom pregradnjom dobivena oksima eritromicina A s aromatskim sulfokloridima, potom redukcijom iminoetera eritromicina A te metiliranjem u eritromicinski prsten uvedenoga dušika. Današnje uobičajeno kemijsko ime za azitromicin je 9-deokso-9a-aza-9a-metil-9a-homoeritromicin A.

Danas se azitromicin upotrebljava kao vrlo učinkovit lijek za liječenje raznih bakterijskih infekcija gornjih i donjih dišnih puteva, spolno-prenosivih bolesti, infekcija želuca i dvanaesnika, infekcija kože i potkožnog tkiva, upale zdjelice te sve više i za prevenciju bakterijskih infekcija kod djece i osoba sa slabim imunitetom. Spektar antibakterijskog djelovanja sličan je eritromicinu, ali je učinkovitiji u borbi protiv anaerobnih i Gram negativnih bakterija, a posebice protiv bakterije *Haemophilus influenzae*. Također,

ako se uspoređuje s eritromicinom, stabilniji je u kiselim uvjetima pa mu ne treba zaštita od želučanih kiselina.<sup>19</sup>

Zbog svih navedenih djelotvornih učinaka u liječenju raznih bolesti i infekcija, često se savjetuje njegovo korištenje te je tako samo u SAD-u 2010. godine propisan čak 50 milijuna puta.<sup>20</sup> Njegova široka upotreba pretvorila je nekad moćno i jedinstveno farmaceutsko oružje u dugoročni rizik za okoliš koji dospijećem u okoliš može imati dugotrajan utjecaj na ljudsko zdravlje. Azitromicin je pronađen u raznim okolišnim sastavnicama poput površinskih i podzemnih voda te tla. Tako je najviša koncentracija azitromicina zabilježena u površinskim vodama iznosila 3 ng/L, a u efluentima 69 ng/L. U podzemnim vodama, azitromicin je pronađen u koncentracijama od 275 ng/L.

Budući da aktivna farmaceutska tvar azitromicina nije u potpunosti apsorbirana i distribuirana u ljudskom tijelu, nakon primjene se gotovo nepromijenjen spoj izlučuje i kanalizira u sustav otpadnih voda. Konvencionalna obrada otpadnih voda, koja uključuje mehaničke, kemijske i biološke metode obrade, vrlo često nije učinkovita u uklanjanju takvih spojeva te oni posljedično mogu dospjeti u površinske vode, a daljnjom cirkulacijom i u vode za piće. Azitromicin je tako pronađen u vodama Srbije, Švicarske, Španjolske i Kine.<sup>21</sup>

## 2.2. Farmaceutici u okolišu

Mnogi farmaceutici, prije no što se izluče iz ljudskog ili životinjskog organizma, prolaze kroz strukturalne promjene što rezultira stvaranjem metabolita, koji mogu biti polarniji i hidrofilniji od izvornoga lijeka. Te promjene se rijetko odvijaju do kraja tako da se uvijek i dio roditeljskog spoja – farmaceutski aktivne tvari, izlučuje iz organizma zajedno s nastalim metabolitima. Literaturni izvori navode kako se neki antibiotici u organizmu mogu metabolizirati do čak 95 %, a drugi samo do 5 %. Studije provedene u Njemačkoj, a koje su se bavile istraživanjima API-a, pokazale su da se čak 75 % korištenih antibiotika u Njemačkoj izlučuje iz organizma nepromijenjeno, u obliku još uvijek aktivnih API-a.<sup>8,10</sup>

Kad jednom završe u okolišu, postoji mogućnost da smjese farmaceutskih aktivnih tvari i metabolita podlegnu sorpciji na čestice tla i sedimenta ili da prolaze kroz daljnje promjene putem abiotičkih i biotičkih procesa. Abiotički procesi podrazumijevaju hidrolitičku i fotolitičku razgradnju farmaceutika, dok biotički procesi podrazumijevaju biološku razgradnju farmaceutika mikroorganizmima, odnosno bakterijama i gljivicama. Da bi se



procijenila sklonost farmaceutika sorpciji na tlo i sediment, kao i abiotičkim ili biotičkim procesima razgradnje, bitno je poznavanje njihovih fizikalno-kemijskih svojstava poput konstante ionizacije ( $K_k$ ), koeficijenta razdiobe ( $K_d$ ), koeficijenta razdiobe oktanol/voda ( $K_{ov}$ ) i koeficijenta sorpcije na organski ugljik ( $K_{oc}$ ).

Procesi razgradnje farmaceutika rezultiraju smanjenjem koncentracije početne molekule farmaceutika i nastajanjem razgradnih i transformacijskih produkata. Transformacijom dolazi do promjene u strukturi početne molekule, pri čemu molekulska masa ostaje ista, dok razgradnjom nastaju novi spojevi s drukčijom molekulskom masom. Zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava u odnosu na početne molekule farmaceutika, nastali razgradni i transformacijski produkti mogu biti toksičniji od početnih molekula. Smanjenje koncentracije farmaceutika u okolišu nije samo posljedica procesa razgradnje, već može biti i rezultat sorpcije farmaceutika na čestice tla, sedimenta ili suspendirane čestice prisutne u vodenoj fazi.<sup>6</sup>

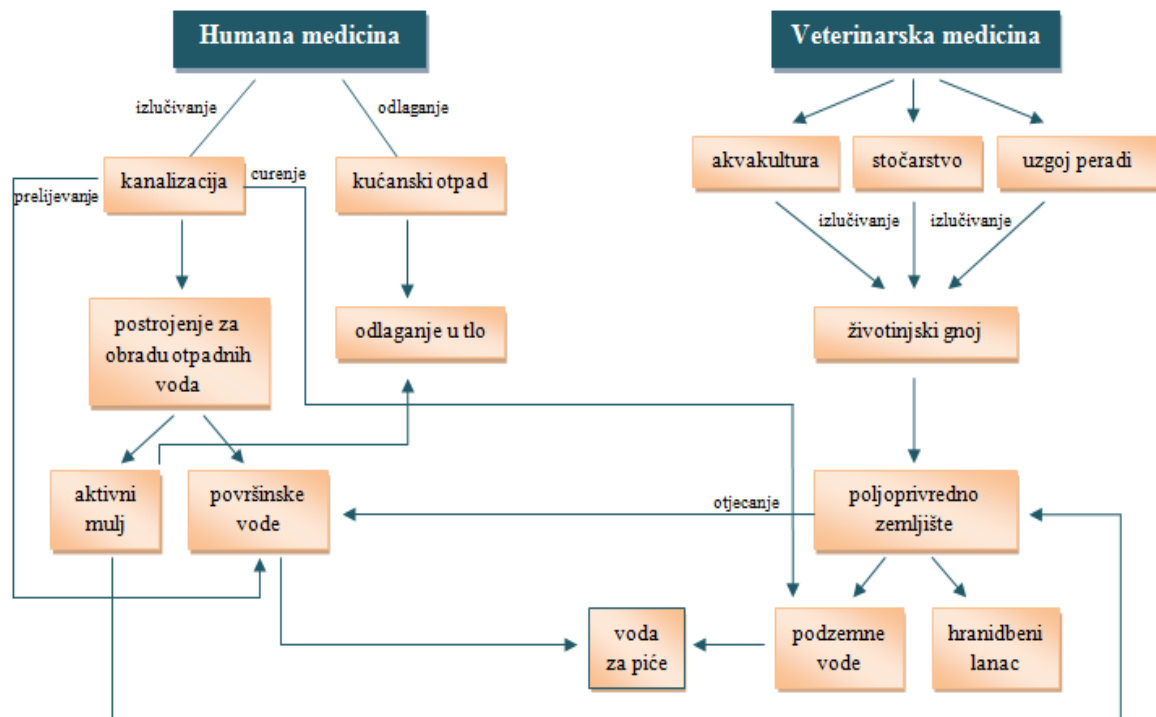
Čitav niz farmaceutika je tijekom godina detektiran u okolišu (**Tablica 1.**), a različiti su putovi njihova dospjeća u okoliš (**Slika 3.**). Neki od izvora su postrojenja za obradu otpadnih voda, farmaceutska industrija, procjedne vode iz odlagališta, septički sustavi, bolnice, nepropisno odlaganje neiskorištenih lijeva te farma na kojima se velike količine farmaceutika, posebice antibiotika, dodaju u životinjsku hranu radi liječenja ili preveniranja bolesti te u svrhu poboljšanog rasta i bolje iskoristivosti prehrane. Upotrebom stajskog gnojiva farmaceutici mogu dospjeti na poljoprivredne površine, a ispiranjem tih površina čak i u podzemne vode. Farmaceutici mogu vrlo lako dospjeti i u tlo ukoliko se poljoprivredne površine gnoje aktivnim muljem, koji je nastao kao produkt obrade komunalnih otpadnih voda.<sup>9,22</sup>

**Tablica 1.** Najzastupljeniji farmaceutici u okolišu s pripadajućim koncentracijama<sup>23</sup>

<b>Antibiotici</b>	Sulfonamidi: sulfametoksazol (0,02-0,58 µg/L) Fluorokinoloni: ofloksacin (6-52 ng/L), ciprofloksacin (6-60 ng/L) Bakteriostatski: trimetoprim (0,11-0,37 µg/L), penicilin G (0,025 µg/L)
<b>Analgetici/Antipiretici</b>	Acetaminofen (10-23,3 µg/L), diklofenak (0,01-510 µg/L), naproksen (0,5-7,84 µg/L), ibuprofen (0,49-990 µg/L), ketoprofen (0,13-3 µg/L), karbamazepin (0,1-1,68 µg/L)
<b>CNS stimulansi</b>	Kofein (3,2-11,44 µg/L)
<b>Beta blokatori</b>	Propranolol (0,05 µg/L), atenolol (10-730 ng/L), metoprolol (10-390 ng/L)
<b>Steroidi i hormoni</b>	17 $\alpha$ -etinilestradiol (1 µg/L), estron, 17 $\beta$ -estradiol, estriol (10 µg/L)

Među glavnim izvorima otpuštanja farmaceutika u okoliš su postrojenja za obradu komunalnih otpadnih voda te bolničke i industrijske otpadne vode. Istraživanjima se pokazalo kako su značajan izvor otpuštanja farmaceutika u okoliš i svi ostali izvori koji nisu povezani s otpadnim vodama (eng. *Non-Wastewater Pathway*), među kojima su najznačajniji izvor pojedinačna kućanstva gdje se farmaceutici odlažu zajedno s ostalim kućnim otpadom.<sup>24,25</sup>

Doprinos svakog od izvora farmaceutika u okoliš različit je od države do države. U Njemačkoj je tako najmanji veterinarski doprinos, a najveći ljudski, dok na Tajvanu najveći doprinos stvaraju poljoprivredna gospodarstva, bolnice i farmaceutska industrija.<sup>26</sup>



**Slika 3.** Glavni putevi dospjeća humanih i veterinarskih farmaceutika u okoliš<sup>27</sup>

Ulaskom u postrojenje za obradu otpadnih voda, farmaceutici nisu u potpunosti mineralizirani. Oni se ili djelomično zadržavaju u mulju ili se metaboliziraju u još hidrofilnije, ali postoje oblike koji vrlo lako prolaze kroz sustav obrade otpadnih voda i završavaju u vodnim prijamnicima. Njihovo uklanjanje tijekom obrade otpadnih voda je promjenjivo i ovisi o svojstvima farmaceutika i procesnim uvjetima kao što su temperatura, vrijeme zadržavanja mulja (eng. *Sludge Retention Time*, SRT) i hidrauličko vrijeme zadržavanja (eng. *Hydraulic Retention Time*, HRT). Malo se farmaceutski aktivnih tvari uklanja konvencionalnim metodama obrade otpadnih voda, zbog čega se često i detektiraju u efluentima.<sup>19</sup> Tako su istraživanja pokazala da učinkovitost uklanjanja antibiotika u postrojenjima za obradu otpadnih voda iznosi između 34 i 72 %.<sup>28</sup>

Koncentracije pojedinačnih farmaceutskih spojeva u efluentima, odnosno ispuštima iz postrojenja za obradu otpadnih voda su uglavnom manje od 1 µg/L, iako su više koncentracije od nekoliko mg/L izmjerene u efluentima iz postrojenja za obradu farmaceutskih otpadnih voda.<sup>29</sup>

### 2.2.1. Analitičke metode identifikacije i kvantifikacije farmaceutika u okolišu

Vrlo niske koncentracije farmaceutika u kompleksnim okolišnim uzorcima predstavljaju problem prilikom njihove identifikacije i kvantifikacije. U okolišu osim farmaceutika mogu biti prisutni i njihovi razgradni i transformacijski produkti, nastali kao rezultat abiotičkih i biotičkih procesa koji se odvijaju u okolišu. Analitičko određivanje farmaceutika zahtijeva korištenje sofisticiranih metoda pripreme uzorka te iznimno osjetljivih analitičkih metoda koje mogu točno i precizno analizirati farmaceutike pri iznimno niskim koncentracijama.<sup>6,30</sup>

Najčešće korištene analitičke metode za identifikaciju i kvantifikaciju farmaceutika, koje analiziraju farmaceutike u koncentracijama i ispod ng/L, su tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa (eng. *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection*, LC-MS), tekućinska kromatografija s tandenskom spektrometrijom masa (eng. *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS), plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (eng. *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*, GC-MS) i plinska kromatografija s tandenskom spektrometrijom masa (eng. *Gas Chromatography tandem Mass Spectrometry*, GC-MS/MS). Tekućinska kromatografija se primjenjuje za određivanje polarnih i termički nestabilnih farmaceutika, a plinska kromatografija za određivanje nepolarnih, hlapljivih i termički stabilnih farmaceutika.<sup>31,32</sup> Uz navedene metode, za analizu farmaceutika se još primjenjuje i kapilarna elektroforeza (eng. *Capillary electrophoresis*, CE) koja je jednostavnija i jeftinija od plinske i tekućinske kromatografije, ali manje osjetljivija s višim granicama detekcije ( $\mu\text{g/L}$ ).<sup>33</sup>

### 2.2.2. Rizici za organizme, ljudsko zdravlje i ekosustav koji se javljaju prilikom dospijea farmaceutika u okoliš

Provedena okolišna i laboratorijska istraživanja dokazala su kako farmaceutici, prilikom dospijea u okoliš, mogu negativno djelovati na svim razinama biološke hijerarhije, počevši od stanica, organa, organizama, populacije, pa sve do čitavog ekosustava.<sup>23,34</sup> Budući da su farmaceutici biološki aktivni spojevi koji su razvijeni da izazivaju biološke učinke pri niskim koncentracijama, dovoljni su i tragovi farmaceutskih spojeva koji mogu uzrokovati nepoželjno djelovanje, a koje uključuje poremećaje fizioloških procesa i reproduktivnih

funkcija organizama, povećanje toksičnosti nekih farmaceutskih aktivnih spojeva i razvoj rezistentnih bakterija.<sup>15</sup>

U **Tablici 2.** prikazani su općeniti negativni učinci koje pojedini farmaceutici mogu imati na izložene organizme pri određenim koncentracijama. Zbog velike topivosti većine farmaceutika, vodeni organizmi poput riba, algi i dagnji su osjetljiviji na njihove učinke. Tako je dokazano da antiepileptik karbamazepin i betablokator metoprolol oštećuju riblje organe, a sintetski estrogenski hormon 17  $\alpha$ -etinil estradiol i psihotropni oksazepam utječu na ponašanje i seksualne karakteristike muških riba.<sup>24,34</sup>

**Tablica 2.** Toksični i ekološki učinci farmaceutika na organizme<sup>24</sup>

Komponenta	Organizam	Vrsta rizika (razina izloženosti)
Diklofenak	Ribe	Tubularna nekroza bubrega i fuzija živaca u crijevima pri 1 $\mu\text{g/L}$ (0, 0,5, 1, 5 i 25 $\mu\text{g/L}$ ) Pojava bubrežnih cista pri 5 $\mu\text{g/L}$ (1-500 $\mu\text{g/L}$ )
Ibuprofen	Alge	Proteomskom analizom utvrđeni utjecaji na kloroplaste (92 i 920 ng/L)
Karbamazepin	Alge	Proteomskom analizom utvrđeni utjecaji na kloroplaste (150 mg/L)
Sulfametoksazol	Alge	Kronični, toksični utjecaj na fotosintetski aparat (0-2500 $\mu\text{g/L}$ )
17 $\alpha$ -etinil estradiol	Ribe	Ekspresija regulatornog moždanog i aktornog steroidogenog proteina srži bubrega i citokrom P-450 posredovanog cijepanja bočnog lanca kolesterola (5-50 ng/L)

Koliko su veliki razmjeri prilikom dospjeća farmaceutika u okoliš, najbolje se može opisati na primjeru utjecaja diklofenaka, nesteroidnog protuupalnog lijeka poznatijeg kao voltaren. Naime, u Indiji je 90-ih godina prošlog stoljeća skoro došlo do izumiranja nekoliko vrsta supova koji su se hranili uginulim ostacima stoke, a koja je prethodno bila tretirana diklofenakom. S obzirom na to da se u uginulim ostacima stoke diklofenak nalazio u još uvijek značajnim koncentracijama, u doticaju sa supovima izazvao je zatajenje bubrega, čime se populacija supova tijekom deset godina smanjila za čak 95 %.<sup>34</sup>

Stručnjaci vjeruju da su za sada koncentracije farmaceutika u vodama za piće ispod granica opasnosti i da ne utječu na ljudsko zdravlje. Na ljudsko zdravlje utjecaj može imati

pojava bakterijske rezistentnosti, odnosno otpora antibiotika da učinkovito kontrolira i inhibira rast bakterija, a koja se javlja pri konstantnom izlaganju bakterija niskim koncentracijama antibiotika koji u okoliš ulaze iz različitih izvora, kao što je opisano u **Poglavlju 2.2.** Korištenjem antibiotika, bakterije sa stečenom antibiotskom rezistencijom imaju veće šanse za preživljavanje u odnosu na osjetljivije bakterije. Sadašnja visoka razina rezistencije na antibiotike posljedica je prekomjerne upotrebe i zlouporabe antibiotika te je tako više od 70 % bakterijskih sojeva neosjetljivo na barem jedan antibiotik, a mnogi od njih pokazuju i višestruku rezistentnost. Najviše rezistentnosti je stvoreno prema penicilinima, posebice ampicilinu, potom tetraciklinima i makrolidima poput eritromicina.<sup>9,17,34</sup>

Osim rezistentnosti, drugi problem koji uzrokuje prisutnost antibiotika u vodi jesu kemijske reakcije koje se mogu odvijati sa sredstvima za obradu voda, a najčešće su to reakcije s klorom koji se dodaje otpadnoj ili pitkoj vodi radi uklanjanja štetnih ili patogenih bakterija. U reakciji s klorom, antibiotici se u vodi pregrađuju u druge kemijske tvorbe koje mogu biti mnogo toksičnije od početnog farmaceutskog spoja.<sup>9</sup>

### **2.3. Mogući procesi obrade otpadnih voda onečišćenih farmaceutskim spojevima**

Najčešći način obrade otpadnih voda onečišćenih farmaceutskim spojevima jesu konvencionalni biološki postupci. Međutim, često je uklanjanje farmaceutskih spojeva tijekom uobičajenih obrada nepotpuno te su tako farmaceutici pronađeni u efluentima obrađenih otpadnih voda u koncentracijama između nekoliko ng/L i µg/L. Studije su pokazale kako je učinkovitost uklanjanja karbamazepina konvencionalnim biološkim postupcima manja od 16 %, klofibrične kiseline manja od 35 %, a učinkovitost uklanjanja diklofenaka je između 3 i 70 %. Takvi nalazi upućuju na nužno poboljšanje postojećih bioloških postupaka obrade otpadnih voda kako bi se spriječio ulazak farmaceutika i njihovih metabolita u okoliš. Jedna od opcija za unaprjeđenje je zamjena suspendiranog aktivnog mulja s biofilm reaktorom s pokretnom podlogom (eng. *Moving Bed Biofilm Reactor*, MBBR) gdje biomasa raste na posebno dizajniranim nosačima koji se slobodno kreću unutar aerobnog reaktora, osiguravajući tako mnogo veću površinu na kojoj biofilm može rasti. Daljnje poboljšanje biološke obrade otpadnih voda može se postići usvajanjem novih tehnologija koje su učinkovitije i zahtijevaju manje vremena, ali je njihova šira upotreba ograničena zbog viših troškova korištenja. Među najučinkovitijim procesima za uklanjanje farmaceutskih spojeva

smatraju se napredni oksidacijski procesi (eng. *Advanced oxidation processes*, AOPs), kao i membranski procesi poput reverzne osmoze i nanofiltracije.<sup>7,35</sup>

Kako bi se farmaceutici u potpunosti uklonili, najbolja je primjena kombinacije jednog ili više konvencionalnih/naprednih tretmana, a takva potreba proizlazi iz činjenice da niti jedna tehnologija, ukoliko se primijeni sama, ne može ukloniti sve prisutne spojeve. Primjena više tehnologija započinje uobičajenim korakom filtriranja gdje se uklanjaju prisutne krute tvari, potom se otpadna voda biološki obrađuje, a aktivni mulj zaostao nakon biološke obrade se zbrinjava spaljivanjem. Zaostala biološki obrađena voda se pritom šalje na daljnju obradu naprednim tehnologijama kako bi se u potpunosti uklonile sve prisutne, niskomolekularne onečišćujuće tvari.<sup>36</sup>

Učinkovitost uklanjanja farmaceutskih spojeva ovisi o složenim fizikalno-kemijskim svojstvima prisutnih otpadnih komponenata, klimatskim uvjetima (npr. temperatura i intenzitet Sunčevog zračenja), vrsti obrade, uvjetima obrade (temperatura rada, SRT, HRT, redoks uvjeti), kao i o starosti korištenog aktivnog mulja. Zbog različitih čimbenika koji utječu na uklanjanje farmaceutika, učinkovitost njihova uklanjanja se znatno može razlikovati od postrojenja do postrojenja te unutar istog postrojenja u različitim vremenskim periodima.<sup>37</sup>

### 2.3.1. Napredni oksidacijski procesi

Napredni oksidacijski procesi su po prvi puta primijenjeni 80-ih godina prošlog stoljeća tijekom obrade vode za piće, a posljednjih godina se sve više proučava mogućnost njihove primjene za obradu različitih otpadnih voda.<sup>38</sup> Definiraju se kao procesi u kojima pod utjecajem kemijske, električne energije ili energije zračenja nastaju vrlo reaktivni hidroksilni radikali ( $OH^\cdot$ ) u dovoljnoj količini da oksidiraju većinu kompleksnih spojeva prisutnih u otpadnoj vodi pri uvjetima atmosferskog tlaka i temperature. U usporedbi s ostalim oksidansima (**Tablica 3.**), hidroksilni radikali su čestice s vrlo visokim oksidacijskim potencijalom koje brzo i neselektivno reagiraju s većinom organskih onečišćenja prisutnih u otpadnoj vodi.<sup>35,39,40</sup>

**Tablica 3.** Oksidacijski potencijali različitih oksidansa korištenih u obradi otpadnih voda<sup>35</sup>

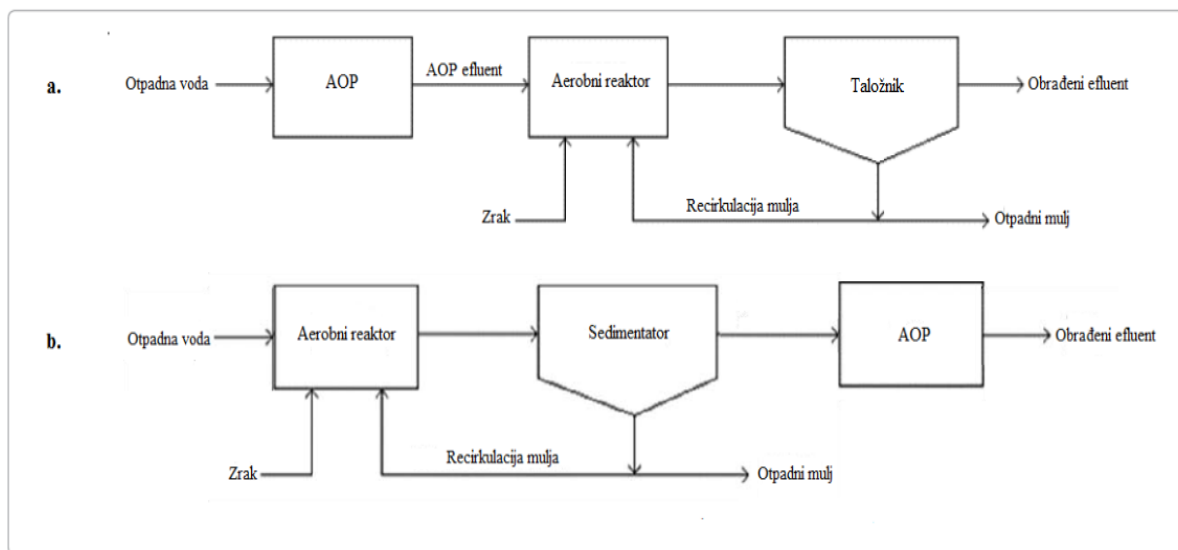
Oksidacijsko sredstvo	Kemijski simbol	Oksidacijski potencijal (V)
Fluor	F <sub>2</sub>	3,03
Hidroksilni radikal	$\cdot\text{OH}$	2,80
Atom kisika	O	2,42
Ozon	O <sub>3</sub>	2,07
Vodikov peroksid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,78
Perhidroksilni radikal	$\cdot\text{OOH}$	1,70
Permanganat	MnO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,68
Hipobromna kiselina	HbrO	1,59
Klorov dioksid	ClO <sub>2</sub>	1,57
Hipoklorna kiselina	HclO	1,49
Klor	Cl <sub>2</sub>	1,36

Napredni oksidacijski procesi se s obzirom na način stvaranja hidroksilnih radikala mogu podijeliti na kemijske, fotokemijske, fotokatalitičke, mehaničke i električne procese. Kemijski procesi uključuju upotrebu ozona i/ili vodikovog peroksida, pa čak i uz prisutnost nekih katalizatora (Fentonov proces). Kod fotokatalitičkih i fotokemijskih procesa hidroksilni radikali nastaju pod utjecajem UV zračenja uz prisutnost katalizatora (TiO<sub>2</sub>, ZnO) ili oksidansa (vodikov peroksid i/ili ozon).<sup>40</sup> Učinkovitost razgradnje tijekom primjene naprednih oksidacijskih procesa ovisi o složenosti sustava koji zahtijeva obradu, vrsti i koncentraciji onečišćujuće tvari, kao i vrsti i koncentraciji oksidansa i katalizatora te konfiguraciji reaktora.<sup>40</sup> U radu je otopina azitromicina masene koncentracije od 10 mg/L obrađena s dva napredna oksidacijska procesa, direktnom UV-fotolizom i fotokatalizom s TiO<sub>2</sub>.

Zbog korištenja skupih reaktanata kao što su vodikov peroksid i ozon, napredni oksidacijski procesi se nebi trebali koristiti kao potpuna zamjena biološkim procesima obrade, već kao faza predobrade ili postobrade nakon biološkog (sekundarnog) pročišćavanja otpadnih voda (**Slika 4.**). Primjena AOP-a u fazi predobrade za cilj ima unaprijediti biološke procese obrade, dok je primjena naprednih oksidacijskih procesa u fazi postobrade nakon



bioloških procesa usmjerena na uklanjanje onečišćujućih tvari koje se nisu u potpunosti uklonile, odnosno razgradile biološkim tretmanom obrade.<sup>42,43</sup>



**Slika 4.** AOP kao predobrada (a.) i postobrada (b.) biološkog sustava<sup>43</sup>

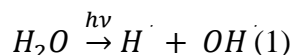
### 2.3.1.1. UV zračenje

UV zračenje je osnova nekoliko kemijskih oksidacijskih procesa u kojima djelovanjem ultraljubičastih (UV) zraka nastaju slobodni radikali koji omogućuju visok stupanj razgradnje onečišćujućih tvari. UV zračenje može na organsku tvar prisutnu u vodi djelovati na dva načina, direktnom ili indirektnom fotolizom (uključuje oksidaciju slobodnim radikalima). UV zračenje je elektromagnetsko zračenje valnih duljina od približno 100 do 400 nm, s pripadajućim energijama zračenja koje sežu od 299 do 1196 kJ/mol (**Tablica 4.**)<sup>44,45</sup>

**Tablica 4.** Tip UV zračenja s pripadajućim valnim duljinama ( $\lambda$ ) i energijama ( $E$ )<sup>45</sup>

	$\lambda$ , nm	$E$ , kJ/mol
UV-A	400-315	299-380
UV-B	315-280	380-427
UV-C	280-200	427-598
VUV	200-100	598-1196

U procesima obrade voda direktnom UV-fotolizom, najčešće se koristi UV-C zračenje jer prisutne onečišćujuće tvari, otopljeni organski i anorganski spojevi, apsorbiraju u tom dijelu spektra (200-280 nm). Kod UV-C zračenja se najviše primjenjuje valna duljina od 254 nm koja se postiže niskotlačnom živinom lampom. VUV, vakuumsko UV područje (100-200 nm) je od posebnog značaja u primjeni naprednih oksidacijskih procesa za obradu voda. Apsorpcijom zračenja iz tog dijela spektra iz vode nastaju reaktivne, radikalske vrste koje zatim dalje mogu sudjelovati u razgradnji otopljenih tvari u vodi:

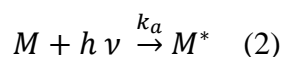


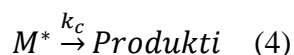
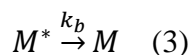
Organski spojevi također apsorbiraju u VUV području, ali u vodenim otopinama glavčinu VUV zračenje apsorbira voda zbog njene velike molarne koncentracije (55,5 mol/L) koja je milijun puta viša od tipičnih koncentracija prisutnih otopljenih onečišćujućih tvari.<sup>45</sup>

Danas se UV zračenje gotovo uvijek kombinira s nizom drugih naprednih oksidacijskih procesa, a vodena otopina se mora tretirati tako da transmisija UV svjetlosti bude što veća, što je naročito važno kod provođenja UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> procesa gdje zamućenje ima direktan utjecaj na količinu hidrosilnih radikala dobivenih iz vodikovog peroksida. Također, vodena otopina koja se obrađuje UV zračenjem ne smije sadržavati uljaste komponente i ione teških metala. Troškovi provođenja ovog procesa su relativno visoki zbog cijena UV lampi i električne energije potrebne za njihov rad.<sup>44</sup>

#### 2.3.1.1.1. Direktna UV-fotoliza

Kod direktne UV-fotolize dolazi do pobuđivanja molekula UV zračenjem, pri čemu one prelaze iz osnovnog (M) u pobuđeno stanje (M\*), odnosno stanje više energije čime nastaju čestice s niskim oksidacijskim potencijalom. Razlika energija između osnovnog i pobuđenog stanja jednaka je količini apsorbirane energije  $h\nu$ , gdje  $h$  označava Planckovu konstantu, a  $\nu$  frekvenciju apsorbiranog zračenja. Molekule se u pobuđenom stanju zadržavaju vrlo kratko, između  $10^{-9}$  i  $10^{-8}$  s, nakon čega se mogu ili vratiti u osnovno stanje jednim od mehanizama (fosforescencija ili fluorescencija) ili se dalje mogu razlagati dajući pritom različite molekule. Mehanizam direktne fotolize se lako opisuje sljedećim jednadžbama:<sup>44</sup>





Za razliku od direktne fotolize, indirektna fotoliza uključuje prethodne reakcije u kojima nastaju *OH* radikali iz odgovarajućih oksidansa. Direktna fotoliza je u pravilu sporija, reakcije *OH* radikala su znatno brže, ali dodatak oksidansa povećava troškove procesa. Direktna fotoliza može biti djelotvorna u slučaju kada su prisutne onečišćujuće tvari jaki apsorberi UV zračenja.<sup>45</sup>

### 2.3.1.2. Fotokataliza s TiO<sub>2</sub>

Fotokatalitički procesi, kao vrsta naprednih oksidacijskih procesa, pobuđuju stalan interes znanstvene i stručne javnosti te se može očekivati da će u skoroj budućnosti imati sve važniju ulogu u ukupnoj strategiji zaštite okoliša. Uglavnom se proučava njezina primjena u vezi s obradom otpadnih voda, ali i onečišćenog zraka.

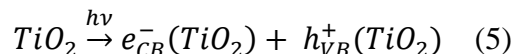
Pojam *fotokatalizator* označava tvar koja, nakon apsorpcije kvanta svjetlosti, u pobuđenom stanju sudjeluju u kemijskim pretvorbama reaktanata, pri čemu nastaju reakcijski međuprodukti. Prema tome, fotokataliza je promjena u kinetici kemijske reakcije, a koja je potaknuta djelovanjem svjetla u kontaktu s aktivnim tvarima nazvanim fotokatalizatori. Nakon svakog ciklusa dolazi do regeneracije fotokatalizatora, a najčešće korišteni fotokatalizator je titanijev dioksid (TiO<sub>2</sub>) u anataznom obliku.<sup>46</sup>

TiO<sub>2</sub> je dostupan, stabilan i povoljan fotokatalizator kojeg odlikuje sposobnost apsorpcije UV zračenja valnih duljina manjih od 385 nm. Tehnologije bazirane na UV/TiO<sub>2</sub> imaju značajnu ulogu u procesima pročišćavanja voda zbog toga što TiO<sub>2</sub> nije toksičan i nije štetan za okoliš, a upotreba katalizatora umanjuje potrebu za korištenjem drugih kemikalija (kemijskih oksidansa).<sup>47</sup>

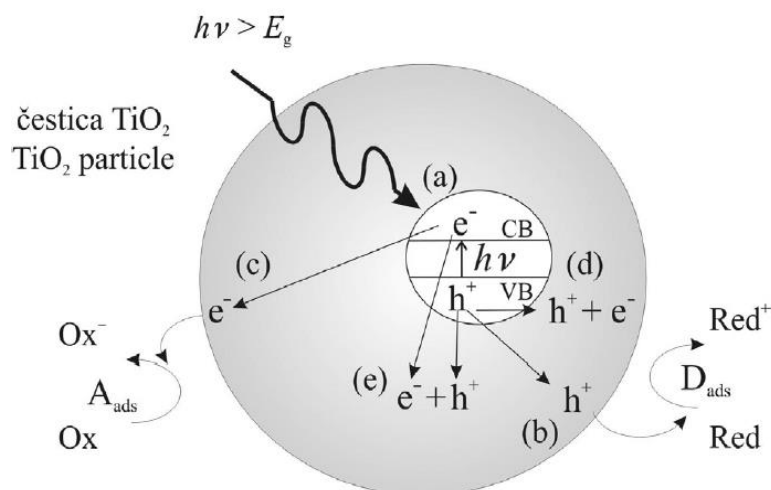
Općenito se TiO<sub>2</sub> kao fotokatalizator može koristiti u dva oblika: u obliku suspendiranih nanočestica u tekućem mediju ili u obliku tankog filma kojeg čine imobilizirane nanočestice na različitim supstratima. Glavni nedostatak primjene fotokatalizatora u obliku suspenzije je teško razdvajanje TiO<sub>2</sub> nakon tretmana što povećava troškove i stvara sekundarni otpad. Međutim, taj problem bi se mogao izbjeći imobilizacijom

TiO<sub>2</sub> u obliku filma na različitim supstratima. Primijenjene su brojne metode za proizvodnju TiO<sub>2</sub> filmova uključujući kemijsku depoziciju pare, termičku obradu, elektroforetsku depoziciju i sol-gel proces. Među nabrojanim metoda, kao jedan od najvažnijih ističe se sol-gel proces pripreme tankog premaza oksida. Prednosti sol-gel procesa su: dobra homogenost, niska procesna temperatura, veliki površinski premazi, niska cijena opreme i dobra fotokatalitička svojstva.<sup>48</sup> U radu je tanak film TiO<sub>2</sub> fotokatalizatora pripremljen sol-gel procesom.

Heterogena UV fotokataliza zasniva se na fotokatalitičkim svojstvima poluvodičkog materijala, TiO<sub>2</sub>, koji apsorbira svjetlo u ultraljubičastom dijelu spektra. Elektronsku strukturu poluvodiča čine popunjena valentna vrpca (eng. *Valence Bond*, VB) i nepopunjena vodljiva vrpca (eng. *Conduction Bond*, CB). Te su dvije vrpce odijeljene „*energijskim procjepom*“, tzv. zabranjenom zonom,  $E_g$ . Energija potrebna za pobuđivanje elektrona iz valentne u vodljivu vrpcu ovisi o širini zabranjene zone. Kada se površina poluvodičkog katalizatora TiO<sub>2</sub> izloži djelovanje fotona čija je energija jednaka ili veća od energije zabranjene zone (3,2 eV za anatazni oblik TiO<sub>2</sub>), dolazi do prijelaza elektrona iz valentne ( $e_{CB}^-$ ) u vodljivu ( $h_{VB}^+$ ) vrpcu, pri čemu u masi poluvodiča nastaju parovi elektron/šupljina:

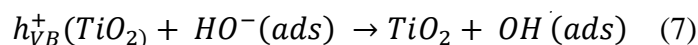
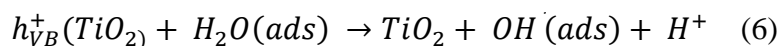


Pobuđeni elektroni u vodljivoj vrpci i zaostale šupljine u valentnoj vrpci, odnosno parovi elektron/šupljina, mogu reagirati s elektron-donorima i elektron-akceptorima adsorbiranim na površini poluvodiča ili unutar elektrokemijskog dvosloja nabijenih čestica ili pak može doći do rekombinacije i oslobađanja energije (**Slika 5.**)<sup>44,46,47</sup>

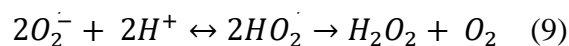
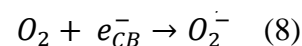


**Slika 5.** Glavni procesi u čestici poluvodiča TiO<sub>2</sub>: (a) nastajanje para elektron/šupljina, (b) oksidacija adsorbirane molekule D, (c) redukcija adsorbirane molekule A, (d) rekombinacija na površini čestice, (e) rekombinacija u unutrašnjosti čestice<sup>46</sup>

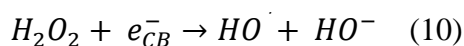
Dva su osnovna načina nastajanja hidroksilnih radikala: reakcijom šupljine s adsorbiranom molekulom vode ili s hidroksilnim ionima na površini TiO<sub>2</sub>:



Elektron se može premjestiti do otopljenog kisika pa nastaje superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ) radikal anion. Superoksid radikal anion i njegov protonirani oblik naknadno reagiraju dajući vodikov peroksid ili peroksid anion:



Fotokatalitičkom redukcijom vodikovog peroksida s elektronima vodljive vrpce nastaje hidroksilni radikal:



Učinkovitost fotokatalitičkog procesa se može poboljšati dodatkom vodikovog peroksida koji, s druge strane, može reagirati sa šupljinom i na taj način utjecati na smanjenje učinkovitosti procesa.<sup>46,49</sup>

## **2.4. Toksičnost farmaceutika u okolišu**

Vodeni ekosustav je među svim ekosustavima najizloženiji djelovanju različitih ljudskih aktivnosti i širok je popis onečišćujućih tvari koje na njega mogu negativno utjecati. Toksičnost tih tvari je slabo poznata, a posebice toksičnost tzv. „novih onečišćujućih tvari“.<sup>48</sup>

U usporedbi s konvencionalnim onečišćujućim tvarima poput pesticida, ugljikovodika i metala, farmaceutici se, kao dio efluenta nakon obrade otpadnih voda, kontinuirano ispuštaju u okoliš, a posebice u površinske vode. Njihovo ispuštanje posljedica je većinom neadekvatne obrade otpadnih voda koja nije u mogućnosti ukloniti prisutne niskomolekularne organske spojeve kao što su farmaceutici. Budući da su farmaceutici dizajnirani tako da postignu visoki stupanj interakcije s biološkim sustavom i da se suprotstave inaktivaciji prije no što postignu željeni terapijski učinak, posljedice onečišćenja vodenog ekosustava farmaceuticima mogu biti drastične i dugoročne te tako uzrokovati narušavanje prirodneravnoteže, a koja može ugroziti ne samo biocenotički sustav i strukturu, već i funkcionalnost čitavog ekosustava.<sup>50,51</sup>

Toksični učinci farmaceutika mogu biti letalni, odnosno smrtonosni i subletalni, koji obuhvaćaju biokemijske ili fiziološke promjene te promjene u ponašanju, razmnožavanju, rastu ili razvoju. Djelovanje farmaceutika na izložene organizme ovisi o njihovoj koncentraciji i/ili trajanju izloženosti.

Iz prethodno navedenih razloga, vrlo je bitno pored fizikalno-kemijskih pokazatelja za ocjenjivanje kakvoće efluenta, odrediti i biološke parametre kakvoće, a u prvom redu je to stupanj toksičnosti otpadne vode. Ekotoksičnost predstavlja relativno novi parametar u praktičnoj primjeni, ali i sa stajališta primjenjivosti zakonske legislative.<sup>51</sup>

### **2.4.1. Provedba biotestova pri ispitivanju toksičnosti farmaceutika u okolišu**

Provedbe kemijskih analiza vode za piće, otpadnih voda i prirodnih vodenih staništa nisu dovoljne za određivanje štetnih učinaka svih postojećih kemikalija na žive organizme. Jedna od alternativa kemijskim analizama jesu biotestovi koji se koriste za određivanje

toksičnosti potencijalnih onečišćujućih tvari prisutnih u vodenim ekosustavima, podzemnim voda, otpadnim vodama te vodama za ljudsku potrošnju.<sup>52</sup>

Biotestovi (eng. *Bioassays*) se definiraju kao eksperimentalni postupci određivanja koncentracije i/ili biološke aktivnosti određene toksične supstance putem mjerenja njezinog učinka na izabrane biološke modele, odnosno test organizme.<sup>48</sup> Test organizmi su bioindikatori na kojima se provodi djelovanje različitih potencijalno toksičnih tvari, a najčešći oblik ispitivanja toksičnosti je mortalitet. Izabrani test organizmi moraju se lako laboratorijski uzgajati i održavati, a njihov izbor ovisi o svrsi testa, specifičnostima ekosustava, karakteristikama otpadne vode i recipijenta, kao i o mogućnostima laboratorija (**Tablica 5.**).

**Tablica 5.** Pregled standardnih vrsta bioindikatora korištenih u biotestovima<sup>51</sup>

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

Osnovu biotesta čini praćenje utjecaja koncentracijskog gradijenta otpadne vode u kontroliranim uvjetima, pri čemu je jedina promjenjiva veličina upravo koncentracija otpadne

vode. Svaki biotest treba biti pouzdan s mogućnošću reprodukcije dobivenih rezultata. Za tu svrhu je potrebno provesti pozitivne i negativne kontrole. Pozitivne kontrole koriste poznatu koncentraciju nekog toksičnog spoja, a kada se primjenjuju trebaju rezultirati predvidljivim odgovorom s niskom varijabilnošću. Provođenje negativnih kontrola isključuje primjenu toksičnih tvari i nikakav učinak ne bi trebao biti vidljiv u krajnjem odgovoru prilikom provođenja testa.<sup>51,52</sup>

Rezultat biotesta mora biti neovisan o kemijsko-fizikalnim okolišnim čimbenicima kao što su temperatura, pH-vrijednost i ostali netoksični sastojci u analiziranim uzorcima, poput hranjivih tvari. Također, provođenje biotestova mora biti isplativo i u uvjetima početne investicije i tijekom njegove kontinuirane upotrebe. To je osobito važno za zemlje u razvoju gdje je financiranje skupih instrumenata i troškova rada ograničeno.<sup>52</sup>

Postoje dvije vrste testova toksičnosti, akutni i kronični. Akutnim testovima se određuje preživljavanje testiranih organizama unutar 24 do 96 h, dok se kroničnim testovima određuje preživljavanje testiranih organizama koji su kontaminirani ispitivanim uzorkom, kao i utjecaj tog uzorka na ponašanje, rast, reprodukciju i sličnu, a traje minimalno 7 dana.<sup>53</sup>

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

Do sada su brojni znanstvenici istraživali razvoj brzih i osjetljivih biotestova za praćenje i procjenu ispuštanja toksičnih materijala u okoliš. Tradicionalno su se za određivanje toksičnosti tvari u vodi koristili rakovi, ribe i alge. Međutim, ispitivanja na temelju tih organizama zahtijevaju dugo vrijeme izloženosti i veliki broj uzoraka. Iz tog razloga su se popularizirali testovi za određivanje toksičnosti koji se temelje na mikroorganizmima, posebice na bakterijama, a koji su brzi, ekonomični i reproducibilni.

Bakterijskim biotestovima se prati učinak ispitane tvari na rast bakterijske populacije, potrošnju supstrata, disanje, ATP luminiscenciju i inhibiciju bioluminiscencije. Test organizmi koji se najčešće koriste za test inhibicije bioluminiscencije su *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi* i *Pseudomonas fluorescens*, dok su test organizmi korišteni u ispitivanju metaboličke inhibicije *Escherichia coli* i *Pseudomonas putida*.<sup>54</sup>

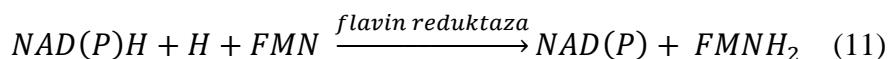
Mnoge studije su pokazale kako je jedan od najosjetljivijih testova za određivanje toksičnosti upravo bioluminiscentni test s Gram negativnim bakterijama *Vibrio fischeri*, koji



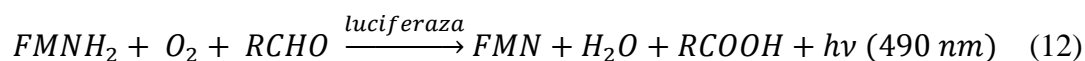
je međunarodno priznat i standardiziran kao ISO (2007) te ima široku primjenjivost u određivanju akutne toksičnosti. Osim visoke osjetljivosti, test je reproducibilan, brz i jednostavan te pouzdano mjeri toksičnost kemikalija i otpadnih voda. Na ovom bakterijskom soju se temelji nekoliko komercijalnih test setova poput Microtoxa, LUMISToxa i ToxAlerta.<sup>54,55,56</sup>

*Vibrio fischeri* su Gram negativne bakterije, pripadnice roda *Vibrionaceae* koje većinom obitavaju u morskom okolišu kao slobodno živeće jedinke ili povezane s nekim drugim organizmima poput morskih riba ili liganja.<sup>57,58</sup> To su bioluminiscentne bakterije čija je proizvodnja svjetlosti izravno proporcionalna metaboličkoj aktivnosti bakterijske populacije i svaka inhibicija enzimske aktivnosti uzrokuje odgovarajuće smanjenje bioluminiscencije.<sup>54</sup>

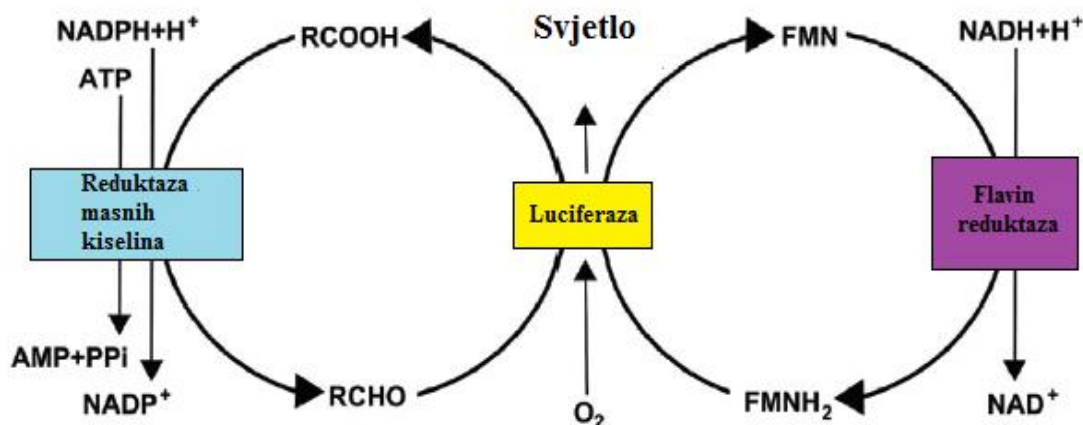
U reakciji bakterijske luminiscencije ključnu ulogu ima FMNH<sub>2</sub>, reducirani flavin mononukleotid. U prisutnosti enzima flavin reduktaze i reduciranog oblika nikotinamid adenina dinukleotida (NAD(P)H), flavin mononukleotid (FMN) reducira u FMNH<sub>2</sub>:



Potom se FMNH<sub>2</sub> pomoću enzima luciferaze i uz prisustvo dugolančanog aldehida (tetradekanala) oksidira u FMN, a kao nusprodukt reakcije nastaje kvant svjetlosti:



Reakcija bioluminiscencije *in vitro* rezultira emisijom plavo-zelenog svjetla s maksimalnim intenzitetom na 490 nm, a *in vivo* rezultira emisijom žutog svjetla s maksimalnim intenzitetom na 540 nm.<sup>54,58</sup> Na **Slici 6.** prikazan je prethodno opisan biokemijski mehanizam luminiscencije.

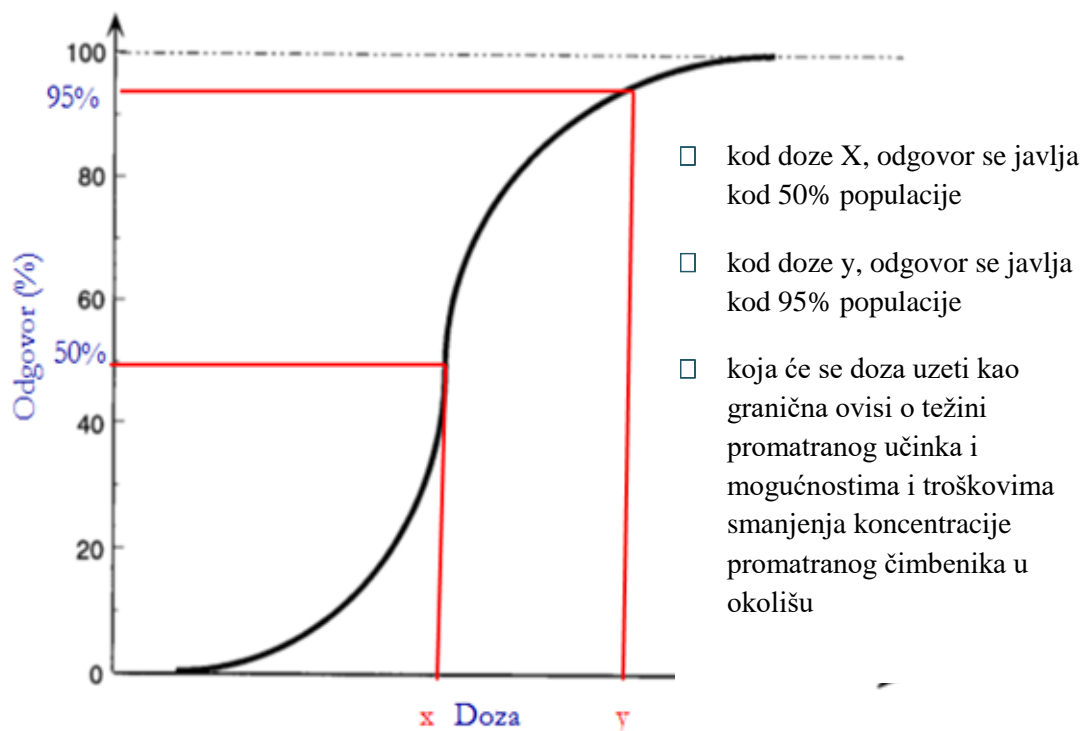


**Slika 6.** Biokemijski mehanizam luminiscencije<sup>59</sup>

U radu je konkretno za određivanje toksičnosti azitromicina nakon naprednih oksidacijskih procesa korištena bioluminiscentna DIN 38412-L-34 metoda koja se, s obzirom na vrijeme trajanja testa od 30 min, ubraja u testove kratkog trajanja i ima veliku prednost u odnosu na ostale „*short term*“ metode koje obično traju između 48 ili 96 h. U metodi se kao test organizmi koriste već opisane bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*, čijim je mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma, a koje je nastalo kao posljedica djelovanja toksičnih tvari.<sup>51</sup>

### 2.4.3. Grafički prikaz toksičnosti i definicije povezane s toksičnošću

U praksi većina biotestova slijedi sigmoidnu ovisnost između doze, odnosno koncentracije i odgovora. Kao što je vidljivo i na krivulji (**Slika 7.**), pri niskim koncentracijama nema vidljivog odgovora, ali povećanjem koncentracije dolazi prvo do sporijeg, a potom do bržeg rasta. Važan kriterij pri provođenju svakog biotesta je osjetljivost. Biotest mora dati mjerljiv rezultat pri niskim koncentracijama toksične tvari ili pri koncentracijama koje su niže od onih koje štetno djeluju na ljudsko zdravlje ili okoliš.<sup>52,53</sup>



**Slika 7.** Opći izgled krivulje toksičnosti<sup>53</sup>

Kod određivanja toksičnosti, prvo se mjeri početna luminiscencija bakterijske suspenzije da bi se kasnije pratilo kao otopina ispitivane potencijalno toksične tvari, odnosno otopina farmaceutika, djeluje na korištenu bakterijsku kulturu, a taj učinak možemo vidjeti u vrijednostima mjerene luminiscencije. Potom se nakon određivanja početne luminiscencije bakterijske suspenzije i luminiscencije nakon doticaja s otopinom farmaceutika, uz pomoć gotovih matematičkih izraza računa postotak inhibirane bakterijske kulture nakon određenog vremena. Na krivulji toksičnosti, postotak inhibirane kulture predstavlja os ordinatu, a logaritam koncentracije otopine farmaceutika predstavlja os apscisu. Iz grafa se kasnije mogu očitati vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  koje uzrokuju inhibiciju 20 %, odnosno 50 % ispitivane bakterijske kulture. Korištenjem  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  vrijednosti se lakše interpretiraju dobiveni rezultati i utjecaj uzorka na ispitivanu bakterijsku kulturu.<sup>60</sup>

Prikaz određivanih fizikalno-kemijskih veličina:

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

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

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

$fK$  – faktor korekcije

$$fK = l_tK/l_0K \quad (13)$$

$l_c$  – ispravljeni  $fK$

$$l_c = fK \times l_0 \quad (14)$$

% inhibirane tvari – postotak inhibicije luminiscencije nakon inkubacije u vremenu  $t$

$$\% \text{ inhib.}t. = (l_c - l_t) \times 100/l_c \quad (15)$$

GL vrijednost – faktor razrjeđenja kojim je postignut % inhibirane tvari < 20

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

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

## 2.5. Procjena rizika za okoliš

Procjena okolišnog utjecaja, odnosno rizika koji se javlja primjenom medicinskih i veterinarskih farmaceutika, zakonska je obveza koja se mora provoditi radi procjene i ograničavanja potencijalno štetnih učinaka farmaceutika na okoliš. Ocjena rizika za okoliš (eng. *Environmental Risk Assessment*, ERA) se u Europskoj uniji provodi u dvije faze.

Cilj prve, odnosno preliminarne faze ispitivanja jest identifikacija izloženosti okoliša farmaceuticima na temelju njihovog potencijala za bioakumulaciju i postojanost u okolišu. U svrhu toga potrebno je izračunati predviđenu koncentraciju lijeka u vodenom okolišu (eng. *Predicted Environmental Concentration*, PEC). Ako je PEC vrijednost za površinske vode jednaka ili iznad 0,01 µg/L, potrebno je provesti drugu fazu ispitivanja, a ako je pak PEC vrijednost manja od navedene koncentracije, pretpostavlja se da ispitivani lijek ne predstavlja rizik za okoliš.

Kada se preliminarним ispitivanjima utvrde specifični rizici određenog farmaceutika, tada se na temelju smjernica koje izdaje Europska agencija za lijekove (eng. *European Medicines Agency*, EMA) provodi druga faza ispitivanja. Testovi druge faze identificiraju

sudbinu lijekova u okolišu i njihove potencijalne učinke na reprezentativne organizme, a pritom je potrebno odrediti PEC/PNEC (eng. *Predicted No-Effect Concentration*, PNEC) odnos. Ukoliko je PEC/PNEC odnos veći od 1, vjerojatno će se pojaviti neprihvatljivi učinci na organizme.<sup>61</sup>

Ekperimentalne studije trebaju slijediti protokole koje propisuje Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD) ili Međunarodna organizacija za standardizaciju (eng. *International Organisation for Standardization*, ISO). Kod ocjene rizika skupljaju se i obrađuju svi dostupni podaci o fizikalno-kemijskim osobinama, primarnoj i sekundarnoj farmakodinamici, metabolizmu, toksikologiji, izlučivanju, razgradnji i postojanosti djelatne tvari i/ili određenog metabolita.

Svrha dobro provedene procjene rizika na okoliš jest utvrditi štetne utjecaje na okoliš, definirati mjere koje je potrebno provesti pri pohrani i zbrinjavanju farmaceutika, te podatke o lijeku upotpuniti s potrebnim podacima koji se odnose na zbrinjavanje neupotrjebljenog lijeka.<sup>62</sup>

## **2.6. Osvrt na zakonodavstvo u području zaštite okoliša**

Europska komisija je u kolovozu 2013. godine usvojila novu direktivu o prioritetnim tvarima (Direktiva 2013/39/EU), a koja mijenja i dopunjava Okvirnu direktivu o vodama (ODV) 2000/60/EZ i Direktivu 2008/105/EZ. Strategija sprječava onečišćenje voda uključuje listu od ukupno 45 prioritetne tvari ili grupe tvari koje predstavljaju rizik za okoliš. Neke tvari s liste su zbog postojanosti u okolišu, bioakumulativnosti i toksičnosti (PBT svojstva) dodatno označene kao prioritetne opasne tvari. ODV propisuje reviziju liste prioritetnih tvari svake četiri godine, a novom direktivom bi emisije prioritetnih opasnih tvari u vodeni okoliš trebale biti obustavljene unutar sljedećih 20 godina.

Novom direktivom uvedena je i tzv „*watch* lista“ koja obuhvaća popis od najviše 10 tvari ili skupina tvari, a koje nisu bile uključene u sustavnom praćenju, tako da o njihovoj pojavi u vodnom okolišu nema puno podataka. Potrebno je ispitivanje tvari s ovog popisa u svakoj državi članici EU u razdoblju od najmanje jedne godine s dinamikom od najmanje jednom godišnje. Budući da onečišćenje vode i tla ostacima i razgradnim produktima

farmaceutskih spojeva predstavlja rastući problem, na „*watch* listi“ su se našla i tri farmaceutska spoja:  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2),  $17\beta$ -estradiol (E2) i diklofenak.<sup>63</sup>

### 2.6.1. Gospodarenje s farmaceutskim otpadom

U skladu sa zakonodavstvom EU, odbacivanje neiskorištenih lijekova putem kućanskog otpada zabranjeno je još od 1994. godine. Najučinkovitiji i ekološki najprihvatljiviji način zbrinjavanja farmaceutskog otpada jest putem spaljivanja. Ako se pak neiskorišteni farmaceutici zbrinjavaju odlaganjem na odlagalištima, postoji mogućnost pojavljivanja farmaceutskih aktivnih spojeva u procjednim vodama odlagališta nakon nekoliko godina. Ukoliko na odlagalištima nije razvijen sustav sakupljanja procjednih voda, one vrlo lako mogu prodrijeti u površinske ili podzemne vode te tako izravno ugroziti vodeni ekosustav.

Istraživanja su pokazala da ljudi najčešće ostatke farmaceutika i farmaceutike kojima je istekao rok valjanosti odbacuju putem odvoda. Takvi nalazi upućuju na uvođenje obvezne edukacije građana u svim zemljama o pravilnom načinu zbrinjavanja neiskorištenih farmaceutika i farmaceutika kojima je istekao rok valjanosti. Prestankom odbacivanja farmaceutika putem odvoda bi se u velikoj mjeri smanjilo farmaceutsko onečišćenje okoliša. U nekim zemljama vrlo uspješno funkcioniraju tzv. „*take-back*“ sistemi gdje se neiskorišteni lijekovi vraćaju u ljekarne koje se potom dalje brinu o njihovom zbrinjavanju.<sup>10</sup>

U Republici Hrvatskoj, prema Pravilniku o gospodarenju medicinskim otpadom, donesenom 8. svibnja 2015. godine, farmaceutski otpad čine svi lijekovi i tvari, uključujući i njihovu primarnu ambalažu, a koji su postali neupotrebljivi zbog isteka roka valjanosti, prolijevanja, rasipanja, pripremljeni, pa neupotrijebljeni ili se ne mogu upotrebljavati zbog drugih razloga. S obzirom na svojstva i način gospodarenja, farmaceutski otpad se svrstava u opasni medicinski otpad.

U skladu s Pravilnikom, ljekarne su dužne od građana preuzimati stare lijekove ili sličan farmaceutski otpad neovisno o njegovom podrijetlu, dok su veterinarske ljekarne i ambulante dužne od građana preuzimati stare veterinarske lijekove ili sličan farmaceutski otpad nastao pružanjem veterinarskih usluga u kućanstvima ili na poljoprivrednim gospodarstvima. Zbrinjavanje farmaceutskog otpada obavlja se u postrojenjima koja su ovlaštena za zbrinjavanje opasnog otpada postupkom spaljivanja, s time da obrađivač opasnog

medicinskog otpada mora novonastalom otpadu nakon obrade dodijeliti novi ključni broj u skladu s posebnim propisom te mu osigurati daljnju obradu.<sup>64,65</sup>

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

U **Tablici 6.** naveden je popis svih korištenih kemikalija prilikom provođenja analiza u svrhu određivanja toksičnosti otopine farmaceutika azitromicina.

**Tablica 6.** Popis korištenih kemikalija

KEMIKALIJE	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Agar	$C_{14}H_{24}O_9$	p.a.	Liofilchem, Italija
Cinkov sulfat heptahidrat	$ZnSO_4 \times 7H_2O$	p.a.	Lach-ner, Češka
D-glukoza	$C_{16}H_{12}O_6$	p.a.	Lach-ner, Češka
D(+)-rafinoza pentahidrat	$C_{18}H_{32}O_{16}$	99 %	Alfa Aesar, Njemačka
Glicerol	$C_3H_8O_3$	p.a.	Lach-ner, Češka
Kalcijev karbonat	$CaCO_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid	$CaCl_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev dihidrogen fosfat	$KH_2PO_4$	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kvašćev ekstrakt	$C_{19}H_{14}O_2$	p.a.	Biolife, Italija
Magnezijev sulfat	$MgSO_4$	p.a.	T.T.T., Hrvatska
Natrijev klorid	$NaCl$	p.a.	Lach-ner, Češka
Pepton	-	p.a.	Biolife, Italija

#### 3.1.2. Farmaceutik – azitromicin

U **Tablici 7.** navedeni su osnovni podaci o korištenom farmaceutiku azitromicinu.

**Tablica 7.** Podatci o korištenom farmaceutiku – azitromicinu

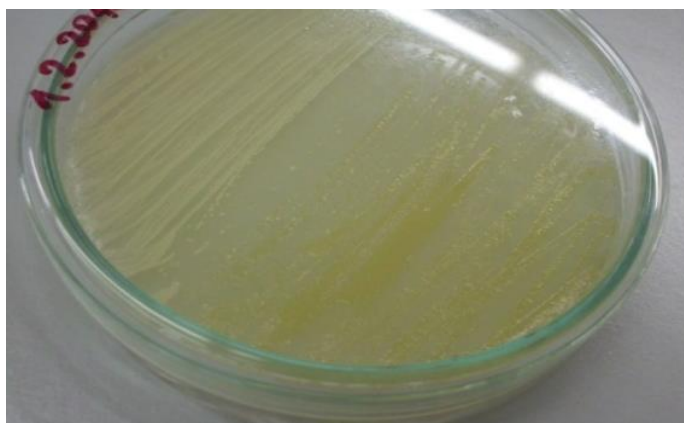
Farmaceutik	Molekulska formula	CAS broj	$M_w$ , g/mol	Čistoća	Proizvođač
Azitromicin	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	83905-01-5	748,98	$\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich



### 3.1.3. Djelatni mikroorganizmi – bakterijska kultura *Vibrio fischeri*

Kao djelatni mikroorganizam u postupku određivanja toksičnosti korištenjem standardne metode DIN 38412-L-34 korištena je bakterijska kultura *Vibrio fischeri*, čija su glavna obilježja opisana u **Poglavlju 2.4.2.**, a među kojima se najvažnijim svojstvom ističe sposobnost bioluminiscencije određenog intenziteta.

Kao hranjiva podloga za uzgoj bakterijske kulture korišten je kruti hranjivi agar. Kultura je održavana u Petrijevim zdjelicama te inkubirana u mračnom prostoru na temperaturi od 15 do 22 °C, uz temperaturni optimum od 18 °C. Već nakon 24 h inkubacije vidljive su izrasle kolonije svjetlo-žute boje koje emitiraju bioluminiscenciju određenog intenziteta. Optimalna luminiscencija i stabilnost bakterijske suspenzije postiže se nakon 48-72 h inkubacije (**Slika 8.**). Pri navedenim uvjetima, bakterijska kultura je upotrebljiva najmanje dva, a najviše devet dana od precjepljivanja.<sup>60</sup>



**Slika 8.** Hranjiva podloga s vidljivim žutim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* nakon 48 h inkubacije

### 3.1.4. Hranjiva podloga za uzgoj bakterijske kulture *Vibrio fischeri*

Potrebno je sve sastojke navedene u **Tablici 8.** otopiti u hladnoj deioniziranoj vodi u Erlenmeyer tikvici te tako ostaviti 15 min da agar nabubri i potom zagrijati do vrenja. Kako većina kalcijevog karbonata ostaje neotopljena, preporučuje se zagrijavanje izvoditi u vodenoj kupelji. Kada se sastojci u potpunosti otope do vrenja, zagrijati direktno na azbestnoj mrežici nad plamenikom. Čim dođe do vrenja treba odmah maknuti pripremljenu suspenziju s mrežice kako sadržaj suspenzije ne bi iskipio. Sterilizirati u autoklavu na 121 °C 15 min.

Nakon sterilizacije u autoklavu se ohlađena sterilna podloga na 45 °C izlije u Petrijeve zdjelice ili se pak može neizlivena čuvati u hladnjaku na 4 °C. Prije izlivanja u Petrijeve zdjelice podlogu je potrebno lagano homogenizirati, bez jakog miješanja, kako bi se kalcijev karbonat koji je na dnu ravnomjerno rasporedio u podlozi. Ukoliko se podloga naknadno otapa, najbolje ju je otapati u vodenoj kupelji koja uključuje stavljanje tikvice u posudu s vodom na plamenik, uz povremeno protresanje.<sup>60</sup>

**Tablica 8.** Sastav hranjive podloge

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

### 3.1.5. Otopine potrebne za određivanje toksičnosti

#### 3.1.5.1. Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izosmotska otopina koja se koristi za resuspendiranje bakterijske kulture, a u **Tablici 9.** prikazani su svi sastojci potrebni za njezinu pripremu. Sastojci bez šećera (D-glukoza i D(+)-rafinosa pentahidrat) otope se u destiliranoj vodi te se otopina prokuha, ohladi, profiltrira i sterilizira u autoklavu. Šećeri se u njoj otope neposredno prije upotrebe.

Tako pripremljena otopina se može čuvati u hladnjaku na temperaturi od 4 °C do 2 tjedna ili do pojave zamućenja. Ako se otopina želi duže očuvati, može se smrznuti u manjim bočicama od 100 mL. Unaprijed priređena i sterilizirana otopina mineralnih sastojaka i glicerola (bez šećera) može se čuvati neograničeno dugo.<sup>60</sup>

**Tablica 9.** Sastav otopine za resuspenziju

Sastojci	u 1000mL
NaCl	36 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
Glicerol	0,5 mL
D-glukoza	10 g
D(+)-rafinoza pentahidrat	10 g

### 3.1.5.2. Otopina referentnih tvari i radna otopina

Otopina referentnih tvari je radni standard za provjeru valjanosti bakterijske kulture. Standard koncentracija 25 mg/L priprema se tako da se točna odvaga ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O otopi u 100 mL redeionizirane vode .

Radna otopina (2 % NaCl) priprema se tako da se 20 g NaCl otopi u 1000 mL deionizirane vode te se sterilizira u autoklavu, a koristi se za pripremu niza razrjeđenja.

Vrlo je bitno da pH-vrijednost otopine za resuspenziju, otopine referentnih tvari i radne tvari bude između 6,8 i 7,2.<sup>60</sup>

## 3.2. Instrumenti za provedbu toksičnosti

Toksičnost otopine azitromicina nakon naprednih oksidacijskih procesa određivana je na mjernom instrumentu LUMISTox 300 s luminiscentnim bakterijama (**Slika 9.**).

Dr. Lange LUMISTox 300 je mjerni instrument koji je razvijen za mjerenje luminiscencije, odnosno jačine svjetlosti luminiscentnih bakterija. Pomoću njega je moguće odrediti akutnu i kroničnu toksičnost ispitivanih tvari. U kombinaciji s termostatiranim blokom LUMISTherm sukladan je tehničkim zahtjevima DIN 38412L34 i L341 te međunarodnom standardu ISO DIS 11348.

LUMISTox 300 objedinjuje računalnu tehnologiju s tehnologijom mjernih instrumenata (u ovom slučaju luminometrom). Baš poput računala, ima svoj vlastiti operativni

sustav s ugrađenom disketom na kojoj su pohranjeni svi podaci i programi potrebni za rad instrumenta. Uređaj bez diskete ne funkcioniра, a za budućа programska proširenja ili ažuriranja koriste se nove diskete.

LUMIStox 300 ima ugrađen fotometar i ustaljeni rad automatskog mjerenja i razvijanja podataka, čime je omogućeno prepoznavanje boje uzorka u testu s luminiscentnim bakterijama, a uzima u obzir i korekciju u slučaju rada s obojenom otopinom. Također, funkcija fotometra omogućuje unaprijed procijenjenu učinkovitost određenih boja na provođenje testa te se može koristiti za određivanje optičke gustoće bakterijskih suspenzija u svrhu procjene inhibicije rasta u luminiscentnom bakterijskom testu za kroničnu toksičnost, LUMIS 24 tox (LCK486). LUMIStox 300 ima automatski referentni upravljački sustav putem kojeg provjerava funkcioniranje čitavog mjernog sustava prije provođenja svakog luminiscentnog bakterijskog testa. Radna temperatura instrumenta je 15 °C ( $\pm 1$  °C).<sup>66</sup>



**Slika 9.** Instrument za provedbu toksičnosti LUMIStox 300 s termostatiranim blokom LUMIStherm

### **3.3. Radni postupci određivanja toksičnosti bakterijama *Vibrio fischeri***

#### **3.3.1. Sterilna tehnika rada**

Sterilna tehnika rada se primjenjuje u svrhu zaštite ljudi i radne okoline od korištenih mikroorganizama, kao i zbog zaštite ispitivanih uzoraka i pribora od potencijalne kontaminacije iz zraka. Sterilna tehnika rada podrazumijeva upaljeni plamenik s oksidirajućim plamenom te radnu površinu očišćenu etanolom. Korištena mikrobiološka eza sterilizira se prvospaljivanjem u unutrašnjem plamenu, a zatim žarenjem po cijeloj dužini u vanjskom dijelu plamena. Sav pribor se mora nalaziti u neposrednoj blizini plamenika te se sve radnje moraju odvijati relativno brzo kako bi mogućnost kontaminacije bila što manja. Potreban je veliki oprez tijekom rada kako se nešto nebi zapalilo budući da se radi u blizini plamenika.<sup>60</sup>

#### **3.3.2. Aktivacija liofiliziranih bakterija**

Korištenjem sterilne tehnike rada priprema se bakterijska suspenzija. U kivetu s liofiliziranim bakterijama netom izvađenu iz zamrzivača pipetira se dobivena otopina za reaktivaciju. Pripravljena suspenzija se dobro homogenizira na vorteksu i stavi na 15 min na termostat koji je prethodno namješten na radnu temperaturu od 15 °C. Nakon isteka 15 min provjerava se aktivnost bakterijske kulture mjerenjem relativne luminiscencije korištenjem programa LU na uređaju LUMISTox 300. Izmjerena luminiscencija mora biti veća od 1.000. Pritom se pripremljena suspenzija pažljivo izlije na svježju sterilnu čvrstu hranjivu podlogu na Petrijevoj zdjelici ili se također može prenijeti pomoću sterilne mikrobiološke eze te razvući po podlozi cik-cak pokretima.<sup>60</sup>

#### **3.3.3. Precjepljivanje bakterijske kulture**

Budući da test kivete s liofiliziranim bakterijama količinski ne zadovoljavaju potrebne analize, aktivirane liofilizirane bakterije se nakon 48 h inkubacije koriste za uzgoj svježje bakterijske kulture precjepljivanjem. Precjepljivanjem se bakterijska kultura prenosi iz Petrijeve zdjelice u kojoj je bakterijska kultura već uzgojena na drugu, čistu i sterilnu Petrijevu zdjelicu. Prvo se čista hranjiva podloga navlaži s nekoliko kapi otopine za resuspenziju, a koje je potrebno mikrobiološkom ezom razvući po podlozi cik-cak pokretima. Potom se mikrobiološkom ezom zahvati grudica čiste kulture povlačenjem po duljini oko

3 cm te se cik-cak pokretima razvuče po prethodno navlaženoj hranjivoj podlozi. Način održavanja bakterijske kulture u Petrijevim zdjelicama opisan je u **Poglavlju 3.1.3.**

### **3.3.4. Priprema bakterijske suspenzije**

Bakterijska suspenzija se priprema tako da se sterilnom tehnikom rada pomoću sterilne mikrobiološke eze pokupi malo kulture izrasle na hranjivoj podlozi te se stavi u epruvetu u kojoj je prethodno dodano oko 5 mL otopine za resuspenziju. Potrebno je dobro resuspendirati dodanu bakterijsku kulturu. Pripremljena gusta, odnosno zamučena bakterijska suspenzija se ostavi 30 min na termostatu na temperaturi od 15 °C. Nakon toga se kreće s radom i mjerenjem.<sup>60</sup>

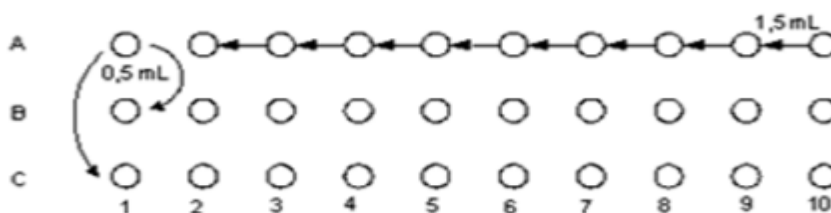
### **3.3.5. Provođenje testa toksičnosti**

Prije postavljanja svakog testa potrebno je provesti test valjanosti bakterijske kulture korištenjem SCR N funkcije. Za provođenje navedenog koristi se referentna i test kivetu. U referentnu kivetu se stavi 0,5 mL otopine 2 % NaCl-a i 0,5 mL inokuluma (suspenzije), a u test kivetu se stavi 0,5 mL otopine  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  i 0,5 mL inokuluma. Pripremljene kivete se ostave na termostatiranom bloku 15 min te se na uređaju pokrene SCR N program. Očita se vrijednost. Sadržaj test kivete u odnosu na sadržaj referentne kivete mora imati između 20 % i 80 % luminiscencije.

Nakon provjere valjanosti bakterijske kulture slijedi provjera aktivnosti bakterijske kulture. Na glavnom izborniku LUMISTox 300 uređaja odabere se program LU za mjerenje relativne luminiscencije. Da bi se započeo test, luminiscencije mora biti najmanje 1.000, a najviše 10.000.<sup>66</sup>

Prije samog mjerenja, potrebno je pripremiti i potrebna razrjeđenja ispitivane otopine farmaceutika slijedeći geometrijski niz razrjeđenja. U radu se ispitivana otopina azitromicina razrjeđivala konačno do 256 puta. Geometrijski niz se priprema tako da se u prvu kivetu stavi 2/3 kivete 2 % NaCl, a u zadnju 2/3 ispitivanog uzorka. 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 10.**).



**Slika 10.** Geometrijski niz

Ukoliko je izmjerena luminiscencija zadovoljavajuća (1.000-10.000), na luminometru se odabere funkcija EC, podese se uvjeti rada te se započne s mjerenjem. Nakon što se očita prva kiveta **B1** vraća se na termo blok, na luminometar se stavlja iduća po redu **C1**, a istovremeno se iz kivete **A1** u kivetu **B1** pipetira po 0,5 mL otopine. **C1** se vraća na termo blok, **B2** se stavlja na luminometar, a iz **A1** se također pipetira 0,5 mL otopine u kivetu **C1**. I tako sve do kraja mjerenja. Rezultati se očitavaju i odmah zapisuju. Nakon 30 min ponovno se izmjeri luminiscencija svih uzoraka, redom od **B1** i **C1** pa sve do postavljenog geometrijskog niza.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je već prethodno navedeno, u radu je ispitivana toksičnost vodene otopine azitromicina masene koncentracije 10 mg/L nakon provedbe dvije vrste naprednih oksidacijskih procesa, direktne UV-fotolize i fotokatalize s  $\text{TiO}_2$ . Direktna UV-fotoliza i fotokataliza s  $\text{TiO}_2$  su korištene uz UV-A<sub>365</sub> i UV-C<sub>254</sub> tipove zračenja, a sveukupno su u određenim vremenskim intervalima analizirana četiri uzorka (A1, A2, A3 i A4). Katalizator  $\text{TiO}_2$  je korišten u obliku tankih folija kako bi se izbjegle poteškoće prilikom njegova odvajanja i filtriranja ukoliko bi se koristio u obliku suspenzije. Razlog zbog kojeg se u provedbu eksperimenta krenulo s otopinom azitromicina od 10 mg/L jest zbog pretpostavke da je azitromicin upravo u toj koncentraciji prisutan u efluentima nakon obrade otpadnih voda konvencionalnim metodama. Zbog detekcije farmaceutika u izlaznim strujama postrojenja za obradu otpadnih voda, vrlo je bitno pronaći učinkovite metode koje će utjecati na cjelovito uklanjanje farmaceutika iz otpadnih voda, čime će se spriječiti njihov ulazak u okoliš i potencijalni utjecaj na izložene organizme i ljudsko zdravlje.

Jedna od mogućnosti potpunog uklanjanja farmaceutika tijekom obrade otpadnih voda je primjena naprednih oksidacijskih procesa. Budući da je provedba takvih procesa financijski zahtjevna, njihova samostalna primjena nije ekonomski isplativa, već je potrebno napredne oksidacijske procese upotrijebiti kao metodu predobrade, odnosno postobrade otpadne vode prije ili nakon primjene uobičajenih metoda obrade.

U istraživanju koje su proveli Čizmić i sur<sup>48</sup>, dvije vodene otopine azitromicina masenih koncentracija od 1 i 10 mg/L podvrgnute su fotolitičkoj i fotokatalitičkoj razgradnji s  $\text{TiO}_2$  primjenom dvije vrste UV zračenja pri 185/254 (UV-C) i 365 nm (UV-A). Kod fotolitičke razgradnje se primjenom UV-A zračenja otopina azitromicina masene koncentracije od 1 mg/L vrlo sporo razgrađivala, dok se ona od 10 mg/L uopće nije razgradila. Primjena UV-C zračenja uzrokovala je razgradnju pri obje ispitivane koncentracije. Kod fotokatalitičke razgradnje je u svim eksperimentima, gdje je koncentracija azitromicina iznosila 10 mg/L, učinkovitost razgradnje bila niža od eksperimenata gdje je koncentracija azitromicina iznosila 1 mg/L. Primjenom UV-C zračenja azitromicin se u potpunosti uklonio bez obzira na koncentraciju, dok se primjenom UV-A zračenja azitromicin uklonio u promatranom vremenu samo pri početnoj koncentraciji od 1 mg/L. Naime, UV-C



zračenje zbog jačeg energetskog zračenja može bolje od UV-A zračenja razgraditi složene molekule poput azitromicina. Osim utjecaja koncentracije na brzinu razgradnje, ispitan je i utjecaj pH-vrijednosti. Iz provedenog istraživanja je zaključeno kako se optimalna razgradnja postiže pri početnoj koncentraciji azitromicina od 1 mg/L i pH-vrijednosti 10 tijekom fotokatalize uz primjenu UV-C zračenja (254 nm).<sup>48</sup>

Navedeno istraživanje pokazalo je koliko učinkovito direktna UV-fotoliza i fotokataliza s TiO<sub>2</sub> utječu na razgradnju vodene otopine azitromicina, a naglasak ovog rada bio je na sljedećem koraku koji je potrebno provesti tijekom istraživanja razgradnje farmaceutika, a to je analiza toksičnosti otopina azitromicina tijekom odvijanja naprednih oksidacijskih procesa budući da se tijekom razgradnje mogu stvoriti razgradni produkti koji mogu biti toksičniji od početnih molekula farmaceutika. Osim analize toksičnosti uzoraka, dan je i prikaz detektiranih i identificiranih razgradnih produkata. U ovom slučaju, početna pH-vrijednost vodenih otopina azitromicina nije bila prilagođena, već kontrolirana i njen iznos se kretao u području između 5,55 i 6,57 (**Tablica 10.**). Konačna pH-vrijednost otopine ovisi o učinkovitosti razgradnje azitromicina. Iz toga proizlazi da tamo gdje nije došlo do razgradnje je i konačna pH-vrijednost ostala približno jednaka početnoj, dok tamo gdje je došlo do razgradnje se konačna pH-vrijednost smanjila.<sup>7</sup>

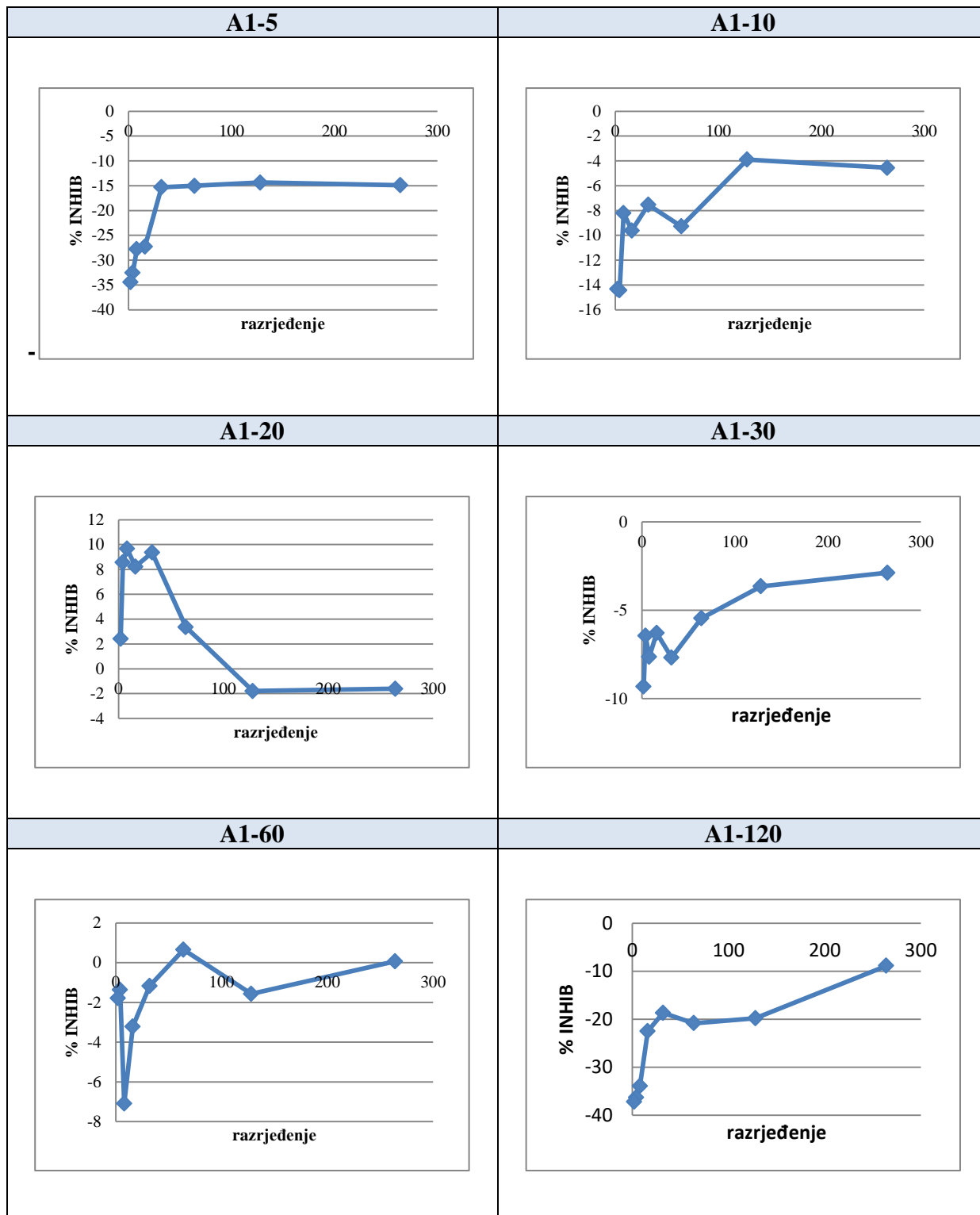
U **Tablici 10**, smanjenje pH-vrijednosti uslijed nastajanja razgradnih produkata možemo zamijetiti kod provođenja procesa fotokatalize s TiO<sub>2</sub> pri valnoj duljini zračenja od 254 nm. Samo je tijekom tog procesa detektirano nastajanje razgradnih produkata, dok u ostala tri slučaja nije, što i potvrđuje konačna pH-vrijednost koja je približno jednaka početnoj.

**Tablica 10.** Početne i konačne pH-vrijednosti vodenih otopina azitromicina prije, odnosno nakon provođenja naprednih oksidacijskih procesa

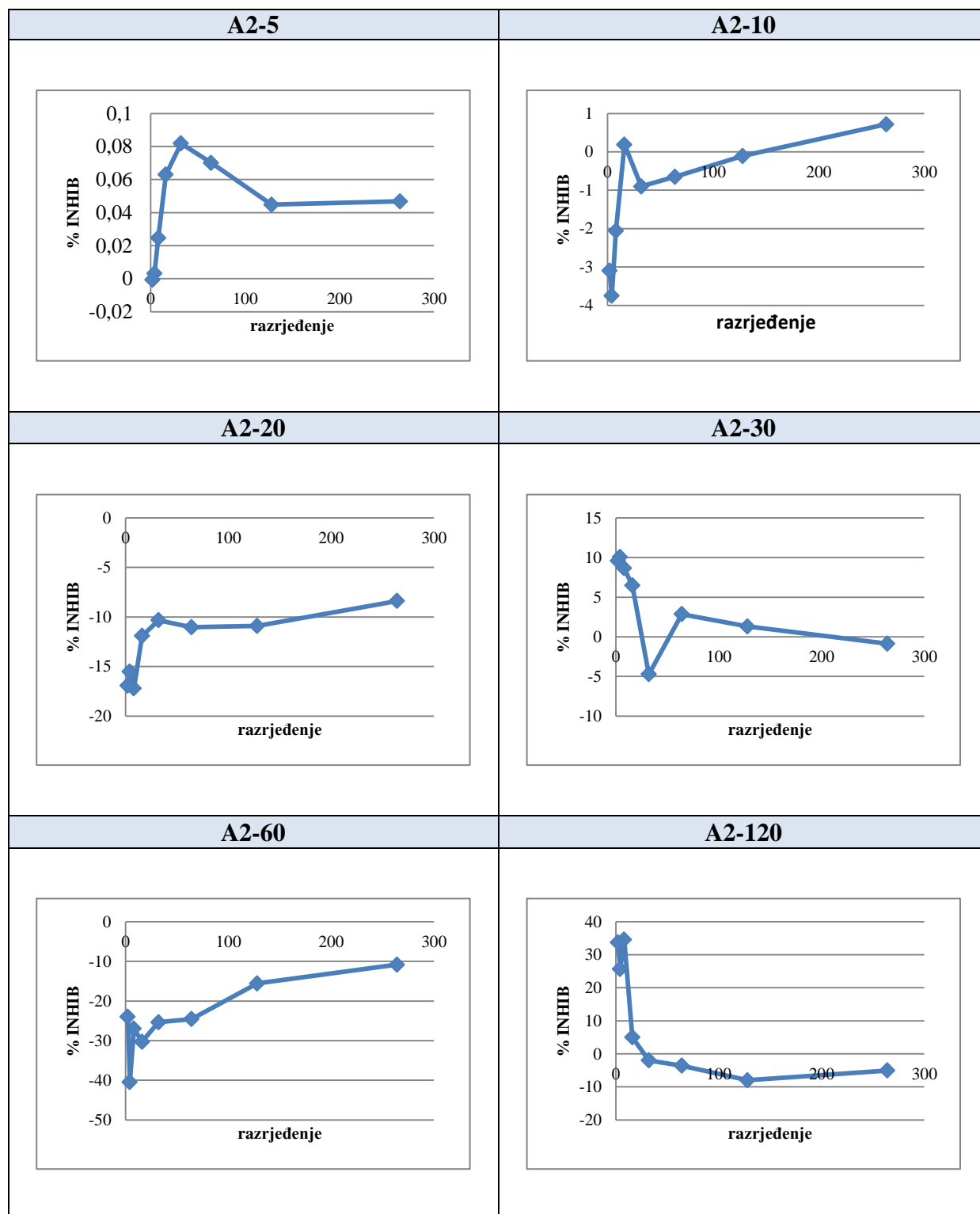
	0	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	240 min
<b>Uzorak 1</b>		<b>A1-5</b>	<b>A1-10</b>	<b>A1-20</b>	<b>A1-30</b>	<b>A1-60</b>	-	<b>A1-120</b>	-
pH <sub>Početak</sub>		5,55	5,55	5,55	5,55	5,55		5,80	
pH <sub>Kraj</sub>		6,11	5,79	5,21	4,75	4,29		4,73	
<b>Uzorak 2</b>		<b>A2-5</b>	<b>A2-10</b>	<b>A2-20</b>	<b>A2-30</b>	<b>A2-60</b>	-	<b>A2-120</b>	-
pH <sub>Početak</sub>		5,80	5,80	5,80	5,80	5,80		5,80	
pH <sub>Kraj</sub>		6,04	5,22	5,26	5,01	4,57		5,16	
<b>Uzorak 3</b>		-	<b>A3-10</b>	<b>A3-20</b>	<b>A3-30</b>	-	<b>A3-90</b>	<b>A3-120</b>	<b>A3-240</b>
pH <sub>Početak</sub>			5,76	5,76	5,76		5,76	5,97	5,97
pH <sub>Kraj</sub>			5,91	5,74	5,65		5,84	5,85	5,79
<b>Uzorak 4</b>		<b>A4-5</b>	<b>A4-10</b>	<b>A4-20</b>	-	<b>A4-60</b>	-	<b>A4-120</b>	<b>A4-240</b>
pH <sub>Početak</sub>		5,76	5,76	5,76		5,76		6,57	6,57
pH <sub>Kraj</sub>		6,27	6,17	6,12		5,48		5,57	5,21
<b>Uzorak 1</b> – 10 mg/L Azitromicin, lampa 254 nm <b>Uzorak 2</b> – 10 mg/L Azitromicin, lampa 254 nm, reaktor s TiO <sub>2</sub> , zrak <b>Uzorak 3</b> – 10 mg/L Azitromicin, lampa 365 nm <b>Uzorak 4</b> – 10 mg/L Azitromicin, lampa 365 nm, reaktor s TiO <sub>2</sub> , zrak									

U **Tablicama 11, 12, 13 i 14** dani su prikazi grafova toksičnosti za ukupno četiri ispitivana uzorka (A1, A2, A3 i A4). U vremenskim intervalima od 5 do 240 min, uzimani su uzorci te im je određivana toksičnost pomoću bakterija *Vibrio fischeri*. Rezultati testa su pokazali kako nitijedna od ispitivanih otopina azitromicina koja je podvrgnuta direktnoj UV-fotolizi i fotokatalizi s TiO<sub>2</sub> uz primjenu UV-A i UV-C zračenja nije toksična, bez obzira na stvorene razgradne produkte. Ispitivane otopine nisu uzrokovale inhibiciju bakterijske kulture te se iz tih razloga parametri toksičnosti poput EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> nisu mogli izmjeriti, odnosno izračunati. EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> kao parametri toksičnosti ukazuju na onu koncentraciju ispitivane tvari koja uzrokuje inhibiciju 20 %, odnosno 50 % ispitivane bakterijske kulture.

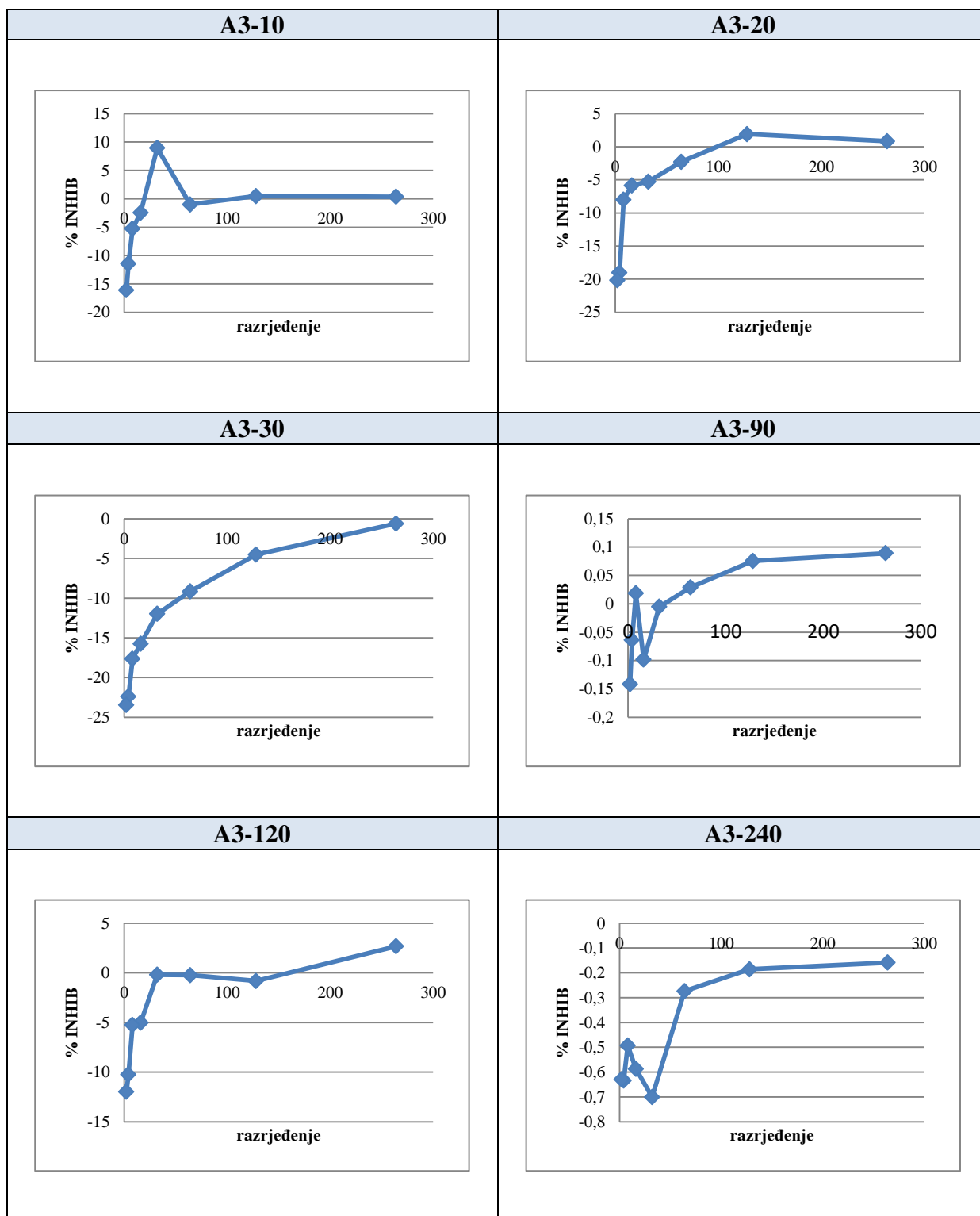
**Tablica 11.** Grafovi toksičnosti za uzorak A1 (otopina azitromicina od 10 mg/L podvrgnuta direktnoj UV-fotolizi pri zračenju od 254 nm)



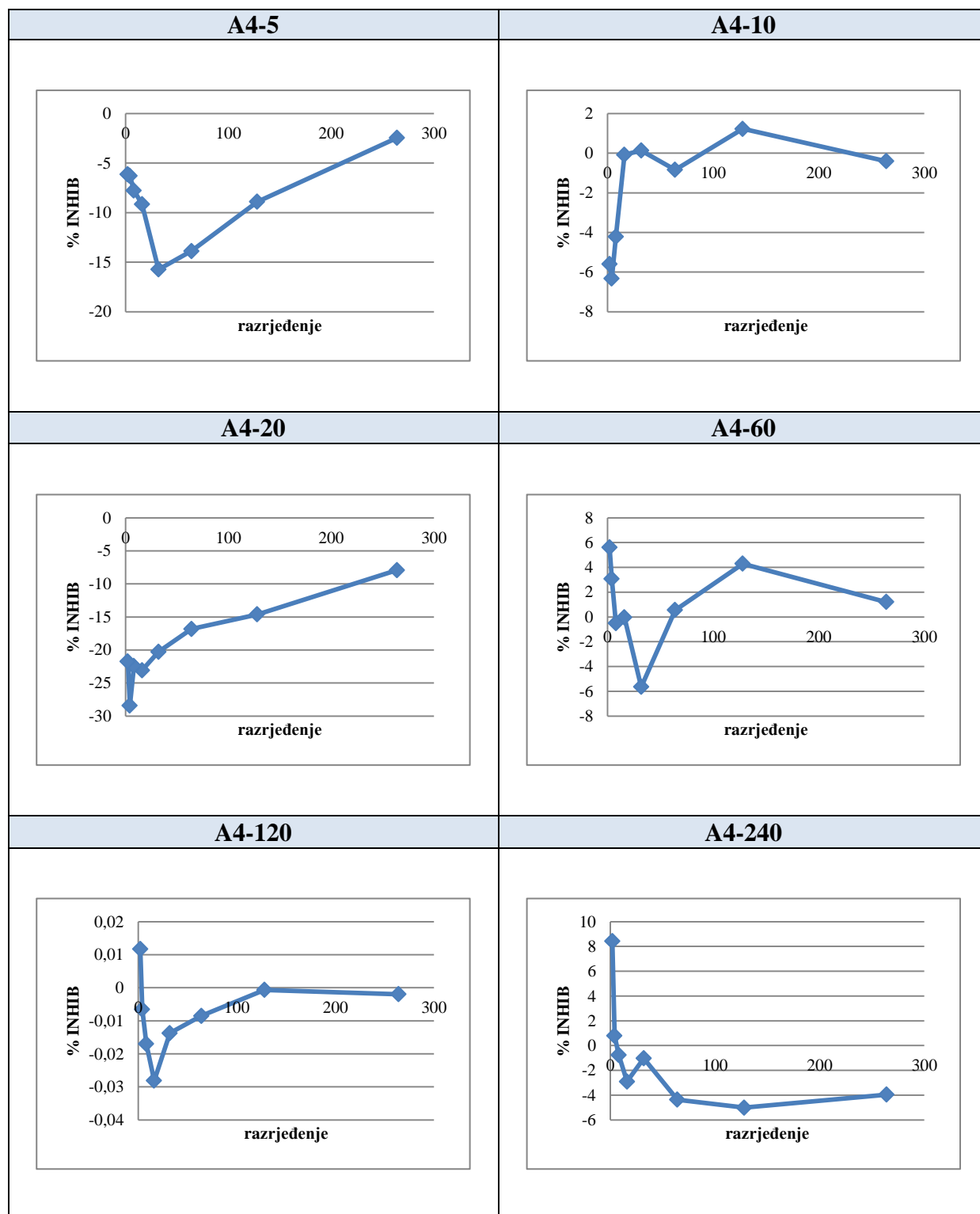
**Tablica 12.** Grafovi toksičnosti za uzorak A2 (otopina azitromicina od 10 mg/Lpodvrgnuta fotokatalizi s  $\text{TiO}_2$  pri zračenju od 254 nm)



**Tablica 13.** Grafovi toksičnosti za uzorak A3 (otopina azitromicina od 10 mg/L podvrgnuta fotolizi pri zračenju od 365 nm)



**Tablica 14.** Grafovi toksičnosti za uzorak A4 (otopina azitromicina od 10 mg/L podvrgnuta fotokatalizi s TiO<sub>2</sub> pri zračenju od 365 nm)



Tijekom provođenja fotokatalize s TiO<sub>2</sub> pri UV-C zračenju (254 nm), HPLC-MS/MS metodom identificiralo se nastajanje ukupno pet razgradnih produkata (DP1, DP2, DP3, DP4 i

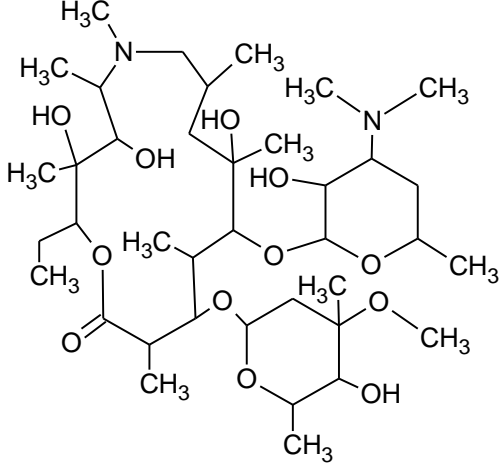
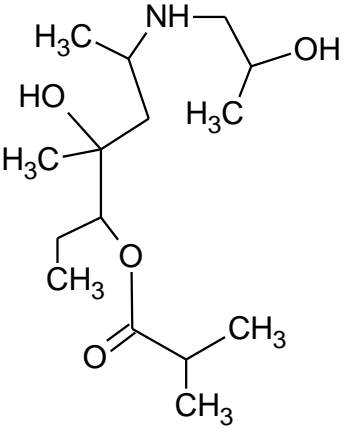
DP5), čiji je prikaz s pripadajućim molekulskim formulama, masom i strukturama danu **Tablici 15**. Strukturu azitromicina čini makrociklički laktoski prsten (15 C atoma) s dvije pridružene molekule šećera (dezosamin i kladinoza). Pucanje veza kojima su šećeri vezani na makrociklički prsten uzrokuje gubitak antibakterijskog učinka makrolida te su stoga kemijska struktura i životni vijek razgradnih produkata u okolišnim sastavnicama od glavnog interesa.

Voigt i sur. su u svom istraživanju otopinu azitromicina od 20 mg/L izložili UV-C zračenju te su ispitivanjem pokazali da je azitromicin u takvoj otopini moguće razgraditi unutar 10 min, s tim da se najveća razgradnja postiže pri pH-vrijednostima od 3 i 7. Fotolitičkom razgradnjom azitromicina nastalo je 6 razgradnih produkata s netaknutim makrolidnim strukturama. U nalazima ovog istraživanja se vidi važnost određivanja toksičnosti nastalih razgradnih produkata, budući da zadržana makrolidna struktura može uvjetovati farmaceutsku ili antibiotsku aktivnost novonastalih produkata.<sup>21</sup>

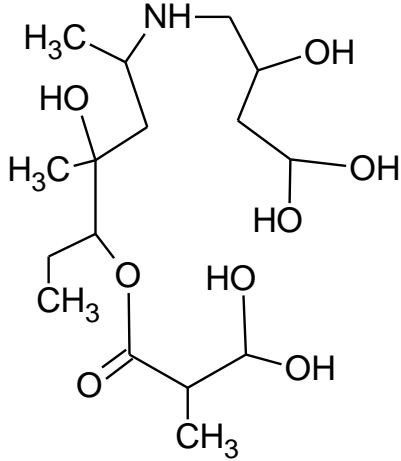
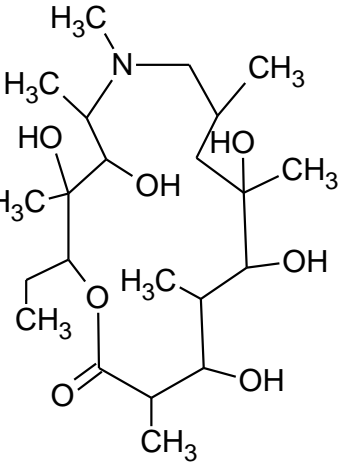
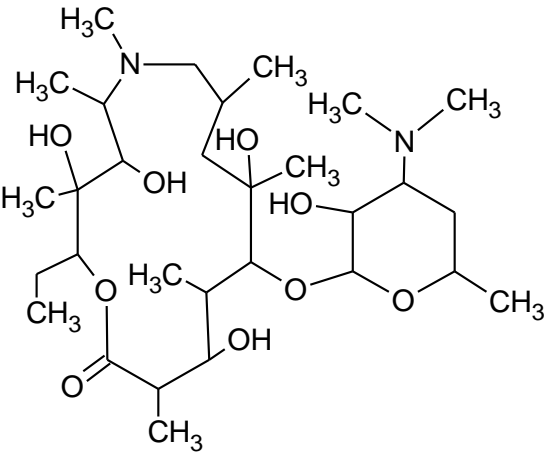
U ovom radu, gdje su razgradni produkti identificirani tijekom provođenja fotokatalitičkog procesa s  $\text{TiO}_2$ , od ukupno pet razgradnih produkata, troje (DP3, DP4 i DP5) ih je zadržalo makrociklički prsten. DP3 se sastoji samo od makrolidne strukture, dok su se šećerne skupine tijekom razgradnje odvojile od prstena. DP4 je zadržao makrolidnu strukturu s pridruženim šećerom dezosaminom, dok se kladinoza odvojila od makrocikličkog prstena. DP5 je strukturno isti kao DP4 uz jednu pridruženu hidroksilnu skupinu na molekuli dezosamina. DP1 i DP2 imaju narušen makrociklički prsten s odcijepljene obje šećerne skupine.

Iz navedenog se potvrđuju i teoretske činjenice, a to je da do cijepanja veza u molekuli azitromicina najčešće dolazi na mjestima s prisutnim heteroatomima i manjom elektronegativnosti. U ovom slučaju su najosjetljivija područja upravo veze između ugljika i kisika gdje su interakcije oslabljene. Metilne grupe kao supstituenti na makrocikličkom prstenu otežavaju njegovo cijepanje te su  $\text{CH}_3^+$  ioni puno stabilniji od razgranatih ugljika kao što su  $\text{R}'\text{CH}_2^+$ ,  $\text{R}_2'\text{CH}^+$  i  $\text{R}_3'\text{C}^+$ .<sup>2</sup>

**Tablica 15.** Nastali razgradni produkti primjenom fotokatalize s TiO<sub>2</sub> pri 254 nm

<p>Naziv</p> <p>Molekulska formula</p> <p>Molekulska masa</p>	<p>Strukturna formula</p>
<p>Azitromicin</p> <p>C<sub>38</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub></p> <p>748,98</p>	 <p>The structure shows a complex macrocyclic ring system with two nitrogen atoms, each substituted with a methyl group. The ring is decorated with multiple methyl groups and hydroxyl groups. A side chain is attached to the ring, consisting of a methoxy group, a carbonyl group, and a methyl group.</p>
<p>DP1</p> <p>C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub></p> <p>289,41</p>	 <p>The structure shows a five-membered ring with a nitrogen atom substituted with a methyl group and a hydroxyl group. The ring is also substituted with two methyl groups and a hydroxyl group. A side chain is attached to the ring, consisting of a methoxy group, a carbonyl group, and a methyl group.</p>

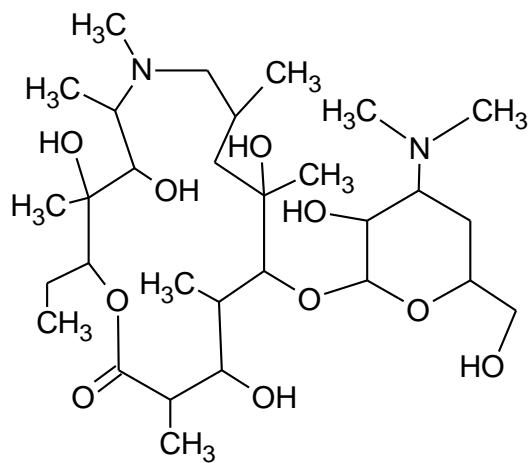


<p>DP2</p> <p><math>C_{16}H_{33}NO_8</math></p> <p>367,44</p>	
<p>DP3</p> <p><math>C_{22}H_{43}NO_7</math></p> <p>433,58</p>	
<p>DP4</p> <p><math>C_{30}H_{58}N_2O_9</math></p> <p>590,79</p>	

DP5

$C_{30}H_{57}N_2O_{10}$

605,79



## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih eksperimenata gdje je u određenim vremenskim intervalima određivana toksičnost ukupno četiri uzorka vodenih otopina azitromicina nakon provođenja direktne UV-fotolize i fotokatalize s  $\text{TiO}_2$  pri izloženosti zračenju valnih duljina od 254 i 384 nm, može se zaključiti sljedeće:

1. Provedene analize toksičnosti su pokazale kako nitijedan od četiri ispitivana uzorka vodenih otopina azitromicina nakon podvrgavanja naprednim oksidacijskim procesima nije toksičan, odnosno nitijedan od uzoraka nije izazvao inhibiciju bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, a koja se koristi u testovima za određivanje akutne toksičnosti.
2. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s tandemskom spektrometrijom masa (HPLC-MS/MS) detektirano je i identificirano ukupno pet razgradnih produkata azitromicina. Razgradni produkti su nastali tijekom provođenja procesa fotokatalize s  $\text{TiO}_2$  pri UV-C zračenju valne duljine od 254 nm. Testovi toksičnosti su pokazali da bez obzira na stvorene razgradne produkte, nitijedan od njih nije utjecao na pojavu toksičnih svojstava ispitivanih otopina. Od ukupno pet nastalih razgradnih produkata, troje ih je zadržalo karakterističnu makrolidnu strukturu azitromicina, a kod preostala dva produkta je došlo do cijepanja makrocikličkog prstena.
3. Prisutnost farmaceutika u okolišu, posebice antibiotika poput azitromicina, predstavlja veliku zabrinutost i nužna je primjena tehnologija koje će u kombinaciji s konvencionalnim metodama obrade otpadnih voda omogućiti njihovo potpuno uklanjanje. Kao savršena alternativa pokazali su se napredni oksidacijski procesi. Njihova samostalna primjena je financijski prezahtjevna te se stoga preporučuje njihova primjena kao metode predobrade, odnosno postobrade konvencionalno obrađene otpadne vode.
4. Za potpuno sprječavanje ulaska farmaceutika i ostalih „novih onečišćujućih tvari“ u okoliš potrebna je i potpora nacionalnog zakonodavstva koje će uvođenjem zakonske regulative o maksimalno dopuštenim koncentracijama takvih tvari u okolišu regulirati njihovo učinkovito uklanjanje i obvezno uvođenje naprednijih tehnologija obrade.

## 6. LITERATURA

1. Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal, *Desalination* **239** (2009) 229-246
2. Ribeiro, R., Mallmann Kuffel, F. J., Pretto Etgeton, H., Brandt, C. R., Kuhn, D., Parizzi Mafioletti, J., Rodrigues, M., Miranda Ethur, E., Stülp, S., Steffens, C., Hoehne, L., Azithromycin determination using spectrophotometer molecular methods and degradation using an advanced oxidation process, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **10** (18) (2016) 94-104
3. Wols, B. A., Hofman-Caris, C. H. M., Review of photochemical reaction constants of organic micropollutants required for UV advanced oxidation processes in water, *Water Research* **46** (2012) 2815-2827
4. Gros, M., Petrovic, M., Barceló, D., Analysis of Emerging Contaminants of Municipal and Industrial Origin, *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution* (2008) 37-104
5. Snyder, S., Westerhoff, P., Yoon, Y., L. Sedlak, D., Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry, *Environmental Engineering Science* **20** (5) (2003) 449-469
6. Periša, M., Babić, S., Farmaceutici u okolišu, *Kemija u industriji* **65** (9-10) (2016) 417-482
7. Čizmić, M., Ljubas, D., Ćurković, L., Škorić, I., Babić, S., Kinetics and degradation pathways of photolytic and photocatalytic oxidation of the anthelmintic drug praziquantel, *Journal of Hazardous Materials* **323** (2017) 500-512
8. Kaštelan-Macan, M., Petrović, M., *Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str.75*
9. Zrnčević, S., Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode* **24** (2016) 96 119 -136
10. Kümmerer, K., Pharmaceuticals in the Environment, *The Annual Review of Environment and Resources* **35** (2010) 57-75
11. Bu, Q., Wang, B., Huang, J., Deng, S., Yu, G., Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review, *Journal of Hazardous Materials* **262** (2013) 189-211

12. Semrany, S., Favier, L., Djelal, H., Taha, S., Amrane, A., Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs), *Biochemical Engineering Journal* **69** (2012) 75-86
13. IWW-Rheinisch-Westfaelisches Institut für Wasser, Pharmaceuticals in the environment – the global perspective: Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM, Germany, 2014., str. 3-6
14. Potrošnja lijekova na: <http://www.halmed.hr/Promet-proizvodnja-i-inspekcija/Promet/Potrosnja-lijekova/Izvjescja-o-prometu-lijekova/> pristupljeno veljača 2018.
15. Puckowski, A., Mioduszevska, K., Łukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska, J., Stepnowski, P., Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **127** (2016) 232-255
16. Dafale, N., P. Semwal, U., Rajput, R., Singh, G.N., Selection of appropriate analytical tools to determine the potency and bioactivity of antibiotics and antibiotic resistance, *Journal of Pharmaceutical Analysis* **6** (2016) 207-213
17. Kumar, R. R., Lee, J. T., Cho, Y. T., Fate, Occurrence, and Toxicity of Veterinary Antibiotics in Environment, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **55** (2012) 701-709
18. Singh, P., Priya, B., Shandilya, P., Raizada, P., Singh N., Pare B., Jonnalagadda, S. B., Photocatalytic mineralization of antibiotics using 60 % WO<sub>3</sub>/BiOCl stacked to graphene sand composite and chitosan, *Arabian Journal of Chemistry* (2016)*in press*
19. Banić Tomišić, Z., Priča o azitromicinu, *Kemija u industriji* **60** (12) (2011) 603-617
20. L. Verimillion Maier, M., S.Tjeerdema, R., Azithromycin sorption and biodegradation in a simulated California river system, *Chemosphere* **190** (2018) 471-480
21. Voigt, M., Jaeger, M., On the photodegradation of azithromycin, erythromycin and tylosin and their transformation products – A kinetic study, *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **5** (2017) 131-140
22. Fram, M. S., Belitz, K., Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California, *Science of the Total Environment* **409** (2011) 3409-3417
23. Gašo-Sokač, D., Habuda-Stanić, M., Bušić, V., Zobundžija, D., Occurrence of pharmaceuticals in surface water, *Croatian Journal of Food Science and Technology* **9** (2) (2017) 204-2010

24. Li, W.C., Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil, *Environmental Pollution* **187** (2014) 193-201
25. Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Hunag, J., Wang, B., Wang, J., Pay attention to non-wastewater emission pathways of pharmaceuticals into environments, *Chemosphere* **165** (2016) 515-518
26. Binh, V. N., Dang, N., Anh, N. T. K., Ky, L. X., K. Thai, P., Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy, *Chemosphere* (2018) *in press*
27. Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment, *Emerging Contaminants* **3** (2017) 1-6
28. Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D., Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387** (2007) 1365-1377
29. Fram, M., Belitz, K., Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California, *Science of the Total Environment* **409** (2011) 3409-3417
30. Zrnčić, M., Gros, M., Babić, S., Kaštelan-Macan, M., Barcelo, D., Petrović, M., Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry, *Chemosphere* **99** (2014) 224-232
31. Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A., Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewaters: current state of knowledge and future research, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399** (2011) 251-275
32. Białk-Bielińska, A., Kumirska, J., Borecka, M., Caban, M., Paszkiewicz, M., Pazdro, K., Stepnowski, P., Selected analytical challenges in the determination of pharmaceuticals in drinking/marine waters and soil/sediment samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **121** (2016) 271-296
33. Le, M. D., Duong, H. A., Nguyen, M. H., Sáiz, J., Pham, H. V., Mai, T. D., Screening determination of pharmaceutical pollutants in different water matrices using dual-channel capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection, *Talanta* **160** (2016) 512-520

34. Klatte, S., Schaefer, H-C., Hempel, M., Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of human, animals and ecosystems, *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **5** (2017) 61-66
35. Zupanc, M., Kosjek, T., Petkovšek, M., Dular, M., Kompare, B., Širok, B., Blažeka, Ž., Heath, E., Removal of pharmaceuticals from wastewater by biological processes, hydrodynamic cavitation and UV treatment, *Ultrasonics Sonochemistry* **20** (2013) 1104-1112
36. Gadipelly, G., Pérez-González, A., D. Yadav, G., Ortiz, I., Ibáñez, R., K. Rathod, V., V. Marathe, K., Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **53** (29) (2014) 11571-11592
37. Gracia-Lor, E., V. Sancho, J., Serrano, R., Hernández, F., Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia, *Chemosphere* **87** (2012) 453-462
38. Deng, Y., Zhao, R., Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment, *Current Pollution Reports* **1** (2015) 167-176
39. Papić, S., Grčić, I., Koprivanac, N., Meixner, J., Obrada industrijske otpadne vode iz proizvodnje vinil-klorida primjenom koagulacije, flokulacije i Fentonova procesa, *Polimer* **31** (3-4) (2010) 100-106
40. Peternel, I., Ptiček Siročić, A., Koprivanac, N., Peroksodisulfatne soli kao novo fotooksidacijsko sredstvo za obradu obojenih otpadnih voda, *Tekstil* **61** (1-6) (2012) 107-115
41. Dewil, R., Mantzavinos, D., Poulios, I., A. Rodrigo, M., New perspectives for Advanced Oxidation Processes, *Journal of Environmental Management* **195** (2017) 93-99
42. Petrovic, M., Radjenovic, J., Barcelo, D., Advanced oxidation processes (AOPs) applied for wastewater and drinking water treatment. Elimination of pharmaceuticals, *The Holistic Approach to Environment* **1** (2) (2011) 63-74
43. Cesaro, A., Naddeo, V., Belgiorno, V., Wastewater Treatment by Combination of Advanced Oxidation Processes and Conventional Biological Systems, *Journal of Bioremediation and Biodegradation* **4** (2013) 4-8
44. Vujević, D., Uklanjanje organskih tvari iz obojenih otpadnih voda primjenom naprednih oksidacijskih procesa, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2007.

45. Lončarić Božić, A., Napredne oksidacijske tehnologije, Fotokemijski procesi, nastavni materijali na web-u (2017/18).
46. Jović, F., Tomašić, V., Heterogena fotokataliza; osnove i primjena za obradu onečišćenog zraka, *Kemija u industriji* **60** (7-8) (2011) 387-406
47. Lončarić Božić, A., Napredne oksidacijske tehnologije, Fotokatalitički procesi, nastavni materijali na web-u (2017/18).
48. Čizmić, M., Vrbat, K., Ljubas, D., Ćurković, L., Babić, S., Photocatalytic degradation of macrolide antibiotic azithromycin in aqueous sample, *Proceedings of the 15th International Conference on Environmental Science and Technology / Lekkas, D. F. – Atena: Kalliopi Vrentzou, 2017, 1-4*
49. Salvador, J.-P., Adrian, J., Galve, R., G. Pinacho, D., Kreuzer, M., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P., Chapter 2.8 Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples, *Comprehensive Analytical Chemistry* **50** (2007) 279-336
50. Villain, V., Minguez, L., Halm-Lemeille, M.-P., Durrieu, G., Bureu, R., Acute toxicities of pharmaceuticals toward green algae, mode of action, biopharmaceutical drug disposition classification system and quantile regression models, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **124** (2016) 337-343
51. Korunić-Košćina, S., Mioč, M., Bobić, V., Ekotoksičnost kao biološki pokazatelj onečišćenja rafinerijskih otpadnih voda, *Goriva i maziva* **42** (3) (2003) 153-176
52. Azizullah, A., Häder, D.-P., A comparison of commonly used and commercially available bioassays for aquatic ecosystems, *Bioassays: Advances Methods and Applications* **17** (2018) 347-368
53. Papić S., Moderne analitičke tehnike u analizi okoliša, *Toksičnost, nastavni materijali na web-u* (2016).
54. Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S., A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environmental International* **32** (2006) 265-268
55. Yu, X., Zuo, J., Tang, X., Li, R., Li, Z., Zhang, F., Toxicity evaluation of pharmaceutical wastewaters using the alga *Scenedesmus obliquus* and the bacterium *Vibrio fischeri*, *Journal of Hazardous Materials* **266** (2014) 68-74
56. Czech, B., Joško, I., Oleszczuk, P., Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **104** (2014) 247-253



57. Dunn, A., Chapter Two – *Vibrio fischeri* Metabolism: Symbiosis and Beyond, *Advances in Microbial Physiology* **61** (2012) 37-68
58. Čanković, M., Bioluminiscentne bakterije na osliću (*Merluccius merluccius*), *Meso* **7** (6) (2006) 350-354
59. Miyashiro, T., G. Ruby, E., Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*, *Molecular Microbiology* **84** (5) (2012) 795-806
60. Đurić, I., Uklanjanje veterinarskih farmaceutika naprednim oksidacijskim metodama, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2010.
61. Sebestyén, I., Monostory, K., Hirka, G., Environmental risk assessment of human and veterinary medicinal products – Challenges and ways of improvement, *Microchemical Journal* **136** (2018) 67-70
62. Čogelja Čajo, G., Osrečki, V., Tomić, S., Utjecaj lijekova na okoliš, *Kemija u industriji* **59** (7-8) (2010) 351-354
63. Bujas, N., Antolić, J., Medić, Đ., Prijedlog europskog zakonodavstva o dopuni liste prioriternih i prioriternih opasnih tvari, *Hrvatske vode* **21** (86) (2013) 328-332
64. Pravilnik o gospodarenju medicinskim otpadomna: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015\\_05\\_50\\_989.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_50_989.html) pristupljeno veljača 2018.
65. Vajda, A., Jezerčić, I. A., Donesen novi Pravilnik o gospodarenju medicinskim otpadom, *Sigurnost* **57** (3) (2015) 283-288
66. Dr. Lange, B., LUMISTox 300 Operatung Manual, Germany, 1999.

# 7. DODATAK

## 7.1. Popis slika

**Slika 1.** Broj farmaceutika detektiranih u površinskim ili podzemnim vodama i/ili vodi za piće<sup>13</sup>

**Slika 2.** Molekulska struktura azitromicina

**Slika 3.** Glavni putevi dospjeća humanih i veterinarskih farmaceutika u okoliš<sup>27</sup>

**Slika 4.** AOP kao predobrada (a.) i postobrada (b.) biološkog sustava<sup>43</sup>

**Slika 5.** Glavni procesi u čestici poluvodiča TiO<sub>2</sub>: (a) nastajanje para elektron/šupljina, (b) oksidacija adsorbirane molekule D, (c) redukcija adsorbirane molekule A, (d) rekombinacija na površini čestice, (e) rekombinacija u unutrašnjosti čestice<sup>46</sup>

**Slika 6.** Biokemijski mehanizam luminiscencije<sup>59</sup>

**Slika 7.** Opći izgled krivulje toksičnosti<sup>53</sup>

**Slika 8.** Hranjiva podloga s vidljivim žutim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* nakon 48 h inkubacije

**Slika 9.** Instrument za provedbu toksičnosti LUMISTox 300 s termostatiranim blokom LUMIStherm

**Slika 10.** Geometrijski niz

## 7.2. Popis tablica

**Tablica 1.** Najzastupljeniji farmaceutici u okolišu s pripadajućim koncentracijama<sup>23</sup>

**Tablica 2.** Toksični i ekološki učinci farmaceutika na organizme<sup>24</sup>

**Tablica 3.** Oksidacijski potencijali različitih oksidansa korištenih u obradi otpadnih voda<sup>35</sup>

**Tablica 4.** Tip UV zračenja s pripadajućim valnim duljinama ( $\lambda$ ) i energijama ( $E$ )<sup>45</sup>

**Tablica 5.** Pregled standardnih vrsta bioindikatora korištenih u biotestovima<sup>51</sup>

**Tablica 6.** Popis korištenih kemikalija

**Tablica 7.** Podatci o korištenom farmaceutiku – azitromicinu

**Tablica 8.** Sastav hranjive podloge

**Tablica 9.** Sastav otopine za resuspenziju

**Tablica 10.** Početne i konačne pH-vrijednosti vodenih otopina azitromicina prije, odnosno nakon provedenja naprednih oksidacijskih procesa

**Tablica 11.** Grafovi toksičnosti za uzorak A1 (otopina azitromicina od 10 mg/L podvrgnuta direktnoj UV-fotolizi pri zračenju od 254 nm)

**Tablica 12.** Grafovi toksičnosti za uzorak A2 (otopina azitromicina od 10 mg/L podvrgnuta fotokatalizi s TiO<sub>2</sub> pri zračenju od 254 nm)

**Tablica 13.** Grafovi toksičnosti za uzorak A3 (otopina azitromicina od 10 mg/L podvrgnuta fotolizi pri zračenju od 365 nm)

**Tablica 14.** Grafovi toksičnosti za uzorak A4 (otopina azitromicina od 10 mg/L podvrgnuta fotokatalizi s TiO<sub>2</sub> pri zračenju od 365 nm)

**Tablica 15.** Nastali razgradni produkti primjenom fotokatalize s TiO<sub>2</sub> pri 254 nm

### 7.3. Popis kratica i simbola

Azitromicin (AZI)

Ultraljubičasto (UV) zračenje

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Spektrometrija masa (MS)

Napredni oksidacijski procesi (**eng.** *Advanced Oxidation Processes*, AOPs)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s tandemskom spektrometrijom masa (HPLC-MS/MS)

Farmaceutski aktivne tvari (**eng.** *Active Pharmaceutical Ingredients*, API)

Farmaceutici i sredstva za osobnu higijenu (**eng.** *Pharmaceuticals and Personal Care Products*, PPCPs)

Maksimalno dopuštena koncentracija (MDK)

Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED)

Vrijeme zadržavanja mulja (**eng.** *Sludge Retention Time*, SRT)

Hidrauličko vrijeme zadržavanja (**eng.** *Hydraulic Retention Time*, HRT)

Tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (**eng.** *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS)

Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (**eng.** *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*, GC-MS/MS)

Plinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (**eng.** *Gas Chromatography tandem Mass Spectrometry*, GC-MS/MS)

Kapilarna elektroforeza (**eng.** *Capillary Electrophoresis*, CE)

Biofilm reaktor s pokretnom podlogom (**eng.** *Moving Bed Biofilm Reactor*, MBBR)

Valentna vrpca (**eng.** *Valence Bond*, VB)

Vodljiva vrpca (**eng.** *Conduction Bond*, CB)

Zabranjena zona ( $E_g$ )

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

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

Ocjena rizika za okoliš (**eng.** *Environmental Risk Assessment*, ERA)

Predviđena okolišna koncentracija (**eng.** *Predicted Environmental Concentration*, PEC)

Europska agencija za lijekove (**eng.** *European Medicines Agency*, EMA)

Predviđena koncentracija bez učinka (**eng.** *Predicted No-Effect Concentration*, PNEC)

Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (**eng.** *Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD)

Međunarodna organizacija za standardizaciju (**eng.** *International Organization for Standardization*, ISO)

Okvirna direktiva o vodama (ODV)

UV-A<sub>365</sub> – ultraljubičasto zračenje valne duljine 365 nm

UV-C<sub>254</sub> – ultraljubičasto zračenje valne duljine 254 nm

## Životopis

### Klara Perović

█ gdje sam završila Osnovnu školu Krune Krstića i Gimnaziju Jurja Barakovića, opći smjer. 2013. godine sam upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer ekoinženjerstvo. Stručna praksu sam odradila u EKO d.o.o., tvrtki za gospodarenje otpadom Zadarske županije. Završni rad pod naslovom: „*Određivanje toksičnosti antiparazitika i antibiotika u vodi bakterijama Vibrio fischeri*“ izradila sam 2016. godine na Zavodu za analitičku kemiju pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger. Iste godine upisujem diplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer ekoinženjerstvo. Dobitnica sam Rektorove nagrade za akademsku godinu 2016./2017. u kategoriji timski rad pod temom „*Određivanje ekotoksičnosti farmaceutika u vodi*“. Tijekom ljetnog semestra druge godine diplomskog studija, provela sam četiri mjeseca u Austriji odrađujući Erasmus+ stručnu praksu gdje sam se bavila proizvodnjom goriva iz otpada. Od stranih jezika koristim engleski i talijanski u govoru i pismu, a poznajem i osnove njemačkog jezika. Računalno sam pismena.