

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**TIA GRGIČEVIČ**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA**

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

TIA GRGIČEVIČ

**VREDNOTENJE UV-FILTROV IN NJIHOVIH RAZGRADNIH PRODUKTOV  
KOT OKOLJSKIH ENDOKRINIH MOTILCEV IN SILICO**

**IN SILICO EVALUATION OF UV-FILTERS AND THEIR DEGRADATION  
PRODUCTS AS ENVIRONMENTAL ENDOCRINE DISRUPTORS**

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem za vse nasvete, pomoč in odzivnost mentorju Žigu Jakopinu pri pisanju magistrske naloge.

Iz srca bi se rada zahvalila vsem, ki so me spodbujali ob pisanju magistrske naloge.

*Posebej bi se zahvalila še:*

- *staršema za vso pomoč in podporo tekom študija, ter da sta me prepričala, da sem se vpisala na magisterij, sicer bi najverjetneje sedaj nekje pekla torte... :)*
- *sestrici Asji, ki mi je ves čas stala ob strani in me spraševala, kdaj bo naloga napisana,*
- *Niki, Srđanu in Davidu za vse spodbudne besede in koristne nasvete pri nalogi (obljubim, da bom v bodoče še boljša teta<sup>2</sup>),*
- *sošolcem, zaradi katerih mi bodo študentska leta ostala v posebnem spominu,*
- *najboljšim prijateljicam, zaradi katerih je bila magistrska naloga spisana malo kasneje*
- *in nazadnje še vsem, ki so poskusili razrešiti skrivnost pravičnega oštevilčenja magistrske naloge.*

*Brez vas bi verjetno še danes pisala magistrsko nalogo ... HVALA!*

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Žige Jakopina.

Ljubljana, 2018

Tia Grgičević

# VSEBINA

Povzetek.....	I
Abstract.....	III
Seznam okrajšav.....	V
1 Uvod.....	1
1.1 UV filtri .....	1
1.2 Varnost UV-filtrov .....	2
1.2.1 UV filtri v okolju .....	2
1.2.2 Parametri, ki vplivajo na usodo UV filtrov v okolju.....	4
1.3 Biokoncentracija in bioakumulacija UV filtrov .....	6
1.4 Razgradni produkti UV filtrov v okolju .....	7
1.5 Halogeniranje UV filtrov .....	7
1.5.1 Vpliv parametrov na halogeniranje UV filtrov .....	9
1.5.1.1 pH.....	10
1.5.1.2 Naravno prisotni halogeni elementi v vodi .....	10
1.5.1.3 Halogeni elementi kot posledica sterilizacije vode .....	10
1.5.1.4 Vsebnost broma.....	11
1.5.1.5 Temperatura .....	11
1.6 Endokrini sistem .....	11
1.6.1 Receptorji .....	12
1.6.2 Hormonski motilci .....	12
1.6.2.1 Delovanje hormonskih motilcev .....	13
1.7 In silico metode za napovedovanje toksičnosti .....	14
1.7.1 Prednosti in slabosti <i>in silico</i> metod .....	15
1.7.2 <i>In silico</i> metode za napovedovanje ekotoksikološkega vpliva.....	15
2 Načrt za delo .....	17
3 Metode in materiali .....	19

3.1	Uporabljeni računalniški programi.....	21
3.1.1	Program VegaNIC.....	21
3.1.2	Program Endocrine Disruptome .....	22
3.2	Pregled baz podatkov.....	23
3.2.1	PubChem.....	23
3.2.2	Academic Search Complete in PubMed.....	24
4	Rezultati in razprava .....	25
4.1	Mehanizmi razgradnje UV filtrov .....	25
4.2	Usoda UV filtrov in razgradnih produktov v okolju.....	33
4.2.1	Program VegaNIC - Persistence (sediment) model (IRFMN) in Ready Biodegradability model (IRFMN).....	34
4.2.1.1	Persistence (sediment) model (IRFMN) .....	34
4.2.1.2	Ready Biodegradability model (IRFMN) .....	37
4.3	Program VegaNIC – model BCF (CAESAR) .....	40
4.4	Ekotoksikološki vpliv UV filtrov in RP .....	42
4.4.1	Model Daphnia Magna LC <sub>50</sub> 48h (EPA) .....	43
4.5	Endokrino delovanje .....	46
4.5.1	Program VegaNIC – Relative Binding Affinity Model.....	46
4.5.2	Program Endocrine Disruptome .....	49
4.5.2.1	Vpliv halogeniranja na povečanje verjetnosti vezave .....	53
4.6	Ocena tveganja analiziranih UV filtrov.....	54
4.6.1	Najvarnejši UV filter – BP4 .....	55
4.6.1.1	BP4 – primerjava rezultatov pridobljenih <i>in silico</i> s podatki iz literature .....	57
4.6.2	Najbolj toksičen UV filter: 4-MBC .....	58
4.6.2.1	4-MBC – primerjava rezultatov pridobljenih <i>in silico</i> s podatki iz literature... ..	60
5	Sklep .....	62
6	Viri.....	64

# KAZALO SLIK

<b>SLIKA 1:</b> VREDNOSTI KONCENTRACIJ UV FILTROV IZMERJENIH V REČNI, JEZERSKI, MORSKI, BAZENSKI IN ODPADNI VODI.....	3
<b>SLIKA 2:</b> VREDNOSTI LOGP UV FILTROV (VIR: PUBCHEM) .....	4
<b>SLIKA 3:</b> PRIKAZ RELATIVNE PORAZDELITVE VSEH TREH OBLIK KLORA, KI JIH NAJDEMO V VODNI RAZTOPINI 0,1 M CL <sub>2</sub> , V ODVISNOSTI OD SPREMEMBE PH-JA PRI 25 °C.....	10
<b>SLIKA 4:</b> BIOSINTEZA STEROIDNIH SPOLNIH HORMONOV.....	14
<b>SLIKA 5:</b> PRIKAZ REZULTATOV PROGRAMA ENDOCRINE DISRUPTOME .....	23
<b>SLIKA 6:</b> KLASIFIKACIJA MODELOV READY BIODEGRADABILITY MODEL (IRFMN) IN PERSISTENCE (SEDIMENT) MODEL (IRFMN). .....	34
<b>SLIKA 7:</b> IZRAČUNANE LOGP VREDNOSTI ZA UV FILTRE IN NJIHOVE MONO- IN DIKLORIRANE PRODUKTE. ....	35
<b>SLIKA 8</b> PRIKAZ REZULTATOV PROGRAMA VEGANIC IN BCF MODELA ZA UV FILTRE: BZS, PS, EHS, BP3, BP4, 4-MBC.. .....	41
<b>SLIKA 9:</b> PRIKAZ REZULTATOV PROGRAMA VEGANIC IN MODELA BCF(CAESAR) ZA UV FILTRE: EDPABA, BMDM IN EHMC. LEGENDA: ZELEN STOLPEC – IZVORNI UV FILTER, ORANŽEN STOLPEC – KLORIRANI RP, MODER STOLPEC – BROMIRANI RP. NA STOLPCIH JE ZAPISANA VREDNOST BCF V LOG (L/KG). ....	42
<b>SLIKA 10:</b> KORELACIJA LOGP Z LC50 VREDNOSTMI NAPOVEDANIMI S PROGRAMOM VEGANIC Z MODELOM MODEL DAPHNIA MAGNA LC50 48H (EPA).....	45
<b>SLIKA 11:</b> PRIKAZ VREDNOSTI LC50 (V MG/L) ZA UV FILTRE IN NJIHOVE MONO- ALI DIHALOGENIRANE RP.. .....	46

# KAZALO PREGLEDNIC

<b>PREGLEDNICA I:</b> VREDNOSTI BCF, LOG P, KOC, TOPNOSTI IN KONCENTRACIJE V VODNEM OKOLJU IN RIBAH ZA NEKATERE UV FILTRE. ....	5
<b>PREGLEDNICA II:</b> PREUČEVANI UV FILTRI S STRUKTURNO FORMULO, SMILES KODO IN CAS ŠTEVILKO. ....	20
<b>PREGLEDNICA III:</b> TABELA PROUČEVANIH UV FILTROV Z OPISOM REAKCIJ IN NAPOVEDANIMI RAZGRADNIMI PRODUKTI. ....	25
<b>PREGLEDNICA IV:</b> PREGLEDNICA RAZGRADNIH PRODUKTOV, KI SO BOLJ OBSTOJNI OD IZVORNIH UV FILTROV IN UV FILTROV, KATERIH OBSTOJNOST SE Z RAZGRADNJO NE POVEČA. ....	36
<b>PREGLEDNICA V:</b> REZULTATI PROGRAMOV VEGANIC ZA NAPOVED OBSTOJNOSTI V SEDIMENTU Z MODELOM PERSISTENCE (SEDIMENT) MODEL (IRFMN) 1.0.0 IN NAPOVED VERJETNOSTI BIORAZGRADNJE Z MODELOM READY BIODEGRADABILITY MODEL (IRFMN) 1.0.9. ....	38
<b>PREGLEDNICA VI:</b> KLASIFIKACIJA SPOJIN NA OSNOVI LC <sub>50</sub> VREDNOSTI V SKLOPU MODELA <i>DAPHNIA MAGNA</i> . ....	43
<b>PREGLEDNICA VII:</b> REZULTATI PROGRAMOV VEGANIC ZA NAPOVEDOVANJE EKOTOKSIKOLOŠKEGA VPLIVA Z MODELOM MODEL <i>DAPHNIA MAGNA</i> LC50 48H (EPA). ....	44
<b>PREGLEDNICA VIII:</b> REZULTATI PROGRAMA VEGANIC ZA NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI PREKO ER ZA UV FILTRE IN NJIHOVE RP. ....	48
<b>PREGLEDNICA IX:</b> REZULTATI PROGRAMA ENDOCRINE DISRUPTOME ZA NAPOVED ENDOKRINE TOKSIČNOSTI UV FILTROV IN NJIHOVIH RAZGRADNIH PRODUKTOV. POLJA SO OBARVANA GLEDE NA STOPNJO VERJETNOSTI VEZAVE. V POLJU JE ZAPISANA ŠE ŠTEVILČNA VREDNOST NAPOVEDI VERJETNOSTI VEZAVE. ....	52
<b>PREGLEDNICA X:</b> PREGLEDNICA UV FILTROV IN NJIHOVIH RAZGRADNIH PRODUKTOV, PRI KATERIH SE JE PO RAZGRADNJI POVEČALA VERJETNOST VEZAVE NA VSAJ EN RECEPTOR. ....	54
<b>PREGLEDNICA XI:</b> PRIKAZ REZULTATOV LOGP, BCF, LC50 IN VERJETNOST VEZAVE NA RECEPTORJE AR, AR AN, TR A IN TR B ZA 7 UV FILTROV, KATERIM SE JE ZARADI RAZGRADNJE POVEČALA VERJETNOST VEZAVE NA VSAJ ENEM RECEPTORJU. Z ZELENIH OKVIRJEM JE OZNAČEN POTENCIALNO NAJVARNEJŠI UV FILTER: BP4, Z RDEČIM OKVIRJEM JE OZNAČEN POTENCIALNO NAJNEVARNEJŠI UV FILTER: 4-MBC. ....	55
<b>PREGLEDNICA XII:</b> REZULTATI PROGRAMA VEGANIC ZA FAKTOR BCF, LC50 IN PROGRAMA ENDOCRINE DISRUPTOME ZA LOGP IN VERJETNOSTI VEZAVE NA 16 RECEPTORJEV ZA BP4 IN NJEGOVE RAZGRADNE PRODUKTE. ....	57
<b>PREGLEDNICA XIII:</b> REZULTATI RAZISKAVE O AKUTNI TOKSIČNOSTI BP3 IN BP4 S TREMI TESTI <i>C. VULGARIS</i> , <i>D. MAGNA</i> IN <i>B. RERIO</i> (POVZETO PO 41) ....	58
<b>PREGLEDNICA XIV:</b> REZULTATI PROGRAMA VEGANIC ZA FAKTOR BCF, LC50 IN PROGRAMA ENDOCRINE DISRUPTOME ZA LOGP IN VERJETNOSTI VEZAVE NA 16 RECEPTORJEV ZA 4-MBC IN NJEGOVE RAZGRADNE PRODUKTE. ....	60

## Povzetek

UV filtri so pogosto uporabljene sestavine za preprečevanje in zmanjšanje škodljivih učinkov sončnih žarkov v kozmetični, farmacevtski in drugih industrijah. Zaradi načina uporabe je posledično vnos UV filtrov v vodno okolje neizogiben proces. V vodnem okolju najdemo naravno in umetno prisotne halogene elemente (največkrat klorove in bromove spojine), s katerimi lahko reagirajo UV filtri, pri čemer nastanejo halogenirani razgradni produkti le-teh. UV filtri so zaradi visokih logP vrednosti odporni proti biodegradaciji ter nagnjeni k procesu bioakumulacije. V nalogi smo devetim reprezentativnim UV filtrom in njihovim razgradnim produktom s pomočjo dveh programov, in sicer Endocrine disruptome in VegaNIC, napovedali okoljski vpliv, akutno toksičnost in endokrino delovanje. Na usodo UV filtrov v okolju smo sklepali iz logP vrednosti in dobljenih rezultatov za verjetnost biološke razgradnje, odpornost proti biodegradaciji in iz faktorja bioakumulacije. Pri preučevanju obstojnosti v sedimentu smo ugotovili, da se nekaterim UV filtrom (BP3, BMDM in PS) z razgradnjo poveča obstojnost. Najmanj biorazgradljiv UV filter je sicer BP3. Najvišji bioakumulacijski faktor je program VegaNIC napovedal za 4-MBC, najnižji faktor bioakumulacije pa za BP4. Ob preučevanju akutne toksičnosti so rezultati pokazali, da ima najvišje vrednosti  $LC_{50}$  BP4, zaradi česar se uvršča med netoksične spojine, med najbolj akutno toksične spojine pa je program VegaNIC uvrstil BMDM, zaradi najvišjih vrednosti  $LC_{50}$ . Rezultati so pokazali, da so bromirani derivati bolj akutno toksični kot klorirani derivati enakega UV filtra. Ob preučevanju endokrinega delovanja smo ugotovili, da imajo analizirani UV filtri največjo verjetnost vezave na receptorje AR, AR an in TR  $\alpha$  in TR  $\beta$ . Pozorni smo bili na povečanje verjetnosti vezave po razgradnji, kar smo opazili pri sedmih UV filtrih (oz. pri 12 razgradnih produktih). Na osnovi vseh rezultatov *in silico* smo naredili oceno tveganja in ugotovili, da je najbolj varen UV filter BP4, saj ima nizko nagnjenost h bioakumulaciji tudi po potencialni razgradnji. Poleg tega pa imajo njegovi razgradni produkti na večino človeških receptorjev najnižjo verjetnost vezave, kar govori o šibkem endokrinem delovanju tega UV filtra in njegovih razgradnih produktov. Med najbolj toksičen UV filter smo uvrstili 4-MBC, saj ima zaradi lipofilnih lastnosti in visokih vrednosti faktorja bioakumulacije veliko nagnjenost k bioakumulaciji. Zaradi napovedane velike verjetnosti vezave na številne receptorje za razgradne produkte 4-MBC smo sklepali na njegovo močno endokrino delovanje, tudi po



potencialni razgradnji v vodnem okolju. Zaradi nagnjenosti večine UV filtrov k bioakumuliranju po razgradnji v vodnem okolju je izpostavljenost okoljskim endokrinim motilcem preko hrane potrebno upoštevati pri oceni varnosti UV filtrov. Razgradni produkti imajo namreč lahko celo močnejše endokrine učinke kot izvorni UV filtri, kar smo nakazali tudi v naši nalogi.

**Ključne besede:** UV filtri, halogeniranje, razgradni produkti, bioakumulacija, *in silico* napoved, endokrino delovanje, ekotoksikološki vpliv

## Abstract

UV filters are very often used ingredients in cosmetic, pharmaceutical and other industries to prevent or reduce harmful effects of UV light. Due to their wide-spread application and usage, occurrence of UV filters in the aquatic environment is an inevitable fact. In the aquatic environment there is a presence of halogen compounds (mostly chlorinated and brominated compounds) that can react with UV filters, resulting in halogenated degradation products. UV filters are resistant to process of biodegradation and are prone to bioaccumulation due to high logP values. In the thesis we predicted environmental impact, acute toxicity and assessed endocrine activity of nine representative UV filters with two programs Endocrine Disruptome and VegaNIC. We estimated the environmental fate of UV filters based on their logP values and the results obtained for biological degradation, resistance to biodegradation and bioconcentration factor. When studying the persistence in the sediment, we found out that some UV filters (BP3, BMDM, and PS) increase the stability in environment with degradation. The least biodegradable UV filter is BP3. Program VegaNIC predicted the highest bioconcentration factor for 4-MBC, while the lowest has been predicted for BP3. When assessing acute toxicity, the results showed that the highest values of LC<sub>50</sub> belong to BP4 and it is classified as a non-toxic compound. On the other hand, the lowest values of LC<sub>50</sub> was calculated for BMDM and is therefore classified as a very toxic compound in this respect. Brominated derivatives of a certain UV filter are more acutely toxic than their chlorinated counterparts. The results of endocrine activity studies showed that the analysed UV filters exhibit the highest probability of binding to the AR, AR $\alpha$  and TR $\alpha$  and TR $\beta$  human receptors. In this Master's thesis we focused on degradation products displaying a higher binding affinity on nuclear receptors than that of the parent UV filter. Increase in binding affinity occurred with 7 UV filters (or their 12 degradation products). Based on all results obtained *in silico*, we conducted a risk assessment from which we concluded that BP4 was the safest UV filter, because of its low tendency for bioaccumulation. Its degradation products also show low bioaccumulation tendencies. In addition, BP4 degradation products have the lowest probability of binding on most human nuclear receptors, indicating only a possible weak endocrine activity of this UV filter and its degradation products. 4-MBC was highlighted as the most toxic UV filter

as due to its lipophilic properties and high bioconcentration factor exhibits high tendency for bioaccumulation. We predicted that 4-MBC and its degradation products possess strong endocrine activity, due to the high probability of binding to numerous nuclear receptors. Because most UV filters are predisposed to bioaccumulation after degradation in the water environment, the exposure to such environmental endocrine disruptors via food chain should be taken into account when conducting safety assessment of UV filters. Halogenated degradation products can possess even more potent endocrine effects than their parent UV filters, which has also been indicated in our Master's thesis.

**Key words:** UV filters, halogenation, degradation products, bioaccumulation, *in silico* prediction, endocrine activity, ecotoxicological effects

## Seznam okrajšav

- BCF = bioakumulacijski faktor
- DAD = detektor s serijo diod
- FID = plamensko-ionizacijski detektor
- GC = plinska kromatografija
- HDT = dihidrotestosteron
- HM = hormonski motilci
- IGF-1 = inzulinu podoben rastni faktor 1
- LC = tekočinska kromatografija
- LC<sub>50</sub> = povprečna smrtna koncentracija
- LD<sub>50</sub> = povprečni smrtni odmerek
- MS = masna spektrofotometrija
- QSAR = kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem (*ang. Quantitative Structure-Activity Relationship*)
- REACH = registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij (*ang. Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*)
- RP = razgradni produkti
- SCCS = znanstveni odbor za varnost potrošnikov (*ang. Scientific Committee on Consumer Safety*)
- SMILES = *ang. Simplified Molecular Input Line Entry Specification*
- UPLC = tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti
- UV = ultravijolično
- UV filtri:
  - 3-BC = 3-benzildien kafa
  - 4DHB = 4,4-dihidroksibenzofenon
  - 4HB = 4-hidroksibenzofenon
  - 4-MBC = 4-metilbenziliden kafa
  - BMDM = butil metoksidibenzoilmetan

- BP1= benzofenon-1
- BP3 = benzofenon-3
- BP4 = benzofenon-4
- BZS = benzil salicilat
- EDPABA = etilheksil dimetil para-aminobenzojska kislina
- EHMC = 2-etilheksil-4-metoksicinamat
- EHS = etilheksil salicilat
- HMS= homosalat
- OCR = oktokrilen
- OMC= oktil metoksicinamat
- PABA = para-aminobenzojska kislina
- PBSA =fenil benzimidazol sulfonska kislina
- PS = fenil salicilat

# 1 Uvod

Okolje, v katerem živimo, je zaradi človeka vse bolj onesnaženo s številnimi okoljskimi onesnaževali. Med pomembna okoljska onesnaževala spadajo tudi kozmetični izdelki, izmed katerih so vse pogostejše prisotni varovalni izdelki za sončenje, katerih glavne aktivne sestavine so UV filtri. Vnos UV filtrov v vodno okolje je neizogiben proces, in sicer zaradi načina uporabe, ko se po nanosu kreme za sončenje uporabnik ponavadi dokaj hitro skopa. Zaradi precej visoke odpornosti UV filtrov proti biorazgradnji lahko UV filtri reagirajo s halogenimi elementi v vodnem okolju, pri čemer nastanejo halogenirani razgradni produkti UV filtrov. Slednji imajo lahko drugačne fizikalno-kemijske lastnosti kot njihovi prekursorji, zaradi česar sta lahko drugačni njihova usoda v okolju in toksikološki profil. Podatki v strokovni literaturi o prisotnosti, usodi in učinkih halogeniranih razgradnih produktov UV filtrov v okolju so relativno skromni in so dostopni samo za posamezne UV filtre. Predvsem to spoznanje nas je spodbudilo k podrobnejšemu raziskovanju tega področja.

## 1.1 UV filtri

UV filtri so najpomembnejše sestavine varovalnih izdelkov za sončenje. Dodaja se jih z namenom zmanjševanja in preprečevanja škodljivih učinkov sončnih žarkov. UV filtri ščitijo pred UVA (320 – 400 nm) in UVB žarki (290-320 nm). UV filtre ločimo po kemizmu in delovanju na: **anorganske/fizikalne UV filtre**, ki odbijajo, sipajo in deloma tudi absorbirajo UV žarke določene valovne dolžine ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ) in **organske/kemijske UV filtre**, ki absorbirajo UV žarke (1). Organske filtre delimo na več skupin: salicilati, benzofenoni, derivati *p*-aminobenzojske kisline (PABA), derivati dibenzoilmetana, cinamati, derivati kafre, krileni in derivati benzimidazola (2).

Po svetu je v različnih državah (EU, ZDA, Avstralija, Kanada, Japonska, Afrika) dovoljenih 55 UV filtrov, izmed katerih jih je deset dovoljenih povsod (9 organskih: BP3, BMDM, EHDABA, EHMC, EHS, HMS, OCR, PABA, PBSA in en anorganski:  $\text{TiO}_2$ ), ostali pa so dovoljeni samo v določenih državah. V Evropi je z Uredbo o kozmetičnih izdelkih (ES) št. 1223/2009 (Aneks VI) trenutno dovoljenih 28 UV filtrov (3). UV filtri se v najvišjih koncentracijah (običajno od 2 – 10 %) uporabljajo v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem. V nižjih koncentracijah (do 0,5 %)

se UV filtre kot pomožne snovi dodaja tudi v zdravila, kjer ščitijo sestavine, občutljive na fotodegradacijo (1, 2).

## **1.2 Varnost UV-filtrov**

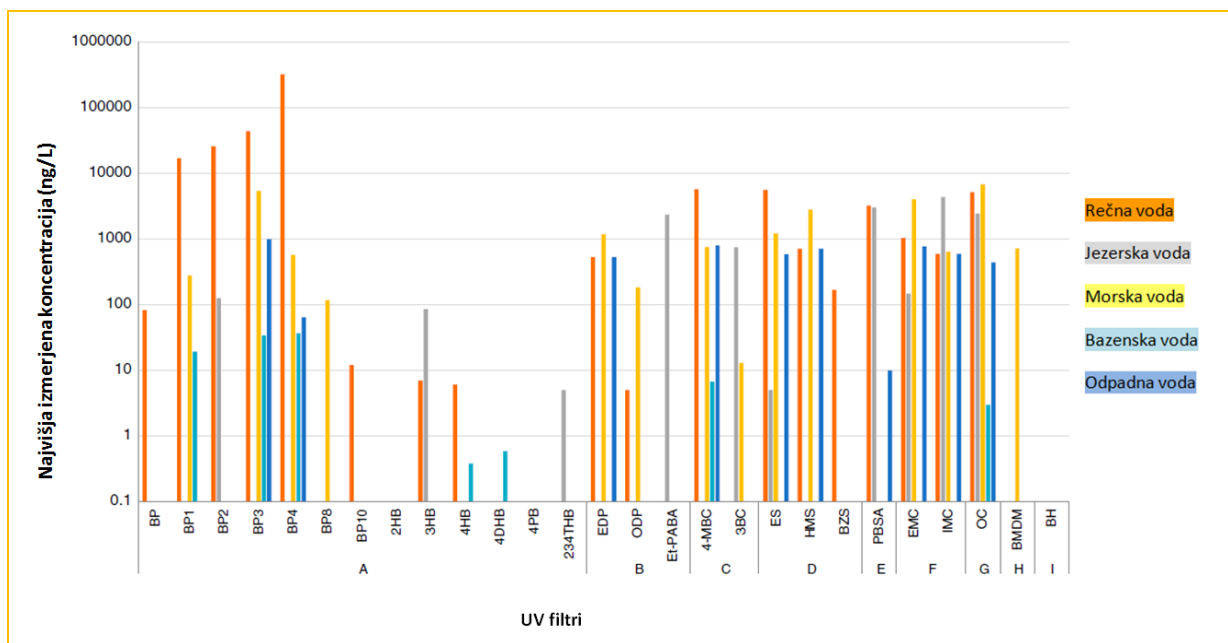
V zadnjih letih je uporabi varovalnih izdelkov za sončenje posvečena vse večja pozornost, tako s stališča odkrivanja novih formulacij in kombinacij UV filtrov, da bi zagotovili čim boljše zaščito pred škodljivimi učinki sončnih žarkov, kot tudi s stališča varnosti za uporabnika in raziskovanja toksikološkega profila uporabljenih UV filtrov. Potencialni toksični učinki UV filtrov, ki so posledica direktnega nanosa izdelka na kožo, so predmet številnih raziskav. Na podlagi slednjih Znanstveni odbor za varnost potrošnikov (SCCS; angl. Scientific Committee on Consumer Safety) poda oceno varnosti kozmetične sestavine in opredeli UV filter glede varnosti uporabe ter ovrednoti morebitne toksične učinke.

Pomemben, a precej neraziskan aspekt pri določanju toksikološkega profila UV filtrov pa je izpostavljenost njihovim učinkom po tem, ko preidejo v (vodno) okolje. Varovalne izdelke za sončenje se na kožo nanaša v relativno velikih količinah. Priporočilo US FDA za učinkovito zaščito je nanos 2 mg sončne kreme/cm<sup>2</sup> kože, kar znaša 40 g varovalnega izdelka za sončenje, če upoštevamo, da je površina kože odraslega človeka 2 m<sup>2</sup> (1). Po nanosu kozmetičnih izdelkov za sončenje se uporabnik skopa ali stušira, zato proizvajalci pri razvoju varovalnih izdelkov za sončenje stremijo k temu, da bi bile formulacije čim bolj vodoodporne. Dokazano pa je, da se izdelki za sončenje (tudi t. i. vodoodporni, še bolj pa nevodoodporni) v stiku z vodo v precejšnji meri izperejo s kože (4).

### **1.2.1 UV filtri v okolju**

UV filtri lahko v vodno okolje preidejo po več poteh – direktno in indirektno. Direktnen in največji vnos UV filtrov v okolje je posledica izpiranja kozmetičnih izdelkov iz kože. Po nanosu varovalnega izdelka za sončenje se sicer del izdelka lahko absorbira tudi skozi kožo, iz telesa pa se nato UV filtri izločijo z urinom in se preko kanalizacijskega sistema posredno pojavijo v vodnem okolju. UV filtri v vodi pa so lahko tudi posledica industrijske uporabe UV filtrov (UV filtri v plastiki, oblačilih, barvah, avtomobilski industriji) (3, 4). V raziskavi, ki je vrednotila

dermalno absorpcijo BP3 v varovalnem izdelku za sončenje s 4 % vsebnostjo tega UV filtra, so ugotovili, da se absorbira 3,7 % BP3, medtem ko ga kar dobrih 96 % ostane na razpolago za izpiranje v vodno okolje. V letu 2008 so raziskovalci ocenili, da se na področju koralnih grebenov v vodno okolje izpere 4000 - 6000 ton varovalnih izdelkov za sončenje, medtem ko je bila v letu 2017 ocenjena količina vnosa varovalnih izdelkov v vodno okolje skoraj dvakrat večja (8000 - 16000 ton/letno). Raziskave žal že potrjujejo škodljive učinke UV filtrov (predvsem BP3) na razvoj in rast koralnih grebenov (5). Izpiranje UV filtrov so sicer s številnimi raziskavami dokazali v zelo različnih vodnih okoljih - v rečni, jezerski, morski, bazenski in odpadni vodi. Na sliki 1 je grafični prikaz najvišjih izmerjenih koncentracij UV filtrov v različnih vodnih okoljih (Slika 1). Najpogosteje zasledeni UV filtri v vodnem okolju so iz skupine benzofenonov (BP1, BP3, BP4) (6).



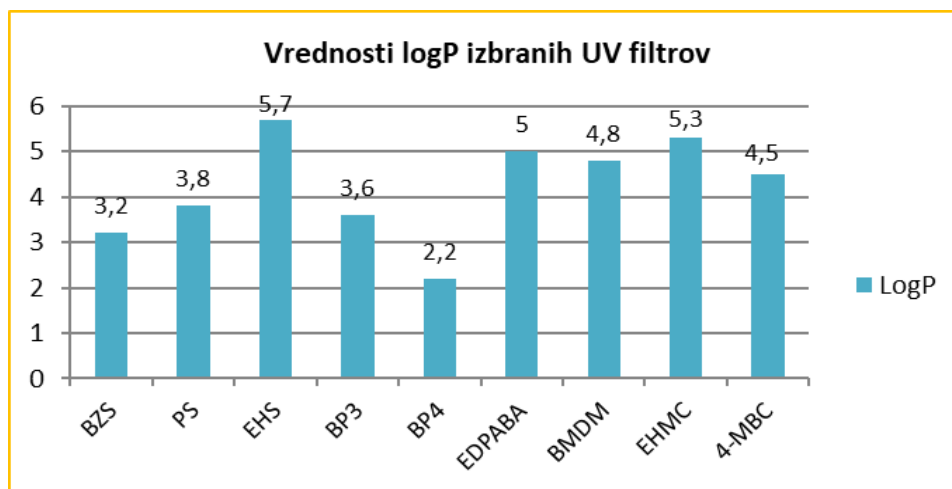
**Slika 1** Vrednosti koncentracij UV filtrov izmerjenih v rečni, jezerski, morski, bazenski in odpadni vodi. (Skupine UV filtrov: **A – benzofenoni** (benzofenon (BP), benzofenon-1 (BP1), benzofenon-2 (BP2), benzofenon-3 (BP3), benzofenon-4 (BP4), benzofenon-8 (BP8), benzofenon-10 (BP10), 2-hidroksibenzofenon (2HB), 3-hidroksibenzofenon (3HB), 4-hidroksibenzofenon (4HB), 4,4-dihidroksibenzofenon (4DHB), 4-fenilbenzofenon (4PB), 2,3,4-trihidroksibenzofenon (234THB)); **B – PABA derivati** (etilheksil dimetil PABA (EDP), oktildimetil PABA (ODP), etil 4-aminobenzoat (EtPABA)); **C – derivati kafre** (4-metilbenziliden kafa (4-MBC), 3-benziliden kafa (3BC)); **D – salicilati** (etilheksil salicilat (ES), homosalat (HMS), benzil salicilat (BZS)); **E – derivati benzimidazola** (fenilbenzimidazol sulfonska kislina (PBSA)); **F – cinamati** (2-etilheksil-4-metoksicinamat (EMC), isoamil-4-metoksicinamat (IMC), **G – krileni** (oktokrilen (OC)); **H – derivati dibenzoil metana** (Butil metoksidibenzoilmetan (BMDM), I – ostali (difenilmetanol (BH)) (Povzeto po 6)



## 1.2.2 Parametri, ki vplivajo na usodo UV filtrov v okolju

Fizikalno-kemijske lastnosti UV filtrov so tiste, ki določajo usodo in distribucijo UV filtrov v vodnem okolju. Najpomembnejši vpliv imajo lipofilni značaj (LogP), adsorpcija na organsko fazo ( $K_{oc}$ ) in bioakumulacijski faktor (BCF) UV filtrov.

**Porazdelitveni koeficient snovi (logP)** je definiran kot razmerje koncentracij spojine med organsko fazo (oktanolom) in vodno fazo pri določeni temperaturi. Poda nam informacijo o hidro-lipofilnih lastnostih učinkovine. V splošnem velja, da bodo snovi z nižjo vrednostjo LogP ( $\text{LogP} < 3$ ) bolj mobilne in bodo zaradi hidrofilnega značaja ostale v vodni fazi. Učinkovine z višjo vrednostjo LogP pa se bodo zaradi lipofilnih lastnosti nahajale v organski snovi, ki jo najdemo v sedimentu, blatu in v maščobnem tkivu organizmov. Vrednost LogP je eden glavnih parametrov, iz katerega lahko sklepamo na usodo UV filtra v okolju. Večina UV filtrov je lipofilnih in ima vrednosti LogP višje od 3, zaradi česar so nagnjeni h koncentriranju in akumulaciji v organski snovi v okolju (v blatu, sedimentu, tleh) in v prehranjevalni verigi (3). Izjema med UV filtri je BP-4, ki ima vrednost LogP nižjo od 3 in ima hidrofilni značaj, zaradi česar je verjetnost nalaganja v organski snovi v okolju manjša (4) (Slika 2).



Slika 2 Vrednosti LogP UV filtrov (vir: PubChem)

**Porazdelitveni koeficient  $K_{oc}$**  je razmerje med koncentracijo adsorbirane snovi v organski snovi in koncentracijo proste snovi v vodi.  $K_{oc}$  nam poda informacijo o mobilnosti snovi oz. kako močno se bo neka snov absorbirala v organsko snov. Nižja kot je vrednost Log  $K_{oc}$  ( $K_{oc} < 2000$ ), bolj mobilna je snov in ima zato manjšo nagnjenost k akumulaciji v organski snovi.  $K_{oc}$  večine UV

filtrrov je nad vrednostjo 2000, kar kaže na slabšo mobilnost v vodi, zato so nagnjeni k nezaželeni akumulaciji v okolju. Ponovno je izjema BP-4, ki ima  $K_{oc}$  nižji od 2000, in je zato nalaganje v organski snovi manj verjetno v primerjavi z ostalimi UV filtri (4).

**Bioakumulacijski faktor (BCF)** je merilo za sposobnost bioakumulacije v maščobnem tkivu organizma. BCF je razmerje med količino snovi v tkivu organizma (mg/kg, w/w) in količino enake snovi v okolju (mg/L oz mg/kg). Podan je lahko s številčno vrednostjo (L/kg) ali kot logBCF. Višji kot je BCF, večjo nagnjenost ima snov k bioakumulaciji. Snov z visokim BCF bo praviloma imela nizko topnost v vodi, visok logP in visok  $K_{oc}$  (4).

V študijah o usodi UV filtrov v okolju najdemo nekatere izmed prej opisanih fizikalno-kemijskih lastnosti za določene UV filtre. Zasledene vrednosti za BCF, Log P,  $K_{oc}$  in topnost smo, poleg podatkov o koncentracijah v vodnem okolju in živih organizmih, zbrali v preglednici I (preglednica I) (4).

**Preglednica I:** Vrednosti BCF, Log P,  $K_{oc}$ , topnosti in koncentracije v vodnem okolju in ribah za nekatere UV filtre. Okrajšave pri stolpcu "Koncentracija v vodnem okolju" pomenijo: J=jezero; R=reka; M=morje; W=sladkovodna voda (Povzeto po 4 in 6\*, logP rezultati, izračunani z Endocrine Disruptome).

UV filter	BCF	LogP	$K_{oc}$	Topnost (mg/L)	Konc. v vodnem okolju (ng/L)	Konc. v bazenu (ng/L)	Konc. v ribah (ng/g lw)
<b>EHS</b>	4000	3,77	Ni podatkov	28	W= do 4700	2,56 *	Ni podatkov
<b>BP3</b>	24 - 160	2,63	1259-2700	28,6 - 210	J= 2-125 R= 7 - 114 M= do 4310	4,2 - 3300	15 - 123
<b>BP4</b>	3,2	2,62	92,37	650-20290	R= 38-849 M= 38-138	3,3 - 86 *	Ni podatkov
<b>EDPABA</b>	3000-5623	4,13	2399	$5,3 \times 10^{-3}$	R= 0,2-47 J= 0,2-34	17 - 2100	Ni podatkov
<b>EHMC</b>	5900-630957	4,47	12589	0,15 - 150	J=2-92 R= 6-1040 M= 7,4-389,9	3,0-4,5	28 - 337
<b>4-MBC</b>	3236-3700	4,4	7762	0,1 - 5,1	J= 2-148 R= 12-38 M= 13,1-978,7	5,4 - 330	36 -1800

Zaradi zgoraj opisanih fizikalno-kemijskih lastnosti je večina UV filtrov in razgradnih produktov odpornih na biodegradacijo. Biodegradacija je naraven proces, s katerim se spremeni ali

razgradi kemijska snov v okolju, z namenom preprečevanja biokoncentracije. Študije okoljske onesnaženosti poročajo, da so koncentracije UV filtrov v vodnem okolju odvisne od:

- **lokacije vzorčene vode, števila kopalcev in same velikosti vodnega sistema:** Zaradi stoječe vode so višje koncentracije UV filtrov načeloma izmerjene v jezerih (koncentracije od 2-125 ng/L) kot v rekah (koncentracije od 0,2-114 ng/L). Še višje koncentracije UV filtrov pa so izmerjene v bazenih, pri katerih je glede na volumen vode največje število kopalcev in posledično največja količina izpranih izdelkov za zaščito pred sončenjem (4).

- **letnega časa in dela dneva:** Najvišje koncentracije so izmerjene ob popoldanskih urah v poletnih mesecih, ko je uporaba UV filtrov največja, kar je v raziskavi, izvedeni v Švici, dokazal Poigrer s sodelavci (4). Spomladi (v aprilu) in poleti (v juliju) so v dveh švicarskih jezerih preverjali prisotnost petih UV filtrov (MBC, EHMC, OC, BP-3 in BMDM). Koncentracije večine UV filtrov (EHMC, OC, BP3, BMDM), izmerjene v mesecu juliju, so bile višje kot v mesecu aprilu. Najvišja razlika je bila opažena pri UV filtru MBC, saj so aprila izmerili koncentracije od 2 do 9 ng/L, medtem ko so poleti njegove koncentracije segale od 9 do 82 ng/L. Najvišja izmerjena koncentracija je bila 125 ng/L za BP3 v poletnih mesecih (7).

### **1.3 Biokoncentracija in bioakumulacija UV filtrov**

Zaradi lipofilnega značaja UV filtrov ( $\text{LogP} > 3$ ) in odpornosti na biodegradacijo izkazujejo organski filtri veliko verjetnost kopičenja v maščobnem tkivu vodnih organizmov, čemur pravimo biokoncentracija. Temu procesu so izpostavljeni mnogi živi organizmi (ribe, plankton, školjke) pa tudi rastline (alge, korale) v vodi. Do vnosa UV filtrov v žive organizme lahko pride preko neposrednega zaužitja ali preko prehranjevalne verige. Čim bolj se organizem nahaja na koncu prehranjevalne verige, večje količine UV filtrov se akumulirajo v njegovem tkivu in so zato lahko koncentracije snovi v takšnem organizmu precej višje, kot pa v samem vodnem okolju, čemur pravimo bioakumulacija. V vodnem okolju se prehranjevalna veriga začne pri planktonu, ki je vir prehrane rib, te pa so precej pogost vir človeške prehrane. Ker je človek na koncu prehranjevalne verige, je vnos UV filtrov in njihovih razgradnih produktov zaradi procesa bioakumulacije zelo pomemben pri oceni varnosti (4). V maščobnem tkivu rib so v številnih raziskavah zasledili različne koncentracije UV filtrov (*Preglednica 1*). V obsežni raziskavi v Švici je

Balmer s sodelavci raziskoval prisotnost UV filtrov v vodnem okolju in ribah. Tudi v tej raziskavi so se koncentracije UV filtrov spreminjale glede na letni čas – višje so bile v toplejših mesecih (junij 2002) kot pa v bolj mrzlih mesecih (april 2002). Najvišje koncentracije v jezerih so izmerili za 4-MBC (2,7 µg/L), prav tako so v maščobnem tkivu rib izmerili najvišje koncentracije 4-MBC, in sicer 166 ng na 1 gram maščobnega tkiva (8).

#### **1.4 Razgradni produkti UV filtrov v okolju**

V vodi lahko pride do različnih mehanizmov razgradnje UV filtrov, ki so odvisni od vrste UV filtrov, lastnosti vode, pH-ja, uporabljenega dezinfekcijskega sredstva in številnih drugih faktorjev. Eden izmed razgradnih mehanizmov, ki poleg fotolize in fotoizomerizacije poteka v vodi, je halogenacija UV filtrov, ki je posledica prisotnosti halogenih elementov v vodi.

Študije, ki raziskujejo prisotnost razgradnih produktov v vodnem okolju, so redke, podatki pa so dostopni samo za določene UV filtre. Negreira s sodelavci je leta 2009 eden prvih objavil rezultate raziskave, ki so dokazali prisotnost razgradnih produktov v vodnem okolju z GC-MS analitsko metodo. Raziskovali so prisotnost razgradnih produktov benzofenonov (BP1, BP3, BP8) in salicilatov (EHS, HMS). Koncentracije BP8 in HMS so bile pod mejo detekcije. Razgradne produkte BP3 so zasledili v koncentracijah do 500 ng/L, za BP1 do 250 ng/L, najnižje koncentracije pa so izmerili za HMS in njegove razgradne produkte (do 150 ng/L) (9). V raziskavi, izvedeni leta 2016 na Poljskem, so v vodi iz bazena želeli ugotoviti, ali UV filtri v vodi reagirajo s klorom in kako dovzetni so za reakcije halogeniranja. Identificirali so razgradne produkte 7 UV filtrov (EHMC, BM-DBM, 4-MBC, OC, BP3, EHS in OD-PABA). Rezultati so pokazali, da je za reakcije halogeniranja najbolj dovzeten BP1 (najhitreje reagira in tvori največ halogeniranih stranskih produktov), sledijo pa mu EHMC, BM-DBM in OC, najmanj dovzetni za halogeniranje pa so 4-MBC, EHS in OD-PABA (10).

#### **1.5 Halogeniranje UV filtrov**

Razgradnja UV filtrov v vodi kot posledica reakcij s halogenimi elementi (klorove in bromove spojine) lahko poteka večstopenjsko preko različnih mehanizmov, med katerimi prevladujeta dva: elektrofilna aromatska substitucija in oksidacija (11). V večini raziskav in študij, ki smo jih

zasledili na temo s halogeni inducirane razgradnje UV filtrov, so na voljo ugotovitve in podatki za reakcije s klorom. Ker pa brom tekmuje s klorom za vezavo in lahko celo hitreje reagira v reakcijah substitucije (podrobneje opisano v poglavju 1.5.1.4 *Vsebnost broma*), smo pri vseh analiziranih UV filtrih poleg kloriranih predvideli še bromirane razgradne produkte.

**Elektrofilna aromatska substitucija:** Skupna strukturna značilnost vseh organskih UV filtrov je benzenov obroč, zato reakcije razgradnje pri večini UV filtrov potekajo po principu elektrofilne aromatske substitucije. Pri reakciji poteče substitucija vodikovega atoma na benzenovem obroču s halogenim elementom. Hitrost in stopnja poteka substitucije je odvisna od dveh dejavnikov:

1. **fizikalno-kemijskih parametrov**, opisanih v sledečem poglavju (koncentracija klora in broma v vodi, pH in temperature vode),
2. **funkcionalnih skupin**, ki so pripete na benzenov obroč, saj lahko le-te aktivirajo ali deaktivirajo benzenov obroč za reakcijo elektrofilne substitucije.

V kolikor so na aromatskem obroču pripete elektron-donorske funkcionalne skupine, npr. hidroksilna, aminska ali alkoksi skupina, se poveča elektronska gostota na *orto*- in *para*- mestu na aromatskem obroču, kar usmerja reakcije substitucije na ta mesta. Pri vseh analiziranih organskih UV filtrih je na aromatski obroč vezana močno donorska funkcionalna skupina (hidroksilna skupina pri salicilatih in benzofenonih; aminska skupina pri derivatih PABA; alkoksi skupina pri derivatih dibenzoilmetana in cinamatih), zaradi česar med kloriranjem in bromiranjem substitucija najprej poteče na *orto* mestu, nato pa še dalje na *para* mestu do dihalogeniranega produkta. Zasledili smo tudi podatek, da je pri BP3 mogoča še nadaljnja substitucija do trihalogeniranega produkta. Stopnja reaktivnosti fenolnih struktur s prostim klorom je poleg že omenjene močno donorske funkcionalne skupine, odvisna še od ostalih funkcionalnih skupin, pripetih na aromatski obroč in njihovih elektron-donorskih sposobnosti. Glede na pripete funkcionalne skupine na aromatski obroč se reaktivnost klora zmanjšuje po sledečem vrstnem redu: reducirane žveplove spojine > 1<sup>o</sup> in 2<sup>o</sup> amini > fenolne OH skupine > 3<sup>o</sup> amini > dvojne vezi > aromatske skupine > karbonilna skupina > amidna skupina (11).

**Oksidacija (Baeyer-Villigerjeva oksidacija):** Druga vrsta reakcije, ki poteče pod vplivom prostega klora (hipokloritne kisline), je oksidacija ketonov. Ko se klor razgradi v vodi in je v stiku z organsko snovjo, se tvori hipokloritna kislina (HOCl), ki lahko oksidira karbonilno skupino, kakršna je prisotna v strukturi benzofenonov. Pri reakciji pride do oksidativne prekinitve C-C vezi ob karbonilni skupini, zaradi česar se keton pretvori v ester. Takšni reakciji pravimo Baeyer-Villigerjeva oksidacija in poteče po reakciji elektrofilne substitucije fenolnega obroča (12).

**Cepitev vezi:** Obema reakcijama substitucije in oksidacije lahko sledijo še nadaljnje reakcije cepitve vezi. Pri določenih pogojih lahko pride do hidrolize estrske vezi ali do oksidativne cepitve benzenovega obroča. Halogenacija lahko potem poteče ponovno na produktih po cepitvi vezi (13).

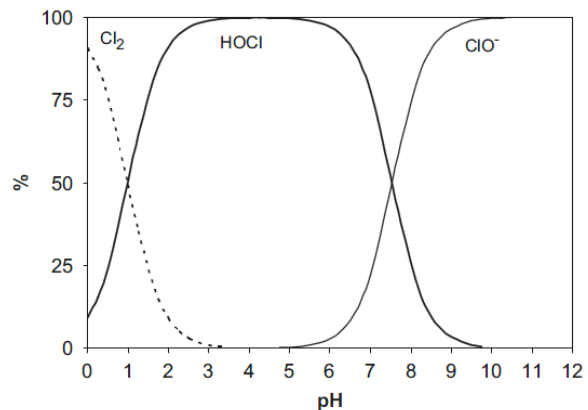
Ali bodo zgoraj opisane reakcije potekle in kaj bo končni produkt, je v največji meri odvisno od vrednosti pH vode, ki določa, v kateri obliki se bo nahajal klor (oz. brom). Pri alkalnih vrednostih pH (pH=11) se klor nahaja v obliki hipokloritnega iona ( $\text{ClO}^-$ ), ki ima elektrofilni značaj, zaradi česar bo potekala samo reakcija elektrofilne aromatske substitucije, nadaljnje reakcije razgradnje pa niso mogoče. Pri nevtralnem pH-ju (pH=7,4) je klor prisoten v obliki HClO in  $\text{ClO}^-$ . Pri takšni vrednosti pH lahko HClO oksidira karbonilno skupino do estra (Bayer-Villigerjeva oksidacija), poleg tega pa lahko HClO zaradi močnega oksidativnega značaja cepi še benzenov obroč. Pri kislem pH (pH=4,6) prevladuje HClO, zato razgradnja poteka po enakem principu razgradnje kot pri nevtralnem pH, dodatno pa lahko pride še do hidrolize estrske vezi (14).

### 1.5.1 Vpliv parametrov na halogeniranje UV filtrov

Najpogostejša reakcija halogeniranja je aromatska substitucija, pri kateri pride do zamenjave vodika na aromatskem obroču s klorovim ali bromovim atomom. Posledično se tvorijo mono-, di- ali redkeje trihalogenirani produkti. Možne reakcije kot posledice halogenacije so še: oksidacija karbonilne skupine, hidroliza in hidroksilacija, ki jih bomo na proučevanih UV filterih bolj podrobno opisali kasneje (15). Hitrost in stopnja halogeniranja UV filtrov je posledica več različnih parametrov: **lastnosti vode** (vsebnosti naravno prisotnih halogenih elementov in količine dezinfekcijskega sredstva), **vsebnosti broma**, **pH vrednosti** in **temperature vode**.

### 1.5.1.1 pH

V odvisnosti od vrednosti pH raztopine se klor v vodi lahko nahaja v treh oblikah: molekularni klor ( $\text{Cl}_2$ ) pri  $\text{pH} < 4$ ; nedisociirana hipokloritna kislina ( $\text{HOCl}$ ) (šibka kislina) pri  $\text{pH}$  med 4 – 5 in hipokloritni ion ( $\text{OCl}^-$ ) pri  $\text{pH} > 11$  (močna konjugirana baza) (Slika 3). Pri  $\text{pH}$  okoli 7,5 sta  $\text{HOCl}$  in  $\text{OCl}^-$  v enakem razmerju.  $\text{pH}$  vrednosti vode v bazenih se gibljejo med 6,5 in 8,5, zato je običajno klor prisoten v obliki  $\text{HOCl}$  in/ali  $\text{OCl}^-$  (1).



Slika 3: Prikaz relativne porazdelitve vseh treh oblik klora, ki jih najdemo v vodni raztopini 0,1 M  $\text{Cl}_2$ , v odvisnosti od spremembe  $\text{pH}$ -ja pri 25 °C.

Velja, da je  $\text{HOCl}$  bolj reaktivna kot  $\text{OCl}^-$ , kar pomeni, da so reakcije halogeniranja bolj pogoste, ko se kislinsko-bazično ravnotežje premakne na stran nevtralne oblike kisline (17, 18).

### 1.5.1.2 Naravno prisotni halogeni elementi v vodi

V sladkovodnih vodah in morju so raztopljene različne snovi, med njimi tudi halogen-vsebujoče snovi, katerih vrsta in koncentracija sta odvisni od področja, kjer voda izvira, torej od geologije dna. Klor v obliki kloridnih ionov  $\text{Cl}^-$  predstavlja večinski delež raztopljenih ionov, poteg pa najdemo še bromidne, magnezijeve, natrijeve, kalijeve, kalcijeve in sulfatne ione. Do povišanja vsebnosti kloridnih ionov v vodih sistemih pa lahko pride tudi zaradi industrijskega onesnaževanja, kloriranja pitne in bazenske vode, uporabe kemičnih mehčalcev vode, katerih glavna sestavina je  $\text{NaCl}$ , in uporabe soli za ceste (16).

### 1.5.1.3 Halogeni elementi kot posledica sterilizacije vode

Vodo, se z namenom zagotavljanja ustrezne mikrobiološke kakovosti, dezinficira z uporabo kemičnih sredstev, med katerimi se najpogosteje uporablja klor v obliki elementarnega klora ( $\text{Cl}_2$ ), raztopine natrijevega hipoklorita ( $\text{NaOCl}$ ), kalcijevega hipoklorita ( $\text{Ca(OCl)}_2$ ) in klorovega dioksida ( $\text{ClO}_2$ ). Halogeni elementi se ob procesu dezinfekcije v vodi pojavljajo v prosti ali vezani obliki. Med dezinfekcijo se klor veže na proste organske snovi (bakterije), prosti klor pa je tisti,

ki ostaja na voljo za dezinfekcijo ter je hkrati vzrok za reakcije halogenacije z ostalimi snovmi, ki so še prisotne v vodi (tudi z UV filtri) (16).

#### **1.5.1.4 Vsebnost broma**

Prav tako kot klor je tudi brom v vodi naravno prisoten - v nižjih koncentracijah v sladkovodni vodi, v višjih koncentracijah pa se nahaja v morski vodi. Brom se lahko uporabi kot dolgotrajno dezinfekcijsko sredstvo za bazenske vode (15). Prosti klor v vodi oksidira brom do hipobromitne kisline (HOBr) in bromidnega iona ( $\text{Br}^-$ ), ki je v vodi v ravnovesju z HOCl in  $\text{ClO}^-$ . Brom zato »tekmuje« s klorom (HClO) v reakcijah halogenacije z UV filtri v vodi. Raziskave so pokazale, da sistem HOBr/ $\text{OBr}^-$  hitreje in učinkoviteje reagira v reakcijah substitucije kot HOCl/ $\text{OCl}^-$ , zato so lahko koncentracije bromiranih stranskih produktov celo višje, kot če bi na to sklepali le iz razmerja med  $\text{Br}^-/\text{Cl}^-$  ioni. Iz tega razloga smo tudi sami pri analizi razgradnje UV filtrov upoštevali klorirane in bromirane razpadne produkte (15, 17).

#### **1.5.1.5 Temperatura**

Višja kot je temperatura vode, hitreje potekajo reakcije halogenacije. Ta parameter sovпада s poletnim letnim časom, ko sta poraba in prisotnost UV filtrov v vodnem okolju najvišja in so zato reakcije halogenacije UV filtrov zaradi višjih temperatur vode še bolj verjetne (15).

## **1.6 Endokrini sistem**

Pri ljudeh, živalih in rastlinah delovanje omogoča sistem kemijskih molekul, ki kontrolirajo in usmerjajo številne osnovne življenjske procese. V mnogoceličnih organizmih je za normalno delovanja telesa nujno usklajeno delovanje dveh ločenih sistemov: živčevja in endokrinega sistema. Endokrini sistem nadzoruje in usmerja rast, razvoj, reprodukcijo, vzdržuje homeostazo in pravičen metabolizem. Pri živalih in ljudeh ta sistem upravljajo žleze, ki proizvajajo kemijske prenašalce informacij, ki jim pravimo hormoni. Glavne žleze z notranjim izločanjem so hipofiza, epifiza, obščitnica, trebušna slinavka, priželjc, nadledvični žlezi, hipotalamus, ščitnica in spolne žleze (jajčniki in moda). Vsaka žleza neposredno v kri izloča enega ali več hormonov, ki jih nato dostavi do svojih tarčnih receptorjev v telesu (16).



Hormoni se v ciljnem organu v celici vežejo na točno določeno vezavno mesto na svojem receptorju. Posledica vezave na receptor je sprememba konformacije receptorja, ki omogoči prenos signala, kar sproži specifičen fiziološki odgovor v telesu. Učinek spojine na prenos signala se izraža v intrinzični aktivnosti. Glede na intrinzično aktivnost, delimo hormone na: agoniste, delne oz. parcialne agoniste, inverzne agoniste alosterične modulatorje in antagonist. Agonist se veže na receptor in ga aktivira, kar ima za posledico biološki odgovor, antagonist pa zavira vezavo agonista na receptor, posledica je izostanek biološkega odgovora. Ločimo kompetitivne, nekompetitivne, akompetitivne in ireverzibilne antagonist. Po strukturi delimo hormone na tri skupine: peptide in proteine, steroidne hormone in na derivate aminokislin (19).

### **1.6.1 Receptorji**

Biološki učinek je odvisen od jakosti in učinkovitosti delovanja hormonov na receptor. Receptorji imajo zelo visoko afiniteto za določen hormon, zato učinkujejo že pri zelo nizkih koncentracijah in so odgovorni za kemijsko regulacijo delovanja organizma. Celični odzivi, ki so posledica vezave liganda na receptor, so lahko različno hitri – nastopijo lahko v zelo kratkem času ali šele po nekaj urah, dnevih ali tednih. Kljub visoki afiniteti za telesu lastne hormone, pa so receptorji zmožni vezave tudi drugih spojin, če le-te ustrezajo določenim zahtevam (20).

### **1.6.2 Hormonski motilci**

V primeru motenega in nepravilnega izločanja ali delovanja hormonov se to izraža v porušnem hormonskem ravnovesju, kar se lahko kaže na različne načine. Razlogov za pojav hormonskega neravnovesja je več. Lahko so endogenega izvora: starost, dedni vzroki, nosečnost, kar je posledica delovanja naravnih hormonov v telesu, ki vsebujejo estrogene (npr. estron (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), progesteron in testosteron) (15). Eksogenega izvora pa so hormonski motilci (HM) – kemijske snovi (naravne, sintezne snovi ali razgradni in stranski produkti prej omenjenih snovi), ki jih najdemo v okolju in lahko vplivajo na delovanje endokrinega sistema, če dosežejo mejno vrednost za doseganje učinka. Med znane HM spadajo UV filtri. Ker pa UV filtri ob izpiranju v vodo podležejo razgradnji, imajo lahko tudi njihovi razgradni produkti vpliv na endokrini sistem, vendar o teh učinkih (trenutno) še ni veliko znanega.

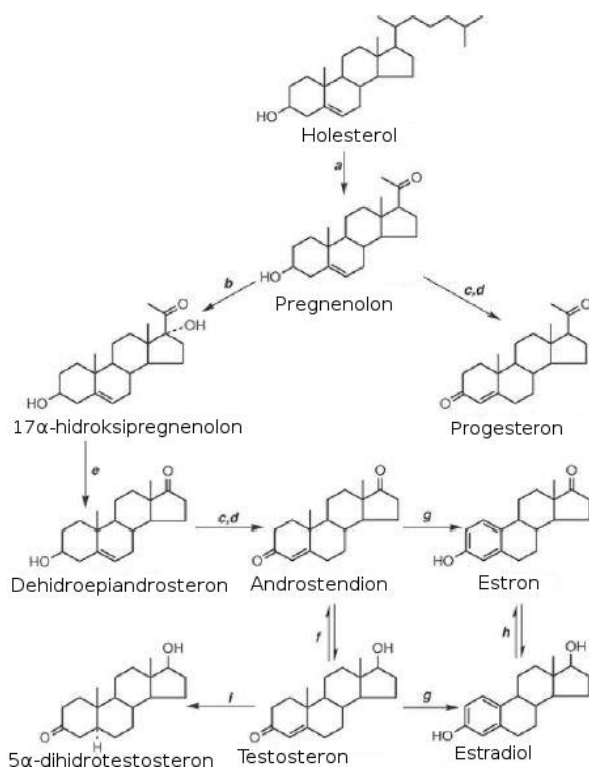
Do endokrine motnje v telesu pride, ko se HM vežejo na hormonske receptorje in na tak način spremenijo naravni odziv telesa, posledično je porušeno ravnotežje endokrinega sistema tako živali (vodnih in kopenskih) in ljudi. HM so eksogene kemijske substance, ki vplivajo in spreminjajo delovanje endokrinega sistema, posledica česar so različni učinki v organizmu pri izpostavljeni populaciji (definicija po US EPA; ang. United States Environmental Protection Agency) (21).

#### **1.6.2.1 Delovanje hormonskih motilcev**

Obstajajo številni mehanizmi, s katerimi lahko snovi vplivajo na delovanje endokrinega sistema. Delujejo lahko na nivoju interakcije s hormonskimi receptorji. Najpogostejša mehanizma HM na tem nivoju sta agonistični in antagonistični učinek. Agonističen učinek HM doseže, ko se veže na receptor in sproži odziv s posnemanjem konformacije naravnega liganda. V primeru antagonističnega učinka pa HM tekmuje z naravnim ligandom za vezavno mesto na receptorju, zato je prenos signala zavrt in fiziološki učinek preprečen. Sam učinek vezave HM na receptor ne sovпада nujno s stopnjo afinitete vezave na receptor. HM ima lahko zelo nizko afiniteto do receptorja, a kljub temu povzroči močan odziv. Poleg omenjenega antagonističnega in agonističnega učinka lahko HM vplivajo tudi na število hormonskih receptorjev in stopnjo izražanja določenega receptorja.

Drug nivo delovanja HM predstavlja vpliv na biosintezo, metabolizem, sproščanje in odstranitev hormonov. HM imajo najpogosteje estrogeno ali antiestrogeno aktivnost, lahko pa delujejo tudi kot androgeni ali imajo antiandrogeno delovanje (22). Estrogeni (ženski spolni hormoni) in androgeni (moški spolni hormoni) so specifični steroidi, ki imajo pomembno vlogo pri reprodukciji, nevroendokrinem sistemu in spodbujajo razvoj sekundarnih spolnih znakov. Endogeni estrogeni so v strukturnem smislu steroidi z 18 ogljikovimi atomi in aromatskim obročem, na katerega je na mestu 3 pripeta hidroksilna skupina. V človeškem telesu (estrogeni so sicer značilni ženski hormoni, vendar so prisotni tudi pri moškem) so prisotni trije endogeni estrogeni: estradiol, estron in estriol (23). Primarni androgen pri moških pa je testosteron in uravnava delovanje spolnih organov, spermatogeneze in ima pomembno metabolično aktivnost. Biosinteza estrogenov se v endokrinih tkivih pod vplivom gonadotropinov začne s

holesterolom, ki se metabolizira do progesteronov (progesteron, 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron, pregnenolon) in moških spolnih hormonov androgenov (testosteron, 5 $\alpha$ -dehidroepiandrosteron, 4-androsten-3,17-dion, 5 $\alpha$ -dihidrottestosteron, 11-ketotestosteron). Pri običajnih pogojih se androgeni v nadaljevanju metabolizirajo do estrogenov. Biosintezo spolnih hormonov katalizirajo encimi v posebnih tkivih ali žlezah. Sproščanje hormonov urejajo mehanizmi, nadzorovani s strani hipotalamusa in hipofize. Na sliki 4 je prikazana biosinteza steroidnih spolnih hormonov s pripadajočimi encimi (23, 24).



**Slika 4:** Biosinteza steroidnih spolnih hormonov. Encimi na sliki predstavljajo: (a) encim za cepitev stranske verige holesterola - P450<sub>sc</sub>, (b) 17 $\alpha$ -hidroksilaza, (c) 5-en-3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza, (d) 3-oksosteroid-4,5-izomeraza, (e) 17,20-liaza, (f) 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza, (g) aromataza, (h) estradiol dehidrogenaza in (i) 5 $\alpha$ -reduktaza (1).

## 1.7 In silico metode za napovedovanje toksičnosti

Za napovedovanje toksičnosti spojin se poleg klasičnih *in vitro* in ter *in vivo* študij vse pogosteje uporabljajo *in silico* metode. Izraz *in silico* opisuje tehnike, ki se izvajajo s pomočjo računalniške simulacije. *In silico* metode so netestne metode in jih omogočajo posebni programi, ki vključujejo (Q)SAR modele in podatkovne baze. Program lahko na podlagi kemijske strukture spojine z računalniškim modeliranjem, uporabo algoritmov in različne programske opreme

kvantitativno in kvalitativno napove oz. predvidi fizikalno-kemijske lastnosti spojin, njihovo aktivnost in toksikološke lastnosti, ter tudi kakšna je usoda teh snovi v okolju (25). Metoda modeliranja obsega 5 temeljnih korakov pri razvoju modela predvidevanja: 1) Zbiranje podatkov o povezavi med kemijskimi snovmi in končnimi točkami toksičnosti, 2) računanje molekulskih deskriptorjev snovi 3) generiranje modela napovedovanja 4) ovrednotenje natančnosti modela in določanje področja uporabe modela in 5) razlaga in vrednotenje rezultatov. Napovedi, ki se nahajajo izven območja uporabnosti modela, so nezanesljive in jih zato ne moremo upoštevati kot uporabne (26, 27).

### **1.7.1 Prednosti in slabosti *in silico* metod**

*In silico* metode so v primerjavi z *in vitro/in vivo* študijami predvsem hitrejše, enostavnejše in cenejše za uporabo. Poleg tega lahko z uporabo *in silico* metod nadomestimo (del) testiranja na živalih, kar je pod določenimi pogoji v Evropski uniji od leta 2006 dovoljeno z Uredbo REACH. Slabost *in silico* metod je vprašljiva zanesljivost in točnost pridobljenih rezultatov. Včasih ni jasno definiranega območja uporabnosti modela. Zato velja, da pri oceni tveganja in razvrščanju snovi prednostno upoštevamo rezultate poskusov in meritev, dobljenimi v študijah *in vitro/in vivo*, pred rezultati, pridobljenimi z *in silico* metodami s pomočjo QSAR modelov (27, 28).

### **1.7.2 *In silico* metode za napovedovanje ekotoksikološkega vpliva**

*In silico* metode uporabljamo tudi za napovedovanje usode snovi v okolju in njihovo ekotoksičnost, saj so v največji meri odvisni od fizikalno-kemijskih lastnosti snovi. Temeljne lastnosti snovi, ki vplivajo na usodo snovi v okolju in so ključne za pravilno *in silico* napoved preko QSAR modela, so: molekulska masa snovi, topnost, konstanta  $k_H$ , parni tlak, logP in sposobnost biodegradacije. Z upoštevanjem teh lastnosti se lahko z *in silico* metodami napove hitrosti biodegradacije, pridobi informacije o BCF faktorju, o kronični in akutni toksičnosti ( $LC_{50}$  in  $LD_{50}$ ) za različne živalske vrste (za ribe, čebele, plankton, glodavce), biološki aktivnosti snovi in njihovi nagnjenosti k nalaganju in akumuliranju v organski snovi (v sedimentu, blatu ali vodi) (25, 27).

Trenutno je dostopnih veliko število programov, ki omogočajo *in silico* napoved (eko)toksikoloških lastnosti: program VegaNIC (<https://www.vegahub.eu/>), Endocrine

Disruptome(<http://endocrinedisruptome.ki.si/>), T.E.S.T. (The Toxicity Estimation Software Tool),  
Pass (<http://www.akosgmbh.de/pass/>), Meteor Nexus, ToxCast in Tox21 in ostali programi.

## 2 Načrt za delo

Vnos UV filtrov v vodno okolje, njihova razgradnja in posledično vnos teh razgradnih produktov v človeško telo so procesi, katerim se ob tako obsežni in vesplošni uporabi UV filtrov ne moremo izogniti. Obstaja velika vrzel v eksperimentalnih podatkih o usodi UV filtrov v okolju in produktih, na katere lahko ti razpadejo. Po pregledu razpoložljive literature smo ugotovili, da je toksikološki profil razgradnih produktov večine UV filtrov (razen nekaj izjem) v večji meri še neraziskan ali pa so podatki pomanjkljivi, saj je takšne učinke težko in dolgotrajno preučevati s pomočjo *in vitro* in *in vivo* študij. V okviru naloge bomo zato s pomočjo *in silico* metod najprej predvideli okoljsko usodo preiskovanih UV filtrov in razgradnih produktov, raziskali ekotoksikološki profil z napovedjo akutne toksičnosti (LC<sub>50</sub>) ter napovedali njihovo endokrino delovanje. Nato pa bomo na podlagi dobljenih rezultatov ocenili, kateri UV filtri in njihovi razgradni produkti so s stališča varnosti najbolj pomembni za nadaljevanje raziskovanje tako z *in silico*, kot z *in vitro/in vivo* raziskavami.

V sklopu magistrske naloge bomo:

- pregledali razpoložljive literaturne podatke o uporabljenih UV filterih in razgradnih produktih, ki so posledica razgradnih reakcij halogenacije.
- S programom VegaNIC bomo ocenili ekotoksikološki profil UV filtrov in razgradnih produktov. Z modelom *Daphnia Magna* LC<sub>50</sub> 48h (EPA) bomo napovedali vrednosti smrtne koncentracije LC<sub>50</sub> za planktonsko vrsto rakca *Daphnia Magna* (Velika vodna bolha), ter tako sklepali na akutno toksičnost snovi. Zanimalo nas bo tudi, kakšen vpliv ima logP na spremembo LC<sub>50</sub>.
- S programom VegaNIC bomo ocenili usodo UV filtrov in razgradnih produktov v okolju. Z modelom Ready Biodegradability model (IRFMN) bomo določili verjetnost biološke razgradnje glede na parameter P/vP. Z modelom Persistence (sediment) model (IRFMN) bomo ocenili verjetnost biokoncentracije UV filtrov in razgradnih produktov v organski snovi sedimenta. Z modelom BCF Model (CAESAR) pa bomo pridobili podatke o faktorju bioakumulacije (BCF), iz katerega bomo sklepali, ali lahko raziskovane snovi preko prehranjevalne verige stopijo v človeško telo.

- S programoma VegaNIC in Endocrine Disrupome bomo ocenili in napovedali endokrino toksičnost na podlagi verjetnosti vezave UV filtrov in razgradnih produktov na določene jedrne receptorje. Pozorni bomo predvsem na razgradne produkte, ki bi zaradi večje verjetnosti vezave lahko imeli bolj izrazit endokrini učinek, kot izvorni UV filter.
- S pomočjo zbranih podatkov o okoljskem vplivu, ekotoksikoloških podatkih in endokrini toksičnosti bomo ocenili, kakšni so učinki razgradnih produktov UV filtrov na ljudi in ali bi lahko bili potencialni hormonski motilci. Določili bomo najbolj varen in najbolj toksičen UV filter. Dobljene rezultate in ugotovitve bomo ovrednotili in primerjali z literaturnimi podatki raziskav, ki so bile izvedene *in vitro* in *in vivo*.

### 3 Metode in materiali

V nalogi smo se osredotočili na raziskovanje usode UV filtrov po prehajanju v vodno okolje. To področje je bilo v preteklih letih precej skopo raziskano, vendar pa je v zadnjih letih naraslo zanimanje o usodi UV filtrov, ko preidejo v okolje. Povečalo se je število raziskav, ki preučujejo koncentracije UV filtrov v okolju, ali se lahko bioakumulirajo, ali imajo lahko njihovi razgradni produkti učinke na ljudi in živali itd. Zato smo na začetku pisanja naloge najprej naredili pregled razpoložljive literature na to tematiko. Tako smo pridobili informacije, kateri UV filtri podležejo razgradnji ob prisotnosti reaktivnih halogenih spojin in kakšni razgradni produkti nastanejo. Ob pregledu literature smo ugotovili, da so pri večini UV filtrov uspeli dokazati nastanek mono- ali dikloriranih produktov. Ker pa najdemo v vodi naravno prisoten tudi brom, poleg tega pa je za zagotavljanje mikrobiološke kakovosti bazenske vode vse pogosteje kot dezinfekcijsko sredstvo uporabljen tudi brom, smo pri vsakem UV filtru predvideli še mono- in dibromirane razgradne produkte. Na podlagi pridobljenih informacij iz literaturnih virov ter predvidenih razgradnih produktov smo v nalogo vključili 9 UV filtrov iz 6 strukturno različnih skupin UV filtrov:

#### 1. SALICILATI

- Benzil salicilat (BZS) - elektrofilna aromatska substitucija (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>); št. RP=4 (18)
- Fenil salicilat (PS) - elektrofilna aromatska substitucija (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>); št. RP=4 (18)
- Etilheksil salicilat (EHS) - elektrofilna aromatska substitucija (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>); št. RP=4 (18)

#### 2. BENZOFENONI

- Benzofenon-3 (BP3) - elektrofilna aromatska substitucija (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>), oksidacija, cepitev vezi; št. RP=9 (13, 29)
- Benzofenon-4 (BP4) - elektrofilna aromatska substitucija (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>), oksidacija, cepitev vezi; št. RP=9 (30)

#### 3. DERIVATI PABA

- Etilheksil dimetil PABA (EDPABA) - elektrofilna aromatska subst. (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>); št. RP=4 (31)

#### 4. DERIVATI DIBENZOILMETANA

- Butil metoksidibenzoilmetan(BMDM)-elektrofilna aromatska subst. (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>); št. RP=4 (32)

#### 5. CINAMATI

- 2-etilheksil-4-metoksicinamat(EHMC) - elektrofilna aromatska subst.(Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>); št.RP=4 (33)

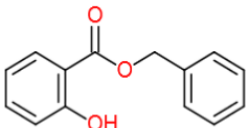
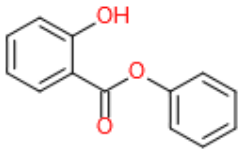
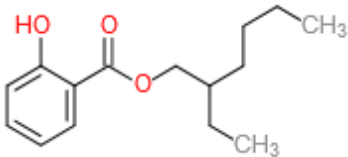
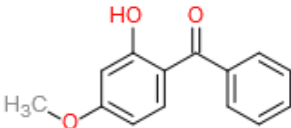
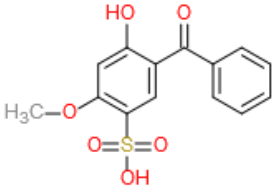
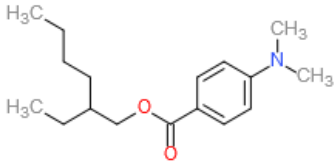
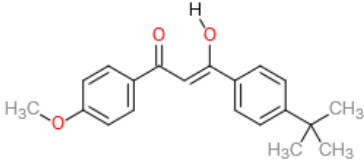
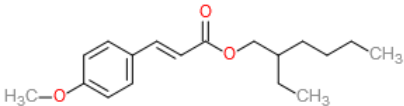
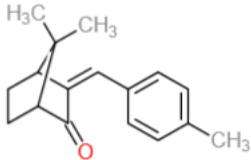
#### 6. DERIVATI KAFRE

- 4-metilbenziliden kafra (4-MBC) - elektrofilna aromatska substitucija (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>); št. RP=4 (18)



V preglednici II so prikazani vsi preučevani UV filtri s pripadajočo strukturno formulo, SMILES kodo in CAS številko.

**Preglednica II:** Preučevani UV filtri s strukturno formulo, SMILES kodo in CAS številko.

SALICILATI		
<p><b>Benzil salicilat (BZS)</b></p>  <p>CAS št.: 118-58-1  <chem>c1c(c(ccc1)C(=O)OCc1ccccc1)O</chem></p>	<p><b>Fenil salicilat (PS)</b></p>  <p>CAS št. 118-55-8  <chem>c1c(cccc1)C(=O)Oc1ccccc1)O</chem></p>	<p><b>Etilheksil salicilat (EHS)</b></p>  <p>CAS št. 118-61-6  <chem>CCCCC(CC)COC(=O)c1ccccc1O</chem></p>
BENZOFENONI		DERIVATI PABA
<p><b>Benzofenon-3 (BP3)</b></p>  <p>CAS št. 131-57-7  <chem>c1(c(ccc(c1)OC)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><b>Benzofenon-4 (BP4)</b></p>  <p>CAS št. 4065-45-6  <chem>c1(c(cc(c(c1)OC)S(=O)(=O)[O])C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><b>Etilheksil dimetil PABA (EDPABA)</b></p>  <p>CAS št. 21245-02-3  <chem>c1c(ccc(c1)C(=O)OCC(CC)CCCC)N(C)C</chem></p>
DERIVATI DIBENZOILMETANA	CINAMATI	DERIVATI KAFRE
<p><b>Butil metoksi dibenzoilmetan (BMDM)</b></p>  <p>CAS št. 70356-09-1  <chem>c1c(ccc(c1)OC)C(=CC(=O)c1ccc(cc1)C(C)(C)C)OC</chem></p>	<p><b>2-etilheksil-4-metoksicinamat (EHMC)</b></p>  <p>CAS št. 5466-77-3  <chem>c1c(ccc(c1)OC)/C=C/C(=O)OCC(CCCC)CC</chem></p>	<p><b>4-metilbenziliden kafra (4-MBC)</b></p>  <p>CAS št. 36861-47-9  <chem>c1cc(ccc1/C=C\1/C2CCC(C1=O)C2(C)C)C</chem></p>

### 3.1 Uporabljeni računalniški programi

V nadaljevanju naloge smo s pomočjo izbranih računalniških programov ovrednotili izbrane UV filtre in njihove razgradne produkte *in silico*. Za analizo smo uporabili dva računalniška programa: Endocrine Disruptome in VegaNIC. Oba sta prosto dostopna na spletu.

#### 3.1.1 Program VegaNIC

VegaNIC je program, ki po namestitvi na računalnik deluje s pomočjo prenosljivega programskega jezika Java in za uporabo ne zahteva spletne povezave ter podatkov ne prenaša preko interneta. Rezultati so podani v formatu csd ali pdf. Razvili so ga v sklopu platforme VEGA HUB v Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri v Milanu (Italija). Program VegaNIC je dostopen za brezplačen prenos na povezavi: <https://www.vegahub.eu/>.

Program nam ponuja možnost izbire med 4 skupinami modelov za napoved toksikoloških lastnosti (12 modelov), ekotoksikoloških lastnosti (5 modelov), okoljski vpliv (7 modelov) in fizikalno-kemijske lastnosti izbranih spojin (3 modeli). Modeli temeljijo na različnih podatkovnih bazah. Program nam ponudi kvalitativne ali kvantitativno razvrstitev izbranih spojin (odvisno od modela). V nalogi smo uporabili naslednje modele:

TOKSIČNOST:

- **Estrogen receptor Relative Binding Sffinitx model (IRFMN)**; za napoved endokrine toksičnosti.

EKOTOKSIČNOST:

- **Model *Daphnia Magna* LC50 48h (EPA)**; za napoved akutne toksičnosti preko LC<sub>50</sub>.

OKOLJSKI VPLIV:

- **Persistence (sediment) model (IRFMN)**; za napoved odpornosti proti biodegradaciji in obstojnosti v sedimentu.
- **Ready Biodegradability model (IRFMN)**; za napoved verjetnosti biološke razgradnje.
- **Model BCF**: za napoved faktorja biokoncentracije.

### 3.1.2 Program Endocrine Disruptome

Program Endocrine Disruptome je računalniški program, s katerim lahko napovedujemo endokrine učinke izbranih spojin. Razvili so ga leta 2014 na Fakulteti za Farmacijo v sodelovanju s Kemijskim inštitutom v Ljubljani. Do programa lahko brezplačno dostopamo na naslovu: <http://endocrinedisruptome.ki.si/>.

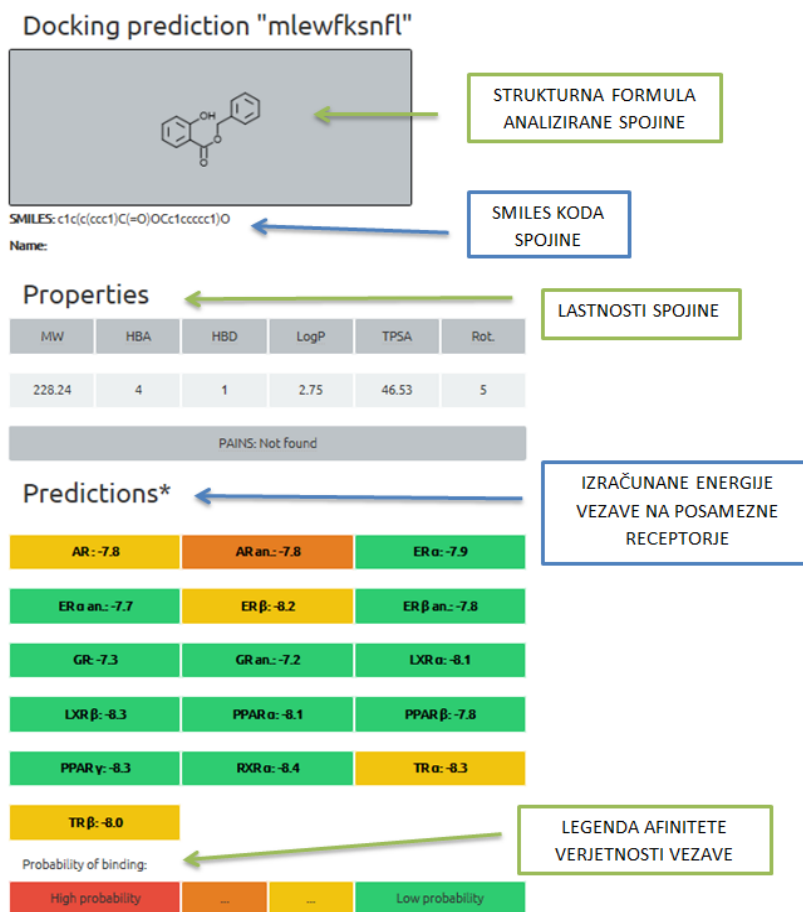
Program deluje na platformi DoTS – Docking interface for Target Systems, ki uporablja program AutoDock Vina za napoved sidranja preučevanih spojin v predhodno validirane strukture ligandov. Analizirano spojino lahko narišemo s pomočjo programa ChemDoodle Sketcher ali jo vnesemo v obliki SMILES kode. Mi smo pri izdelavi naloge vse UV filtre in njihove razgradne produkte narisali s pomočjo programa in tako dobili tudi SMILES kode vseh UV filtrov in razgradnih produktov. Program poleg napovedi afinitete vezave na receptorje izračuna še naslednje lastnosti spojine: molekulska masa (MW), število akceptorjev vodikove vezi (HBA), število donorjev vodikove vezi (HBD), lipofilnost (LogP) in polarnost molekule (TPSA). Za namene naloge smo v nalogi upoštevali LogP vrednosti.

Program nam poda afiniteto vezave za **12 receptorjev**:

- Androgenski receptor (AR) – naravna liganda sta testosteron in dihidrotestosteron
- Estrogenski receptor alfa (ER  $\alpha$ ) – naraven ligand je 17 $\beta$ -estradiol
- Estrogenski receptor beta (ER  $\beta$ ) – naravni ligandi so 17 $\beta$ -estradiol, fitoestrogeni, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol
- Glukokortikoidni receptor (GR) – naravni ligandi so glukokortikoidi (endogeni: kortizol, kortikosteron)
- Jetrna X receptorja alfa in beta (LXR  $\alpha$  in LXR  $\beta$ ) – naravni ligandi so oksisteroli
- Receptorji, aktivirani s proliferatorjem peroksisomov (PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\beta$ , PPAR  $\gamma$ ) – vezava proliferatorjev peroksisomov
- Retinoidni X receptor alfa (RXR  $\alpha$ ) – naravni ligand je retinojska kislina
- Tiroidna receptorja (TR  $\alpha$  in TR  $\beta$ ) – naravni ligand je trijodtironin (20).

Za receptorje AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$  in GR program napove vezave za dve različni konformaciji, na agonistično in antagonistično konformacijo (oznaka »an« poleg receptorja). Rezultati napovedi so obarvani glede na stopnjo verjetnosti vezave: rezultati z **rdečo** imajo najvišjo verjetnost vezave, z **oranžno** imajo visoko verjetnost, z **rumeno** srednjo verjetnost in z **zeleno** nizko

verjetnost vezave na analizirani receptor. Rezultati so podani še kvantitativno s številkami, ki pomenijo vrednost proste energije vezave, izražene v kcal/mol in so določene za vsak receptor posebej. Bolj kot je številka negativna, večja je verjetnost vezave spojine na receptor (Slika 5) (20).



Slika 5: Prikaz rezultatov programa Endocrine Disruptome

## 3.2 Pregled baz podatkov

### 3.2.1 PubChem

PubChem je podatkovna zbirka spojin in drugih snovi, ki jo vzdržuje Narodni center biotehnoloških informacij. Podatkovna zbirka PubChem je prosto dostopna na spletni strani <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Vključuje informacije iz treh podatkovnih baz: PubChem Substance (informacije o spojinah), PubChem Compound (informacije o strukturi spojin) in

PubChem BioAssay (informacije o biološki aktivnosti spojin). Na osnovi kemijskega imena UV filtra smo s pomočjo podatkovne zbirke podatkov PubChem pridobili informacije o sinonimih, ki se uporabljajo za določen UV filter ter podatke o IUPAC imenu, strukturni in molekulski formuli, CAS številki in podatke o toksičnosti izbranih UV filtrov (34, 35).

### 3.2.2 Academic Search Complete in PubMed

Preko podatkovnih zbirk Academic Search Complete in PubMed smo pregledali literaturo dostopno na medmrežju na temo razgradnje UV filtrov v prisotnosti reaktivnih halogenih spojin. Do zbirke Academic Search Complete smo dostopali preko uporabniškega vmesnika EBSCOHost, PubMed pa je brezplačna zbirka podatkov dostopna vsem uporabnikom. Obe bazi podatkov smo uporabili z namenom pridobiti članke, ki vsebujejo informacije:

- kateri UV filtri podležejo razgradnji ob prisotnosti reaktivnih halogenih spojin,
- kakšni razgradni produkti nastanejo ob razgradnji UV filtrov,
- kakšne so znane koncentracije v okolju, živalih in ljudeh,
- katere poti vnosa v človeško telo so mogoče,
- kakšni so do sedaj znani endokrini učinki preučevanih UV filtrov.

Iskanje literature smo omejili s ključnimi besedami (*degradation products of UV filters, chlorination, bioconcentration of UV filters, UV filters bioaccumulation in fish, concentrations of UV filters in water, in silico prediction of endocrine activity, ecotoxicological effects of UV filters ipd.*). Osredotočeni smo bili na članke, ki so bili zadnji objavljeni na iskano temo.

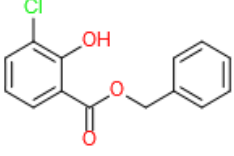
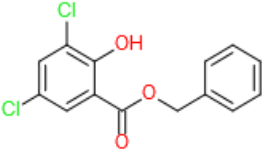
## 4 Rezultati in razprava

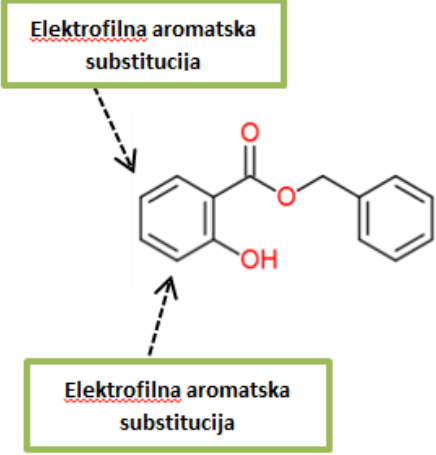
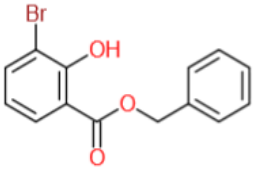
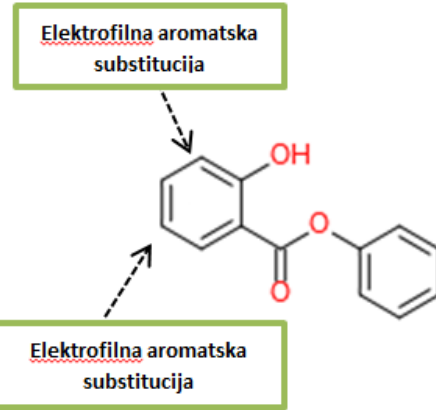
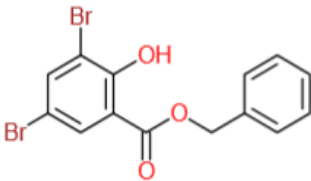
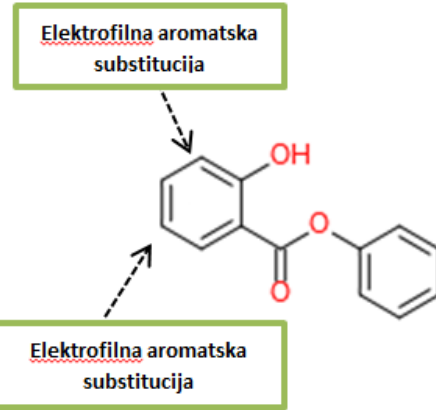
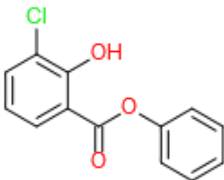
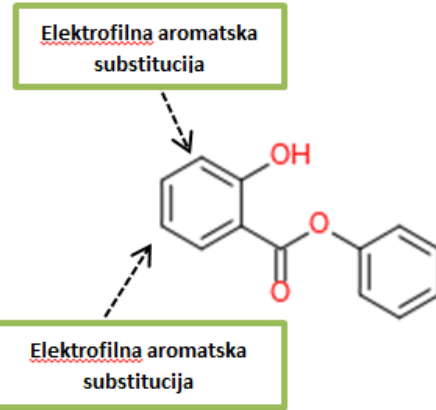
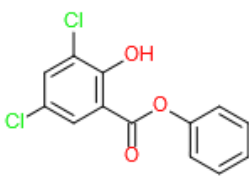
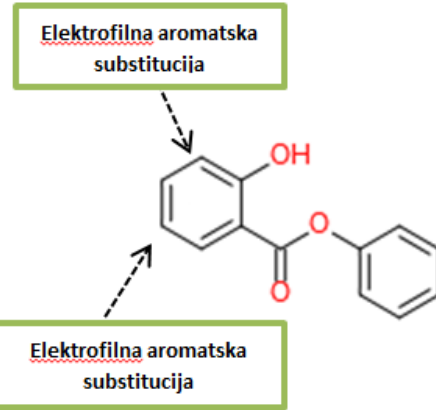
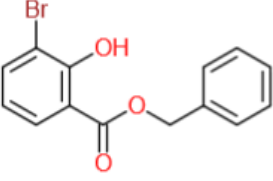
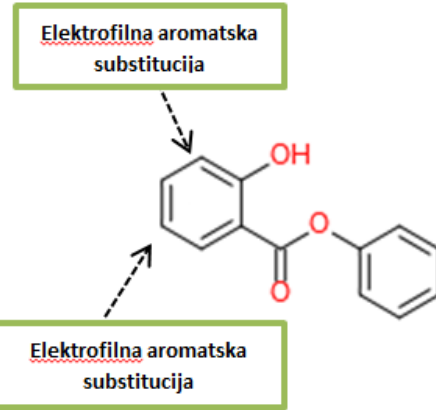
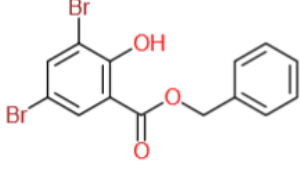
### 4.1 Mehanizmi razgradnje UV filtrov

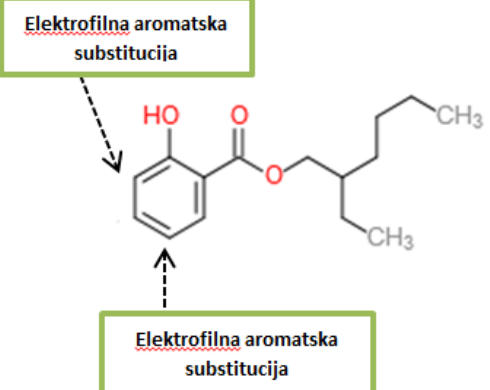
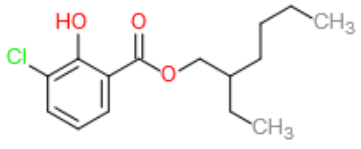
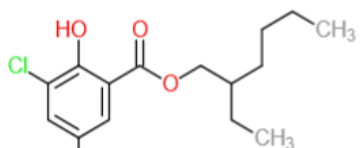
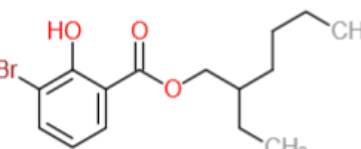
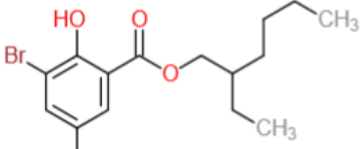
Iz literaturnih podatkov smo najprej zbrali informacije, preko katerih mehanizmov poteka razgradnja preučevanih UV filtrov, na katerem mestu/mestih poteče reakcija ter kateri so možni razgradni produkti. Rezultati so predstavljeni v preglednici III. Pri vseh UV filterih poteče reakcija elektrofilne aromatske substitucije kot primarni mehanizem razgradnje, pri benzofenonih, ki imajo v svoji strukturi ketonsko skupino, pa poteče oksidacija do estra, kateri sledi še cepitev estrske vezi.

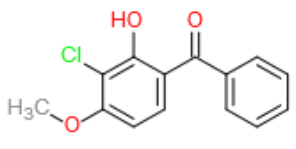
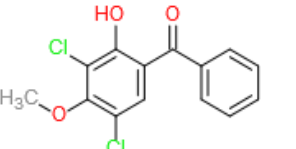
Za vsako spojino smo s program Endocrine Disruptome izračunali še vrednost LogP. Opazimo, da se s halogeniranjem vrednosti logP razgradnih produktov vseh UV filtrov povišajo. Dihalogenirani produkti imajo ne glede, ali poteče reakcija s klorom ali bromom višje vrednosti logP kot monohalogenirani produkti. Benzofenonom, pri katerih poteče še reakcija oksidacije, se logP le minimalno spremeni. Razgradni produkti, ki so posledica razgradnje estrske vezi, pa imajo nižji logP od osnovnega UV filtra.

**Preglednica III:** Tabela proučevanih UV filtrov z opisom reakcij in napovedanimi razgradnimi produkti.

UV filtri in možne reakcije razgradnje	Razgradni produkti SMILES koda	Oznaka RP Log P
<b>I. SALICILATI</b>		
<b>Benzil salicilat (BZS)</b>  C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>  LogP=2,75	 <chem>c1(c(c(ccc1)C(=O)O)OCc1ccccc1)Cl</chem>	<b>BZS-R1</b>  LogP=3,40
	 <chem>c1(c(c(cc1)Cl)C(=O)OCc1ccccc1)OCl</chem>	<b>BZS-R2</b>  LogP=4,06

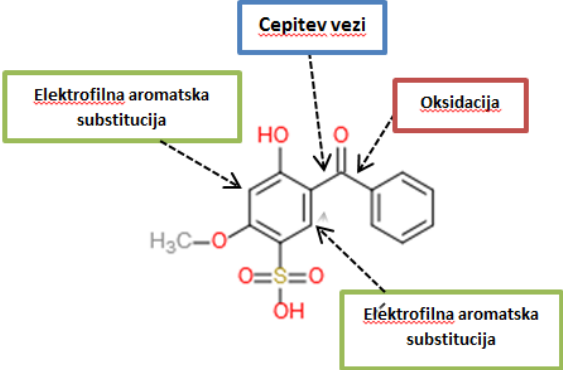
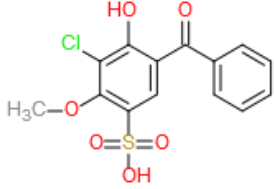
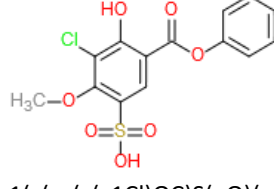
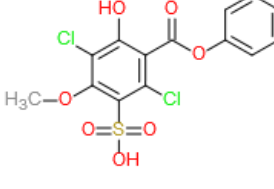
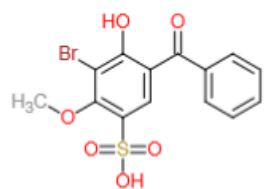
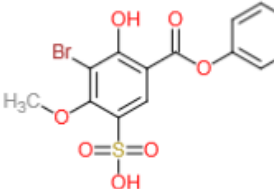
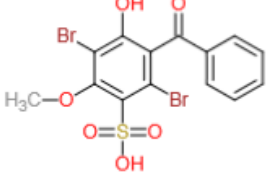
<p><b>Elektrofilna aromatska substitucija</b></p>  <p>SMILES: c1c(c(ccc1)C(=O)OCc1ccccc1)O</p>	 <p>c1(c(c(ccc1)C(=O)OCc1ccccc1)O)Br</p>	<p><b>BZS-R3</b></p> <p>LogP=3,51</p>
<p><b>Fenil salicilat (PS)</b> C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub></p> <p>LogP=2,61</p> <p><b>Elektrofilna aromatska substitucija</b></p>  <p>SMILES: c1(c(cccc1)C(=O)Oc1ccccc1)O</p>	 <p>c1(c(c(cc(c1)Br)C(=O)OCc1ccccc1)O)Br</p>	<p><b>BZS-R4</b></p> <p>LogP=4,27</p>
<p><b>Elektrofilna aromatska substitucija</b></p>  <p>SMILES: c1(c(cccc1)C(=O)Oc1ccccc1)O</p>	 <p>c1(c(cccc1Cl)C(=O)Oc1ccccc1)O</p>	<p><b>PS-R1</b></p> <p>LogP=3,42</p>
<p><b>Elektrofilna aromatska substitucija</b></p>  <p>SMILES: c1(c(cccc1)C(=O)Oc1ccccc1)O</p>	 <p>c1(c(cc(cc1Cl)Cl)C(=O)Oc1ccccc1)O</p>	<p><b>PS-R2</b></p> <p>LogP=3,92</p>
<p><b>Elektrofilna aromatska substitucija</b></p>  <p>SMILES: c1(c(cccc1)C(=O)Oc1ccccc1)O</p>	 <p>c1(c(c(ccc1)C(=O)Oc1ccccc1)O)Br</p>	<p><b>PS-R3</b></p> <p>LogP=3,37</p>
<p><b>Elektrofilna aromatska substitucija</b></p>  <p>SMILES: c1(c(cccc1)C(=O)Oc1ccccc1)O</p>	 <p>c1(c(c(cc(c1)Br)C(=O)Oc1ccccc1)O)Br</p>	<p><b>PS-R4</b></p> <p>LogP=4,14</p>

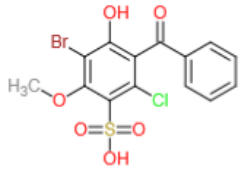
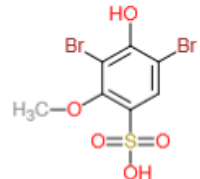
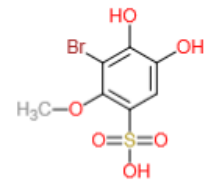
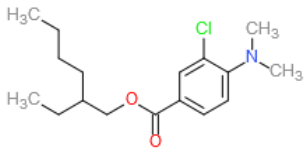
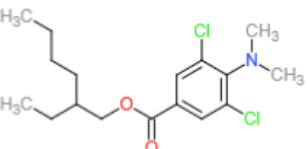
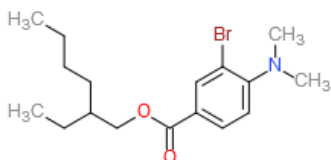
<b>Etilheksil salicilat (EHS)</b>		
<p><math>C_{15}H_{22}O_3</math></p> <p><b>LogP=3,77</b></p> <div style="text-align: center;"> <div style="border: 1px solid green; padding: 2px; display: inline-block;">Elektrofilna aromatska substitucija</div>   <div style="border: 1px solid green; padding: 2px; display: inline-block;">Elektrofilna aromatska substitucija</div> </div> <p>SMILES: CCCCC(CC)COC(=O)c1cccc1O</p>	 <p><chem>c1(c(cccc1Cl)C(=O)OCC(CCCC)CC)O</chem></p>	<p><b>EHS-R1</b></p> <p><b>LogP=4,42</b></p>
	 <p><chem>c1(c(cc(cc1Cl)Cl)C(=O)OCC(CCCC)CC)O</chem></p>	<p><b>EHS-R2</b></p> <p><b>LogP=5,07</b></p>
	 <p><chem>c1(c(cccc1Br)C(=O)OCC(CCCC)CC)O</chem></p>	<p><b>EHS-R3</b></p> <p><b>LogP=4,53</b></p>
	 <p><chem>c1(c(cc(cc1Br)Br)C(=O)OCC(CCCC)CC)O</chem></p>	<p><b>EHS-R4</b></p> <p><b>LogP=5,29</b></p>

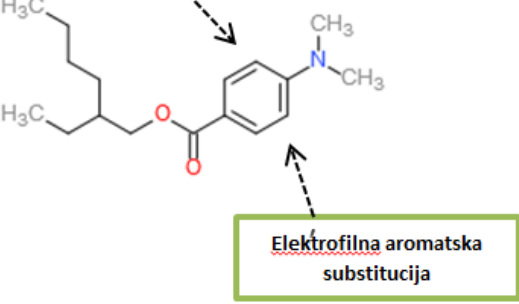
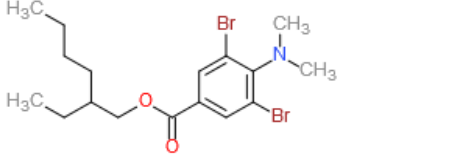
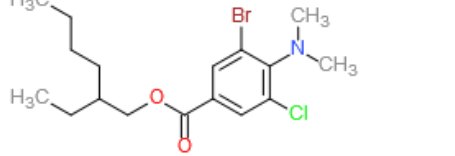
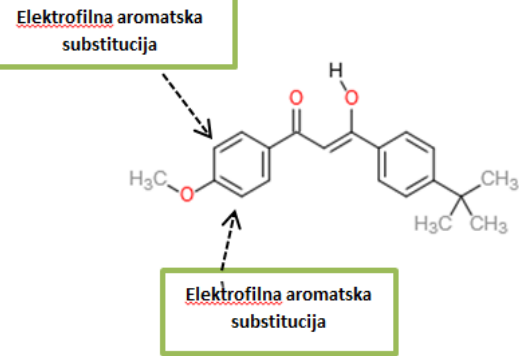
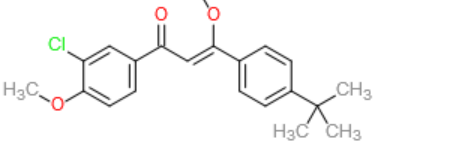
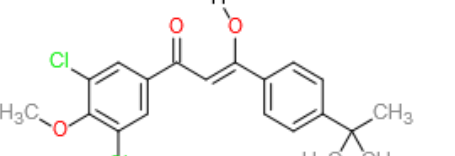
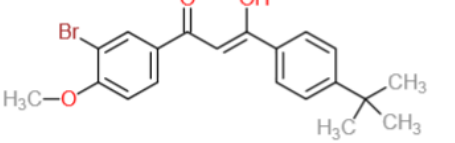
<b>II. BENZOFENONI</b>		
<p><b>Benzofenon-3 (BP3)</b></p> <p><math>C_{14}H_{12}O_3</math></p> <p><b>LogP=2,63</b></p>	 <p><chem>c1(c(ccc(c1Cl)OC)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><b>BP3-R1</b></p> <p><b>LogP=3,29</b></p>
	 <p><chem>c1(c(cc(c(c1Cl)OC)Cl)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><b>BP3-R2</b></p> <p><b>LogP=3,94</b></p>

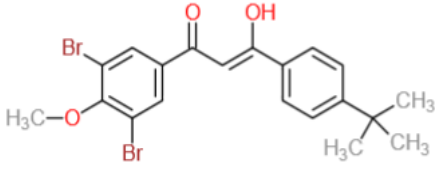
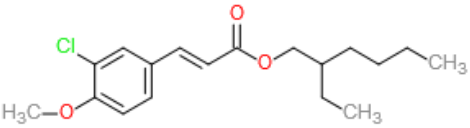
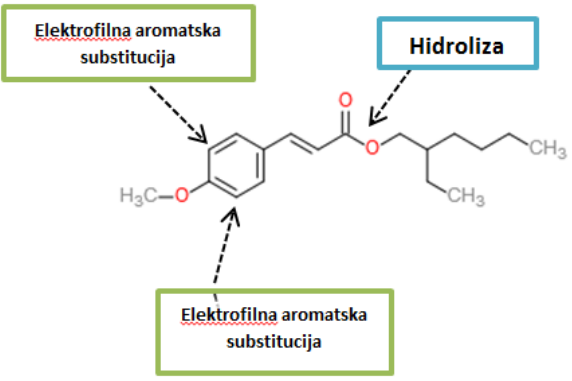
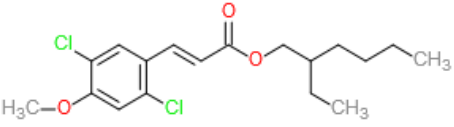
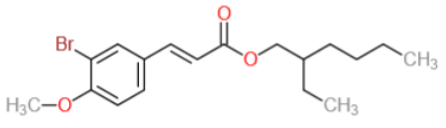
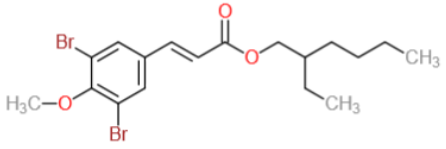
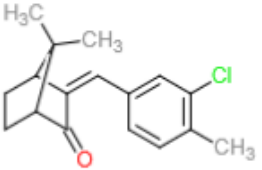


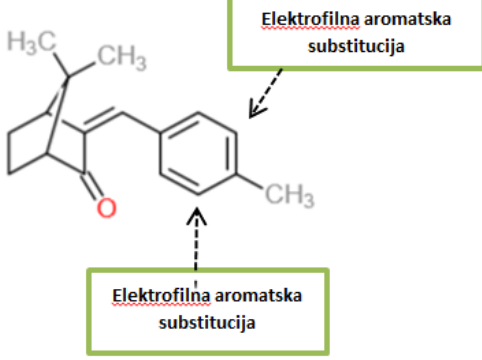
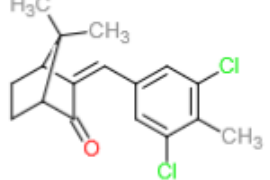
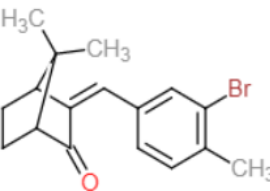
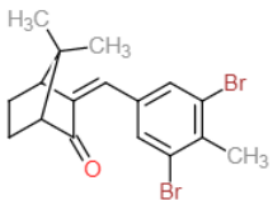
<p>Elektrofilna aromatska substitucija</p> <p>Cepitev vezi</p> <p>Oksidacija</p> <p>Elektrofilna aromatska substitucija</p>	<p><chem>c1(cc(c(c1Cl)OC)Cl)C(=O)Oc1ccccc1O</chem></p>	<p>BP3-R3</p> <p>LogP=3,93</p>
<p>SMILES:</p> <p><chem>c1(c(ccc(c1)OC)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><chem>C1(=C(C(=C(C(=C1C(=O)OC2=CC=CC=C2)Cl)Cl)OC)Cl)O</chem></p>	<p>BP3-R4</p> <p>LogP=4,58</p>
<p>SMILES:</p> <p><chem>c1(c(ccc(c1)OC)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><chem>c1(cc(c(c1)OC)Br)C(=O)c1ccccc1O</chem></p>	<p>BP3-R5</p> <p>LogP=3,39</p>
<p>SMILES:</p> <p><chem>c1(c(ccc(c1)OC)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><chem>c1(cc(c(c1Br)OC)Br)C(=O)c1ccccc1O</chem></p>	<p>BP3-R6</p> <p>LogP=4,16</p>
<p>SMILES:</p> <p><chem>c1(c(ccc(c1)OC)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><chem>c1(cc(c(c1Br)OC)Br)OC(=O)c1ccccc1O</chem></p>	<p>BP3-R7</p> <p>LogP=4,51</p>
<p>SMILES:</p> <p><chem>c1(c(ccc(c1)OC)C(=O)c1ccccc1)O</chem></p>	<p><chem>c1(cc(c(c1Cl)OC)Cl)Cl)O</chem></p>	<p>BP3-R8</p> <p>LogP=3,36</p>
	<p><chem>c1(cc(c(c1Br)OC)Br)Br)O</chem></p>	<p>BP3-R9</p> <p>LogP=3,69</p>

<p><b>Benzofenon-4 (BP4)</b></p> <p>C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>S</p> <p style="text-align: right;"><b>LogP=2,62</b></p>  <p style="text-align: center;">SMILES:</p> <p>c1(cc(c(c1)OC)S(=O)(=O)[O])C(=O)c1cccc1)O</p>	 <p>c1(cc(c(c1Cl)OC)S(=O)(=O)[O])C(=O)c1cccc1)O</p>	<p><b>BP4-R1</b></p> <p><b>LogP=3,27</b></p>
	 <p>c1(cc(c(c1Cl)OC)S(=O)(=O)[O-])C(=O)Oc1cccc1)O</p>	<p><b>BP4-R2</b></p> <p><b>LogP=3,26</b></p>
	 <p>c1(cc(c(c(c1Cl)OC)S(=O)(=O)[O-])Cl)C(=O)Oc1cccc1)O</p>	<p><b>BP4-R3</b></p> <p><b>LogP=3,91</b></p>
	 <p>c1(cc(c(c1Br)OC)S(=O)(=O)[O-])C(=O)c1cccc1)O</p>	<p><b>BP4-R4</b></p> <p><b>LogP=3,38</b></p>
	 <p>c1(c(c(cc1OC)S(=O)(=O)O)C(=O)Oc1cccc1)O)Br</p>	<p><b>BP4-R5</b></p> <p><b>LogP=3,37</b></p>
	 <p></p>	<p><b>BP4-R6</b></p> <p><b>LogP=4,14</b></p>

	<chem>c1(c(c(c(c(c1S(=O)(=O)[O])Br)C(=O)c1ccccc1)O)Br)OC</chem>	
		<b>BP4-R7</b>  <b>LogP=4,02</b>
	<chem>c1(c(c(c(c(c1OC)S(=O)(=O)O)Cl)C(=O)Oc1ccc1)O)Br</chem>	
		<b>BP4-R8</b>  <b>LogP=2,91</b>
	<chem>c1(c(cc(c(c1Br)OC)S(=O)(=O)O)Br)O</chem>	
		<b>BP4-R9</b>  <b>LogP=1,85</b>
	<chem>c1(c(cc(c(c1Br)OC)S(=O)(=O)O)O)</chem>	
<b>III. DERIVATI PABA</b>		
<b>Etilheksil dimetil PABA (EDPABA)</b>  $C_{17}H_{27}NO_2$  <b>LogP=4,13</b>		<b>EDPABA-R1</b>  <b>LogP=4,78</b>
	<chem>c1(c(ccc(c1)C(=O)OCC(CC)CCCC)N(C)C)Cl</chem>	
		<b>EDPABA-R2</b>  <b>LogP=5,43</b>
	<chem>c1(c(c(cc(c1)C(=O)OCC(CC)CCCC)Cl)N(C)C)Cl</chem>	
		<b>EDPABA-R3</b>  <b>LogP=4,89</b>

<p><b>Elektrofilna aromatska substitucija</b></p>  <p>SMILES: c1c(ccc(c1)C(=O)OCC(CC)CCCC)N(C)C</p>	<p>c1(c(ccc(c1)C(=O)OCC(CC)CCCC)N(C)C)Br</p>  <p>c1(c(c(cc(c1)C(=O)OCC(CC)CCCC)Br)N(C)C)Br</p>	<p>EDPABA-R4</p> <p>LogP=5,65</p>
	 <p>c1(c(c(cc(c1)C(=O)OCC(CC)CCCC)Cl)N(C)C)Br</p>	<p>EDPABA-R5</p> <p>LogP=5,54</p>
<b>IV. DERIVATI DIBENZOILMETANA</b>		
<p><b>Butil metoksidibenzoilmetan (BMDM)</b></p> <p>C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub></p> <p>LogP=4,32</p> <p><b>Elektrofilna aromatska substitucija</b></p>  <p>SMILES: c1c(ccc(c1)OC)C(=CC(=O)c1ccc(cc1)C(C)(C)C)[O-]</p>	 <p>c1c(ccc(c1Cl)OC)C(=CC(=O)c1ccc(cc1)C(C)(C)C)[O-]</p>	<p>BMDM-R1</p> <p>LogP=4,89</p>
	 <p>c1c(cc(c(c1Cl)OC)Cl)C(=CC(=O)c1ccc(cc1)C(C)(C)C)[O-]</p>	<p>BMDM-R2</p> <p>LogP=5,54</p>
	 <p>c1c(ccc(c1Br)OC)C(=O)/C=C(/c1ccc(cc1)C(C)(C)C)O</p>	<p>BMDM-R3</p> <p>LogP=5,00</p>

	 <chem>c1c(cc(c(c1Br)OC)Br)C(=O)/C=C(/c1ccc(cc1)C(C)(C)C)\O</chem>	<b>BMDM-R4</b>  <b>LogP=5,76</b>
<b>V. CINAMATI</b>		
<b>2-etilheksil-4-metoksicinamat (EHMC)</b> $C_{18}H_{26}O_3$  <b>LogP=4,47</b>	 <chem>c1c(ccc(c1Cl)OC)/C=C/C(=O)OCC(CCCC)CC</chem>	<b>EHMC-R1</b>  <b>LogP=5,12</b>
 <b>Elektrofilna aromatska substitucija</b> <b>Hidroliza</b> <b>Elektrofilna aromatska substitucija</b>  <b>SMILES:</b> <chem>c1c(ccc(c1)OC)/C=C/C(=O)OCC(CCCC)CC</chem>	 <chem>c1c(c(cc(c1Cl)OC)Cl)/C=C/C(=O)OCC(CCCC)CC</chem>	<b>EHMC-R2</b>  <b>LogP=5,77</b>
	 <chem>c1c(ccc(c1Br)OC)/C=C/C(=O)OCC(CCCC)CC</chem>	<b>EHMC-R3</b>  <b>LogP=5,23</b>
	 <chem>c1c(cc(c(c1Br)OC)Br)/C=C/C(=O)OCC(CCCC)CC</chem>	<b>EHMC-R4</b>  <b>LogP=5,99</b>
<b>VI. DERIVATI KAFRE</b>		
<b>4-metilbenziliden kafa (4-MBC)</b> $C_{18}H_{22}O$  <b>LogP=4,40</b>	 <chem>c1c(c(ccc1/C=C\1/C2CCC(C1=O)C2(C)C)C)Cl</chem>	<b>4-MBC-R1</b>  <b>LogP=4,67</b>
		<b>4-MBC-R2</b>

 <p>SMILES: c1cc(ccc1/C=C\1/C2CCC(C1=O)C2(C)C)C</p>	 <p>c1c(c(c(cc1/C=C\1/C2CCC(C1=O)C2(C)C)Cl)C)Cl</p>	<p>LogP=5,32</p>
	 <p>c1c(c(ccc1/C=C\1/C2CCC(C1=O)C2(C)C)C)Br</p>	<p>4-MBC-R3 LogP=4,78</p>
	 <p>c1c(c(c(cc1/C=C\1/C2CCC(C1=O)C2(C)C)Br)C)Br</p>	<p>4-MBC-R4 LogP=5,54</p>

## 4.2 Usoda UV filtrov in razgradnih produktov v okolju

Da bi lahko napovedali toksičnost UV filtrov in halogeniranih razgradnih produktov, smo želeli najprej pridobiti podatke, kakšna je njihova usoda po prehodu v okolje.

S programom VegaNIC smo preko 3 modelov napovedali:

- **verjetnost biološke razgradnje** - Ready Biodegradability model (IRFMN),
- **odpornost proti biodegradaciji in obstojnost v sedimentu** – Persistence (sediment) model (IRFMN),
- **faktor biokoncentracije** – model BCF (CAESAR).

#### 4.2.1 Program VegaNIC - Persistence (sediment) model (IRFMN) in Ready Biodegradability model (IRFMN)

S programom VegaNic z **modelom Persistence (sediment) model (IRFMN)** smo napovedali, kakšna je obstojnost UV filtrov in razgradnih produktov v organski snovi sedimenta. Model na osnovi fizikalno kemijskih lastnosti in podatkov o razpolovnih časih snovi poda kvalitativno oceno obstojnosti v določenem okolju (v sediment v našem primeru). S tem dobimo informacijo, v kolikšni meri je snov odporna na biodegradacijo. Kriterij za obstojnost (P) v sedimentu znaša  $t_{1/2s} > 120$  dni, za zelo obstojno snov (vP) pa  $t_{1/2} > 180$  dni (36).

Z modelom **Ready Biodegradability model (IRFMN)** smo napovedali, kakšna je stopnja biorazgradljivosti snovi v okolju. Model temelji na podatkih, pridobljenih iz presejalnih testov biološke razgradljivosti (OECD TG 301C test) (37).

Oba modela Ready Biodegradability model (IRFMN) in Persistence (sediment) model (IRFMN) razvrstita spojino v enega izmed štirih razredov, kot je prikazano na sliki 6. Ob tem podata še informacijo, kako zanesljiva je bila napoved - visoka (\*\*\*) - spojina se nahaja v območju uporabnosti modela), srednja (\*\* - spojina se lahko nahaja izven območja uporabnosti) ali nizka zanesljivost (\* - spojina se nahaja izven območja uporabnosti) (slika 6):

Persistence (sediment) model (IRFMN) 1.0.0	Ready Biodegradability model (IRFMN) 1.0.9
<b>nP</b> Snov ni obstojna.	<b>L</b> Lahko biorazgradljiva snov.
<b>nP/P</b> Snov je na mejni vrednosti med neobstojno/obstojno.	<b>B</b> Biološka razgradnja snovi je mogoča.
<b>P/vP</b> Snov je na mejni vrednosti med obstojno/zelo obstojno.	<b>M</b> Biološka razgradnja snovi je malo mogoča.
<b>vP</b> Snov je zelo obstojna.	<b>N</b> Snov ni biorazgradljiva.

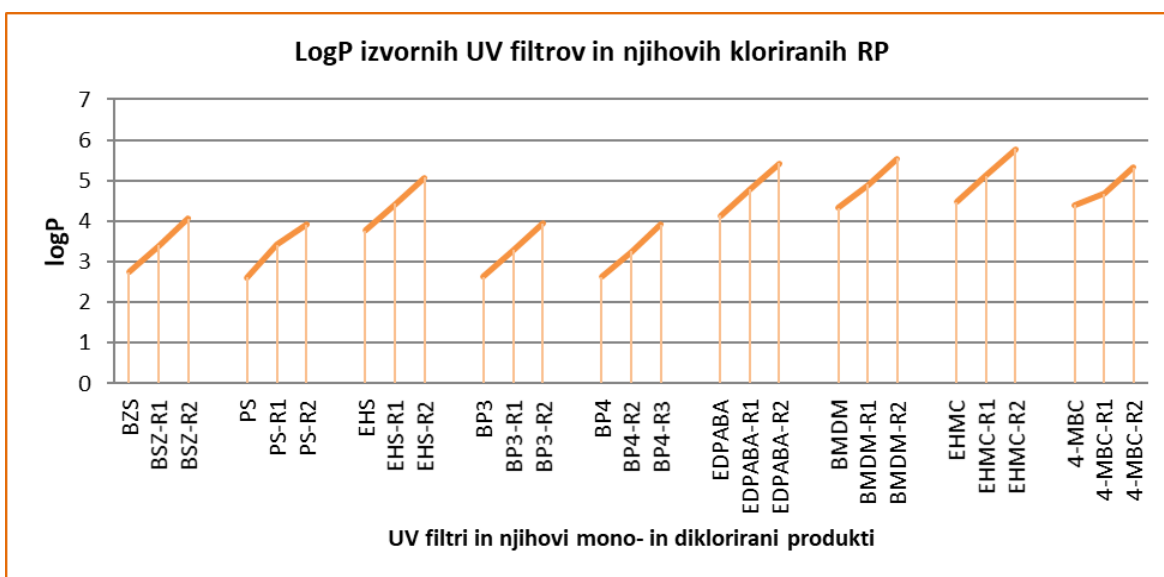
Slika 6: Klasifikacija modelov Ready Biodegradability model (IRFMN) in Persistence (sediment) model (IRFMN).

##### 4.2.1.1 Persistence (sediment) model (IRFMN)

S programom Persistence (sediment) model (IRFMN) smo pridobili podatke, kako obstojna je snov v rečnem sedimentu. Rezultate smo prikazali v preglednici V v naslednjem poglavju, skupaj

z rezultati o biorazgradljivosti snovi (Ready Biodegradability model (IRFMN)). Rezultati napovedi obstojnosti UV filtrov in razgradnih produktov v sedimentu prikazujejo raznolike rezultate, vendar je samo 38 % rezultatov v območju visoke ali srednje zanesljivosti, preostali rezultati (62 %) pa so izven območja uporabnosti ali pa celo ni dovolj podatkov na voljo za razvrstitev (n/a).

Na sliki 7 smo grafično prikazali vrednosti logP vseh devetih UV filtrov in njihovih mono- in dikloriranih produktov, saj je to najpomembnejši parameter, ki določa obstojnost UV filtra v organski snovi v sedimentu kot tudi v maščobnem tkivu organizmov. Izbrali smo samo klorirane razgradne produkte, ker so njihove logP vrednosti zelo podobne tistim od bromiranih razgradnih produktov.



Slika 7: Izračunane LogP vrednosti za UV filtre in njihove mono- in diklorirane produkte.

Kot je razvidno iz grafa na sliki 7, se logP povečuje s stopnjo substitucije – diklorirani produkti vseh UV filtrov imajo za eno enoto večji logP od osnovnih UV filtrov. Glede na vrednosti logP smo pričakovali največjo obstojnost v sedimentu za EHMC (logP=4,47) in 4-MBC (logP=4,4) in za njune diklorirane produkte, najmanjšo obstojnost pa za oba benzofenona in BZS, saj imajo logP <3. Rezultati za obstojnost v sedimentu, napovedani s programom Persistence (sediment) model (IRFMN), so prikazani v preglednici V, skupaj z rezultati za Ready Biodegradability model (IRFMN).



Program je spojine razvrstil drugače od naših predvidevanj: **EHMC** in vsi njegovi mono- in dihalogenirani razgradni produkti so razvrščeni v razred **nP/P**, **4-MBC** pa je opredeljen kot neobstoje (nP) – za oba smo, vsaj glede na visoke vrednosti logP, pričakovali najvišjo obstojnost v sedimentu. **BZS** in njegovi razgradni produkti so uvrščeni v razred **nP/P**, **BP3** je v razredu **P/vP**, mono- in diklorirana produkta pa se uvrščata med zelo obstojne snovi (**vP**) – za oba smo, glede na nizke vrednosti logP, pričakovali najnižjo obstojnost. Za **BP4** ni dovolj podatkov za razvrstitev, razen za razgradna produkta BP4-R8 in BP4-R9, ki sta uvrščena v razred **vP**. Dobljeni rezultati se v večini ne skladajo z literaturnimi podatki, ki pravijo, da se z višjim logP poveča tudi obstojnost v okolju (38). Posledično smo zaradi povišanja logP pri vseh razgradnih produktih pričakovali uvrstitev v razred z večjo obstojnostjo od izvirnega UV filtra. Rezultate smo prikazali v preglednici IV.

**Preglednica IV:** Preglednica razgradnih produktov, ki so bolj obstojni od izvornih UV filtrov in UV filtrov, katerih obstojnost se z razgradnjo ne poveča.

Razgradni produkti, ki so bolj obstojni glede na izvorni UV filter		UV filtri, pri katerih se obstojnost v sedimentu z razgradnjo ne poveča	
<b>BP3</b>	P/vP	<b>BZS</b>	nP/P
BP3-R1- <i>monokloriran RP</i> BP3-R2- <i>dikloriran RP</i>	vP	<b>EHS</b>	nP/P
<b>BMDM</b>	nP/P	<b>EDPABA</b>	nP/P
BMDM-R1- <i>monokloriran RP</i>	P/vP	<b>EHMC</b>	nP/P
<b>PS</b>	nP/P	<b>4-MBC</b>	nP
PS-R2 - <i>dikloriran RP</i> PS-R4 - <i>dihalogeniran RP</i>	vP	<b>BP4</b>	n/a

Glede na **izvorni UV filter** so v organski snovi sedimenta bolj obstojni razgradni produkti naslednjih UV filtrov: **BP3** (mono- (BP3-R1) in dikloriran produkt (BP3-R2) – oba **vP**), **BMDM** (monokloriran produkt (BMDM-R1) – razred **P/vP**) in **PS** (dikloriran (PS-R2) in dihalogeniran produkt (PS-R4) – oba **vP**). Za ostale UV filtre (**BZS**, **EHS**, **EDPABA**, **EHMC**, **4-MBC**) je program njihovim razgradnim produktom napovedal enako obstojnost v okolju kot izvornemu filtru, kljub povišanju logP, kar ni v skladu z literaturnimi podatki, ki navajajo, da se s povišanjem logP poveča tudi obstojnost v sedimentu.

#### 4.2.1.2 Ready Biodegradability model (IRFMN)

S programom Ready Biodegradability model (IRFMN) smo pridobili podatke o biorazgradljivosti UV filtrov in njihovih razgradnih produktov. Rezultati so prikazani v preglednici V. Program je napovedal 67 % podatkov z visoko ali srednjo zanesljivostjo. Samo en UV filter – BZS je bil razvrščen kot lahko biorazgradljiv. Biološka razgradljivost je mogoča še pri PS. Vsi ostali UV filtri so uvrščeni med biološko nerazgradljive snovi, kar je v skladu z našimi pričakovanji. UV filtri so odporni na biodegradacijo zaradi fizikalno kemijskih lastnosti kot so: lipofilne lastnosti, visoke logP vrednosti in visoke vrednosti porazdelitvenega koeficienta  $K_{oc}$  ( $K_{oc}$  večine UV filtrov je nad vrednostjo 2000) (4).

Pri BZS in PS smo opazili, da s halogeniranjem postajajo razgradni produkti vedno manj biorazgradljivi, kar je v skladu s pričakovanji, saj imajo te spojine višji logP (Slika 7). Pri ostalih UV filtrih, ki so že sami biološko nerazgradljivi, imajo enake lastnosti tudi razgradni produkti. Pri EHMC postaneta oba razgradna produkta po cepitvi estrske vezi bolj biorazgradljiva.

**Preglednica V:** Rezultati programov VegaNIC za napoved obstojnosti v sedimentu z modelom Persistence (sediment) model (IRFMN) 1.0.0 in napoved verjetnosti biorazgradnje z modelom Ready Biodegradability model (IRFMN) 1.0.9. Legenda: barve kvadratkov predstavljajo razred, v katerega je bila spojina razvrščena, kot je razloženo na sliki 6. Zvezdice opredeljujejo zanesljivost napovedanega rezultata: \*\*\* Visoka zanesljivost, \*\* Srednja zanesljivost, \* Nizka zanesljivost, n/a – na voljo ni dovolj podatkov za napoved.

UV filter in razgradni produkti	Persistence (sediment) model (IRFMN) 1.0.0	Ready Biodegradability model (IRFMN) 1.0.9
BZS	nP/P **	**
BZS-R1	nP/P **	**
BZS-R2	nP/P **	***
BZS-R3	nP/P *	**
BZS-R4	nP/P *	**
PS	nP/P **	***
PS-R1	nP/P ***	**
PS-R2	vP *	***
PS-R3	nP/P **	**
PS-R4	vP *	**
EHS	nP/P ***	*
EHS-R1	nP/P ***	*
EHS-R2	nP/P ***	***
EHS-R3	nP/P **	*
EHS-R4	nP/P **	*
BP3	P/vP **	EXP. DATA
BP3-R1	vP *	*
BP3-R2	vP *	***
BP3-R3	nP/P *	***
BP3-R4	vP *	***
BP3-R5	vP *	***
BP3-R6	vP *	***
BP3-R7	nP/P *	***
BP3-R8	P/vP ***	**
BP3-R9	P/vP **	**
BP4	n/a	**
BP4-R1	n/a	**
BP4-R2	n/a	**
BP4-R3	n/a	**
BP4-R4	n/a	**
BP4-R5	n/a	**
BP4-R6	n/a	**
BP4-R7	n/a	**
BP4-R8	vP **	**
BP4-R9	vP **	**

UV filter in razgradni produkti	Persistence (sediment) model (IRFMN) 1.0.0	Ready Biodegradability model (IRFMN) 1.0.9
EHPABA	nP/P ***	*
EHPABA-R1	nP/P ***	*
EHPABA-R2	nP/P ***	*
EHPABA-R3	nP/P ***	*
EHPABA-R4	nP/P **	*
EHPABA-R5	nP/P **	*
BMDM	nP/P **	*
BMDM-R1	P/vP *	*
BMDM-R2	n/a	*
BMDM-R3	nP/P *	*
BMDM-R4	n/a	*
EHMC	nP/P *	*
EHMC-R1	nP/P *	*
EHMC-R2	nP/P *	*
EHMC-R3	nP/P *	**
EHMC-R4	nP/P *	*
4-MBC	nP *	**
4-MBC-R1	nP *	**
4-MBC-R2	nP *	**
4-MBC-R3	nP *	**
4-MBC-R4	nP *	**

V raziskavi španskih rek je Gago-Ferrero s sodelavci raziskoval prisotnost različnih UV filtrov v rečnem sedimentu na 20 različnih lokacijah. Ker se v sedimentu snovi nalagajo skozi daljše obdobje, je to primeren pokazatelj onesnaženosti vode, iz katerega lahko sklepamo o snoveh, ki so sposobne biorazgradnje in tistih, ki so nanjo odporne (te bodo v sedimentu v najvišjih koncentracijah). Z UPLC in MS/MS metodo so preverjali prisotnost 8 UV filtrov: 4DHB, 4HB, BP1, OC, BP3, 4-MBC, EHMC, EDPABA (zadnje štiri smo uporabil tudi v naši magistrski nalogi). Rezultati so podani v ng na gram maščobnega tkiva. Prisotnost UV filtrov so zasledili v kar 95 % analiziranih vzorcih sedimenta. Zasledili so pet UV filtrov (OC, EDPABA, EHMC, BP3 in 4DHB). Najpogosteje in v najvišjih koncentracijah so izmerili OC, saj so ga zasledili v 95 % analiziranih vzorcev s koncentracijami do  $24 \times 10^2$  ng/g. V nižjih koncentracijah (4,4 – 27 ng/g) so v 60-65 % analiziranih vzorcih zasledili EDPABA in BP3. EHMC so zasledili v 35 % vzorcih v koncentraciji od 7-42 ng/g. 4DHB so v treh vzorcih zaznali v najnižjih koncentracijah (12 – 21 ng/g), medtem ko 4-MBC, BP1 in 4HB niso zasledili (38).

Glede na dobljene rezultate z modelom Ready Biodegradability model smo ocenili, da je **BP3** eden izmed najmanj biorazgradljivih UV filtrov, saj je to tudi edini UV filter, za katerega obstajajo eksperimentalni podatki v bazi programa VegaNIC, ki potrjujejo, da se BP3 v sedimentu ne razgrajuje, to pa potrjuje tudi prej omenjena raziskava, saj so BP3 zasledili v 60-65 % analiziranih vzorcih sedimenta (38). Program je z veliko verjetnostjo napovedal največjo obstojnost večini razgradnim produktom BP3 (BP3-R1, BP3-R2, BP3-R4, BP3-R5 in BP3-R6-snov ni biorazgradljiva, BP3-R3-snov je lahko biorazgradljiva). Prisotnost BP3 so v številnih raziskavah dokazali v vodnem okolju pa tudi v človeškem urinu, serumu in materinem mleku. BP3 ima dokazan ekotoksikološki vpliv, saj ima škodljive učinke na koralne grebene. Dokazano ima tudi endokrine učinke (antiandrogeno in antiestrogeno delovanje), zato se uporaba varovalnih izdelkov s tem UV filtrom v zadnjem času vse bolj odsvetuje, še zmeraj pa je uvrščen med dovoljene filtre (5).

### 4.3 Program VegaNIC – model BCF (CAESAR)

S programom VegaNIC z modelom BCF smo napovedali faktor biokoncentracije (BCF) za analizirane UV filtre in razgradne produkte. Program nam poda informacijo o vrednosti BCF za ribe, podanih v enoti log (L/kg). Spojina je lahko razvrščena v 3 skupine:

- log BCF < 2,7: **Spojina ni bioakumulativna,**
- log BCF med 2,7 in 3,3: **Spojina je lahko bioakumulativna,**
- log BCF > 3,3: **Spojina je bioakumulativna.**

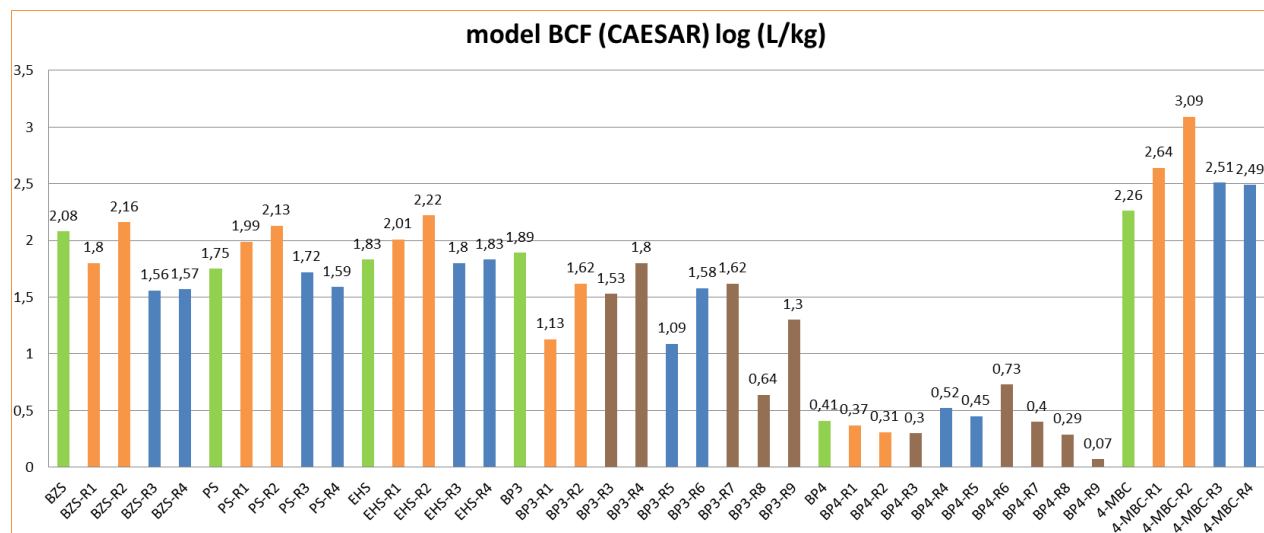
Rezultate smo grafično prikazali na spodnjih dveh slikah (slika 8 in slika 9). Na sliki 8 smo prikazali UV filtre iz skupine salicilatov (BZS, PS, EHS), benzofenonov (BP3, BP4) in derivatov kafe (4-MBC). Na sliki 9 smo prikazali rezultate za UV filtre: EDPABA, BMDM in EHMC.

#### Rezultati napovedi faktorja BCF so naslednji:

- Najvišje BCF vrednosti imajo 4-MBC in njegovi razgradni produkti. Razgradni produkt 4-MBC-R2 je edini, ki ima logBCF višji od 2,7, in se zato uvršča med spojine, ki so lahko bioakumulativne.
- Vse ostale logBCF vrednosti ostalih UV filtrov in RP so pod mejo 2,7, kar pomeni, da jih je program opredelil kot spojine, ki se ne koncentrirajo v maščobnem tkivu.
- BP4 ima izrazito nižji logBCF faktor od preostalih UV filtrov.

EU REACH smernice razvrščajo snovi glede na vrednosti BCF faktorja v dva razreda: snovi z BCF > 2000 spadajo v razred B (ang. *bioaccumulative*); snovi z BCF > 5000 spadajo v razred vB (ang. *very bio-accumulative*), ki imajo zelo veliko nagnjenost k bioakumulaciji (39). Literaturni podatki za vrednosti BCF za UV filtre: EHS, EDPABA, EHMC, 4-MBC iz preglednice I (*Uvod; 1.2.2 Parametri, ki vplivajo na usodo UV filtrov v okolju*) uvrščajo tri UV filtre (EHS, EDPABA, 4-MBC) v razred B, EHMC pa celo v razred vB, oba benzofenona (BP3 in BP4) pa med spojine, ki se ne bioakumulirajo. Napovedane BCF vrednosti s programom VegaNIC so precej nižje v primerjavi z literaturnimi podatki, saj je program vse UV filtre opredelil kot snovi, ki se ne bioakumulirajo. Literaturni podatki se ujemajo z napovedanimi za oba benzofenona (BP3 in BP4), ki ju tako

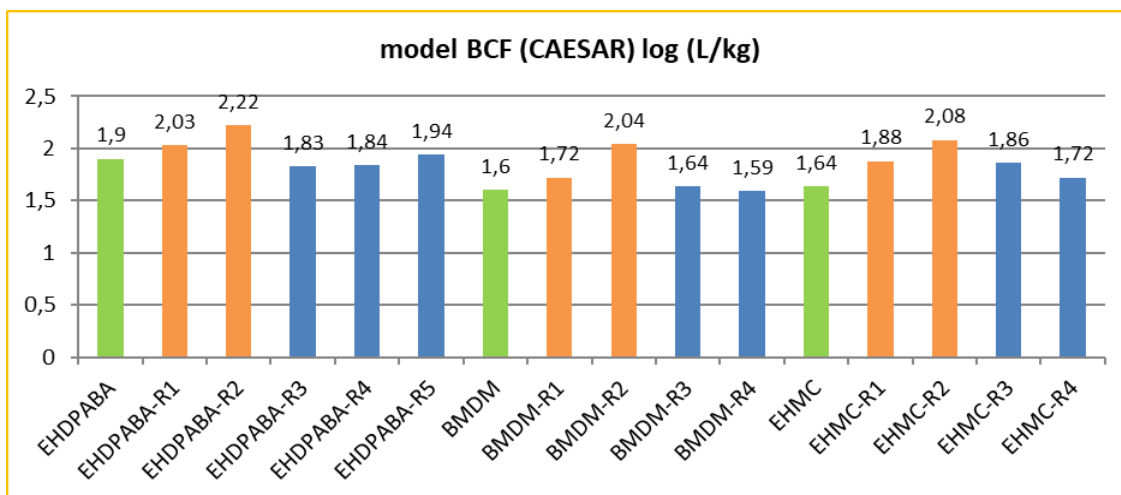
program kot različne raziskave opredeljujejo kot spojini, ki se ne koncentrirata v maščobnem tkivu vodnih organizmov. S stališča bioakumulacije je BP4 najvarnejši za uporabo.



**Slika 8** Prikaz rezultatov programa VegaNIC in BCF modela za UV filtre: BZS, PS, EHS, BP3, BP4, 4-MBC. Legenda: Zelen stolpec – izvorni UV filter, oranžen stolpec – klorirani RP, moder stolpec – bromirani in ostali RP, rjav stolpec: oksidirani in ostali RP. Na stolpcih je zapisana vrednost BCF v log (L/kg).

Pri podrobnejši analizi rezultatov smo ugotovili, da se skoraj vsem UV filtrom (BZS, PS, EHS, 4-MBC, EDPABA, BMDM, EHMC) pri razgradnih produktih, ki so posledica kloriranja, poveča vrednost BCF. Z bromiranjem pa se BCF pri vseh prej omenjenih UV filterih povečini zniža, še sploh, če ga primerjamo z BCF vrednostmi za UV filter in klorirane razgradne produkte. Na sliki 9 smo grafično prikazali še BCF vrednosti za UV filtre iz skupine derivatov PABA (EDPABA), derivatov dibenzoilmetana (BMDM) in cinamatov (EHMC), pri katerih je jasno vidno povišanje BCF vrednosti pri kloriranih razgradnih produktih in znižanje BCF vrednosti pri bromiranih razgradnih produktih. Tudi stopnja halogeniranja vpliva na spremembo BCF vrednosti. Pri dikloriranih produktih je BCF višji glede na monokloriran produkt, medtem ko je pri bromiranih produktih BCF monobromiranega rahlo višji v primerjavi z dibromiranim produktom.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da bodo imeli (di)klorirani razgradni produkti večjo verjetnost biokoncentracije v prehranjevalni verigi kot izvorni UV filtri. Medtem ko bodo razgradni produkti kot posledica bromiranja, imeli manjšo nagnjenost k biokoncentraciji. V literaturi nismo zasledili podatkov, ki bi podpirali ali zavračali naše rezultate o vplivu vrste halogene razgradnje ter stopnje halogeniranja na spremembo BCF vrednosti.



**Slika 9** Prikaz rezultatov programa VegaNIC in modela BCF(CAESAR) za UV filtre: EDPABA, BMDM in EHMC. Legenda: Zelen stolpec – izvorni UV filter, oranžen stolpec – klorirani RP, moder stolpec – bromirani RP. Na stolpcih je zapisana vrednost BCF v log (L/kg).

Število raziskav, ki so bile izvedene na temo bioakumulacije UV filtrov, se je v zadnjih letih povečalo. Literaturnih podatkov raziskav, ki bi preučevale bioakumulacijo razgradnih produktov UV filtrov v organizmih, pa nismo našli. Bioakumulacijo zdravilnih in kozmetičnih sestavin in kemikalij je težko dokazovati, saj je odvisna od številnih ekoloških dejavnikov, kot so vrsta in velikost organizma, vsebnost telesnih maščob, izbira dela vzorčenja ter sama geografska lokacija vzorčenja. Še posebno težavo pa predstavlja raziskovanje bioakumulacije razgradnih produktov teh snovi. Do sedaj so o zasledenih koncentracijah UV filtrov v ribah poročali v številnih evropskih državah (Nemčiji, Švici, Španiji), v Ameriki in na Japonskem. V Braziliji so leta 2013 UV filtre prvič zasledili tudi v sesalskih vodnih vrstah. V delfinih je bil najpogosteje (v 21 od 56 analiziranih vzorcev) zasleden UV filter oktokrilen, in sicer v koncentracijah od 89-789 ng/g lw (40).

#### 4.4 Ekotoksikološki vpliv UV filtrov in RP

S programom VegaNIC z modelom *Daphnia Magna* LC<sub>50</sub> 48h (EPA) smo dobili podatke o napovedi akutne toksičnosti analiziranih UV filtrov in njihovih RP (Preglednica VII). Model razvrsti spojino glede na smrtno koncentracijo LC<sub>50</sub> – nižja kot je vrednost LC<sub>50</sub>, bolj je spojina toksična.

#### 4.4.1 Model *Daphnia Magna* LC<sub>50</sub> 48h (EPA)

Model *Daphnia Magna* LC<sub>50</sub> 48h (EPA) nam poda kvantitativno napoved LC<sub>50</sub> (48 ur) (-log/mol/L) za planktonskega rakca vrste *Daphnia Magna*. Vrednost je podana v enoti mg/L. *Daphnia Magna* se hrani s fitoplanktonom, poleg tega pa je sam pomemben izvor hrane ribam ter nekaterim drugim vodnim organizmom in ima zaradi tega pomembno ekološko vlogo v prehranjevalni verigi v vodnem sistemu. Zaradi velike dovzetnosti in občutljivosti na toksikološke vplive, brezspolnega razmnoževanja in enostavne kulture se pogosto uporablja kot indikator onesnaženja vodnega ekosistema in za oceno akutne toksičnosti (40).

Model razvrsti spojino v štiri razrede toksičnosti, glede na vrednost LC<sub>50</sub>, kot je prikazano v preglednici VI.

**Preglednica VI:** Klasifikacija spojin na osnovi LC<sub>50</sub> vrednosti v sklopu modela *Daphnia Magna*.

Vrednost LC <sub>50</sub>	<i>Daphnia Magna</i> LC <sub>50</sub> 48h (EPA)	Učinek
LC <sub>50</sub> več kot 100 mg/L	<b>Netoksična spojina</b>	Spojina nima škodljivih učinkov na vodne živali.
LC <sub>50</sub> med 10 in 100 mg/L	<b>Spojina je blago toksična.</b>	Spojina ima lahko blažje škodljive učinke na vodne živali.
LC <sub>50</sub> med 1 in 100 mg/L	<b>Spojina je toksična.</b>	Spojina ima lahko hujše škodljive učinke na vodne živali.
LC <sub>50</sub> pod 1 mg/L	<b>Spojina je zelo toksična.</b>	Spojina ima lahko zelo hude škodljive učinke na vodne živali.

Rezultati napovedi akutne toksičnosti (LC<sub>50</sub>) so naslednji (*Preglednica VII*):

- BP4 ima izrazito visoke vrednosti LC<sub>50</sub> (LC<sub>50</sub>=70,42 mg/L) in njegovi razgradni produkti BP4-1, BP4-8 in BP4-9, ki se zaradi vrednosti LC<sub>50</sub> > 100 mg/L uvrščajo v razred netoksičnih spojin (edini izmed preučevanih razgradnih produktov 9 UV filtrov). Razgradni produkti BP4-R5, BP4-R6 in BP4-R7 se uvrščajo v skupino blago toksičnih spojin, BP4-R2, BP4-R3 in BP4-R4 pa se uvrščajo med toksične spojine.
- Vsi UV filtri iz skupin salicilatov (BZS, PS, EHS) in EHDPABA spadajo med blago toksične spojine, njihovim razgradnim produktom pa se vrednosti LC<sub>50</sub> celo znižajo, zaradi česar so vsi bromirani in diklorirani produkti ovrednoteni kot zelo toksične spojine.

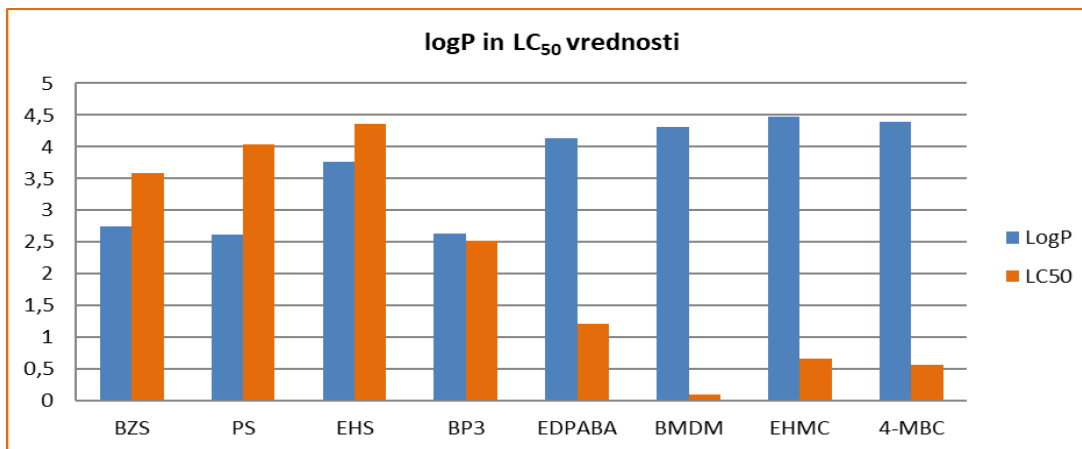


- Med zelo akutno toksične spojine spadajo UV filtri BMDM, EHMC in 4-MBC in vsi njihovi halogenirani razgradni produkti, saj imajo LC<sub>50</sub> vrednosti pod 1 mg/L.
- Najnižje vrednosti LC<sub>50</sub> imajo BMDM (LC<sub>50</sub>=0,1025 mg/L) in njegovi RP (LC<sub>50</sub> < 0,0578 mg/L), zaradi česar jih uvrščamo med najbolj akutno toksične razgradne produkte.

**Preglednica VII:** Rezultati programov VegaNIC za napovedovanje ekotoksikološkega vpliva z modelom Model *Daphnia Magna* LC50 48h (EPA).

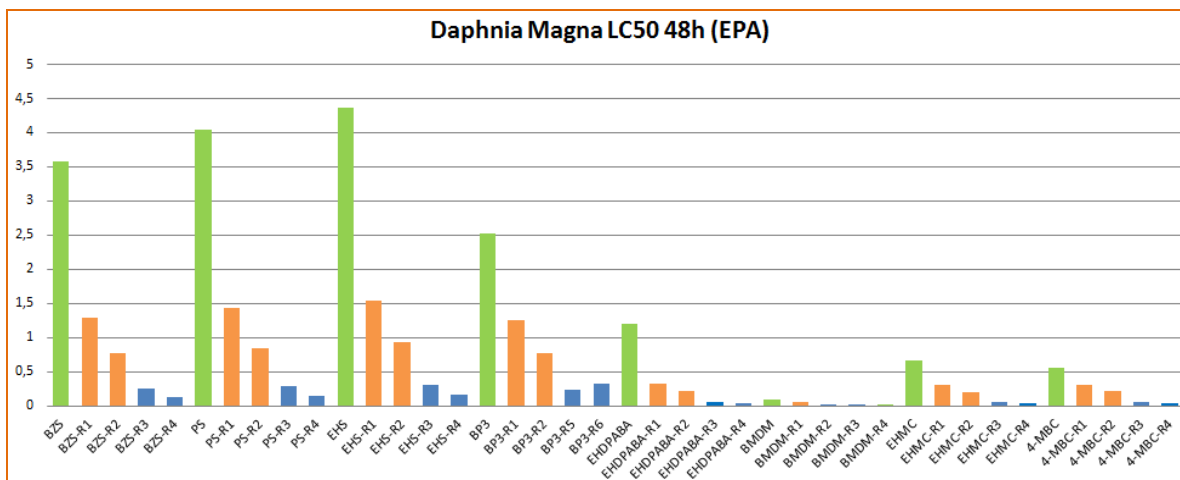
UV filter in razgradni produkti	Daphnia Magna LC <sub>50</sub> 48h (EPA) (mg/L)	UV filter in razgradni produkti	Daphnia Magna LC <sub>50</sub> 48h (EPA) (mg/L)
<b>BZS</b>	3,58	<b>EHPABA</b>	1,21
BZS-R1	1,3	EHPABA-R1	0,3347
BZS-R2	0,7811	EHPABA-R2	0,215
BZS-R3	0,2631	EHPABA-R3	0,0647
BZS-R4	0,1364	EHPABA-R4	0,0374
<b>PS</b>	4,04	EHPABA-R5	0,0416
PS-R1	1,43	<b>BMDM</b>	0,1025
PS-R2	0,8502	BMDM-R1	0,0578
PS-R3	0,2869	BMDM-R2	0,0295
PS-R4	0,1466	BMDM-R3	0,026
<b>EHS</b>	4,36	BMDM-R4	0,0166
EHS-R1	1,54	<b>EHMC</b>	0,6728
EHS-R2	0,9363	EHMC-R1	0,3026
EHS-R3	0,3098	EHMC-R2	0,2019
EHS-R4	0,1652	EHMC-R3	0,0618
<b>BP3</b>	2,52	EHMC-R4	0,0362
BP3-R1	1,25	<b>4-MBC</b>	0,559
BP3-R2	0,7643	4-MBC-R1	0,3079
BP3-R3	0,5358	4-MBC-R2	0,2146
BP3-R4	0,3282	4-MBC-R3	0,0665
BP3-R5	0,2353	4-MBC-R4	0,0425
BP3-R6	0,3282		
BP3-R7	0,0995		
BP3-R8	2,05		
BP3-R9	0,2866		
<b>BP4</b>	70,42		
BP4-R1	119,7		
BP4-R2	4,69		
BP4-R3	3,71		
BP4-R4	3,55		
BP4-R5	29,2		
BP4-R6	30,27		
BP4-R7	18,49		
BP4-R8	137,84		
BP4-R9	4245,14		

Ob analizi rezultatov za akutno toksičnost smo se najprej posvetili povezavi med napovedano vrednostjo  $LC_{50}$  in  $\log P$  vrednostjo za posamezen izvorni UV filter. Na sliki 10 je prikazana korelacija med vrednostmi  $\log P$  in vrednostmi  $LC_{50}$ , napovedanimi s programom VegaNIC z modelom *Model Daphnia Magna*  $LC_{50}$  za sedem UV filtrov, pri katerih opazimo inverzno korelacijo med obema parametroma: UV filtri (BZS, PS, BP3), ki imajo nižje  $\log P$  vrednosti ( $\log P < 4$ ), imajo  $LC_{50}$  vrednosti višje ( $LC_{50} > 2,5$ ). Pri UV filtrih (EDPABA, BMDM, EHMC in 4-MBC), ki imajo višje vrednosti  $\log P$  ( $\log P > 4$ ), pa opazimo, da imajo nižje vrednosti  $LC_{50}$  ( $LC_{50} < 1,21$ ) in so zato bolj akutno toksični. Izjema je EHS, ki ima kljub visokemu  $\log P$  (= 5,7), nenavadno visok  $LC_{50}$  ( $LC_{50} = 4,36$ ), kar ga uvršča med najmanj toksične UV filtre. Po nizki akutni toksičnosti pa izstopa še BP4, ki ima  $\log P = 2,2$  in  $LC_{50} = 70,42$ .



**Slika 10:** Korelacija  $\log P$  z  $LC_{50}$  vrednostmi napovedanimi s programom VegaNIC z modelom *Model Daphnia Magna*  $LC_{50}$  48h (EPA). Legenda: modri stolpci –  $\log P$ ; rdeči stolpci –  $LC_{50}$ .

Nato smo analizirali še vpliv halogeniranja na vrednosti akutne toksičnosti  $LC_{50}$ . Na sliki 11 smo grafično prikazali napovedane vrednosti  $LC_{50}$  za vse UV filtre (razen BP4, ki ima izrazito visoke vrednosti  $LC_{50}$ ) in njihove klorirane in bromirane razgradne produkte. Opazimo lahko, da je vrednost  $LC_{50}$  najvišja za osnovne UV filtre, s halogeniranjem pa se  $LC_{50}$  niža, kar pomeni, da se akutna toksičnost pri razgradnih produktih poveča. Pri vseh razgradnih produktih se bromiranim produktom vrednosti  $LC_{50}$  znižajo bolj kot pri kloriranih produktih, kar pomeni, da so v primeru preučevanih UV filtrov bromirani derivati bolj akutno toksični kot klorirani derivati enakega UV filtra.



**Slika 11** Prikaz vrednosti LC50 (v mg/L) za UV filtre in njihove mono- ali dihalogenirane RP. Legenda: Zeleni stolpci – izvorni UV filter; oranžni stolpci – klorirani RP; modri stolpci – bromirani RP.

## 4.5 Endokrino delovanje

Endokrino delovanje smo napovedali z dvema različnima programoma: Veganic z modelom Relative Binding Affinity Model in programom Endocrine Disruptome.

### 4.5.1 Program VegaNIC – Relative Binding Affinity Model

S programom VegaNIC z modelom Relative Binding Affinity Model smo napovedali endokrino toksičnost kot posledico vezave spojin na estrogenski receptor. Program napove, če se spojina veže na receptor ali ne. V kolikor se spojina veže na ER receptor, je označena z **zeleno**, kar pomeni, da je spojina aktivna na receptor ER. Če je obarvana **rdeče**, pomeni, da je spojina neaktivna, saj se na receptor ER ne veže. Hkrati nam program poda oceno zanesljivosti napovedi v treh stopnjah: visoka (\*\*\*) , srednja (\*\*) ali nizka zanesljivost (\*) (Preglednica VIII). Program je za 34 % analiziranih spojin podal napoved z nizko zanesljivostjo (v preglednici označeno z \*), zato teh podatkov nismo upoštevali.

**Program VegaNIC je za UV filtre in njihove RP napovedal naslednje rezultate:**

- Za **BZS** in vse njegove RP (BZS-R1 do BZS-R4) je napovedana **aktivnost** na ER, vendar je zanesljivost napovedi srednja (spojine se lahko nahajajo izven območja uporabnosti modela).

- za **PS** je napovedana **neaktivnost** na ER, kar je potrjeno tudi z eksperimentalnimi podatki v podatkovni bazi modela. Prav tako so na ER kot **neaktivni** napovedani tudi vsi razgradni produkti PS (PS-R1 do PS-R4), in to z visoko verjetnostjo zanesljivosti.
- Za **EHS** je napovedana **neaktivnost** na ER, kar je potrjeno tudi z eksperimentalnimi podatki v podatkovni bazi modela. Napoved za vse RP ima zgolj nizko zanesljivost, zato teh podatkov ne moremo obravnavati kot verodostojnih.
- Za **BP3** je napovedana **aktivnost** na ER, kot tudi za BP3-R1, BP3-R2 (oba klorirana RP) in BP3-R4 (trikloriran produkt po oksidaciji karbonilne skupine). Za vse ostale RP ima napoved zgolj nizko zanesljivost, zato teh podatkov ne moremo obravnavati kot verodostojnih.
- Za **BP4** je napovedana aktivnost, vendar z nizko zanesljivostjo, zato teh podatkov ne moremo upoštevati. **Aktivnost** na ER s srednjo zanesljivostjo je napovedana samo za BP4-R3 (dihalogeniran produkt po oksidaciji karbonilne skupine) in BP4-R7 (bromiran in kloriran produkt).
- Za **EDPABA** je napovedana **neaktivnost** na ER, kar je potrjeno tudi z eksperimentalnimi podatki v podatkovni bazi modela. Prav tako so na ER kot **neaktivni** napovedani vsi razgradni produkti PS (EDPABA-R1 do EDPABA-R4) z visoko verjetnostjo zanesljivosti.
- Za **BMDM** je napovedana **neaktivnost** na ER, vendar je zanesljivost napovedi srednja (spojine se lahko nahajajo izven območja uporabnosti modela). **Neaktivnost** s srednjo zanesljivostjo je napovedana za oba monohalogenirana produkta BMDM-R1 in BMDM-R3, z visoko zanesljivostjo pa za dihalogenirana RP BMDM-R2 in BMDM-R4.
- Za **EHMC** je napovedana neaktivnost, vendar z nizko zanesljivostjo, zato teh podatkov ne moremo upoštevati. **Neaktivnost** s srednjo zanesljivostjo je napovedana za dikloriran RP (EHMC-R2). Za oba bromirana produkta je napovedana **aktivnost** – za monobromirani EHMC-R3 (s srednjo zanesljivostjo) in za dibromirani RP EHMC-R4 (z visoko zanesljivostjo).
- Za **4-MBC** in vse njegove RP (4-MBC-R1 do 4-MBC-R4) je napovedana **aktivnost** na ER z visoko zanesljivostjo napovedi.

- Pozorni smo bili ali se je kateremu izmed predvidenih RP povečala aktivnost glede na izvorni UV filter. To smo opazili le pri enem UV filtru, saj je za **EHMC** program napovedal **neaktivnost** na ER (vendar z nizko zanesljivostjo), medtem ko je za EHMC-R3 in EHMC-R4 (mono- in dibromiran RP) napovedana **aktivnost** na ER.

**Preglednica VIII:** Rezultati programa VegaNIC za napoved endokrine toksičnosti preko ER za UV filtre in njihove RP. Legenda: Zeleno obarvan kvadrater = spojina ni aktivna na ER, rdeče obarvan kvadrater = spojina je aktivna na ER. V kvadratih so navedene še zvezdice, ki opredeljujejo zanesljivost napovedanega rezultata: \*\*\* Visoka zanesljivost (spojina se nahaja v območju uporabnosti modela), \*\* Srednja zanesljivost (spojina se lahko nahaja izven območja uporabnosti), \* Nizka zanesljivost (spojina se nahaja izven območja uporabnosti).

UV filter in razgradni produkti	Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model (IRFMN)	UV filter in razgradni produkti	Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model (IRFMN)
<b>BZS</b>	**	<b>EHPABA</b>	EXPERIMENTAL DATA
BZS-R1	**	EHPABA-R1	***
BZS-R2	**	EHPABA-R2	***
BZS-R3	**	EHPABA-R3	***
BZS-R4	**	EHPABA-R4	***
<b>PS</b>	EXPERIMENTAL DATA	EHPABA-R5	***
PS-R1	***	<b>BMDM</b>	**
PS-R2	***	BMDM-R1	**
PS-R3	***	BMDM-R2	***
PS-R4	***	BMDM-R3	**
<b>EHS</b>	EXPERIMENTAL DATA	BMDM-R4	***
EHS-R1	*	<b>EHMC</b>	*
EHS-R2	*	EHMC-R1	*
EHS-R3	*	EHMC-R2	**
EHS-R4	*	EHMC-R3	**
<b>BP3</b>	**	EHMC-R4	***
BP3-R1	**	<b>4-MBC</b>	***
BP3-R2	**	4-MBC-R1	***
BP3-R3	*	4-MBC-R2	***
BP3-R4	**	4-MBC-R3	***
BP3-R5	*	4-MBC-R4	***
BP3-R6	*		
BP3-R7	*		
BP3-R8	*		
BP3-R9	*		
<b>BP4</b>	*		
BP4-R1	*		
BP4-R2	*		
BP4-R3	**		
BP4-R4	*		
BP4-R5	*		
BP4-R6	*		
BP4-R7	**		
BP4-R8	*		
BP4-R9	*		

## 4.5.2 Program Endocrine Disruptome

Program Endocrine Disruptome smo uporabili za napoved verjetnosti vezave 9 UV filtrov in njihovih razgradnih produktov na 12 hormonskih receptorjev v agonistični in nekaterih primerih tudi v antagonistični konformaciji, na podlagi česar smo ocenili ali bi napovedani RP lahko vplivali na delovanje endokrinega sistema.

Program nam je razvrstil spojine v 4 razrede, glede na stopnjo verjetnosti vezave na določen receptor. Spojine označene z **rdečo** imajo najvišjo verjetnost vezave, z **oranžno** visoko verjetnost, z **rumeno** srednjo verjetnost in z **zeleno** nizko verjetnost vezave na analizirani receptor. Poleg razvrstitve v razrede pa nam program poda še številčno vrednost verjetnosti vezave, za bolj natančno interpretacijo rezultatov. V nadaljevanju smo predstavili rezultate napovedi vezave na hormonske receptorje za posamezne skupine UV filtrov in njihovih razgradnih produktov (Preglednica IX).

- **Na receptor AR** je program napovedal **najvišjo** stopnjo vezave za **4-MBC** (in njegove RP: 4-MBC-R1, 4-MBC-R2, 4-MBC-R3). **Visoko** stopnjo verjetnosti vezave program napove samo za BP3-R1. **Srednja** stopnja vezave velja za **BZS** (in njegove RP: BSZ-R1, BZS-R2), **PS** (PS-R1, PS-R3), **BP3** (BP3-R3, BP3-R4, BP3-R7), **BP4**, 4-MBC-R4. Vse ostale UV filtre (**EDPABA**, **BMDMB**, **EHMC**) in njihove RP je program razvrstil v razred z **najnižjo** verjetnostjo vezave.
- **Na receptor AR an** je program napovedal **najvišjo** stopnjo vezave za dva razgradna produkta **4-MBC** - 4-MBC-R2, 4-MBC-R3. **Visoka** verjetnost vezave je napovedana za **BZS** in vse njegove RP, **PS** (in njegove RP: PS-R1, PS-R2) **BP3** (in njegove RP: BP3-R1, BP3-R2, BP3-R3, BP3-R4, BP3-R7) in BP4-R1, BP4-R6) in **4-MBC** (in njegova RP: 4-MBC-R1, 4-MBC-R4). **Srednja** verjetnost vezave je napovedana za **EHS in EDPABA** in vse njune RP, nekatere razgradne produkte benzofenonov (BP3-R5, BP3-R6, BP3-R8, BP3-R9), **BP4** (in njegove RP: BP4-R2, BP4-R3, BP4-R4, BP4-R5, BP4-R7, BP4-R8, BP4-R9) in PS-R3, PS-R4. Program napove **najnižjo** verjetnost vezave samo za **BMDM** in vse njegove RP.
- **Na receptor ER  $\alpha$**  se z **visoko** verjetnostjo veže **4-MBC** in 4-MBC-R1, s **srednjo** verjetnostjo pa 4-MBC-R3. Vse ostale UV filtre (**BZS**, **PS**, **EHS**, **BP3**, **BP4**, **EHPABA**, **BMDM**, **EHMC**) in

njihove razgradne produkte pa je program razdelil v zelen razred z **najnižjo** verjetnostjo vezave.

Podobni rezultati so tudi za antagonistično obliko **ER  $\alpha$  (an)**, za katerega je program napovedal **srednjo** verjetnost vezave za **4-MBC** (in njegove RP: 4-MBC-R1, 4-MBC-R2, 4-MBC-R3, 4-MBC-R4).

- **Na receptor ER  $\beta$**  je program napovedal **srednjo** verjetnost vezave za **BSZ** (in njegove RP: BZS-R1, BZS-R2, BZS-R3), **4-MBC** (in njegova RP: 4-MBC-R1, 4-MBC-R3) in za PS-R1. Vse ostale UV filtre (**BZS, PS, EHS, BP3, BP4, EHPABA, BMDM, EHMC**) in njihove razgradne produkte je program razdelil v zelen razred z **najnižjo** verjetnostjo vezave.
- Za antagonistično obliko **ER  $\beta$  (an)** je program za **vse UV filtre** in njihove RP napovedal **najnižjo** verjetnost vezave. Izjema je edino **4-MBC**, za katerega je napovedal **visoko** verjetnost vezave na ta receptor.
- **Na receptor GR** je program napovedal **srednjo** verjetnost vezave za BZS-R1, BZS-R2, BZS-R3, BZS-R4, **PS** (in njegove RP: PS-R1, PS-R2, PS-R3, PS-R4), **BP3** (in BP3-R1, BP3-R2, BP3-R3, BP3-R4, BP3-R5, BP3-R6, BP3-R7, **BP4**) (in njegovi RP: BP4-R1, BP4-R2, BP4-R3, BP4-R4, BP4-R5, EDPHABA-R5), **BMDM** in **4 MBC** (in vsi njuni RP), in za EHMC-R1, EHMC-R2. Za UV filtre (**BZS, EHS EDPABA, EHMC**) in preostale RP pa je napovedana **najnižja** verjetnost vezave.
- Za antagonistično obliko **GR (an)** je program za **vse UV filtre** in njihove RP napovedal **najnižjo** verjetnost vezave. Izjema so BDMD-R3, 4-MBC-R2 in 4-MBC-R4, ki jih je program razvrstil v rumen razred s **srednjo** verjetnostjo vezave.
- **Na receptor LXR  $\alpha$**  je program napovedal **nizko** verjetnost vezave za vse UV filtre in njihove RP, razen za BMDM in BMDM-R1, ki ju je razvrstil v rumen razred s **srednjo** verjetnostjo vezave. Prav tako so podobni rezultati za **LXR  $\beta$** , kjer je bila napovedana **nizka** verjetnost vezave za **vse UV filtre** in njihove RP. **Srednja** verjetnost vezave je bila napovedana le za BMDM-R2, BMDM-R3 in BMDM-R4.
- **Za receptorje PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\beta$ , PPAR  $\mu$  in RXR  $\alpha$**  je program napovedal **nizko** verjetnost vezave za **vse UV filtre** in njihove RP.

- **Za receptor TR  $\alpha$**  je program napovedal **visoko** verjetnost vezave za **BMDM** in BMDM-R1, ter 4-MBC-R1 in 4-MBC-R2. Za **BZS, PS, EHS** in vse njihove RP je napovedana **srednja** verjetnost vezave. V rumen razred s **srednjo** verjetnostjo vezave so razvrščeni še **BP-3** (in njegovi RP: BP3-R1, BP3-R2, BP3-R3, BP3-R4, BP3-R5, BP3-R6, BP3-R7), **BP-4** (in njegova RP: BP4-R1, BP4-R4), **EDPABA** (in njegovi RP: EDPABA-R1, EDPABA-R2, EDPABA-R3), **EHMC** (in njegovi RP: EHMC-R1, EHMC-R2, EHMC-R3, EHMC-R4), **4-MBC** (in njegova RP: 4-MBC-R2, 4-MBC-R4) in trije RP od BMDM: BMDM-R2, BMDM-R3, BMDM-R4.
- **Za receptor TR  $\beta$**  je napovedana **visoka** verjetnost vezave za **BMDM** (in njegove RP: BMDM-R1, BMDM-R2, BMDM-R3) in štiri RP od 4-MBC: 4-MBC-R1, 4-MBC-R2, 4-MBC-R3, 4-MBC-R4. **Srednjo** verjetnost vezave je napovedana za **BZS, PS** in vse njune RP. Za **BP3** (in njegove RP: BP3-R1, BP3-R2, BP3-R3, BP3-R4, BP3-R5, BP3-R6, BP3-R7), ter za **BP4** (in njegove RP: BP4-R2, BP4-R5), EHPABA-R2, BMDM-R4, **EHMC** (in njegove RP: EHMC-R1, EHMC-R2, EHMC-R3) in **4-MBC**. **Najnižja** verjetnost vezave je napovedana za **EHS**, (in vse njegove RP) in **EDPABA**.





Kot je razvidno tudi iz obarvanosti preglednice (največ rdeče in oranžno obarvanih polj) imajo analizirani UV filtri in razgradni produkti največjo verjetnost vezave na receptorje **AR, AR  $\alpha$  in TR  $\beta$** .

Androgeno aktivnost osmih UV filtrov (BP3, BP4, 4-MBC, BMDM, ODPABA, HMS, 3-BC in OMC) so dokazovali v raziskavi na celični liniji MDA-kb2. Antagonistično delovanje na androgene receptorje pa so zaradi DHT aktivirane transkripcije AR dokazali samo za dva UV filtra, in sicer BP3 in HMS pri  $IC_{50}=4,98 \times 10^{-6}M$  (BP3) in  $5,57 \times 10^{-6}M$  (HMS). Nobeden od osmih UV filtrov ni izkazoval antagonistične aktivnosti na androgene receptorje med testiranjem (45). Za pet UV filtrov iz omenjene raziskave (**BP3, BP4, 4-MBC, BMDM, ODPABA**) smo tudi sami napovedali aktivnost na androgene receptorje *in silico*. Napovedani rezultati niso popolnoma skladni z rezultati raziskave, saj imata BP3 in 4-MBC napovedano antagonistično delovanje na AR z veliko verjetnostjo, raziskava pa dokazuje, da antagonističnega delovanja nima nobeden izmed UV filtrov.

#### **4.5.2.1 Vpliv halogeniranja na povečanje verjetnosti vezave**

Pri večini UV filtrih smo opazili, da je stopnja verjetnosti vezave na nekatere receptorje odvisna od tega, katera reakcija poteče ob razgradnji ter s katerim halogenim elementom, saj se glede na to spremeni razred vezave. Prav tako je stopnja vezave odvisna tudi od tega ali poteče elektrofilna substitucija do mono- ali dihalogeniranega razgradnega produkta. Zanimalo nas je predvsem, ali se po razgradnji UV filtrov kateremu izmed nastalih razgradnih produktov poveča verjetnost vezave na določen receptor, glede na osnovni UV filter.

To smo opazili pri 7 UV filtrih (oz. pri 12 razgradnih produktih), pri šestih se je verjetnost vezave povečala na enem receptorju, pri BMDM pa se je verjetnost vezave povečala na dveh receptorjih. Rezultate smo prikazali v preglednici X.

**Preglednica X:** Preglednica UV filtrov in njihovih razgradnih produktov, pri katerih se je po razgradnji povečala verjetnost vezave na vsaj en receptor.

UV filter oz. razgradni produkt	Opis RP	Receptor	Verjetnost vezave
<b>BZS</b>		GR	nizka
BZS-R1, BZS-R2	<i>mono- in dikloriran derivat</i>	GR	srednja
BZS-R3, BZS-R4	<i>mono- in dibromiran derivat</i>	GR	srednja
<b>BP3</b>		AR	srednja
BP3-R1	<i>monokloriran derivat</i>	AR	velika
<b>BP4</b>		AR an	srednja
BP4-R1	<i>monokloriran derivat</i>	AR an	velika
BP4-R6	<i>oksidiran in dibromiran</i>	AR an	velika
<b>EDPABA</b>		TR $\beta$	nizka
EDPABA-R2	<i>dikloriran derivat</i>	TR $\beta$	srednja
<b>BMDM</b>		GR an	nizka
BMDM-R3	<i>monobromiran derivat</i>	GR an	srednja
<b>BMDM</b>		LXR $\beta$	nizka
BMDM-R2	<i>dikloriran derivat</i>	LXR $\beta$	srednja
BMDM-R3, BMDM-R4	<i>mono- in dibromiran derivat</i>	LXR $\beta$	srednja
<b>EHMC</b>		GR	nizka
EHMC-R1 in EHMC-R2	<i>mono- in dikloriran derivat</i>	GR	srednja
<b>4-MBC</b>		AR an	velika
4-MBC-R2	<i>dikloriran derivat</i>	AR an	največja
4-MBC-R3	<i>monobromiran derivat</i>	AR an	največja

Iz dobljenih rezultatov lahko vidimo, da je povečanje verjetnosti vezave mogoče tako pri kloriranih in bromiranih produktih. Stopnja halogenacije ne vpliva nujno na povečanje verjetnosti vezave, saj se le-ta spremeni tako pri mono- kot dihalogeniranih produktih. Največkrat pa se verjetnost vezave na vsaj en receptor poviša pri dikloriranih razgradnih produktih, kar smo opazili pri petih proučevanih UV filtrih (BZS, EDPABA, BMDM, EHMC, 4-MBC).

#### 4.6 Ocena tveganja analiziranih UV filtrov

Povečana verjetnost vezave razgradnih produktov prej omenjenih sedmih UV filtrov na določene receptorje je pomembna pri določanju ocene tveganja teh UV filtrov. Tako iz literaturnih podatkov kot tudi iz *in silico* podatkov za BCF in biorazgradljivosti smo ugotovili, da je

izpostavljenost razgradnim produktom UV filtrom najverjetnejša preko bioakumulacije teh snovi v vodnih organizmih, ki jih človek nato zaužije.

Z namenom identificirati potencialno najbolj toksičen UV filter ali katerega izmed razgradnih produktov smo primerjali in povezali rezultate endokrine toksičnosti, pridobljene s programom Endocrine Disruptome, z rezultati o potencialu za bioakumulacijo in akutni toksičnosti, pridobljenimi s programom VegaNIC (preglednica XI). Rezultate za vezavo na receptorje AR, AR an, TR  $\alpha$  in TR  $\beta$  (verjetnosti vezave na te receptorje so bile najvišje) smo prikazali v preglednici XII, ter jih primerjali z dobljenimi rezultati o logP, BCF in LC<sub>50</sub>. Glede na rezultate napovedane *in silico* smo ocenili, da je najbolj varen UV filter BP4, najbolj toksičen UV filter pa je 4-MBC.

**Preglednica XI:** Prikaz rezultatov logP, BCF, LC<sub>50</sub> in verjetnost vezave na receptorje AR, AR an, TR  $\alpha$  in TR  $\beta$  za 7 UV filtrov, katerim se je zaradi razgradnje povečala verjetnost vezave na vsaj enem receptorju. Z zelenim okvirjem je označen potencialno najvarnejši UV filter: BP4, z rdečim okvirjem je označen potencialno najnevarnejši UV filter: 4-MBC.

UV filter oz. razgradni produkt	Opis razgradnega produkta	logP	Faktor BCF	LC <sub>50</sub>	AR	AR an	TR $\alpha$	TR $\beta$
<b>BZS</b>		2,75	2,08	3,58				
BZS-R1	monokloriran derivat	3,4	1,8	1,3				
BZS-R2	dikloriran derivat	4,06	2,16	0,78				
BZS-R3	monobromiran derivat	3,51	1,56	0,26				
BZS-R4	dibromiran derivat	4,27	1,57	0,14				
<b>BP3</b>		2,63	1,89	2,52				
BP3-R1	monokloriran derivat	3,29	1,13	1,25				
<b>BP-4</b>		2,62	0,41	70,42				
BP4-R1	monokloriran derivat	3,27	0,37	119,7				
BP4-R6	oksidiran in dibromiran derivat	4,14	0,73	30,27				
<b>EDPABA</b>		4,13	1,9	1,21				
EDPABA-R2	dikloriran derivat	5,43	2,22	0,22				
<b>BMDM</b>		4,32	1,6	0,1				
BMDM-R2	dikloriran derivat	5,54	2,04	0,03				
BMDM-R3	monobromiran derivat	5	1,64	0,03				
BMDM-R4	dibromiran derivat	5,76	1,59	0,02				
<b>EHMC</b>		4,47	1,64	0,67				
EHMC-R1	monokloriran derivat	5,12	1,88	0,3				
EHMC-R2	dikloriran derivat	5,77	2,08	0,2				
<b>4-MBC</b>		4,4	2,26	0,56				
4-MBC-R2	dikloriran derivat	5,32	3,09	0,31				
4-MBC-R3	monobromiran derivat	4,78	2,51	0,07				

#### 4.6.1 Najvarnejši UV filter – BP4

**BP4** smo glede na *in silico* rezultate iz preglednice XII ovrednotili kot najbolj varen UV filter.

- **logP:** BP4 ima najnižjo vrednost logP izmed preučevanih UV filtrov, ki se pri mono- in dihalogeniranih produktih poviša, najvišjo vrednost logP ima zato dibromiran razgradni produkt BP4-R6.
- **BCF:** BCF za BP4 in vse njegove razgradne produkte je pod 0,73, zaradi česar spadajo med snovi, ki se ne bioakumulirajo. *In silico* napovedani rezultati za faktor BCF se skladajo z literaturnimi podatki iz preglednice I (*Uvod; 1.2.2 Parametri, ki vplivajo na usodo UV filtrov v okolju*), za BCF in porazdelitveni faktor  $K_{oc}$  izvornega UV filtra. Večina UV filtrov ima vrednost  $K_{oc} > 2000$ , BP4 pa ima izrazito nizek porazdelitveni faktor  $K_{oc}$  (92,37), ki nam poda informacijo o veliki mobilnosti in ima zato manjšo nagnjenost k akumulaciji v okolju, kar potrjuje tudi literaturni podatek za nizek BCF (BCF=3,2) tega UV filtra.
- **Akutna toksičnost LC<sub>50</sub>:** BP4 in njegovi razgradni produkti izstopajo tudi po visokih vrednostih LC<sub>50</sub>. Trije razgradni produkti BP4-R1, BP4-R8 in BP4-R9 imajo LC<sub>50</sub> višji od 100 mg/L in so edini izmed razgradnih produktov, ki so v tem modelu opredeljeni kot popolnoma netoksične spojine. Izvorni UV filter in štirje izmed njegovih razgradnih produktov imajo LC<sub>50</sub> med 10-100 mg/L, zaradi česar se uvrščajo med blago toksične spojine.
- **Endokrina toksičnost:** Na 11 receptorjev je napovedana najnižja verjetnost vezave za BP4 in vse njegove razgradne produkte. Srednja verjetnost pa je napovedana za vezavo BP4 in večina njegovih razgradnih produktov na antagonistično konformacijo AR. Velika verjetnost vezave je napovedana le za 2 razgradna produkta (monokloriran produkt BP4-R1 in dibromiran produkt BP4-R6) na antagonistično konformacijo AR (an), vsi ostali razgradni produkti imajo srednjo ali nizko verjetnost vezave.
- V smislu sposobnosti vezave na ostale receptorje se pri nekaterih razgradnih produktih verjetnost vezave celo zniža iz srednje na nizko verjetnost. To opazimo pri receptorjih AR, GR, TR  $\alpha$  in TR  $\beta$ . BP4 in večina razgradnih UV filtrov ima napovedano najnižjo verjetnost vezave na vseh 12 človeških receptorjev (izjema je AR an, kjer so v večini napovedane srednje verjetnosti vezave izvornega UV filtra in RP) iz česar sklepamo na šibko endokrino delovanje tega UV filtra tudi po potencialni razgradnji v vodnem okolju.

**Preglednica XII:** Rezultati programa VegaNIC za faktor BCF, LC50 in programa Endocrine Disruptome za logP in verjetnosti vezave na 16 receptorjev za BP4 in njegove razgradne produkte.

UV filter in razgradnji produkti	logP	faktor BCF	Daphnia Magna LC50 48h (EPA)	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
<b>BP4</b>	2,62	0,41	70,42	-7,5	-7,5	-7,5	-7,8	-7,4	-7,0	-8,5	-7,3	-8,6	-8,7	-7,7	-7,7	-6,9	-8,5	-8,1	-8,2
BP4-R1	3,27	0,37	119,7	-6,7	-7,7	-7,7	-7,6	-7,1	-6,9	-8,5	-7,2	-8,5	-8,2	-7,8	-7,7	-7,9	-8,7	-7,8	-7,6
BP4-R2	3,26	0,31	4,69	-5,8	-7,2	-7,7	-7,6	-6,9	-6,9	-8,5	-7,0	-8,0	-8,2	-7,9	-8,0	-7,1	-8,6	-7,2	-8,1
BP4-R3	3,91	0,3	3,71	-6,5	-7,0	-6,5	-6,5	-6,6	-6,1	-7,6	-6,6	-8,4	-8,5	-7,7	-7,2	-7,3	-8,4	-6,8	-7,5
BP4-R4	3,38	0,52	3,55	-5,8	-7,6	-7,6	-7,4	7,0	-6,7	-8,4	-7,4	-8,5	-8,2	-7,9	-7,1	-8,0	-8,6	-7,3	-7,4
BP4-R5	3,37	0,45	29,2	-5,8	-7,1	-7,6	-7,0	-7,3	-6,9	-8,2	-7,0	-8,5	-8,3	-7,8	-7,6	-7,2	-8,6	-6,5	-7,9
BP4-R6	4,14	0,73	30,27	-5,1	-8,0	-7,7	-6,4	-7,4	-7,1	-7,2	-6,7	-7,9	-8,2	-7,1	6,9	-6,6	-7,4	-6,5	-7,6
BP4-R7	4,02	0,4	18,49	-4,9	-6,7	-7,2	-6,5	-6,6	-6,4	-7,2	-6,6	-7,7	-8,1	-8,0	-7,7	-7,0	-8,5	-6,5	-7,7
BP4-R8	2,91	0,29	137,84	-5	-5,9	-5,7	-5,5	-5,7	-5,6	-6,0	-5,3	-6,1	-6,2	-5,9	-5,6	-5,3	-6,3	-5,7	-6,1
BP4-R9	1,85	0,07	4245,14	-6,3	-6,2	-5,9	-5,7	-5,9	-6,2	-5,9	-5,6	-5,9	-6,1	-6,2	-5,9	-5,4	-5,9	-6,2	-5,9

#### 4.6.1.1 BP4 – primerjava rezultatov pridobljenih *in silico* s podatki iz literature

##### **Ekotoksičnost BP4**

V preteklosti so objavili zelo malo raziskav, ki bi preučevale in dokazale toksične učinke BP4. V raziskavi, izvedeni leta 2017 na Japonskem, so raziskovali akutno toksičnost in oceno tveganja za okolje za benzofenona BP3 in BP4. Akutno toksičnost so dokazovali s tremi testi: test s *Chlorella vulgaris* (sladkovodna alga – določa se EC<sub>50</sub> (mg/L) po času izpostavljenosti 48 h), test z *Daphnia magna* (planktonski rakec – določa se LC<sub>50</sub> (mg/L) po času izpostavljenosti 48 h) in s testom z *Brachydanio rerio* (zarodki rib cebric - določa se LC<sub>50</sub> (mg/L) po času izpostavljenosti 96 h) in tako sklepali, kakšno tveganje predstavljata oba UV filtra kot hormonska motilca v okolju. Kriterij za določitev stopnje toksičnosti je glede na vrednost EC<sub>50</sub> (96h)/ LC<sub>50</sub> (48h)/ LC<sub>50</sub> (96h) (mg/L) pri vseh treh testih enak: <1 zelo visoka stopnja toksičnosti, 1-10 visoka stopnja, 10-100 srednja stopnja toksičnosti in > 100 nizka stopnja toksičnosti. Rezultati so predstavljeni v preglednici XIII, iz katere je razvidno, da ima BP4 pri vseh treh testih veliko boljše rezultate iz vidika akutne toksičnosti v primerjavi z BP3 in je posledično BP4 varnejši od BP3. S testoma *C. vulgaris* in *B. rerio* so BP4 opredelili kot UV filter z nizko stopnjo toksičnosti, s testom *D. magna* pa kot spojina s srednjo stopnjo toksičnosti. Vsi trije testi *C. vulgaris*, *D. magna* in *B. rerio* so BP3 opredelili kot UV filter z visoko stopnjo akutne toksičnosti.

**Preglednica XIII:** Rezultati raziskave o akutni toksičnosti BP3 in BP4 s tremi testi *C. vulgaris*, *D. magna* in *B. rerio* (povzeto po 41)

Test akutne toksičnosti	enota: mg/L	BP3	BP4
test s <i>Chlorella vulgaris</i>	EC <sub>50</sub> (96h)	2,98	<b>201</b>
test z <i>Daphnia magna</i>	LC <sub>50</sub> (48h)	1,09	<b>47,47</b>
test z <i>Brachydanio rerio</i>	LC <sub>50</sub> (96h)	3,89	<b>633</b>

V raziskavi so preučevali še ekotoksičnost kombinacije BP3 in BP4 z izračunom enot toksičnosti (TU = Toxic units). TU<sub>i</sub> za eno snov se izračuna po formuli  $TU = C_i / EC_{50_i}$  in predstavlja razmerje med koncentracijo snovi v zmesi (C<sub>i</sub>) in vrednostjo EC<sub>50</sub> oz LC<sub>50</sub> zmesi. Toksikološka enota zmesi je vsota TU<sub>i</sub> posameznega UV filtra. Če je skupni TU<sub>i</sub> večji od 1, ima zmes antagonistično delovanje, v primeru, da je TU<sub>i</sub> manjši od 1, pa ima zmes sinergistično delovanje. TU<sub>i</sub> vrednosti zmesi pri vseh treh vodnih organizmih *C. vulgaris*, *D. magna* in *B. rerio* so bile višje od 1.2, iz česar so sklepali na antagonistično delovanje zmesi obeh UV filtrov. Opazili so, da kombinacija obeh UV filtrov spodbudi močno povečanje nivoja mRNA že pri nižjih koncentracijah, podrobnejšega mehanizma toksičnega delovanja pa niso objavili. Antagonistični učinek se je s povišanjem koncentracije mešanice UV filtrov povečeval (42).

Rezultati te raziskave dokazujejo akutno toksičnost zmesi BP3 in BP4, medtem ko akutne toksičnosti za sam UV filter BP4 niso dokazali oz. je le-ta zelo majhna. Ker vemo, da v sončnih kremah in posledično v vodnem okolju večinoma najdemo kombinacijo več UV filtrov, bi lahko bil to pomemben podatek pri upoštevanju ocene tveganja izvornih UV filtrov. Zaradi posledic bioakumulacije bi lahko torej imela zmes teh dveh filtrov po vstopu v vodno okolje endokrino delovanje na vodne organizme in posredno tudi na človeka.

#### 4.6.2 Najbolj toksičen UV filter: 4-MBC

**4-MBC** smo glede na *in silico* rezultate, predstavljene v preglednici XIV, ovrednotili kot najbolj toksičen UV filter.

- **LogP:** **4-MBC** ima logP=4,4, zaradi česar ima lipofilne lastnosti in posledično **veliko nagnjenost k akumulaciji** v okolju in maščobnem tkivu organizmov. LogP se pri

monohalogeniranima produktoma poviša, in sicer pri kloriranem produktu (4-MBC-R1;  $\log P=4,67$  in pri bromiranem produktu 4-MBC-R3 na  $\log P=4,78$ . Opazimo, da se pri obeh dihalogeniranih produktih  $\log P$  še zviša na  $\log P=5,32$  pri dikloriranem produktu (4-MBC-R2), pri dibromiranem produktu pa na  $\log P=5,54$  (4-MBC-R4)

- **BCF:** Glede na visoke  $\log P$  vrednosti izvornega UV filtra in vseh njegovih razgradnih produktov so pričakovane tudi zelo visoke vrednosti BCF.  $\log BCF$  za 4-MBC in vse njegove razgradne produkte je nad 2,26, zaradi česar spadajo med spojine, ki se lahko bioakumulirajo. Najvišjo vrednost  $\log BCF=3,09$  ima dikloriran produkt 4-MBC-R2, kar je tudi najvišja vrednost izmed vseh preučevanih razgradnih produktov.
- **Akutna toksičnost  $LC_{50}$ :** Vrednost akutne toksičnosti  $LC_{50}$  4-MBC in vseh njegovih razgradnih produktov je pod vrednostjo 0,1 mg/L, zaradi česar spada med zelo toksične spojine. Najnižji  $LC_{50}=0,0425$  mg/L ima dibromiran produkt 4-MBC-R4. Zaradi največje akutne toksičnosti (najnižji  $LC_{50}$ ), najvišjega  $\log P$  in visokega faktorja BCF smo razgradni produkt 4-MBC-R4 opredelili kot razgradni produkt, ki ima največjo možnost akumuliranja v maščobnem tkivu vodnih organizmov in je tako najbolj ekotoksičen.
- **Endokrina toksičnost:** Na receptor AR je napovedana največja verjetnost vezave za 4-MBC in njegov mono- (4-MBC-R1) in dikloriran razgradni produkt (4-MBC-R2) ter za monobromiran produkt (4-MBC-R3). Velika verjetnost je napovedana za vezavo izvornega UV filtra na antagonistično konformacijo AR, medtem ko se pri dikloriranem (4-MBC-R2) in monobromiranem produktu (4-MBC-R3) poveča verjetnost vezave na največjo. Srednja verjetnost vezave je napovedana za vezavo na TR  $\alpha$  se poveča na veliko verjetnost pri 4-MBC-R1 in 4-MBC-R3 na TR  $\alpha$  in TR  $\beta$ , ki pa se poveča na veliko verjetnost pri vseh razgradnih produktih. Srednja verjetnost vezave je napovedana za vezavo na antagonistično konformacijo ER  $\beta$ , ki pa se zmanjša na najmanjšo verjetnost pri vseh razgradnih produktih. Na 6 receptorjev je napovedana najnižja verjetnost vezave za 4-MBC in vse njegove razgradne produkte (preglednica XV).
- **4-MBC** in njegovi razgradni produkti so edini, za katere je program VegaNIC z modelom Relative Binding Affinity Model napovedal aktivnost na receptorju ER z visoko zanesljivostjo (preglednica VII). Zaradi velike nagnjenosti k biakumulaciji, ki je posledica



zelo visokih vrednosti logP in nizkih vrednosti LC<sub>50</sub>, ki uvršča tako izvorni UV filter kot njegove razgradne produkte med najbolj akutno toksične spojine ter zaradi povečane vezave nekaterih razgradnih produktov na človeške jedrne receptorje AR, AR an, TR α in TR β, smo ovrednotili 4-MBC kot **najbolj toksičen UV filter**, ki bi ob halogeni razgradnji s klorom ali bromom zaradi bioakumulacije lahko imel še močnejše endokrine učinke kot izvorni UV filter.

**Preglednica XIV** Rezultati programa VegaNIC za faktor BCF, LC<sub>50</sub> in programa Endocrine Disruptome za logP in verjetnosti vezave na 16 receptorjev za 4-MBC in njegove razgradne produkte.

UV filter in razgradnji produkti	logP	faktor BCF	Daphnia Magna LC <sub>50</sub> 48h (EPA)	AR	AR an	ER α	ER α an	ER β	ER β an	GR	GR an	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	RXR α	TR α	TR β
4-MBC	4,4	2,26	0,559	-8,7	-8,4	-9,3	-8,7	-8,7	-8,7	-9,1	-7,9	-9,6	-10,0	-7,8	-8,3	-6,9	-9,7	-8,5	-9,3
4-MBC-R1	4,67	2,64	0,3079	-9,1	-9,1	-8,9	-9,3	-8,7	-8,2	-8,6	-8,2	-9,8	-10,1	-8,2	-8,9	-8,8	-9,7	-10,0	-9,8
4-MBC-R2	5,32	3,09	0,2146	-9,5	-9,5	-8,2	-9,1	-6,9	-7,7	-8,8	-8,6	-9,6	-10,3	-7,7	-8,4	-7,3	-9,6	-8,8	-10,1
4-MBC-R3	4,78	2,51	0,0665	-8,9	-8,7	-8,7	-9,1	-8,2	-7,7	-8,6	-8,2	-9,6	-10,3	-7,6	-8,6	-8,2	-9,6	-10,1	-9,6
4-MBC-R4	5,54	2,49	0,0425	-7,9	-8,1	-5,8	-7,5	-4,7	-7,6	-8,5	-8,8	-9,0	-10,1	-7,2	-7,8	-7,2	-9,0	-8,9	-9,7

#### 4.6.2.1 4-MBC – primerjava rezultatov pridobljenih *in silico* s podatki iz literature

##### **Ekotoksikološki vpliv 4-MBC**

4-MBC je eden izmed najpogosteje uporabljenih organskih UV filtrov, zaradi česar je pogosto prisoten v vodnih ekosistemih, v katerih so predvsem v zadnjih letih dokazali njegove negativne učinke na vodne organizme. V *in vivo* multigeneracijski raziskavi na ceponožnih rakah *Tigriopus japonicus* so Chen in sodelavci preučevali vpliv 4-MBC na preživetje, razvoj in razmnoževanje. *T. japonicus* so izpostavili različnim koncentracijam (0, 0,5, 1, 5 in 10 µg/L) štirim zaporednim generacijam (F0 – F3). Rezultati na generaciji F0 so pokazali, da 4-MBC povzroča smrtnost pri letalnih koncentracijah 5 in 10 µg/L, pri naslednjih generacijah (F1-F3) izpostavljenost 4-MBC ni vplivala na stopnjo preživetja. Pri potomcih (na generacijah F1-F3) so odkrili, da 4-MBC tudi pri najnižji koncentraciji 0,5 µg/L povzroča oksidativni stres in apoptozo celic, kar vpliva na razvoj in razmnoževanje *T. japonicus* (43).

### **Endokrino delovanje 4-MBC**

V številnih raziskavah so dokazali tudi endokrino delovanje 4-MBC, in sicer predvsem estrogeno delovanje preko delovanja na estrogenski receptor beta (ER  $\beta$ ). V *in vitro* raziskavi na podganah so ugotavljali vpliv 4-MBC na estrogenske receptorje na tumorski celični liniji MCF-7. Ugotovili so, da 4-MBC stimulira proliferacijo celic MCF-7, pri koncentraciji  $EC_{50}=3,9 \mu\text{M}$ . V raziskavi so dokazali še, da 4-MBC vpliva na spremenjeno izražanje  $16\text{-}\alpha\text{-}^{125}\text{I}$ -estradiola iz citosolnih receptorjev prašičje maternice ( $IC_{50}=112 \mu\text{M}$ ) ter iz človeških estrogenskih receptorjev  $\beta$  (ER  $\beta$ ) pri koncentraciji  $IC_{50}=35,3 \mu\text{M}$ . Spremembe v izražanju na človeškem estrogenskem receptorju  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) niso dokazali do koncentracij 3 mM, kar dokazuje višjo afiniteto vezave 4-MBC do ER  $\beta$ , kot na ER  $\alpha$  (44). *In silico* rezultati, ki smo jih napovedali s programom Endocrine Disruptome za vezavo 4-MBC na estrogenska receptorja ER  $\alpha$  in ER  $\beta$ , se ne ujemajo z dokazano večjo afiniteto na receptor ER  $\beta$ , saj je z veliko verjetnostjo napovedana vezava na ER  $\alpha$ , na ER  $\beta$  pa le s srednjo verjetnostjo.

V *in vivo* raziskavi so Durrer in sodelavci na podganjih samcih dokazovali estrogene učinke na reproduktivni razvoj pri prenatalni in postnatalni izpostavljenosti 4-MBC. Podganji samci so bili dnevno izpostavljeni 0,7, 7, 24 in 47 mg/kg/dan 4-MBC pred parjenjem pa vse do odrasle dobe. Dokazali so, da ima 4-MBC vpliv na razvoj moških reprodukcijskih funkcij in organov, saj so opazili znižanje mase prostate pri odraslih samcih, povišano maso testisov in odložen nastop razvoja reproduktivnih organov. Spremenjeno je bilo izražanje receptorjev: AR, IGF-1, ER  $\alpha$  in ER  $\beta$  v prostati, kar se je odražalo na spremenjenem izražanju mRNA kot tudi na nivoju beljakovin. Odmerek, pri katerem so opazili neželene učinke, je bil najnižji testiran odmerek, in sicer 0,7 mg/kg (45) Rezultati napovedani *in silico* napovedujejo aktivnost 4-MBC na receptorju AR z največjo verjetnostjo, ter na receptor ER  $\alpha$  z veliko verjetnostjo, kar je v skladu z rezultati iz raziskave. Na receptor ER  $\beta$  je *in silico* napovedana aktivnost le s srednjo verjetnostjo, kar se ne ujema popolnoma z rezultati *in vivo* raziskave.

## 5 Sklep

1. Človek je razgradnim produktom UV filtrov najbolj izpostavljen preko prehrane zaradi procesa bioakumulacije v maščobnem tkivu vodnih organizmov, saj ima večina UV filtrov vrednost logP višjo od 3. Številne raziskave potrjujejo razgradnjo UV filtrov ob prisotnosti reaktivnih halogenih (klorovih in bromovih) spojin v vodnem okolju. Razgradnja najpogosteje poteka preko elektrofilne substitucije s klorom, pri kateri nastajajo mono- ali diklorirani razgradni produkti.

2. S programom Endocrine Disruptome smo izračunali logP razgradnim produktom UV filtrov in dokazali, da se logP z razgradnjo poveča, na povišanje vrednosti logP pa vpliva tudi stopnja halogenacije. Literaturni podatki navajajo, da se s povišanjem logP poveča obstojnost in zmanjša razgradnja snovi v okolju, ter da se posledično povišajo tudi vrednosti BCF. Napovedane vrednosti BCF s programom VegaNIC so precej nižje v primerjavi z literaturnimi podatki. Program je namreč vse UV filtre opredelil kot snovi, ki se ne bioakumulirajo, v literaturi pa je dokazana prisotnost UV filtrov v sedimentu in vodnih organizmih.

3. Pri rezultatih za akutno toksičnost smo opazili korelacijo med parametroma logP in  $LC_{50}$  – višji logP kot ima UV filter, nižje so vrednosti  $LC_{50}$  in je zato tak UV filter bolj akutno toksičen. Pri analizi vpliva halogeniranja na akutno toksičnost smo ugotovili, da se  $LC_{50}$  s halogeniranjem znižajo tako pri kloriranih kot bromiranih derivatih. Opazili smo še, da so bromirani derivati bolj akutno toksični kot klorirani derivati enakega UV filtra.

4. *In silico* rezultati, pridobljeni s programoma Endocrine Disruptome in VegaNIC, so napovedali endokrino delovanje razgradnih produktov UV filtrov. Za BP3 in 4-MBC je program VegaNIC napovedal aktivnost na receptorju ER. Program Endocrine Disruptome je napovedal največje endokrino delovanje na človeške receptorje AR, AR $\alpha$ , TR $\alpha$  in TR $\beta$ . Pri 7 UV filtrih smo opazili, da se endokrino delovanje po halogeniranju poveča. Pri 12-ih razgradnih produktih teh UV filtrov smo namreč opazili večjo verjetnost vezave na vsaj en receptor, na katerih bi bilo potrebno izvesti dodatna *in vivo/in vitro* testiranja za potrditev delovanja.

5. Glede na *in silico* rezultate za ekotoksikološki vpliv, verjetnost biološke razgradnje, faktorja BCF, napovedi akutne in endokrine toksičnosti smo določili najbolj varen UV filter – BP4 in najbolj toksičen UV filter – 4-MBC. Rezultati za endokrino delovanje 4-MBC se večinoma ujemajo z dokazi iz *in vivo/in vitro* testiranj, saj so estrogeno delovanje 4-MBC dokazali v predhodnih raziskavah.

6. Ljudje so veliki potrošniki rib in morske hrane, zato je izpostavljenost okoljskim endokrinim motilcem preko hrane potrebno upoštevati kot eno izmed možnih in zelo pomembnih poti vnosa razgradnih produktov UV filtrov. V nalogi smo nakazali, da imajo lahko nekateri razgradni produkti še močnejše endokrine učinke kot izvorni UV filtri. Med preučevanimi UV filtri izstopa 4-MBC, zato bi bilo smiselno toksikološki profil halogeniranih razgradnih produktov 4-MBC še dodatno preučiti z *in vitro* in *in vivo* raziskavami.

*In silico* rezultati v nalogi, pridobljeni z različnimi programi, so sicer včasih odstopali od literaturnih podatkov, vendar menimo, da *in silico* preučevanje predstavlja pomemben del pri nadaljnjih usmeritvah *in vitro* in *in vivo* raziskav endokrinih okoljskih motilcev.

## 6 Viri

1. Dias-Cruz MS, Liorca M, Barcelo D: Organic UV filters and their photodegradate, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27: 873-874
2. Čajkovec M: *Kozmetologija*, Slap, Zagreb, 2000, 2: 133-138
3. Santos AJM, Miranda MS, Esteves da Silva J: The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water research* 46, 2012: 3167 – 3176.
4. Lambropoulou DA, Nollet LM: *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment*, Willey, United Kingdom, 2014; 2: 459 – 467
5. DiNardo J C, Downs C A: Dermatological and environmental toxicological impact of the sunscreen ingredient oxybenzone/benzophenone-3. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2017; 17: 15-19
6. Ramos S, Homem V, Alves, A, Santos, L: Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment — a review. *Science of the Total Environment*, 2015; 526: 278–311
7. Poiger T, Buser RH, Balmer EM, Berqvist PA, Muller MD: Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere*, 2004; 951-963
8. Balmer EM, Buser HR, Muler M, Poiger T: Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes. *Environmental Science & Technology*, 2005; 39: 953-962
9. Negreira N, Rodriguez I, Ramil M, Rubi E, Cela R: Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2009; 638: 36–44
10. Włodoyka-Bergier A, Bergier T, Nowak-Bator M: UV filters as disinfection by-products precursors in swimming pool water. *Proceedings of ECOpole*, 2016; 10: 578-579

11. Deborde M, von Guten U: Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment – kinetics and mechanisms: a critical review. *Water research*, 2008; 42: 13-51
12. Benito Quintana J, Rodil R, Rodriguez I: Transformation Products of Emerging Contaminates upon Reaction with Conventional Water Disinfection Oxidants (Chapter 4), Wiley, 2014; 1: 123-160
13. Negreira N, Canosa P, Rodriguez I, Ramil M, Rubi E, Cela R: Study of some UV filters stability in chlorinated water and identification of halogenated by-products by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography*, 2008; 206-214
14. Liu W, Wei D, Liu Q, Du Y: Transformation pathways and acute toxicity variation of 4-hydroxyl benzophenone in chlorination disinfection process. *Chemosphere*, 2016; 154: 491-498
15. Lambropoulou DA, Nollet LM: Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment, Wiley, United Kingdom, 2014; Vol 1: 124 -141; 229- 231
16. Birkett JW, Lester NJ: Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. Lewis publishers, 2002: 2 – 8
17. Pickup J: Environmental safety of halogenated organic by products from use of active chlorine. *Science dossier*, 2010: 6 - 10
18. Mariana M. de Oliveira e Sa, Margarida S. Miranda, Joaquim C.G. Esteves da Silva: Study of the transformation of two salicylates used in personal care products in chlorinated water. *Water research*, 2014; 32-39
19. Rang HP, Dale MM, Ritter M, Flower RJ, in Henderson G: Rang and Dale's Pharmacology. Elsevier, 2012; 7: 23–48
20. Program Endocrine disruptome <http://endocrinedisruptome.ki.si/receptors.html>  
(Dostopano: februar 2018)
21. <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption#concerns>  
(Dostopano: februar 2018)
22. Swedenborg E, Rüegg J, Mäkelä S, Pongratz I, Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of molecular endocrinology*, 2009; 43: 1-10

23. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/277177.php> (Dostopano: marec 2018)
24. Rubinow DR, Schmidt PJ, Androgens, Brain and Behaviour. *The American Journal of Psychiatry*, 1996; 153: 974-984
25. [https://mpkb.org/home/patients/assessing\\_literature/in\\_vitro\\_studies](https://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies) (Dostopano: April 2018)
26. Raies AB, Bajic VB: *In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity*. Wiley, 2016; 6: 147 – 172
27. [https://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg\\_report\\_qsars\\_sl.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_qsars_sl.pdf) (Dostopano: februar 2018)
28. Raunio H: *In Silico Toxicology – Non-Testing Methods*. *Front Pharmacol*, 2011; 1 – 3
29. Manafi T, Storck V, Ravier S, Demelas D, Coulomb B, Boudenne JL: Degradation product of Benzophenone-3 in Chlorinated Seawater Swimming Pools. *Environmental Science & Technology*, 2015; 49: 9308-9316
30. Xiao M, Wei D, Li L, Lui Q, Zhao H, Du Y: Formation pathways of brominated products from benzophenone-4 chlorination in presence of bromide ions. *Journal of environmental sciences* 226; 2014: 2387 – 2396
31. Chai Q, Zhang S, Wang X, Yang H, Xie Y: Effect of bromide on the transformation and genotoxicity of octyl-dimethyl-p-aminobenzoic acid during chlorination. *Journal of Hazardous Materials*, 2017; 324: 626-633
32. Cristaa D, Mirandab MS, Esteves da Silva CG: Degradation in chlorinated water of the UV filter 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane present in commercial sunscreens. *Environmental Technology*, 2017; 37-42
33. Santos AJM, Crista D, Margarida SM, B Almeida IF, Sousa e Silv Pa, Costa CP, Amaral A: Degradation of UV filters 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate and 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane in chlorinated water. *Environmental Chem*, 2013: 127 – 134
34. <https://sl.wikipedia.org/wiki/PubChem> (Dostopano: marec 2018)
35. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Dostopano: marec 2018)
36. Matthies M, Beulke S: Considerations of temperature in the context of the persistence classification in the EU. *Environmental Sciences Europe*, 2017; 1-15

37. Vega - Guide to Ready Biodegradability Model version 1.0.9 – VegaNIC document
38. Gago-Ferrero P, Diaz-Cruz S: Fast pressurized liquid extraction with in-cell purification and analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of UV filters and their degradation products in sediments. *Anal Bioanal Chem*, 2011; 400: 2195-2204
39. [http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Bioconcentration\\_Factor\\_BCF.html](http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Bioconcentration_Factor_BCF.html)  
(Dostopano: marec 2018)
40. Gago-Ferrero P, Alonso MB, Bertozzi CP, Marigo J, Barbosa L, Cremer M: First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. *Environmental Science & Technology*, 2013; 47: 5619-5625
41. Adema DMM: *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 1978; 59: 125-134
42. Du Y, Wang W, Pei Z, Ahmad F, Xu R, Zhang Y, Sun L: Acute Toxicity and Ecological Risk Assessment of Benzophenone-3 (BP-3) and Benzophenone-4 (BP-4) in Ultraviolet (UV)-Filters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017; 11: 1414
43. Chen L, Li X, Hong H, Shi D: Multigenerational effects of 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) on the survival, development and reproduction of the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic toxicology*, 2018; 194: 94-102
44. Schlumpf M, Jarry H, Wuttke W, Ma R, Lichtenseiger W: Estrogenic activity and estrogen receptor binding of the UV filter 3-benzylidene camphor Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology*, 2004; 199: 109-120
45. Durrer S, Ehnes C, Fuetsch M, Maerkel K, Schlumph M, Lichtensteiger W: Estrogen Sensitivity of Target Genes and Expression of Nuclear Receptor Co-Regulators in Rat Prostate after Pre- and Postnatal Exposure to the Ultraviolet Filter 4-Methylbenzylidene Camphor. *Environmental Health Perspective*, 2007; 115: 42–50