

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BARBARA HERLAH

NAPOVEDOVANJE RAZGRADNJE, METABOLIZMA IN TOKSIČNOSTI
BENZOFENONA-3 *IN SILICO*

Ljubljana, 2015

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



BARBARA HERLAH

NAPOVEDOVANJE RAZGRADNJE, METABOLIZMA IN TOKSIČNOSTI
BENZOFENONA-3 *IN SILICO*

PREDICTION OF DEGRADATION, METABOLISM AND TOXICITY OF
BENZOPHENONE-3 *IN SILICO*

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm. za pomoč pri izbiri diplomske naloge, s katero sem si razširila obzorje, za čas, ki mi ga je posvetil, za dosegljivost, potrpežljivost ter vso strokovno pomoč tekom pisanja diplomske naloge.

Rada bi se zahvalila tudi svojim staršema Danijeli in Sašu, ki sta me venomer bodrila in spodbujala.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Ljubljana, avgust 2015

Barbara Herlah

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Obreza

Član diplomske komisije: asist. dr. Zoran Lavrič

VSEBINA

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 ULTRAVIJOLIČNO SEVANJE	1
1.2 NEGATIVNE POSLEDICE UV SEVANJA	1
1.2.1 POSLEDICE UVA SEVANJA.....	1
1.2.2 POSLEDICE UVB SEVANJA	2
1.3 KOZMETIČNI IZDELKI ZA ZAŠČITO PRED SONCEM.....	2
1.4 UV-FILTRI.....	2
1.4.1 ANORGANSKI UV-FILTRI.....	3
1.4.2 ORGANSKI UV-FILTRI.....	3
1.4.2.1 DERIVATI BENZOFENONA.....	3
1.5 BENZOFENON-3	4
1.5.1 KARAKTERISTIKE BENZOFENONA-3	5
1.5.2 PRISOTNOST BENZOFENONA-3 V POVRŠINSKIH VODAH.....	7
1.5.3 IZPOSTAVITEV ORGANIZMOV BENZOFENONU-3 V POVRŠINSKIH VODAH	8
1.5.4 VPLIV BENZOFENONA-3 NA LJUDI	9
1.6 PROGRAMSKA OPREMA ZA <i>IN SILICO</i> EVALVACIJO RAZGRADNJE, METABOLIZMA IN TOKSIČNIH UČINKOV SPOJIN.....	10
1.6.1 CRAFT EXPLORER	12
1.6.2 METEOR NEXUS	13
1.6.3 TOXTREE.....	14
2 NAMEN	15
3 METODE IN MATERIALI	16

3.1 CRAFT EXPLORER	16
3.2 METEOR NEXUS	17
3.3 CHEMDRAW PROFESSIONAL	18
3.4 TOXTREE	18
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1 NAPOVEDANI PRODUKTI S PROGRAMOM CRAFT EXPLORER	23
4.2 NAPOVEDANI PRODUKTI S PROGRAMOM METEOR NEXUS	28
4.3 REZULTATI TESTIRANJ SPOJIN S PROGRAM TOXTREE	34
5 SKLEP	47
6 LITERATURA	48
7 PRILOGA I	55
8 PRILOGA II	57
9 PRILOGA III	58
10 PRILOGA IV	60
11 PRILOGA V	66
12 PRILOGA VI	67

POVZETEK

Že vrsto let je dobro znano dejstvo, da je prekomerno izpostavljanje soncu glavni vzrok za razvoj melanoma, najnevarnejšo obliko kožnega raka, ima pa tudi druge negativne učinke kot so prezgodnje staranje, tanjšanje kože in nastanek globljih gub. Zaradi naštetih razlogov se vsako leto večja količina novonastalih krem za zaščito pred soncem, ki vsebujejo najrazličnejše kombinacije tako organskih kot anorganskih UV-filtrov. Benzofenon-3 je organski UV-filter in je eden izmed najbolj uporabljenih organskih UV-filtrov, še posebej v kozmetiki. Prav njegova razširjena uporaba v različnih izdelkih je pripeljala do velike izpostavljenosti tej spojini prek površinskih voda do različnih živali in naprej do ljudi. V sklopu s pomisleki o njegovi varnosti se porajajo vprašanja o fotoalergijskih reakcijah, endokrini aktivnosti, vplivu na reprodukcijo ter citotoksičnosti in genotoksičnosti, ki jim marsikateri znanstveniki še danes skušajo priti do dna. Znani učinki benzofenona-3 pa so nas spodbudili, da izvedemo *in silico* evalvacijo toksičnih učinkov benzofenona-3 ter njegovih razgradnih in metabolnih produktov. S programom CRAFT Explorer smo pod določenimi pogoji izvedli simulacijo biorazgradnje benzofenona-3 v naravi ter prišli do 32 razgradnih produktov. Iz sledeče zbirke smo jih izbrali štiri ter *in silico* ocenili njihove potencialne toksične učinke s programom Toxtree. Potem smo s programom Meteor Nexus pod izbranimi pogoji napovedali potencialne metabolite benzofenona-3 pri sesalcih, kjer smo nato šestim izbranim metabolitom s programom Toxtree določili potencialne toksične učinke. Ugotovili smo, da se napovedani razgradni produkti in metaboliti deloma skladajo s produkti, pridobljenimi v *in vitro/in vivo* študijah. Ugotovili smo tudi, da ocene o toksičnih učinkih benzofenona-3 in njegovih razpadnih produktov/metabolitov, pridobljene z računalniškim programom Toxtree, niso v skladu z do sedaj poznanimi in objavljenimi učinki teh spojin.

Ključne besede: *in silico*, benzofenon-3, razgradni produkti, metaboliti, toksičnost

ABSTRACT

It has long been known that sun exposure is the main cause for the development of melanoma, skin cancer. Sun exposure has also other negative effects on human body, for example early photo-aging, skin thinning, and coarse wrinkles. These reasons are the main cause for development of different formulations of sunscreens with variety of organic and inorganic UV-filters combinations. Benzophenone-3 is an organic UV-filter and represents one of the most widely used UV-filters in sunscreens. Its broad usage led to a significant exposure in surface water to animals and onto humans via the food chain, which raised some concern regarding its safety, specifically it raised questions regarding photo-allergic reactions, endocrine activity, effects on reproduction, cytotoxicity, and genotoxicity. The reported effects of benzophenone-3 drew our attention, therefore we performed an *in silico* evaluation of toxic effects of benzophenone-3 and its products resulting either from biodegradation or metabolism. The pre-set conditions in the software CRAFT Explorer enabled us to execute biodegradation of benzophenone-3 in the environment. Thirty-two products were obtained as a result of this biodegradation and four of them were chosen for further *in silico* toxicity evaluations. Afterwards, the program Meteor Nexus executed the prediction of metabolism of said UV-filter under set conditions. Six products of first degree metabolism were selected to be evaluated for potential toxic effects with the software Toxtree. Our observations suggest that some of the proposed biodegradation products as well as metabolites are in agreement with known and reported products of benzophenone-3, whereas evaluations of toxic effects of benzophenone-3 and its products obtained with Toxtree are not in agreement with the published scientific research.

Key words: *in silico*, benzophenone-3, degradation products, metabolites, toxicity

SEZNAM OKRAJŠAV

ACSII – Ameriška standardna koda za izmenjavo informacij
(American Standard Code for Information Interchange)

BZ - Benzofenon

BZ-1 – Benzofenon-1

BZ-3 – Benzofenon-3

BZ-4 – Benzofenon-4

BZ-8 – Benzofenon-8

CDK – Orodje za razvoj kemije
(Chemistry Development Kit)

CRAFT – Orodje za kemijsko reaktivnost in usodo
(Chemical Reactivity and Fate Tool)

EEC – Evropsko ekonomsko združenje
(European Economic Community)

EC – Evropska komisija
(European Commission)

IUPAC – Mednarodno združenje za čisto in uporabno kemijo
(International Union of Pure and Applied Chemistry)

JRC – Skupno raziskovalno središče
(Joint Research Centre)

OECD – Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
(Organization for Economic Cooperation and Development)

QSAR – Kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem
(Quantitative Structure-Activity Relationships)

SAR – Odnos med strukturo in delovanjem

(Structure-Activity Relationships)

SCCS – Znanstveni komite za varstvo potrošniškov

(Scientific Committee on Consumer Safety)

SMILES – Poenostavljen enovrstični sistem za vstavljanje molekul

(Simplified Molecule Input Line Entry System)

SMARTS – Arbitrarna tarčna specifikacija po SMILES

(Smiles Arbitrary Target Specification)

SMARTCYP – Metoda za napovedovanje mesta v molekuli, ki je najbolj odgovorno za metabolizem z encimi citokromi P450

UM-BBD – Podatkovna baza biokatalize/biorazgradnje Univerze v Minnesoti

(University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database)

1 UVOD

Malo pred letom 1900 pa vse do leta 1910 je bila temna oz. temnejša polt znak pripadnosti delavskemu sloju, saj so bili ti ljudje med delom veliko izpostavljeni soncu, medtem ko so modni trendi in socialno-ekonomski dejavniki tistega časa narekovali belo, porcelanasto polt. Kasneje so v tem obdobju zaradi novih odkritij v medicini in pojava novih medicinskih paradigem spodbujali k večji izpostavljenosti soncu ter sončenju, saj naj bi pomagalo pri zdravljenju marsikaterih bolezni, npr. pri psoriazi ... Sčasoma so zaradi opaznih koristi izpostavljanja soncu spodbujali idejo o zdravi, naravni polti, kot je razvidno iz pripombe (1910) v reviji The Lancet, ki potrjuje "... porjavitev obraza na soncu se smatra kot znak zdravja." (1)

V zadnjih letih pa vedno bolj narašča zavedanje o pomenu zaščite pred sončnimi žarki. Knjige, internet ter drugi mediji javnost vedno bolj osveščajo o posledicah nezaščitenosti kože, saj prav zaradi tega prihaja do večjega števila opeklin, poškodb molekul DNA, oslabilve imunskega sistema in s tem do prezgodnjega staranja, na žalost pa tudi večje verjetnosti za razvoj raka kože (2).

1.1 ULTRAVIJOLIČNO SEVANJE

Spekter sončnih žarkov, ki doseže Zemljo, sega od ultravijoličnih (UV) (100 – 400 nm), pa vse do infrardečih žarkov (760 nm – 1 mm). UV svetlobo delimo na ultravijolično A (UVA) (315 – 400 nm), ultravijolično B (UVB) (280 – 315 nm) ter ultravijolično C (UVC) (100 – 280 nm) svetlobo. Zemljino površje doseže 98 % UVA in 2 % UVB, medtem ko plast ozona UVC svetlobo, ki ima najvišjo energijo in je za ljudi najbolj škodljiva, na srečo zadrži (3,4).

1.2 NEGATIVNE POSLEDICE UV SEVANJA

Zaradi stanjšanja ozonske plasti se je v zadnjih nekaj letih povečala količina UV žarkov, ki to plast preidejo, kar lahko pojasni povečanje primerov kožnega raka (2).

1.2.1 POSLEDICE UVA SEVANJA

UVA je v primerjavi z UVB dolgovalovno sevanje, ki prodre globoko v povrhnjico in usnjico in je približno 1000-krat bolj učinkovito pri procesu takojšnje porjavitve, saj aktivira melanocite v epidermisu. Intenzivna in/ali obsežna izpostavljenost UVA lahko poškoduje strukture v globljih plasteh kože in povzroči prezgodnje fotostaranje kože. Ti

znaki vključujejo gubanje, venenje, ohlapnost, povešanje, suhost kože, neenotno pigmentacijo itd. UVA poškodbe povzročajo nekrozo epiteljskih celic in poškodbe dermalnih krvnih žil. Zaradi UV svetlobe so razni odzivi na celičnem nivoju najpogosteje vzrok posrednih oksidativnih procesov zaradi endogenih fotosenzibilizatorjev. Reaktivne kisikove spojine lahko poškodujejo celične proteine, lipide in ogljikove hidrate. Lahko pa vplivajo tudi na strukturne poškodbe DNA, oslabijo imunski sistem in vodijo do raka (67 % malignega melanoma je povezanega z UVA sevanjem) (8).

1.2.2 POSLEDICE UVB SEVANJA

UVB sevanje je bolj genotoksično od UVA sevanja in je približno 1000-krat bolj sposobno povzročiti opekline. UVB ne prodira tako globoko, zato vpliva predvsem na epidermalne bazalne celice kože. Sproži lahko neposredne poškodbe DNA (nastajanje ciklobutan-pirimidinskih dimerov (CDP) in pirimidin-pirimidonskih (6-4) fotoproduktov ((6-4)-PP)) in beljakovin (interakcije z aromatskimi aminokislinami), lahko pa vpliva tudi posredno, saj izzove nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, povzročča znatno zmanjšanje antioksidantov v koži in omejuje sposobnost zaščite kože pred radikali, ki nastanejo po izpostavljenosti sončni svetlobi (4,8,9).

1.3 KOZMETIČNI IZDELKI ZA ZAŠČITO PRED SONCEM

Omenjeni neželeni učinki UV sevanja ter večje zavedanje o pomenu zaščite so vodili do težnje, da se pred njimi primerno zaščitimo. K temu je prispevalo odkritje UV-filtrov, ki so varni za uporabo na koži in s širokim spektrom delovanja zagotavljajo zaščito pred sončnimi opeklinami in fotostarano kožo (6). S pozorno izbiro pravega UV-filtra in njegove koncentracije je možno oblikovati izdelek za zaščito pred soncem, ki je primeren za različne občutljivosti kože (10).

1.4 UV-FILTRI

V kozmetiki se UV-filtri uporabljajo kot snovi, ki ščitijo kožo pred UV žarki, kot tudi spojine, s katerimi lahko zaščitimo kozmetične ali druge izdelke, ki vsebujejo snovi, občutljive na sončno svetlobo. Dodajajo se barvam, premazom, črnilom, oblačilom, preprogam, tekstilu, plastiki itd., skratka povsod, kjer lahko sončni žarki pridejo v stik s temi proizvodi. Dandanes poznamo veliko UV-filtrov, ki jih lahko razdelimo glede na kemijsko sestavo ali pa glede na spekter absorpcije. Čeprav je seznam UV-filtrov,

odobrenih s strani različnih agencij za zdravje in varnost, precej razširjen, se jih le nekaj uporablja pogosteje (5,6).

1.4.1 ANORGANSKI UV-FILTRI

Anorganski UV-filtri so večinoma kovinski oksidi, čeprav se uporabljajo tudi silikati in so prisotni v marsikaterem kozmetičnem izdelku prav zaradi svoje inertnosti. Najpogostejša predstavnika te skupine sta titanov dioksid in cinkov oksid. Anorganski UV-filtri nimajo tako kompleksne zgradbe kot organski, imajo pa večji spekter zaščite, prav tako so netopni v vodi (3). Anorganski UV-filtri delujejo povsem drugače kot mineralni pigmenti v drugi kozmetiki, saj ne le, da odbijejo svetlobo, temveč jo sipajo, lahko pa tudi absorbirajo. S pomočjo zmanjšanja velikosti delcev teh materialov iz mikro- do nanometrskih velikosti, lahko omogočimo, da se izdelek na koži manj pozna oz. je bolj transparenten. S pomočjo uporabe delcev različnih velikosti lahko dosežemo zaščito preko celotnega UV spektra. Za razliko od drugih UV-filtrov ponujata titanov dioksid (TiO₂) in cinkov oksid (ZnO) najboljšo zaščito v UVA območju (6).

1.4.2 ORGANSKI UV-FILTRI

Organski UV-filtri so običajno spojine, v katerih je aromatski obroč konjugiran s karbonilno skupino in imajo odlično sposobnost absorbiranja svetlobe. Te spojine absorbirajo UV žarke z visoko intenziteto, nato pa preidejo v vzbujeno stanje (višje energijsko stanje). Potrebno je približno 79 kcal/mol, da preide benzen iz osnovnega v vzbujeno stanje, ta energija pa sovпада z energijo UV žarkov. Kadar spojina prehaja nazaj v osnovno stanje, odda energijo, ki je lahko v obliki toplote, fluorescence ali pa fosforescence (5).

Med organske UV-filtre štejemo *para*-aminobenzojsko kislino in njene derivate, cinamate, salicilate, derivate kafre, oktokrilen, ensulizol, derivate triazina, derivate benzofenona, avobenzon, metil antranilat, Mexoryl SX[®], Mexoryl XL[®], Tinosorb S[®], Tinosorb M[®] (6).

1.4.2.1 DERIVATI BENZOFENONA

Benzofenon se uporablja v najrazličnejši kozmetiki, med drugim ga najdemo tudi v balzamih za ustnice in lakih za nohte, z namenom zaščite snovi pred UV svetlobo, žal pa je tudi obstojna spojina, bioakumulativna in ima toksične učinke (7).

Derivati benzofenona (*preglednica 1*) zagotavljajo širokospektralno UV zaščito, še posebej, če jih kombiniramo z dobrimi UVB filtri (npr. oktilmetoksicinamat), sicer pa zagotavljajo

večjo zaščito v UVB in kratkovalovnem UVA spektru. Najbolj poznana derivata benzofenona sta oksibenzon (BZ-3) in sulizobenzon (BZ-4). (5).

Preglednica I: Derivati benzofenona

Derivati benzofenona						
Ime	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
BZ-1	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H
BZ-2	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H
BZ-3	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H
BZ-4	-OH	-OCH ₃	-SO ₃ H	-H	-H	-H
BZ-5	-OH	-OCH ₃	-SO ₃ ⁻ Na ⁺	-H	-H	-H
BZ-6	-OH	-OCH ₃	-H	-OH	-OCH ₃	-H
BZ-8	-OH	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H
BZ-9	-OH	-OCH ₃	-SO ₃ H	-OH	-OCH ₃	-SO ₃ H

Na splošno velja, da so benzofenoni fotolabilni in da so močni fotoalergeni (npr. benzofenon-3), zato lahko pride do kontaktnega dermatitisa. Sulizobenzon (BZ-4) lahko povzroči nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Nekateri poznani učinki derivatov benzofenona so motnje antioksidativnega sistema in motnje hormonskega in endokrinega sistema, saj pride do bioakumulacije in počasnega sproščanja nizkih koncentracij v obtok (3,5).

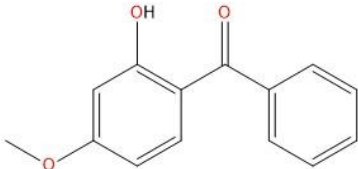
1.5 BENZOFENON-3

Zaradi pogoste uporabe benzofenonov, še posebej benzofenona-3, je pomembno, da se seznanimo z že izvedenimi testi in dostopnimi rezultati preiskav o njegovi toksičnosti. Kljub pogosti uporabi pa imamo še vedno zelo malo podatkov o biodegradaciji benzofenona-3 in reakcijah v okolju, ter njegovih metabolitih in reakcijah v bioloških tkivih (11).

1.5.1 KARAKTERISTIKE BENZOFENONA-3

Benzofenon-3 je poenostavljeno ime za 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon oz. (2-hidroksi-4-metoksifenil)-fenilmetanon (IUPAC). Glavni podatki o njegovi kemijski identiteti in fizikalno-kemijskih lastnostih so zbrani v spodnji preglednici (*preglednica II*).

Preglednica II: Kemijska identiteta in fizikalno-kemijske značilnosti benzofenona-3 (13)

Kemijsko ime (IUPAC)	(2-hidroksi-4-metoksifenil)-fenilmetanon	Temperatura tališča	65.5 °C
Kemijsko ime (CA)	Benzofenon-3	Temperatura vrelišča	155 °C
CAS No	131-57-7	Izgled	Prah; čist: bele barve do sivo-bele barve
SMILES	<chem>COC1=CC(=C(C=C1)C(=O)C2=CC=CC=C2)</chem> O	Parni tlak	1.4 x 10 ⁻⁶ mm Hg pri 25 °C
Molekulska formula	C14H12O3	Topnost v vodi	69 mg/L pri 25 °C
Molekulska masa	228,24	Log P	3,79
Strukturna formula		Maksimalna absorpcija UV svetlobe	288 nm in 326 nm
Gostota	1,2 g/cm ³	Dovoljena maksimalna uporaba	V Evropi do 10 %, V Avstraliji do 10 %, V ZDA do 6 %, Na Japonskem do 5 %

Benzofenon-3 (BZ-3) je bil 1. januarja 1987 vključen v Prilogo VII, v kateri so zbrani vsi UV-filtri, ki so lahko dodani kozmetičnim izdelkom (*Direktiva 83/574/EEC*; EC, 1987). Priloga VII spada v seznam desetih prilog Kozmetične direktive (76/768/EEC) in so predpisi, ki regulirajo uporabo kozmetičnih sestavin v kozmetiki znotraj Evropske Unije, nadzira in potrjuje pa jih Evropska komisija (EC) (12).

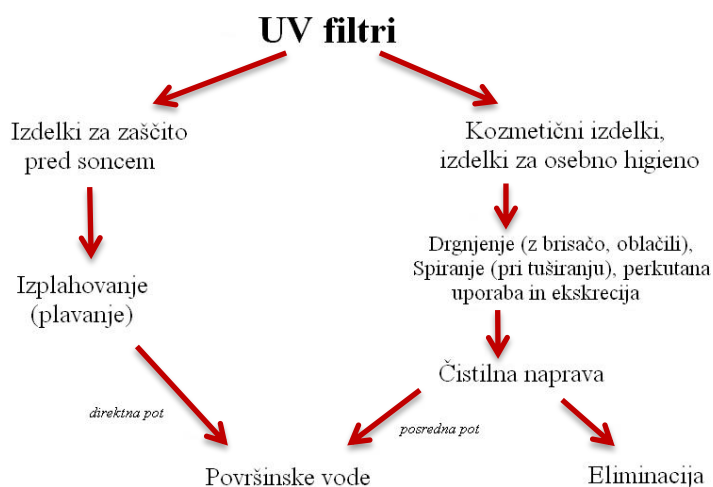
Leta 2006 je Znanstveni komite za varnost potrošnikov (SCCS) ponovno ocenil toksikološki profil BZ-3 (prvič leta 2001). Toksikokinetične študije na podganah so pokazale, da se BZ-3 hitro biotransformira v tri glavne metabolite, in sicer 2,4-dihidroksibenzofenon (benzofenon-1), 2,2'-dihidroksi-4-metoksibenzofenon (benzofenon-

8) in 2,3,4-trihidroksibenzofenon (THB). Ugotovili so, da BZ-3 prikazuje nizek nivo akutne toksičnosti pri peroralni in dermalni aplikaciji, kjer vrednosti LD_{50} presegajo mejo 2000 mg/kg ter da UV-filter ne kaže nobenih znakov draženja kože ali oči ob izpostavitvi. BZ-3 so prav tako temeljito *in vitro* testirali v smislu povzročanja fotodražilnih učinkov, kjer pa je bilo večino testov negativnih. Na voljo imamo tudi podatke iz dveh testiranj preobčutljivosti kože, ki nakazujeta, da BZ-3 ne povzroča preobčutljivosti kože pri morskih prašičkih. Kljub temu pa je že kar nekaj časa znano in tudi dokazano, da povzroča fotoalergijske reakcije ter da prehaja kožno bariero, vendar pa ni znanih natančnih podatkov, v kolikšni meri pride do absorpcije (kožo prehaja približno v obsegu od 1 – 9 %) (13).

Pri testiranju teratogenosti na podganah so ugotovili, da BZ-3 ne povzroča teratogenosti pri pogojih, ki so bili določeni, vendar pa je pri izpostavitvi živali vrednosti NOAEL višji od 20 mg/kg telesne mase/dan prišlo do skoraj neopaznih, a vseeno zaznavnih napak pri razvoju skeleta mladičev. Prav tako je bilo ugotovljeno, da BZ-3 ne izkazuje (foto)mutagenih ali (foto)genotoksičnih učinkov (13).

Uporaba BZ-3 je bila leta 2008 ponovno ovrednotena s strani SCCS. Osredotočili so se na iskanje informacij, ki bi podprle ali ovrgle hipotezi: (i) če je BZ-3 varen za uporabo kot UV-filter v kozmetičnih izdelkih v koncentracijah do 6,0 %, z upoštevanjem do sedaj zbranih znanstvenih podatkov, ter (ii) če so pri tem vzbujeni dodatni znanstveni pomisleki v zvezi z uporabo BZ-3 kot UV-filtra v kozmetičnih izdelkih. Prišli so do zaključka, da uporaba benzofenona-3 kot UV-filtra v koncentracijah do 6 % v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem ter do 0,5 % v ostalih vrstah kozmetičnih izdelkov kot zaščitna formulacija ne predstavlja tveganja za zdravje potrošnika (ima pa fotoalergeni potencial) (14).

1.5.2 PRISOTNOST BENZOFENONA-3 V POVRŠINSKIH VODAH



Slika 1: Direktna in posredna pot UV-filtrov v površinske vode

BZ-3 se lahko pri različnih rekreacijskih aktivnostih v vodi ter kohanju spere s kože in tako direktno ali pa posredno (v odpadni vodi) onesnaži okoljsko vodo (Slika 1). Zaradi dokaj visokega log P (3,79) in počasnejše biorazgradnje domnevajo, da pride tudi do večjega kopičenja v tleh (15, 16). V Španiji, in sicer na otoku Majorki, so na treh različnih obalah analizirali morsko vodo. Ugotovili so, da le-ta vsebuje štiri spojine, ki se najbolj dodajajo prav v kreme za zaščito pred soncem in se v največjih koncentracijah nahajajo na površini morja. Ena izmed njih je bila tudi BP-3, in sicer v najvišji koncentraciji 580 ± 50 ng/L, na obali, kjer se v poletnih mesecih po navadi zadržuje največ ljudi. Na rtu Salinas tega otoka so prav tako zaznali koncentracije BZ-3, in sicer $36 \pm 1,7$ ng/L, kar namiguje na visoko raven povezanosti obale ter »potovanje« spojnin vzdolž le-te (16). Y. Kameda in sodelavci so v študiji, kjer so analizirali onesnaženost voda, izmerili, da je bilo območje koncentracije BZ-3 v dveh strugah med 16 in 41 ng/L, v štirih napravah za čiščenje odpadnih vod med 29 in 164 ng/L ter v eni od šestih merjenih močno onesnaženih rekah, približno 4 ng/L, medtem ko so dve rahlo onesnaženi reki in tri jezera smatrali kot kontrolna območja (namerili so 2 – 10 ng/L). BZ-3 niso zaznali nikjer v sedimentu (17). Študija, izvedena v Sloveniji, je prav tako temeljila na analizi koncentracij UV-filtrov, in sicer so izbrali sedemnajst različnih območij, med drugim morsko vodo, bazen, jezero in reko ter štiri območja z odpadno vodo. Najpogosteje zaznan UV-filter je bil prav benzofenon-3, ki so ga zaznali v koncentracijah od 11 – 400 ng/L. Najvišjo koncentracijo

so zaznali v enem izmed bazenov v Portorožu, pa tudi v reki Kolpi (18). Medtem pa so pri študiji izvedeni v Nemčiji dokazali, da BZ-3 niso zaznali v sedimentu rek, temveč v sedimentu jezer, blizu mesta Frankfurt, kjer je bila največja koncentracija 3,6 ng/L (19).

1.5.3 IZPOSTAVITEV ORGANIZMOV BENZOFENONU-3 V POVRŠINSKIH VODAH

Tako pogosto zaznavanje BZ-3 v površinskih vodah in sedimentih je znanstvenike spodbudilo k raziskavi o njegovem vplivu na različne organizme v vodnih sistemih. Kim in sodelavci so analizirali količino BZ-3 v ribah *Oryzias latipes* ter izvedli dvogeneracijsko študijo, kjer so opazovali njegov vpliv na endokrini sistem ter reprodukcijo pri teh živalih (20). Po pet odraslih samcev in samic (skupaj 40) je bilo izpostavljenih različnim koncentracijam BZ-3, in sicer 4,7; 8,4; 26 in 90 µg/L. Ugotovili so, da se je koncentracija testosterona pri samcih zelo povečala, pri samicah pa je bila narast skoraj neopazna. Nato so naključno združili po dva samca in samici, ki sta bila izpostavljena isti koncentraciji, da bi preverili vpliv BZ-3 na reprodukcijo, kasneje pa so koncentracijam 15, 50 ter 150 µg/L izpostavili še oplojena jajčeca, ki so se razvila v mladiče. Pri mladičih je bila umrljivost malce višja kot pri kontrolni skupini, je pa prišlo do izrazitega zmanjšanja v masi in dolžini (20). Tako so, na primer, na Antarktiki na jugozahodu otoka Ross, kjer sta locirani dve raziskovalni postaji, merili prisotnost kozmetično aktivnih učinkovin v morju Ross. Tudi tam se, prav zaradi suhega ozračja in večjega UV sevanja, kozmetični izdelki za osebno rabo in UV-filtri pogosto uporabljajo. Ker tam ni čistilnih naprav, mimoidoče ladje pa lahko živilske odpadke in odpadno vodo v morje spuščajo z oddaljenosti dvanajstih morskih milj, so raziskovalci v morski vodi odkrili prisotnost enajstih spojin, med njimi je bil tudi UV-filter BZ-3. Pomembno je omeniti, da so ribe in okoljska morska biota tem koncentracijam, zaradi pomanjkanja čistilnih naprav, še bolj izpostavljena. Na Antarktiki, rtu Cape Evans, so v jetrih ribe *T. bernachii* zaznali od 265 - 1450 ng/g suhe mase BZ-3 in odkrili, da se bolj akumulira v jetrih kot v mišicah te ribe. Antarktična biota ima relativno počasen metabolizem in počasi rastejo, kar pomeni, da se te spojine v njih združujejo dalj časa. In prav te višje koncentracije ter daljša izpostavitve vplivajo na estrogene in androgene učinke (21). V naslednji študiji so se osredotočili na določanje učinkov UV-filtra BZ-3 na primarno vodno bioto, in sicer zeleno algo *Desmodesmus subspicatus* in vodno bolho *Daphnia magna*. Ugotovili so, da je bila koncentracija UV-filtra BZ-3, pri kateri se je rast zelene alge zmanjšala za 50 %, 0,96 mg/L, medtem ko je bila koncentracija pri 10 % zmanjšanju rasti 0,61 mg/L. Izpostavitve vodnih bolh različnim koncentracijam

BZ-3 (0,005 – 0,5 mg/L) ni pokazala učinkov. Koncentracija BZ-3, pri kateri so se začeli kazati toksični učinki in vplivi na reprodukcijo, je bila 1,67 mg/L (22).

1.5.4 VPLIV BENZOFENONA-3 NA LJUDI

– Absorpcija, distribucija, metabolizem in eliminacija

BZ-3 je v 80-ih letih prejšnjega stoletja postal najbolj uporabljan UV-filter v kremah za zaščito proti soncu in odobren s strani ameriške FDA (do 6 %) in evropske Kozmetične direktive (do 10 %). Pomembno je tudi omeniti sistemsko absorpcijo BZ-3, kjer je bilo nedavno dokazano, da je 0,5 % celotne koncentracije BZ-3, aplicirane na kožo, bilo možno zaznati v vzorcih urina prostovoljcev po 48-urni izpostavitvi (23). V eni izmed študij so zaznali vsebnost BZ-3 v 96,8 % vseh analiziranih vzorcev urina (2517) ter pridobili zanimive podatke, saj so ne glede na starost zaznali višjo koncentracijo pri ženskah kot pri moških, višja pa je bila tudi pri belcih kot pri črncih. Razlike med spoloma in rasami kažejo tudi razlike v uporabi krem za zaščito pred soncem (24). BZ-3 so zaznali tudi materinem mleku (20). Študije na podganah so pokazale, da se BZ-3 akumulira predvsem v ledvicah, jetrih, vranici in testisih (25). Ker so BZ-3 zaznali v veliki večini analiziranih vzorcev urina (> 96 %) (23, 24), lahko iz tega sklepamo, da je glavna pot izločanja BZ-3 preko urina.

– Preobčutljivostne reakcije, citotoksične reakcije, genotoksičnost, endokrini učinki in toksični učinki na reprodukcijo

Dobro je znano, da BZ-3 povzroča fotokontaktne alergijske reakcije na koži. Topikalno apliciran lahko povzroči tudi produkcijo reaktivnih kisikovih spojin in radikalov pod vplivom UV sevanja (26) in zmanjša delovanja antioksidativnega encima superoksid dismutaze (27). Izvedli so tudi *in vivo* citogenetski test na celicah kostnega mozga podgan za oceno klastogenosti BZ-3, pri čemer so le-te bile enkrat dnevno izpostavljene določeni koncentraciji, študija pa je trajala 5 dni. Nobena od koncentracij ni povzročila povečanja v kromosomskih aberacijah, iz tega so sklepali, da BZ-3 ne povzroča genotoksičnosti *in vivo* (28). Vela-Soria in sodelavci so analizirali prisotnost različnih benzofenonov v tkivih placente, a med detektiranimi spojinami sledeče niso zaznali (29). Zaznane koncentracije BZ-3 v vzorcih urina mater so pri študijah reproduktivne toksičnosti povezali s povečanjem teže ter obsega glave pri novorojenih fantkih (30, 31).

1.6 PROGRAMSKA OPREMA ZA NAPOVED RAZGRADNJE, METABOLIZMA IN TOKSIČNIH UČINKOV SPOJIN *IN SILICO*

V zadnjih desetletjih, ko smo priča stalnemu napredku tehnologije in je uporaba računalnikov že skoraj neizogibna, se tudi *in silico* eksperimentiranje razvija in širi na številnih področjih. Pomembno je še posebej tam, kjer lahko te raziskave s pomočjo računalniške simulacije z modeli natančno prikazujejo realni svet (32).

In silico metodologija ima mnoge prednosti pred *in vivo* in *in vitro* eksperimentiranjem. V farmaciji in medicini lahko pospeši stopnjo odkrivanja vpliva zdravilne učinkovine, zmanjša število dragih laboratorijskih poskusov in kliničnih testiranj. Na splošno pa omogoča še večjo natančnost in boljšo kakovost podatkov, posamezni poskusi potekajo hitreje, zmanjša pa se tudi eksperimentiranje na živalih (32).

V spodnji preglednici (*preglednica III*) smo zbrali *in silico* ekspertne sisteme (prosto dostopne in komercialne), s katerimi si lahko pomagamo pri evalvaciji razgradnje spojin, metabolizma in potencialne toksičnosti.

Preglednica III: Ekspertni sistemi, s katerimi lahko pomagamo pri evalvaciji biorazgradnje, metabolizma in toksičnosti spojin.

Področje uporabe	Ime ekspertnega sistema	Funkcija	Vir
<u>Biorazgradljivost in ekotoksičnost</u>	CRAFT	Predvidi kemijsko reaktivnost, obstojnost, biorazgradljivost in usodo kemijskih spojin v okolju.	(33)
	ECOSAR	Oceni toksičnost za vodno okolje.	(34)
	EPI Suite	Zbirka programov, ki omogoča določevanje fizikalno-kemijskih lastnosti spojin in ocenitev njihove usode v okolju.	(34)
	VEGA-QSAR	Omogoča oceno kemijskih lastnosti spojin in napovedovanje njihove biološke aktivnosti prek QSAR modelov.	(35)
	CATALOGIC	Vsebuje baze podatkov, povezanih z usodo spojin, njihovo razgradnjo, bioakumulacijo in toksičnost na vodno okolje.	(36)
	PBT Profiler	Pomaga pri identifikaciji kemijskih spojin, ki so lahko obstojne, se lahko bioakumulirajo ali pa so toksične v vodnem okolju.	(35)

Področje uporabe	Ime ekspertnega sistema	Funkcija	Vir
	OECD QSAR Toolbox	V pomoč pri iskanju podatkov o (eko)toksičnosti, ki so potrebni za oceno nevarnosti kemikalij.	(34)
	UMBBDD-PPS (tudi UM-PPS)	Predvidi mikrobiološke katabolne reakcije in napove transformacije, ki temeljijo na pravilih biotransformacije.	(37)
<u>Metabolizem</u>	Meteor	Predvidi metabolite spojine glede na pravila o njenih fizikalnih in strukturnih lastnostih ter je povezano s SMARTCyp modulom.	(38, 39)
	MetaSite	Napove s citokromi-posredovane metabolne transformacije, primarno mesto metabolizma in strukturo metabolitov.	(38, 39)
	StarDrop	Napove delež nastalih metabolitov na različnih delih molekule ter ali ti omogočajo s citokromi-posredovan metabolizem.	(38, 39)
	META	Z uporabo slovarja o biotransformaciji predvidi verjetne metabolite.	(39, 40)
	MetabolExpert	Predvidi strukture metabolitov. Vključuje metabolne poti v ljudeh, živalih ali rastlinah.	(39, 40)
	MetaPrint2D in MetaPrint2D-React	Predvidi območje metabolizma, metabolne transformacije in metabolite.	(39, 40)
	MetaDrug	Predvidi metabolite s pomočjo QSAR modeliranja in metabolnih reakcij.	(39)
	SMARTCyp	Predvidi območje molekule, ki je metabolno specifično za pet najpomembnejših citokromskih encimov.	(39)
<u>Toksičnost</u>	Toxtree	Razvrsti toksične spojine v različne kategorije in napove njihov toksični učinek z uporabo odločitvenega drevesa.	(41)
	DEREK	Kvantitativno napove parametre toksičnosti spojin.	(41)
	HazardExpert	Oceni toksičnost organskih spojin v višjih živalih.	(41)
	ACD/Tox Suite	Zbirka programskih modulov, ki napove verjetnosti za osnovne parametre toksičnosti.	(41)
	T.E.S.T (Toxicity Estimation Software Tool)	Oceni toksičnost z uporabo več različnih QSAR metodologij.	(42)

Področje uporabe	Ime ekspertnega sistema	Funkcija	Vir
	TOPKAT	Napove območje akutnih in kroničnih parametrov toksičnosti.	(42)
	CASE	Opredeli strukturne fragmente, ki so pomembni za toksičnost.	(42)

V nadaljevanju so predstavljeni trije programi, ki smo se jih poslužili pri tej diplomski nalogi, in sicer CRAFT Explorer, Meteor Nexus in Toxtree.

1.6.1 CRAFT EXPLORER

Program CRAFT Explorer generira vse možne reakcije določene spojine z neko prej določeno mejo. To mejo določimo z določitvijo tipa reakcije, stopnje razgradnje in stopnje verjetnosti nastanka. Nastanek produktov lahko omejimo tudi s selekcijo pogojev, pri katerih jih želimo vrednotiti (43).

Tipi reakcij, ki jih lahko določimo pri razgradnji določene molekule, so sestavljeni iz dveh glavnih tipov reakcij, in sicer UM-BBD verjetnostnega modela ter (Q)SAR reaktivnega modela:

- UM-BBD (**U**niversity of **M**innesota **B**iocatalysis/**B**iodegradation **D**atabase) tip reakcij je sestavljen iz biotransformacijskih pravil (44), podrobneje definiranih v (<http://umbbd.msi.umn.edu/>). Vsebuje informacije o kemijski transformaciji, verjetnosti in pogojih nastanka. Nekatere reakcije so spremenjene oz. modificirane, da bolje odražajo primere reakcij za posamezno spojino (43).
Ta tip reakcij je vseboval 6 podtipov reakcij: »zelo verjetne«, »verjetne«, »nevtralne«, »malo verjetne«, »zelo malo verjetne« ter »ni odločitve«.
- (Q)SAR (**Q**uantitative) **S**tructure-**A**ctivity **R**elationships) je kvantitativen odnos med strukturo in delovanjem. Sestavljajo ga metode, s pomočjo katerih lahko ocenimo lastnosti spojine iz njene molekulske strukture (44). S pomočjo tega postopka lahko določimo odnos med strukturo spojine in biološko aktivnostjo (kot je npr. toksičnost). (Q)SAR metode nam omogočajo ocenitev oz. določitev nevarnosti spojin v relativno kratkem času, brez finančnih stroškov in testiranj na živalih (45, 46).

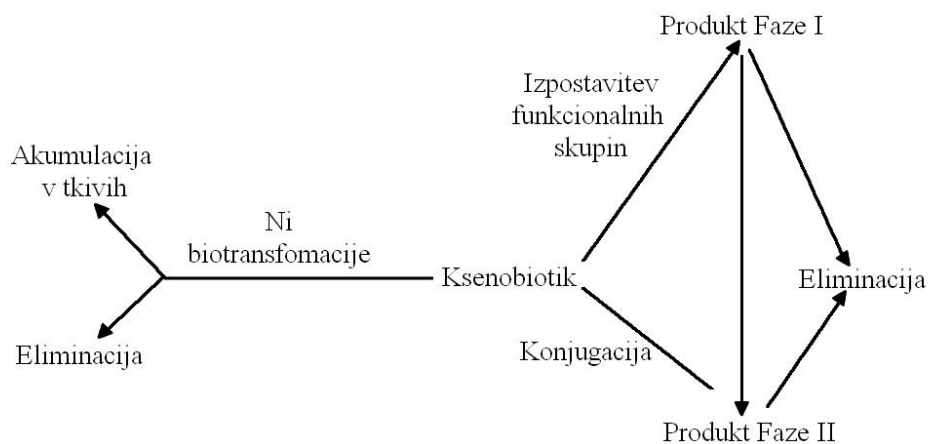
1.6.2 METEOR NEXUS

Program Meteor Nexus je namenjen hitri napovedi in generiranju metabolitov ksenobiotikov.

Še posebej je priročen, kadar gre za nenavadne ali nepričakovane metabolite, saj omogoča preskrbo z informacijami, ko je na voljo malo ali pa prav nič eksperimentalnih podatkov o metabolizmu. Iz skupne baze nam lahko prikaže informacije o biotransformaciji in metabolitih ter jih grafično zelo nazorno pojasni – vse je dobro podprto z empiričnimi opazovanji in referencami, kadar gre za potencialno toksične spojine in je potrebno pregledati vse prekursorje metabolizma (47, 48).

Informacije o biotransformacijskih reakcijah vključujejo napoved nastanka metabolitov po Fazi I ali po Fazi II:

- Faza I sestavljajo reakcije, ki jih katalizirajo biotransformacijski encimi in so katabolne, pogosto pa nastanejo bolj reaktivni (toksični) produkti. To so citokromske reakcije (npr. oksidacija ksenobiotikov s citokromom P450) ter necitokromske reakcije (npr. hidroliza, oksidacija in redukcija). V tej fazi reakcije uvedejo funkcionalne skupine (-OH, -NH₂, -SH ali -COOH), pri čemer po navadi pride do rahlega povečanja hidrofilnosti (49, 50).
- Faza II je lahko, ni pa nujno, naslednja stopnja biotransformacije ksenobiotika in je prav tako encimsko podprta. Sama faza se imenuje tudi konjugacija, reakcije pa so anabolne in praviloma nastanejo manj reaktivni produkti. Sestavljajo jo reakcije glukuronidacije, sulfatacije, metilacije, acetilacije, konjugacije z glicinom, konjugacije z glutationom in fosforilacije. Večina biotransformacij faze II zelo poveča hidrofilnost spojin, kar močno pospeši eliminacijo le-teh iz sistema (49).



Slika 2: Potek biotransformacije ksenobiotikov

1.6.3 TOXTREE

Toxtree (Ideaconslult Ltd, Bolgarija) je prilagodljiv ter uporabnikom prijazen program in je uveljavljen ter odobren s strani Evropske komisije (EC). Program je prosto dostopen in je na voljo vsem, tako znanstvenikom kot tudi vsakomur, ki je zainteresiran za računalniško podprte programe, namenjene ocenitvi toksičnosti spojin (51). Toxtree spada v skupino programov, s katerimi lahko hitro in brez večjih težav ocenimo toksične učinke spojin, če le poznamo njihovo strukturno formulo. Na voljo je veliko modulov, s katerimi lahko te učinke tudi napovemo, na primer razgradnjo v okolju in obstojnost v njem, draženje kože in oči, preobčutljivost, mutagenost in kancerogenost, identificira nam tudi funkcionalne skupine, ki lahko potencialno vplivajo na toksične učinke in na možnost vezave le-teh na biološke molekule ter o možnostih s citokromi-posredovanega metabolizma. Na koncu nam Kroes-ovo odločitveno drevo posreduje še informacije o varnosti uporabe spojine.

2 NAMEN

Ozaveščenost o posledicah sončnih žarkov in UV sevanja na kožo se vsako leto večja, s čimer se večja tudi število izdelkov za zaščito pred soncem in njihova uporaba. Dejstvo, da je BZ-3 tako pogosto uporabljen UV-filter, tako v kozmetičnih kot tudi drugih izdelkih, priča o njegovi dobri stabilnosti pod mnogimi pogoji. Kljub mnogim dobrim lastnostim pa so dokazali, da BZ-3 prehaja v dermis, povzroča preobčutljivostne reakcije kože, in da sodi med endokrine motilce. Glede na dokazane učinke nas je zanimalo, kakšni so njegovi razpadni produkti in ali imajo tudi le-ti podobne toksične učinke.

Namen našega dela bo:

- *in silico* vrednotenje oz. evalvacija razpadnih produktov BZ-3 v okolju in njegovih metabolitov pri sesalcih,
- *in silico* napoved toksičnosti BZ-3 in produktov,
- primerjati napovedane produkte s podatki v literaturi in tako ustreznost računalniških programov.

Najprej bomo s pomočjo ekspertnih sistemov *in silico* določili produkte BZ-3. Začeli bomo s programom CRAFT Explorer ter pod predpisanimi pogoji določili produkte razgradnje v treh stopnjah, ki se lahko zgodi v okolju. Nadaljevali bomo s programom Meteor Nexus, se osredotočili na načrtane pogoje ter s tristopenjskim procesom določili metabolite BZ-3, ki lahko nastanejo v sesalcih. V drugem delu se bomo posvetili evalvaciji toksičnih učinkov osnovne spojine s programom Toxtree, kjer bomo te določili še izbranim produktom. Sledeče rezultate bomo na koncu primerjali z literaturnimi podatki, študijami in raziskavami in iz vseh podatkov potegnili nek smiseln zaključek.

3 METODE IN MATERIALI

Pri vrednotenju toksičnosti in drugih neželenih učinkov UV-filtra BZ-3 in njegovih razgradnih produktov v okolju, smo se v skladu z namenom diplomske naloge osredotočili na tri glavne programe.

3.1 CRAFT EXPLORER

CRAFT (**C**hemical **R**eactivity and **F**ate **T**ool) je programski paket, ki pomaga pri evalvaciji varnosti, tveganja in toksičnosti produkta s pomočjo ocene kemijske reaktivnosti, biorazgradnje in poznejših, dolgotrajnih učinkov v okolju. Programska oprema CRAFT je sestavljena iz dveh programov, CRAFT Editor in CRAFT Explorer. Pri tej diplomski nalogi smo se odločili za uporabo programa CRAFT Explorer, saj izdelava/oceni pot razgradnje in shemo produktov, ki so nastali na različnih stopnjah razgradnje z določeno verjetnostjo ter pod določenimi pogoji.

Program vsebuje 6 ločenih modulov:

- MN. Tautomer
- CDK Generator resonančne strukture
- CDK Pregledovalec strukture
- ToxTree
- PubChem
- CDK Računalo deskriptorjev

Molekulo, katere razgradni produkti nas zanimajo, vnesemo v program tako, da jo narišemo, kjer posameznih vodikov ni treba dodati, saj program sam zazna, kje manjkajo. Če želimo videti molekulske formule ali pravilno postavitev vodikov, lahko to storimo s klikom na tipki *Alt-M*, kjer izberemo zavihek *Edit*, nato pa *Hydrogens ...*, ter izberemo zeleni ukaz.

Molekulo lahko v program vnesemo tudi s kodo SMILES, in sicer s klikom na tipki *Alt-I* in odpre se okno za vnos kode. SMILES (**S**implified **M**olecule **I**nput **L**ine **E**ntry **S**ystem) je sistem, s katerim lahko v obliki ene vrstice kodiramo kemijsko strukturo (z uporabo kratkih ACSII (American Standard Code for Information Interchange) nizov (54)). Čeprav je sistem SMILES osredotočen na majhne organske molekule, lahko z njegovo pomočjo

kodiramo tudi večje, daljše molekule ter zajamemo njihovo stereokemijsko konfiguracijo (55).

Pomembna in dobra lastnost tega sistema je, da je molekulska struktura zapisana bolj kompaktno glede na druge sisteme, ki tudi omogočajo kodiranje molekulske strukture. Prav zaradi svoje kompaktnosti, kode ne zasedajo toliko prostora. Izpopolnjenost in dobra zorganiziranost pa doprinašata k natančnosti in doslednosti zapisa strukture, zato so kode SMILES tako pogosto uporabljane. Poleg tega lahko s tem zapisom molekule pretvorimo v dvodimenzionalne slike ali tridimenzionalne modele (56).

Začeli smo s programom CRAFT Explorer in postopek izvedli sledeče (Priloga I):

- Najprej smo v program vrisali strukturo benzofenona-3 (*Slika Ia*).
- Izbrali smo modul MN. Tautomer (*Slika Ib*).
- V tem primeru smo se odločili izbrati vse možne reakcije. Pri dodatnih možnostih smo izbrali najmanj 60 % verjetnost nastanka dotičnih razgradnih produktov ter tri nivoje stopenj razgradnje. Za dodatno omejitev pogojev, pod katerimi bi lahko nastali produkti degradacije, se nismo odločili (*Slika Ic*).
- Četrty zavihek *Reaction generation* nam omogoča, da po kliku na ikono *Start* zaženemo reakcijo razgradnje (*Slika Ič*).

3.2 METEOR NEXUS

Meteor Nexus je program, ki ga je razvilo podjetje Lhasa Limited iz Velike Britanije in je strokovni program, ki izdelava hitro oceno o metabolizmu spojine pri sesalcih. Temelji na podatkih, ki jih znanstveniki pri Lhasa Limited nenehno obdelujejo ter izpopolnjujejo na področju biotransformacije (47).

Program Meteor Nexus metabolite prve stopnje generira glede na lipofilnost (log P preiskovane spojine), prisotnost oz. odsotnost strukturnih značilnosti (določene funkcionalne skupine) ter relativno verjetnost transformacij. Pri vsakem metabolitu je prikazana njegova verjetnost nastanka, čemur sledi primerna analiza, ki lahko napove nadaljnjo presnovo. Rezultati so grafično prikazani v obliki drevesa z dodatnimi informacijami in podrobnostmi o biotransformaciji (57).

Pomembno je omeniti, da je program Meteor povezan s programom SMARTCyp.

- SMARTCyp je program, razvit na Univerzi v Kopenhagenu, in je metoda za napovedovanje mesta v molekuli, ki je najbolj odgovorno za metabolizem s citokromom P450. Za izdelavo programa je bilo potrebno izvesti veliko kemijskih in drugih izračunov. Sam program je sestavljen iz SMARTS (**S**miles **A**rbitrary **T**arget **S**pecification – je jezik, ki omogoča, da določimo podstrukturo molekule z uporabo pravil, neposredno razširjenih iz SMILES) vzorcev in z njimi povezanimi energijami (58, 59).

Pri uporabi programa Meteor Nexus smo postopek izvedli sledeče (Priloga II):

- V program smo narisali strukturo benzofenona-3, v kateri ni bilo treba vrisati vodikov, saj je program sam prepoznal, kje manjkajo (*Slika IIa*).
- V naslednji točki smo se odločili izbrati vse možne reakcije, tako iz faze I kot iz faze II. Pri možnostih smo izbrali tri stopnje razgradnje ter do 1000 metabolitov, z najmanj 50 % verjetnostjo (equivocal) nastanka, pod pogojem, da nastanejo v sesalcih. Tako smo kliknili na ikono *M Start Prediction* (*Slika IIb*).

3.3 CHEMDRAW PROFESSIONAL

ChemDraw Professional je del programskega paketa ChemOffice Professional (verzija 15.0) (60). ChemDraw je program, namenjen risanju in oblikovanju molekul s skoraj kakršnokoli kemijsko strukturo in vsebuje veliko različnih možnosti oblikovanja (61, 62). Za našo diplomsko nalogo pa je najbolj pomembna opcija, ki omogoča risanje produktov BZ-3 ter njihovo poimenovanje po IUPAC nomenklaturi in obratno. Omogoča tudi izpis SMILES kod, ki nam lahko pride zelo prav pri nadaljnjih programih. Programa ChemDraw smo se poslužili pri poimenovanju spojin, ki so nastale s programoma CRAFT Explorer in Meteor Nexus.

3.4 TOXTREE

Toxtree je program, s katerim lahko ocenimo toksične učinke in nevarnosti spojin z uporabo odločitvenega drevesa. Ta program uporablja tudi QSAR modele za določevanje oz. ocenitev toksičnih učinkov spojin.

Verzija 2.6.6., ki smo jo uporabili pri tej diplomski nalogi, vsebuje 16 ločitvenih modulov, ki omogočajo določitev različnih toksičnih učinkov:

- Cramer-jeva pravila in razširjena Cramer-jeva pravila

- Verhaar-jeva shema in modificirana Verhaar-jeva shema
- Napoved draženja kože
- Napoved draženja oči
- Strukturni elementi (SA) biorazgradnje in obstoja
- Benigni / Bossa-jeva pravila mutagenosti in kancerogenosti
- *In vitro* mutagenost
- Strukturni elementi toksičnosti za *in vivo* teste na podganjih mikronukleusih
- Strukturni elementi za identifikacijo funkcionalnih skupin
- Strukturni elementi za določanje preobčutljivosti kože
- Strukturni elementi, povezani s kovalentnimi vezmi DNA
- Elementi za vezavo proteinov
- Kroes-ovo odločitveno drevo
- SMARTCyp – s citokromom P450 posredovan metabolizem spojin (52, 63).

V spodnji preglednici (*preglednica IV*) smo predstavili klasifikacije vseh 16 ločitvenih modulov.

Preglednica IV: Klasifikacije 16 ločitvenih modulov (52, 63)

Moduli	Klasifikacije
Cramer-jeva pravila in razširjena Cramer-jeva pravila	<ul style="list-style-type: none"> – Razred I: spojine s preprosto kemijsko strukturo in učinkovitimi načini metabolizma ter nakazujejo nizko peroralno toksičnost, – Razred II: vmesna stopnja, – Razred III: spojine, ki nakazujejo toksične učinke ali imajo reaktivne funkcionalne skupine.
Verhaar-jeva shema in modificirana Verhaar-jeva shema	<ul style="list-style-type: none"> – Razred 1: Narkoza ali začetna toksičnost, – Razred 2: Manj inertne spojine – spojine, ki so malo bolj toksične od prejšnje skupine zaradi kislosti donorja vodikove vezi, – Razred 3: Nespecifična reaktivnost – spojine, ki reagirajo neselektivno z biomolekulami ali s spojinami, ki so z metabolizmom bioaktivirane, – Razred 4: Spojine, ki reagirajo po specifičnem mehanizmu – reagirajo z receptorji biomolekul, – Razred 5: ni možno klasificirati s sledečimi pravili.

Moduli	Klasifikacije
Napoved draženja kože	<ul style="list-style-type: none"> - Ni korozivno, - Ni dražilno ali korozivno, - Ni dražilno, - Dražilno, - Korozivno, - Dražilno ali korozivno, - Ni znano. <p>Potrebno je vnesti tudi molekulsko maso spojine, topnost v vodi, topnost v lipidih, temperaturo tališča in površinsko napetost.</p>
Napoved draženja oči	<ul style="list-style-type: none"> - Ni korozije na koži po R34 ali R35, - Ni lezij po R34, R35, R36 ali R41, - Ni dražilno za oči po R41, - Ni dražilno za oči po R36, - Ni korozivno po R34, R35 ali R41, - Ni lezij po R34, R35 ali R36, - Ni dražilno za oči po R36 ali R41, - Resne lezije na očeh po R41, - Srednje reverzibilno draženje oči po R36, - Draženje kože po R34 ali R35, - Ni znano. <p>Potrebno je vnesti tudi topnost spojine v vodi, topnost v lipidih in temperaturo tališča.</p>
Strukturni elementi biorazgradnje in obstoja	<ul style="list-style-type: none"> - Razred 1: Hitro biorazgradljiva spojina, - Razred 2: Obstojna spojina, - Razred 3: Neznana biorazgradljivost.
Benigni / Bossa-jeva pravila mutagenosti in kancerogenosti	<ul style="list-style-type: none"> - Ni elementov za kancerogeno aktivnost, - Strukturni elementi za genotoksično kancerogenost, - Strukturni elementi za negenotoksično kancerogenost, - Potencialno mutageno za <i>S. typhimurium</i> TA100 glede na QSAR, - Mala verjetnost mutagenosti za <i>S. typhimurium</i> TA100 glede na QSAR, - Potencialni kancerogen glede na QSAR, - Mala verjetnost kancerogenosti glede na QSAR, - Za boljšo oceno bi bili potrebni nadaljnji QSAR izračuni, - Napaka pri uporabi odločitvenega drevesa.

Moduli	Klasifikacije
<i>In vitro</i> mutagenost	<ul style="list-style-type: none"> – Strukturni elementi mutagenosti za <i>S. typhimurium</i> TA100, – Ni strukturnih elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i> TA100, – Potencialno mutageno za <i>S. typhimurium</i> TA100 glede na QSAR, – Mala verjetnost mutagenosti za <i>S. typhimurium</i> TA100 glede na QSAR, – Za boljšo oceno bi bili potrebni nadaljnji QSAR izračuni, – Napaka pri uporabi odločitvenega drevesa.
Strukturni elementi toksičnosti za <i>in vivo</i> teste na podganjih mikronukleusih	<ul style="list-style-type: none"> – Vsaj en pozitiven strukturni element na testu mikronukleusov, – Ni najdenih strukturnih elementov na testu mikronukleusov.
Strukturni elementi za identifikacijo funkcionalnih skupin	<ul style="list-style-type: none"> – Najdena vsaj ena funkcionalna skupina, – Ni najdenih funkcionalnih skupin.
Strukturni elementi za določanje preobčutljivosti kože	<ul style="list-style-type: none"> – Identificiran element za S_NAr, – Identificiran element za nastanek Schiffove baze, – Identificiran element za Michael-ov akceptor, – Identificiran element za transfer acilne skupine, – Identificiran element za S_N2, – Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali preobčutljivost.
Strukturni elementi, povezani s kovalentnimi vezmi DNA	<ul style="list-style-type: none"> – Identificiran element za S_NAr, – Identificiran element za nastanek Schiffove baze, – Identificiran element za Michael-ov akceptor, – Identificiran element za transfer acilne skupine, – Identificiran element za S_N2, – Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali vezavo na DNA.
Elementi za vezavo proteinov	<ul style="list-style-type: none"> – Identificiran element za S_NAr, – Identificiran element za nastanek Schiffove baze, – Identificiran element za Michael-ov akceptor, – Identificiran element za transfer acilne skupine, – Identificiran element za S_N2, – Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali vezavo na proteine.

Moduli	Klasifikacije
Kroes-ovo odločitveno drevo	<ul style="list-style-type: none"> – Domneva se, da je spojina varna za uporabo, – Zanemarljivo tveganje (majhna možnost (1 na 10^{-6}) za nastanek raka), – Za oceno tveganja so potrebni dodatni podatki o toksičnosti spojine. <p>Potrebno je vnesti tudi podatek o dnevnem vnosu spojine.</p>
SMARTCyp	<ul style="list-style-type: none"> – SMARTCyp primarna območja metabolizma, – SMARTCyp sekundarna območja metabolizma, – SMARTCyp terciarna območja metabolizma, – SMARTCyp območja metabolizma, povezana z območjem štiri, – (Napaka).

Molekulo lahko v program vnesemo na več načinov, za nas sta pomembna še posebej dva.

Lahko jo narišemo, in sicer s pomočjo posebnega programskega orodja »JChemPaint – a structure diagram editor«, kar storimo tako, da kliknemo na zavihek *Chemical Compounds*, ter izberemo *Edit Compound*. Odpre se nam manjše okno, kamor lahko vrišemo spojino (Priloga III).

- Spojino lahko vnesemo tudi tako, da v okvirček, pred katerim piše *Chemical identifier*, vpišemo SMILES kodo ter nato na levi strani kliknemo ikono *Go*. Spojina se nato prikaže v oknu spodaj desno, kjer je napisano *Structure diagram* (Slika IIIa).
- Po vstavljeni molekuli, kliknemo na zavihek *Method*, izberemo *Select a decision tree*, kjer se nam odpre manjše okno ter nam omogoča, da prosto izbiramo med različnimi moduli. Po izbranem modulu kliknemo na ikono *OK* (Slika IIIb).
- Nato kliknemo še na ikono *Estimate*. Program nam ovrednoti spojine in njihove toksične učinke – izmed vseh naštetih lastnosti izbere najbolj verjetno/-e (Slika IIIc).
- Odločili smo se, da bomo pri tej diplomski nalogi preverili vseh 16 modulov, ki nam podajajo oceno o toksičnih učinkih spojin (Slika IIIč).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 NAPOVEDANI PRODUKTI S PROGRAMOM CRAFT EXPLORER

Pri biorazgradnji BZ-3 s programom CRAFT Explorer je poteklo devetintrideset reakcij, od tega smo se odločili predstaviti devet najpogostejših, in sicer UM-BBD bt0367 (nastanek produkta P20, P25), UM-BBD bt0013 (P43), UM-BBD bt0011 (P44), UM-BBD bt0012 (P45), UM-BBD bt0021 (P46, P47), UM-BBD bt0357 (P37) UM-BBD bt0005 (P33, P38), UM-BBD bt0023 (P50, P51) ter UM-BBD bt0040 (P29). Strukture vseh napovedanih produktov so narisane v Prilogi IV.

- UM-BBD bt0367 (nesubstituiran aromat → dihidrodihidroksiaromat)
Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Klasificirana je kot »verjetna« reakcija in je del pravila, ki obravnava dioksidacijo nesubstituiranih aromatskih derivatov (bt0367) in naknadno oksidacijo, ki tvori kateholne derivate (bt0255). To pravilo privede do nastanka *cis*- in *trans*-dihidrodiolnih intermediatov, kjer je položaj dioksidacije običajno določen z usmeritvijo obroča (-ev) v aktivnem mestu encima, česar pa ni mogoče predvideti.
- UM-BBD bt0013 (monosubstituiran benzenoid → na *para* mesto uvedena OH skupina)
Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Po verjetnosti je klasificirana kot »nevtralna« reakcija.
- UM-BBD bt0011 (monosubstituiran benzenoid → na *orto* mesto uvedena OH skupina)
Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Po verjetnosti je klasificirana kot »nevtralna« reakcija.
- UM-BBD bt0012 (monosubstituiran benzenoid → na *meta* mesto uvedena OH skupina)
Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Po verjetnosti je klasificirana kot »nevtralna« reakcija.

- UM-BBD bt0021 (1-okso-2-en derivat → 1-okso-3-hidroksi derivat)
 Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Klasificirana je kot »nevtralna« reakcija, pri kateri pride do vezave alfa in beta aktivnih dvojnih vezi z vodikom na okso skupino v tioestrih, karboksilatih in ketonih. Substrat je Michael-ov akceptor. Elektron donorske skupine deaktivirajo C=C dvojno vez.

- UM-BBD bt0357 (1,4-dihidroksibenzenoid → derivat maleil acetata)
 Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Klasificirana je kot »verjetna« reakcija, pri kateri pride do cepitve hidrokinaonskih derivatov (bt0297) in drugih hidrokinaonov (bt0174, bt0069), nastane lahko keton ali aldehidni intermediat, ki se nato oksidira in tvori karboksilat (bt0003).

- UM-BBD bt0005 (nesubstituiran aromat → dihidroksiaromat)
 Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Klasificirana je kot »verjetna« reakcija, pri kateri pride do dioksidacije nesubstituiranih aromatov (bt0367) in naknadne oksidacije, ki tvori kateholne derivate (bt0255). Dioksidacija aromatskega ogljikovodika proizvede aktivirane dikisikove zvrsti, ki naj bi bile dovolj reaktivne za potencialno funkcionalizacijo večine, če ne vseh, atomov ogljika aromatskega obroča. Položaj dioksidacije je običajno določen z usmeritvijo obroča (-ev) v aktivnem mestu encima, česar pa ni mogoče predvideti. To pravilo vpliva na nastanek *cis*- in *trans*-dihidrodiolnih intermediatov.

- UM-BBD bt0023 (aromatski-alifatski eter → derivat fenola + aldehid)
 Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Klasificirana je kot »nevtralna« reakcija. Pri aromatskem-alifatskem etru, Ar-O-R₁, nastaneta ArOH in R₁CHO, pri dialifatskem etru, R₁-O-R₂, nastaneta R₁-OH in R₂CHO ter R₂-OH in R₁CHO. Do reakcije ne pride pri etrih, kjer so sosednji ogljikovi halogenirani, kot tudi ne pri diaromatskih etrih, Ar₁-O-Ar₂, in cikličnih etrih (npr. furan, piran).

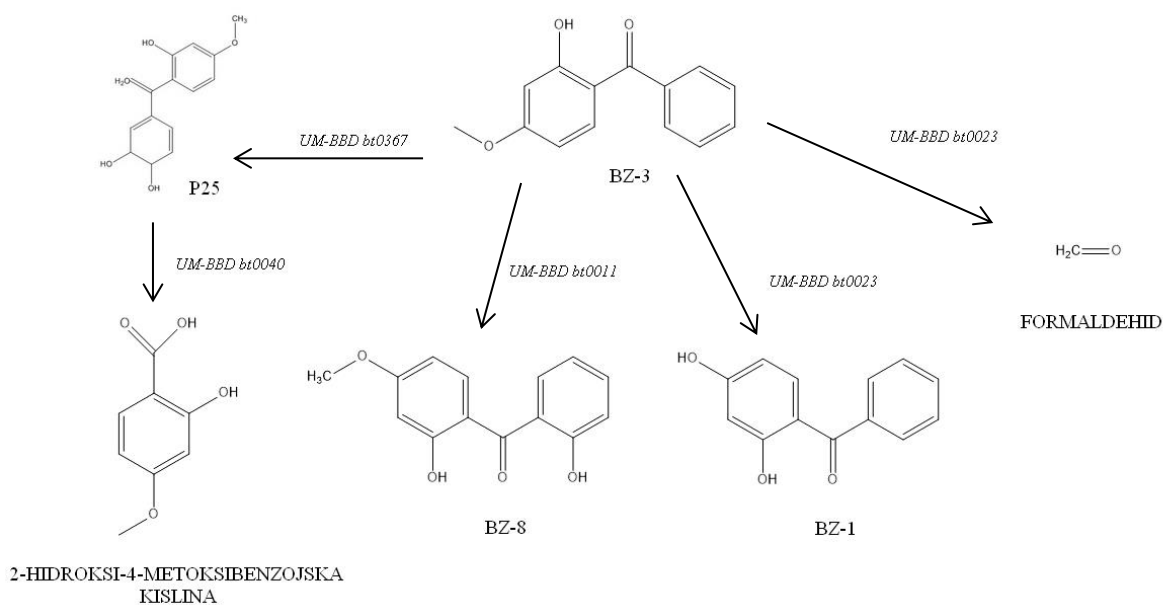
- UM-BBD bt0040 (1-aldo/keto-2,4-dien-5-ol → karboksilat + 1-en-4-on)

Biotska reakcija, ki poteka pri aerobnih pogojih, v vodi in/ali zemlji pri srednji vlažnosti, nevtralnem pH in 25 °C. Po verjetnosti je klasificirana kot »nevtralna« reakcija.

Po obdelavi podatkov in produktov razgradnje, napovedane s programom CRAFT Explorer, smo jih zbrali v Prilogi IV (*preglednica VIII*). V njej so prikazane strukturne formule napovedanih produktov, v stolpcu zraven desno pa so podane še informacije o verjetnosti njihovega nastanka, SMILES koda ter najkrajša pot nastanka.

Nastalo je dvaintrideset produktov, izvedenih pa je bilo devetintrideset reakcij. Kot lahko vidimo na drevesu biorazgradnje BZ-3 (Priloga V), lahko več različnih reakcij vodi do nastanka oz. napovedi istega produkta.

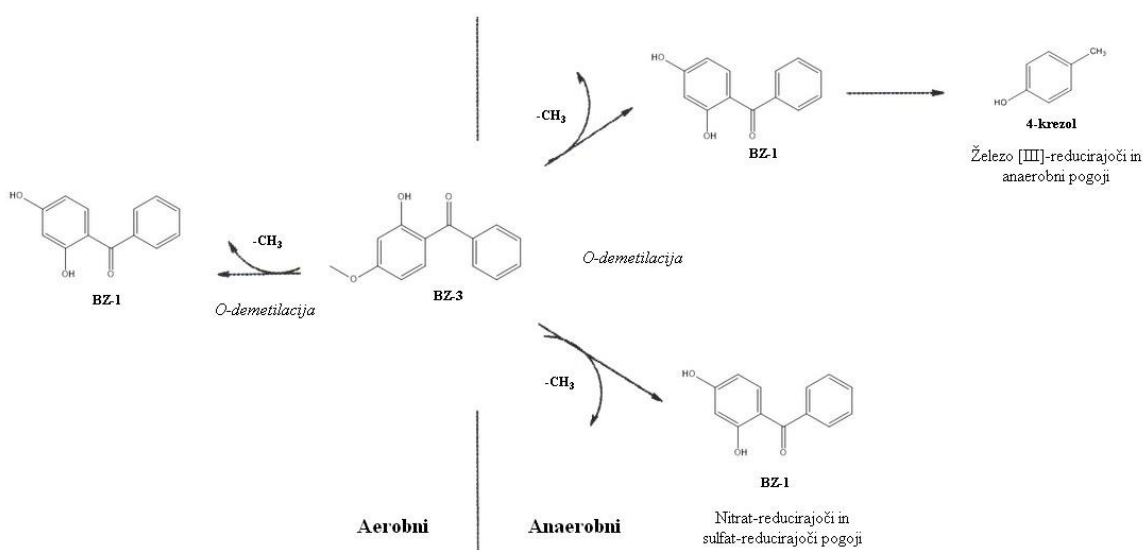
Od dvaintridesetih napovedanih produktov smo se odločili podrobneje preučiti toksične učinke štirih, ker so se nam po strukturi zdeli raznoliki in bi lahko njihove funkcionalne skupine različno vplivale na njihove toksične učinke (*Slika 3*). Odločili smo se za P29 (2-hidroksi-4-metoksibenzojska kislina oz. 4-metoksisalicilna kislina), P44 (benzofenon-8), P50 (benzofenon-1) ter P51 (formaldehid).



Slika 3: Prikaz razgradnje BZ-3 s CRAFT Explorer-jem in nastanek izbranih produktov.

BZ-3 je eden izmed najbolj pogosto uporabljenih organskih UV-filtrov v kremah za zaščito pred soncem, zato je posledično tudi najbolj zaznan UV-filter v odplakah in čistilnih napravah. Prek rekreacijskih dejavnosti ljudi kot sta plavanje in kopanje v morju pride namreč direktno v stik z vodnim in drugim okoljem, posredno pa prek nepopolne učinkovitosti čistilnih naprav. Že dlje časa je znano, da je dokaj stabilen v prisotnosti sončne svetlobe, zato biorazgradnja predstavlja najpomembnejšo pot pri nižanju koncentracij BZ-3 v okolju.

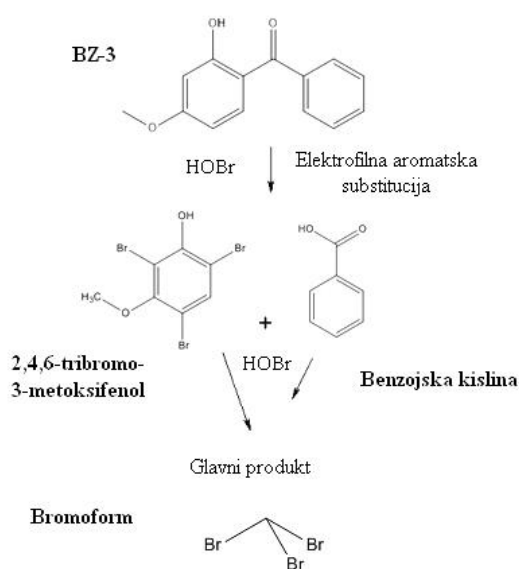
Biodegradacijo BZ-3 so raziskovali tudi v laboratorijskem okolju, kjer so jo izvedli pri različnih umetno induciranih pogojih, kot so aerobni, anaerobni, nitrat-reducirajoči, sulfat-reducirajoči in železo(III)-reducirajoči pogoji, ob prisotnosti navadnega blata in razgrajenega blata iz čistilnih naprav. Opazna je bila velika razlika v razpolovnih časih pri različnih pogojih – pri aerobnih pogojih je bila 10,7 dni, v nitrat-reducirajočem 8,7 dni, v železo(III)-reducirajočem 5,1 dni, v sulfat-reducirajočem 4,3 dni, pri anaerobnih pogojih pa 4,2 dni. Relativno kratki razpolovni časi nakazujejo na hitro razgradnjo BZ-3, opazili so tudi, da se spojina lažje razgradi pri anaerobnih kot pri aerobnih pogojih, pri obeh pogojih pa se v prisotnosti mikroorganizmov iz čistilnih naprav popolnoma biorazgradi v roku 42 dni inkubacije. Kot glavna metabolita so detektirali BZ-1 in 4-krezol (Slika 4). 4-krezol so zaznali le pri anaerobnih in železo(III)-reducirajočih pogojih, medtem ko so BZ-1 zaznali pri vseh uporabljenih pogojih. BZ-1 je nastal preko O-demetilacije metoksi skupine na BZ-3, medtem ko predvidevajo, da je bil 4-krezol stranski produkt pri nadaljnjih transformacijah BZ-1, saj UM-BBD baza tega produkta ni našla (64).



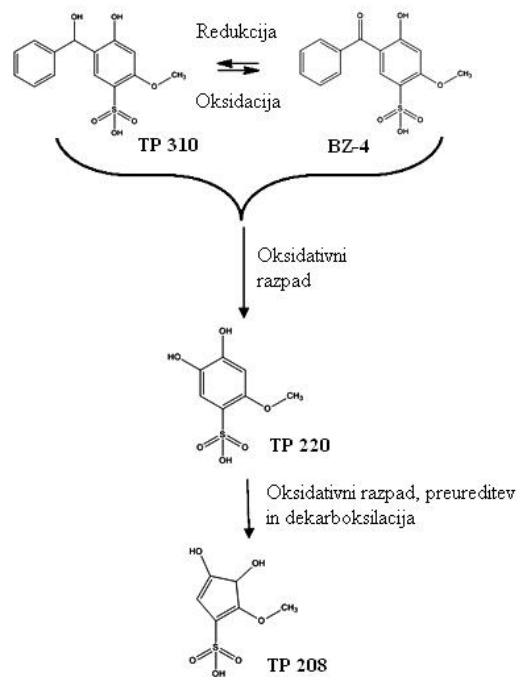
Slika 4: Shema biorazgradnje BZ-3 pri različnih pogojih.

V eni študiji so analizirali nastanek produktov benzofenona-3 v klorirani vodi v bazenih, kjer je voda bogata z bromidom. Vemo, da je klor zelo reaktiven v stiku z organskimi spojinami, še posebej tistimi, ki imajo v svoji strukturi fenolno skupino, kot npr. BZ-3. Zaradi standardnih redoks potencialov zelo hitro nastanejo zvrsti HOBr/OBr⁻, Cl⁻ ter zelo reaktivni BrCl, pri čemer lahko nastanejo klorirani oz. bromirani produkti (Slika 5) (65).

Beel in sodelavci so izvedli biodegradacijo benzofenonu-3 zelo sorodnega benzofenona-4 (BZ-4) v čistilnih napravah pri aerobnih pogojih ter analizirali nastanek njegovih produktov (Slika 6). Najpogosteje so zaznali produkt TP 310 (3,4-dihidroksi-2-metoksiciklopenta-1,4-dien-1-sulfonska kislina). Po sedmih dneh analiziranja so nastali še drugi produkti, npr. TP 220 (4,5-dihidroksi-2-metoksibenzensulfonska kislina), ki najverjetneje nastane z oksidativno cepitvijo BZ-4. Prvič so tudi odkrili, da bi lahko te biodegradacijske reakcije vodile do zelo polarnih produktov kot je TP 208 (hidroksilirana ciklopentadien sulfonska kislina) (66). Iz tega lahko sklepamo, da bi tudi pri BZ-3 lahko nastali podobni razgradni produkti.



Slika 5: Biorazgradna pot BZ-3 v klorirani vodi.



Slika 6: Biotransformacija BZ-4

Slednje raziskave so zelo zanimive, ker smo tudi sami s pomočjo programov napovedali iste oz. podobne produkte, še posebej velja omeniti BZ-1. Pri aerobnih pogojih je tudi BZ-1 znan produkt biodegradacije BZ-3, ima pa malo nižji log P (3,2) kot njegova matična spojina in se za razliko od nje lažje razgradi v okolju – ni tako stabilen v prisotnosti UV

svetlobe (67). Prav tako je zanimivo dejstvo, da se v nobeni od teh študij ne pojavi BZ-8 kot razgradni produkt, čeprav ga Kim in sodelavci omenjajo kot enega izmed glavnih biorazgradnih produktov BZ-3 (67). Najbrž zato, ker v umetno induciranih pogojih očitno ne nastane, medtem ko smo ga sami s CRAFT Explorer-jem pravilno napovedali. Glavni produkt, ki je nastal v primeru biorazgradnje BZ-4, in sicer TP 310, je podoben produktu v našem primeru, 2-[hidroksi(fenil)metil]-5-metoksifenol, saj je v obeh primerih prišlo do redukcije ketona do sekundarnega alkohola. Vendar pa je bil naš produkt napovedan s programom Meteor, medtem ko ga CRAFT Explorer ni napovedal kot potencialnega razgradnega produkta.

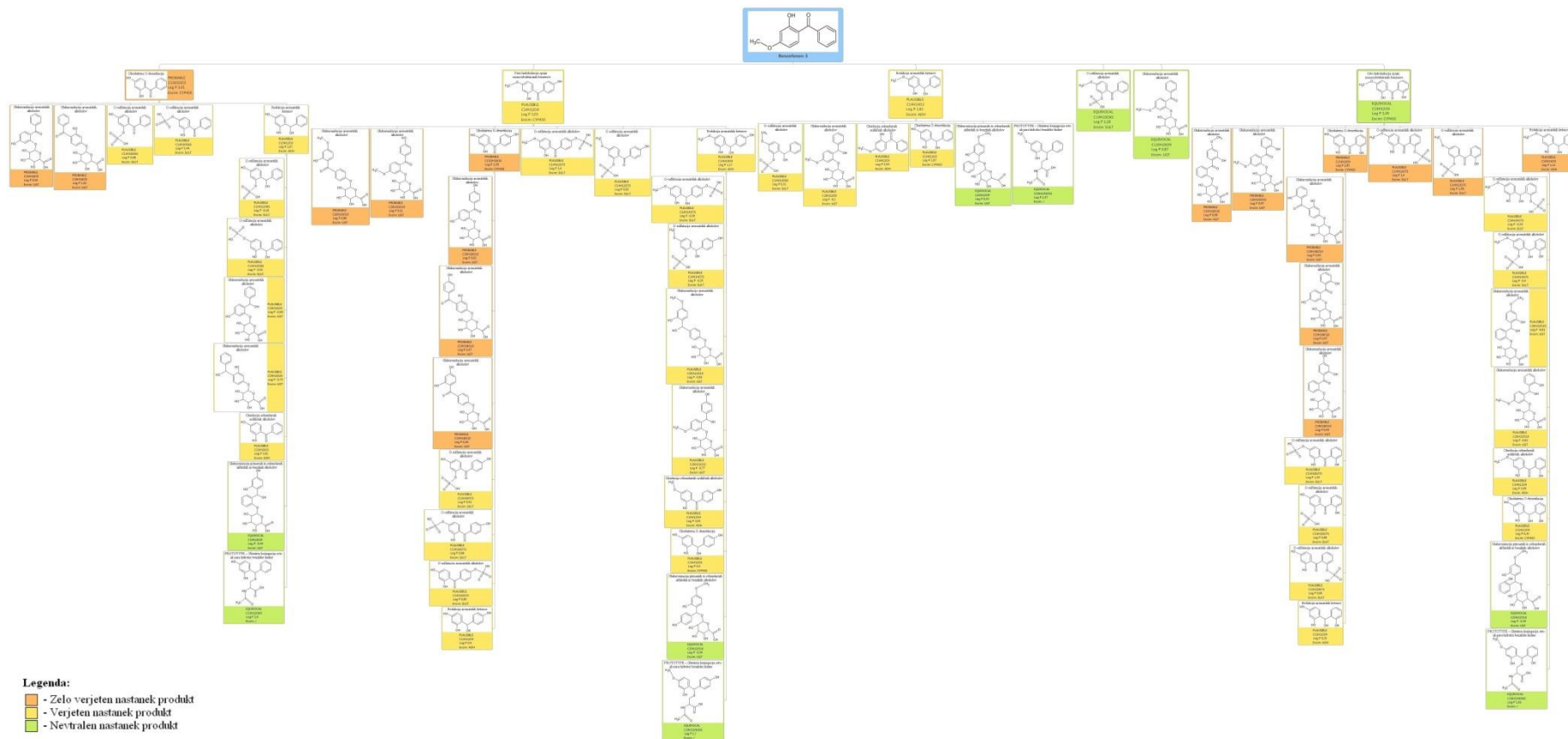
4.2 NAPOVEDANI PRODUKTI S PROGRAMOM METEOR NEXUS

Pri napovedanem metabolizmu BZ-3, s programom Meteor Nexus, je poteklo osem različnih reakcij, pri katerih so sodelovali štiri encimi; izoencimi citokroma 450, uridin difosfat-glukuronoziltransferaza, sulfotransferaza ter alkohol dehidrogenaza. V preglednici V so prikazani encimi, imena reakcij, v katerih so sodelovali ter številka primera iz Priloge VI, kjer smo vse napovedane metabolite tudi zbrali.

Preglednica V: Prikazani so biotransformacijski encimi, imena reakcij, v katerih so sodelovali ter št. primera iz Predloge VI.

Biotransformacijski Encimi	Ime reakcij	Št. primera iz preglednice VI
CYP450 (izoencimi citokromi 450)	Oksidativna O-demetilacija	1.
	<i>Para</i> -hidroksilacija spojin monosubstituiranih benzenov	14.
UGT (uridin difosfat-glukuronoziltransferaza)	Glukuronidacija aromatskih alkoholov	2.
	Glukuronidacija primarnih in sekundarnih alifatskih in benzilnih alkoholov	12.
SULT (sulfotransferaza)	O-sulfatacija aromatskih alkoholov	4.
ADH (alkohol dehidrogenaza)	Redukcija aromatskih ketonov	6.
	Oksidacija sekundarnih acikličnih alkoholov	11.
Encim ni naveden (ni encimsko katalizirana)	Prototip konjugacije <i>orto</i> - ali <i>para</i> -hidroksisubstituiranih benzojskih kislin z glutationom	13.

Tristopenjski metabolizem in nastanek šestinšestdesetih produktov si lahko lažje predstavljamo ob prikazanem drevesu metabolizma (Slika 7). Modra barva označuje osnovno spojino, iz katere smo izhajali, oranžna barva označuje »verjetne« produkte, rumena »možne«, zelena pa »nevtralne« produkte.



Slika 7: Drevo metabolizma benzofenona-3 in njegovih šestinšestdeset produktov.

V že prej omenjeni Prilogi VI (*preglednica IX*) pa smo zbrali metabolite benzofenona-3 ter informacije o njihovem metabolizmu, kot so strukturne formule, verjetnosti nastanka, molekulske formule, vrednosti log P, imena reakcij ter sodelujoče encime. Vidimo lahko, da je poteklo več reakcij metabolizma faze II, kjer sta glavna encima UGT (uridin difosfat-glukuronoziltransferaza) in SULT (sulfotransferaza), kar smo tudi pričakovali. Reakcije faze II so reakcije konjugacije, pri čemer pride do kovalentne vezave endogenih molekul preko reaktivnih (nukleofilnih) skupin ksenobiotikov. V reakcijah sodelujejo kofaktorji, ki so nosilci endogene molekule, metabolitom pa se zmanjša učinek, postanejo bolj topni, zato se lažje izločijo iz telesa (68).

Glukuronidacija je najpogostejša reakcija v fazi II metabolizma, pri čemer je potreben kofaktor uridin difosfat-glukuronska kislina (UDP-glukuronska kislina), reakcija pa je katalizirana z encimom UGT. Območje glukuronidacije je praviloma z elektroni bogat nukleofilni atom (O, N ali S), zato ti substrati navadno vsebujejo funkcionalne skupine, kot so alifatski alkoholi in fenoli, karboksilne kisline, primarne in sekundarne aromatske in alifatske amine (49, 50). Kot lahko vidimo je v primeru benzofenona-3 že v osnovni strukturi prisotna prosta fenolna hidroksilna skupina, ki se z lahkoto glukuronidira z glukuronsko kislino.

Sulfatacija je reakcija, kjer praviloma nastanejo visoko vodotopni estri žveplove kisline, kar lahko vidimo tudi v našem primeru z reakcijami O-sulfatacije fenolne OH skupine. Reakcije so katalizirane z encimom sulftransferazo (SULT), kofaktor pa je 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS) in največkrat potekajo na fenolih in alifatskih alkoholih (49).

Reakcije, ki so katalizirane z encimi ADH in CYP450 pa sodijo med reakcije metabolizma faze I.

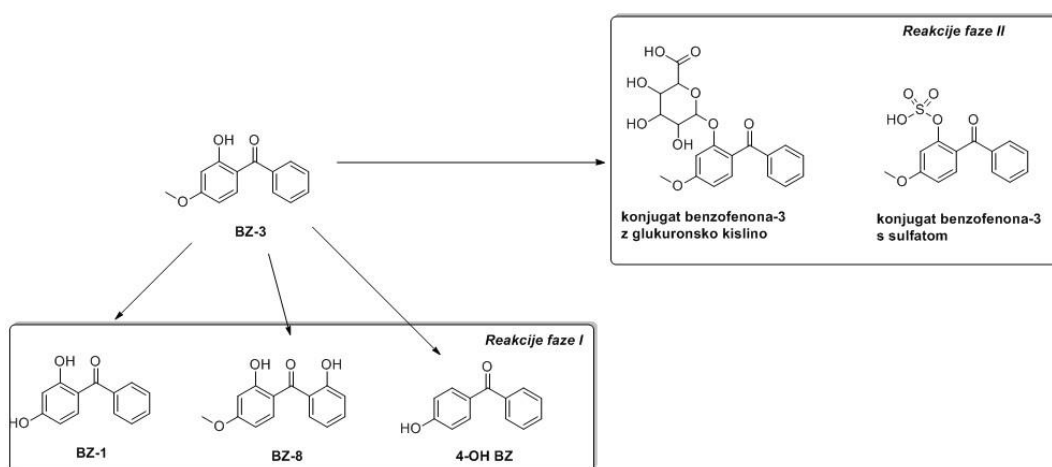
Alkohol dehidrogenaza (ADH) je encim, ki v svoji strukturi vsebuje cink in je dimerni protein (sestavljeno iz dveh podenot). ADH lahko razdelimo v štiri razrede, kjer je razred I odgovoren za oksidacijo etanola in drugih manjših alifatskih alkoholov. Razred II oksidira večje alifatske in aromatske alkohole, razred III je odgovoren za detoksifikacijo formaldehida, razred IV pa je pomemben za oksidacijo retinola. Razred I in II najdemo predvsem v jetrih, razred III se nahaja v tkivih po vsem telesu, razred IV pa najdemo v želodcu in drugih območjih gastrointestinalnega trakta (49). V našem primeru so najbolj pomembni encimi ADH razreda III, kjer je najpomembnejša katalizirana reakcija redukcija

aromatskih ketonov, ne smemo pa pozabiti omeniti še oksidacije sekundarnih acikličnih alkoholov, ki pa je redkeje prisotna.

Med biotransformacijskimi encimi faze I je **sistem izoencimov citokromov P450** zagotovo na prvem mestu, ko pride do detoksifikacije ksenobiotika oz. aktivacije le-tega in nastanka intermediatov. Reakciji, ki ju v našem primeru katalizirajo citokromi P450 sta oksidativna O-demetilacija in *para*-hidroksilacija spojin monosubstituiranih benzenov. Oksidativna O-demetilacija je zagotovo najpomembnejša reakcija, katalizirana s citokromi P450 pri detoksifikaciji BZ-3, medtem ko je *para*-hidroksilacija (monooksigenacija) spojin monosubstituiranih benzenov prisotna le enkrat, pa čeprav je najosnovnejša reakcija, katalizirana z encimi (49, 50).

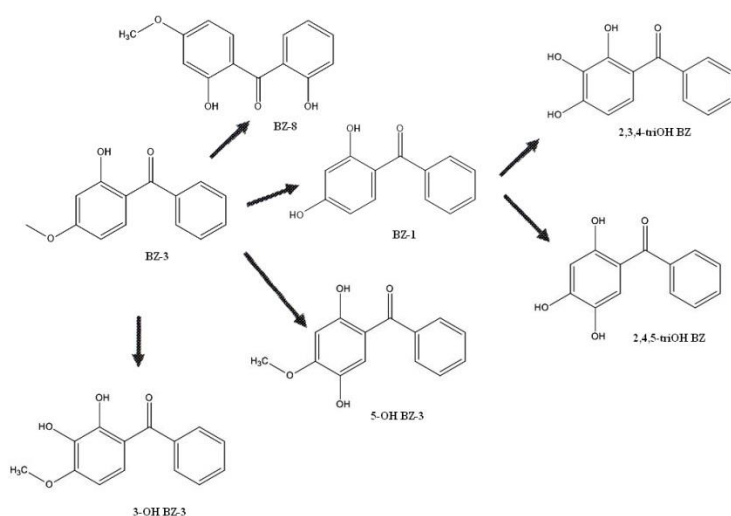
V naslednjem segmentu raziskav smo primerjali ustreznost napovedi metabolizma BZ-3 s programom Meteor, z realnimi literaturnimi podatki, pridobljenimi iz študij na podganah in ljudeh.

BZ-3 so zaznali tako v vzorcih urina otrok kot tudi odraslih iz Združenih Držav Amerike in Kitajske. Ugotovili so, da so bili prevladujoči produkti faze I BZ-1, BZ-8 in 4-OH BZ (4-hidroksibenzofenon), pri fazi II pa so v veliki večini nastali glukuronidi in sulfati (*Slika 8*). Primerjali so tudi razlike v metabolizmu faze I in II pri teh ljudeh in ugotovili, da je bil metabolizem faze II uspešnejši pri ljudeh iz ZDA, saj je nastalo več konjugiranih metabolitov, medtem ko je bilo nekonjugiranih metabolitov le 25-37 %, v vzorcih urina ljudi iz Kitajske pa so zaznali veliko več BZ-3. Razlika v koncentracijah zaznanega BZ-3 in metabolitov v urinu je verjetno posledica razlike v uporabi krem za zaščito pred soncem, pa tudi genetskih razlik in razlik v metaboliziranju (69).



Slika 8: Metabolna pot BZ-3 in reakcije faze I ter II.

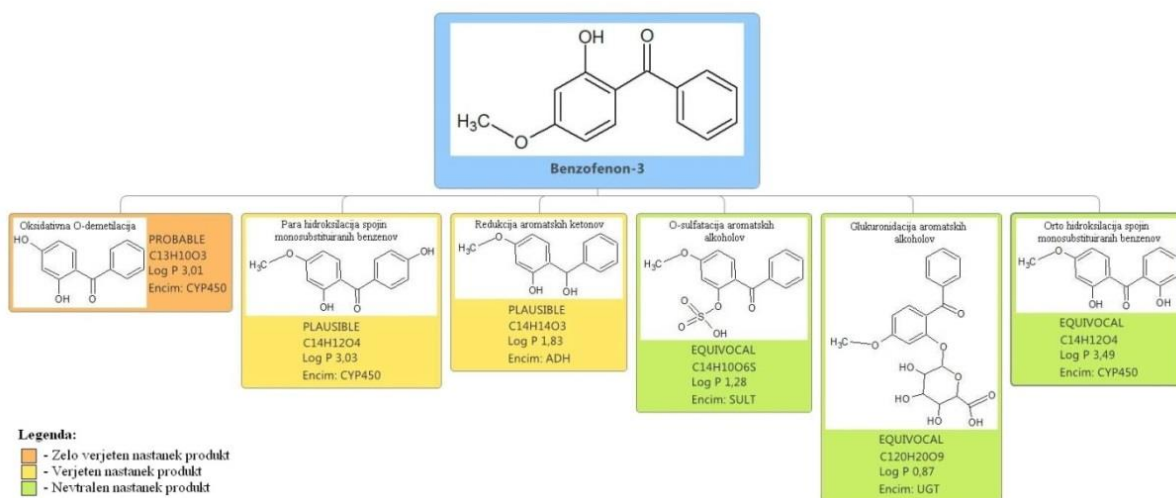
Watanabe in sodelavci so preiskovali biotransformacijo BZ-3 z mišjimi jetrnimi mikrosomi in pri ljudeh, kjer so v glavnem detektirali BZ-1 s sledmi THB (2,3,4-trihidroksibenzofenon), 3-OH BZ-3 (2,3-dihidroksi-4-metoksibenzofenon), 5-OH BZ-3 (2,5-dihidroksi-4-metoksibenzo-fenon) ter 2,4,5-triOH BZ (2,3,4-trihidroksibenzofenon) (Slika 9). Čeprav BZ-8 in BZ-1 predstavljata glavna metabolita BZ-3, skupaj z THB v sledovih, pa BZ-8 v tej študiju kot metabolita niso zaznali. So pa zaznali 3-OH BZ-3 in 5-OH BZ-3 kot pogosta metabolita v mišjih jetrnih mikrosomih, kjer je večina metabolitov nastala s pomočjo encimov CYP450 (70).



Slika 9: Metabolna pot BZ-3 v mišjih jetrnih mikrosomih.

Pri napovedi metabolitov BZ-3 s programom Meteor smo večino produktov dobili v obliki glukuronidov in sulfatov, ni pa napovedal nastanka THB, 4-OH BZ, 3-OH BZ-3, 5-OH BZ-3 in drugih manjših metabolitov, zaznanih v sledovih. V študijah smo zasledili tako BZ-1 in BZ-8 (67, 69) kot tudi 2,2',4-trihidroksibenzofenon in 2,4,4'-trihidroksibenzofenon (70) in jih pravilno napovedali z Meteor-jem. Prav tako smo z Meteor-jem napovedali nastanek spojine 2-[hidroksi(fenil)metil]-5-metoksifenol, ki je sicer produkt biorazgradnje benzofenona-3, ni ga pa napovedal CRAFT Explorer.

Izmed vseh šestinšestdesetih nastalih metabolitov smo se odločili natančneje preučiti toksične učinke šestih, in sicer tistih, ki so nastali v prvi stopnji metabolizma (*Slika 10*).

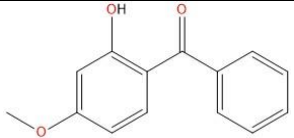
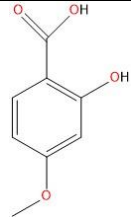
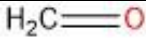
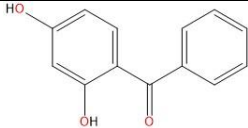
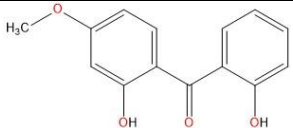


Slika 10: Osnovna spojina ter šest izbranih metabolitov, ki jih bomo natančneje preučili.

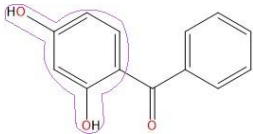
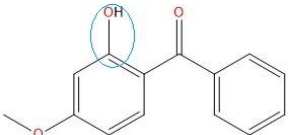
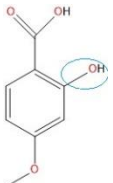
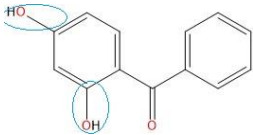
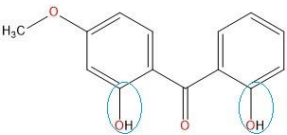
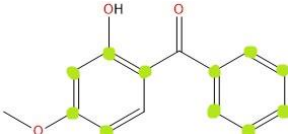
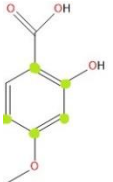
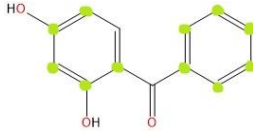
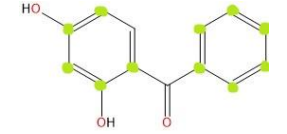
4.3 REZULTATI TESTIRANJ SPOJIN S PROGRAM TOXTREE

Po testiranju razgradnih produktov, napovedanih s programom CRAFT Explorer, ter metabolitov, napovedanih s programom Meteor Nexus, smo rezultate zbrali v preglednicah, ki sta prikazani spodaj (*preglednici VI in VII*). V njih so zbrane vse izbrane spojine, ki smo jih imeli namen preučiti *in silico*, pa tudi vsi moduli, ki smo jih pri testiranjih upoštevali.

Preglednica VI: Rezultati ocene toksičnih učinkov spojin s programom Toxtree, nastalih s programom CRAFT Explorer

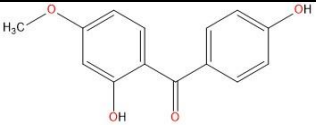
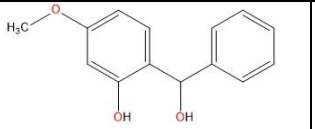
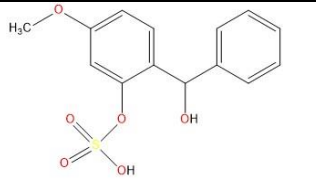
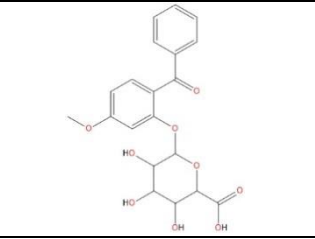
Toxtree moduli	Toksični učinki osnovne spojine	Toksični učinki razgradnih produktov, predvidenih s programom CRAFT Explorer (BZ-1 in BZ-8 sta tudi produkta metabolizma)			
		<u>BZ-3</u>	<u>2-hidroksi-4-metoksibenzojska kislina</u>	<u>Formaldehid</u>	<u>BZ-1</u>
<u>SMILES koda</u>	<chem>C1=CC=CC=C1C(C2=CC=C(C=C2)OC)=O</chem>	<chem>C1=C(C=C(C(=C1)C(O)=O)O)OC</chem>	<chem>C=O</chem>	<chem>C1(=CC=CC=C1)C(C2=CC=C(C=C2)O)=O</chem>	<chem>C1(=C(C=CC=C1)O)C(C2=CC=C(C=C2)OC)=O</chem>
<u>Strukturne formule</u>					
<u>Cramer-jeva pravila</u>	Visoko (Razred III)	Nizko (Razred I)	Nizko (Razred I)	Visoko (Razred III)	Visoko (Razred III)
<u>Razširjena Cramer-jeva pravila</u>	Visoko (Razred III)	Nizko (Razred I)	Nizko (Razred I)	Visoko (Razred III)	Visoko (Razred III)
<u>Verhaar-jeva shema</u>	Razred I (začetna toksičnost)	Razred I (začetna toksičnost)	Razred III (nespecifična reaktivnost)	Razred V (ni možno določiti)	Razred I (začetna toksičnost)
<u>Modificirana Verhaar-jeva shema</u>	Razred I (začetna toksičnost)	Razred I (začetna toksičnost)	Razred III (nespecifična reaktivnost)	Razred V (ni možno določiti)	Razred I (začetna toksičnost)
<u>Napoved draženja kože</u>	Ne draži oz. ni korozivno	Ne draži oz. ni korozivno	Draži oz. deluje korozivno	Ne draži oz. ni korozivno	Ne draži oz. ni korozivno
<u>Napoved draženja oči</u>	Ni korozivno po R34 in R35	Ni korozivno po R34 in R35	Neznano	Ni korozivno po R34 in R35	Ni korozivno po R34 in R35

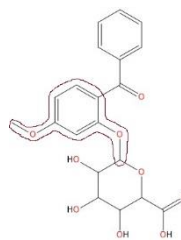
Toxtree moduli	Toksični učinki osnovne spojine	Toksični učinki razgradnih produktov, predvidenih s programom CRAFT Explorer (BZ-1 in BZ-8 sta tudi produkta metabolizma)			
		<u>BZ-3</u>	<u>2-hidroksi-4-metoksibenzojska kislina</u>	<u>Formaldehid</u>	<u>BZ-1</u>
<u>Strukturni elementi biorazgradnje in obstoja</u>	Razred II (obstojna spojina)	Razred I (hitra biorazgradljivost)	Razred I (hitra biorazgradljivost)	Razred II (obstojna spojina)	Razred II (obstojna spojina)
<u>Benigni / Bossa-jeva pravila mutagenosti in kancerogenosti</u>	Negativno za genotoksično kancerogenost, negativno za negenotoksično kancerogenost	Negativno za genotoksično kancerogenost, negativno za negenotoksično kancerogenost	Negativno za genotoksično in negenotoksično kancerogenost	Negativno za genotoksično kancerogenost in negenotoksično kancerogenost	Negativno za genotoksično kancerogenost in negenotoksično kancerogenost
<u>In vitro mutagenost</u>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>
<u>Strukturni elementi toksičnosti za in vivo teste na podganjih mikronukleusih</u>	Vsaj en pozitivni strukturni element (QSA34: H-acceptor-path3-H-acceptor) ****	Vsaj en pozitivni strukturni element (QSA34: H-acceptor-path3-H-acceptor) ****	Ni strukturnih elementov	Vsaj en pozitivni strukturni element (QSA34: H-acceptor-path3-H-acceptor) ****	Vsaj en pozitivni strukturni element (QSA34: H-acceptor-path3-H-acceptor) ****
<u>Strukturni elementi za identifikacijo funkcionalnih skupin</u>	Najdena vsaj ena funkcionalna skupina (QFG3: Karbonilna skupina) (QFG3_2: Keton) (QFG23_LS: Alkohol) (QFG23_6: Fenol) (QFG24_LS: Eter) (QFG24_2:Alkilarileter) (QFG87: Aromatska spojina)	Najdena vsaj ena funkcionalna skupina (QFG23_LS: Alkohol) (QFG23_6: Fenol) (QFG24_LS: Eter) (QFG24_2:Alkilarileter) (QFG35_1: Karboksilna kislina) (QFG87: Aromatska spojina)	Ni najdenih funkcionalnih skupin	Najdena vsaj ena funkcionalna skupina (QFG3: Karbonilna skupina) (QFG3_2: Keton) (QFG23_LS: Alkohol) (QFG23_6: Fenol) (QFG87: Aromatska spojina)	Najdena vsaj ena funkcionalna skupina (QFG3: Karbonilna skupina) (QFG3_2: Keton) (QFG23_LS: Alkohol) (QFG23_6: Fenol) (QFG24_LS: Eter) (QFG24_2:Alkilarileter) (QFG87: Aromatska spojina)

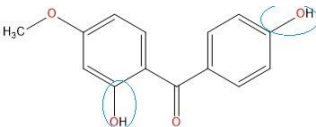
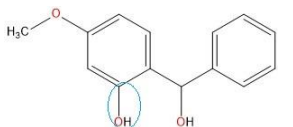
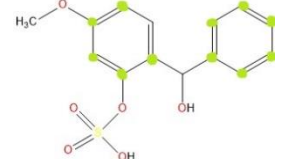
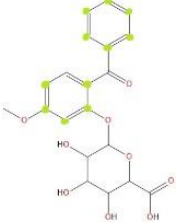
Toxtree moduli	Toksični učinki osnovne spojine	Toksični učinki razgradnih produktov, predvidenih s programom CRAFT Explorer (BZ-1 in BZ-8 sta tudi produkta metabolizma)			
		<u>BZ-3</u>	<u>2-hidroksi-4-metoksibenzojska kislina</u>	<u>Formaldehid</u>	<u>BZ-1</u>
<u>Strukturni elementi za določanje preobčutljivosti kože</u>	Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali preobčutljivost	Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali preobčutljivost	Identificiran strukturni element za tvorbo Schiff-ove baze** (QSB: Keton) <chem>H2C=O</chem>	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* (QMA: Aromatski obroč z OH skupinama, nastanek tautomera) 	Ni identificiranih strukturnih elementov
<u>Strukturni elementi, povezani s kovalentnimi vezmi DNA</u>	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* (Hidroksi skupina) 	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* (Hidroksi skupina) 	Identificiran strukturni element za tvorbo Schiff-ove baze** (QSB: Karbonilna skupina) <chem>H2C=O</chem>	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* (QMA: Dve hidroksi skupini) 	Elementi za Michaelove akceptorje* (QMA: Dve hidroksi skupini) 
<u>Elementi za vezavo proteinov</u>	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* 	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* 	Identificiran strukturni element za tvorbo Schiff-ove baze** (QSB: Keton) <chem>H2C=O</chem>	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* 	Elementi za Michaelove akceptorje* 

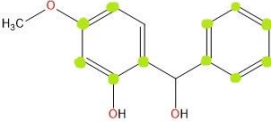

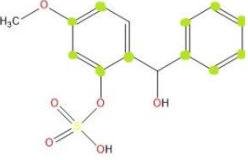
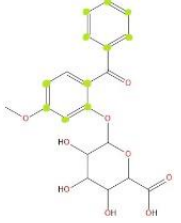
Toxtree moduli	Toksični učinki osnovne spojine	Toksični učinki razgradnih produktov, predvidenih s programom CRAFT Explorer (BZ-1 in BZ-8 sta tudi produkta metabolizma)			
		<u>BZ-3</u>	<u>2-hidroksi-4-metoksibenzojska kislina</u>	<u>Formaldehid</u>	<u>BZ-1</u>
<u>Kroes odločitveno drevo</u>	Domneva se, da je spojina varna za uporabo	Domneva se, da je spojina varna za uporabo	Domneva se, da je spojina varna za uporabo	Domneva se, da je spojina varna za uporabo	Domneva se, da je spojina varna za uporabo
<u>SMARTCyp – s citokromom P450 posredovan metabolizem spojin</u>	Lahko pride do metabolizma z encimom citokrom P450	Lahko pride do metabolizma z encimom citokrom P450	Ne more priti do metabolizma	Lahko pride do metabolizma s citokromom P450	Lahko pride do metabolizma s citokromom P450

Preglednica VII: Rezultati ocene toksičnih učinkov metabolitov, napovedanih s programom Meteor Nexus

Toxtree moduli	Toksični učinki razgradnih produktov, predvidenih s programom Meteor Nexus (ocenjeni toksični učinki BZ-1 in BZ-8, ki sta tudi produkta razgradnje, so navedeni v zgornji preglednici)			
	<u>(2-hidroksi-4-metoksifenil)(4-hidroksifenil) metanon</u>	<u>2-[hidroksi(fenil)metil]-5-metoksifenol</u>	<u>2-benzoil-5-metoksifenil oksidansulfonska kislina</u>	<u>6-(2-benzoil-5-metoksifenoksi)-3,4,5-trihidroksitetrahidro-2H-piran-2-karbonsilna kislina</u>
<u>SMILES koda</u>	<chem>C1(=CC=C(C=C1)O)C(C2=CC=C(C=C2)OC)=O</chem>	<chem>C1(=CC=CC=C1)C(C2=CC=C(C=C2)OC)O</chem>	<chem>O[S](=O)(=O)OC1=CC(=CC=C1)C(=O)C2=CC=CC=C2OC</chem>	<chem>C1=C(C=CC=C1)C(C2=CC=C(C=C2)OC(=O)C3C(C(C(O3)C(=O)O)O)O)OC)=O</chem>
<u>Strukturna formula</u>				
<u>Cramer-jeva pravila</u>	Visoko (Razred III)	Visoko (Razred III)	Visoko (Razred III)	Visoko (Razred III)
<u>Razširjena Cramer-jeva pravila</u>	Visoko (Razred III)	Visoko (Razred III)	Visoko (Razred III)	Visoko (Razred III)
<u>Verhaar-jeva shema</u>	Razred I (začetna toksičnost)	Razred I (začetna toksičnost)	Razred III (nespecifična reaktivnost)	Razred I (začetna toksičnost)

Toxtree moduli	Toksični učinki razgradnih produktov, predvidenih s programom Meteor Nexus (ocenjeni toksični učinki BZ-1 in BZ-8, ki sta tudi produkta razgradnje, so navedeni v zgornji preglednici)			
	<u>(2-hidroksi-4-metoksifenil)(4-hidroksifenil) metanon</u>	<u>2-[hidroksi(fenil)metil]-5-metoksifenol</u>	<u>2-benzoil-5-metoksifenil oksidansulfonska kislina</u>	<u>6-(2-benzoil-5-metoksifenoksi)-3,4,5-trihidroksitetrahidro-2H-piran-2-karboksilna kislina</u>
<u>Modificirana Verhaar-jeva shema</u>	Razred I (začetna toksičnost)	Razred I (začetna toksičnost)	Razred III (nespecifična reaktivnost)	Razred I (začetna toksičnost)
<u>Napoved draženja kože</u>	Ne draži oz. ni korozivno	Ne draži oz. ni korozivno	Ni znano	Ne draži oz. ni korozivno
<u>Napoved draženja oči</u>	Ni korozivno po R34 in R35	Ni korozivno po R34 in R35	Ni znano	Ni lezij po R34, R35, R36 in R41
<u>Strukturni elementi biorazgradnje in obstoja</u>	Razred II (obstojna spojina)	Razred II (obstojna spojina)	Razred II (obstojna spojina)	Razred II (obstojna spojina)
<u>Benigni / Bossa-jeva pravila mutagenosti in kancerogenosti</u>	Negativno za genotoksično in negenotoksično kancerogenost	Negativno za genotoksično in negenotoksično kancerogenost	Negativno za genotoksično in negenotoksično kancerogenost	Negativno za genotoksično in negenotoksično kancerogenost
<u>In vitro mutagenost</u>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>	Ni elementov mutagenosti za <i>S. typhimurium</i>
<u>Strukturni elementi toksičnosti za in vivo teste na podganjih mikronukleusih</u>	Vsaj en pozitivni strukturni element (QSA34: H-acceptor-path3-H-acceptor) ****	Ni strukturnih elementov	Vsaj en pozitivni strukturni element (QSA34: H-acceptor-path3-H-acceptor) ****	Vsaj en pozitivni strukturni element (QSA32: 1,3-Dialkoksi-benzen)  (QSA34: H-acceptor-path3-H-acceptor) ****

Toxtree moduli	Toksični učinki razgradnih produktov, predvidenih s programom Meteor Nexus (ocenjeni toksični učinki BZ-1 in BZ-8, ki sta tudi produkta razgradnje, so navedeni v zgornji preglednici)			
	<u>(2-hidroksi-4-metoksifenil)(4-hidroksifenil) metanon</u>	<u>2-[hidroksi(fenil)metil]-5-metoksifenol</u>	<u>2-benzoil-5-metoksifenil oksidansulfonska kislina</u>	<u>6-(2-benzoil-5-metoksifenoksi)-3,4,5-trihidroksitetrahidro-2H-piran-2-karboksilna kislina</u>
<u>Strukturni elementi za identifikacijo funkcionalnih skupin</u> <u>Strukturni elementi za identifikacijo funkcionalnih skupin</u>	Najdena vsaj ena funkcionalna skupina (QFG3: Karbonilna skupina) (QFG3_2: Keton) (QFG23_LS: Alkohol) (QFG23_6: Fenol) (QFG24_LS: Eter) (QFG24_2: Alkilarileter) (QFG87: Aromatska spojina)	Najdena vsaj ena funkcionalna skupina (QFG23_LS: Alkohol) (QFG23_2: Sekundarni alkohol) (QFG23_6: Fenol) (QFG24_LS: Eter) (QFG24_2: Alkilarileter) (QFG87: Aromatska spojina)	Najdena vsaj ena funkcionalna skupina (QFG3: Karbonilna skupina) (QFG3_2: Keton) (QFG24_LS: Eter) (QFG24_2: Alkilarileter) (QFG74_2: Monoester žveplove kisline) (QFG87: Aromatska spojina)	Najdena vsaj ena funkcionalna skupina (QFG3: Karbonilna skupina) (QFG3_2: Keton) (QFG15: Acetal) (QFG23_LS: Alkohol) (QFG23_2: Sekundarni alkohol) (QFG23_4: 1,2-Diol) (QFG24_LS: Eter) (QFG24_1: Dialkileter) (QFG24_2: Alkilarileter) (QFG35_1: Karboksilna kislina) (QFG87: Aromatska spojina)
<u>Strukturni elementi za določanje preobčutljivosti kože</u>	Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali preobčutljivost	Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali preobčutljivost	Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali preobčutljivost	Ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi določali preobčutljivost
<u>Strukturni elementi, povezani s kovalentnimi vezmi DNA</u>	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* (QMA: Dve hidroksi skupini) 	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* (QMA: Hidroksi skupina) 	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* 	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* 

Toxtree moduli	Toksični učinki razgradnih produktov, predvidenih s programom Meteor Nexus (ocenjeni toksični učinki BZ-1 in BZ-8, ki sta tudi produkta razgradnje, so navedeni v zgornji preglednici)			
	<u>(2-hidroksi-4-metoksifenil)(4-hidroksifenil) metanon</u>	<u>2-[hidroksi(fenil)metil]-5-metoksifenol</u>	<u>2-benzoil-5-metoksifenil oksidansulfonska kislina</u>	<u>6-(2-benzoil-5-metoksifenoksi)-3,4,5-trihidroksitetrahidro-2H-piran-2-karboksilna kislina</u>
<u>Elementi za vezavo proteinov</u>	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* 	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* in S _N 2.*** (QSN2: Alifatska substitucija na alkoholu med obročema) 	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* 	Identificirani elementi za Michaelove akceptorje* 
<u>Kroes odločitveno drevo</u>	Domneva se, da je spojina varna za uporabo	Domneva se, da je spojina varna za uporabo	Domneva se, da je spojina varna za uporabo	Domneva se, da je spojina varna za uporabo
<u>SMARTCyp – s citokromom P450 posredovan metabolizem spojin</u>	Lahko pride do metabolizma z encimom citokrom P450	Lahko pride do metabolizma z encimom citokrom P450	Lahko pride do metabolizma z encimom citokrom P450	Lahko pride do metabolizma z encimom citokrom P450

* Michealov akceptor – Izvira iz Michaelove reakcije oz. Michaelove adicije. Michaelov akceptor je običajno keton, ki se s tautomerijo spremeni v enon.

** Schiffova baza – Schiffove baze so spojine s splošno formulo R¹R²C=NR³. Kemijsko gledano so Schiffove baze imini, dušikovi analogi karbonilnih spojin. Najenostavneje jih pripravimo z reakcijo med ustreznim ketonom in aromatskim aninom.

*** S_N2 – Vrsta nukleofilne substitucije.

**** QSA34: Spojina vsebuje dva akceptorja H-vezi ločena z dvema ogljikovima atomoma.

– **Benzofenon-3**

Pri uporabi modula Cramer-jeva pravila (in razširjena) lahko opazimo, da je spojina klasificirana pod razred III, kar pomeni, da izkazuje toksične učinke oz. ima reaktivne funkcionalne skupine, naslednja modula (Verhaar) pa jo klasificirata pod začetno toksičnost (razred I). Pri BZ-3 ni bilo identificiranih strukturnih elementov, ki bi povzročali preobčutljivost, kar pa ni res, saj vemo, da je BZ-3 znan povzročitelj fotoalergij, urtikarij in dermatitsov. Benzofenon-3 je najpogostejši UV-filter, ki povzroča (foto)kontaktno alergijo, pa tudi (foto)kontaktno urtikarijo, pri čemer je potrebno upoštevati površino kože, ki je izpostavljena BZ-3. Pri izpostavitvi večji količini, lahko pride celo do anafilaktičnega šoka (72). Šest let trajajoča študija (1985 – 1990), izvedena v New Yorku, nakazuje, da se število pojavov fotokontaktne dermatitisa iz leta v leto povečuje in da bo v naslednjih letih potrebno omejiti oz. zmanjšati uporabo tega UV-filtra (73). BZ -3 kože ne draži oz. ne deluje korozivno nanjo, prav tako ne deluje korozivno na oči. V okolju je spojina obstojna, kar pomeni, da je možna bioakumulacija. Glede na rezultate programa Toxtree spojina ni kancerogena in ni mutagena. Pri BZ-3 lahko najdemo več funkcionalnih skupin, kot so karbonilna skupina - keton, alkohol, fenol, eter, alkilarileter ter aromatski obroč, ki se lahko zaradi svoje reaktivnosti vežejo na biološke molekule. Ketoni in aldehidi so sicer reaktivne funkcionalne skupine, medtem ko je pri diaril-ketonih reaktivnost znatno zmanjšana. Identificirani so bili elementi, ki so lahko odgovorni za vezavo na DNA in proteine, za kar so verjetno odgovorni tautomeri BZ-3. Domneva se, da je spojina varna za uporabo, saj ne pride do velikih količin spojine, ki bi ji bili vsakodnevno izpostavljeni.

– **2-hidroksi-4-metoksibenzojska kislina**

2-hidroksi-4-metoksibenzojska kislina je v okolju hitro biorazgradljiva spojina in ni kancerogena ali mutagena, prav tako v svoji strukturi ne vsebuje elementov, ki bi povzročali preobčutljivost kože. Najdemo več funkcionalnih skupin, kot so alkohol, fenol, eter, alkilarileter, karboksilno kislino, ki se lahko vežejo z biološkimi molekulami. Identificirani so bili tudi elementi, ki so lahko odgovorni za vezavo na DNA in proteine. Domneva se, da je spojina varna za uporabo, saj vsakodnevno nismo izpostavljeni velikim količinam te spojine.

– **Formaldehid**

Formaldehid je spojina s preprosto kemijsko strukturo in nakazuje nizko peroralno toksičnost (Cramer – razred I), njena reaktivnost pa je nespecifična (Verhaar – razred III).

Formaldehid kožo draži oz. deluje korozivno nanjo, medtem ko delovanje na oči ni znano. V okolju se hitro biorazgradi in ni kancerogen in mutagen, kar pa je v nasprotju z eksperimentalnimi podatki, saj smo zasledili, da formaldehid povzroča mutagenost pri AMESovem testu na *S. typhimurium* (71). Identificirani so bili strukturni elementi za tvorbo Schiff-ove baze, ki lahko privedejo do kovalentne povezave z DNA in proteini, kar je posledica prisotnosti aldehydne skupine v strukturi formaldehida. Iz literarnih podatkov smo razbrali, da je formaldehid hitro biorazgradljiva spojina. Ena izmed študij prikazuje učinke pri kronični izpostavitvi samic in samcev podgane Wistar dvoletnemu pitju vode, ki je vsebovala formaldehid (samci so bili izpostavljeni 82 mg količini formaldehida na kg telesne mase na dan, samice pa 109 mg količini formaldehida na kg telesne mase na dan), kjer se je masa izrazito zmanjšala – 10-15 % nižja kot pri kontrolnih živalih (74). Študije, izvedene pri obeh spolih podgan, dokazujejo povečanje gastrointestinalnih leiomiosarkom, posebej pri samicah (75, 76), ki je ponovno v nasprotju s Toxtree napovedjo karcinogenosti, saj dolgoročno povzroča rakotvornost.

– **Benzofenon-1**

Benzofenon-1 je spojina, klasificirana pod razred III, kar pomeni, da izkazuje toksične učinke oz. ima reaktivne funkcionalne skupine, medtem ko toksičnosti in reaktivnosti s pomočjo Verhaar-jeve sheme ni mogoče določiti (razred V). V okolju je obstojna spojina, kar pomeni, da je možna bioakumulacija. Po Toxtree spojina ni kancerogena in ni mutagena. Pri BZ-1 lahko najdemo več funkcionalnih skupin, kot so karbonilna skupina – keton, alkohol, fenol ter aromatski obroč in so odgovorne za reaktivnost spojine ter možnost vezave na proteine. Michaelov akceptor predstavlja tautomerna oblika osnovne spojine.

– **Benzofenon-8**

Benzofenon-8 je še ena spojina, klasificirana pod razred III, kar pomeni, da izkazuje toksične učinke oz. ima reaktivne funkcionalne skupine, Verhaar modula pa

napovedujeta začetno toksičnost. V okolju je obstojna spojina, kar pomeni, da je možna bioakumulacija, ni pa označena za kancerogeno oz. mutageno. Pri BZ-8 najdemo funkcionalne skupine, kot so karbonilna skupina – keton, alkohol, fenol, eter, alkilarileter ter aromatski obroč; ketoni in fenoli so znane reaktivne funkcionalne skupine, ki lahko sodelujejo v vezavi na biološke makromolekule. Identificirani pa so bili tudi nekateri drugi strukturni elementi, ki so lahko odgovorni za vezavo na DNA in proteine.

– **(2-hidroksi-4-metoksifenil)(4-hidroksifenil)metanon**

Spojina ima reaktivne funkcionalne skupine, naslednja modula (Verhaar) pa jo klasificirata pod začetno toksičnost (razred I). Program v strukturi ni identificiral strukturnih elementov, ki bi povzročali preobčutljivost, dražili kožo ali nanjo delovali korozivno, kot tudi ne tistih, ki delujejo korozivno na oči. V okolju je obstojna spojina in ni kancerogena ali mutagena. Identificirani pa so bili elementi, ki so lahko odgovorni za vezavo na DNA in proteine, za kar so verjetno odgovorne tautomerne oblike osnovne spojine. Domneva se, da je spojina varna za uporabo.

– **2-[hidroksi(fenil)metil]-5-metoksifenol**

Spojina izkazuje toksične učinke oz. ima reaktivne funkcionalne skupine, naslednja modula (Verhaar) pa jo klasificirata pod začetno toksičnost (razred I). V okolju je spojina obstojna in ni napovedano, da bi bila kancerogena ali mutagena. Pri določanju toksičnosti *in vivo* na podganjih mikronukleusih ni bilo določenih nobenih strukturnih elementov, ki bi jo nakazovali. Tautomerna oblika spojine lahko predstavlja Michaelov akceptor, medtem ko alifatska sekundarna alkoholna OH skupina med aromatskima obročema predstavlja mesto, dovzetno za nukleofilno substitucijo S_N2 .

– **2-benzoil-5-metoksifenil–oksidansulfonska kislina**

Spojina izkazuje toksične učinke oz. ima reaktivne funkcionalne skupine, Verhaar-jev modul pa jo označuje za spojino z nespecifično reaktivnostjo (razred III). Ni znanih informacij, ki bi lahko napovedale draženje kože in oči. Program jo je predvidel kot obstojno spojino. V strukturi najdemo tudi monoester žveplove kisline, ki je manj reaktiven kot keton ali aldehyd. Za možnost vezave na DNA in proteine so odgovorni tautomeri spojine.

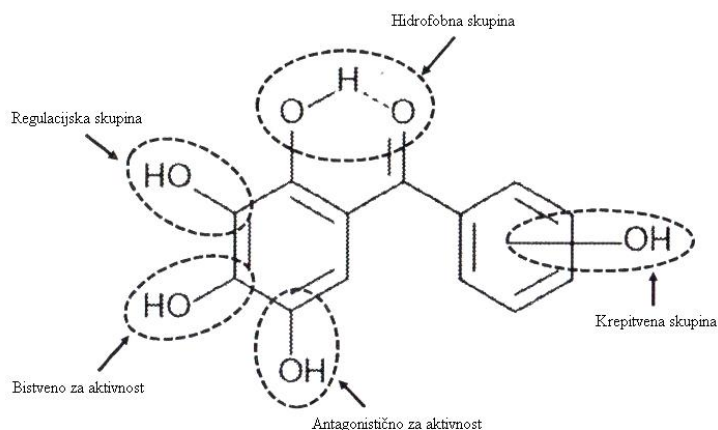
– **6-(2-benzoil-5-metoksifenoksi)-3,4,5-trihidroksitetrahydro-2H-piran-2-karboksilna kislina**

Spojina je klasificirana pod razred III, kar pomeni, da izkazuje toksične učinke oz. ima reaktivne funkcionalne skupine, naslednja modula (Verhaar) pa jo klasificirata pod začetno toksičnost (razred I). Med prisotnimi funkcionalnimi skupinami lahko v sami strukturi najdemo karbonilno skupino - keton, acetal, alkohol – sekundarni alkohol, 1,2- diol, eter, dialkilni eter, alkilarilni eter, karboksilno kislino ter aromatski obroč. Tudi tukaj Michaelov akceptor predstavlja tautomerna oblika spojine. Identificirali smo strukturni element – 1,3-dialkoksi benzen, ki je zaradi svoje strukture odgovoren za toksičnost na *in vivo* testih na podganjih mukronukleusih.

Pri sedmih od devetih spojin so bili identificirani strukturni elementi, ki so odgovorni za toksičnost na *in vivo* testih na podganjih mikronukleusih. Našli smo informacije s strani Evropske Komisije, kjer so preiskovali toksičnost različnih soli s programoma Toxtree in Lazar. Pri štirih od štirinajstih spojin so bili identificirani strukturni elementi za tovrsten tip toksičnosti pri Toxtree, medtem ko je Lazar označil te molekule kot nemutagene (77). Torej, glede na to, da je v prejšnjih verzijah slednji modul povzročal težave ter določil toksičnost snovem, ki v resnici niso bile, lahko dopustimo tudi možnost, da je bila ocenitev toksičnosti izbranih spojin napačna.

Mnogo *in vitro* študij nakazuje, da imajo UV-filtri, med njimi tudi BZ-3 (pri koncentraciji 84 µg/L), endokrine učinke. *In vitro* študije na humanih estrogenskih receptorjih alfa (hER α) nakazujejo estrogene, testiranja na humanih androgenih receptorjih (hAR) pa nakazujejo anti-androgene učinke, kjer pa BZ-1 (pri koncentraciji 0,49 mg/L) izkazuje še močnejšo vezavo na estrogene receptorje (78). Tako BZ-8 kot BZ-1 sta izkazovala estrogeno aktivnost na hER α (79) in tudi anti-androgeno aktivnost, vendar v manjši meri (80). Vendar so te koncentracije, ki so jim bili organizmi izpostavljeni pri laboratorijskih pogojih, veliko višje od do sedaj najvišjih zaznanih koncentracij v okolju in je izredno majhna možnost, da bi imele spojine pri zaznanih koncentracijah te učinke. Watanabe in sodelavci so analizirali tudi estrogene učinke BZ-3 in njegovih metabolitov, ki so jih pridobili z jetrnimi mikrosomi miši. BZ-3 predstavlja relativno majhno tveganje estrogene aktivnosti, je pa zelo pomembno vrednotiti estrogene učinke njegovih razgradnih produktov/metabolitov, saj lahko pozicija funkcionalne skupine odločilno vpliva na

endokrino delovanje (Slika 11). BZ-3 se bolje veže na receptor ER α kot pa ER β , medtem ko je pri večini metabolitov ravno obratno (BZ-1 in THB) (70).



Slika 11: Strukturni elementi, povezani z estrogeno in anti-androgeno aktivnostjo derivatov benzofenona.

Ena izmed študij je bila izvedena na kvasovkah, kjer so preučevali estrogeno aktivnost BZ-3, BZ-1 in BZ-8 in odkrili, da so vse tri spojine aktivne (81). Tako BZ-3 kot njegovi glavni metaboliti izkazujejo estrogeno aktivnost, in sicer v vrstnem redu BZ-1 > THB >> BZ-3 > BZ-8. Odkrili so, da BZ-8 in THB povzročata močno povečano proliferacijo celične linije MCF-7 (linija rakavih celic dojke), medtem ko estrogene aktivnosti BZ-8 niso zaznali na testih kvasovk (81). Iz tega lahko sklepamo, da test ni zanesljiv, saj daje dvoumne rezultate.

Zanimivo je, da so zaznali estrogeno aktivnost BZ-8 le na celični liniji MCF-7 pri koncentraciji 0,1 μ M in anti-androgeno delovanje le na celični liniji NIH3T3 pri koncentraciji več kot 100 μ M (67), v drugih študijah pa ne (70, 81). Ker BZ-8 v okolju ni nikoli prisoten v tolikšnih koncentracijah kot v študijah, anti-androgene aktivnosti BZ-8 realno ne more povzročiti. Rezultati *in vitro* testov na izoliranih estrogenskih receptorjih so včasih nasprotujoči, saj Watanabe in sodelavci poročajo, da se BZ-1 lažje veže na receptor ER β kot ER α (70), medtem ko so drugi ugotovili, da ima večjo vezavno afiniteto na ER α kot na ER β (67). Pri vseh študijah pa so poenoteni glede najvišje vezavne afinitete BZ-1 na estrogenske receptorje izmed 23 testiranih UV-filtrov pri ribah in ljudeh (67, 70, 78).

Iz strukturnih formul, zbranih v Prilogi VI, lahko opazimo, da je večina ostalih produktov polifenolov. Čeprav naj polifenoli ne bi negativno učinkovali na naše telo, v nekaterih primerih so celo zaželeni, poznamo marsikatere študije, katerih zaključki trdijo drugače. Dejstvo je, da polifenoli izkazujejo endokrine učinke predvsem preko vezave na

estrogenske pa tudi nekatere druge receptorje (82, 83). Kot lahko opazimo, so v strukturah napovedanih produktov prisotni tudi kateholi, ki spadajo v skupino polifenolov. Določeni kateholi lahko vodijo v prekomerno ekspresijo encimov, ki aktivirajo estrogene in/ali pomanjkljivo ekspresijo encimov, ki zavirajo aktivacijo estrogenov, slednje pa lahko poveča možnost nastanka raka dojke pri ženskah in raka prostate pri moških (84). Če katehol v telesu reagira z bakrovimi ioni, namreč nastanejo ROS (reaktivne kisikove zvrsti), ki aktivirajo encim peroksidazo (85). Kompleks katehol-bakrovi ioni lahko naprej reagira tudi z molekulo DNA. Reakcijski sistemi, ki vsebujejo bakrove ione, katehol in DNA lahko tvorijo DNA-bakro-hidroperoksi komplekse, ki povzročajo nastanek hidroksilnih radikalov ter singletnega kisika, kar povzroča spremembe v strukturi DNA (86). Nekateri polifenoli (kofeinska kislina) izkazujejo tudi kancerogene in genotoksične učinke (testiranja opravljena na podganah in miših) pri 2 % koncentracijah, dodanih v hrano. Možno je, da so genotoksične učinke na *in vitro* testih pripisali visokim koncentracijam, pri katerih lahko polifenoli postanejo prooksidativni (88). Odkrili so tudi, da testirani antioksidativni polifenoli delujejo citotoksično na humano celično linijo HL-60 (89). Med ostalimi strukturami so prisotni tudi benzofenoni, za katere je že kar nekaj časa znano, da povzročajo alergijske reakcije, lahko pa povzročijo tudi nastanek ROS (87).

Pri vseh izbranih spojinah, ki smo jih testirali, smo ugotovili, da vsebujejo funkcionalne skupine, ki se lahko potencialno vežejo s proteini in ostalimi pomembnimi biološkimi molekulami, in so iz tega zornega kota potencialno nevarni. Moramo pa omeniti, da so pri večini študij, izvedenih v laboratorijih, uporabljali spojine v veliko večjih koncentracijah, kot pa smo jim lahko izpostavljeni v okolju neposredno. Kroes-ovo odločitveno drevo je zato tudi odločilo, da so BZ-3 in njegovi razgradni produkti/metaboliti nenevarni za okolje in ljudi ob njihovi izpostavitvi, saj jim dnevno nismo izpostavljeni v koncentracijah, višjih od 1,5 µg/dan. Ker pa drugih razgradnih produktov in metabolitov v literaturi nismo našli, saj jih nikjer niso zaznali, primerjave napovedane toksičnosti teh spojin z eksperimentalnimi podatki nismo mogli izvesti.

Primerjava napovedanih potencialnih alergenskih učinkov BZ-3 se ne sklada z raziskavami in študijami, saj program ni ustrezno napovedal potencialne preobčutljivosti kože. Žal pa Toxtree ne omogoča ocenitve oz. napovedi endokrine aktivnosti ali celo estrogenega in androgenega delovanja, saj večino zgoraj omenjenih spojin izkazuje estrogene in anti-androgene učinke.

5 SKLEP

Razširjena uporaba BZ-3 v različnih izdelkih za osebno nego, vključno s kremami za zaščito pred soncem, ter pogosto odkrivanje BZ-3 v vodnem okolju in živih organizmih, so vzbudile zaskrbljenost glede ekoloških tveganj te spojine. Z diplomsko nalogo smo *in silico* ovrednotili razgradnjo in metabolizem benzofenona-3 ter toksičnih učinkov njegovih produktov. Razgradnjo benzofenona-3 v okolju smo napovedali s programom CRAFT Explorer, medtem ko smo se za napoved metabolizma odločili za program Meteor Nexus. Toksične učinke BZ-3 ter ostalih izbranih produktov smo izvedli s programom Toxtree.

- Programa CRAFT Explorer in Meteor Nexus sta dokaj ustrezna, saj sta pravilno napovedala nastanek dveh večjih razgradnih produktov in metabolitov benzofenona-3 BZ-1 in BZ-8 ter še dveh, ki ju najdemo v sledovih, medtem ko ostalih napovedanih produktov nismo zasledili nikjer v literaturi.
- Toxtree je napovedal potencialno kancerogenost in mutagenost spojin, česar pa z literaturnimi podatki ne moremo potrditi. Neustrezna pa je bila napoved *in vitro* mutagenosti formaldehida na *S. typhimurium*, kot tudi preobčutljivostnih reakcij kože ob stiku z benzofenonom-3; kot vemo, je le-ta namreč znana spojina, ki povzroča kontaktne alergije.
- Predvidevamo, da imajo napovedani produkti, ki so hidroksilirani, zelo podobne učinke tistim, ki jih ima BZ-3 in verjetno izkazujejo endokrino aktivnost ter generirajo ROS. V bodoče bi bilo zato potrebno oceniti tudi endokrino aktivnost napovedanih razgradnih produktov oziroma metabolitov, tako *in silico* kot tudi *in vitro*.

6 LITERATURA

- (1) Chang C, Murzaku E C, Penn L, Abbasi N R, Davis P D, Berwick M, and Polsky D: More Skin, More Sun, More Tan, More Melanoma. American Journal of Public Health: November 2014, Vol. 104, No. 11, 92-99.
- (2) Kristl J: Podiplomsko strokovno izobraževanje Koža – sonce – zdravje – lepota; 2004; Ljubljana; 111-122.
- (3) Chisvert A, Salvador A: Analysis of Cosmetic Products; 2007; Elsevier B. V.; 83-127.
- (4) Yagura T, Makita K, Yamamoto H, Menck C F M, Schuch A P: Biological Sensors for Solar Ultraviolet Radiation: Sensors (Basel) 2011; 11(4): 4277–4294.
- (5) Schlossman, M. L.: The Chemistry and Manufacture of Cosmetics 2002; 1037-1066.
- (6) Barel, A. O., Paye, M., Maibach, I. H.: Handbook of Cosmetic Science and Technology 2009; 299-311.
- (7) Benzofenon: <http://www.safecosmetics.org/get-the-facts/chemicals-of-concern/benzophenone/>, dostop: julij 2015
- (8) Svobodova A, Walterova D, Vostalova J: Ultraviolet light induced alteration to the skin, Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006, 150(1): 25–38.
- (9) Maverakis E, Miyamura Y, Bowen M P, Correa G, Ono Y, Maverakis H G: Light, Including Ultraviolet: J Autoimmun. Author manuscript 2010 May; 34(3): 247–257.
- (10) Simmons J V: The Science of Cosmetics: Science and the Beauty Business, Second Edition 1995; 144-147.
- (11) Gago-Ferrero P, Diaz-Cruz M, Barceló D: An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2012; 404: 2597-2610.
- (12) European Commission: http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=28809, dostop: junij 2015
- (13) SCCS Opinion ob Benzophenone-3, European Commission (2006).

- (14) SCCS:
http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_159.pdf,
 dostop: junij 2015
- (15) Benzofenon-3:
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/oxybenzone#section=Top>, dostop:
 junij 2015
- (16) Tovar-Sánchez A, Sánchez-Quiles D, Basterretxea G, Benedé J L, Chisvert A, Salvador A, Moreno-Garrido I, Blasco J: Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters. *Plos one* (2013)
- (17) Kameda Y, Kimura K, Miyazaki M: Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution* (2011)
- (18) Cuderman P, Heath E: Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Anal Bioanal Chem.* (2007)
- (19) Kaiser D, Wappelhorst O, Oetken M, Oehlmann J: Occurrence of widely used organic UV filters in lake and river sediments. *Environ. Chem.* (2012)
- (20) Kim S, Jung D, Kho Y, Choi K: Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)—A twogeneration exposure study, *Aquatic Toxicology* (2014)
- (21) Emnet P, Gaw S, Northcott G, Storey B, Graham L: Personal care products and steroid hormones in the Antarctic coastal environment associated with two Antarctic research stations, McMurdo Station and Scott Base. *Environmental Research* (2014)
- (22) Sieratowicz A, Kiaser D, Behr M, Oetken M, Oehlmann J: Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia Magna*. *Journal of Environmental Science and Health* (2011), Part A, 46:12, 1311-1319
- (23) Maier T, Korting H C: Sunscreens – Which and What for. *Skin Pharmacol Physiol* (2005); 18: 254-262
- (24) Calafat A m, Wong L Y, Ye X, Reidy J A, Needham L L: Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environ Health Perspect.* (2008); 116(7): 893-897

- (25) Burnett M E, Wang S Q: Current sunscreen controversies: a critical review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* (2011)
- (26) Hanson K M, Gratton E, Bardeen C J: Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radic Biol Med.* (2006); 41(8): 1205-12
- (27) Vilela F M, Fonseca Y M, Jabor J R, Vicentini F T, Fonseca M J: Effect of ultraviolet filters on skin superoxide dismutase activity in hairless mice after a single dose of ultraviolet radiation. *Eur J Pharm Biopharm.*(2012); 80(2): 387-92
- (28) Schlumph M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, et. al.: Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update. *Toxicology 205* (2004) 113-122
- (29) Robison S H, et. al. Assessment of the in vivo genotoxicity of 2-hydroxy 4-methoxybenzophenone. *Environ Mol Mutagen.*(1994); 23(4): 312-7
- (30) Vela-Soria F, Jiménez-Díaz I, Rodríguez-Gómez R, Zafra-Gómez A et. al.: Determination of benzophenones in human placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta.* (2011); 1848-1855
- (31) Philippat C, et. al. Exposure to phthalates and phenols during pregnancy and offspring size at birth. *Environ Health Perspect.* (2012); 120(3): 464-70.
- (32) In silico: <http://www.taverna.org.uk/introduction/what-is-in-silico-experimentation/>, dostop: junij 2015
- (33) Molecular Networks: <http://www.molecular-networks.com/products/craft>, dostop: junij 2015
- (34) QSAR napovedna orodja toksičnosti: <http://omictools.com/qsar-toxicity-predictions-c1287-p1.html>, dostop: junij 2015
- (35) Benfenati E, Manganaro A, Gini G: VEGA-QSAR:AI inside a platform for predictive toxicology. *CEUR Workshop* (2013); Volume 1107; 21-28
- (36) CATALOGIC: <http://oasis-lmc.org/products/software/catalogic.aspx>, dostop: junij 2015
- (37) UMBBD-PPS: <http://sivabio.50webs.com/pps.htm>, dostop: junij 2015
- (38) T'jollyn H, Boussery k, Mortishire-Smith R J, Coe K, De Boeck B, Van Bocxlaer J F, Mannens G: Evaluation of Three State-of-the-Art Metabolite Prediction Software Packages (Meteor, MetaSite, and StarDrop) through Independent and Synergistic Use. *Drug Metabolism and Disposition* (2011); 39: 2066-2075

- (39) Pelander A, Tyrkkö E, Ojanperä I: *In Silico* Methods In Prediction Of Drug Metabolism, Mass Fragmentation, and Chromatographic Behavior. *Rapid Commun Mass Spectrom.* (2009); 23(4): 506-14
- (40) Kirchmair J, Willimson M J, Tyzack J D, Tan L, Bond P J, Bender A, Glen R C: Computational Prediction of Metabolism: Sites, Products, SAR, P450 Enzyme Dynamics, and Mechanisms. *Journal of Chemical Information and Modeling* (2012); 5: 617–648.
- (41) Kham F, Sajid M, Sameotra S S: In Silico Approach for the Bioremediation of Toxic Pollutants. *J Pet Environ Biotechnol* (2013); 4:6.
- (42) Dearden J C et. al.: The Development and Validation of Expert System for PRedicting Toxicology. *ALTA* (1997); 25: 223-252.
- (43) Molecular Networks: http://www.molecular-networks.com/files/docs/craft/CRAFT_Editor-v.1.0-user_manual.pdf, doston: junij 2015
- (44) Ellis LBM, Roe D, Wackett LP (2006) "The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: The First Decade," *Nucleic Acids Research* 34: D517-D521
- (45) OECD: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdquantitativestructure-activityrelationshipsprojectqsars.htm>, doston: junij 2015
- (46) OECD: <http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/introductiontoquantitativestructureactivityrelationships.htm>, doston: junij 2015
- (47) Lhasa Limited: <http://www.lhasalimited.org/products/meteor-nexus.htm>, doston: junij 2015
- (48) Meteor Nexus: <http://www.lhasalimited.org/Public/Library/Lhasa%20Library/Brochures/Meteor%20Nexus.pdf>, doston: junij 2015
- (49) Parkinson A: Klaassen C: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, Biotransformation Of Xenobiotics, Eighth Edition (2013)
- (50) Penner N, Woodward C, Prakash C: Drug Metabolizing Enzymes And Biotransformation Reactions, ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development, First Edition (2012)
- (51) Joint Research Centre, https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/qsar_tools/toxtree, doston: junij 2015
- (52) Toxtree: <http://toxtree.sourceforge.net/>, doston: junij 2015

- (53) Molecular Networks: <http://www.molecular-networks.com/companyprofile>, dostop: junij 2015
- (54) https://en.wikipedia.org/wiki/Simplified_molecular-input_line-entry_system, dostop: junij 2015
- (55) SMILES: <http://metamolecular.com/cheminformatics/smiles/>, dostop: junij 2015
- (56) Daylight: <http://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.smiles.html>, dostop: junij 2015
- (57) Lhasa Limited: <http://www.lhasalimited.org/about-us.htm>, dostop: junij 2015
- (58) SMARTCyp: <http://www.farma.ku.dk/smartcyp/about.php>, dostop: junij 2015
- (59) Daylight: <http://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.smarts.html>, dostop: junij 2015
- (60) ChemOffice Professional: https://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/ChemOffice/ChemOfficeProfessional/, dostop: junij 2015
- (61) ChemDraw: <https://en.wikipedia.org/?title=ChemDraw>, dostop: junij 2015
- (62) ChemDraw: <http://scistore.cambridgesoft.com/ScistoreProductPage.aspx?ItemID=8168>, dostop: junij 2015
- (63) Toxtree: http://sourceforge.net/projects/toxtree/files/toxtree/Toxtreev.2.6.6/Toxtree_user_manual.pdf/download, dostop: junij 2015
- (64) Liu Y S, Ying G G, Shareef A, Kookana R S: Biodegradation of the ultraviolet filter benzophenone-3 under different redox conditions. *Environ Toxicol Chem* (2012); 31(2): 289-95.
- (65) Manasfi T, Storck V, Ravier S, demelas C, Coulomb B, Boudenne J L: Degradation products of Benzophenone-3 in Chlorinated Seawather Swimming Pools. *Environ Sci Technol* (2015)
- (66) Beel R, Lütke Eversloh C, Ternes T A: Biotransformation of the UV-filter Sulisobenzone: Challenges for the Identification of Transformation Products. *Environ Sci Technol* (2013); 47(13): 6819-28.
- (67) Kim S, Choi K: Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. *Environ Int.* (2014); 70: 143-57.
- (68) Ilaš J: Metabolizem zdravilnih učinkoiv (2009), predavanje

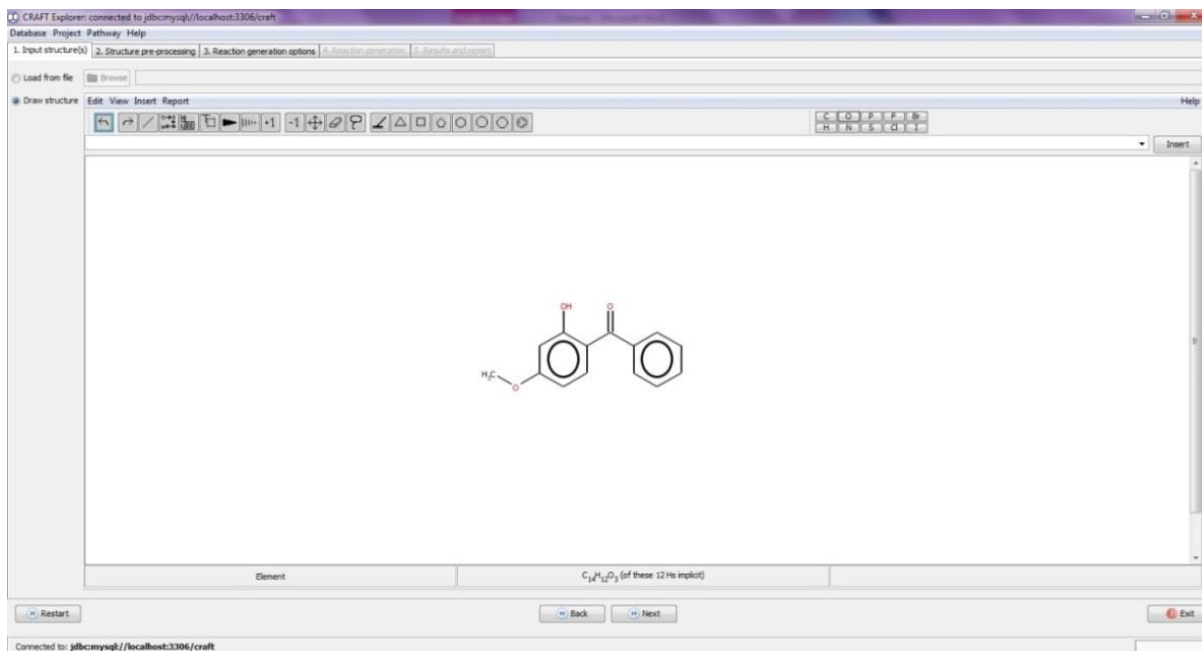
- (69) Wang L, Kannan K: Characteristic Profiles of Benzophenone-3 and its Derivatives in Urine of Children and Adults from the United States and China. *Environ Sci Technol* (2013); 47(21): 12532-8.
- (70) Watanabe Y et. al.: Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicol Appl Pharmacol* (2015); 282(2): 119-28.
- (71) Dillon D, Comber R: The effectiveness of Salmonella strains TA1000, TA102 and TA104 for detecting mutagenicity of some aldehydes and peroxides. *Mutagenesis* (1998); Vol 13 (1): 19-26.
- (72) Spijker G T, et. al.: Anaphylaxis caused by topical application of a sunscreen containing benzophenone-3. *Contact Dermatitis* (2008); 59: 248-249
- (73) DeLeo V A, Suarez S M, Maso M J.: Photoallergic contact dermatitis. Results of photopatch testing in New York, 1985 to 1990. *Arch Dermatol* (1992); 128(11): 1513-8.
- (74) Wakefield J C: Health Protection Agency, Formaldehyde toxicological overview (2008), Version 1.
- (75) IARC (International Agency for Research on Cancer) Formaldehyde. Lyon, France: IARC; 2006a. [June 10, 2013]. pp. 39–325. (Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans Vol 88).
- (76) National Research Council Washington (DC) of National Academies Press (US): Review the Formaldehyde Assessment in the National Toxicology Program 12th Report on Carcinogens Sept (2014).
- (77) http://cordis.europa.eu/result/rcn/148614_en.html, dstop: julij 2015
- (78) Maipas S, Nicolopoulou-Stamati P: Sun lotion chemicals as endocrine disruptors. *Hormones* (2015); 14(1): 32-46.
- (79) Kerdivel G, Le Guevel R, Habauzit D, BrionF, Ait-Aissa S, Pakdel F: Estrogenic potency of benzophenone UV filters in breast cancer cells: proliferative and transcriptional activity substantiated by docking analysis. *PLoS One* (2013); 8(4): e60567
- (80) Kawamura Y, Mutsuga M, Kato T, Iida M, Tanamoto K: Estrogenic and anti-androgenic activities of benzophenones in human estrogen and androgen receptor

- mediated mammalian reporter gene assays. *Journal of Health Science* (2005); 51(1); 48-54
- (81) Takatori S et. al.: Estrogenicity of Metabolites of Benzophenone Derivates Examined by a Yeast Two-Hybrid Assay. *Journal of Health Science* (2003): 49(2): 91-98.
- (82) IARC (International Agency for Research on Cancer) Benzophenone (2012); 285-304.
- (83) Hazard assessment of benzophenone: <http://www.meti.go.jp/english/report/downloadfiles/gED0305e.pdf>, dostop: julij 2015.
- (84) Cavalieri E et. al.: Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications of biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer* (2006); Vol. 1766, Issue 1; 63-78.
- (85) Chen C, Ahmed I, Fruk L: Reactive oxygen species production by catechol stabilized copper nanoparticles. *Nanoscale* (2013); 5(23); 11610-4.
- (86) Schwiegert Nina et. al.: DNA degradation by the mixture of copper and catechol is caused by DNA-copper-hydroperoxo complexes, probably DNA-Cu(I)OOH. (*Environmental and Molecular Mutagenesis* (2000); Vol. 36, Issue 5, 5-12.
- (87) Ngan V: Allergy to benzophenones (2005). Allergy to benzophenones: <http://www.dermnetnz.org/dermatitis/benzophenone-allergy.html>, dostop: julij 2015
- (88) Mennen L I, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A: Risks and safety of polyphenol consumption. *American Society for Clinical Nutrition* (2005); Vol. 81 No. 1, 3265-3295.
- (89) Sergediene E et. al.: Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationship. *FEBS Letters* 462 (1999); 392-396

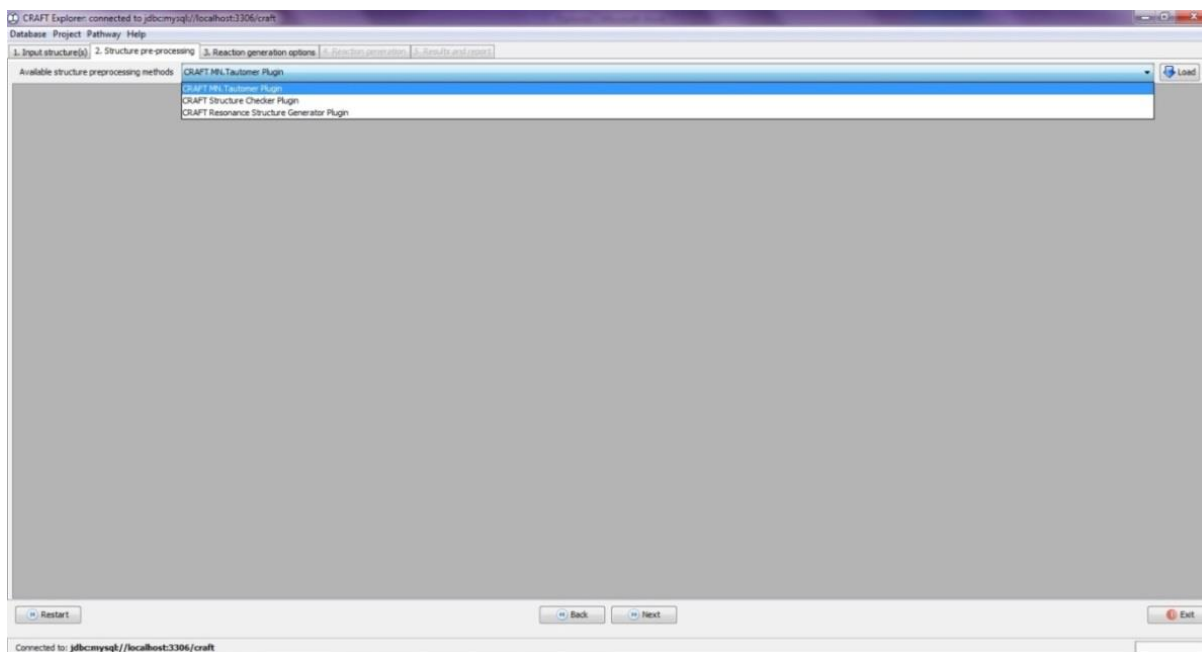
7 PRILOGA I

Postopek dela s programom CRAFT Explorer.

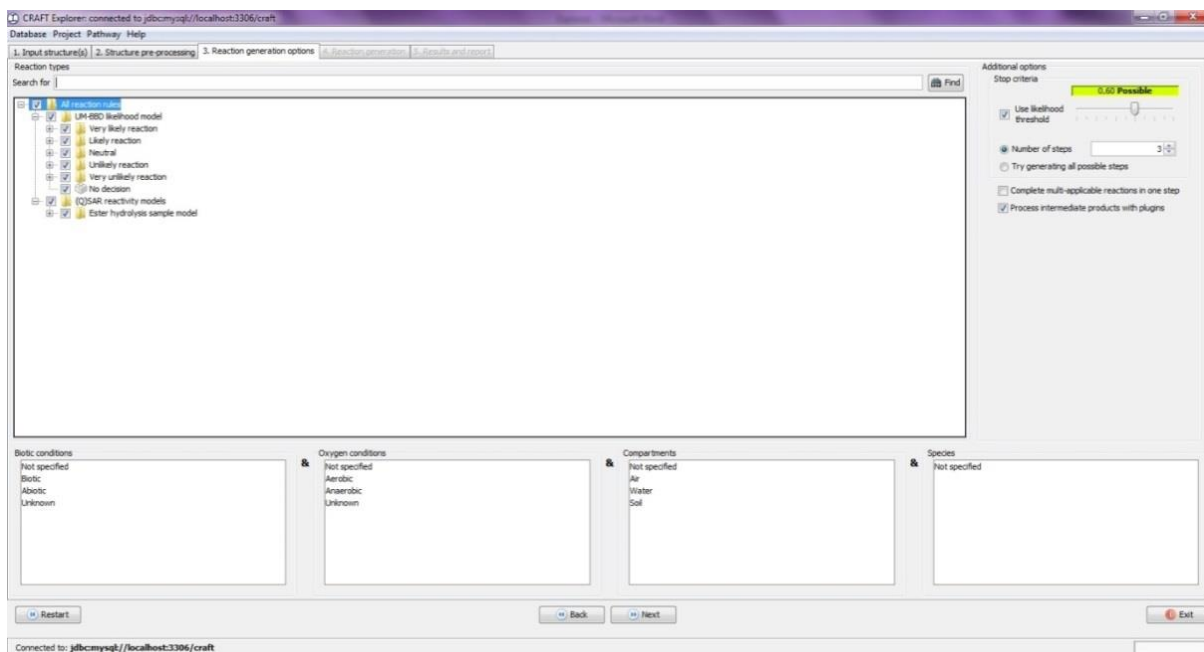
Slika Ia



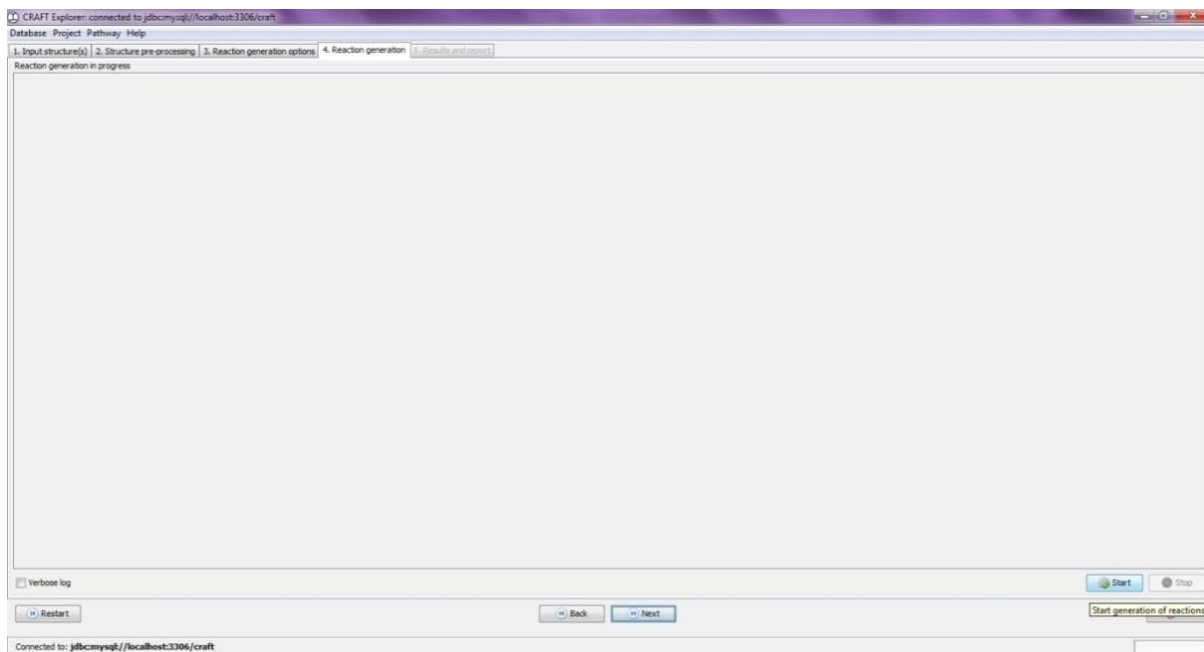
Slika Ib



Slika Ic



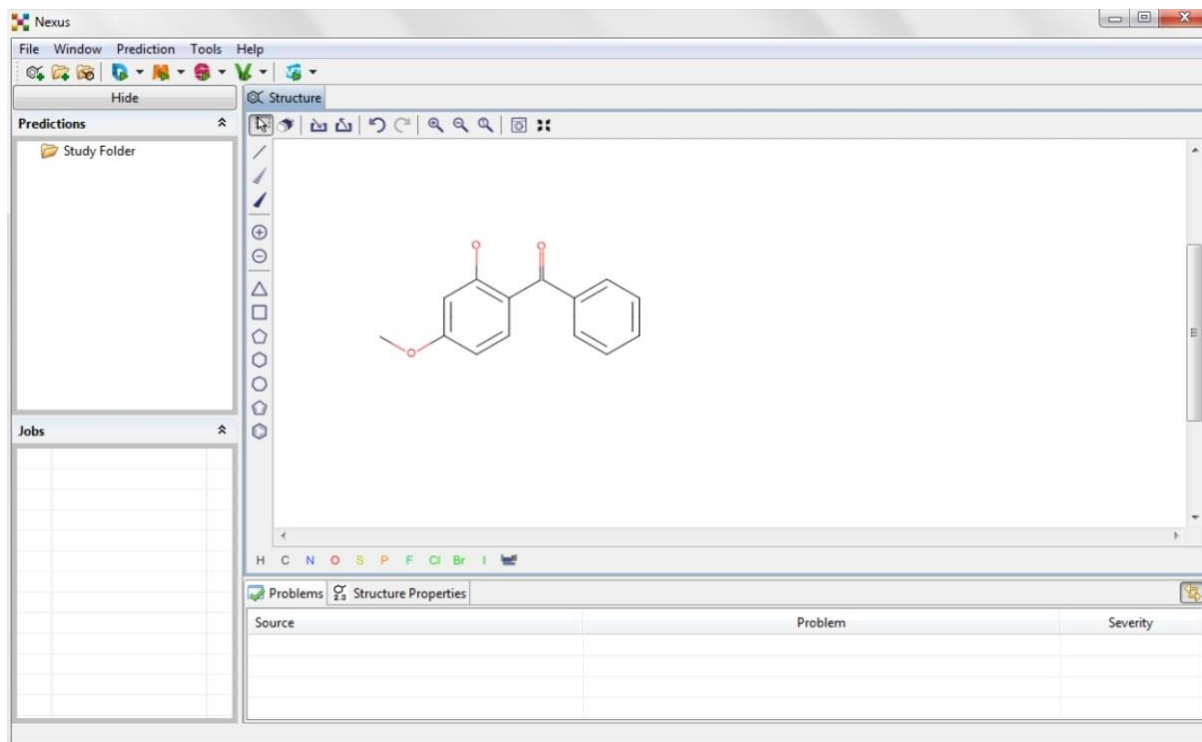
Slika Ič



8 PRILOGA II

Postopek dela s programom Meteor.

Slika IIa



Slika IIb

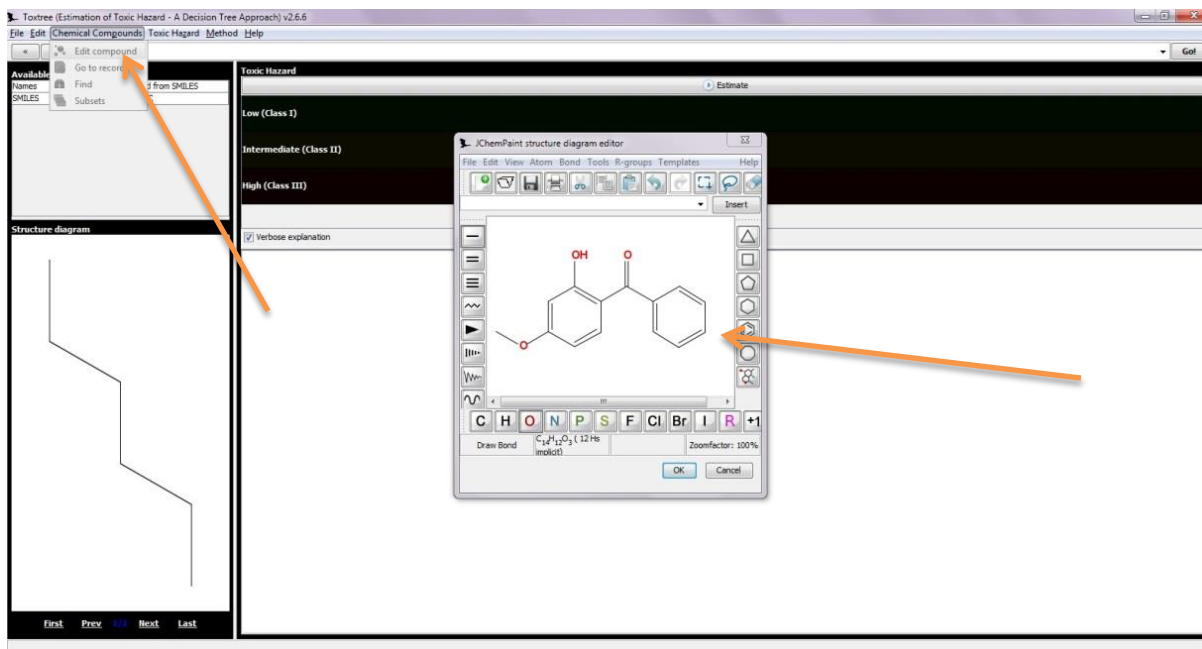
The screenshot shows the 'Meteor prediction setup - Meteor Prediction' window in Nexus. The window is divided into several sections: 'Knowledge Bases', 'Species', 'Processing Options', 'Biotransformations', and 'Structure Properties'. A black arrow points to the 'EQUIVOCAL' dropdown menu in the 'Processing Options' section. The 'Biotransformations' section is expanded, showing various reaction types like Redox, Oxidation, Reduction, Non-Redox, etc. The 'Structure Properties' section at the bottom shows a table of properties and their values.

Fact/Property	Override	Value
LogP	<input type="checkbox"/>	2.14
LogKp	<input type="checkbox"/>	-1.88
Average Molecular Mass	<input type="checkbox"/>	78.11

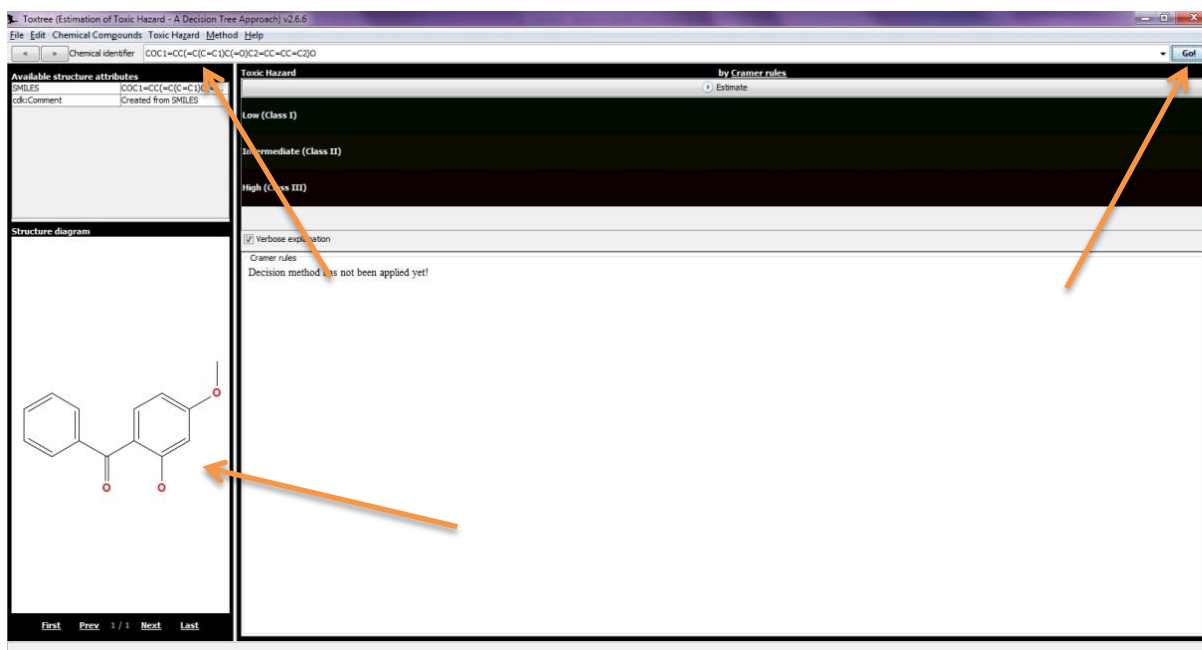
9 PRILOGA III

Postopek dela s programom Toxtree.

Slika IIIa



Slika IIIb



Slika IIIc

The screenshot shows the Toxtree v2.6.6 interface. The main window displays the chemical structure of 4-methoxyacetophenone (COc1ccc(cc1)C(=O)c2ccccc2) and its classification as High (Class III). A dialog box titled 'Select a tree' is open, showing a list of available decision trees. The 'Cramer rules' option is selected. The dialog also includes a 'References' section with three entries:

1. Cramer G. M., R. A. Ford, R. L. Hall. Estimation of Toxic Hazard - A Decision Tree Approach. J. Cosmet. Toxicol., Vol.16, pp. 255-276, Pergamon Press, 1978
2. I. C. Munro, R.A. Ford, E. Kennepohl, and J.G. Sprenger, Correlation of structural class with No-Observed-Effect Levels: A proposal for establishing a threshold of concern, Food Chem. Toxicol. 34 (1996), pp. 829-867.
3. Patlewicz G, Jelazkova N, Safford RJ, Worth AP, Aleksiev B. (2008) An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. SAR QSAR Environ Res. 19(5-6):495-524.

Slika IIIč

The screenshot shows the Toxtree v2.6.6 interface. The main window displays the chemical structure of 4-methoxyacetophenone and its classification as High (Class III). The 'Estimate' dialog box is open, showing a list of Cramer rules (Q1-Q33) and their results for the chemical structure. The results are as follows:

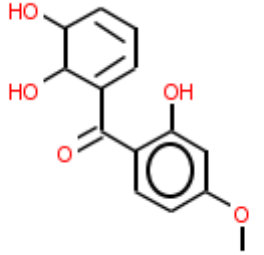
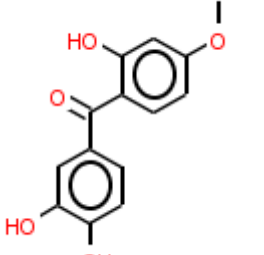
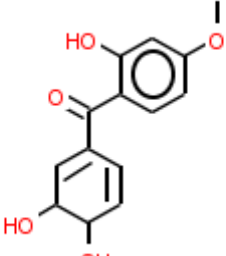
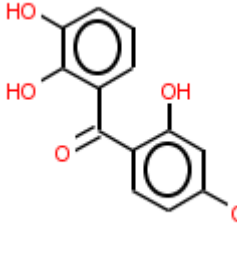
- Q1. Normal constituent of the body No
- Q2. Contains functional groups associated with enhanced toxicity No
- Q3. Contains elements other than C,H,O,N,divalent S No
- Q5. Simply branched aliphatic hydrocarbon or a common carbohydrate No
- Q6. Benzene derivative with certain substituents No
- Q7. Heterocyclic No
- Q16. Common terpene No
- Q17. Readily hydrolysed to a common terpene No
- Q19. Open chain No
- Q23. Aromatic Yes
- Q27. Rings with substituents Yes
- Q28. More than one aromatic ring Yes
- Q29. Readily hydrolysed No
- Q33. Has sufficient number of sulphate or sulphamate groups No

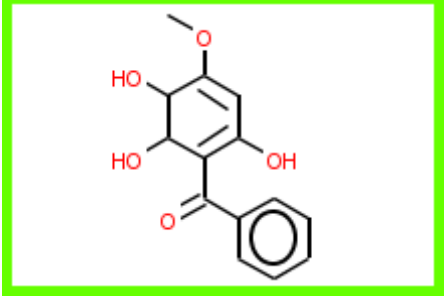
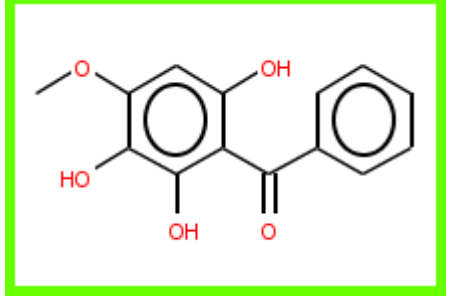
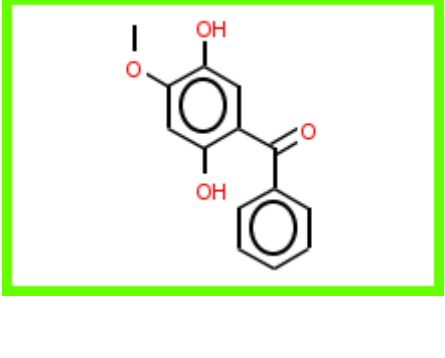
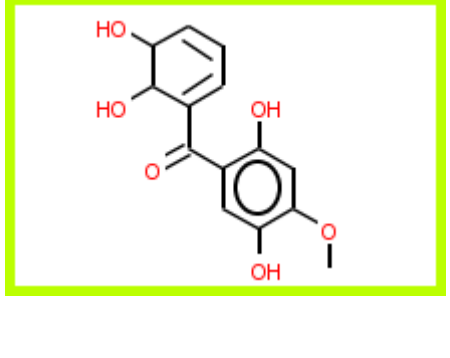
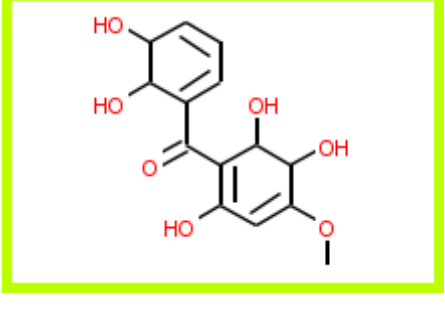
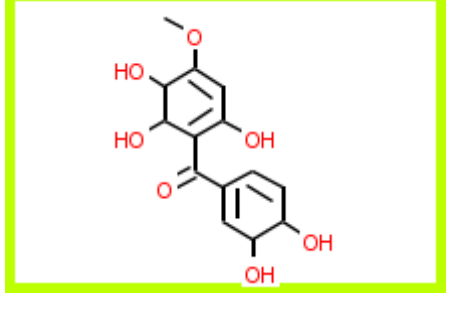
The final classification is High (Class III).

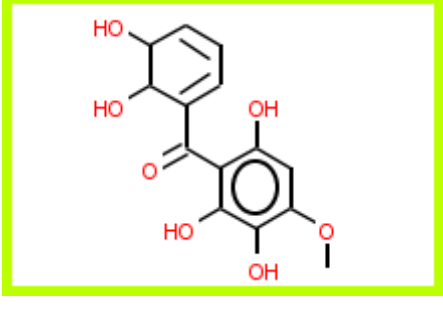
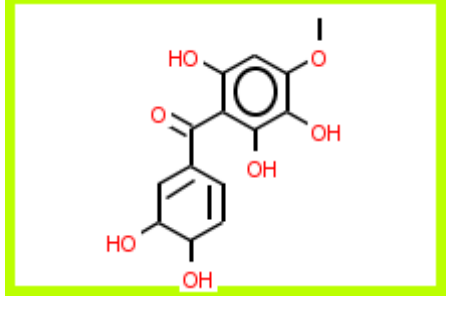
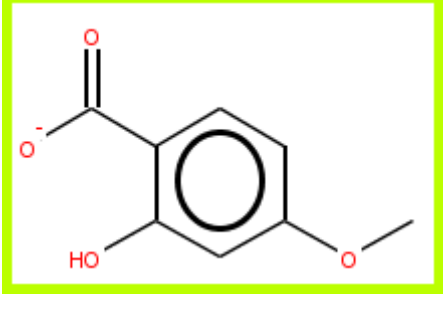
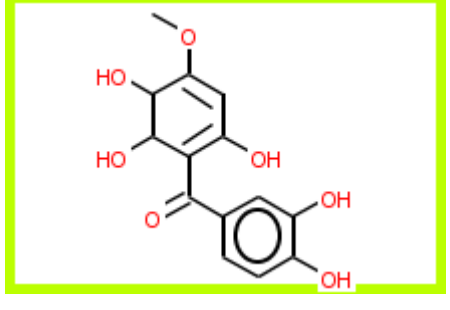
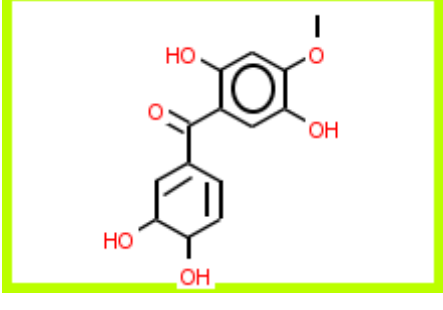
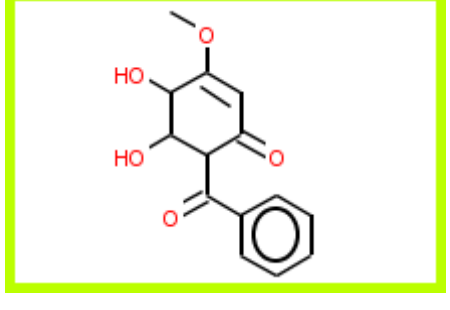
10 PRILOGA IV

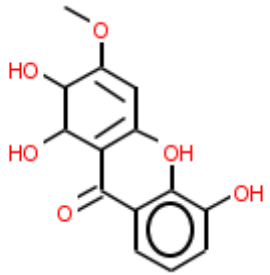
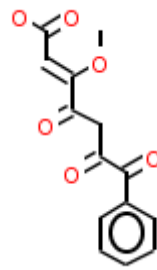
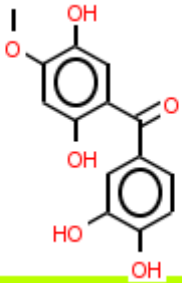
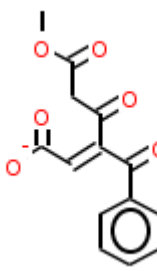
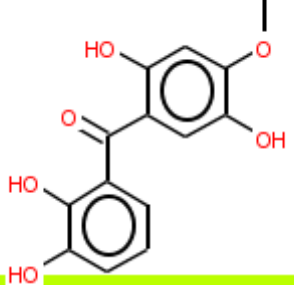
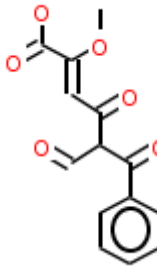
Prikazane so strukturne formule napovedanih produktov, v stolpcu zraven desno pa so podane še informacije o verjetnosti njihovega nastanka, SMILES kode ter najkrajša pot nastanka.

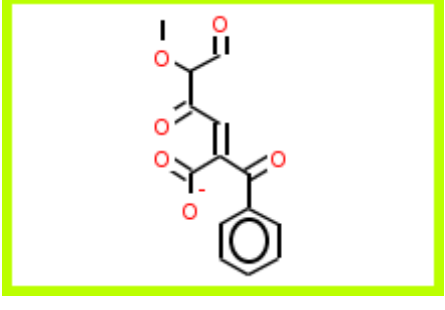
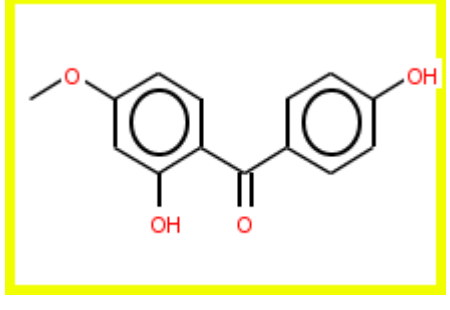
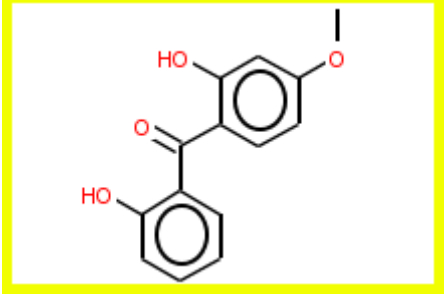
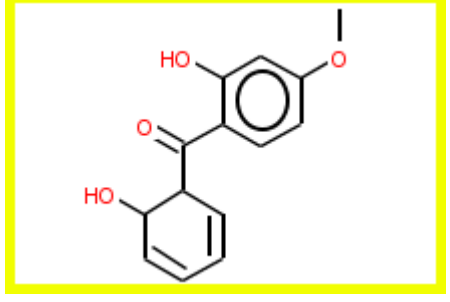
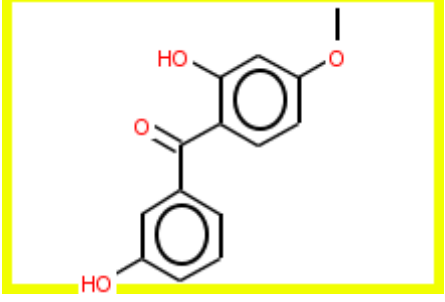
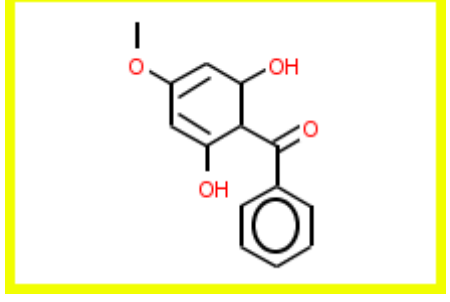
Preglednica VIII: Spojine, napovedane s programom CRAFT Explorer, ter informacije o njihovem nastanku.

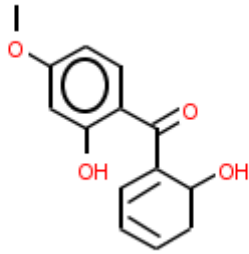
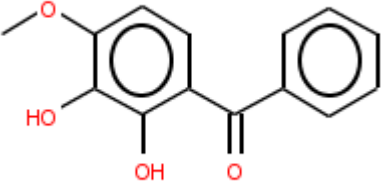
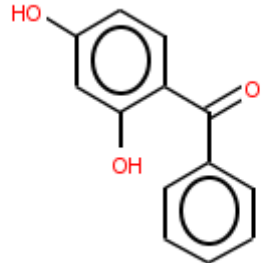

Napovedane spojine	Informacije	Napovedane spojine	Informacije
	<p><u>CRAFT ID:</u> P20</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 80 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=CC(=C(O)C=1)C(=O)C2=CC=CC(O)C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P20</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P27</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 80 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=CC(=C(O)C=1)C(=O)C2=CC(O)=C(O)C=2</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0005 > P27</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P25</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 80 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=CC(=C(O)C=1)C(=O)C2=CC(O)C(O)C=2</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P25</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P22</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 80 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=CC(=C(O)C=1)C(=O)C2=CC=C(O)C=2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0005 > P22</p>

Napovedane spojine	Informacije	Napovedane spojine	Informacije
	<p><u>CRAFT ID:</u> P31</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 80 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC(O)=C(C(=O)C1=CC=CC=C1)C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P31</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P32</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 80 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=2C=C(O)C(C(=O)C1=CC=CC=C1)=C(O)C=2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0005 > P32</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P36</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 80 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=C(O)C(=CC=1(O))C(=O)C2=CC=CC=C2</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0064 > P32</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P24</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC1=CC(O)=C(C(=C1(O))C(=O)C2=CC=CC(O)C2(O))C(=O)C2=CC=CC(O)C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P20 > UM-BBD bt0064 > P24</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P21</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC(O)=C(C(=O)C1=CC(O)=C(O)C1(O))C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P31 > UM-BBD bt0367 > P21</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P26</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC(O)=C(C(=O)C1=CC(O)=C(O)C1(O))C(=O)C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P25 > UM-BBD bt0367 > P20</p>

Napovedane spojine	Informacije	Napovedane spojine	Informacije
	<p><u>CRAFT ID:</u> P23</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC(O)=C(C(=O)C1=CC=CC(O)C1(O))C(O)=C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P20 > UM-BBD bt0005 > P23</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P28</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC(O)=C(C(=O)C1=CC(O)C(O)C1)C(O)=C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P25 > UM-BBD bt0005 > P28</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P29</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=CC(C(=O)[O-])C(O)=C1</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P25 > UM-BBD bt0040 > P29</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P34</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC(O)=C(C(=O)C1=CC(O)C(O)C1)C(O)C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P31 > UM-BBD bt0005 > P34</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P30</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC1=CC(O)=C(C(=O)C2=CC(O)C(O)C2)C(O)=C1</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P25 > UM-BBD bt0064 > P30</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P35</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC(=O)C(C(=O)C1=CC(O)C(O)C1)C(O)C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P31 > UM-BBD bt0044 > P35</p>

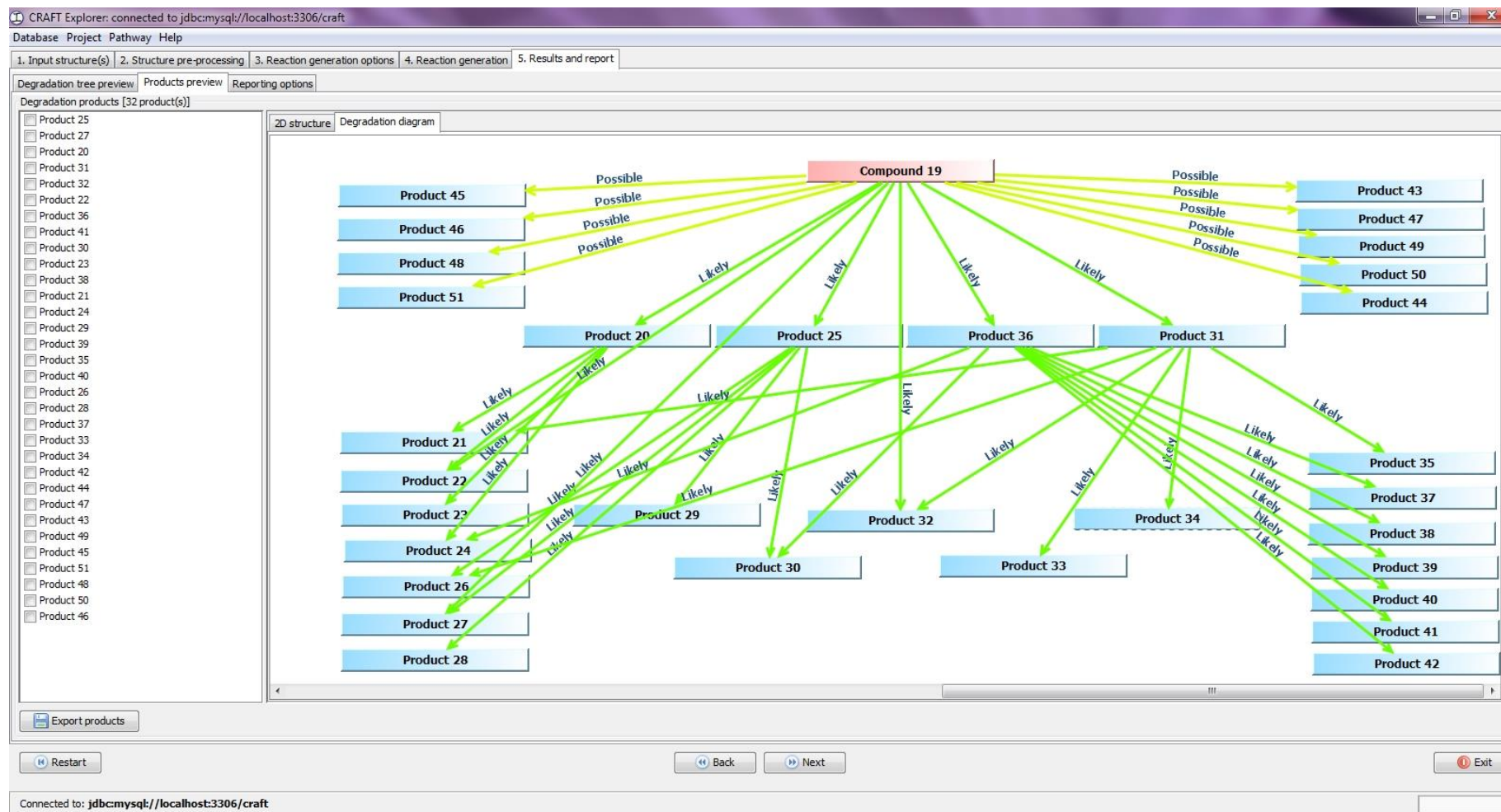
Napovedane spojine	Informacije	Napovedane spojine	Informacije
	<p><u>CRAFT ID:</u> P33</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC(O)=C(C(=O)C1=CC=CC(O)=C1)C(O)C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0367 > P31 > UM-BBD bt0005 > P33</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P37</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC(=CC(=O)[O-])C(=O)CC(=O)C(=O)C=1C=CC=CC=1</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0064 > P36 > UM-BBD bt0357 > P37</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P38</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=C(O)C(=CC=1(O))C(=O)C=2C=CC(O)=C(O)C=2</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0064 > P36 > UM-BBD bt0005 > P38</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P41</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC(=O)CC(=O)C(=CC(=O)[O-])C(=O)C=1C=CC=CC=1</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0064 > P36 > UM-BBD bt0297 > P41</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P39</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=C(O)C(=CC=1(O))C(=O)C=2C=CC=C(O)C=2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0064 > P36 > UM-BBD bt0005 > P39</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P42</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC(=CC(=O)C(C=O)C(=O)C=1C=CC=CC=1)C(=O)[O-]</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0064 > P36 > UM-BBD bt0297 > P42</p>

Napovedane spojine	Informacije	Napovedane spojine	Informacije
	<p><u>CRAFT ID:</u> P40</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 64 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC(C=O)C(=O)C=C(C(=O)[O-])C(=O)C=1C=CC=CC=1</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0064 > P36 > UM-BBD bt0297 > P40</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P43</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC1=CC=C(C(O)=C1)C(=O)C=2C=CC(O)=CC=2</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0013 > P43</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P44</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC1=CC=C(C(O)=C1)C(=O)C=2C=CC=CC=2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0011 > P44</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P47</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC1=CC=C(C(O)=C1)C(=O)C2C=CC=CC2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0021 > P47</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P45</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC1=CC=C(C(O)=C1)C(=O)C=2C=CC=C(O)C=2</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0012 > P45</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P48</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC=1C=C(O)C(C(O)C=1)C(=O)C=2C=CC=CC=2</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0021 > P48</p>

Napovedane spojine	Informacije	Napovedane spojine	Informacije
	<p><u>CRAFT ID:</u> P46</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC1=CC=C(C(O)=C1)C(=O)C2=CC=CCC2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0021 > P46</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P49</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>COC2=CC=C(C(=O)C=1C=CC=CC=1)C(O)=C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0014 > P49</p>
	<p><u>CRAFT ID:</u> P50</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>O=C(C=1C=CC=CC=1)C2=CC=C(O)C=C2(O)</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0023 > P50</p>		<p><u>CRAFT ID:</u> P51</p> <p><u>Verjetnost nastanka:</u> 60 %</p> <p><u>SMILES:</u> <chem>C=O</chem></p> <p><u>CRAFT najkrajša pot:</u> BZ-3 > UM-BBD bt0023 > P50</p>

11 PRILOGA V

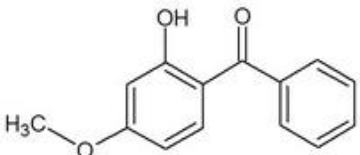
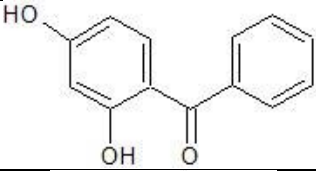
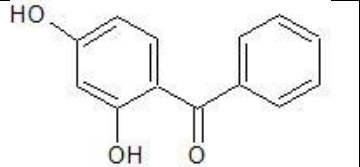
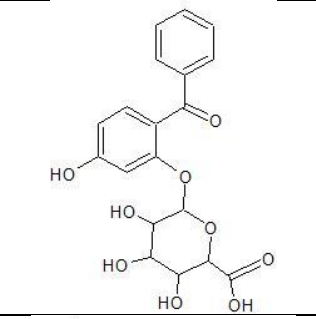
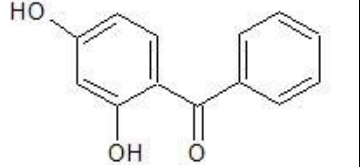
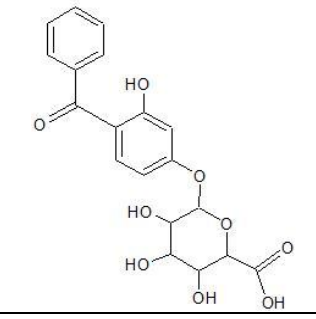
Slika prikazuje drevo biorazgradnje benzofenona-3 s programom CRAFT Explorer.

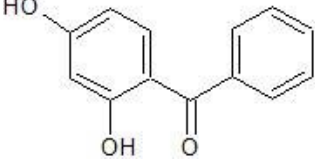
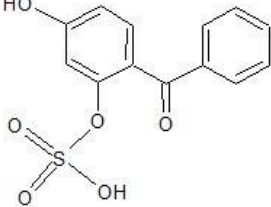
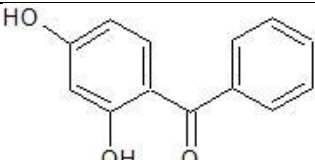
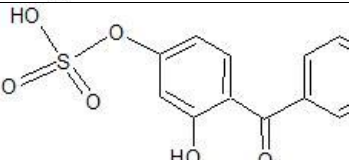
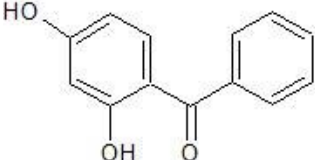
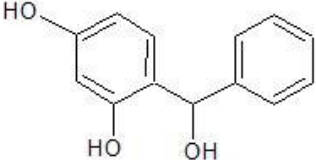
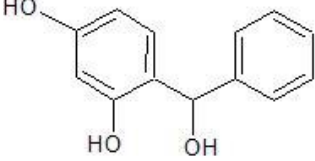
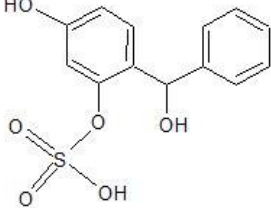
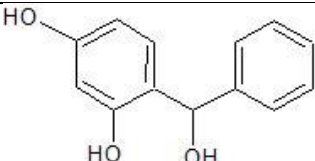
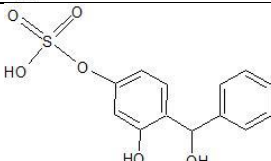


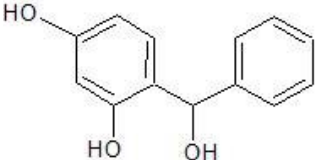
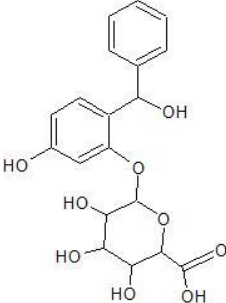
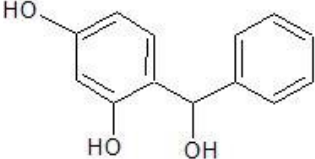
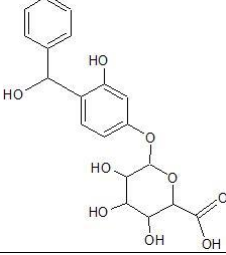
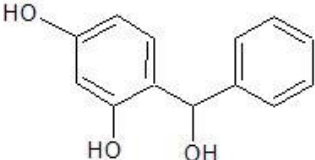
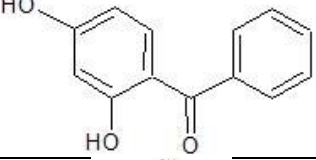
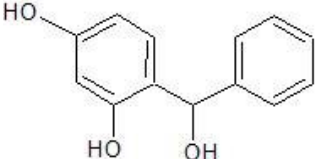
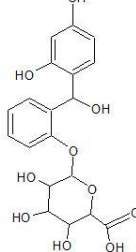
12 PRILOGA VI

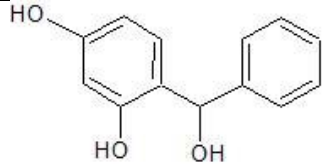
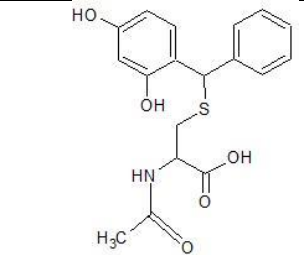
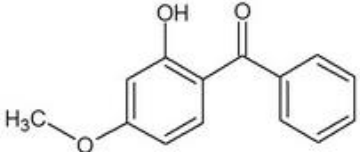
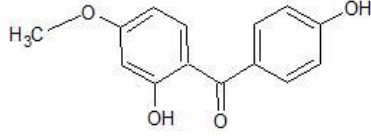
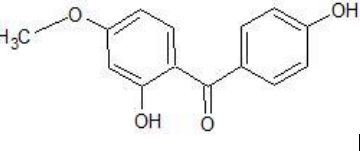
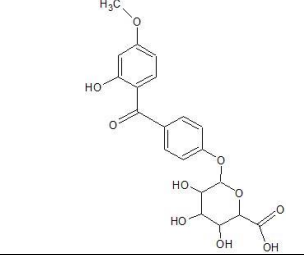
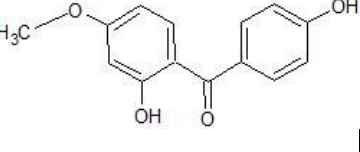
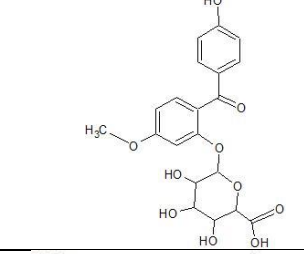
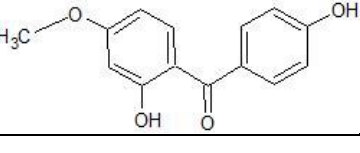
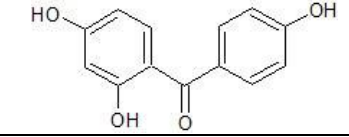
V spodnji preglednici (*preglednica IX*) smo zbrali metabolite benzofenona-3, napovedane z Meteor-jem, ter informacije o njihovem metabolizmu, kot so strukturne formule, verjetnost nastanka, molekulske formule, Log P, ime reakcij ter sodelujoči encimi.

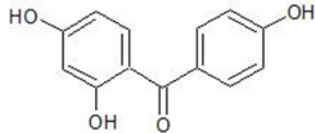
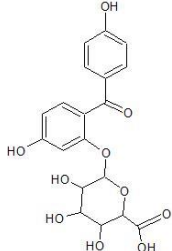
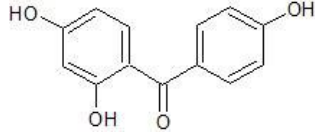
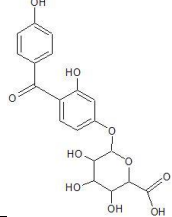
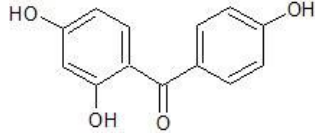
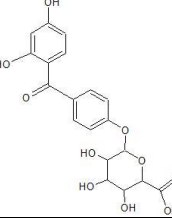
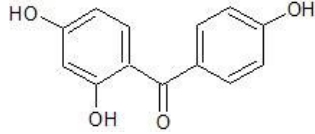
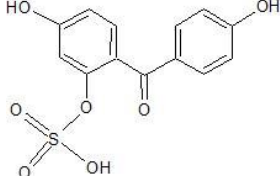
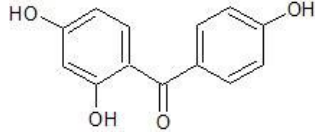
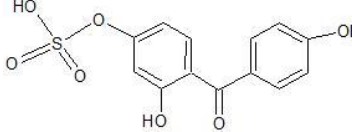
Preglednica IX: Benzofenon-3 in njeni metaboliti ter informacije o njihovem metabolizmu.

Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
1.		<u>Q:</u> BZ-3 <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₃ <u>Log P:</u> 3,59	→ CYP450		<u>M:</u> 1 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₃ H ₁₀ O ₃ <u>Log P:</u> 3,01
2.		<u>M:</u> 1 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₃ H ₁₀ O ₃ <u>Log P:</u> 3,01	→ UGT		<u>M:</u> 1.1 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₉ H ₁₈ O ₉ <u>Log P:</u> 0,56
3.		<u>M:</u> 1 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₃ H ₁₀ O ₃ <u>Log P:</u> 3,01	→ UGT		<u>M:</u> 1.2 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₉ H ₁₀ O ₉ <u>Log P:</u> 1,02

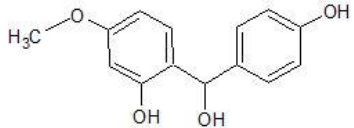
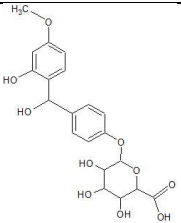
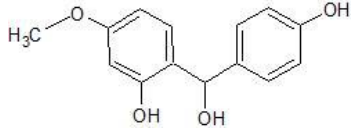
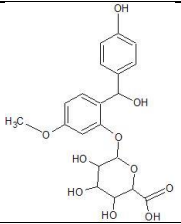
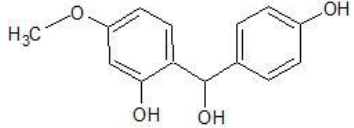
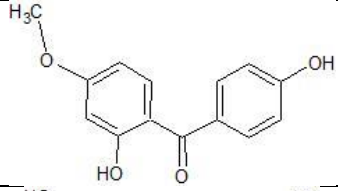
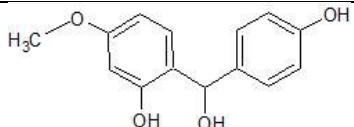
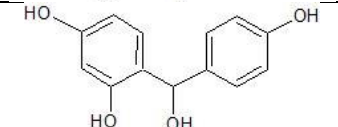
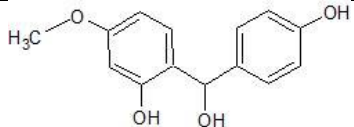
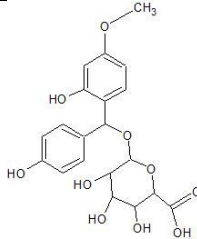
Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
4.		<u>M</u> : 1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₃ <u>Log P</u> : 3,01	→ SULT		<u>M</u> : 1.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₆ S <u>Log P</u> : 0,98
5.		<u>M</u> : 1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₃ <u>Log P</u> : 3,01	→ SULT		<u>M</u> : 1.4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₆ S <u>Log P</u> : 1,44
6.		<u>M</u> : 1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₃ <u>Log P</u> : 3,01	→ ADH		<u>M</u> : 1.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07
7.		<u>M</u> : 1.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07	→ SULT		<u>M</u> : 1.5.1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₆ S <u>Log P</u> : -0,26
8.		<u>M</u> : 1.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07	→ SULT		<u>M</u> : 1.5.2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₆ S <u>Log P</u> : -0,31

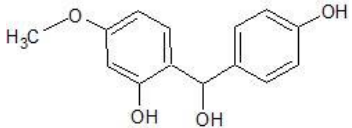
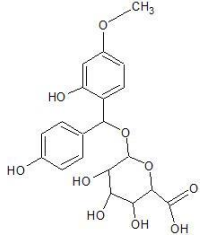
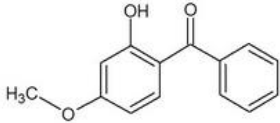
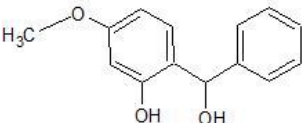
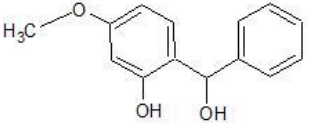
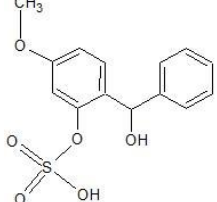
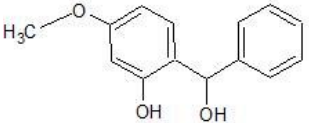
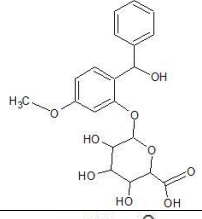
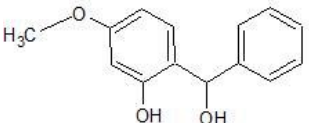
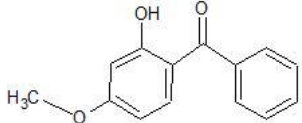
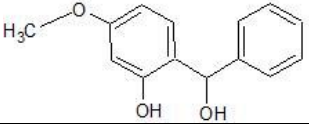
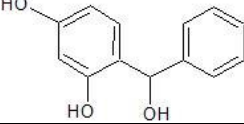
Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
9.		<u>M</u> : 1.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07	→ UGT		<u>M</u> : 1.5.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₂₀ O ₉ <u>Log P</u> : -0,68
10.		<u>M</u> : 1.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07	→ UGT		<u>M</u> : 1.5.4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₂₀ O ₉ <u>Log P</u> : -0,73
11.		<u>M</u> : 1.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07	→ ADH		<u>M</u> : 1.5.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₃ <u>Log P</u> : 3,01
12.		<u>M</u> : 1.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07	→ UGT		<u>M</u> : 1.5.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvovljiva <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₂₀ O ₉ <u>Log P</u> : -0,44

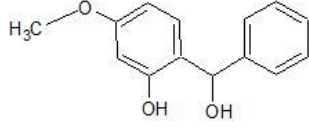
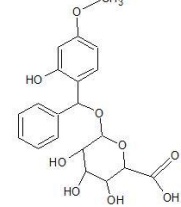
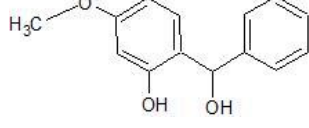
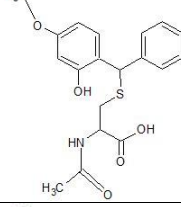
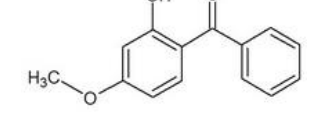
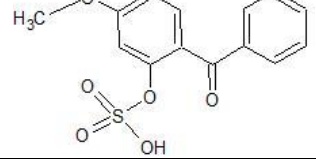
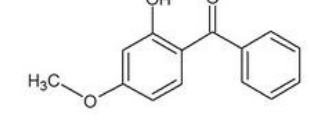
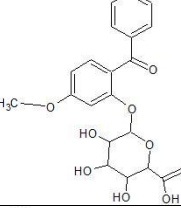
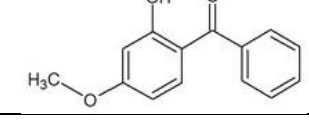
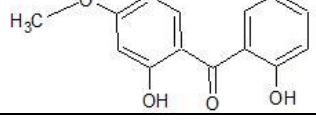
Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
13.		<u>M</u> : 1,5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07	→ (Encim ni naveden)		<u>M</u> : 1,5,7 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvumljiva <u>Molekulska formula</u> : C ₁₈ H ₁₉ NO ₅ S <u>Log P</u> : 1,6
14.		<u>Q</u> : BZ-3 <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 3,59	→ CYP450		<u>M</u> : 2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,03
15.		<u>M</u> : 2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,03	→ UGT		<u>M</u> : 2,1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀ <u>Log P</u> : 0,98
16.		<u>M</u> : 2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,03	→ UGT		<u>M</u> : 2,2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀ <u>Log P</u> : 0,51
17.		<u>M</u> : 2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,03	→ CYP450		<u>M</u> : 2,3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,39

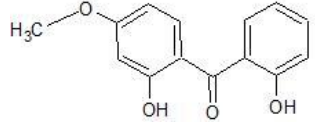
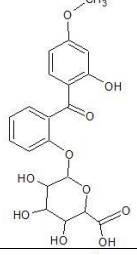
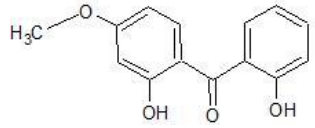
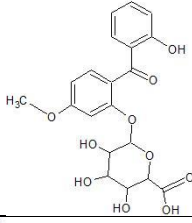
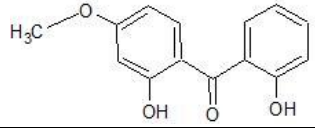
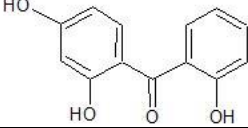
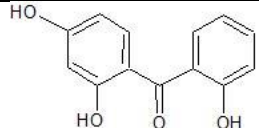
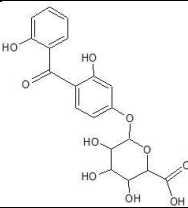
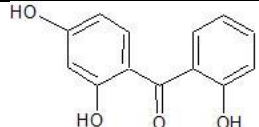
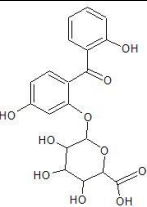
Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
18.		<u>M</u> : 2.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,39	→ UGT		<u>M</u> : 2.3.1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀ <u>Log P</u> : 0,01
19.		<u>M</u> : 2.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,39	→ UGT		<u>M</u> : 2.3.2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀ <u>Log P</u> : 0,47
20.		<u>M</u> : 2.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,39	→ UGT		<u>M</u> : 2.3.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀ <u>Log P</u> : 0,44
21.		<u>M</u> : 2.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,39	→ SULT		<u>M</u> : 2.3.4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₇ S <u>Log P</u> : 0,42
22.		<u>M</u> : 2.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,39	→ SULT		<u>M</u> : 2.3.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₇ S <u>Log P</u> : 0,88

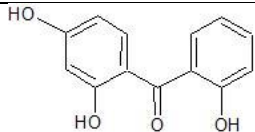
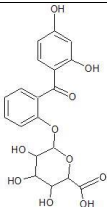
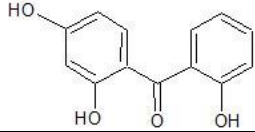
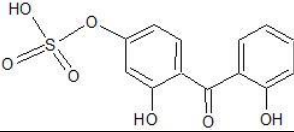
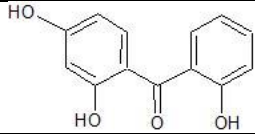
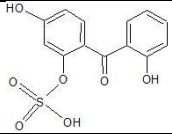
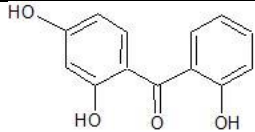
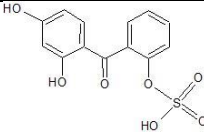
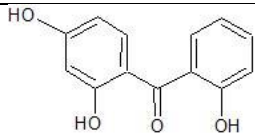
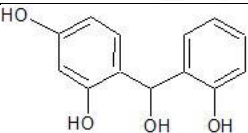
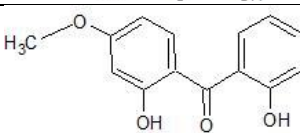
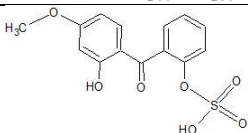
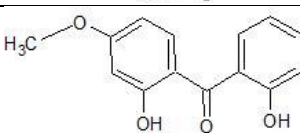
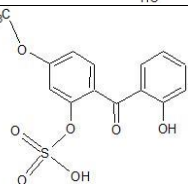
Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
23.		<u>M</u> : 2.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,39	→ SULT		<u>M</u> : 2.3.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₇ S <u>Log P</u> : 0,85
24.		<u>M</u> : 2.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,39	→ ADH		<u>M</u> : 2.3.7 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 0,40
25.		<u>M</u> : 2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,03	→ SULT		<u>M</u> : 2.4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₇ S <u>Log P</u> : 1,40
26.		<u>M</u> : 2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,03	→ SULT		<u>M</u> : 2.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₇ S <u>Log P</u> : 0,92
27.		<u>M</u> : 2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,03	→ ADH		<u>M</u> : 2.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17
28.		<u>M</u> : 2.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17	→ SULT		<u>M</u> : 2.6.1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₇ S <u>Log P</u> : -0,39
29.		<u>M</u> : 2.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17	→ SULT		<u>M</u> : 2.6.2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₇ S <u>Log P</u> : -0,35

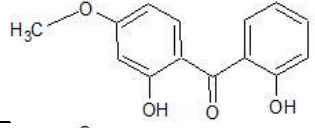
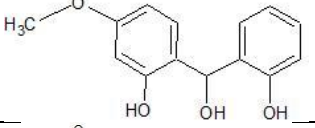
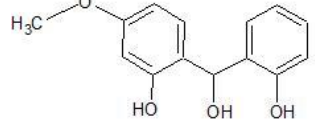
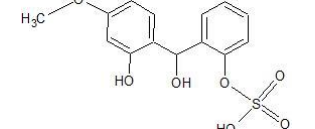
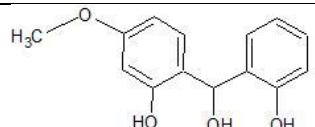
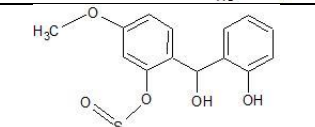
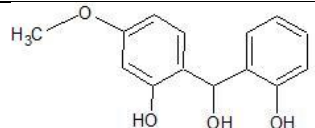
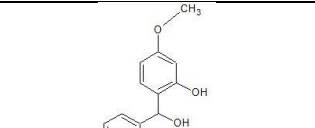
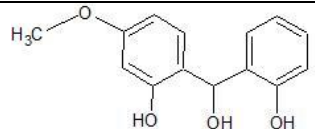
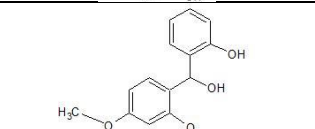
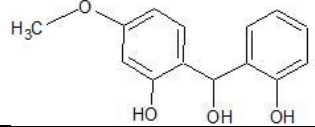
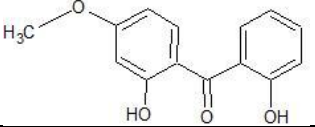
Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
30.		<u>M</u> : 2.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17	→ UGT		<u>M</u> : 2.6.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀ <u>Log P</u> : -0,81
31.		<u>M</u> : 2.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17	→ UGT		<u>M</u> : 2.6.4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀ <u>Log P</u> : -0,77
32.		<u>M</u> : 2.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17	→ ADH		<u>M</u> : 2.6.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,03
33.		<u>M</u> : 2.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17	→ CYP450		<u>M</u> : 2.6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 0,40
34.		<u>M</u> : 2.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17	→ UGT		<u>M</u> : 2.6.7 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvomljiva <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₂ O ₁₀ <u>Log P</u> : -0,34

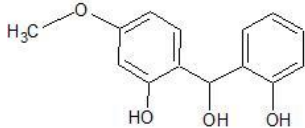
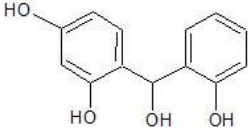
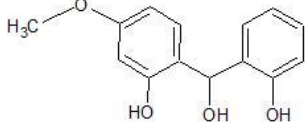
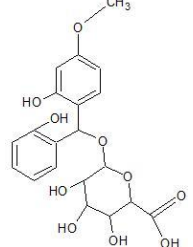
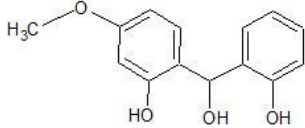
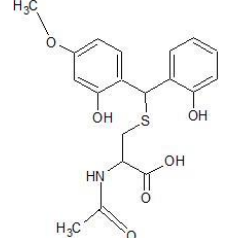
Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
35.		<u>M</u> : 2,6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,17	→ (Encim ni naveden)		<u>M</u> : 2,6,8 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvomljiva <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S <u>Log P</u> : 1,7
36.		<u>Q</u> : BZ-3 <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 3,59	→ UGT		<u>M</u> : 3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₃ <u>Log P</u> : 1,83
37.		<u>M</u> : 3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₃ <u>Log P</u> : 1,83	→ SULT		<u>M</u> : 3,1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₆ S <u>Log P</u> : 0,31
38.		<u>M</u> : 3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₃ <u>Log P</u> : 1,83	→ UGT		<u>M</u> : 3,2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₂ O ₉ <u>Log P</u> : -0,1
39.		<u>M</u> : 3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₃ <u>Log P</u> : 1,83	→ ADH		<u>M</u> : 3,3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 3,59
40.		<u>M</u> : 3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₃ <u>Log P</u> : 1,83	→ CYP450		<u>M</u> : 3,4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₃ <u>Log P</u> : 1,07

Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
41.		M: 3 <u>Verjetnost nastanka:</u> Možna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₄ O ₃ <u>Log P:</u> 1,83	→ UGT		M: 3.5 <u>Verjetnost nastanka:</u> Dvomljiva <u>Molekulska formula:</u> C ₂₀ H ₂₀ O ₉ <u>Log P:</u> 0,32
42.		M: 3 <u>Verjetnost nastanka:</u> Možna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₄ O ₃ <u>Log P:</u> 1,83	→ (Encim ni naveden)		M: 3.6 <u>Verjetnost nastanka:</u> Dvomljiva <u>Molekulska formula:</u> C ₁₉ H ₂₁ NO ₅ S <u>Log P:</u> 2,37
43.		Q: BZ-3 <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₃ <u>Log P:</u> 3,59	→ SULT		M: 4 <u>Verjetnost nastanka:</u> Dvomljiva <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₆ S <u>Log P:</u> 1,28
44.		Q: BZ-3 <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₃ <u>Log P:</u> 3,59	→ UGT		M: 5 <u>Verjetnost nastanka:</u> Dvomljiva <u>Molekulska formula:</u> C ₂₀ H ₂₀ O ₉ <u>Log P:</u> 0,87
45.		Q: BZ-3 <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₃ <u>Log P:</u> 3,59	→ CYP450		M: 6 <u>Verjetnost nastanka:</u> Dvomljiva <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P:</u> 3,49

Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
46.		M: 6 <u>Verjetnost nastanka:</u> Dvomljiva <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P:</u> 3,49	→ UGT		M: 6.1 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀ <u>Log P:</u> 0,98
47.		M: 6 <u>Verjetnost nastanka:</u> Dvomljiva <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P:</u> 3,49	→ UGT		M: 6.2 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀ <u>Log P:</u> 0,97
48.		M: 6 <u>Verjetnost nastanka:</u> Dvomljiva <u>Molekulska formula:</u> C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P:</u> 3,49	→ CYP450		M: 6.3 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P:</u> 2,85
49.		M: 6.3 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P:</u> 2,85	→ UGT		M: 6.3.1 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀ <u>Log P:</u> 0,93
50.		M: 6.3 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P:</u> 2,85	→ UGT		M: 6.3.2 <u>Verjetnost nastanka:</u> Verjetna <u>Molekulska formula:</u> C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀ <u>Log P:</u> 0,47

Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
51.		<u>M</u> : 6.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,85	→ UGT		<u>M</u> : 6.3.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀ <u>Log P</u> : 0,44
52.		<u>M</u> : 6.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,85	→ SULT		<u>M</u> : 6.3.4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₇ S <u>Log P</u> : 1,34
53.		<u>M</u> : 6.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,85	→ SULT		<u>M</u> : 6.3.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₇ S <u>Log P</u> : 0,88
54.		<u>M</u> : 6.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,85	→ SULT		<u>M</u> : 6.3.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₇ S <u>Log P</u> : 0,85
55.		<u>M</u> : 6.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Verjetna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₀ O ₄ <u>Log P</u> : 2,85	→ ADH		<u>M</u> : 6.3.7 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 0,35
56.		<u>M</u> : 6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvomiľjiva <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,49	→ SULT		<u>M</u> : 6.4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₇ S <u>Log P</u> : 1,40
57.		<u>M</u> : 6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvomiľjiva <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,49	→ SULT		<u>M</u> : 6.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₇ S <u>Log P</u> : 1,38

Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
58.		<u>M</u> : 6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvomljiva <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,49	→ ADH		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12
59.		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12	→ SULT		<u>M</u> : 6.6.1 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₇ S <u>Log P</u> : -0,39
60.		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12	→ SULT		<u>M</u> : 6.6.2 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₇ S <u>Log P</u> : -0,4
61.		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12	→ UGT		<u>M</u> : 6.6.3 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₂ O ₁₀ <u>Log P</u> : -0,81
62.		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12	→ UGT		<u>M</u> : 6.6.4 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₂ O ₁₀ <u>Log P</u> : -0,82
63.		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12	→ ADH		<u>M</u> : 6.6.5 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 3,49

Št.	Osnovne spojine	Informacije o osnovnih spojinah	Encimi	Metaboliti	Informacije o metabolitih
64.		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12	→ CYP450		<u>M</u> : 6.6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₃ H ₁₂ O ₄ <u>Log P</u> : 0,35
65.		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12	→ UGT		<u>M</u> : 6.6.7 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvumljiva <u>Molekulska formula</u> : C ₂₀ H ₂₂ O ₁₀ <u>Log P</u> : -0,39
66.		<u>M</u> : 6.6 <u>Verjetnost nastanka</u> : Možna <u>Molekulska formula</u> : C ₁₄ H ₁₄ O ₄ <u>Log P</u> : 1,12	→ (Encim ni naveden)		<u>M</u> : 6.6.8 <u>Verjetnost nastanka</u> : Dvumljiva <u>Molekulska formula</u> : C ₁₉ H ₂₁ NO ₆ S <u>Log P</u> : 1,65