

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Gorica D. Veselinović

**ISPITIVANJE STABILNOSTI I TOKSIČNOSTI UV
FILTERA BENZOFENONSKOG TIPA I NJIHOVIH
TRANSFORMACIONIH PROIZVODA U
PRISUSTVU HLORA U VODENOJ SREDINI**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Gorica D. Veselinović

**STABILITY AND TOXICITY OF BENZOPHENONE-
TYPE UV FILTERS AND ITS TRANSFORMATION
PRODUCTS IN THE PRESENCE OF CHLORINE IN
AN AQUEOUS MEDIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

Dr Branimir Jovančičević, redovni profesor,
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Polonca Trebše, vanredni profesor,
Zdravstveni fakultet Univerziteta u Ljubljani

Članovi komisije:

Dr Ivan Gržetić, redovni profesor,
Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr Aleksandra Šajnović, viši naučni saradnik,
Centar za hemiju - IHTM, Univerzitet u Beogradu

Datum obrane:

Zahvalnica

Ova disertacija je urađena u okviru realizacije projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 176006 „Geohemijsko ispitivanje stena – fosilna goriva i zagađivači životne sredine“. Najveći deo istraživanja sproveden je u saradnji sa Laboratorijom za životnu sredinu Univerziteta u Novoj Gorici i Fakultetom za hemiju i hemijsku tehnologiju Univerziteta u Ljubljani.

U izradi ove teze učestvovao je veliki broj ljudi, koji su svojim neposrednim ili posrednim delovanjem uticali na njen konačni izgled, i ovom prilikom želim da im se zahvalim.

Pre svega, mentoru dr Branimiru Jovančičeviću, najiskrenije zahvaljujem na ukazanom poverenju i prilici da budem deo njegove istraživačke grupe, kao i stručnoj pomoći, savetima i ljudskom razumevanju.

Najsrdanije se zahvaljujem mentorki dr Polonci Trebše na nesebičnoj pomoći i podršci tokom svih faza izrade ove disertacije. Pre svega HVALA za iskreno prijateljstvo i topli ljudski odnos.

Dr Ivanu Gržetiću zahvaljujem na korisnim savetima i sugestijama ne samo tokom izrade disertacije, već i tokom ranijih studija.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Šajnović, koja me na neki način uvela u svet nauke. Njena svesrdna stručna pomoć i podrška, kao i iskreni prijateljski saveti, bili su mi od velikog značaja u svim, a posebno u finalnoj fazi izrade ove disertacije.

Dr Darku Dolencu, redovnom profesoru Fakulteta za hemiju i hemijsku tehnologiju Univerziteta u Ljubljani, najlepše hvala za pomoć, savete i strpljenje tokom rada u njegovoj laboratoriji, i što je svoje znanje organske hemije nesebično podelio sa mnom.

Najlepše HVALA dragim prijateljicama dr Olgi Malev i Tatjani Radovanović koje su mi boravak u Sloveniji učinile nezaboravnim i koje su bile tu za svaku stručnu i prijateljsku pomoć, kao i dr Romini Žabar i dr Vesni Lavtižar za savete i pomoć tokom eksperimentalnog rada.

Mojim dragim kumovima Milici i Mirku Maksimović veliko HVALA na pomoći oko tehničke obrade i finalizacije teze.

Dr Snežani Štrbac zahvaljujem se na pomoći i savetima tokom interpretacije ekotoksikoloških rezultata.

Posebno HVALA dragim koleginicama sa kojima delim radni prostor Gordani Gajici i dr Milici Kašanin-Grubin, kao i tehničkom saradniku Peri Arsiću, dr Sanji Stojadinović, dr Konstantinu Ilijeviću i ostalim kolegama iz grupe za Organsku geohemiju za svu pomoć i stvaranje prijatne radne atmosfere.

Beskrajno HVALA mojim roditeljima, bratu i sestra za pruženu podršku, bezrezervnu ljubav i oslonac svih ovih godina školovanja i usavršavanja. Posebno hvala mojoj mami koja je pomogla da Bogdan što manje oseti moje odsustvo, a ja bezbrižno radim znajući da je on u sigurnim rukama.

Na kraju, od srca HVALA mom suprugu na bezgraničnoj ljubavi, razumevanju i sigurnosti koju mi je pružio i olakšao moj put ka ostvarenju ovog cilja.

IZVOD

Ispitivanje stabilnosti i toksičnost UV filtera benzofenonskog tipa i njihovih transformacionih proizvoda u prisustvu hlora u vodenoj sredini

Sve veća zabrinutost zbog nepovoljnog uticaja ultraljubičastog zračenja na ljudsko zdravlje, dovela je do povećane upotrebe kozmetičkih preparata koji kao glavne satojke sadrže UV filtre, supstance sposobne da apsorbuju, reflektuju i/ili raspršuju fotone svetlosti i na taj način pružaju zaštitu od štetnog UV zračenja. Povećana upotreba UV filtera ima sve veći uticaj na životnu sredinu. Iako su ova jedinjenja stabilna pod dejstvom UV zračenja, pod određenim uslovima može doći do njihove razgradnje, uglavnom fotolizom ili u reakciji sa sredstvima na bazi hlora, kakva se obično koriste za dezinfekciju bazenskih voda.

U okviru ovog rada ispitivana su tri benzofenonska UV filtra čije je korišćenje dozvoljeno za pripremu kozmetičkih proizvoda u Evropskoj Uniji: dietilaminohidroksibenzoil heksil benzoat (DHHB), 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3) i 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (BP4). S obzirom da se o sudbini DHHB UV filtra u životnoj sredini i njegovoj ekotoksičnosti malo zna, glavni cilj ovog rada bilo je ispitivanje njegove stabilnosti i toksičnosti u prisustvu hlora u vodenoj sredini. Pored toga, ispitivani su BP3 i BP4 kao najčešće korišćeni benzofenonski UV filtri. Za potrebe istraživanja bilo je neophodno sintetisati i potpuno okarakterisati hlorovane proizvode DHHB, BP3 i BP4 UV filtra.

Glavni proizvodi u reakciji DHHB i NaOCl su 3-Cl DHHB i proizvod za koji se pretpostavlja da nastaje hlorovanjem fenolnog prstena sa simultanom eliminacijom etil grupe sa susednog azotovog atoma. Za detaljnije objašnjenje ovog mehanizma biće potreban dodatni rad. U višku dezinfekcionog sredstva nastaje 3,5-diCl DHHB. U procesu hlorovanja BP3 i BP4 UV filtera u neutralnoj vodenoj sredini nastaju 5Cl-BP3 i 3,5-diCl-BP3. Rezultati su pokazali da su BP3, BP4 i DHHB UV filtri i njihovi monohlorovani derivati stabilni pod dejstvom UV zračenja. Izuzetak je 3,5-diCl-BP3.

Sa stanovišta životne sredine, to je najmanje povoljno jer je ovo jedinjenje glavni proizvod hlorovanja BP3 i BP4, a identifikovan je i u uzorcima bazenskih voda.

Testovi toksičnosti pokazali su da se efekat DHHB, BP3 i BP4 UV filtera na bakteriju *V. fischeri* ne menja značajno nakon procesa hlorovanja. Slatkovodna alga *P. subcapitata* je pokazala značajno veću osetljivost na prisustvo DHHB UV filtra nego na njegove hlorovane proizvode, dok na *D. magna* veći efekat imaju hlorovani proizvodi, posebno 3-hloro DHHB. Uporedni podaci toksičnosti pokazuju da DHHB, a još više njegovi hlorovani proizvodi, imaju veći uticaj na dafnije nego drugi benzofenonski UV filtri. Prema algama DHHB ima sličan efekat kao BP3, a najmanju ekotoksičnost pokazuje BP4.

Ključne reči: UV filtri, benzofenoni, dietilaminohidroksibenzoil heksil benzoat (DHHB), 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3), 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (BP4), hlorovanje, ekotoksičnost

Naučna oblast: Hemija

UDK broj: 54

ABSTRACT**Stability and toxicity of benzophenone-type UV filters and its transformation products in the presence of chlorine in an aqueous media**

Growing concern over deleterious effects of ultraviolet (UV) radiation on humans has caused an increase in usage of sunscreen products with UV filter-containing formulations. UV filters are substances capable of absorbing, reflecting and/or scattering sunlight wavelengths, reducing the damage that this radiation might cause on human health. Increased application of sunscreen raised the concern regarding their possible environmental pathway, fate and effects. Although UV filters must be stable on exposure to UV light, under certain special conditions they might decompose by light or may react with chlorine-based disinfection agents.

The aim of this study is to investigate three benzophenone-type UV filters, currently allowed by the European Union legislation: diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate (DHHB), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP3) and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (BP4). Due to the lack of information on DHHB, the main objective of this work was to investigate the transformation behavior and toxicity changes of DHHB UV filter during chlorination disinfection treatment and under UV radiation. In addition, investigation was performed on BP3 and BP4 as most frequently used benzophenone-type UV filters. For the purpose of this investigation, it was necessary to synthesize and fully characterize chlorinated products of DHHB, BP3 and BP4 UV filter.

As the main products in reaction of DHHB and NaOCl were 3-Cl DHHB and the product which lacks an ethyl group and contains a chlorine atom instead. The reaction seems mechanistically plausible, albeit additional work will be needed to elucidate this reaction in more detail. With an excess of disinfectant 3,5-diCl-DHHB is formed. In the chlorination process of BP3 and BP4 in neutral aqueous media, 5-Cl BP3 and 3,5-diCl-BP3 were formed. Photostability experiments showed that BP3, BP4 and DHHB UV filters and their mono-chlorinated by-products were fairly stable under the effect of UV

radiation. 3,5-diC BP3 was the only compound proven to be unstable. This causes main concern regarding environmental protection, since this compound was the main product in the reaction of BP3 and BP4 with chlorine and it was identified in swimming pool water samples.

The acute toxicity of DHHB, BP3 and BP4 UV filters and their chlorinated products was measured using standardized tests with aquatic model organisms. Toxicity of chlorinated compounds tested by photobacteria *Vibrio fischeri* was found to be in the similar range as that of the starting compound. Microalgae were more sensitive to DHHB than to its chlorinated by-products, while daphnids were affected more by DHHB's chlorinated products. The comparative toxicity data showed DHHB and even more its chlorinated by-products as highly biologically potent to daphnids than other tested UV filter. Microalgae were similarly affected by DHHB and BP3, but BP4 has the lowest ecotoxicity.

Key words: UV filters, benzophenones, diethylamino hydroxybenzoil hexyl benzoate (DHHB), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP3), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (BP4), chlorination, ecotoxicity

Scientific field: Chemistry

UDC number: 54

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO	6
2.1. Ultraljubičasto (UV) zračenje.....	6
2.1.1. Podela UV zračenja	6
2.1.2. UV indeks (UVI) i minimalna eritemska doza (MED)	7
2.2. Uticaj UV svetlosti na kožu.....	9
2.3. Fotozaštita u kozmetičkim preparatima.....	14
2.4. UV filtri	15
2.4.1. Neorganski UV filtri.....	17
2.4.2. Organski UV filtri.....	18
2.4.2.1. Podela organskih UV filtera	20
2.4.2.2. Fizičko-hemijske osobine	26
2.4.3. Zakonska regulativa.....	28
2.5. Unos UV filtera u životnu sredinu.....	29
2.6. Degradacija u životnoj sredini i transformacioni proizvodi	31
2.6.1. Fotolitička disocijacija.....	31
2.6.2. Fotoizomerizacija	33
2.6.3. Reakcija sa hlorom. Formiranje DBP.....	34
2.7. Prisustvo UV filtera u vodama	36

2.8. Ekotoksičnost UV filtera	39
2.8.1. Ispitivanje toksičnosti	40
2.8.2. Toksikološki test na luminescentnoj bakteriji	42
2.8.3. Toksikološki test na algama	43
2.8.4. Toksikološki test na <i>Daphnia magna</i>	44
2.9. Benzofenonski UV filtri	45
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	51
4. EKSPERIMENTALNI DEO	53
4.1. Reagensi	53
4.2. Sinteze	54
4.2.1. Sinteza heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB)	55
4.2.1.1. Sinteza 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline	55
4.2.1.2. Sinteza heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB)	55
4.2.2. Sinteza hlorovanih proizvoda: heksil 2-(3-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata i heksil 2-(5-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata	56
4.2.3. Sinteza hloro derivata BP3	57
4.2.3.1. Sinteza 3-hloro- i 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (3-Cl BP3 i 5-Cl BP3)	57
4.2.3.2. Sinteza 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (3,5-diCl-BP3)	57
4.2.4. Hlorovanje BP4 UV filtra	57
4.2.4.1. Reakcija BP4 UV filtra i TCCA u baznoj sredini	58

4.2.4.2. Reakcija BP4 UV filtra i NaOCl u kiseloj sredini.....	58
4.3. Dezinfekcioni eksperimenti.....	58
4.3.1. Hlorovanje DHHB UV filtra u vodenoj sredini.....	58
4.3.2. Hlorovanje BP3 i BP4 u vodenoj sredini.....	59
4.4. Ispitivanje fotostabilnosti	60
4.5. Određivanje DHHB, BP3, BP4 i njihovih hlorovanih proizvoda u bazenskim vodama.....	61
4.6. Instrumentalne analitičke metode	62
4.6.1. Određivanje tačke topljenja	62
4.6.2. Određivanje pH vrednosti.....	62
4.6.3. Elementarna analiza.....	62
4.6.4. IR (infracrvena) spektroskopija	62
4.6.5. UV-Vis spektrofotometrija	63
4.6.6. ^1H i ^{13}C nuklearna magnetna spektroskopija.....	63
4.6.7. HPLC-DAD analize.....	63
4.6.8. LC-ESI-MS i LC-ESI-MS-MS analize.....	64
4.7. Ispitivanje toksičnosti upotrebom test organizama	65
4.7.1. Toksikološki test na luminescentnoj bakteriji <i>Vibrio fischeri</i>	66
4.7.2. Toksikološki test na algama	67
4.7.3. Toksikološki test na <i>Daphnia magna</i>	68
4.7.4. Uporedni podaci o toksičnosti na dafnije, mikroalge i fotobakterije	68

5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	70
5.1. Sinteze	70
5.1.1. Sinteza heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB).....	70
5.1.1.1. Sinteza 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline.....	70
5.1.1.2. Sinteza heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB).....	71
5.1.2. Sinteza hlorovanih proizvoda: heksil 2-(3-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata i heksil 2-(5-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata.....	73
5.1.3. Sinteza hloro derivata BP3	76
5.1.3.1. Sinteza 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (3,5-diCl-BP3).....	78
5.1.4. Hlorovanje BP4 UV filtra u baznoj sredini	78
5.1.5. Hlorovanje BP4 UV filtra u kiseloj sredini	80
5.2. Dezinfekcioni eksperimenti	81
5.2.1. Hlorovanje BP3 i BP4 UV filtra.....	81
5.2.2. Hlorovanje DHHB UV filtra	83
5.2.3. Analiza masenih spektara polaznog jedinjenja, DHHB	85
5.2.4. Identifikacija dobijenih proizvoda.....	91
5.2.4.1. LC-MS-MS analiza.....	92
5.3. Ispitivanje fotostabilnosti	98
5.4. Određivanje UV filtra u bazenskim vodama	101
5.5. Toksikološki testovi.....	102

5.5.1. Rezultati toksikoloških testova na <i>Vibrio fischeri</i>	102
5.5.2. Rezultati toksikoloških testova na <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	107
5.5.3. Rezultati toksikoloških testova na <i>Daphnia magna</i>	109
5.5.4. Uporedni testovi toksičnosti na dafnije, mikroalge i fotobakterije	111
6. ZAKLJUČCI	117
7. LITERATURA	120

1. UVOD

Ultraljubičasto (UV) zračenje predstavlja deo elektromagnetnog zračenja u intervalu talasnih dužina od 100 do 400 nm. Sunce, kao glavni prirodni izvor elektromagnetnog zračenja, ima važnu ulogu u biohemijskim procesima koji se odigravaju u ćelijama živih organizama i neophodno je za opstanak živog sveta na našoj Planeti.

Prema Međunarodnoj komisiji za svetlost (CIE, Commision Internationale de l'Eclairage ili International Commision of Illumination) UV zračenje se deli na tri oblasti: UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) i UVA (315-400 nm). Međutim, kada se govori o biološkom dejstvu, nije moguće postaviti jasne granice između ovih oblasti, pa se češće primenjuje podela UV zračenja na: UVC (180-290 nm), UVB (290-320 nm) i UVA (320-400 nm).

Tokom svoje evolucije, organizmi su se prilagodili prirodnim nivoima sunčevog UV zračenja i svako povećanje intenziteta tog zračenja prouzrokuje štetne posledice po živi svet – biosferu. Iako su štetni efekti dejstva UV zračenja na žive organizme bili poznati još u XIX veku (Morys i Berger, 1993), tek otkrićem smanjene debljine ozonskog omotača iznad Antarktika i pojavom „ozonskih rupa“ 80-tih godina prošlog veka, svetska javnost počinje da posvećuje pažnju UV zračenju kao ozbiljnom ekološkom problemu.

Sve veća zabrinutost zbog nepovoljnog uticaja ultraljubičastog zračenja na ljudsko zdravlje, dovela je do povećane upotrebe kozmetičkih preparata za zaštitu od sunca. Ovi preparati kao glavne sastojke sadrže UV filtre, supstance sposobne da apsorbuju, reflektuju i/ili raspršuju fotone svetlosti i na taj način pružaju zaštitu od štetnog UV zračenja. UV filtri se uopšteno klasifikuju u dve grupe: neorganske (npr. TiO_2 i ZnO), koji reflektuju UV zračenje, i hemijske (organske) UV filtre koji ga apsorbuju. Među organskim UV filtrima mogu se naći različite klase jedinjenja, kao što su *para*-aminobenzoati, salicilati, cinamati i derivati kamfora koji apsorbuju UVB zračenje, i benzofenoni, dibenzoilmetani i benzomidazoli koji apsorbuju u UVA spektralnoj oblasti (Giokas *et al.*, 2007; Shaat, 2010). Kreme za zaštitu od sunca su u početku dizajnirane tako da sadrže uglavnom UVB filtre (Kockler *et al.*, 2012), zbog

činjenice da UVB zračenje izaziva fotokarcinogenezu direktnom reakcijom sa ćelijskom DNK (Vielhaber *et al.*, 2006). Dok su efekti UVB zračenja prilično ograničeni jer epiderm sprečava njihovo dublje prodiranje u kožu, UVA direktno utiče na kožu i smatra se najodgovornijim za takozvano foto-starenje kože. U današnje vreme, kreme za zaštitu od sunca u svojoj formulaciji sadrže nekoliko različitih UV filtera, često u kombinaciji sa neorganskim mikropigmentima, i na taj način omogućavaju zaštitu duž celog UV spektra (Shaath *et al.*, 2005; Serpone *et al.*, 2007; Moyal *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2011).

Važna grupa jedinjenja koja se koristi u proizvodnji preparata za zaštitu od sunca su benzofenoni. Najčešće upotrebljavani benzofenonski UV filteri su dva UVB filtera, 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (nazvan još i oksibenzon, benzofenon-3 ili BP3, CAS No. 131-57-7) i 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (benzofenon-4 ili BP4, CAS No. 4065-45-6). Sa ciljem da obezbedi zaštitu od kratkotalasnog UVA zračenja, na tržištu se, pod imenom Uvinul A plus (BASF, 2006), pojavio noviji benzofenonski UV filter, heksil 2-[4-(dietilamino)-2-hidroksibenzoil]benzoat (dietilamino hidroksibenzoil heksil benzoat ili DHHB, CAS No. 302776-68-7).

Povećana upotreba UV filtera u cilju zaštite od štetnog uticaja sunca, povećala je brigu o uticaju ovih supstanci na životnu sredinu. UV filteri dospevaju u životnu sredinu direktnim putem, spiranjem sa kože i odeće prilikom rekreativnih aktivnosti tokom letnje sezone, i indirektno, kroz ispuštanje otpadnih industrijskih i komunalnih voda, ili ispuštanjem bazenskih voda (Santos *et al.*, 2012; Díaz-Cruz i Barceló, 2009). Podaci o koncentracijama benzofenonskih UV filtera u realnim uzorcima sveže ili morske vode su objavljeni u brojnim publikacijama i uglavnom su reda veličine nanograma po litru (ng/l), ali dostižu i koncentracije od nekoliko desetina mikrograma po litru vode (µg/l) (Lambropoulou *et al.*, 2002; Giokas *et al.*, 2004; Giokas i Sakkas, 2005; Jeon *et al.*, 2006; Zenker *et al.*, 2008; Gago-Ferrero *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Gago-Ferrero *et al.*, 2012). S druge strane, podaci o prisustvu UV filtera u bazenskim vodama su veoma retki. Što se tiče DHHB UV filtra, postoji samo nekoliko istraživanja u kojima je ispitivana koncentraciju ovog jedinjenja u kozmetičkim proizvodima (Couteau *et al.*, 2007; Durand *et al.*, 2009; Nyeberg *et al.*, 2010). Međutim, u dostupnoj literaturi ne

postoje podaci o njegovom ponašanju i sudbini u životnoj sredini, niti o njegovim koncentracijama u bazenskim ili drugim vodama.

Iako su UV filtri jedinjenja koja su stabilna pod dejstvom UV zračenja, pod određenim uslovima ipak može doći do njihove razgradnje. Potvrđeno je da do toga dolazi uglavnom fotolizom (Serpone *et al.*, 2002; Sakkas *et al.*, 2003; Kockler *et al.*, 2012), ili u reakciji sa sredstvima na bazi hlora, kakva se obično koriste za dezinfekciju bazenskih voda (Sakkas *et al.*, 2003; Negreira *et al.*, 2008; Nakajima *et al.*, 2009; Duirk *et al.*, 2013). Hlorisanje je najčešći hemijski proces koji se koristi za dezinfekciju bazenske i pijaće vode. Formiranje halogenovanih proizvoda kao sporednih proizvoda tokom procesa dezinfekcije je neizbežno, pogotovo za jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju fenolne i/ili amino grupe (Bedner i MacCrehan, 2006; Lebedev, 2007). Pri tom nastaju takozvani sporedni proizvodi dezinfekcije (DBPs, *eng. disinfection by-products*). Problem sa nastankom dezinfekcionih nusproizvoda je u tome što njihova struktura, toksični efekt i način delovanja nisu uvek poznati. Oni su često toksičniji od svojih matičnih jedinjenja (Díaz-Cruz *et al.*, 2008; Díaz-Cruz i Barceló, 2009; Richardson, 2011; Xiao *et al.*, 2013).

Ekotoksikološki podaci za UV filtre predstavljeni u skorašnjim revijalnim radovima potvrđuju njihovu estrogenu hormonalnu aktivnost i da se ponašaju kao endokrini disruptori (Díaz-Cruz *et al.*, 2008; Fent *et al.*, 2010; Brauch i Rand, 2011; Kaiser *et al.*, 2012). Dostupno je nekoliko radova na temu transformacionih karakteristika benzofenonskih UV filtera i potencijalnog ekološkog i rizika po ljudsko zdravlje tokom dezinfekcionih procesa hlorisanja (Yamamoto *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Međutim, ne postoje ekotoksikološki podaci o potencijalno štetnom efektu DHHB UV filtra i njegovih hlorovanih sporednih proizvoda na vodeni svet.

Kako su koncentracije UV filtera u uzorcima vode reda veličine ng/l i niže, za njihovu identifikaciju neophodno je primeniti neku od savremenih instrumentalnih tehnika. Masena spektrometrija (MS) je dokazano najmoćnija analitička tehnika za rešavanje pitanja u životnoj sredini. Nekoliko skorijih revijalnih radova pokazuju kolika su dostignuća ove metode u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi emergentnih

zagađujućih supstanci (uključujući i UV filtre) i njihovih transformacionih proizvoda (Richardson i Ternes, 2011; Pedrouzo *et al.*, 2011; Richardson, 2012; Wille *et al.*, 2012; Lebedev, 2013). Masena spektrometrija se koristi i kao osnovni metod za određivanje i kvantifikaciju sporednih (hlorovanih) proizvoda dezinfekcije.

U okviru ovog rada ispitivana su tri benzofenonska UV filtra čije je korišćenje dozvoljeno za pripremu kozmetičkih proizvoda na evropskom tržištu: dietilaminohidroksibenzoil heksil benzoat (DHHB), 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3) i 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (BP4).

Glavni cilj ovog rada bilo je ispitivanje sudbine DHHB UV filtra nakon što dospe u životnu sredinu, naročito u vodene sisteme (prirodne i bazenske vode) u kojima se koriste hlorni agensi kao dezinfekciona sredstva (npr. natrijum hipohlorit, trihloroizocijanurna kiselina), kao i ispitivanje toksičnosti kako polaznog jedinjenja tako i njegovih hlorovanih proizvoda. S obzirom da je DHHB UV filter relativno nov na tržištu i podataka o njegovoj transformaciji u životnoj sredini i ekotoksičnosti ima jako malo, on je bio glavni predmet ovog rada, a pored njega ispitivanja su vršena i na BP3 i BP4 kao najčešće korišćenim benzofenonskim UV filtrima.

Kako bi se realizovao postavljeni cilj bilo je potrebno ispitati stabilnost BP3, BP4 i DHHB UV filtera u prisustvu hlora u neutralnoj vodenoj sredini dodavanjem NaOCl ili TCCA, i stabilnosti ovih UV filtera i njihovih hlorovanih proizvoda kada se izlože UV zračenju. Ispitivanje je vršeno u fotoreaktoru sa šest živinih fluorescentnih lampi koje emituju UVA (355 nm) zračenje. Za praćenje kako dezinfekcionih tako i eksperimenata fotostabilnosti korišćene su instrumentalne tehnike tačna hromatografija visokih performansi (HPLC) i tačna hromatografija visokih performansi u kombinaciji sa masenom spektrometrijom, HPLC-MS i HPLC-MS-MS, sa preciznim merenjem masa.

Za potrebe većine izvedenih eksperimenata bilo je neophodno sintetisati i potpuno okarakterisati hlorovane proizvode BP3, BP4 i DHHB UV filtra, jer ova jedinjenja nisu bila dostupna na tržištu. Iz ekonomskih i praktičnih razloga, sintetisan je i DHHB. U ovom radu su predstavljeni postupci sinteze i kompletna karakterizacija sintetisanih jedinjenja kao neophodan korak za istraživački rad vezan za hemiju životne

sredine i odabranih UV filtera. Za identifikaciju i karakterizaciju svih sintetisanih proizvoda primenjivane su sledeće instrumentalne tehnike: ^1H i ^{13}C nuklearna magnetna rezonancija (NMR), UV-Vis spektrofotometrija, infracrvena spektroskopija (IR), masena spektrometrija visoke rezolucije (MS-TOF), tečna hromatografija visokih performansi (HPLC-DAD), tečna hromatografija visokih performansi u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS-TOF).

Zbog nedostatka ekotoksikoloških podataka, jedan od ciljeva ovog rada bilo je i ispitivanje akutne toksičnosti DHHB UV filtra i njegovih hlorovanih proizvoda korišćenjem standardizovanih testova na vodenim test organizmima kakvi su luminescentna bakterija *Vibrio fischeri*, slatkovodna jednoćelijska alga *Pseudokirchneriella subcapitata* i slatkovodni račić *Daphnia magna*. Pored toga, izvršena je i toksikološka procena za UV filtre BP3 i BP4 na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri*. Dodatni cilj ovog istraživanja bio je da se uradi uporedna studija toksičnosti polaznih jedinjenja i njihovih transformacionih proizvoda, kao i ostalih benzofenonskih UV filtera. Data je i korelacija između toksičnih efekata i hemijske strukture, ali i specifičnog biološkog odgovora organizma na određena jedinjenja. Konačno, još jedan cilj ovog rada bio je da do sada slabo ispitani DHHB UV filter i njegovi hlorovani proizvodi rangiraju prema njihovom toksikološkom potencijalu među ostalim benzofenonskim UV filtrima koji su već testirani na nekim vodenim model organizmima.

Da bi se utvrdilo prisustvo BP3, BP4 i DHHB UV filtera i njihovih hlorovanih proizvoda u životnoj sredini, ispitivani su uzorci voda sa nekoliko kupališta i bazena u Sloveniji i Srbiji.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Ultraljubičasto (UV) zračenje

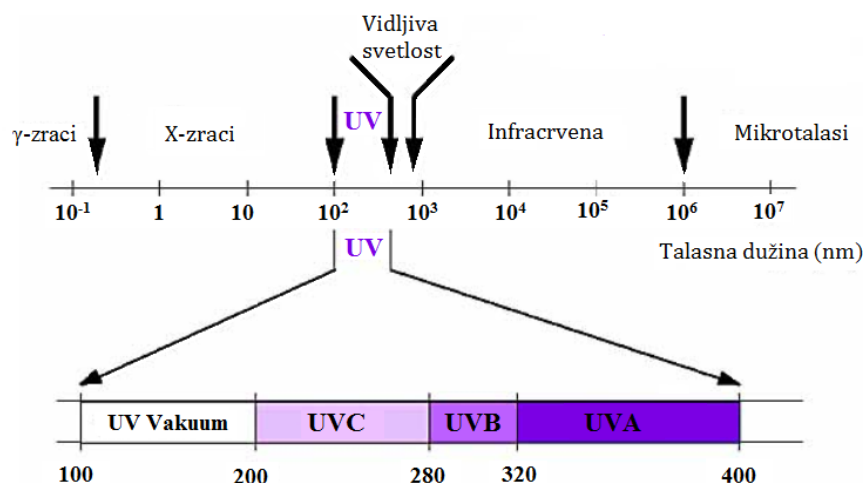
Sunce sa prečnikom 1,4 miliona kilometara i masom koja je skoro trista hiljada puta veća od Zemljine, predstavlja centar našeg planetarnog sistema. Skoro celokupna energija na Zemlji potiče od Sunca i dolazi u vidu elektromagnetnog zračenja. Prema energiji, odnosno frekvenciji, elektromagnetno zračenje koje dospeva na zemlju delimo na vidljivo (Vis), ultraljubičasto (UV) i infracrveno (IC), odnosno toplotno zračenje. Vidljiva svetlost (400-700 nm) je odgovorna za pokretanje vitalnih procesa u živim organizmima, kao što je fotosinteza, koja obezbeđuje materijal za lanac ishrane i održava nivo kiseonika u atmosferi, za kontrolu rasta biljaka i sezonski razvoj, i omogućava vid, pomoću kog viši organizmi dobijaju informaciju o svom okruženju.

Ultraljubičasto (UV) zračenje (100-400 nm) je deo elektromagnetnog spektra koje je od posebnog značaja za našu kožu. Ultraljubičasto zračenje takođe igra važnu ulogu u održavanju niskih koncentracija ozona u gornjim slojevima atmosfere, koji zauzvrat apsorbuje većinu štetnog kratkotalasnog UV zračenja i tako ga sprečava da dospe na zemljinu površinu. Pored ozonskog omotača svetlost apsorbuju i druge komponente atmosfere: kiseonik, vodena para, kristali leda, ugljen-dioksid, azot, čestice prašine. Tako se približno 25% ukupnog zračenja apsorbuje u atmosferi, 30% se rasprši, odnosno odbije, i samo 45% zračenja dospe na zemlju.

2.1.1. Podela UV zračenja

Postoji nekoliko podela UV zračenja zavisno od stanovišta. Prema definiciji Međunarodne komisije za svetlost (CIE, Commission Internationale de l'Eclairage ili International Commission of Illumination) UV zračenje se deli na tri oblasti: UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) i UVA (315-400 nm). Prema biološkom dejstvu, UV zračenje se deli na: UVC (180-290 nm), UVB (290-320 nm) i UVA (320-400 nm).

Granice između pojedinih oblasti UV zračenja su manje-više proizvoljno određene i nije ih moguće jasno postaviti, pogotovo kada se govori o biološkom efektu. Zbog toga se u literaturi najčešće sreće načelna podela na: UVC (<280 nm), UVB (280-320 nm) i UVA (320-400 nm) zračenje (*Slika 1*).



Slika 1. *Ultraljubičasti (UV) deo elektromagnetnog spektra*
(Modifikovano prema Soehnge et al., 1997).

Ozonski omotač skoro potpuno apsorbuje visoko-energetsko UVC zračenje i ono tako ne utiče na kožu, a takođe apsorbuje i veliki procenat UVB zračenja. Tako, oko 5% UV zračenja koje dospeva na zemljinu površinu čini UVB, a 95% UVA zračenje (Coyle, 1989).

Ultraljubičasta svetlost koja dospeva na zemlju može da uzrokuje oštećenja različitih materijala koji su joj izloženi. Fotoni svetlosti izazivaju kidanje kovalentnih veza i tako uzrokuju različite oksidacione procese, uglavnom slobodno-radikalске lančane oksidacije vazдушnim kiseonikom koje vode starenju i uništavanju različitih građevinskih materijala, lakova, plastike, gume itd. Osnova svake fotohemijske reakcije u nekom materijalu je reakcija između energetske čestice (fotona svetlosti) i molekula tog materijala. Organski molekul koji apsorbuje foton, prelazi u takozvano elektronski “pobuđeno” stanje. On predstavlja molekulsku vrstu čiji elektroni nisu raspoređeni tako da ispunjavaju uslov najniže energetske konfiguracije, dakle predstavlja manje stabilno stanje i prema tome, pogodnije za hemijske reakcije (Coyle, 1989).

2.1.2. UV indeks (UVI) i minimalna eritemska doza (MED)

Aktivni spektar UV zračenja predstavlja zavisnost intenziteta UV zračenja koje ima biološko dejstvo od njegove talasne dužine.

Intenzitet zračenja (fluks) u nekom intervalu talasnih dužina (λ , $\lambda + d\lambda$) se izražava u W/m^2 . To je fizička jedinica, koja se koristi za izražavanje apsolutnih vrednosti intenziteta zračenja. Međutim, ovakav način prezentovanja intenziteta UV zračenja nije pogodan za javnost. Zbog toga je 1994. godine zajedničkim delovanjem Svetske zdravstvene organizacije (World Health Organization - WHO), Svetske meteorološke organizacije (World Meteorological Organization - WMO), Programa Ujedinjenih nacija za životnu sredinu (United Nations Environment Programme - UNEP) i Međunarodne komisije za zaštitu od nejonizujućeg zračenja (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection - ICNIRP) usvojena je nova internacionalna jedinica intenziteta UV zračenja, koja je prihvatljiva za javnost i naziva se UV indeks (UVI). Jedinica UV indeks se definiše kao intenzitet zračenja od 25 mW/m^2 i njemu odgovara vrednost od 1 UV indeksa, dok intenzitetu zračenja od 250 mW/m^2 odgovara vrednost od 10 UV indeksa. Podela UV zračenja prema intenzitetu izraženom u jedinici UV indeks, na osnovu dejstva koje UV zračenje ima na koži data je na slici 2.

UV INDEKS	NIVO ZRAČENJA
0-2	NISKI NIVO
3-5	SREDNJI NIVO
6-7	VISOKI NIVO
8-10	VRLO VISOKI NIVO
>10	EKSTREMNO VISOKI NIVO

Slika 2. Podela UV zračenja prema intenzitetu (UV indeks).

Vrednosti UV indeksa kreću se od nule, pa naviše. Što su vrednosti UVI veće, veće je štetno dejstvo UV zračenja na kožu i oči, a potrebno je kraće vreme da do oštećenja dođe.

Efekti UV zračenja su kumulativni, što znači da je pored intenziteta zračenja važno i vreme izlaganja zračenju. Doza zračenja se uopšteno definiše kao proizvod intenziteta zračenja i vremena izlaganja tom zračenju.

Doza zračenja koja dovodi do pojave crvenila (eritema) na koži, koja prethodno nije bila izlagana dejstvu UV zračenja, naziva se minimalna eritemska doza (MED) (ISO 2000). Vrednost jedne minimalne eritemske doze zavisi od tipa kože i obično se kreće u vrednostima od 200-300 J/m² (Sayre *et al.*, 1981; Parrish *et al.*, 1982; Pathak i Fanselow, 1983).

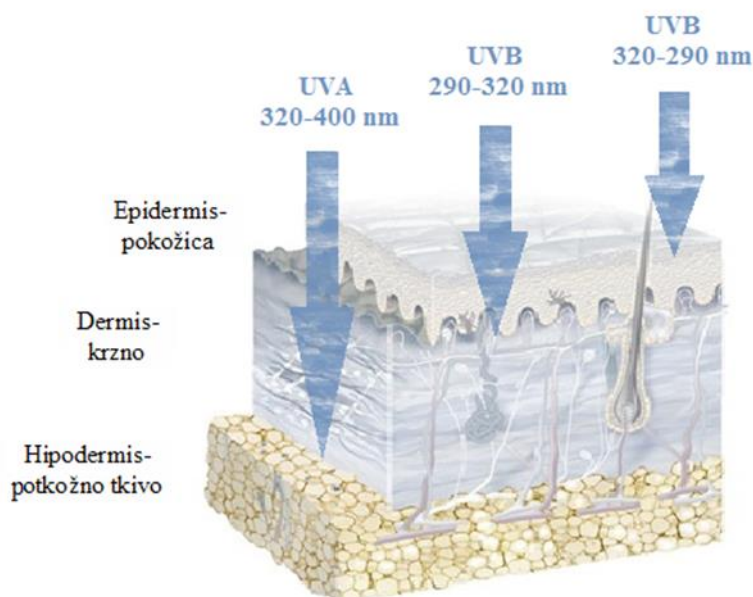
2.2. Uticaj UV svetlosti na kožu

Koža (*cutis*) je najveći ljudski organ koji prekriva celokupnu površinu čovekovog tela. Uloga kože je višestruka: zaštitna (mehanički, fizički, hemijski uticaji, infekcije), termoregulaciona (razmena toplote), organ čula (senzibilitet), sekretorna (izlučivanje štetnih materija putem znoja). Sastoji se iz dva sloja: površinskog sloja – pokožice i dubokog sloja – krzna.

Dubina prodiranja UV zračenja u kožu zavisi od talasne dužine (*Slika 3*). Što je talasna dužina zračenja manja, manja je i dubina njegovog prodiranja. Dubina prodiranja UVB zračenja je znatno manja od dubine prodiranja UVA zračenja. UVB zračenje prodire do epidermisa, gde i ispoljava svoje biološko dejstvo, dok UVA zračenje (preko 50%) prodire dublje do koriuma (krzna).

Pri izlaganju kože UV zračenju, dolazi do interakcije fotona zračenja sa biološkim makromolekulima u površinskom sloju kože – epidermisu. Fizički procesi koji se tom prilikom odigravaju su: refleksija, rasejanje, transmisija i apsorpcija. Od ovih procesa zavisi način dejstva zračenja na kožu.

Refleksija i rasejanje su procesi pri kojima dolazi do promene smera, odnosno odbijanja fotona zračenja bez razmene energije i nemaju efekta na kožu. Procesom transmisije dolazi do prodiranja zračenja do dubokih slojeva kože.



Slika 3. Ilustracija približne penetracije UV zračenja u kožu

(Izvor: <http://www.eucerin.bg/about-skin/basic-skin-knowledge/skin-structure-and-function>).

Apsorpcija zračenja predstavlja uslov i početak bilo koje fotohemijske reakcije. Do apsorpcije zračenja može doći u bilo kom sloju kože, ali samo u prisustvu određenih molekula, tzv. hromofora. Od koncentracije i rasporeda ovih molekula, zavisi intenzitet reakcije kože na dejstvo UV zračenja. Različite hromofore apsorbuju zračenje različitih talasnih dužina. Tako najveći deo UVB zračenja apsorbuju hromofore raspoređene u epidermisu, kao što su: amino-kiseline (tirozin, triptofan), nukleinske kiseline (DNK), proteini (npr. keratin), pigmenti (melanin), urokanska kiselina, holesterol. Kod svih ovih molekula, osim kod melanina, apsorpciona efikasnost naglo opada sa povećanjem talasne dužine zračenja, tako da vrlo malo ili uopšte ne apsorbuju zračenje iz UVA spektralnog područja.

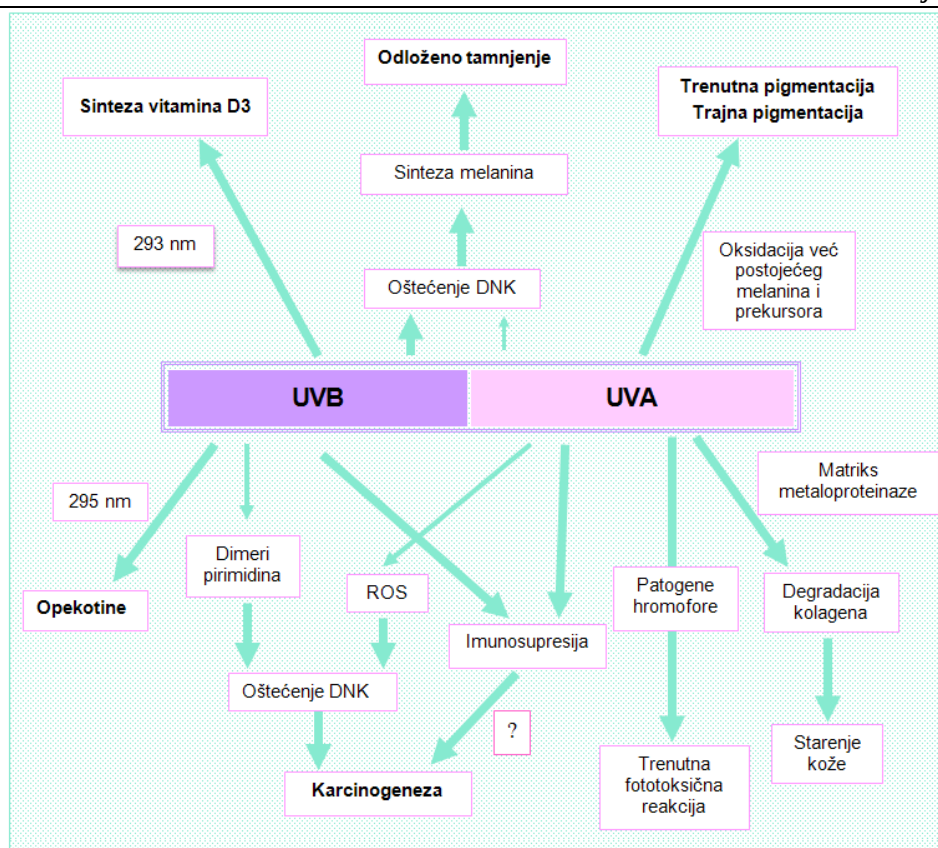
Melanin apsorbuje UVA i vidljivo zračenje, oslobađa energiju u vidu toplote i inhibira lančane reakcije slobodnih radikala koji pri tom nastaju. Pri tom dolazi do trenutne pigmentacije već 15 minuta nakon izlaganja zračenju. Ta boja nije trajna i nestaje već nakon dva sata. Veće doze UVA zračenja uzrokuju trajniju pigmentaciju i više braon boju kože. Ni trenutna ni trajna pigmentacija ne predstavljaju novu sintezu

melanina, već nastaju kao rezultat foto-oksidacije već postojećeg melanina i prekursora. Ovi procesi ne štite kožu od opekotina (Reichrath, 2008).

UVB zračenje je najodgovornije za sintezu novog melanina (tzv. melanogenezu). Novosintetisani melanin, koji je bezbojan, se nizom biohemijskih procesa transformiše u žuto-smeđi pigment melanin. Kako je za ovaj proces potrebno izvesno vreme, maksimalno tamnjenje kože je vidljivo tek posle 10 sati od početka sunčanja. Osnovni zadatak tamnog melanina je da zaštiti ćelije bazalnog sloja epidermisa od štetnog dejstva UV zračenja. Prema tome, ovaj proces predstavlja zaštitni mehanizam kože na dejstvo UV zračenja.

Uticaj ultraljubičastog zračenja na ljudsko zdravlje, pre svega na ljudsku kožu, može biti i koristan i štetan (*Slika 4*). Najvažniji koristan efekat izlaganja UVB zračenju je fotoprodukcija vitamina D u koži, odnosno konverzija provitamina D u njegov vitamin D₃. Kod većine ljudi više od 90% vitamina D se proizvodi usled izlaganja sunčevom UVB zračenju (Norval *et al.*, 2009). Vitamin D je veoma važan za naše opšte zdravstveno stanje, jer pomaže resorpciju kalcijuma i fosfata i njihovu integraciju u kosti. Osim toga, svetlost utiče na poboljšanje odbrambenih sposobnosti organizma i poboljšanje fizičke izdržljivosti. Pozitivnim efektom se, uslovno, može smatrati i aktiviranje zaštitnih mehanizama kože od dejstva zračenja: zadebljanje površinskog sloja kože – epidermisa i aktiviranje procesa melanogeneze i sinteza melanina. Kapacitet zaštitnih mehanizama kože je ograničen i zato prekomerno sunčanje izaziva ireverzibilne promene koje dovode do narušavanja zdravlja i lepog izgleda kože.

S druge strane, dobro je poznato da preterano izlaganje sunčevom zračenju bez zaštite može izazvati kako trenutna oštećenja kože (opekotine od sunca), prevremeno starenje kože, tako predstavlja i glavni uzrok pojave različitih oblika karcinoma kože. Akumuliranje velikih doza zračenja može da dovede do pojave mutacija DNK i kancerogeneze. Fototoksični učinak UVB zračenja javlja se pri dozi većoj od jedne minimalne eritemske doze (1 MED).



Slika 4. Biološki uticaj UV zračenja na ljudsku kožu (modifikovano prema Reichrath, 2008).

Smatra se da UVB zračenje izaziva opekotine na koži i direktno fotohemijsko oštećenje DNK. Ono je, kao što je već rečeno, i najefikasnije u stimulaciji pigmentacije (malenogeneze ili tamnjenja) kože. UVB zračenje je važno za inicijaciju tumora, a UVA zračenje uglavnom uzrokuje napredovanje tumora. UVA zračenje je odgovorno za trenutno tamnjenje kože i za odloženo tamnjenje, ali je takođe odgovorno za starenje kože i indirektna oštećenja DNK. UVA indukuje niz matriks metaloproteinaza koje degradiraju kolagen (Reichrath, 2008). Matriks metaloproteinaze su degradirajući fermenti iz familije endopeptidaza za koje se pretpostavlja da igraju značajnu ulogu u procesu tumorskog napredovanja i nastanku metastaza. U poređenju sa UVB, UVA zračenje češće uzrokuje oksidativni stres i 10 puta je efikasnije u izazivanju lipidne peroksidacije (proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta, ROS¹), sa izraženijim citotoksičnim efektom (Girard *et al.*, 2011). Oksidativni stres izazvan UVA zračenjem je dodatno pojačan prisustvom patogenih hromofora u koži, koje nakon UV zračenja proizvode mnogo više reaktivnih kiseoničnih vrsta nego hromofore u koži pod

¹ ROS, eng. *Reactive Oxigene Species*

normalnim uslovima (Reichrath, 2008). Zračenje iz obe spektralne oblasti, UVA i UVB, izaziva supresiju imunološkog odgovora kože, čak i u dozi manjoj od minimalne eritemske.

Najčešći oblik raka kože je bazeocelularni karcinom, koji se javlja kao posledica prekomerne izloženosti sunčevom zračenju i predstavlja oko 75 posto svih oblika raka kože kada su u pitanju pripadnici bele rase (Maier i Korting, 2005; Lautenschlager *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Barysch *et al.*, 2010). Najopasniji vid raka kože koji je najčešće i letalan, je melanom (Lund i Timmins, 2007), za koji se pouzdano ne zna da li je izazvan UVA ili UVB zračenjem, ili oboma (Ivry *et al.*, 2006).

Dermatolozi razlikuju nekoliko tipova kože zavisno od načina i brzine reakcije na UV zračenje. Fototipovi kože se označavaju brojevima od I (melanokompromitovana – veoma svetao ten) do VI (melanozaštićena – taman ten) (Fitzpatrick *et al.*, 1988). Za evropsku populaciju su uobičajena prva četiri tipa kože (*Tabela 1*), gde su prva dva melanokompromitovani a druga dva melanokompetentni. Pored njih postoje još dva tipa, prirodno braon i crna koža, koji spadaju u melanozaštićeni tip i nikad ne gore. Što je niži fototip, koži je potrebno više zaštite jer je brža i izvesnija pojava eritema i opekotina (Brenner i Hearing, 2008).

Tabela 1. Tipovi kože i njihove karakteristike

TIP KOŽE	NAZIV TIPA KOŽE	OPIS KOŽE	REAKCIJA NA SUNCE		MED [J/m ²]	VREME TRAJANJA SOPSTVENE ZAŠTITE* [min]
			OPEKOTINE	TAMNJENJE		
I	Keltski tip	Veoma svetla	Uvek i bolne	Nema ga	200	15-20
II	Germanski tip	Svetla	Skoro uvek i bolne	Slabo do umereno	250	20-25
III	Srednje-evropski tip	Svetla do svetlo-smeđa	Retko i umereno	Primetno	350	28-35
IV	Mediterranski tip	Svetlosmeđa	Skoro nikad	Brzo i duboko	450	36-45

*Vreme potrebno da dođe do prve pojave crvenila

2.3. Fotozaštita u kozmetičkim preparatima

Postoji nekoliko načina da se zaštiti koža od štetnog efekta UV zračenja. Svetska zdravstvena organizacija (SZO, 2014) preporučuje izbegavanje izlaganja suncu u podnevnim časovima, skrivanje u hladu, nošenje adekvatne zaštitne odeće i naočara za sunce i, naravno, nanošenje krema za zaštitu od sunca. Osnovni sastojci kozmetičkih preparata za zaštitu od sunca su UV apsorbujuće supstance, poznatije kao UV filtri, koje se dodaju sa ciljem da štite od štetnog uticaja UV zračenja.

Kozmetika za zaštitu od sunca (*eng. Sunscreens*) može se definisati kao „svaki kozmetički proizvod koji u svom sastavu sadrži UV filtre u nameri da zaštiti kožu od štetnog UV zračenja, sprečavajući ili svodeći na minimum štetu koju ovo zračenje može imati po ljudsko zdravlje“. Prvi preparati za zaštitu od sunca pojavili su se na tržištu još početkom dvadesetog veka. Komercijalno najuspešniji među njima bio je „Ambre Solaire“. Ulje za zaštitu od sunca, koje je sadržalo UV filter benzil salicilat, proizveo je osnivač kompanije L'Oréal, francuski hemičar Eugène Schueller (Urbach, 2001). Tokom Drugog svetskog rata, razvoj preparata za zaštitu od sunca podržala je vlada Sjedinjenih država sa ciljem da se pronađe pogodno zaštitno sredstvo koje bi sprečilo opekotine od sunca među njihovim vojnicima na Južnom Pacifiku (Phillips, 2004). Međutim, u isto vreme je među opštom populacijom postao popularan taman ten i predstavljao je sinonim za zdravlje. Kao rezultat, proizvodili su se losioni za sunčanje koji su omogućavali da se lako dođe do preplanulog tena. Oni su pružali minimum zaštite od sunca ali su ipak sprečavali opekotine, pa su korisnici mogli duže da ostanu na suncu i postignu željeni izgled. Pravi preparati za zaštitu od sunca koji su nudili viši nivo zaštite kože, a istovremeno i smanjivali reakciju tamnjenja kože u jedinici vremena, došli su u širu upotrebu tek kasnih sedamdesetih godina dvadesetog veka. To se može pripisati pojavi sve učestalijih i brojnih kampanja zdravstvenih organizacija koje su upozoravale na štetne efekte izlaganja UV zračenju. Danas, potrošači usvajaju navike u zaštiti od sunca čak i u svakodnevnom životu. Stoga se UV filtri, osim u uobičajene kreme za zaštitu od sunca, dodaju u brojne druge kozmetičke preparate, kao što su preparati za negu i ulepšavanje lica i tela, šminka itd. Štaviše, UV filtri se mogu dodavati u proizvode za ličnu negu kako bi zaštitili proizvod od fotodegradacije.

Veoma je važno da svrha zaštite od sunca nije produženje vremena do tamne boje kože, već ograničavanje rizika kod razumne izloženosti. Zabluda je da se kreme sa većim zaštitnim faktorom duže zadržavaju na koži i ostaju efikasne u odnosu na kreme sa manjim zaštitnim faktorom. Faktor zaštite od sunca ili SPF (*eng. Sun Protection Factor*) je širom sveta priznat kao vrednost koja potrošačima daje opštu sliku o tome koliku zaštitu, prvenstveno od UVB zraka, pruža neki preparat. Obeležava se brojevima od 1-30 i više. SPF je broj koji predstavlja odnos između doze UV zračenja koju koža apsorbira i koja dovodi do pojave eritema kod zaštićene kože, i doze zračenja koja dovodi do pojave eritema kod kože bez zaštite (1).

$$SPF = \frac{MED_{zk}}{MED_{nk}} \quad (1)$$

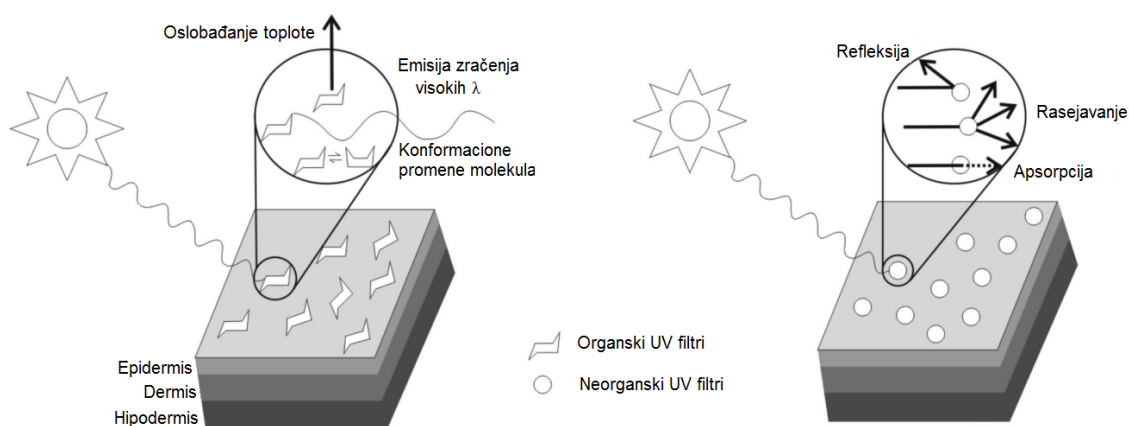
Minimalna eritemna doza (MED) je količina ili vreme zračenja potrebno da se na koži izazove prvo crvenilo (*zk* – kod zaštićene kože; *nk* – kod nezaštićene kože) koje je postojalo u toku 24 h. Na primer, zaštitni faktor 15 označava da koža apsorbira 1/15 ili 6,7% od onog zračenja koje bi apsorbirala koža bez zaštite, što znači da pruža 93,3% UV zaštite. Za SPF 30, koža apsorbira 1/30 odnosno 3,3%, što znači da je zaštita 96,6%. Faktor 50 štiti 98%. Konkretnije, SPF 6 označava da osoba koja dobija minimalni eritem nakon 10 minuta izlaganja nezaštićene kože sunčevom zračenju, u uslovima primenjenog zaštitnog sredstva eritem će dobiti nakon 60 minuta (10 min x 6) izlaganja kože suncu. Delotvornost krema za sunčanje tokom vremena opada, zato je preporučljivo da se svaka 2 sata kao i posle svakog kupanja, krema za sunčanje ponovo nanese.

2.4. UV filtri

Kozmetički preparati za zaštitu od sunca koriste se već više od 80 godina i sadrže supstance poznate kao ultraljubičasti (UV) filtri. UV filtri su supstance sposobne da apsorbiraju, reflektuju i/ili rasejavaju UV zračenje i tako zaštite ljudsku kožu od direktnog izlaganja štetnom delu spektra sunčevog zračenja. Aktivne komponente preparata za zaštitu od sunca mogu biti neorganski i organski UV filtri. Ova podela je izvršena prema načinu delovanja. Obično se organski UV filtri zovu hemijskim UV

filtrima jer se njihov način delovanja svodi na hemijske promene u njihovim molekulima koje sprečavaju da UV zračenje prodre u kožu. Neorganski UV filtri, takođe su poznati kao fizički UV filtri, jer se način na koji oni štite od sunčevog zračenja vezuje za fizičke pojave, kao što su rasejavanje ili refleksija (odbijanje) UV zračenja. Organski UV filtri apsorboju fotone svetlosti i brzo se vraćaju u osnovno stanje uz termičko emitovanje energije kroz nekoliko vibracionih prelaza (vibraciona relaksacija). Zatim, ako su stabilni, UV filtri mogu apsorbovati novi foton i ponoviti proces i na taj način zaštititi kožu od UV zračenja.

Ispravna nominacija UV filtera bi bila neorganski i organski (a ne fizički i hemijski), jer su i jedni i drugi hemijska jedinjenja koja se razlikuju po svojoj molekulskoj strukturi, a termini fizički i hemijski se odnose na njihov način delovanja. Različiti načini delovanja organskih i neorganskih UV filtera ilustrovani su na *slici 5* (Morabito *et al.*, 2011; Manaia *et al.*, 2013). Do sada su napravljeni različiti proizvodi za zaštitu od sunca koji sadrže više različitih UV filtera kako bi pokrili širi opseg talasnih dužina, odnosno pružaju zaštitu i od UVA (320-400 nm) i od UVB (290-320 nm) zračenja.



Slika 5. Način delovanja organskih (levo) i neorganskih (desno) UV filtera (modifikovano prema Manaia *et al.*, 2013).

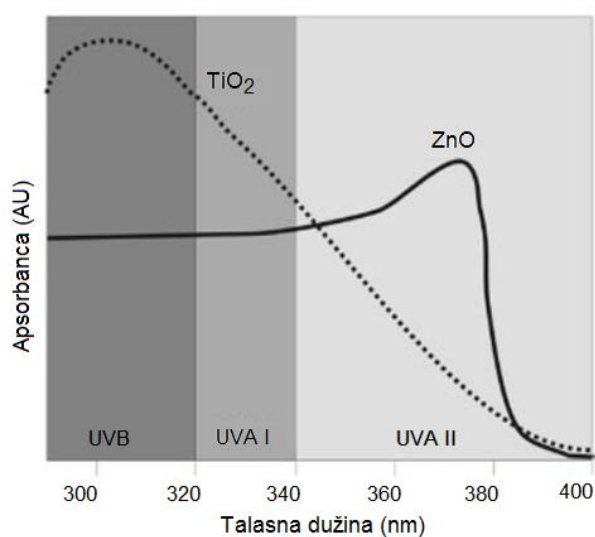
2.4.1. Neorganski UV filtri

“Fizički UV filtri su obično neprozirni proizvodi i sadrže komponente koje su po prirodi čestice koje neselektivno apsorbuju UV svetlost, ali kada se nanese na kožu u tankom sloju, one primarno odbijaju i rasejavaju UV i vidljivo zračenje zbog veličine čestica i debljine sloja” (Pathak, 1986). Međutim, primećeno je da neki od neorganskih UV filtera, imaju sposobnost apsorpcije u oblasti elektromagnetnog spektra u oblasti ispod 400 nm (Kollias *et al.*, 1986). Prema tome, postoji podela i među neorganskim UV filtrima, na one koji odbijaju zračenje (gde spadaju BaSO₄ i talk²) i one koji osim što odbijaju svetlost određenih talasnih dužina, apsorbuju zračenje drugih talasnih dužina. Tu spadaju dva najpoznatija UV filtra, titanijum dioksid (TiO₂) i cink oksid (ZnO), kao i obojeni gvožđe oksidi. Neorganski UV filtri iz prve grupe, barijum sulfat (BaSO₄) i talk, da bi bili efikasni moraju biti u većoj količini naneti na kožu. Ako nisu kao puder ili kao tanak sloj vidljivi na koži, oni ne mogu rasejavati svetlost, te je njihova upotreba ograničena. Gvožđevi oksidi apsorbuju u vidljivoj oblasti elektromagnetnog spektra, te su i oni nepraktični za komercijalne formulacije. S druge strane, upotreba titanijum dioksida i cink oksida u preparatima za zaštitu od sunca ima smisla, jer TiO₂ i ZnO imaju širok apsorpcioni maksimum na talasnim dužinama u ultraljubičastom delu elektromagnetnog spektra (ispod 400 nm). TiO₂ pruža zaštitu u širokom spektralnom opsegu UV zračenja, dok ZnO ima apsorpcione maksimume u UVA oblasti. Apsorpcioni spektri TiO₂ i ZnO prikazani su na *Slici 6*. Podešavanjem veličine čestica, odnosno pažljivom formulacijom, smanjuje se njihova optička sklonost ka odbijanju zračenja, a povećava apsorpcija (Sayre *et al.*, 1990).

U odnosu na organske, neorganski UV filtri imaju dve značajne prednosti:

- odbijaju i/ili apsorbuju zračenje u celokupnom UV delu spektra (UVA i UVB),
- ne prodiru u kožu, i zato ne izazivaju alergijske reakcije.

² Talk je mineral, po hemijskom sastavu hidratizirani magnezijum silikat formule Mg₃Si₄O₁₀(OH)₂. Često je dovođena u pitanje njegova bezbednost, s obzirom da može da sadrži opasne kontaminante, kao što je azbest.



Slika 6. Apsorpcioni spektri TiO_2 i ZnO (Manaia et al., 2013).

2.4.2. Organski UV filtri

Kada se govori o UV filtrima, uglavnom se misli na organske UV filtre. Organski UV filtri su obično aromatična jedinjenja, koja apsorbuju UV svetlost u oblasti od 100 do 380 nm. UV filtri su obično lipofilnog karaktera i u svojoj strukturi poseduju mono ili poli aromatične prstenove, često sa konjugovanim ugljenik-ugljenik dvostrukim vezama i/ili karbonilnim grupama koje su sposobne da smanje prenos energije solarnih fotona koji dospevaju do površine zemlje. Kada prime energiju od UV fotona, organski UV filtri mogu da se ponašaju na tri načina: a) podležu konformacionim promenama molekula, b) emituju zračenje većih talasnih dužina ili c) oslobađaju energiju koju su primili kao toplotu (*Slika 5*). Apsorpcija energije u ultraljubičastom i vidljivom delu spektra elektromagnetnog zračenja prouzrokuje pobuđivanje valentnih elektrona atoma i molekula. Elektroni se kod molekula u osnovnom, nepobuđenom stanju, nalaze u različitim vezivnim ili nevezivnim orbitalama (Saath, 1987; Sayre et al., 1990). Teorija molekulskih orbitala pored vezivnih i nevezivnih orbitala predviđa takođe i postojanje antiveznih orbitala, koje imaju višu energiju od vezivnih i obično su prazne. Kada molekul apsorbuje foton, jedan elektron iz vezivne, odnosno nevezivne orbitale, prelazi u antivezivnu. Tada govorimo o fotopobuđivanju (fotoekscitaciji) molekula, a taj prelaz nazivamo $n \rightarrow \pi^*$ prelaz. Molekul etena, na primer, za taj prelaz zahteva energiju koja odgovara svetlosti talasne

dužine od 180 nm, što nema praktični značaj za proizvode za zaštitu od sunca jer je ovo zračenje uglavnom apsorbovano u stratosferi od strane ozonskog omotača. Kod molekula 1,3-butadiena za fotohemijsku ekscitaciju potrebna je energija koja odgovara talasnoj dužini od 230 nm. Konjugacija dvostrukih veza smanjuje energiju koja je potrebna za ekscitaciju (odnosno povećava talasnu dužinu sa 180 na 230 nm) i to zbog mogućnosti lake delokalizacije elektrona (rezonancije) unutar molekula. Dakle, produžetkom konjugacije, energetske zahteve za ekscitaciju se smanjuju, i tako molekul 1,3,5-heksatriena apsorbuje zračenje na 258 nm, a molekul kakav je β -karoten, koji ima dosta konjugovanih dvostrukih veza, apsorbuje zračenje na talasnoj dužini čak od 452 nm. Zbog toga su ovakva jedinjenja obojena, jer apsorbuju u vidljivom delu spektra elektromagnetnog zračenja.

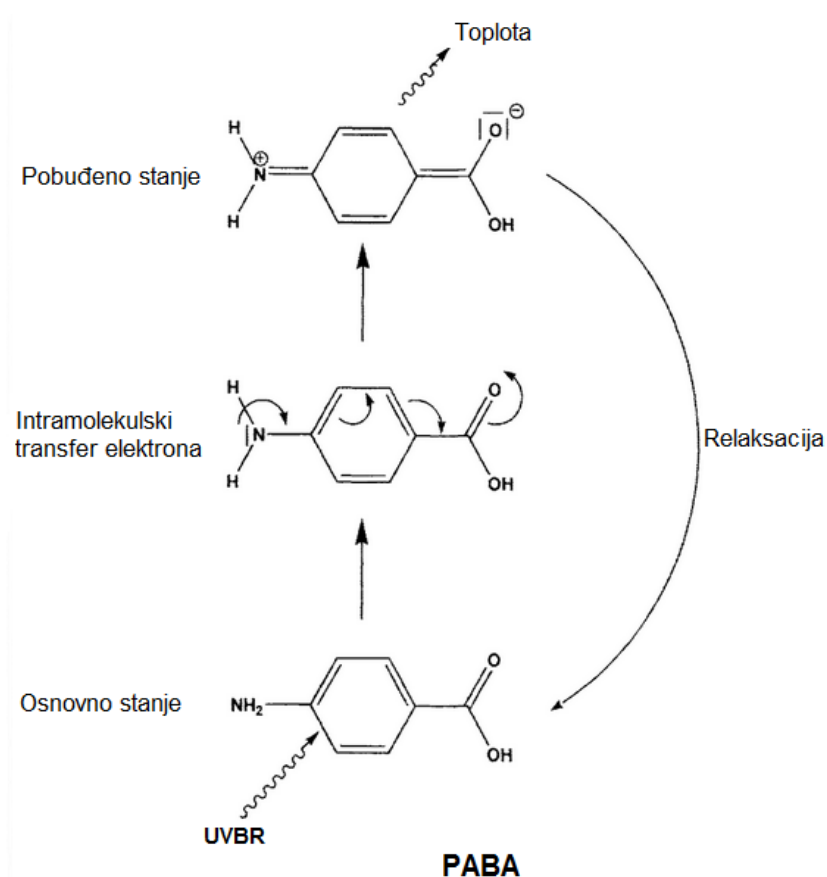
Sličan učinak takođe imaju funkcionalne grupe: -OH, -OR, -NH, -X, -SH, -SR, vezane za nezasićen molekul, i one tako omogućavaju π delokalizaciju elektrona i produžetak rezonantne delokalizacije na ceo molekul. Naime, one omogućavaju $n \rightarrow \pi^*$ prelaz elektrona, iz nevezivnih u antivezivne orbitale.

Aromatična jedinjenja su još kompleksnija u pogledu fotohemijske ekscitacije. Kod njih veliki uticaj na apsorpciju imaju supstituenti, njihova priroda i položaj. To su obično disupstituisana aromatična jedinjenja koja imaju najmanje jednu karbonilnu grupu (keton ili estar) i jedan elektrondonorski supstituent (obično sa atomom azota ili kiseonika) koji je u *orto* ili *para* položaju u odnosu na karbonilnu grupu. Ove hromofore apsorbuju UV zračenje kroz delokalizaciju rezonantnih elektrona pri čemu dolazi do fotohemijske ekscitacije, odnosno molekul iz svog osnovnog singletnog stanja S_0 prelazi u pobuđeno elektronsko stanje S_1 , odnosno u viši energetske nivo (Reicharth, 2008). Kod većine „klasičnih“ UVB filtera, kao što je *p*-aminobenzoat, PABA, dolazi do tranzitorne polarizacije organskog molekula (*Slika 7*).

Zbog svog veoma lipofilnog karaktera ($\log K_{ow}$ ³ 4-8) i relativne otpornosti na biodegradaciju, organski UV filtri pokazuju jaku sklonost da se akumuliraju u tkivima životinja, samim tim i u lancu ishrane. Nekoliko UV filtera detektovano je u tkivima

³ K_{ow} – Koeficijent raspodele *n*-oktanol/voda

riba u opsegu koncentracija 25-1800 ng/g (Balmer *et al.*, 2005; Buser *et al.*, 2006, Fent *et al.*, 2010; Zenker *et al.*, 2008) i u humanom mleku 16-417 ng/g (Giokas *et al.*, 2007). Dakle, može se zaključiti da UV filtri pokazuju neke osobine koje su tipične za perzistentne (dugotrajne) organske zagađujuće supstance (POPs, *eng. Persistent Organic Pollutants*).

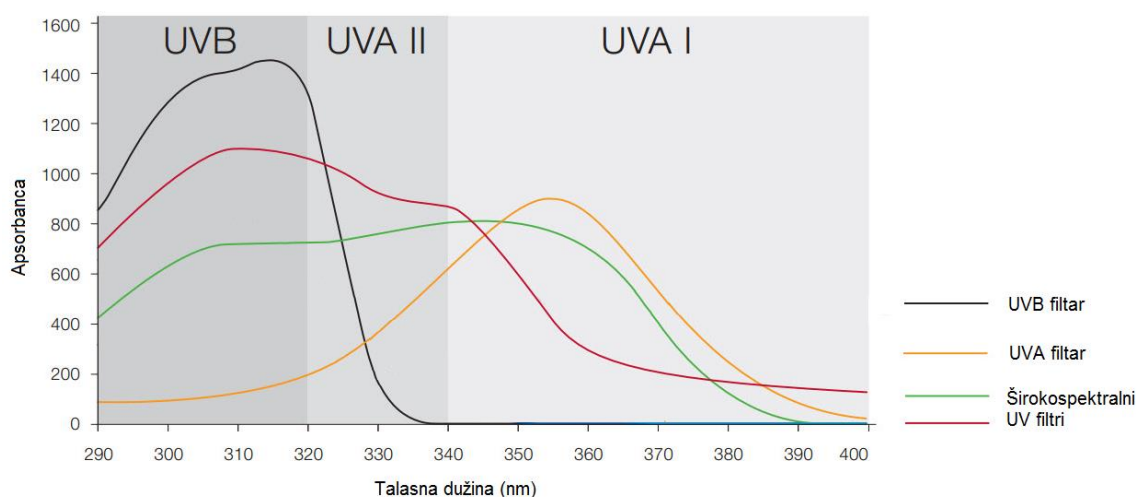


Slika 7. Mehanizam UVB apsorpcije PABA UV filtra (Reichrath, 2008).

2.4.2.1. Podela organskih UV filtera

S obzirom na to koji deo elektromagnetnog spektra najbolje apsorbuju, organske UV filtre delimo na:

- UVA filtre,
- UVB filtre, i
- UVA i UVB filtre (širokospektralni filtri).



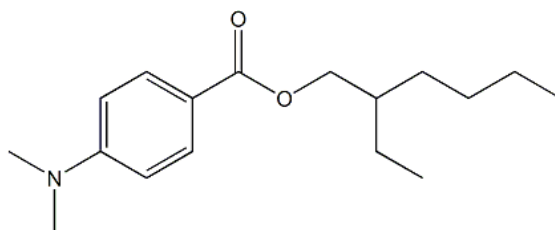
Slika 8. Apsorpcioni spektri UVB, UVA i širokospektralnog UV filtra (prema <http://www.myskinrecipes.com/shop/chemical-sunscreen/998-tris-biphenyl-triazine-nano.html>).

Po strukturi, organske UV filtre delimo na sledeće grupe:

- derivati *p*-aminobenzojeve kiseline (PABA),
- salicilati,
- cinamati ili estri cimetove kiseline,
- benzofenoni,
- derivati dibenzoilmetana,
- derivati kamfora,
- triazini,
- benzotriazoli,
- benzimidazoli,
- benzalmalonati,
- krileni.

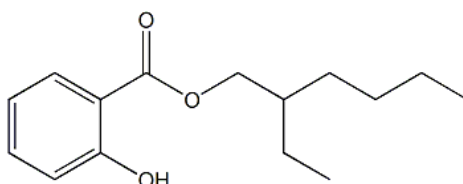
Derivati *p*-aminobenzojeve kiseline (PABA) su među prvim UV filtrima koji su se pojavili na tržištu. U svojoj strukturi imaju jedan benzenov prsten na koji su supstituisane jedna elektron-donorska grupa (NR_2) u *para* položaju u odnosu na elektron-akceptorsku grupu (COOR). Ovakva struktura omogućava efikasnu delokalizaciju elektrona, zbog koje *para*-aminobenzoati apsorbuju u UVB oblasti

zračenja ($\lambda_{\max}^4$ na 290 nm). Jedan od najviše korišćenih PABA derivata je 2-etilheksil 4-(dimetilamino)benzoat (EHDPABA) (Slika 9).



Slika 9. 2-Etilheksil 4-(dimetilamino)benzoat (EHDPABA).

Salicilati (derivati monohidroksi benzojeve kiseline) su prva jedinjenja koja su se upotrebljavala kao UV filtri još 1950. godine, a popularni su i danas. Predstavljaju interesantnu grupu *orto*-disupstituisanih molekula sa prostornim rasporedom koji dozvoljava intramolekulske vodonične veze. Ovo zahteva energiju koja odgovara apsorpciji UV svetlosti na oko 300 nm (Shaar, 2010). U poređenju sa ostalim UV filtrima su slabiji apsorberi, mada je njihova upotreba sigurnija jer stupaju u manje sporednih reakcija. Jedan od predstavnika ove grupe UV filtera je 2-etilheksil salicilat (Slika 10).

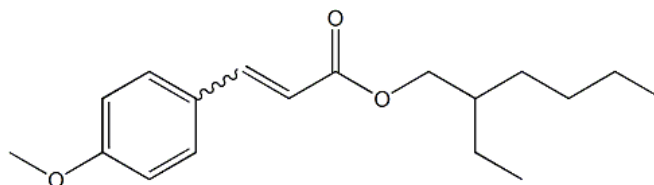


Slika 10. 2-Etilheksil salicilat (ES).

Cinamati (nezasićene karboksilne kiseline) su najviše upotrebljivani UV filtri. Njihovi molekuli imaju takvu strukturu gde je za aromatični prsten vezana elektron donorska grupa (OCH_3) i elektron akceptorska grupa (estarska grupa koja je dalje konjugovana sa dvostrukom vezom). Ovo omogućava proširenu delokalizaciju elektrona zbog koje ovi molekuli apsorbuju u UV oblasti na 310 nm. Najznačajniji predstavnik je oktil metoksicinamat (2-etilheksil-4-metoksicinamat, EMC) čija je

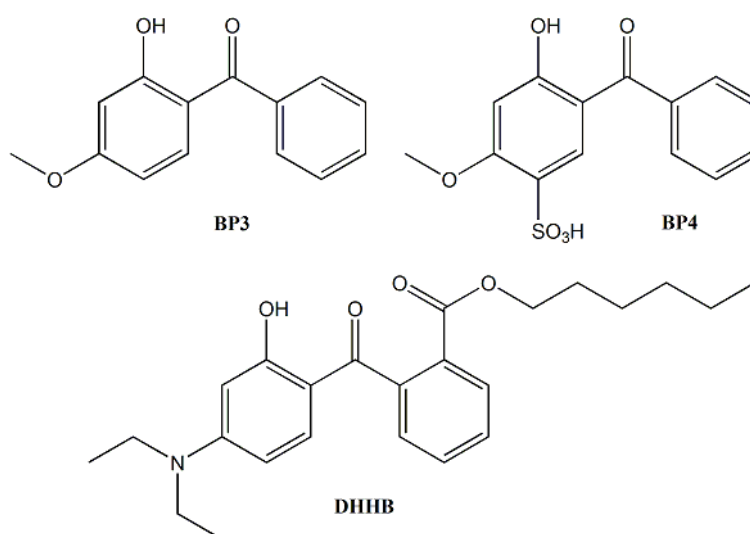
⁴ $\lambda_{\max}$ – talasna dužina u apsorpcionom spektru na kojoj je postignut maksimum apsorpcije.

struktura prikazana na *slici 11*. Oktil metoksicinamat je relativno bezbedan, što znači da ne uzrokuje fotoalergije i fototoksične reakcije. Dobro se rastvara u organskim rastvaračima a nerastvoran je u vodi, pa je dobar za pripremu vodootpornih preparata. Cinamati, međutim, podležu fotoizomerizaciji između svojih *cis* (*Z*) i *trans* (*E*) oblika, što smanjuje njihovu efikasnost apsorpcije.



Slika 11. 2-Etilheksil-4-metoksicinamat (EMC).

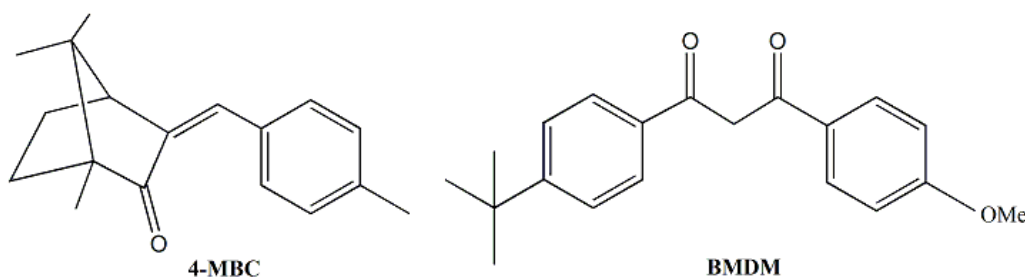
Benzofenoni apsorbuju, pre svega, u oblasti UVA zračenja i u strukturi imaju dva benzenova prstena spojena karbonilnom grupom. Najznačajniji predstavnici ove grupe su 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (benzofenon-3, oksibenzon ili BP3) i 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (benzofenon-4 ili BP4). Poslednjih godina se sve češće upotrebljava dietilamino hidroksibenzoil heksil benzoat (DHHB). Strukture ovih jedinjenja prikazane su na *slici 12*. Rezonantna delokalizacija elektrona potpomognuta je prisustvom elektron-donorske grupe u *orto* ili *para* položaju, ili u oba, što može da uzrokuje apsorpciju i u UVA i u UVB oblasti. Ukoliko kozmetički preparat sadrži BP3 UV filter, po evropskom zakonodavstvu na etiketi mora stajati upozorenje zbog veće mogućnosti alergija. O ovoj grupi jedinjenja biće reči u poglavlju 2.10.



Slika 12. 2-Hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3), 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (BP4) i dietilamino hidroksibenzoil heksil benzoat (DHHB).

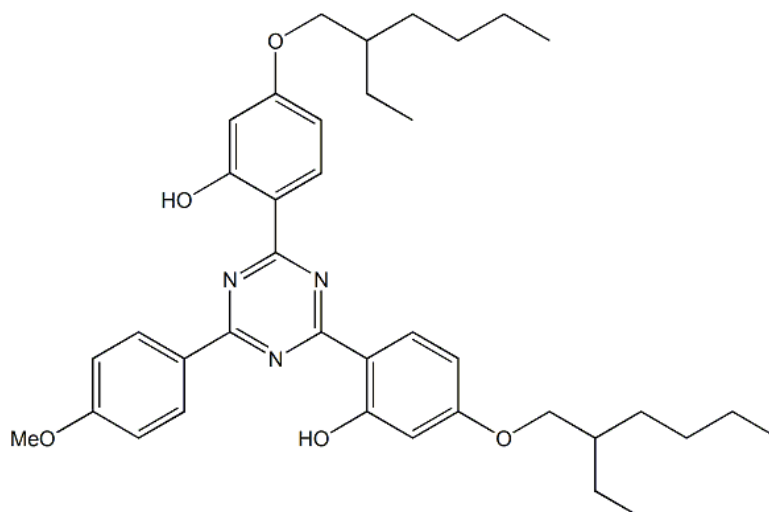
Derivati kamfora su organska jedinjenja koja se klasifikuju kao terpenoidi. Upotreba nekoliko predstavnika je dozvoljena širom sveta, a najpoznatiji je 4-metilbenzildien kamfor (pozant i kao enzacamem, ime po IUPAC nommenklaturi je (3*E*)-1,7,7-trimetil-3-[(4-metilfenil)metilen]-2-norbornanon) (*Slika 13*). Derivati kamfora generalno imaju visok molarni apsorpcioni koeficijent, a svoju fotostabilnost duguju reverzibilnoj fotoizomerizaciji između *E* i *Z* izomera.

Dibenzoilmetani su aromatični 1,3-diketon derivati acetilacetona gde su obe metil grupe supstituisane fenil grupama. Apсорbuju pre svega u UVA oblasti. Prilično su skupi, nerastvorni u nekim rastvaračima, manje stabilni pod uticajem UV zraka što za posledicu ima i manju efikasnost u zaštiti od UV zračenja. Trenutno najpopularniji UVA filter je upravo butil metoksi dibenzoilmetan (*Slika 13*) sa λ_{max} na 357 nm. Nažalost, ovaj molekul je jako fotonestabilan i zabranjen je u kombinaciji sa mnogim drugim UV filtrima (Shaar, 2010).



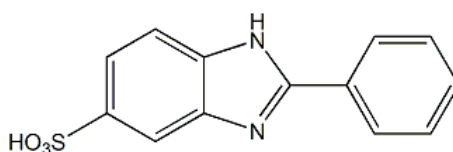
Slika 13. 4-metilbenziliden kamfor (4-MBC) i 4-terc-butil-4'-metoksidibenzoilmetan (BMDM).

Triazini su širokospektralni UV filtri, i veoma su stabilni pod dejstvom UV zračenja. Predstavljaju sastojke kako kozmetičkih preparata, tako i raznih boja, lakova, plastike, folija itd. Najpoznatiji predstavnik triaziina je bis-etilheksiloksifenol metoksifenil triazin (BEMT), na tržištu poznat još i kao Tinosorb S (*Slika 14*).



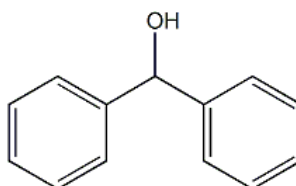
Slika 14. Bis-etilheksiloksifenol metoksifenil triazin (BEMT).

Benzomidazoli, posebno 2-fenilbenzimidazol-5-sulfonska kiselina (PBSA) prikazana na slici 15, su UV filtri koji se dosta koriste u proizvodima za zaštitu od sunca zbog snažne apsorpcije u UVB oblasti. Međutim, istraživanja su pokazala da je fotodegradacija PBSA UV filtra u vodi neobično brza i značajna, približno 90% nakon 10 minuta izlaganja UV zračenju (Serpone *et al.*, 2002).



Slika 15. 2-fenilbenzimidazol-5-sulfonska kiselina (PBSA).

Još jedno jedinjenje, **benzhydrol (difenilmetanol)**, nije svrstano ni u jednu grupu jer je to metabolit koji se dobija redukcijom benzofenona (Slika 16). Međutim, ovaj UV filter se takođe dosta koristi i detektovan je u životnoj sredini.



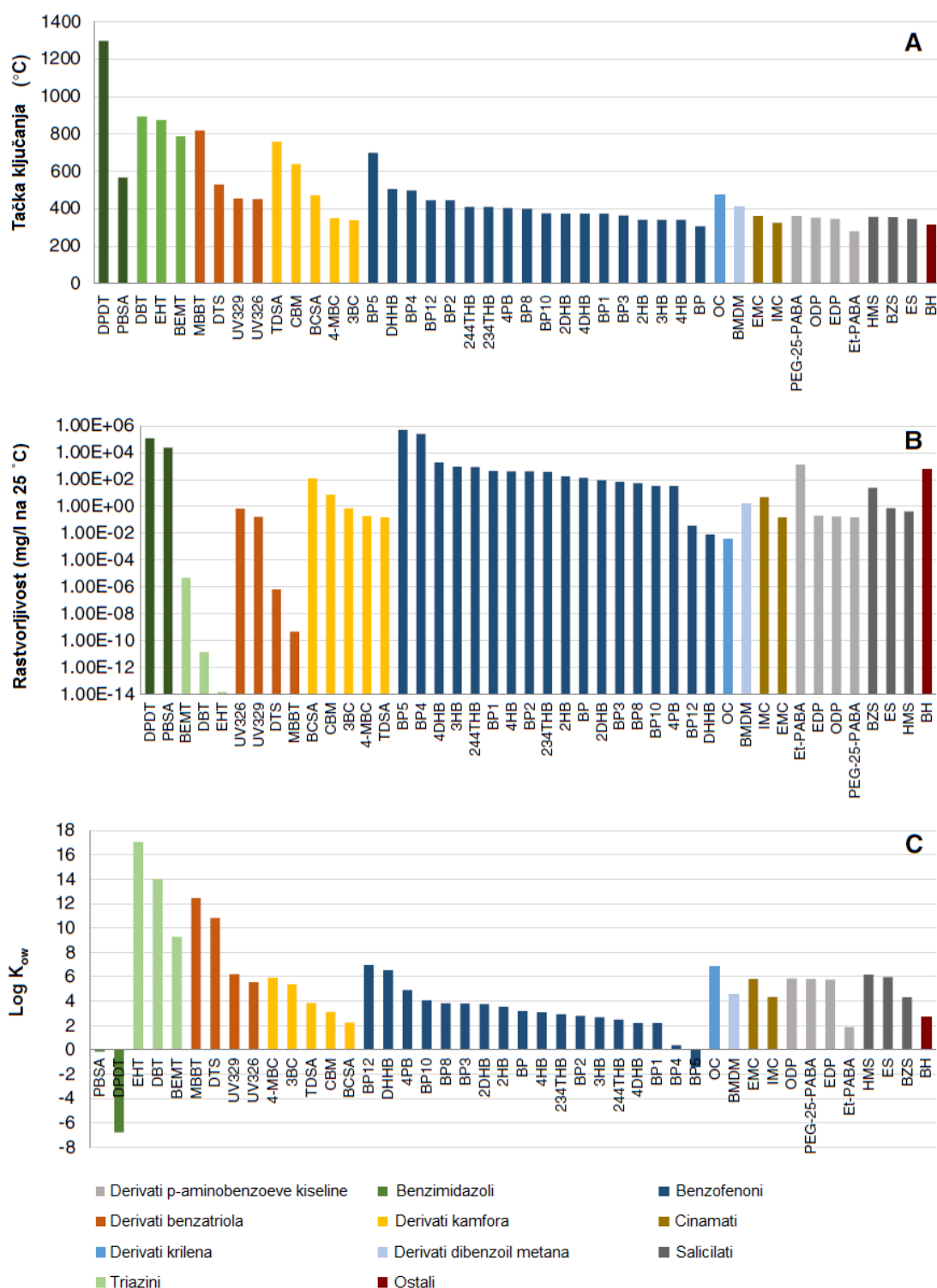
Slika 16. Difenilmetanol (BH).

2.4.2.2. Fizičko-hemijske osobine

Fizičko-hemijske osobine UV filtera određuje njihovu sudbinu u životnoj sredini, a takođe su bitne za izbor analitičkih metoda koje će se koristiti za njihovo određivanje u različitim uzorcima iz životne sredine. Glavne osobine različitih grupa UV filtera date su na *slici 17*, i to su tačka ključanja, rastvorljivost u vodi i oktanol-voda particioni koeficijent (K_{ow}). Podaci za mnoge UV filtre nisu dostupni, pa je uobičajena primena softvera EPI Suite™ za procenu nedostupnih vrednosti (Ramos *et al.*, 2015). To je softver na nivou skrininga (prikazivanja) koja obezbeđuje bilo izmerene bilo procenjene vrednosti fizičko-hemijskih osobina (EPA, 2012).

Uzimajući u obzir *tačke ključanja* (Slika 17 A) čija je prosečna vrednost oko 400 °C, UV filtri ne spadaju u isparljiva jedinjenja (EPA, 2012). U najisparljivije komponente spadaju jedinjenja iz grupa derivata *p*-aminobenzojeve kiseline (Et-PABA), benzofenon (BP) i cinamat (IMC) (oko 300-350 °C). Najmanje isparljivi su benzimidazoli i triazini.

Rastvorljivost u vodi je od velikog značaja tako što utiče na mobilnost, reakcije i degradacioni put svih jedinjenja, pa tako i UV filtera. Ova vrednost nam daje informaciju o verovatnoj raspodeli između vode i zemljišta/sedimenta, prema tome o mogućem uticaju jedinjenja na čoveka i životnu sredinu kroz oslobađanje u vodenu sredinu. Veoma polarna, stoga i veoma rastvorna jedinjenja ne akumuliraju se u zemljištu i sklone su razgradnji hidrolizom, što je najčešća reakcija u vodi. Prema vrednosti rastvorljivosti u vodi (s), UV filtri se kreću od veoma rastvorljivih ($s \geq 1,0 \times 10^4$ mg/l) do neznatno rastvorljivih ($s < 1,0 \times 10^{-1}$ mg/l). Prema ovoj podeli, najrastvorniji su benzimidazoli i neki derivati benzofenona (BP4 i BP5) što je potvrđeno i u nekoliko studija (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009; Fent *et al.*, 2010; Wick *et al.*, 2010; Gago-Ferrero *et al.*, 2013). Triazini, benzotriazoli i krileni nisu rastvorni u vodi, pa se, prema tome, ne mogu naći u vodenim sistemima.



Slika 17. Fizičko-hemijske osobine UV filtera (A - tačka ključanja, B – rastvorljivost u vodi, C – oktanol-voda particioni koeficijent) (Ramos et al., 2015).

Koeficijent raspodele oktanol-voda ($K_{ow}/\log K_{ow}$) predstavlja odnos koncentracija jedinjenja u oktanolu i vodi, kada su ove faze u ravnoteži na određenoj temperaturi (Pontolillo i Eganhouse, 2001). Vrednosti koeficijenta raspodele oktanol-voda za najčešće upotrebljivane i najčešće detektovane UV filtre u životnoj sredini prikazane su na *slici 17 C*. Ovaj koeficijent je indikator sudbine UV filtera u životnoj sredini pokazujući kako će oni biti raspodeljeni između oktanola (koji predstavlja lipide ili masti u živom svetu) i vode (koja predstavlja vodenu fazu). Derivati benzomidazola i neki benzofenoni (BP4, BP5) sa vrednostima $\log K_{ow} < 1$ se smatraju hidrofilnim (veoma rastvorni u vodi). S druge strane, mnoga jedinjenja sa vrednostima > 4 su hidrofobna, kao što je krilen, dibenzoil metan, cinamati, derivati *p*-aminobenzojeve kiseline i salicilati (Díaz-Cruz i Barceló, 2009). UV filtri koji imaju vrednosti $\log K_{ow}$ preko 8 i 10 su ili teško biodostupni ili su nedostupni.

2.4.3. Zakonska regulativa

Prema Uredbi za kozmetičke proizvode 1223/2009 Evropskog parlamenta i saveta, UV filtri su “supstance koje isključivo ili uglavnom imaju za cilj da zaštite kožu od određenog UV zračenja tako što ga apsorbiraju, reflektuju ili odbijaju”. Na globalnom nivou, UV filtri su regulisani kao: a) kozmetika (Evropa, Japan); b) lekovi koji se izdaju bez recepta (SAD, Kanada); ili kao c) terapijska roba (Australija). Broj dozvoljenih UV filtera i njihove dozvoljene maksimalne koncentracije mogu da se razlikuju na regionalnom nivou. Trenutno postoji 28 UV filtera koje za komercijalnu upotrebu dozvoljava Kozmetička direktiva Evropske unije, od kojih su 27 organski UV filtri a samo jedan (titanijum dioksid) je neorganski (tabela dozvoljenih UV filtera nalazi se u Prilogu 1). Uobičajena koncentracija UV filtera u kozmetičkim preparatima je od 2 do 10%. Procenat UV filtra dodatog u proizvod za zaštitu od sunca zavisi od zaštitnog faktora (SPF) i željene zone zaštite (UVA, UVB). Taj procenat ne bi trebalo da prelazi 10% u kombinaciji sa neorganskim filtrima. Kako su preparati za ličnu negu koji sadrže UV filtre regulisani kao kozmetika, svi sastojci moraju da budu nabrojani na deklaraciji po opadajućem redosledu koncentracija, osim sastojaka koji sadrže manje od 1% koji mogu biti navedeni bilo kojim redosledom. Ako ovo nije moguće iz praktičnih razloga, lista sastojaka mora biti na letku, brošuri, nalepnici, ili pak, ako je pakovanje premalo (npr. stikovi za usne) lista sastojaka mora biti izložena u neposrednoj blizini prodajnog

mesta. Međutim, informacija o tačnoj koncentraciji UV filtera u kozmetičkim proizvodima je ipak poverljiva. Evropska regulativa za klasifikaciju, označavanje i pakovanje uglavnom nije korišćena za UV filtre, iako su Sobek i saradnici (2013) uradili istraživanje po kome je 12 od 26 organskih UV filtera dozvoljenih za kozmetičku upotrebu na evropskom tržištu, označeno kao “opasno za vodenu životnu sredinu” (označeni u Prilogu 1). Među tih 12, četiri se klasifikuju prema najvišim kategorijama toksičnosti. Za dva UV filtra nađeni podaci nisu dovoljni za klasifikaciju prema opasnosti po životnu sredinu, a za preostalih 12 nisu nađeni podaci u dostupnoj naučnoj literaturi, pa se stoga ne mogu ni klasifikovati (Sobek *et al.*, 2013).

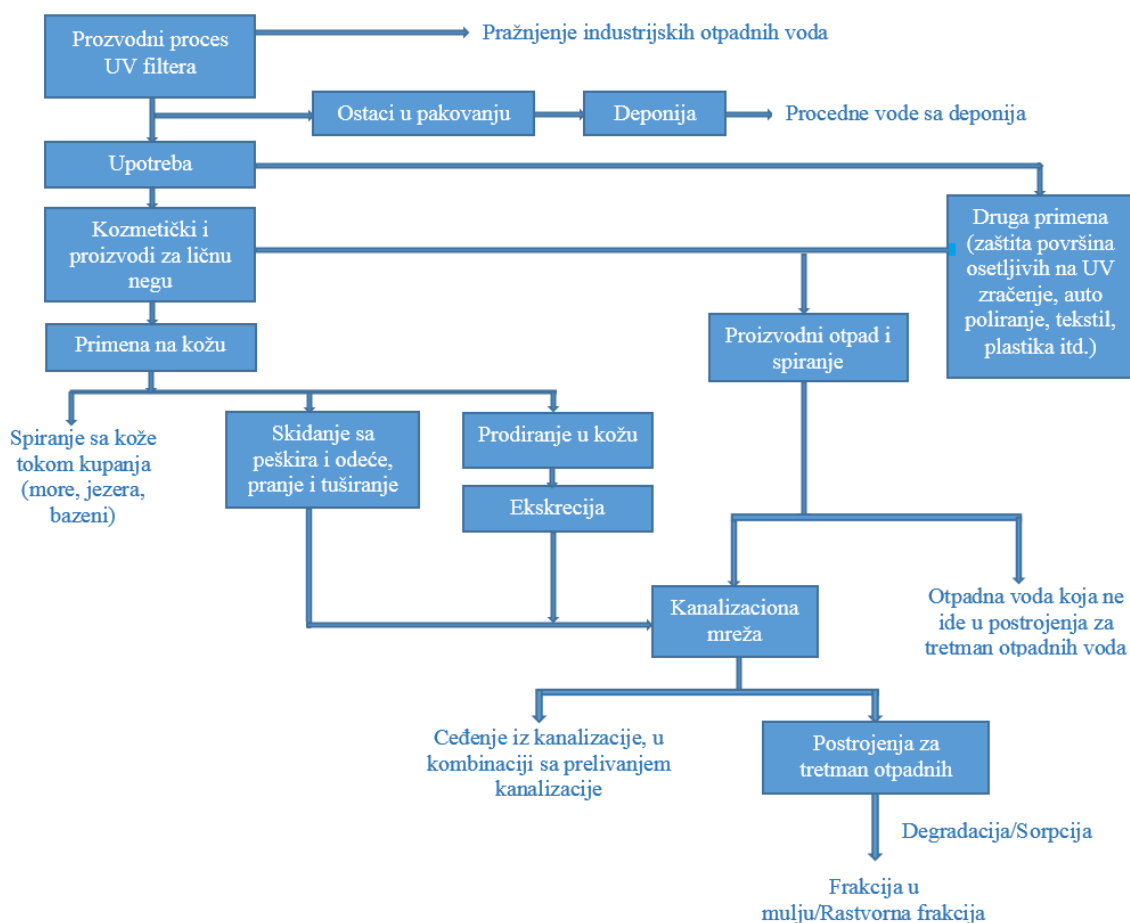
Prema direktivi Evropske unije 98/83 (1998) koja se odnosi na kvalitet vode namenjene za ljudsku upotrebu, UV filtri se ne spominju. Srećom, kako znanje o prisustvu UV filtera u životnoj sredini i njihovoj ekotoksičnosti raste, postoji mogućnost da u skorijoj budućnosti studije o proceni rizika nametnu zakonska ograničenja za neka jedinjenja iz ove grupe u otpadnim vodama. Ova ograničenja će smanjiti količinu UV filtera otpuštenih iz postrojenja za otpadne vode u reke koji bi se dalje akumulirali u drugim matriksima.

U Republici Srbiji ne postoji zakonska regulativa koja se odnosi konkretno na UV filtre, ali se na njih može odnositi Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu staviti u promet (Službeni list SFRJ 26/1983, 61/84, 56/86). Tu se kozmetički proizvodi (čiji aktivni sastojci mogu biti i UV filtri) definišu kao “sredstva za održavanje lica i tela”, a zahtevi su: originalna ambalaža, deklaracija, dozvoljeni maksimalni sadržaj metala i mikrobiološka ispravnost. Međutim, kako naša zemlja ulaže napore da postane članica EU, zakoni se usaglašavaju i u velikoj meri oslanjaju na zakonodavne propise Evropske Unije.

2.5. Unos UV filtera u životnu sredinu

Mnogi od UV filtera pokazali su toksične osobine, te je godinama glavnu brigu oko njihove upotrebe predstavljalo kako naći kompromis između adekvatne zaštite, odnosno što veće efikasnosti u zaštiti od štetnog dejstva UV zračenja, i što je moguće manje štetnih efekata za potrošače i minimalan rizik po ljudsko zdravlje. Tek nedavno se pojavio i drugi veoma važan aspekt upotrebe UV filtera. Studije su pokazale da oni

mogu da dospeju u vodu sredinu kroz direktne i indirektne izvore (Slika 18). Direktni unos UV filtera u prirodne vodene sisteme moguć je spiranjem sa kože u toku rekreativnih aktivnosti, plivanja i kupanja na bazenima i otvorenim kupalištima (netačkasti izvori), kao i pražnjenjem otpadne vode iz industrijskih sistema i indirektnim otpuštanjem (npr. tokom tuširanja, pranja odeće ili ekskrecijom urina) kroz otpadne vode iz domaćinstava (tačkasti izvori) (Santos *et al.*, 2012). Moguć je, takođe, i posredan unos koji se odnosi uglavnom na oslobađanje otpadne vode iz postrojenja za tretman otpadne vode.



Slika 18. Glavni putevi unosa UV filtera u životnu sredinu (Stavke koje nisu uokvirene predstavljaju potencijalno oslobađanje u životnu sredinu;
Modifikovano prema Giokas *et al.*, 2007).

2.6. Degradacija u životnoj sredini i transformacioni proizvodi

Iako je upotreba UV filtera ograničena u poređenju sa drugim proizvodima široke potrošnje (npr. sapunima i detergentima), posledice koje oni mogu da imaju po životnu sredinu mogu biti ogromne s obzirom na njihov direktan unos u površinske vode i činjenicu da mogu da se akumuliraju u tkivima živih organizama.

UV filtri bi trebalo da budu stabilni pod dejstvom svetlosti. Visoka zaštita od sunca može biti garantovana jedino ako je UV filter veoma stabilan pod dejstvom UV zračenja. Međutim, istraživanja pokazuju da izlaganjem UV filtera prirodnoj i/ili veštačkoj svetlosti dovodi do reakcija fotodegradacije čime se dovode u pitanje njihove fizičke osobine (npr. apsorpcioni maksimum i koeficijent apsorpcije) ili dolazi do nastajanja nepoželjnih proizvoda koji se akumuliraju na ljudskoj koži. Na primer, derivat *p*-aminobenzojeve kiseline, PABA, je veoma stabilan pod dejstvom UV zračenja, ali ima i najveći potencijal za iritaciju ljudske kože jer pod dejstvom svetlosti stupa u reakcije sa drugim UV filtrima formirajući sporedne proizvode, tako da se više i ne koristi u kozmetici (Kockler *et al.*, 2012). Očekuje se da pojedini UV filtri mogu da podlegnu fotodegradaciji nakon što dospeju u vodu sredinu. Istraživanja pokazuju da neki UV filtri u vodenom rastvoru pod dejstvom UV zračenja mogu da generišu reaktivne kiseonične vrste i druge slobodne radikale (Serpone *et al.*, 2002; Shaat, 2010; Kockler *et al.*, 2012) kao i da povećaju svoju toksičnost prema nekim vodenim organizmima, kao što je slučaj sa BP3 UV filtrom (Rodil *et al.*, 2009a).

Osim fotodegradacije, UV filtri mogu da podlegnu degradaciji kroz reakciju sa dezinfekcionim agensima, kao što je hlor, pri čemu dolazi do formiranja sporednih proizvoda koji mogu biti toksičniji po živi svet od same polazne supstance (Sakkas *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2004; Nakajima *et al.*, 2009; Díaz-Cruz i Barceló, 2009).

2.6.1. Fotolitička disocijacija

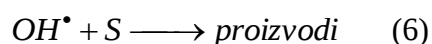
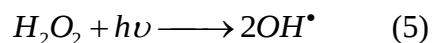
Sama apsorpcija UV svetlosti nije dovoljan uslov da se neko organsko jedinjenje upotrebljava kao UV filter. Pri izloženosti stalnom i jakom UV zračenju važno je takođe da to jedinjenje bude stabilno. Iako bi fotostabilnost trebalo da bude njihova glavna karakteristika, nekoliko studija je pokazalo da UV filtri mogu da podlegnu degradaciji

pod dejstvom UV svetlosti. To se uglavnom dešava zbog toga što ova jedinjenja nisu u mogućnosti da dovoljno brzo konvertuju apsorbovanu energiju, pa molekul ostaje pobuđen, energetski nestabilan i tako veoma reaktivan (Díaz-Cruz *et al.*, 2008). Fotohemijske reakcije izazvane sunčevom svetlošću su verovatno glavni abiotički procesi koji upravljaju sudbinom organskih supstanci u vodenoj sredini. Fotoliza uzrokuje disocijaciju molekula koji apsorbuje svetlost na reaktivne fragmente (slobodne radikale) ili reaktivne intermedijere. U površinskom sloju vodenih sistema može doći do dve vrste procesa: direktne i indirektne fotolitičke disocijacije. Organski UV filtri sadrže hromoforne grupe sposobne da apsorbuju svetlost u UV oblasti talasnih dužina, ali takođe mogu i da podlegnu indirektnim putevima transformacije u prisustvu fotosenzibilizatora. O direktnom fotohemijском procesu govorimo kada se jedinjenje zračenjem dovede u pobuđeno (ekscitovano) stanje, koje potom hemijski reaguje i tako nastaju proizvodi (2, 3, 4):



gde UV filter* predstavlja UV filter u pobuđenom (ekscitovanom) stanju, a X predstavlja rastvarač ili drugi molekul.

Do indirektne fotolize najčešće dolazi kada UV filter slabo apsorbuje u UVA i vidljivoj oblasti solarnog spektra i tada nije moguće da dođe do njegove degradacije direktnom fotolizom. Pobuđeno stanje UV filtra se u tom slučaju dobija uz pomoć pobuđivača (senzibilizatora). Rastvorena organska supstanca (DOM, *eng. Dissolved Organic Matter*) je sveprisutna u površinskim vodama i poznata je kao senzibilizator. Naime, ona se nakon apsorpcije fotona pobuđuje i proizvodi reaktivne kiseonične vrste, kao što su hidroksi radikali (OH[•]), peroksi radikali (ROO[•]), singletni kiseonik (¹O₂) i drugi radikali (Díaz-Cruz *et al.*, 2008). Proizvodi takvih fotohemijских procesa zatim reaguju sa supstratom, u ovom slučaju UV filtrom. Na primer, fotolizom vodonik-peroksida (H₂O₂) nastaju hidroksi ili peroksi radikali (5), koji zatim oksiduju organske molekule (6). Proces jeste iniciran zračenjem, ali ne teče preko pobuđenih stanja supstrata (Díaz-Cruz *et al.*, 2008).

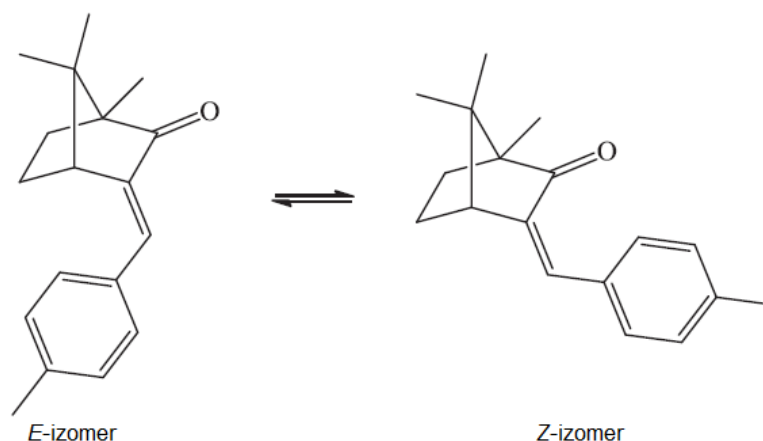


Fotohemija krema za zaštitu od sunca je još kompleksnija od izolovanog ponašanja pojedinačnih UV filtera (Sayre *et al.*, 2005). Kako one sadrže i po nekoliko agenasa, može se desiti da upravo neki od sastojaka pokrene fotodegradaciju.

Fotonestabilnost organskih UV filtera može da predstavlja veliki problem, jer oni usled izlaganja UV svetlosti mogu da izgube svoje fotozaštitne sposobnosti. Utvrđeno je da su neki UV filtri, kao što su jedinjenja iz grupe derivata *p*-aminobenzojeve kiseline (PABA, OD-PABA) i kamfor derivati (PDSA) prilično nestabilni u prisustvu svetlosti (Serpone *et al.*, 2002; 2007). Utvrđeno je, takođe, da mogu da nastanu proizvodi fotodegradacije koji mogu da izazovu fotoalergijske reakcije ili druge štetne efekte. Na primer, kada se oktil metoksicinamat (OMC), jedan od najčešće korišćenih UV filtera, izloži UV svetlosti, nastaju uzastopni proizvodi razlaganja za koje je utvrđeno da su toksičniji za ćelije od samog OMC (Butt *et al.*, 2000).

2.6.2. Fotoizomerizacija

Fotoizomerizacija može doprineti stvaranju molekulskih vrsta koje verovatno apsorbuju manje UV svetlosti od polaznog jedinjenja. Zajedničko za sve organske UV filtre je da poseduju aromatični deo sa bočnim lancem koji može da ima različit stepen nezasićenja. Neki od njih su stereoizomeri upravo zato što poseduju dvostruku vezu. Enantiomeri ovakvih jedinjenja imaju iste fizičko-hemijske osobine, međutim, mogu da se razlikuju u biološkom ponašanju (npr. etilheksil metoksicinamat (EMC) i 4-metilbenziliden kamfor (4-MBC), *Slika 19*). Iako brojni UV filtri imaju i *trans* (*E*) i *cis* (*Z*)-izomere, komercijalni proizvodi sadrže uglavnom geometrijske (*E*)-izomere. Međutim, pod dejstvom UV svetlosti *trans* izomeri prelaze u *cis* (Poiger *et al.*, 2004; Balmer *et al.*, 2005) i oba oblika mogu biti detektovana u životnoj sredini. Na taj način, UV filtri menjaju svoje apsorbujuće sposobnosti, kao i biološko ponašanje i efekte na živi svet.



Slika 19. *E* i *Z* izomeri 4-metilbenziliden kamfora (4-MBC).

2.6.3. Reakcija sa hlorom. Formiranje DBP.

Bazeni poslednje tri decenije doživljavaju sve veću posećenost. Evropska Unija je sa oko 4,5 miliona bazena rangirana na drugo mesto posle Sjedinjenih Američkih Država (Florentin *et al.*, 2011). Ovakav trend je rezultat sve veće popularnosti bazena kao dostupnih mesta za plivanje radi rekreacije ili sporta. Zbog kompleksnosti hemijske strukture bazenske vode, do danas je malo poznat mogući rizik koji bazenska voda ima po ljudsko zdravlje. Hemija bazenske vode zavisi od same izvorne vode, zatim transformacija koje se u vodi dešavaju (npr. procesa dezinfekcije) i aktivnosti u bazenima (plivači koji unose biološki materijal i različite hemijske supstance, između ostalog i UV filtre, itd). Najpre se proverava mikrobiološka ispravnost vode i mikrobiološko zagađenje se drži pod kontrolom upravo procesom dezinfekcije. Kao i voda za piće, bazenska voda može se tretirati sa različitim dezinfekcionim sredstvima (sredstva na bazi hlora ili broma, ozon i bakar/srebro). Međutim, za dezinfekciju i česmenske i bazenske vode ipak se najčešće, zbog svoje oksidativne sposobnosti, postojanosti i niske cene, koriste dezinfekciona sredstva na bazi hlora: gasoviti hlor (Cl_2), natrijum ili kalcijum hipohlorit (NaOCl i Ca(OCl)_2), hlorovani izocijanurat (trihloroizocijanurna kiselina, TCCA), hlor dioksid (ClO_2). Dezinfekcione osobine slobodnog hlora zavise od njegovog oksidativnog kapaciteta.

Dobro je poznato da hlorinacija kako vode za piće tako i bazenske vode vodi formiranju sporednih proizvoda dezinfekcije (DBP), uključujući hloramine i trihalometane (SZO⁵, 2006). Sporedni proizvodi dezinfekcije nastaju u reakciji slobodnog hlora sa prirodnim ili unetim organskim ili neorganskim materijalom prisutnim u vodi. Bazeni su karakteristični po značajnom spoljnom unosu supstanci. Među njima, između ostalog, mogu biti hemijska jedinjenja iz kozmetike i krema za zaštitu od sunca, organski materijal i supstance ljudskog tela (znoj, urin, čestice kože, kosa itd), alge i drugi mikroorganizmi.

Formiranje sporednih proizvoda dezinfekcije u vodenim uzorcima koji sadrže hlor je očekivan proces za mnoga organska jedinjenja. Ovaj tip reakcija je posebno povoljan za jedinjenja sa fenolnim i/ili amino grupama u njihovoj strukturi (Bedner i MacCrehan, 2006; Lebedev, 2007).

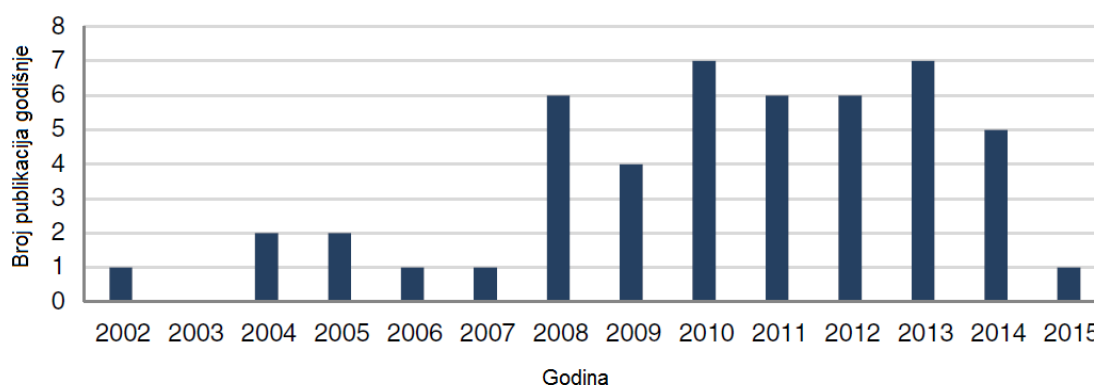
Studije o sudbini UV filtera u hlorisanoj vodi su i dalje retke i postoji samo nekoliko radova na tu temu. Broj nastalih sporednih proizvoda zavisi od vrste vode sa kojom se radi, odnosno u kojoj se UV filter nalazi. U poređenju sa destilovanom i morskom vodom, u slučaju bazenske vode zbog dodatnog prisustva hlora nađeno je više hlorovanih proizvoda EHDPABA UV filtra, derivata *p*-aminobenzojeve kiseline (Sakkas *et al.*, 2003). Skorašnja istraživanja pokazala su da unos UV filtera u bazenske vode (direktnan izvor) može biti značajan, zavisno od upotrebe i uslova održavanja bazena (Lambropoulou *et al.*, 2002; Giokas *et al.*, 2004). Razlike u reaktivnosti pojedinih UV filtera prema halogenim elementima u velikoj meri zavise od uticaja različitih supstituenata na aktivaciju ili deaktivaciju fenolnog prstena za reakciju elektrofilne supstitucije (Negreira *et al.*, 2008; Nakajima *et al.*, 2009; Crista *et al.*, 2015; Kalister *et al.*, 2016; Trebše *et al.*, 2016). Od toga takođe zavisi i položaj supstituisanog hlora ili drugog halogenog elementa. Nastali proizvodi mogu imati ozbiljne toksikološke efekte i mogu da budu opasniji od polaznih jedinjenja (Sakkas *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2004; Nakajima *et al.*, 2009; Díaz-Cruz i Barceló, 2009).

⁵ SZO– Svetska zdravstvena organizacija (odnosno, WHO, *eng.* World Health Organization)

2.7. Prisustvo UV filtera u vodama

Povećan broj analitičkih tehnika za određivanje UV filtera verovatno je doprineo učestalosti pojave UV filtera u vodenim matriksima (*Slika 20*). Prisustvo UV filtera utvrđeno je u česmennoj vodi i prirodnim vodama, kao što su jezera, reke, podzemne vode i morska voda (*Slika 21*).

U vodenim sistemima, UV filtri se mogu podeliti u dve grupe obzirom na razlike u mobilnosti koje zavise od njihovih fizičko-hemijskih osobina. Manje pokretni molekuli imaju značajan oktanol-voda koeficijent ($\log K_{ow}$) i mogu da pokažu sklonost ka sorpciji na organski materijal prisutan u sedimentima u vodenim basenima. Pokretniji molekuli trebalo bi da imaju hidrofilnije karakteristike (Jurado *et al.*, 2014).

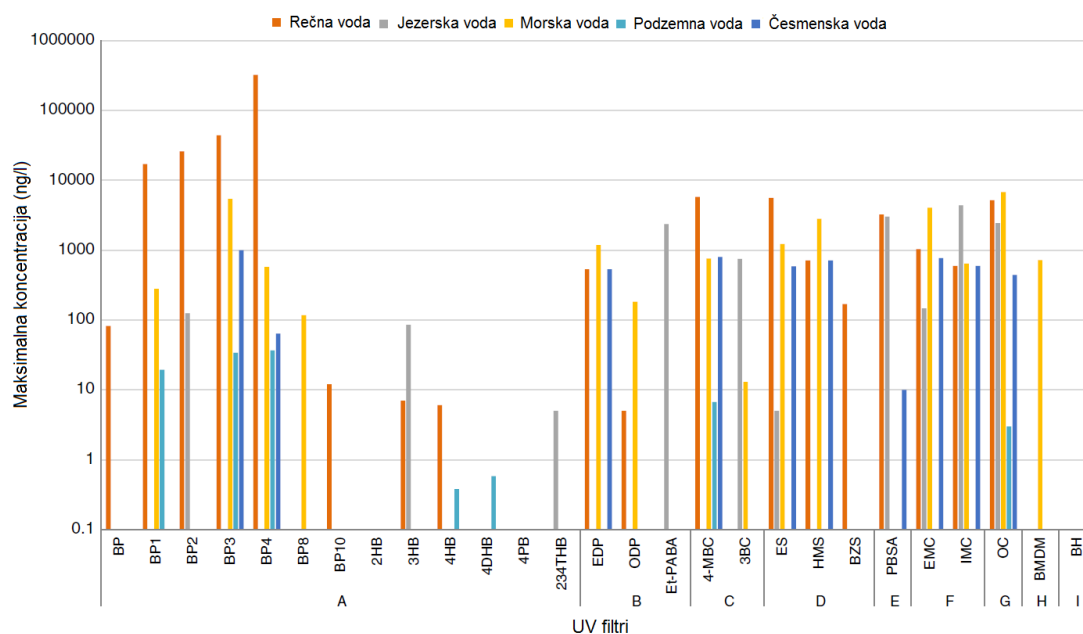


Slika 20. Broj objavljenih radova posvećenih detekciji UV filtera u vodama (Ramos *et al.*, 2015).

Rečna voda je matriks za koji se pokazalo da sadrži veće koncentracije i različite vrste UV filtera (*Slika 21*). Najzastupljenija familija UV filtera u rekama su derivati benzofenona (BP, BP1, BP2, BP3 i BP4) sa koncentracijama do 0,3 mg/l (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009). Derivati *p*-aminobenzojeve kiseline (EDP) nađeni su u koncentraciji 531 ng/l, derivati kamfora (4-MBC) do 5,8 µg/l, salicilati (ES, HMS i BZS) od 169 ng/l do 5,6 µg/l, benzimidazoli (PBSA) do 3,3 µg/l, cinamati (EMC i IMC) od 595 ng/l do 1,1 µg/l i krileni sa 5,2 µg/l (Liu *et al.*, 2010; Kameda *et al.*, 2011; Roman *et al.*, 2011). Treba napomenuti da je najviša nađena vrednost za benzofenone (0,4 mg/l za BP4) izmerena nakon ispuštanja iz tretmana za otpadnu vodu u Velikoj Britaniji (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009). U Japanu su, međutim, u najvišim

koncentracijama nađena jedinjenja iz grupe salicilata (BZS) i cinamata (EMC), u Španiji takođe derivat cinamata (IMC), salicilata (HMS) i *p*-aminobenzojeve kiseline (EDP), a u Nemačkoj najviša koncentracija nađena je za PBSA (derivat benzimidazola) (Wick *et al.*, 2010; Kameda *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Roman *et al.*, 2011, Jansen *et al.*, 2013). Najviše koncentracije nađenih UV filtera verovatno umnogome zavise od zakonske regulative za UV filtre u pojedinim zemljama.

U poređenju sa rečnom vodom, jezerska voda je manje ispitivana a nađene su i manje koncentracije UV filtera, što je očekivano, uzimajući u obzir da je jedini način unosa plivanje i druge rekreacione aktivnosti. Veća koncentracija nađena je za kamfor 4-MBC (2,4 µg/l) (Moeder *et al.*, 2010), salicilat ES (0,8 µg/l), cinamati EMC (3,01 µg/l) i IMC (146 ng/l), krilen OC (4,4 µg/l) i dibenzoil metan BMDM (2,4 µg/l) (Rodil *et al.*, 2009b). Treba napomenuti da BMDM uopšte nije detektovan u rečnoj vodi. Benzofenoni su nađeni jedino u jezerima u Švajcarskoj (BP3 125 ng/l) (Poiger *et al.*, 2004) i Južnoj Koreji (4HB 85 ng/l) (Jeon *et al.*, 2006).



Slika 21. Vrednosti koncentracija UV filtera nađene u česmenkoj, rečnoj, jezerskoj, morskoj i podzemnoj vodi (A – benzofenoni, B – PABA derivati, C – derivati kamfora, D – salicilati, E – benzimidazoli, F – cinamati, G – krileni, H – dibenzoil metan derivati, I – ostali) (Ramos *et al.*, 2015).

U morskoj vodi, pored rekreacionih aktivnosti i direktnog spiranja, mogući doprinos unosu UV filtera je verovatno otpuštanje otpadnih voda u more (Tsui *et al.*, 2014). Najveći broj podataka potiče iz studija za razvoj metoda za određivanje UV filtera, najviše iz Španije, Grčke i Japana. U ovim studijama u najvišim koncentracijama pojavljuju se benzofenon BP3, salicilat ES i krilen OC (Lambropoulou *et al.*, 2002; Giokas *et al.*, 2004; Giokas *et al.*, 2005; Tarazona *et al.*, 2010; Róman *et al.*, 2011).

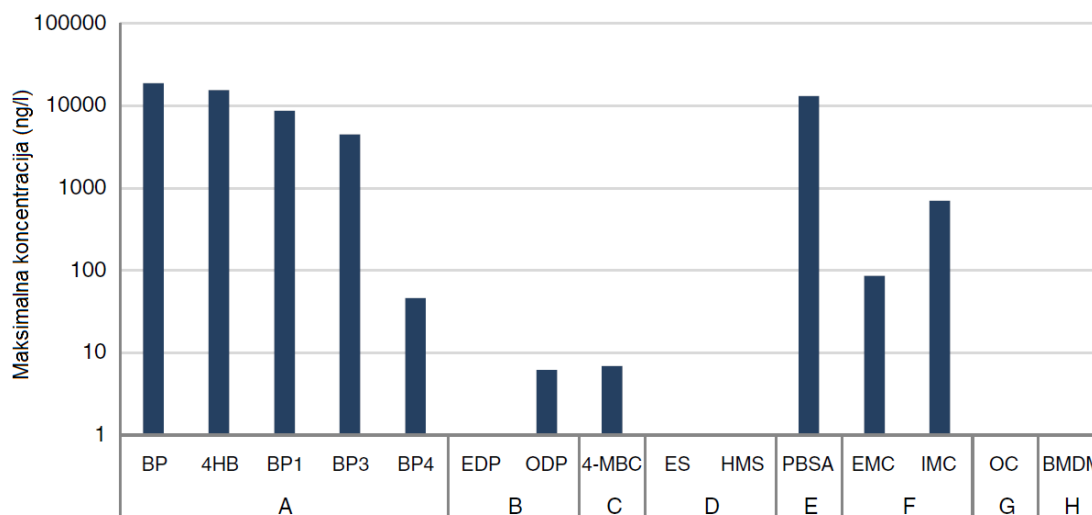
U podzemnim vodama u višim koncentracijama nađen je jedino benzofenonski UV filter BP4, što može biti objašnjeno njegovom dobrom rastvorljivošću u vodi i čestom upotrebom u kozmetičkim proizvodima i u proizvodima sa providnim pakovanjima gde se ovo jedinjenje koristi kao UV zaštita (Gago-Ferrero *et al.*, 2013).

Prisustvo UV filtera u česmenkoj vodi se malo ispituje, a u nekoliko radova je potvrđeno njihovo odsustvo. Međutim, u istraživanjima koje su sprovedi Róman i saradnici (2011) i Rodil i saradnici (2012) ipak su nađene visoke koncentracije UV filtera u česmenkoj vodi u Španiji (*Slika 21*). U prvom slučaju nađeno je oko 10 ng/l za benzimidazol PBSA i kamfor 4-MBC, i 62 ng/l za benzofenon BP4, i u rangju ispod limita kvantifikacije pa do 160 ng/l za salicilat ES, i cinamate EMC i IMC. Takođe u Španiji, Díaz-Cruz i saradnici (2012) našli su u nešto višem opsegu koncentracija, od 110 do 290 ng/l, sledeće UV filtre: benzofenon BP3, derivat *p*-aminobenzojeve kiseline ODP, cinamat EMC i krilen OC.

Bazeni, kao i jezera, se dosta koriste u toku letnje sezone za rekreacione aktivnosti, gde se UV filtri direktno unose zbog upotrebe preparata za zaštitu od sunca. Maksimalne koncentracije UV filtera nađene u bazenskim vodama u nekoliko studija (Giokas *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2011; Grabicova *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2015) prikazane su na *Slici 22*.

Detekcioni opseg UV filtera u bazenima je nešto drugačiji od drugih vodenih matriksa, najverovatnije zbog drugačijeg izvora zagađenja i degradacionih procesa. Najčešće detektovani UV filtri su benzofenoni BP (18,8 µg/l), 4HB (15,4 µg/l), BP1 (8,7 µg/l) i BP3 (4,5 µg/l) (Ye *et al.*, 2011), dok je BP4 detektovan u nižim koncentracijama, 46 ng/l (Grabicova *et al.*, 2013). Druga jedinjenja poput benzimidazola PBSA (13 µg/l) i nekih cinamata nađena su u višim koncentracijama, i

do 700 ng/l (Grabicova *et al.*, 2013). Jedinjenja poput derivata *p*-aminobenzojeve kiseline ODP i EDP, i dibenzoil metana BMDM nisu nađena ili su nađena u niskim koncentracijama, verovatno zbog toga što u kontaktu sa hlorom dolazi do njihove degradacije. Iako su cinamat EMC i benzofenon BP3 nađeni u relativno visokim koncentracijama, oni se takođe degradiraju u reakciji sa hlorom (Ramos *et al.*, 2015).



Slika 22. Vrednosti koncentracija UV filtera u bazenskoj vodi (A – benzofenoni, B – PABA derivati, C – derivati kamfora, D – salicilati, E – benzimidazoli, F – cinamati, G – krileni, H – dibenzoil metan derivati) (Ramos *et al.*, 2015).

2.8. Ekotoksičnost UV filtera

UV filteri se uveliko koriste ne samo u kremama za zaštitu od sunca, već i u ostaloj kozmetici kao što su parfemi, šamponi, sprejevi za kosu, boje za kosu, kreme, stikovi za usne i brojni drugi proizvodi. Njihova učestala primena dovela je do toga da ova jedinjenja konstantno dospevaju u vodu sredinu, direktnim unosom tokom rekreativnih aktivnosti ili, češće, indirektnim unosom kroz otpadne vode. Jednom otpušteni iz industrijskih i urbanih izvora, oni konačno ulaze u površinske i podzemne vode. Tako UV filteri mogu da imaju toksične efekte na vodeni i kopneni ekosistem, jer se zbog svog lipofilnog karaktera i fotostabilnosti mnogi od njih akumuliraju u ribama i beskičmenjacima (Balmer *et al.*, 2005; Buser *et al.*, 2006; Fent *et al.*, 2010). Procena njihovog toksičnog potencijala rađena je u nekoliko studija, pokazujući da se veliki broj

UV filtera ponaša kao endokrini disruptori (supstance koje ometaju rad hormonskog, odnosno endokrinog sistema). U velikom broju radova dokazani su estrogeni efekti na živi svet i čoveka (Schlumpf *et al.*, 2004; Weisbrod *et al.*, 2007; Sieratowicz *et al.*, 2011; Kaiser *et al.*, 2012; Parades *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014a i 2014b). Skorašnja ispitivanja pokazuju ne samo estrogene efekte, nego i različite uticaje UV filtera na hormonski sistem riba i sisara (Blüthgen *et al.*, 2014; Ponzo i Silvia, 2013). Do danas je više pažnje posvećeno interakcijama UV filtera sa gonadalnim steroidnim hormonima u sisarima, jer su se istraživanja o štetnim efektima ovih jedinjenja uglavnom fokusirala na određivanje potencijalnog rizika za čoveka. Iako je mnogo manje pažnje posvećeno o uticaju na invertebrate, ipak postoje neki podaci o toksičnom uticaju (Gao *et al.*, 2013; Brausch i Rand, 2011). Pojedina istraživanja pokazuju da UV filtri ne pokazuju akutnu toksičnost prema vodenim organizmima (Fent *et al.*, 2010). Pokazalo se da je *Daphnia magna* nakon kratkog izlaganja (48 h) najosetljivija na cinamat EMC, dok je najmanje osetljiva na benzofenonski UV filter BP4. Većina dosadašnjih studija se fokusirala na efekat nakon duže ekspozicije. Schmitt i saradnici (2008) ispitivali su efekte na bentoske invertebrate i primetili značajno smanjenje reprodukcije vrsta *Potamopyrgus antipodarum* i *Lumbriculus variegates* i povećanje smrtnosti kada se izlože derivatima kamfora 3BC i 4-MBC. Informacije o toksičnosti UV filtera su i dalje retke da bi se razvila adekvatna procena rizika po vodeni svet. Takođe, poznato je da se pod određenim uslovima UV filtri mogu degradirati i formirati nepoznate proizvode koji mogu biti i toksičniji za pomenute organizme od polaznih jedinjenja.

2.8.1. Ispitivanje toksičnosti

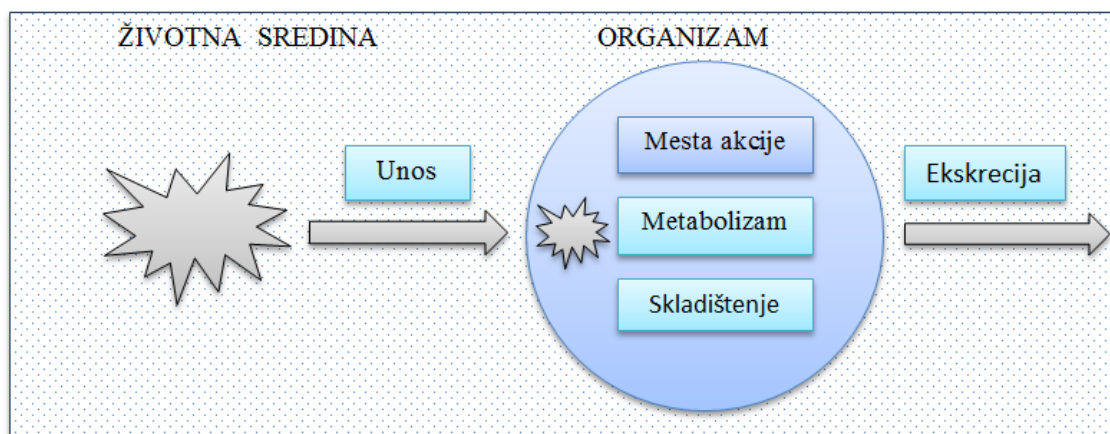
Kasnih sedamdesetih godina XX veka, zbog povećane brige o negativnom uticaju zagađujućih supstanci u životnoj sredini razvila se ekotoksikologija kao zvanična naučna disciplina. Osnova toksikoloških studija su bioeseji i laboratorijski testovi toksičnosti na pojedinim organizmima koji se izlažu supstanci od interesa u određenom opsegu koncentracija (Walker *et al.*, 1996). Praćenjem odgovora organizma prema koncentraciji ispitivane supstance određuje se intenzitet toksičnosti supstance prema organizmu. Da bi se odredio toksični efekat, prate se različiti odgovori organizma, takozvani „endpoint“ ili, u slobodnom prevodu, završne tačke ili krajnji

ishodi toksičnosti. Ovako dobijeni rezultati mogu da se ekstrapoliraju na uslove prirodnog sistema.

Nekada se kao odgovor organizma pratio samo mortalitet, i ti testovi su bili kratkoročni – akutni. U današnje vreme prednost se daje hroničnim testovima koji obuhvataju reprodukciju i druge subletalne efekte, a imaju veći ekološki značaj (van Gestel, 2012).

Da bi se prepoznao i odredio potencijalni rizik novih i postojećih hemijskih supstanci, udruženja poput Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD⁶) i Međunarodne organizacije za standardizaciju (ISO⁷) počele su da razvijaju standardizovane i međunarodno prihvaćene procedure za testiranje toksičnosti supstanci (tzv. ksenobiotika) prema odabranim organizmima. Ti organizmi mogu biti različite vrste iz vodenih i kopnenih ekosistema, uključujući ribe, pčele, alge, cijanobakterije i druge mikroorganizme, biljke, vodene mušice, vodozemce itd.

Princip interakcije između ksenobiotika i živog organizma predstavljen je na slici 23. Interakcija može da se opiše u dva glavna koraka (Walker *et al.*, 1996; Katayama *et al.*, 2010).



Slika 23. Model koji opisuje ekspoziciju organizma ksenobiotiku iz svog okruženja i sudbinu supstance u organizmu (modifikovano prema Lavtižar, 2014).

⁶ OECD – Organization for Economic Co-operation and Development

⁷ ISO – International Organization for Standardization

U prvom koraku, organizam apsorbira supstancu iz svog okruženja (unos supstance). To se obično dešava pasivnom difuzijom kroz kožu, kutikulu ili membranu. Lipofilne supstance imaju veći afinitet za ovaj proces jer membrane obično sadrže fosfolipide. Potencijal supstance da prođe prirodne barijere i uđe u organizam označena je pojmom biodostupnost (bioraspoloživost) i zavisi od vrste organizma, puta ulaska, vremena ekspozicije i od matriksa u kom se supstanca nalazi (Anderson *et al.*, 1999).

Drugi korak se sastoji od procesa koji određuju sudbinu supstance u organizmu. Ovaj korak obuhvata transport supstance iz okruženja do mesta delovanja u organizmu, stepen unosa i unutrašnju distribuciju i biotransformaciju u telu (toksikokinetika). Nakon unosa supstance u organizam, moguća su četiri „scenarija“. Pre svega, supstanca može da reaguje na „mestu akcije“ izazivajući toksičnost. U drugom slučaju, supstancu metabolišu enzimi prisutni u organizmu čineći je manje toksičnom. U nekim slučajevima, biotransformacija vodi stvaranju toksičnijih proizvoda od polazne supstance. Supstanca takođe može da se akumulira u organizmu u obliku koji je u toksikološkom smislu inertan. Poslednji proces je ekskrecija. Supstanca se izbacuje ili u svom početnom obliku (nepromenjena) ili češće u obliku metabolita (Walker *et al.*, 1996).

Ekotoksikološka aktivnost pojedinačnih supstanci (hemikalija) može se proceniti standardizovanim testovima, koji nisu precizni pokazatelj uticaja na životnu sredinu, ali su najbolja dostupna metoda za razumevanje integrisanog efekta više zagađujućih supstanci. U laboratorijskim ekotoksikološkim testovima, supstanca od interesa se obično testira sa odabranim neselektivnim test organizmom. Među mnogobrojnim standardizovanim testovima na akvatičnim organizmima, našli su se i test na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri*, na slatkovodnom račiću *Daphnia magna* i slatkovodnoj mikroalgi *Pseudokirchneriella subcapitata*.

2.8.2. Toksikološki test na luminescentnoj bakteriji

Bakterije su važni članovi vodenog ekosistema i igraju važnu ulogu u sudbini određenih hemikalija u životnoj sredini. Test na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri* (nekada *Photobacterium phosphoreum*) koristi se preko 25 godina kao osnovni test za ekotoksikološko ispitivanje hemikalija, otpadne vode i proceđenih voda iz zemljišta i

sedimenata. *V. fischeri* je gram-negativna bakterija sa jedinstvenom osobinom – bioluminescencijom, koju kontroliše mali set gena poznat kao *lux* operon (Slika 24).

Luminescencija je hemijska reakcija u kojoj enzim, luciferaza (FMNH_2), oksiduje organsku supstancu, npr. duge lance aldehida, i redukuje se do flavin mononukleotida (FMN), pri čemu se oslobađa slobodna energija u obliku plavo-zelene svetlosti na 490 nm (7). Reakcija koja se odvija u *V. fischeri* je sledeća:



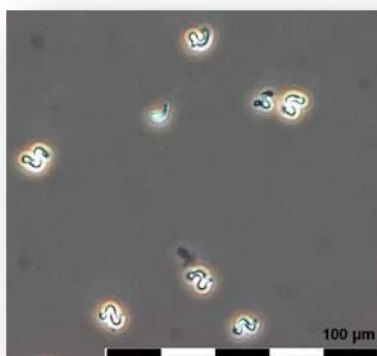
Slika 24. Fotografija bakterije *Vibrio fischeri* uvećana 8000 puta
(Dr. Dennis Kunkel Microscopy, Inc./Visuals Unlimited, Inc).

Bioluminescencija koju proizvede marinska bakterija *V. fischeri* osnov je za ISO standardni bioesaj toksičnosti (11348 - Deo 1-3 (2007)) koji se koristi za određivanje toksičnosti vodenih rastvora poznatih i nepoznatih uzoraka. Razlika u količini proizvedene svetlosti nakon izlaganja ispitivanom jedinjenju (inhibicija luminescencije) može onda da se koreliše sa metabolizmom organizama i proporcionalna je toksičnosti ispitivanog jedinjenja.

2.8.3. Toksikološki test na algama

Mikroalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Slika 25) je planktonska vrsta koja živi u slatkovodnim barama, jezerima i rekama. Taksonomija *P. subcapitata* (Hindak, 1990) je kompleks nekoliko imena koja se i dalje koriste, kao što su *Selenastrum capricornutum* (Printz, 1914), *Kirchneriella subcapitata* (Korshikov, 1953) i *Raphidocelis subcapitata* (Hindak, 1977). *P. subcapitata* je među najčešće korišćenim i

preporučenim vrstama za ispitivanje toksičnosti slatkih voda. Većina standardnih procedura koje se trenutno koriste (OECD 2006, ISO 2012) uzimaju inhibiciju rasta algi kao završnu tačku toksičnosti, odnosno efekat ispitivanog jedinjenja koristeći brzorastuću populaciju algi u odgovarajućem, nutrijentima obogaćenom medijumu, tokom ekspozicije u trajanju od 3-4 dana. Standardni ISO protokol (ISO 8692, 2012) je utvrđen za određivanje inhibicije rasta jednoćelijskih zelenih algi izazvane jedinjenjima ili smešom jedinjenja u vodama i otpadnim vodama. Ovaj metod je primenjiv na supstance rastvorne u vodi.



Slika 25. Čelije *Pseudokirchneriella subcapitata* pod fazno-kontrastnim mikroskopom (Aruoja, 2011).

2.8.4. Toksikološki test na *Daphnia magna*

Daphnia magna je planktonski račić rasprostranjen u malim ili srednje velikim slatkovodnim staništima (Slika 26). Hraneći se fitoplanktonima kao glavnom hranom s jedne strane, a s druge strane predstavljajući važan izvor hrane ribama i još nekim vodenim invertebratama, *Daphnia magna* igra značajnu ekološku ulogu u lancu ishrane slatkovodnog ekosistema. Zbog svoje velike osetljivosti na otrovne materije, služi kao dobar indkator zagađenja (Adema, 1978). Zbog toga se dosta koristi za testove toksičnosti za pojedine zagađujuće supstance ili njihove smeše, kao i u bioesejima za procenu toksičnosti otpadnih ili zagađenih prirodnih voda. U biološkim istraživanjima koristi se još od XVIII veka, a sve veću primenu ima u ekološkim i ekotoksikološkim studijama. Pored već pomenute ekološke važnosti, bespolno razmnožavanje, visoka plodnost i laka kultivacija čine dafnije veoma poželjnim u vodenoj ekotoksikologiji

(Adema, 1978), sa trenutno nekoliko dostupnih testova (OECD 2004, OECD 1998, ISO 2012).

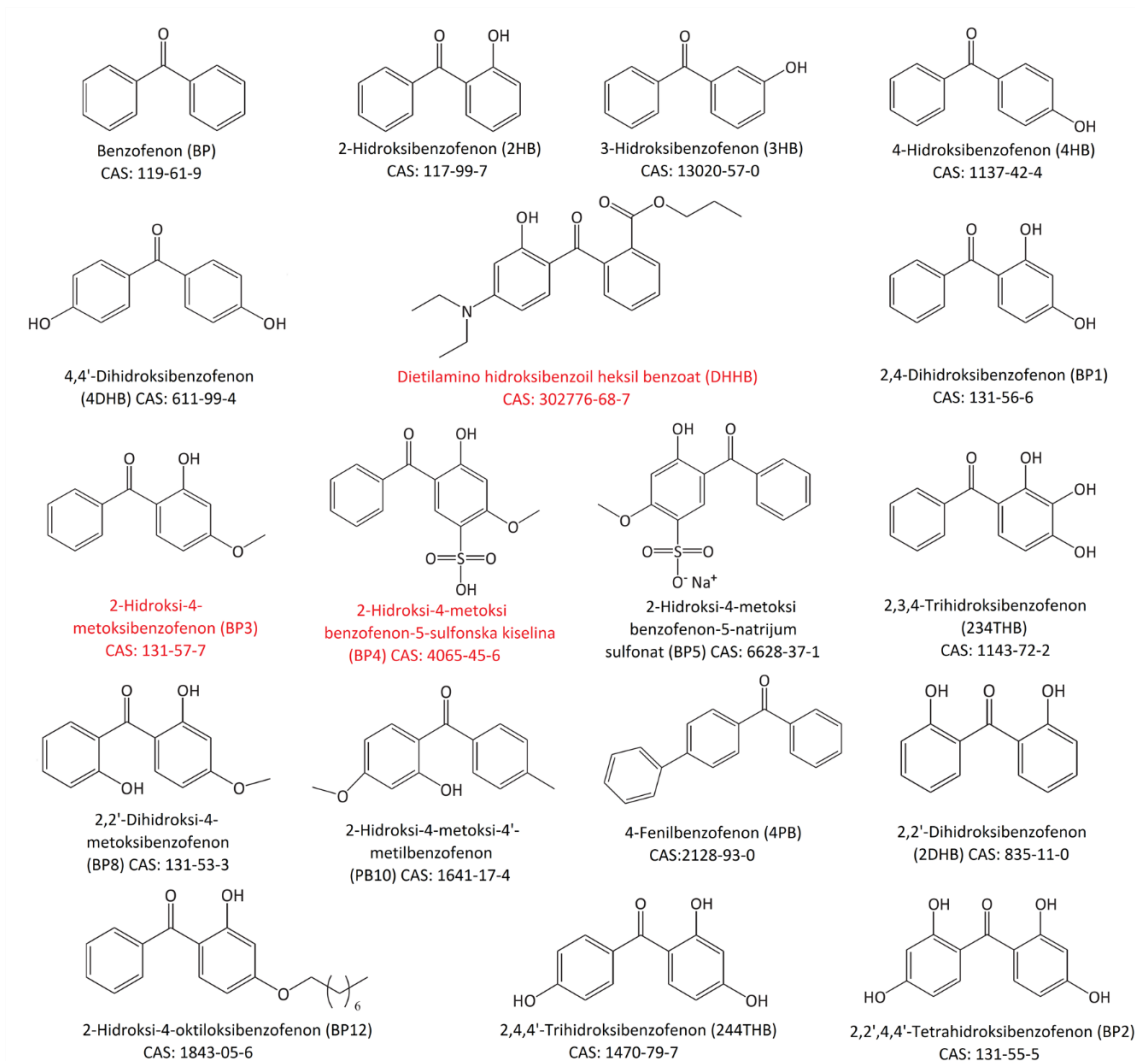


Slika 26. Ženka *Daphnia magna* sa jajašcima
(https://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia_magna).

2.9. Benzofenonski UV filtri

Benzofenonski UV filtri su supstance sposobne da apsorbuju zračenje u UVA (320-400 nm) i UVB (290-320 nm) oblasti elektromagnetnog spektra. Oni su u širokoj upotrebi kao aktivne komponente krema za zaštitu od sunca u nameni da spreče neka najčešća oštećenja i bolesti kože, uključujući i rak. Zbog toga se dosta koriste u proizvodnji kozmetike i ostalih preparata za ličnu negu. Mogu takođe da se koriste i kao poljoprivredne hemikalije, pojačivači ukusa i kao UV stabilizatori u izradi plastične ambalaže za pakovanje hrane kako bi sprečili fotodegradaciju plastičnih polimera ili same hrane (Suzuki *et al.*, 2005; Zenker *et al.*, 2008).

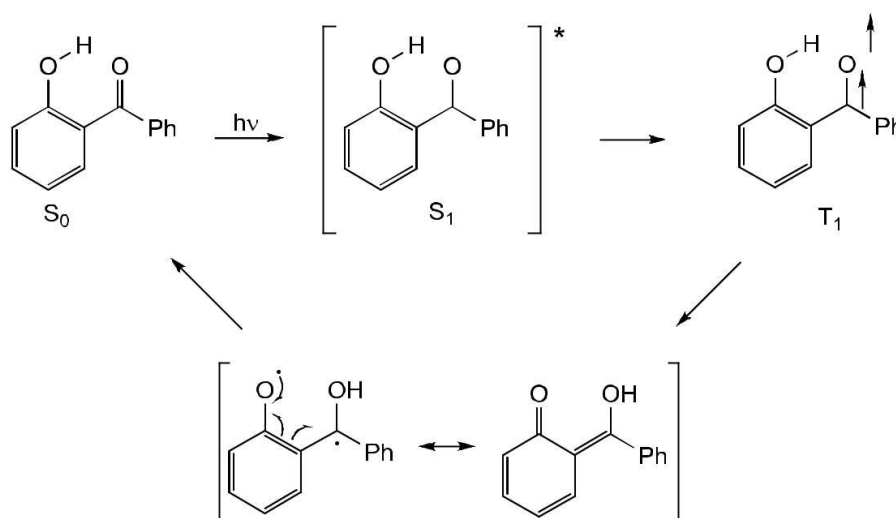
Benzofenoni imaju dva benzenova prstena spojena karbonilnom grupom. Osamnaest supstituisanih derivata benzofenona (Slika 27) se zbog svojih apsorpcionih sposobnosti koristi u različitim komercijalnim proizvodima.



Slika 27. Benzofenonski UV filtri (crvenom bojom su označeni UV filtri dozvoljeni u kozmetici u EU).

Benzofenoni su generalno fotohemijski prilično reaktivni. Pri apsorpciji fotona UV svetlosti nastaje singletno pobuđeno stanje, koje veoma brzo prelazi u tripletno pobuđeno stanje. Tripletne stanja ketona imaju osobine dvostrukih radikala, T_1 (Šema 1). Radikalni centar na C atomu je prirodno stabilizovan supstituentima, samim tim i manje reaktivan. Kiseonični radikali (alkoksieni) su veoma reaktivni i brzo reaguju tako što apsorbuju molekul vodonika iz drugog organskog molekula. Pri tome dolazi do redukcije ketona do alkohola.

Ako benzofenon na položaju 2 ima hidroksilnu grupu, onda nastali triplet apsorbuje vodonikov atom iz te OH grupe. Veza OH kod fenola je dosta slaba. Pri tome nastaje enol koji se vrlo brzo vrati u termodinamički stabilniji keto oblik. Zbog tih reakcija izomerizacije, odnosno keto-enolne tautomerije, fotohemijski pobuđeno stanje se vrlo brzo deaktivira i mogućnost drugih reakcija je veoma mala, te se benzofenoni smatraju stabilnim jedinjenjima.

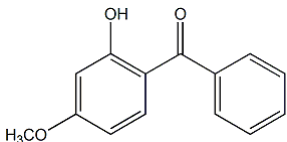
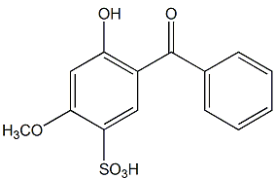
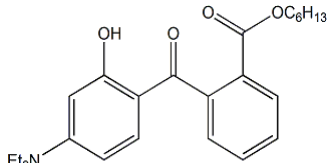


Šema 1. Izomerizacija 2-hidroksibenzofenona (2HB).

S druge strane, benzofenonski UV filtri zbog toga što u svojoj strukturi poseduju jake elektrondonorske grupe (-OH, -OMe), veoma su reaktivni prema elektrofilnim halogenim elementima. Zbog toga se očekuje da će benzofenoni lako reagovati sa sredstvima za dezinfekciju na bazi hlora i kao proizvod dati hlorovane derivate.

Benzofenonski UV filtri koji se najčešće upotrebljavaju u kozmetici su BP3 i BP4, koji apsorbuju u UVB oblasti elektromagnetnog zračenja (Tabela 2). Sa ciljem da obezbedi zaštitu od kratkotalasnog UVA zračenja, na listu dozvoljenih UV filtera u kozmetici dospelo je benzofenonski UV filter, DHHB, proizveden od strane BASF pod imenom Uvinul A plus (BASF, 2006). Zbog svoje dobre kompatibilnosti sa UVB filtrima (Venditi *et al.*, 2008), očekivano je da će relativno nov UVA filter da obezbedi odgovarajuću zaštitu protiv slobodnih radikala i prevremenog starenja kože, za šta je uglavnom odgovorno UVA zračenje (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 2007).

Tabela 2. Dozvoljeni benzofenonski UV filtri u EU

Jedinjenje	BP3	PB4	DHBB
Hemijska formula	$C_{14}H_{12}O_3$	$C_{14}H_{12}O_6S$	$C_{24}H_{31}NO_4$
Strukturna formula			
Naziv po IUPAC	(2-Hidroksi-4-metoksifenil)-fenilmetanon	4-Hidroksi-2-metoksi-5-(okso-fenilmetil)benzensulfonska kiselina	Heksil 2-[4-(dietilamino)-2-hidroksibenzoil]benzoat
Trivijalna imena	Oksibenzon, Benzofenon-3, 2-Hidroksi-4-metoksibenzofenon	Benzofenon-4, Sulisobenzon Sulisobenzon	Dietilamino hidroksibenzoil heksil benzoat, Uvinul A Plus
CAS broj	131-57-7	4065-45-6	302776-68-7
Molekulska masa	228,25 g/mol	308,31 g/mol	397,51 g/mol
Rastvorljivost u vodi na 25 °C	69 mg/l	$2,5 \cdot 10^5$ mg/l	$9,5 \cdot 10^{-4}$ g/l
Napon pare na 25 °C	$1,4 \cdot 10^{-6}$ Pa	$1,3 \cdot 10^{-11}$ Pa	$2,9 \cdot 10^{-8}$ Pa
log Kow	3,79	0,37	6,93

Treba naglasiti da se zakonodavstvo vezano za UV filtre razlikuje u različitim zemljama, tako se i dozvoljeni UV filtri i njihove maksimalne koncentracije razlikuju od zemlje do zemlje. Maksimalna dozvoljena koncentracija BP3 UV filtra u zaštitnim kremama je 10% u Evropskoj Uniji, dozvoljeni benzofenon u Koreji je BP8 i to do 3% (EEC⁸, 1983; Jeon *et al.*, 2006), a dozvoljena koncentracija BP4 upotrebljenog u kozmetici je 10% u Japanu (MHLW⁹, 2000). Na taj način, velika količina ostataka

⁸ EEC – European Economic Community (Evropska ekonomska zajednica)

⁹ MHLW – Ministry of Health and Welfare (Ministarstvo zdravlja i socijalne zaštite)

benzofenonskih UV filtera i njihovih metabolita ulazi u vodenu sredinu direktno ili indirektno spiranjem sa kože i odeće tokom sezonskih aktivnosti na kupalištima ili ispuštanjem otpadnih ili bazenskih voda. Najviša izmerena koncentracija je u Velikoj Britaniji za BP4 UV filter (do 0,3 mg/l), ali u rečnoj vodi nizvodno od mesta gde se ispuštaju otpadne vode (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009). U istoj studiji nađeni su i BP3 (do 44 µg/l), BP2 (do 26 µg/l) i BP1 (do 17 µg/l). Koncentracija BP4 UV filtra kreće se od 237-1481 ng/l u uzorcima otpadnih voda iz Španije (Rodil i Moeder, 2008). BP3 UV filter je takođe dosta proučavan i nađen u visokim koncentracijama u rekama, i do 993 ng/l u teže zagađenim rekama (Rodil i Moeder, 2008; Negreira *et al.*, 2008; Fent *et al.*, 2010; Róman *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). Srednja koncentracija BP1 u 25 reka u Koreji je 47 ng/l, a benzhidrol (BH, difenilmetanol), glavni metabolit benzofenona, detektovan je sa najvišom koncentracijom od 204 ng/l (Jeon *et al.*, 2006). U jezerskoj vodi, benzofenonski UV filtri su detektovani jedino u Švajcarskoj, i to BP3 sa koncentracijom 125 ng/l (Poiger *et al.*, 2004) i u Južnoj Koreji 4HB sa 85 ng/l (Jeon *et al.*, 2006).

Kao što je ranije već spomenuto, u bazenskim vodama su upravo benzofenoni najčešće detektovani UV filtri, BP (18,8 µg/l), 4HB (15,4 µg/l), BP1 (8,7 µg/l) i BP3 (4,5 µg/l) (Ye *et al.*, 2011), dok je BP4 detektovan u nižim koncentracijama, 46 ng/l (Grabicova *et al.*, 2013) (Slika 22). Benzofenonski UV filtri BP i 4HB nisu među jedinjenjima koja su na listi dozvoljenih za kozmetičke preparate, pa njihovo prisustvo u bazenima nije potpuno jasno. Prisustvo DHHB UV filtra nije zabeleženo ni u jednoj od studija koje su se bavile ispitivanjem bazenske vode.

Benzofenonski UV filtri u različitim biosejima pokazali su i estrogene i antiandrogene karakteristike u različitim organizmima. Na primer, pokazali su „uterotrofni“ efekat (neželjena dejstva na reproduktivne organe) *in vivo*, stimulaciju proliferacije nekih ćelija kancera dojke i povećanje lučenja nekih tumor markera *in vitro* (Schlumpf *et al.*, 2004; Balmer *et al.*, 2005; Schreurs *et al.*, 2005; Zenker *et al.*, 2008). Štaviše, neka istraživanja su pokazala da benzofenonski UV filtri BP4 i BP8 i 234THB imaju genotoksični efekat (Zeiger *et al.*, 1987; French, 1992; Jeon *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014). Analize humanog (majčinog) mleka obezbedile su dokaze za moguću bioakumulaciju benzofenonskih UV filtera, i ostaci BP3 UV filtra u uzorcima majčinog

mleka detektovani su u koncentracijama do 445 ng/l (Hany i Nagel, 1995; Liu *et al.*, 2014). Benzofenonski UV filteri BP3 i BP1 detektovani su u ljudskom urinu nakon primene komercijalno dostupnog proizvoda za zaštitu od sunca (Felix *et al.*, 1998).

Međutim, sistematsko istraživanje toksičnosti i potencijalnog ekotoksikološkog rizika benzofenonskih UV filtera je krajnje nedovoljno, pogotovo njihovih transformacionih metabolita u dezinfekcionim procesima hlorinacije.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

U okviru ovog rada ispitivana su tri benzofenonska UV filtra čije je korišćenje dozvoljeno za pripremu kozmetičkih proizvoda u Evropskoj Uniji: dietilaminohidroksibenzoil heksil benzoat (DHHB), 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3) i 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (BP4).

Glavni cilj ovog rada bilo je ispitivanje stabilnosti i toksičnosti DHHB UV filtra u prisustvu hlora u vodenoj sredini. S obzirom da se je DHHB relativno nov na tržištu i da se malo zna o njegovoj ekotoksičnosti i sudbini u životnoj sredini, on je bio glavni predmet ovog rada, a pored njega ispitivani su i BP3 i BP4 kao najčešće korišćenim benzofenonski UV filtri. Ovi eksperimenti sprovedeni su simuliranjem dezinfekcionih uslova koji vladaju u bazenskim vodama, dodavanjem NaOCl ili TCCA kao izvora slobodnog hlora.

Kako bi se realizovao postavljeni cilj bilo je potrebno ispitati i stabilnost BP3, BP4 i DHHB UV filtera i njihovih hlorovanih proizvoda kada se izlože UV zračenju. Ispitivanje je vršeno u fotoreaktoru sa šest živinih fluorescentnih lampi koje emituju UVA (355 nm) zračenje.

Za potrebe eksperimenata bilo je neophodno sintetisati i potpuno okarakterisati hlorovane proizvode DHHB, BP3 i BP4 UV filtra jer ova jedinjenja nisu dostupna na tržištu, a sintetisan je i dietilaminohidroksibenzoil heksil benzoat (DHHB).

Budući da, prema našim saznanjima, nema podataka o toksičnosti DHHB UV filtra i njegovih hloro derivata, ispitivan je potencijalni toksični efekat korišćenjem standardnih ekotoksikoloških testova na vodenim organizmima: luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri*, slatkovodnoj planktonskoj algi *Pseudokirchneriella subcapitata* i slatkovodnom račiću *Daphnia magna*. Akutna toksičnost BP3 i BP4 UV filtra ispitivana je samo na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri*. Dodatni cilj rada bio je i da se predstave uporedni podaci toksičnosti DHHB UV filtra i njihovih transformacionih proizvoda, kao i poređenje sa literaturnim podacima za ostale

benzofenonske UV filtre. Data je i korelacija između toksičnih efekata i hemijske strukture, ali i specifičnog biološkog odgovora organizma na određena jedinjenja.

Da bi se utvrdilo prisustvo BP3, BP4 i DHHB UV filtera i njihovih hlorovanih proizvoda u životnoj sredini, ispitivani su uzorci voda sa nekoliko kupališta i bazena u Sloveniji i Srbiji.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Reagensi

U toku eksperimentalnog rada korišćeni su sledeći analitički standardi: heksil 2-[4-(dietilamino)-2-hidroksibenzoil]benzoat (DHBB) (*Dr Ehrenstorfer*, analitičke čistoće 99%), 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3) (analitičke čistoće 96%) i 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (BP4) (analitičke čistoće 96%) proizvođača *Sigma Aldrich (UK)*.

U sintetičkim postupcima korišćeni su *N,N*-dietil-3-aminofenol, anhidrid ftalne kiseline, dicikloloheksil-karbodiimid (DCC), 4-dimetilaminopiridin (DMAP), 10%-tni natrijum hipohlorit (NaOCl) i trihlorocijanurna kiselina (TCCA) (tehničke čistoće 97%), heksanol, toluen, petrol-etar, dietil etar, etil acetat, etanol, dihlorometan, *n*-heksan, hlorovodonična kiselina, natrijum-hidrogenkarbonat, anhidrovani natrijum-sulfat (*Sigma Aldrich* ili *Fluka*).

U dezinfekcionim eksperimentima korišćeni su 10%-tni natrijum hipohlorit (NaOCl) i trihlorocijanurna kiselina (TCCA) (analitičke čistoće 97%), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i Na_2HPO_4 (*Acros Organics*, analitičke čistoće više od 99%) za pripremanje fosfatnog pufera, zatim acetonitril, natrijum-hidrogenkarbonat i anhidrovani natrijum-sulfat (*Sigma Aldrich* ili *Fluka*).

U procesima fotodegradacije za pripremanje rastvora korišćen je acetonitril i dvostruko dejonizovana voda ($<18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) pripremljena je na "NANO pure water" sistemu (Barnstead, SAD).

Za HPLC i LC-MS analize korišćen je acetonitril (*Sigma Aldrich*, HPLC čistoće) i metanol (*Fluka analytical*, HPLC čistoće; *Merck*, MS čistoće), glacijalna sirćetna kiselina (*Merck, p.a.*), mravlja kiselina HCOOH (*Fluka*, HPLC čistoće; *Merck*, MS čistoće), dvostruko dejonizovana voda ($<18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) pripremljena je na "NANO pure water" sistemu (Barnstead, SAD).

Za NMR analize korišćeni su aceton d_6 , deuterisani hloroform ($CDCl_3$) i dimetil sulfoksid (DMSO), tetrametilsilan (*Sigma Aldrich*, *Fluka* ili *Merc*).

U testovima toksičnosti korišćeni su aceton ili dimetilsulfoksid (DMSO) i dvostruko dejonizovana voda za pravljenje rastvora, natrijum hidroksid (*AppliChem*) i hlorovodonična kiselina (*Sigma Aldrich, p.a.*), natrijum hlorid (*Carlo Erba*), kalijum dihromat ($K_2Cr_2O_7$, *Merk*).

4.2. Sinteze

Sa ciljem da se obezbede hlorovani proizvodi DHHB UV filtra kojih nije bilo među komercijalno dostupnim reagensima u katalogima dobavljača, bilo ih je neophodno sintetisati. Međutim, pre sinteze 3-hloro i 5-hloro DHHB, trebalo je da se obezbedi i dovoljna količina DHHB UV filtra, koji je u upotrebi tek poslednjih nekoliko godina.

Prvi korak u sintezi DHHB UV filtra bila je sinteza 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzojeve kiseline. Ona je izvedena u skladu sa postupkom koji su objavili Patel i saradnici (2005), dok su heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoat (DHHB) i njegovi hlorovani proizvodi, heksil 2-(3-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoat i heksil 2-(5-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoat, sintetisani prema postupku koji će biti predstavljeni po prvi put u ovom radu u poglavljima 4.2.1.2. i 4.2.2. Radi pojednostavljenja, u daljem tekstu će hlorovani proizvodi DHHB UV filtra biti navođeni i kao 3-hloro DHHB i 5-hloro DHHB (ili 3-Cl i 5-Cl DHHB).

Jedinjenja 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3) i 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina (BP4) kupljeni su kao gotovi proizvodi. Postupak sinteze hlorovanih derivata BP3 i BP4 UV filtera, 3-hloro- i 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (u tekstu će biti navođeni kao 3Cl-BP3 i 5Cl-BP3) i 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (3,5-diCl-BP3) biće predstavljen u daljem tekstu u poglavljima 4.2.3.1. i 4.2.3.2, kao i sinteza 5-benzoil-3-hloro-4-hidroksi-2-metoksibenzensulfonske kiseline (3Cl-BP4) u poglavlju 4.2.4.2.

Karakterizacija svih dobijenih proizvoda i reakcioni putevi biće prikazani u odeljku Rezultati i diskusija.

4.2.1. Sinteza heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB)

4.2.1.1. Sinteza 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline

U dvogrli balon opremljen magnetom rastvoreno 14,8 g anhidrida ftalne kiseline (100 mmol) u 35 ml toluena i zagrevano do 80 °C u uljanom kupatilu. Balon je povezan na vodeni kondenzator i uz mešanje je dodano 12,2 g (74 mmol) 3-*N,N*-dietilaminofenola (DEAP). Zatim je temperatura zagrevanja podešena na 130 °C (to je temperatura topljenja anhidrida ftalne kiseline) i reakciona smeša ostavljena da se refluktuje u toku 8 sati. Tok reakcije praćen je tankoslojnom hromatografijom (SiO₂, kao mobilna faza korišćena je smeša etil acetat : petrol etar : metanol : etanol = 2 : 6 : 1 : 0,5). U ohlađenu reakcionu smešu je zatim dodano 10 ml etanola, čime se proizvod staloži, a zatim filtrira i osuši na temperaturi oko 100 °C. Sirovi proizvod je prekrystalisan smešom etanola i etilacetata i dobijeno je 16,65 g (72%) 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline.

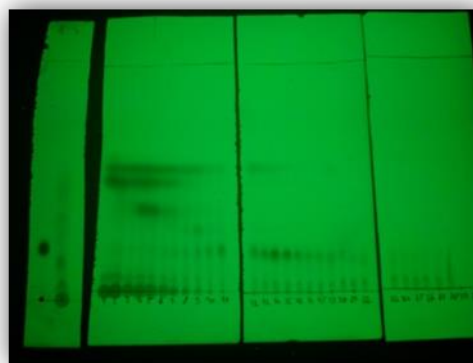
4.2.1.2. Sinteza heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB)

U balonu opremljenom magnetom rastvoreno je 4,68 g (15,0 mmol) 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline, 3,25 g (15,8 mmol) dicikloheksilkarbodiimida (DCC), 1,61 g (15,8 mmol) heksan-1-ola u 30 ml dihlormetana i dodato je 18 g (1,5 mmol) 4-dimetilaminopiridina (DMAP) koji služi kao katalizator u ovoj reakciji. Reakciona smeša postavljena je na magnetnu mešalicu i ostavljena da se meša dva sata na sobnoj temperaturi (dok esterifikacija nije bila završena). Reakciona smeša razblažena je sa petrol etrom kako bi se staložile nerastvorne supstance (kao što je urea) i potom je filtrirana. Filtrat je par puta ispiran vodom u levku za odvajanje, zatim razblaženom hlorovodoničnom kiselinom, pa vodenim rastvorom natrijumhidrogenkarbonata i opet vodom. Nakon sušenja sa bezvodnim natrijum sulfatom, rastvarač je uparen na vakuum uparivaču. Dobijeni sirovi proizvod koji je imao roze-ljubičastu boju je radi prečišćavanja propušten kroz kratku kolonu silika gela, a kao

eluent je korišćen etilacetat. Dobijeno je 1,65 g (prinos 28%) heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB) u vidu ulja žute boje.

4.2.2. Sinteza hlorovanih proizvoda: heksil 2-(3-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata i heksil 2-(5-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata

U erlenmajeru je rastvoreno 0,407 g (odnosno 1,0 mmol) sintetisanog DHHB UV filtra u 10 ml sirćetne kiseline. Rastvor je dodatno zakišeljjen sa 0,5 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline i postepeno je uz mešanje u kapima dodavano 5 ml vodenog rastvora natrijum-hipohlorita koji je sadržao 1,0 mmol NaOCl. Nakon 30 minuta, reakciona smeša razblažena je sa 50 ml vode i 20 ml dietil etra. Organski sloj ispran je sa vodenim rastvorom NaHCO_3 , osušen sa bezvodnim Na_2SO_4 i rastvarač je uparen na vakuum uparivaču. Sirovi uljani proizvod propušten je kroz hromatografsku silika kolonu, u epruvetice su hvatane male frakcije i njihov sastav proveravan takođe uz pomoć tankoslojne hromatografije na pločicama SiO_2 . U ovom slučaju TLC pločice su posmatrane pod UV lampom kratkotalasnog zračenja od 254 nm (kao na *Slici 28, desno*), jer jedinjenja u odvojenim frakcijama nisu bila obojena da bi se primetila golim okom. Dobijene su 2 komponente (kasnije će biti predstavljene kao jedinjenja A i B).



Slika 28. Razdvajanje hlorovanih proizvoda na hromatografskoj koloni (levo); razdvajanje frakcija na tankom sloju SiO_2 (desno).

4.2.3. Sinteza hloro derivata BP3

4.2.3.1. Sinteza 3-hloro- i 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona

(3-Cl BP3 i 5-Cl BP3)

Sinteza je izvedena je tako što je 2,28 g (10,0 mmol) 2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (BP3) rastvoreno u 20 ml dihlormetana. Sud je postavljen na ledeno kupatilo i u porcijama je dodavan *N*-hlorosaharin uz stalno mešanje. Nakon 10 minuta, reakciona smeša isprana je vodenim rastvorom natrijum hidrogenkarbonata i natrijum bisulfita, zatim je isprana vodom i sušena sa bezvodnim natrijum sulfatom. Nakon uparavanja rastvarača na sniženom pritisku, zaostalo je 2,54 g žute kristalne supstance; ona je sadržala 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenon kao glavni proizvod (5Cl-BP3) i oko 15% 3-hloro-izomera (3Cl-BP3). Rekristalizacijom sirovog proizvoda iz smeše dihlormetana i petrol etra dobijen je prinos od 1,20 g (46%) čistog 5Cl-BP3. Rastvarač je nakon kristalizacije 5-hloro-izomera uparen i proizvod je prečišćen na hromatografskoj koloni (SiO₂, eluent smeša dietil etar-petrol etar (1:6)). Izolovano je 232 mg (9%) čistog 3-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (3Cl-BP3). Karakteristike dobijenih proizvoda biće detaljno prikazane u Rezultatima i diskusiji.

4.2.3.2. Sinteza 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (3,5-diCl-BP3)

Sinteza dihloro derivata BP3 UV filtra vršena je tako što je 1,13 g (5,0 mmol) 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (5Cl-BP3) tretirano sa 1,31 g (5,0 mmol) *N*-hlorosaharina u 10 ml dihlormetana na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta reakciona smeša je isprana sa vodenim rastvorom natrijum hidrogenkarbonata i natrijum bisulfata, osušena sa bezvodnim natrijum sulfatom i rastvarač je uparen na vakuum uparivaču. Dobijena čvrsta supstanca žute boje je rekristalisana iz smeše dihlormetana i *n*-heksana i izolovano je 0,965 g (65%) svetlo žutih kristala 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona.

4.2.4. Hlorovanje BP4 UV filtra

Pošto je BP4 UV filter zapravo 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina, njegovo ponašanje i stabilnost umnogome zavise od pH sredine. Zbog toga su eksperimenti hlorovanja u slučaju BP4 izvođeni u kiseloj i baznoj sredini.

4.2.4.1. Reakcija BP4 UV filtra i TCCA u baznoj sredini

U 4 ml destilovane vode rastvoreno je 0,92 g (3,0 mmol) BP4 UV filtra i 0,25 g (3,0 mmol) natrijum hidrogenkarbonata. Nakon toga, dodato je 0,28 g (1,2 mmol) trihloroizocijanurne kiseline (TCCA) i reakciona smeša je ostavljena da stoji preko noći. Tok reakcije je praćen tankoslojnom hromatografijom (SiO_2 , mobilna faza je smeša etanol:dihlormetan = 1:1). Čvrsti proizvod koji se izdvojio je filtriran, rastvoren u dietiletru i ekstrahovan sa zasićenim vodenim rastvorom natrijum hidrogenkarbonata. Nakon upravljanja rastvarača, zaostalo je 0,295 g (33%) žute kristalne supstance. Pomoću NMR spektroskopije, utvrđeno je da je dobijeno jedinjenje 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (3,5-diCl-BP3).

4.2.4.2. Reakcija BP4 UV filtra i NaOCl u kiseljoj sredini

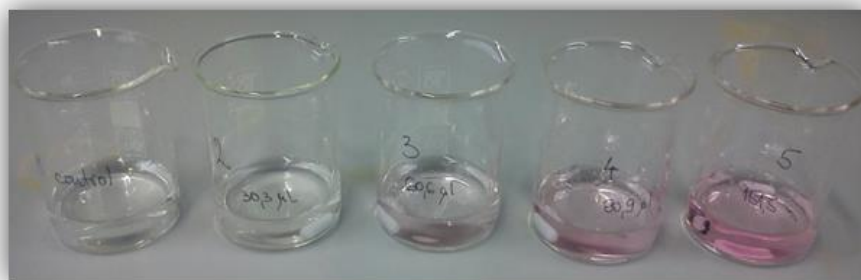
U erlenmajeru opremljenom magnetom, rastvoreno je 0,21 g (0,7 mmol) BP4 UV filtra u 5 ml destilovane vode, i erlenmajer je smešten u ledeno kupatilo i postavljen na magnetnu mešalicu. Dobijeni rastvor zakiseljen je sa 0,15 ml (1,5 mmol) koncentrovane hlorovodonične kiseline i polako je dodato 1,407 g vodenog rastvora natrijum hipohlorita (0,91 mmol, masenog udela 4,8%). Nakon dva sata, reakciona smeša je filtrirana. Filtrat je uparen pod sniženim pritiskom na rotacionom vakuum uparivaču i čvrsti osatak je ekstrahovan etanolom. Ekstrakt je prečišćen na hromatografskoj koloni (SiO_2 , eluent je smeša etanol : dihlormetan = 1 : 3) i izolovano je 39 mg (18%) 5-benzoil-3-hloro-4-hidroksi-2-metoksibenzensulfonske kiseline (3Cl-BP4) u vidu žutih kristala.

4.3. Dezinfekcioni eksperimenti

4.3.1. Hlorovanje DHHB UV filtra u vodenoj sredini

Sa ciljem da se ispituju transformacije DHHB UV filtra u vodenoj sredini u prisustvu hlora, eksperimenti hlorovanja izvođeni su dodatkom različitih količina hipohlorita rastvoru DHHB UV filtra u simuliranim uslovima prirodnog vodenog sistema. Najpre, 25 ml koncentrovanog rastvora DHHB u acetonitrilu (40 mg/l) dopunjeno je destilovanom vodom do 100 ml. Nakon toga, u rastvor je dodato 0,0168 g

NaHCO₃ čime je postignuta koncentracija bikarbonata od 2 mmol/dm³, što odgovara koncentraciji bikarbonata u prirodnim uslovima. Pre dodatka hipohlorita, rastvor je podeljen na pet delova, u pet čaša po 20 ml rastvora. Koncentracija ukupnog DHHB UV filtra bila je 10 mg/l, odnosno, u svakom delu bilo je po $5,038 \times 10^{-7}$ molova DHHB. Uzorci su dopunjeni redom sa 0; 0,5; 1; 1,5 i 2,5 ekvivalenta hipohlorita (*Slika 29*). Zbog mogućnosti dekompozicije aktivnog hlora tokom vremena, sadržaj aktivnog hlora u rastvoru NaOCl određen je standardnom titrimetrijskom metodom 4500-Cl F DPD-FAS (Eaton i Franson, 2005). Rastvori su postavljeni na magnetnu mešalicu i ostavljeni na sobnoj temperaturi na pH 8 (približno prirodnoj pH vrednosti) i nakon jednog sata reakcija je zaustavljena dodatkom ekvivalentne količine Na₂SO₃, nakon čega je rađena HPLC-DAD i LC-MS-MS analiza.



Slika 29. Rastvori DHHB sa dodatim različitim koncentracijama NaOCl.

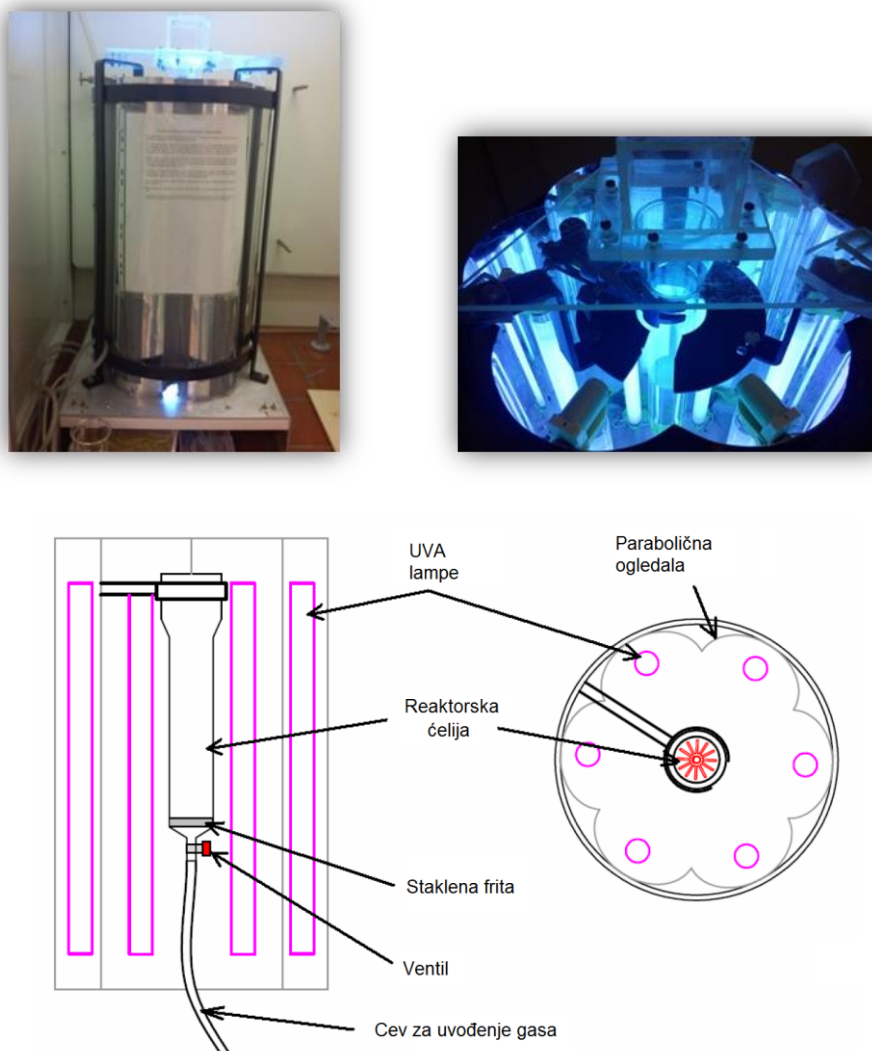
4.3.2. Hlorovanje BP3 i BP4 u vodenoj sredini

Radni rastvori BP3 i BP4 UV filtera pripremljeni su u 0,01 M fosfatnom puferu (KH₂PO₄ + Na₂HPO₄) tako da je njihova pH vrednost iznosila 6,9 a koncentracije rastvora 5,0 mg/l i 10 mg/l. Za eksperimente hlorovanja korišćeni su 30%-tni rastvor natrijum hipohlorita čiji je sadržaj aktivnog hlora 1,4 mg/l, ili rastvor trihloroizocijanurne kiseline koncentracije 4,0 mg/l. Sadržaj aktivnog hlora u NaOCl takođe je proveravan standardnom titrimetrijskom metodom 4500-Cl F DPD-FAS (Eaton i Franson, 2005) zbog mogućnosti dekompozicije hlora tokom vremena. U 100 ml rastvora BP3, odnosno BP4, dodato je po 0,29 ml rastvora NaOCl ili TCCA i reakciona smeša ostavljena je da stoji 24 sata na sobnoj temeperaturi u tami. Nakon toga, vršene su analize na HPLC-DAD i UV-Vis spektrofotometru.

Isti set eksperimenata hlorovanja UV filtera BP3 i BP4 izvođen je sa NaOCl u simuliranim uslovima prirodne vode, koja sadrži Na^+ (18,0 mg/l), Mg^{2+} (4,8 mg/l), Ca^{2+} (47,0 mg/l), SO_4^{2-} (9,0 mg/l), Cl^- (17,0 mg/l) i HCO_3^- (174,8 mg/l).

4.4. Ispitivanje fotostabilnosti

Ispitivana je fotostabilnost BP3, BP4 i DHHB UV filtera i njihovih hlorovanih proizvoda u laboratorijskim uslovima. Eksperimenti fotodegradacije izvođeni su korišćenjem živinih lampi niskog pritiska kao izvora zračenja. Rastvori su pravljani u smeši acetonitrila i vode u odnosu u kom se postigne zadovoljavajuća rastvorljivost.

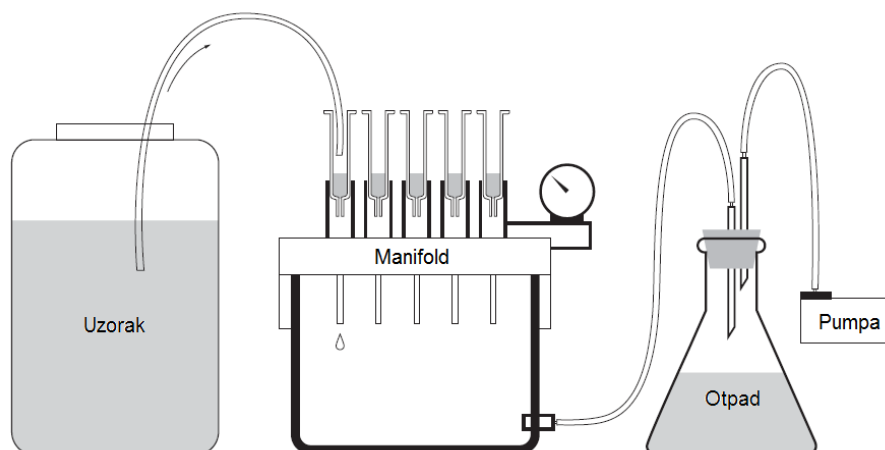


Slika 30. Fotografije i skica kružnog fotoreaktora sa postavljenom fotolitičkom ćelijom (Černigoj et al., 2007).

Eksperimenti ispitivanja fotostabilnosti izvođeni su u fotoreaktoru koji je opremljen sa ćelijom od borosilikatnog stakla (cev dužine 240 mm, unutrašnjeg prečnika 40 mm) efektivne zapremine 250 ml (Černigoj *et al.*, 2007; Žabar *et al.*, 2011). Ćelija je postavljena u centru fotoreaktora između 6 lampi na udaljenosti od 10 cm. Šest živinih lampi niskog pritiska služe kao izvor UVA (315-400 nm) zračenja (CLEO 20 W, 438 mm x 26 mm, Philips; sa emisijom maksimumom na 355 nm) (Slika 30). Rastvori analita zapremine 250 ml izlagani su svetlosti tokom 120 minuta. Uzorci su održavani u konstantnom kontaktu sa sobnom atmosferom i održavani na konstantnoj temperaturi 25 ± 2 °C tokom eksperimenta. U toku trajanja eksperimenta, alikvoti od 10 ml ozračivanog uzorka uzimani su iz ćelije u određenim vremenskim intervalima (15, 30, 45, 60, 90 i 120 min) i analizirani na HPLC-DAD i UV-Vis spektrofotometru.

4.5. Određivanje DHHB, BP3, BP4 i njihovih hlorovanih proizvoda u bazenskim vodama

Uzorci vode zapremine 1l uzimani su iz nekoliko bazena tokom letnje sezone avgusta 2011. godine u Sloveniji i tokom avgusta 2012. godine u Srbiji. Uzorci su podeljeni na dva dela i ekstrahovani pomoću strata-X 33 µm polimernog sorbenta (kertridži 200mg/6ml) i eluirani prema protokolu predloženom od strane Phenomenex. Uzeti uzorci vode su se najpre zakišeljivali sa glacijalnom sirćetnom kiselinom do pH = 3,5. Kondicioniranje sorbenta u kertridžima se vrši sa 5 ml metanola a potom sa 5 ml dejonizovane vode. Uzorci od 1l vode propuštani su kontinuirano kroz kolonu korišćenjem manifold aparature kao što je prikazano na Slici 31. Potom su ispod kertridža postavljene epruvetice i eventualno prisutna jedinjenja su eluirana sa po 5 ml acetona i 5 ml dihlormetana. Nakon uparavanja rastvarača, uzorci su rastvoreni u 0,5 ml mobilne faze i analizirani na HPLC-DAD po metodi koja će biti opisana daljem tekstu. Da bi se uradila kvantitativna analiza, pripremljene su kalibracione krive u opsegu koncentracija od 0,125 do 3 µg/l za BP3 i od 0,125 do 7,5 µg/l za 3,5-diCl-BP3.



Slika 31. Šema aparature korišćene za ekstrakciju UV filtera iz vode
(Phenomenex, 2003).

4.6. Instrumentalne analitičke metode

4.6.1. Određivanje tačke topljenja

Tačka topljenja sintetisanih jedinjenja određivana je pomoću OptiMelt EZ (Stanford Scientific) automatizovanog sistema za određivanje tačke topljenja.

4.6.2. Određivanje pH vrednosti

Za praćenje pH vrednosti korišćen je pH-metar Hanna Instruments HI 8417.

4.6.3. Elementarna analiza

Udeo mase ugljenika, vodonika i azota (%) čistih proizvoda dobijenih u postupcima sinteze određen je korišćenjem Perkin Elmer Series II CHNO/S 2400 elementarnom analizatoru. Dobijeni rezultati upoređeni su sa izračunatim sadržajem svakog elementa za svako ispitivano jedinjenje.

4.6.4. IR (infracrvena) spektroskopija

IR spektroskopija korišćena je kao jedna od dodatnih metoda kako bi se potvrdila predložena struktura jedinjenja, na osnovu prisustva glavne funkcionalne grupe. Karakterizacija ispitivanih jedinjenja na osnovu njihovih IR spektara vršena je

pomoću Parkin-Elmer Spectrum BX spektrometra, merenjem oslabljene ukupne refleksije uzorka. Uzorci su ispitivani u čvrstom stanju.

4.6.5. UV-Vis spektrofotometrija

Apsorpcioni spektri su snimljeni za rastvore DHHB UV filtra i njegovih hlorovanih proizvoda 3-Cl DHHB i 5-Cl DHHB u smeši acetonitril-destilovana voda (1:1) kako bi se pratila promena apsorbanca u toku eksperimenta fotodegradacije. Početna koncentracija rastvora bila je 50 mg/l i nakon određenih perioda zračenja uzimani su alikvoti i snimani na UV-Vis spektrofotometru. Apsorpcioni spektri su snimljeni takođe i za BP3 i BP4 UV filtre i njihove hloro derivate dobijene u postupku opisanom u odeljku 4.3.2. UV-Vis apsorpcioni spektri snimljeni su na Hewlett Packard 8453 spektrofotometru sa kvarcnim kivetama kod kojih je dužina optičkog puta 1 cm. ApSORBANCA je merena na talasnim dužinama od 200-500 nm.

4.6.6. ^1H i ^{13}C nuklearna magnetna spektroskopija

Analize na NMR spektroskopu izvođene su kako bi se dobila kompletna informacija o strukturi sintetisanih proizvoda i o njihovoj čistoći. NMR spektri snimljeni su na Bruker Avance DPX 300 spektrometru na 300 MHz (^1H) i na 75 MHz (^{13}C). Hemijska pomeranja data su δ jedinicama (ppm) a konstante kuplovanja (J) u hercima (Hz). Kao referentni standard je korišćen tetrametilsilan (TMS), a uz svaki spektar naveden je rastvarač u kome je sniman. Ispitivani proizvodi su uglavnom rastvarani u deuterisanom hloroformu (CDCl_3) ili dimetilsulfoksidu (DMSO).

4.6.7. HPLC-DAD analize

Tečna hromatografija visoke performanse (HPLC, eng. *HighPerformance Liquid Chromatography*) u kombinaciji sa DAD (eng. *Diode Array Detector*) je upotrebljena kako bi se pratili proizvodi degradacije odabranih UV filtera. HPLC analize izvedene su na Agilent 1100 HPLC-DAD. Hromatografsko razdvajanje izvođeno je na koloni Zorbax C8 (prečnika 4,6 mm x 250 mm dužine) punjene stacionarnom fazom Chromasil 100 (veličina pora 5 μm) koje proizvodi BIA Separations d.o.o., Slovenija. Temperatura kolone održavana je na 25 °C. Injekciona zapremina bila je 75 μl , a kao mobilna faza

korišćena je smeša acetonitrila i razblažene sirćetne kiseline (pH 3) u odnosu 60:40. Protok rastvarača podešen je na 1,0 ml/min, a trajanje metode na 25 minuta sa dodatnih 5 minuta (*post run*). DHHB i njegovi hlorovani proizvodi snimani su na talasnoj dužini detektora koja je podešena na 360 nm, dok su BP3, BP4 i njihovi hlorovani proizvodi praćeni na talasnoj dužini 240 nm. Sve analize su ponovljene tri puta i predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Uzorci DHHB-a i njegovih hlorovanih proizvoda uzimani takođe su uzimani najmanje u duplikatima i sva merenja vršena su četiri puta kako bi se obezbedila reproduktivnost merenja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (SD).

4.6.8. LC-ESI-MS i LC-ESI-MS-MS analize

Identifikacija proizvoda hlorovanja DHHB, BP3 i BP4 UV filtera vršena je pomoću tačne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (LC-MS). Maseni spektri snimljeni su na Agilent 6224 Accurate-Mass TOF masenom spektrometru sa dvostrukom elektrosprej jonizacijom (ESI, *eng. Electrospray Ionization*) sa radom u pozitivnom modu.

Za rasvetljavanje kompletnog mehanizma reakcije DHHB UV filtra sa dezinfekcionim sredstvom korišćena je tačnomaseno-masena spektrometrija. Waters-Micromass LC-QTOF tandem maseni spektrometar (Micromass, Manchester, UK) sa ortogonalnim Z-sprejem kao jonskim izvorom, korišćen je za LC-ESI-MS i LC-ESI-MS-MS eksperimente. Tačnehromatografsko razdvajanje je postignuto korišćenjem gradijentnog programa (*Tabela 3*).

Eluat je izložen elektrosprej jonizaciji (ESI) u pozitivnom modu i kao proizvodi su nastali protonovani molekuli komponenata uzorka $[M+H]^+$. Snimanje je izvođeno za m/z vrednosti u opsegu od 60 do 600. Elementarni sastav snimljenih jona dalje je određivan pomoću MassLynx Elemental Composition softvera V4.1 (Micromass). Maksimalna devijacija postavljena je na 5 ppm i kao moguće prisutni elementi odabrani su C, H, N, O, S, Cl. Pet snimanja je kombinovano pre integracije pojedinačnih pikova.

Tabela 3. Program gradijentnog razdvajanja tečnom hromatografijom

Vreme (min)	H ₂ O + mravlja kis. 0,1%	CH ₃ CN (%)	Protok	Kriva
0,00	40	60	0,2	1
6,00	10	90	0,2	6
15,00	10	90	0,2	6
20,00	40	60	0,2	6
25,00	40	60	0,2	6

Temperatura rastvaranja je podešena na 250 °C a temperatura jonskog izvora na 100 °C. Azot je korišćen kao raspršivač ili nebulajzer (35 l/h) i kao gas za rastvaranje (350 l/h). Kako bi proizveo maksimalan intenzitet, optimalan napon za probe i komponente jonskog izvora podešen je na 3 kV za kapilarnu kolonu od nerđajućeg čelika, 35 V napon na konusu (*sample cone*) i 1V ekstrakcioni napon na konusu (*extractor cone*).

Tandemska masena spektrometrija (MS-MS) izvođena je u modu koliziono indukovane disocijacije (CID, *eng. Collisionally Induced Dissociation*) koristeći argon u kolizionoj ćeliji na pritisku od $4,0 \times 10^{-3}$ milibara. Za preliminarni "otisak prsta" korišćen je gradijent kolizione energije (15-35 V), a potom su korišćene specifične energije kako bi se nedvosmisleno izolovali joni proizvoda. Jon prekursor, odnosno protonovani molekulski jon, $[M+H]^+$ je korišćen kao monitoring jon (ili *lock mass*) u MS-MS ekperimentima, što je omogućilo precizna merenja masa. Jonska formula određena je razgraničavanjem mogućih elemenata koji su prisutni i u formuli jona prekursora, kao i podešavanjem maksimalnog odstupanja od 20 ppm u merenju mase.

4.7. Ispitivanje toksičnosti upotrebom test organizama

Potencijalni toksični efekat UV filtra DHHB i njegovih hlorovanih proizvoda ispitan je primenom tri standardna testa ekotoksičnosti na test organizmima: *Vibrio*

fischeri, *Pseudokirchneriella subcapitata* i *Daphnia magna*, a UV filtera BP3 i BP4 standardnim testom na test organizmu *Vibrio fischeri*.

4.7.1. Toksikološki test na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri*

Toksikološki test na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri* zasniva se na merenju 30 min EC₅₀ vrednosti za rastvore DHHB, 3-hloro- i 5-hloro DHHB, BP3, 3,5-diCl-BP3 i BP4.

Osnovni rastvori DHHB-analitičkog standarda i oba sintetisana hlorovana proizvoda, 3-hloro i 5-hloro DHHB, pravljani su u 1%-tnom rastvoru dimetil sulfoksida (DMSO), početne koncentracije 2 mg/l. Osnovni rastvor BP4 pripremljen je u vodi, koncentracije 1 g/l. Rastvor BP3 pripremljen je u acetonu (100 g/l) a 3,5-diCl-BP3 u dimetil sulfoksidu (75 g/l). Konačna testirana koncentracija pripremljena je prema ISO standardu (ISO 14442, 2006) poštujući maksimalnu dozvoljenu koncentraciju rastvarača (0,1 ml/l).

Toksičnost DHHB, BP3 i BP4 UV filtra i njihovih hlorovanih proizvoda testirana je standardnom ISO metodom (ISO 11348-2, 2007) na tečno-sušenoj¹⁰ luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri* (LUMISTox, Dr. LANGE). Završna tačka toksičnosti određuje se tako što se meri smanjenje luminescentne emisije bakterija nakon inkubacije sa jedinjenjem čija se toksičnost meri. Pre analiziranja uzoraka, podešava se pH vrednost na $7 \pm 0,2$ sa hlorovodoničnom kiselinom ili natrijum hidroksidom, i dodaje se odgovarajuća količina natrijum hlorida tako da zapreminski udeo bude 2%, a sve u cilju sprečavanja mogućih neželjenih efekata koje mogu uzrokovati neogovarajući pH i koncentracije soli. Uzorak sa bakterijom *Vibrio fischeri* stavljen je u dve vijale uporedo i odmah je izmerena luminescencija sa fotomultiplikatorom LUMISTox300 luminometer (kontrolni uzorak). Nakon toga ispitivano jedinjenje dodato je u vijalu koja sadrži bakterije i održavana je temperatura

¹⁰ Tečno-sušenje (liquid-drying) je alternativni proces procesu sušenja pomoću vakuuma i koristi se za konzerviranje bakterija koje su posebno osetljive na početnu fazu zamrzavanja kod normalnog procesa liofilizacije. Prednost ovog procesa je u tome što se sprečava zamrzavanje kultura tako što se sušenje vrši direktno iz tečne faze.

od 15 ± 1 °C u toku 30 minuta. Zatim su od toga pravljena geometrijska razblaženja (2, 4, 8, 16, 64 i 128 puta) prema ISO standardu (ISO 11348-2, 2007). Slepa proba je napravljena sa 2%-tnim rastvorom natrijum hlorida, a negativna kontrola sa 1%-tnim rastvorom dimetilsulfoksida (DMSO) koji je korišćen kao rastvarač. Merene su emisije luminescencije za svaku probu nakon 30 minuta i 30 min EC_{50} vrednost je računata sa 95% pouzdanosti prema ISO standardu 11348-2, pomoću programa podržanog kompjuterskim softverom. 30 min EC_{50} vrednosti računata su korišćenjem logaritamske linearne regresije i predstavlja koncentraciju testiranog jedinjenja koja odgovara inhibiciji 50% luminescencije (u odnosu na kontrolnu probu) nakon 30 minuta izloženosti.

4.7.2. Toksikološki test na algama

Toksikološki test na alge izvođen je korišćenjem Algaltokit FTM (1996) sa zelenom algom *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum* ili *Raphidocelis subcapitata*) prema ISO standardu ISO 8692, 2012. Testirana je toksičnost tri odabrana jedinjenja: DHHB (analitički standard) i sintetisani 3-hloro DHHB i 5-hloro DHHB u koncentracionom opsegu 0,01-1 mg/l. Testovi su izvođeni u erlenmajeru od 250 ml u medijumu pripremljenom prema ISO 8692 standardu. Odgovarajuće zapremine rastvora ispitivanih supstanci dodate se u hranljivi rastvor kako bi se dobile zadate koncentracije. U jednom sudu nalazi se rastvor bez ispitivane supstance i služi kao kontrolni uzorak. Dodatno se još, radi unutrašnje kontrole kvaliteta, izvodi bioesej i na referentnu hemikaliju kalijum dihidromat ($K_2Cr_2O_7$). Svi uzorci sa ispitivanim supstancama, kao i kontrolni, inkubiraju se tri dana (72 h) na temperaturi 23 ± 2 °C uz mešanje po proceduri 110 min (Innova 4340, New Brunswick Scientific, Nju Džersi, SAD) i kontinuirano izlaganje svetlosti od 10000 luksa kako bi se obezbedio eksponencijalni rast algi. Inhibicija rasta algi u odnosu na kontrolnu probu određena je dnevnim merenjem optičke gustine (OG) na 670 nm na Lambda 14P spektrofotometru (Perkin Elmer, Norwalk, Konektikat, SAD). Šest ponavljanja merenja vršeno je za kontrolnu probu i po tri merenja za svaku ispitivanu koncentraciju. Po tri merenja vršena su za svaki uzorak. Na početku i na kraju eksperimenta u svim uzorcima merena je pH vrednost uz pomoć staklene elektrode (pH 526 WTW, Vajlhajm, Nemačka). Određivana je koncentracija koja inhibira 50% rasta algi i označena je kao završna tačka

toksičnosti, a izražava se kao EC₅₀ analizom nelinearne regresije. 72 h EC₅₀ vrednosti računane su ISO metodom „površina ispod krive“.

4.7.3. Toksikološki test na *Daphnia magna*

Toksikološki test na *Daphnia magna* Straus izvođen je korišćenjem *Daphtoxkit FTM magna* prema ISO protokolu (ISO 6341, 2012). Mala jajašca *D. magna* su aktivirana pranjem sa česmenskom vodom i onda se legu 72 h pre testiranja na 20 ± 1 °C uz kontinuirano osvetljivanje na 6000 luksa. Pripremljeni su rastvori DHHB analitičkog standarda i sintetisanih 3-hloro i 5-hloro DHHB u opsegu koncentracije od 0,01-2 mg/l. Pet organizama (tek izlegle novorođenčadi) izloženo je svakom stepenu razblaženja u 4 ponavljanja. Rastvori bez testiranih supstanci korišćeni su kao kontrolni. Nakon 24 h i 48 h inkubacije na 20 ± 1 °C zabeležen je broj nepokretnih (imobilizovanih) dafnija. Procenat nepokretnih dafnija analiziran je probit¹¹ analizom kako bi se odredila efektivna EC₅₀ koncentracija koja uzrokuje 50 % nepokretnih dafnija.

Da bi se obezbedili pouzdani toksikološki podaci, stabilnost DHHB UV filtra i hlorovanih derivata proveravana je ispitivanjem njihove stabilnosti i fotostabilnosti tokom vremena. Utvrđeno je da su koncentracije ovih jedinjenja bile stabilne u svim testovima (3,8 ± 0,6% od početne koncentracije) i svim ispitivanim rastvorima u toku 24, 48 i 72 sata trajanja eksperimenata. Koncentracije rastvora praćene su sa prethodno opisanom HPLC metodom. Takođe, pH vrednosti su se kretale od 6,86 do 6,98, što znači da su bile u preporučenom opsegu (6-9), i nisu se menjale značajno tokom vremena.

4.7.4. Uporedni podaci o toksičnosti na dafnije, mikroalge i fotobakterije

Radi poređenja dobijenih rezultata sa ostalim literaturnim podacima, razmatrane su odabrane ekotoksikološke studije na benzofenonu i benzofenonskim UV filtrima. Poređeni su podaci toksičnosti UV filtera rađeni na dafnijama, mikroalgama i fotobakterijama u istraživanjima u kojima su imali slične eksperimentalne uslove. U

¹¹ Step en verovatnoće na osnovu odstupanja od srednje vrednosti normalne raspodele.

ovim istraživanjima, organizmi su bili izloženi dejstvu nekoliko organskih UV filtera u različitim koncentracionim opsezima od 0,005 do 70 mg/l u toku 24, 48 i 72 sata. U okviru ovog rada testirani su rastvori koncentracija od 0,01 do 2 mg/l. Da bi odredili i svrstali DHHB i njegove hlorovane proizvode prema njihovom toksičnom potencijalu, poređene su EC_{50} (IC_{50}) vrednosti organizama nakon izlaganja srodnim benzofenonskim UV filtrima. Vrednost EC_{50} – polovina maksimalne efektivne koncentracije, predstavlja efektivnu koncentraciju test supstance (*eng. effective concentration*) koja izaziva 50% efekta na posmatrano svojstvo test organizma, odnosno koncentracija jedinjenja pri kojoj se ispoljava 50% njegovog maksimalnog efekta. Vrednost IC_{50} predstavlja polovinu koncentracije maksimalnog inhibitoriskog dejstva.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

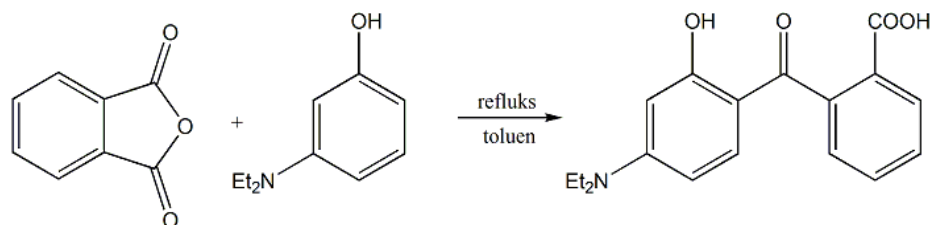
5.1. Sinteze

5.1.1. Sinteza heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB)

Prvi korak u sintezi heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata je sinteza 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline.

5.1.1.1. Sinteza 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline

2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeva kiselina je keto-kiselina čija sinteza postoji u literaturi (Patel *et al.*, 2005). U procesu sinteze, kao polazni reagensi korišćeni su anhidrid ftalne kiseline i *N,N*-dietil-*m*-aminofenol (DEAP). Direktnim topljenjem anhidrida ftalne kiseline na temperaturi od 130 °C dolazi do reakcije elektrofilne aromatične supstitucije, pri čemu se anhidrid ftalne kiseline vezuje u *orto*-položaj na prstenu dietilaminofenola. Ova supstitucija povlači otvaranje petočlanog prstena u molekulu anhidrida ftalne kiseline i formiranje 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline (Šema 2). Ova reakcija predstavlja Fridel-Kraftsovu reakciju acilovanja aromatičnog prstena dietilaminofenola sa anhidridom ftalne kiseline. U reakcijama Fridel-Kraftsove acilacije obično se koriste Luisove kiseline kao katalizatori. Međutim, u ovom slučaju katalizator nije bio potreban jer je DEAP dovoljno aktivan za acilovanje sa anhidridom kiseline. Dobijena reakciona smeša bila je intenzivno obojena crveno-ljubičasto, jer su nečistoće bile prisutne u samom aminofenolu. Prekristalizacijom dobijenog proizvoda iz smeše etanola i etilacetata dobijeno je 16,65 g (72%) 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline; tačka topljenja 213-215 °C (207-208 °C prema Patel *et al.*, 2005).



Šema 2. Sinteza 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeve kiseline.

Podaci na osnovu kojih je okarakterisana struktura 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeeve kiseline:

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3447, 2974, 2669, 2539, 1850, 1765, 1692, 1632, 1588, 1523, 1420, 1343, 1283, 1242, 1196, 1128, 1081, 1015, 928, 846, 804.

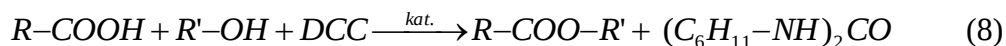
^1H NMR (DMSO- d_6) δ/ppm : 1,10 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H); 3,39 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H); 6,08 (d, $J = 2,3$ Hz, 1 H); 6,19 (dd, 1H, $J = 2,4$ i 9,2 Hz, ArH); 6,80 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H); 7,38 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H); 7,65 (m, 2H); 7,95 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 12,55 (s, 1H); 13,01 (s, 1H).

MS (ESI $^-$) m/z (%) 312 ($\text{M}-\text{H}^-$, 15), 269 (14), 268 (69), 240 (10), 238 (18), 225 (17), 224 (100), 120 (5).

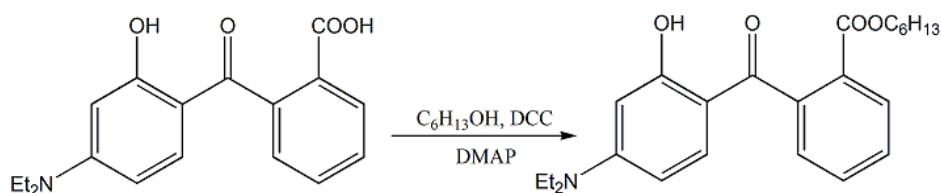
HRMS (ESI $^-$) za $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_4$ ($\text{M}-\text{H}^-$): izračunato 312,1236; izmereno 312,1235.

5.1.1.2. Sinteza heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB)

Nakon što je dobijena 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoeva kiselina, bilo je potrebno da se izvede reakcija esterifikacije kako bi se kao proizvod dobio heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoat (DHHB). Prisustvo jednog ekvivalenta N,N' -dicikloheksilkarbodiimida (ili cikloheksamin, DCC) u reakcionoj smeši, omogućilo je da se jedan ekvivalent karboksilne kiseline potpuno konvertuje u estar (8).



Hassner i Alexanian (1978) dokazali su da se reakcija esterifikacije odigrava zahvaljujući prisustvu dicikloheksil-karbodiimida (DCC) i 4-dimetilaminopiridina (DMAP) kao katalizatora. Prisustvo katalizatora, DMAP, omogućava da prinos estra dostigne 94%, umesto 10% koji se dobije bez katalizatora. Dicikloheksil-karbodiimid omogućava početak reakcije. Karboksilna kiselina se uz pomoć DCC konvertuje u anhidrid, koji sa katalizatorom formira acilpiridinium jon. Zatim dolazi do nukleofilnog napada alkoholnog ostatka (n -heksanola) na karbonilni ugljenik pri čemu nastaje estar, odnosno DHHB (Šema 3).



Šema 3. Sinteza 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB).

Dobijeni sirovi proizvod u postupku sinteze imao je roze-ljubičastu boju i radi prečišćavanja je propušten kroz kratku hromatografsku kolonu silika gela, kao eluent je korišćen etilacetat. Dobijeno je 1,65 g (prinos 28%) heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB) u vidu ulja žute boje.

Podaci na osnovu kojih je okarakterisana struktura heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (**DHHB**):

IR (KBr, cm^{-1}): 3063, 2959, 2932, 2868, 2725, 2360, 1721, 1630, 1596, 1563, 1522, 1343.

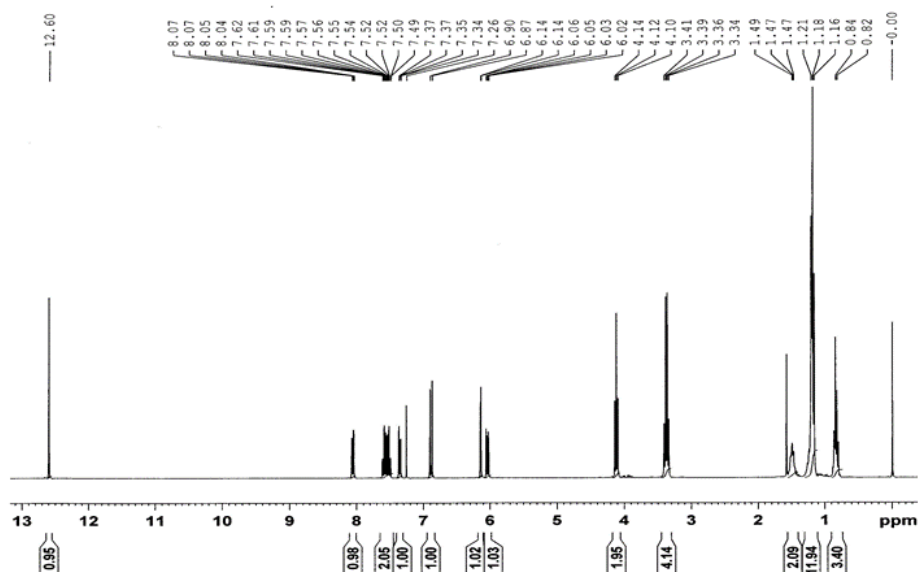
^1H NMR (CDCl_3), δ/ppm : 0,84 (m, 3H); 1,19 (m, 12H); 1,49 (m, 2H); 3,38 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H); 4,12 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H); 6,04 (dd, $J = 3,0$; 9,0 Hz, 1H); 6,15 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H); 6,89 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,36 (m, 1H); 7,54 (m, 2H); 8,06 (m, 1H); 12,61 (s, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ/ppm : 12,7 (CH_3); 14,2 (CH_3); 22,6 (CH_2); 25,8 (CH_2); 28,4 (CH_2); 31,6 (CH_2); 44,8 (CH_2); 65,9 (CH_2); 97,3 (CH); 103,8 (CH); 110,3 (C); 128,0 (CH); 129,3 (CH); 130,5 (CH); 132,1 (CH); 134,7 (CH); 140,6 (C); 154,1 (C); 165,6 (C); 166,4 (C); 198,7 (C) (Slika 32).

MS (ESI+) m/z (%): 398 (MH^+ , 96), 384 (28), 382 (14), 297 (7), 296 (33), 150 (10), 149 (100), 77 (6).

HRMS (ESI+) za $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{NO}_4$ (MH^+): izračunato 398,2331; izmereno 398,2315.

Elementarna analiza: Izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_4$: C = 72,61%, H = 7,86%, N = 3,52%; izmereno: C = 72,59%, H = 8,06%, N = 3,54%.

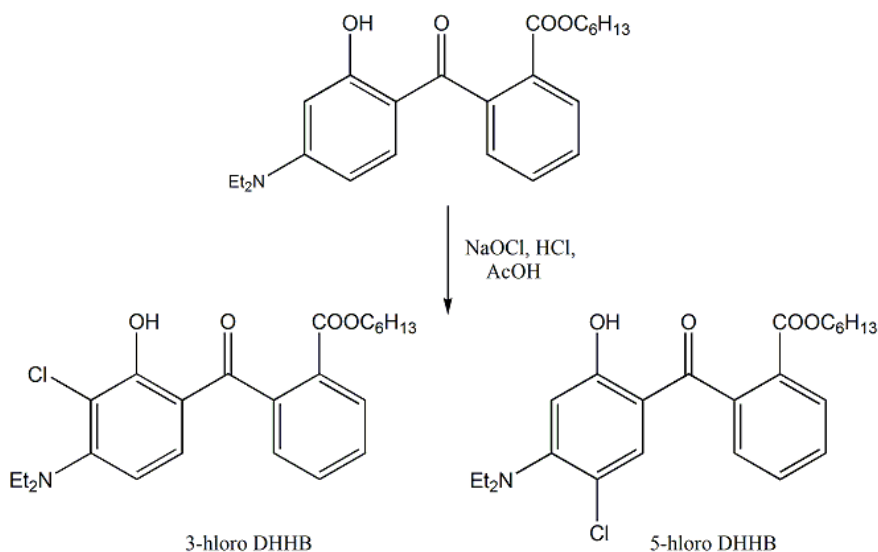


Slika 32. ^1H NMR spektar heksil 2-(4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (DHHB).

5.1.2. Sinteza hlorovanih proizvoda: heksil 2-(3-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata i heksil 2-(5-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata

U reakciji DHHB UV filtra sa natrijum hipohloritom, veoma brzo dolazi do stvaranja hlorovanih proizvoda. Fenolni prsten DHHB UV filtra je veoma reaktivan i veoma lako podleže elektrofilnoj aromatičnoj supstituciji. Hlor iz NaOCl se obično supstituiše na položajima 3 ili 5 (*Šema 4*). Ovo se objašnjava činjenicom da su te pozicije u *orto*- i *para*-položaju u odnosu na supstituenate prvog reda, hidroksilnu i amino grupu. Prisustvo elektron donorskih supstituenata ($-\text{OH}$ i $-\text{NH}_2$) u jezgri aromatičnih kiselina utiče na aktiviranje prstena pri elektrofilnim supstitucijama, a poznato je i da su ove dve grupe najjače *orto*- i *para*-dirigujuće grupe.

Kao proizvod u reakciji hlorovanja nastaje smeša hloro derivata DHHB UV filtra. Razdvajanje komponenata dobijenog proizvoda vršeno je hromatografijom na koloni i u malim epruветama skupljane su frakcije, kao što je prikazano na *slici 28*.



Šema 4. Reakcija DHHB UV filtra sa NaOCl.

Na osnovu TLC hromatograma, spajane su frakcije za koje se moglo pretpostaviti da sadrže iste, čiste komponente, a potom je rastvarač uparen na rotacionom vakuum uparivaču. Na taj način su dobijena dva proizvoda, jedinjenje **A** sa prinosom od 64 mg (15%) i jedinjenje **B** sa prinosom od 43 mg (10%). Oba proizvoda bila su u vidu ulja svetlo žućkaste boje, i na osnovu spektroskopskih i spektrometrijskih podataka okarakterisana su kao:

Jedinjenje **A**, heksil 2-(3-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoat
(**3Cl-DHHB**):

¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 0,84 (m, 3H); 1,19 (m, 12H); 1,49 (m, 2H); 3,38 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H); 4,12 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H); 6,39 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 6,89 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 7,36 (m, 1H); 7,54 (m, 2H); 8,06 (m, 1H); 12,61 (s, 1H) (Slika 33).

¹³C NMR (CDCl₃) δ /ppm: 13,0 (CH₃); 14,1 (CH₃); 22,5 (CH₂); 25,7 (CH₂); 28,3 (CH₂); 31,5 (CH₂); 45,7 (CH₂); 66,0 (CH₂); 111,1 (CH); 113,0 (C); 114,4 (C); 127,7 (CH); 129,1 (C); 129,8 (CH); 130,6 (CH); 130,9 (CH); 132,3 (CH); 139,9 (C); 155,2 (C); 160,8 (C); 165,9 (C); 200,5 (C).

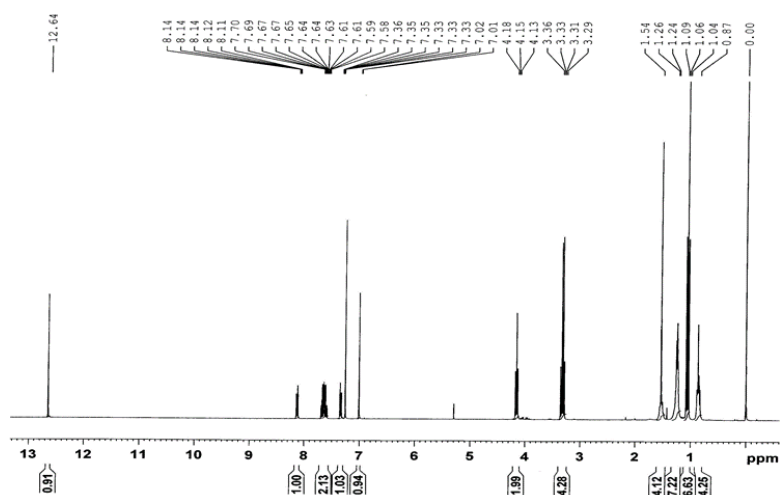
HRMS (ESI⁺) m/z : izračunato za C₂₄H₃₁ClNO₄ (M+H⁺) 432,1936, izmereno 432,1946.

Jedinjenje **B**, heksil 2-(5-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoat

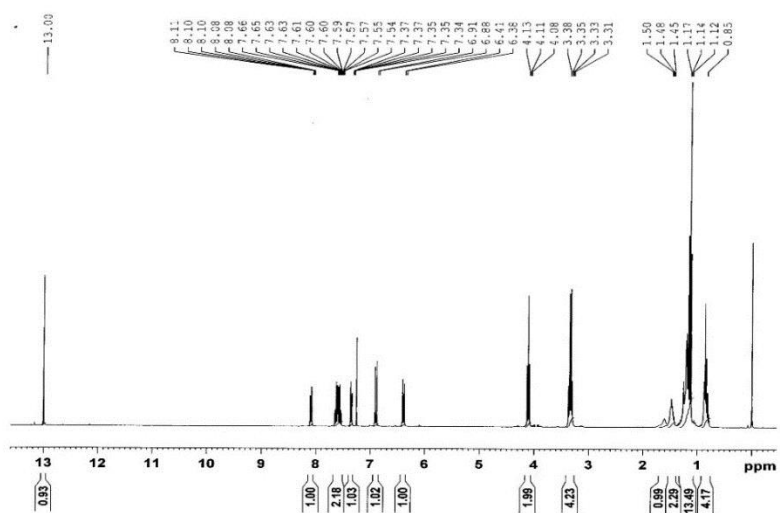
(5Cl-DHHB):

^1H NMR (CDCl_3) δ/ppm : 0,84 (m, 3H); 1,19 (m, 12H); 1,49 (m, 2H); 3,38 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H); 4,12 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H); 6,54 (s, 1H); 7,01 (s, 1H); 7,36 (m, 1H); 7,54 (m, 2H); 8,06 (m, 1H); 12,61 (s, 1H) (Slika 34).

HRMS (ESI $^+$) m/z : izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{ClNO}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 432,1936, izmereno 432,1928.



Slika 33. ^1H NMR spektar heksil 2-(3-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (3Cl-DHHB).

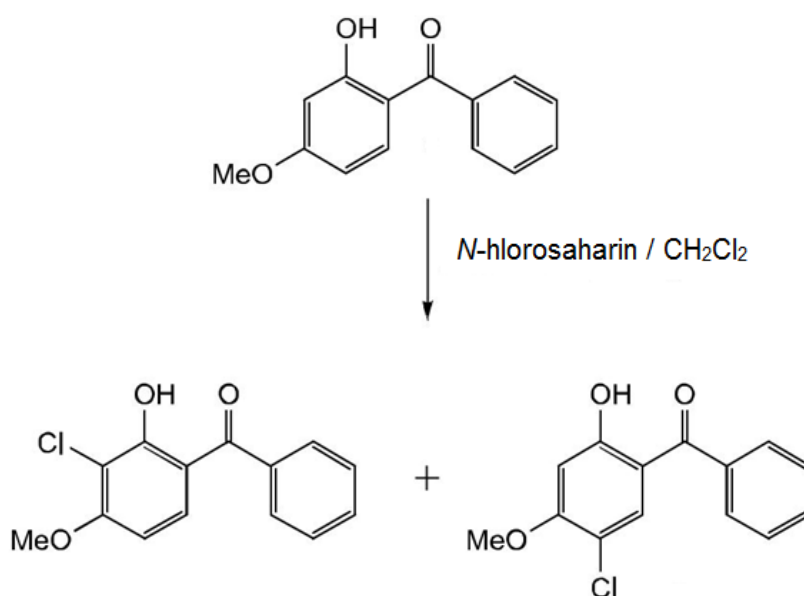


Slika 34. ^1H NMR spektar heksil 2-(5-hloro-4-dietilamino-2-hidroksibenzoil)benzoata (5Cl-DHHB).

5.1.3. Sinteza hloro derivata BP3

Zbog slabe rastvorljivosti BP3 UV filtra u vodi, preparativno hlorovanje vršeno je, kao i u slučaju DHHB UV filtra, u organskom rastvaraču, tačnije u dihlormetanu. U organskom medijumu sa *N*-hlorosaharinom kao hlorirajućim sredstvom, osim glavnog proizvoda, 5Cl-BP3, nastaje i dovoljna količina 3Cl-BP3 što je omogućilo izolovanje i karakterizaciju ovih jedinjenja (Šema 5). Sa viškom dezinfekcionog sredstva, nastaje takođe i 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (3,5-diCl-BP3). Sinteza 3,5-diCl-BP3 biće predstavljena u poglavlju 5.1.3.1.

Nakon uparavanja rastvarača na sniženom pritisku, iz reakcione smeše zaostalo je 2,54 g žute kristalne supstance koja se sastojala iz 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (naziv po IUPAC nomenklaturi (5-hloro-2-hidroksi-4-metoksifenil)(fenil)metanon) kao glavnog proizvoda, i oko 15% 3-hloro-izomera. Rekristalizacijom sirovog proizvoda iz smeše dihlormetana i petrol etra dobijen je prinos od 1,20 g (46%) čistog 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona, tačke topljenja 113-116 °C. Tečnost nakon kristalizacije 5-hloro izomera uparena je i proizvod prečišćen na hromatografskoj koloni. Izolovano je 232 mg (9%) čistog 3-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona, tačke topljenja 135-137 °C.



Šema 5. Reakcija BP3 UV filtra sa *N*-hlorosaharinom.

Podaci na osnovu kojih je okarakterisana struktura (3-hloro-2-hidroksi-4-metoksifenil)(fenil)metanona (**3Cl-BP3**):

IR (KBr, cm^{-1}): 3439, 3055, 2959, 2852, 2689, 1621, 1579, 1504, 1443, 1416, 1347, 1292, 1177, 1145, 1079, 988, 925, 792.

^1H NMR (acetone d_6) δ/ppm : 4,02 (s, 3H, OCH_3), 6,80 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,55 (m, 6H, ArH), 13,0 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ/ppm : 56,5 (CH_3), 102,4 (CH), 109,4 (C), 114,1 (C), 128,4 (CH), 128,9 (CH), 131,9 (CH), 133,3 (CH), 137,7 (C), 160,7 (C), 161,1 (C), 200,1 (C).

MS (ESI+) m/z : 265 ($\text{MH}^+ + 2$, 27), 263 (MH^+ , 74), 187 (33), 185 (100), 105 (18), 77(8).

HRMS, (ESI+) za $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{Cl}$ (MH^+): izračunata 263,0476; izmerena 263,0475.

Elementarna analiza: Izračunato za $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$: C = 64,01%, H = 4,23%, izmereno: C = 64,06%, H = 4,22%.

Podaci na osnovu kojih je okarakterisana struktura (5-hloro-2-hidroksi-4-metoksifenil)(fenil)metanon (**5Cl-BP3**):

IR (KBr, cm^{-1}): 3447, 2978, 2944, 2637, 1626, 1603, 1572, 1488, 1440, 1371, 1346, 1266, 1208, 1149, 1055, 995, 915, 829, 789.

^1H NMR (acetone d_6) δ/ppm : 4,03 (s, 3H, OCH_3), 6,74 (s, 1H, ArH), 7,50 (m, 3H, ArH), 7,60 (m, 3H, ArH), 12,57 (s, 1H, OH).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ/ppm : 56,7 (OCH_3), 101,2 (CH), 113,16 (C), 113,18 (C), 128,7 (CH), 129,0 (CH), 132,0 (CH), 134,2 (CH), 137,8 (C), 161,4 (C), 165,1 (C), 199,5 (C).

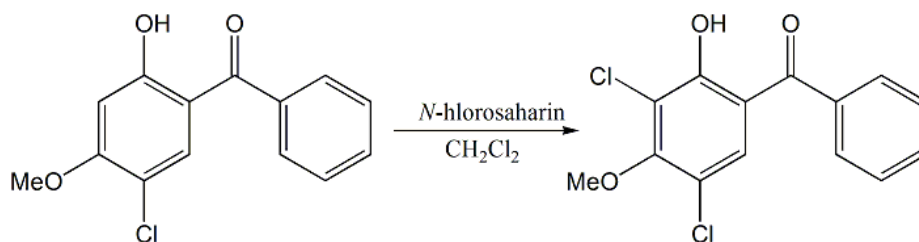
MS (ESI+) m/z : 265 ($\text{MH}^+ + 2$, 12), 263 (MH^+ , 35), 187 (40), 185 (100), 149 (13), 105 (28), 97 (15), 77 (16).

HRMS, ESI (+) za $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{Cl}$ (MH^+): izračunana 263,0474; izmerena 263,047.

Elementarna analiza: Izračunato za $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$: C = 64,01%, H 4,23%, izmereno: C 64,01%, H 4,18%.

5.1.3.1. Sinteza 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (3,5-diCl-BP3)

U reakciji 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (5Cl-BP3) sa *N*-hlorosaharinom dobijena je čvrsta supstanca žute boje (Šema 6), koja je potom rekristalisana iz smeše dihlormetana i heksana i izolovano je 0,965 g (65%) svetlo žutih kristala 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (tačka topljenja 98-101 °C).



Šema 6. Reakcija hlorovanja 5-hloro-2-metoksibenzofenona.

Podaci na osnovu kojih je okarakterisana struktura (3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksifenil)(fenil)metanon (**3,5-diCl-BP3**):

IR (KBr, cm⁻¹): 3442, 2870, 1620, 1595, 1475, 1422, 1328, 1247, 1165, 1078, 989.

¹H NMR (CDCl₃) δ/ppm: 4,01 (s, 3H, OCH₃), 7,56 (m, 3H), 7,65 (m, 3H, ArH), 12,74 (s, 1H, OH).

¹³C NMR (CDCl₃) δ/ppm: 61,5 (OCH₃), 118,0 (C), 118,6 (C), 119,2 (C), 129,6 (CH), 130,1 (CH), 133,1 (CH), 133,6 (CH), 138,0 (C), 159,1 (C), 200,6 (C), 206,2 (C).

MS (ESI⁺), m/z (%): 301 (MH⁺+4, 14), 299 (MH⁺+2, 36), 297 (MH⁺, 56), 263 (20), 223 (12), 221 (71), 219 (100), 185 (32), 105 (42).

HRMS, ESI (+) za C₁₄H₁₁O₃Cl₂ (MH⁺): izračunata 297,0085; izmerena 297,0093.

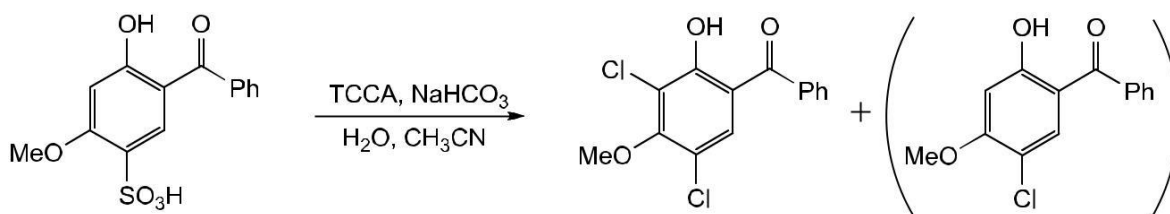
Elementarna analiza: izračunato za C₁₄H₁₀Cl₂O₃: C = 56,59%, H = 3,39%, izmereno: C = 56,75%, H = 3,35%.

5.1.4. Hlorovanje BP4 UV filtra u baznoj sredini

BP4 UV filter, ili 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina, u svojoj strukturi sadrži sulfonsku grupu (-SO₃H) koja je elektron-privlačna i deaktivira aromatični prsten za elektrofilnu supstituciju. S druge strane, jonizovana sulfonatna

grupa je elektron-donorska i olakšava supstituciju. U baznoj sredini, u prisustvu NaHCO_3 , sulfonska grupa BP4 je u deprotonovanom obliku i tako je benzofenonski prsten dostupniji za elektrofilno hlorovanje (Šema 7). Nakon filtriranja reakcione smeše koja je sadržala BP4, TCCA i NaHCO_3 , tankoslojnom hromatografijom je utvrđeno da se proizvod nalazi u talogu. To implicira da je proizvod nepolarne prirode i da ne sadrži kiselu funkcionalnu grupu ($-\text{SO}_3\text{H}$), u suprotnom bi bio u vodenoj fazi zbog dodatog bikarbonata. Čvrst proizvod je rastvoren u dietil etru i ispiran sa rastvorom NaHCO_3 i vodom kako bi se odstranila moguće preostala izocijanurna kiselina. Zatim je uparen rastvarač i sirov proizvod prečišćen na hromatografskoj koloni i izolovano je 0,295 g (33%) proizvoda koji je prema tački topljenja ($135\text{--}137^\circ\text{C}$) i protonskom NMR spektru identifikovan kao 3,5-dihloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (3,5-diCl-BP3). Drugog proizvoda je bilo premalo da bi se uradila potpuna karakterizacija, ali se na osnovu R_f vrednosti na TLC pločicama moglo pretpostaviti da se radi o 5-hloro-2-hidroksi-4-metoksibenzofenonu (5Cl-BP3). Nastali proizvodi isti su kao i u reakciji hlorovanja BP3 UV filtra, s tim što je glavni proizvod isti kao u reakciji u poglavlju 5.1.3.1. gde u reakciji 5Cl-BP3 sa *N*-hlorosaharinom nastaje 3,5-diCl-BP3.

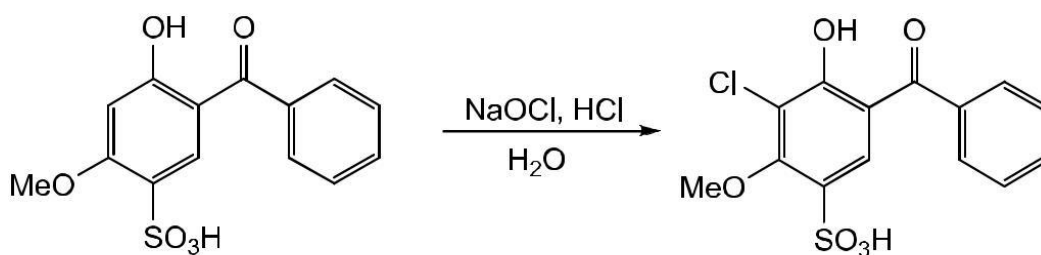
Dakle, u reakciji BP4 UV filtra sa trihloroizocijanurnom kiselinom u baznoj sredini, dolazi do reakcije elektrofilne supstitucije pri čemu se sulfonska grupa zamenjuje atomom hlora. U organskoj hemiji, sulfonska grupa je već poznata kao dobra odlazeća grupa u reakcijama elektrofilne aromatične supstitucije.



Šema 7. Reakcija BP4 UV filtra sa *N*-saharinom u baznoj sredini.

5.1.5. Hlorovanje BP4 UV filtra u kiseljoj sredini

U organskoj hemiji, sulfonska grupa se koristi kao zaštitna grupa za dobijanje monosupstituisanih fenola. U kiseljoj sredini, u prisustvu hlorovodonične kiseline, sulfonska grupa je *m*-dirigujuća i dolazi do supstitucije hlora iz NaOCl na aromatični prsten 2-hidroksi-4-metoksibenzofenonsulfonske kiseline (Šema 8). Dobijeni proizvod je filtriran i prečišćen na hromatografskoj koloni, i izolovano je 39 mg (18%) 5-benzoil-3-kloro-4-hidroksi-2-metoksibenzensulfonske kiseline (3Cl-BP4), tačke topljenja 160 °.



Šema 8. Reakcija BP4 UV filtra sa NaOCl u kiseljoj sredini.

Podaci na osnovu kojih je okarakterisana struktura 5-benzoil-3-kloro-4-hidroksi-2-metoksibenzensulfonska kiselina (**3Cl-BP4**):

IR (KBr, cm^{-1}): 3472, 2425, 1624, 1420, 1330, 1261, 1094, 1035, 936, 816, 771, 740, 702, 638, 614.

^1H NMR (acetone d_6) δ /ppm: 4,08 (s, 3H, OCH_3), 5,62 (s, 1H, OH), 7,67 (m, 5H, ArH), 8,21 (s, 1H, ArH), 12,92 (s, 1H, SO_3H).

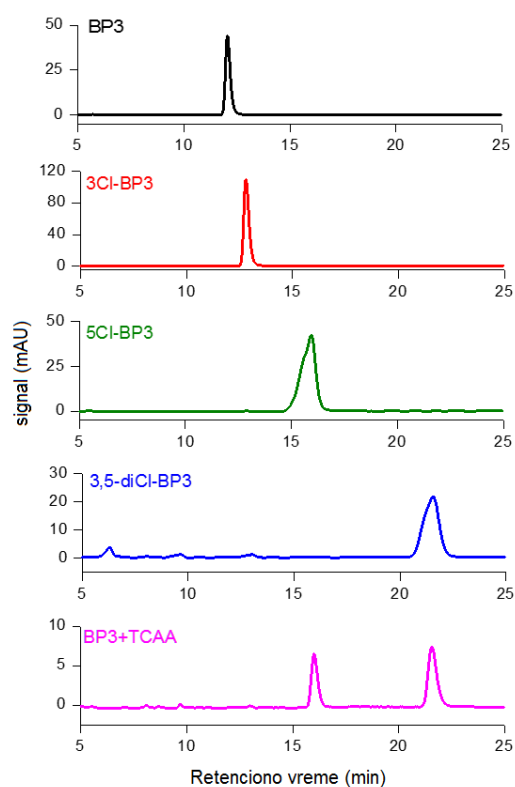
MS (ESI $^-$), m/z (%): 343 ($\text{M}-\text{H}^-+2$, 42), 241 ($\text{M}-\text{H}^-$ 100), 212 (65), 165 (38), 144 (42), 141 (94), 135 (82), 114 (57), 103 (65), 89 (64), 73 (48).

HRMS izračunato za $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClO}_6\text{S}$ 340,9887, nađeno 340,9890.

5.2. Dezinfekcioni eksperimenti

5.2.1. Hlorovanje BP3 i BP4 UV filtra

Za potrebe ovog eksperimenta svi hlorovani proizvodi BP3 i BP4 UV filtra su sintetisani i kompletno okarakterisani pomoću nekoliko instrumentalnih tehnika (NMR, IR, MS). To je bilo neophodno usled nedostatka komercijalnih proizvoda ovih jedinjenja na tržištu. U dezinfekcionim eksperimentima ova jedinjenja su korišćena kao HPLC standardi te je tako na osnovu njihovih retencionih vremena u HPLC hromatogramima izvedena identifikacija dobijenih proizvoda.



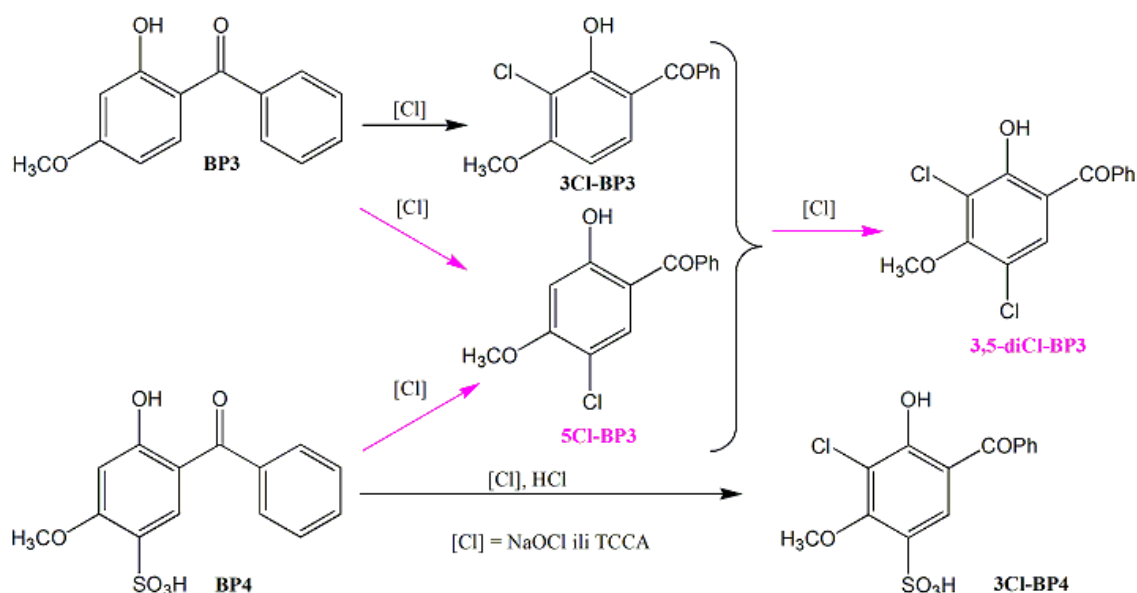
Slika 35. HPLC hromatogrami BP3, tri moguća proizvoda hlorovanja, i reakcione smeše BP3 sa TCCA.

Razblaženi vodeni rastvori BP3 i BP4 tretirani su sa NaOCl ili TCCA na sobnoj temperaturi, i nakon određenog vremena reakcija je zaustavljena dodatkom Na_2SO_3 . Zabeležena je veoma brza reakcija oba jedinjenja u kontaktu sa dezinfekcionim

reagensima. Polazna supstanca je u oba slučaja potpuno izreagovala za manje od 15 minuta i gotovo da nema razlike u sastavu reakcione smeše nakon 15 minuta, jedan sat ili 24 sata nakon postavljanja reakcije. U eksperimentima u kojima su simulirani dezinfekcioni uslovi vodene sredine, sa dodatkom NaOCl, formirani su isti proizvodi.

Nakon reakcije sa dezinfekcionim sredstvima BP3 i BP4 UV filtera, na HPLC-DAD hromatogramima se pojavljuju dodatni pikovi koji mogu da odgovaraju novonastalim hlorovanim proizvodima. Poređenje hromatograma BP3, sintetisanih hlorovanih proizvoda i reakcione smeše BP3 i TCCA prikazano je na *Slici 35*. Može se zaključiti da hlorovanje BP3 UV filtra sa TCCA vodi nastanku 5-hloro i 3,5-dihloro derivata. BP3 UV filter nije identifikovan 24 sata od početka reakcije, što dokazuje da je sav BP3 izreagovao.

Hlorovanje BP4 UV filtra u neutralnoj vodenoj sredini takođe vodi formiranju 5Cl-BP3 i 3,5-diCl-BP3 proizvoda. Kao što je očekivano, nije identifikovan 3Cl-BP4, što ukazuje da u neutralnoj vodenoj sredini, gde je sulfonska grupa kompletno jonizovana, verovatnije dolazi do *ipso* supstitucije (zamena sulfonatne grupe hlorom). Jedino se u strogo kiselim uslovima, gde je sulfonska grupa protonovana, 3Cl-BP4 pojavljuje kao proizvod.



Šema 9. Reakcioni put BP3 i BP4 UV filtera u prisustvu dezinfekcionog sredstva (NaOCl ili TCCA.)

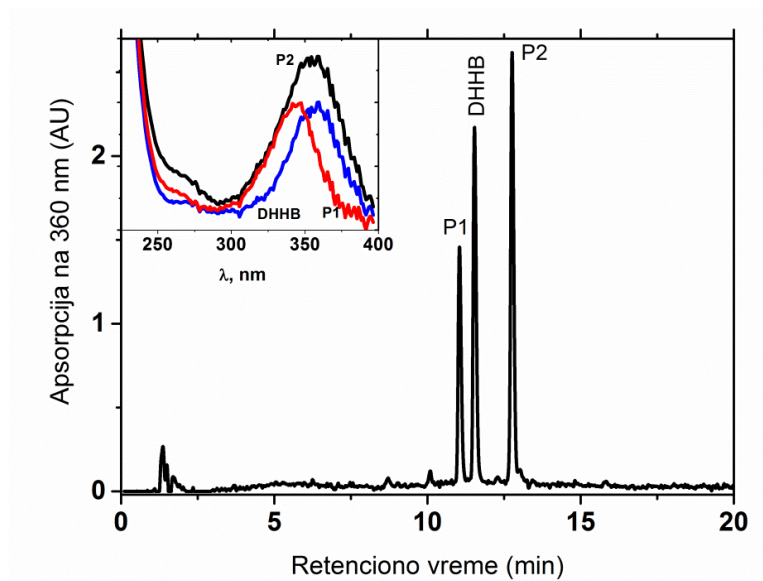
Na osnovu svih dobijenih rezultata zaključujemo da su BP3 i BP4 UV filteri u prisustvu dezinfekcionih sredstava (NaOCl ili TCCA) formirali iste proizvode. Takođe, i u simuliranim uslovima prirodne vode takođe nastaju isti proizvodi. Predloženi reakcioni put ovih UV filtera u dezinfekcionoj sredini prikazan je na *Šemi 9*.

Očekivani dominantni putevi u realnim uzorcima bili bi formiranje 5Cl-BP3 proizvoda u reakciji BP3 i BP4 UV filtra sa hlorom, i dalje hlorovanje 5-hloro proizvoda pri čemu nastaje 3,5-diCl-BP3, pa se očekuje da se ovi derivati mogu naći u životnoj sredini.

5.2.2. Hlorovanje DHHB UV filtra

Uzimajući u obzir činjenicu da je DHHB relativno nov proizvod i da ne postoji mnogo podataka vezanih za ponašanje ovog UV filtra u životnoj sredini, postojao je interes da se ovo jedinjenje detaljno ispita. Za potrebe ovih eksperimenata bilo je potrebno sintetisati i okarakterisati sve hlorovane proizvode

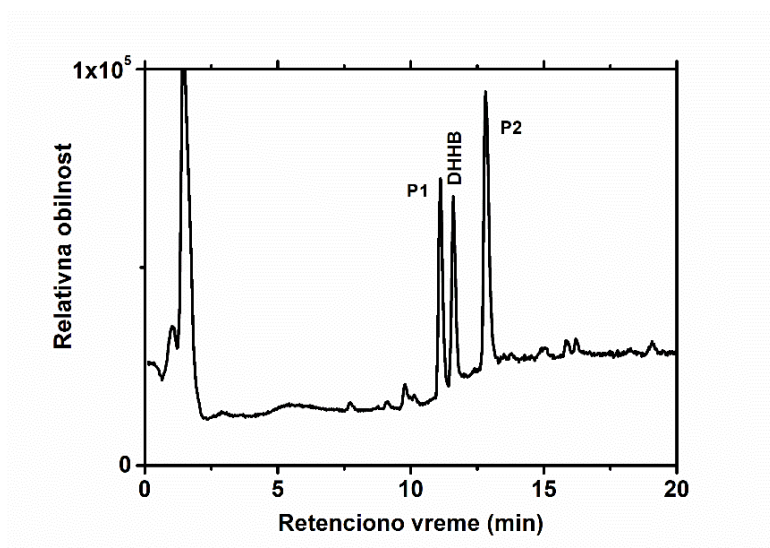
Eksperimenti hlorovanja DHHB UV filtra izvođeni su sa ciljem da se ispituju njegove moguće transformacije nakon što on dospe u vodenu sredinu u kojoj je prisutan hlor, kao što je bazenska voda. Ispitivanje je vršeno sa različitim koncentracijama hipohlorita. Zahvaljujući HPLC-DAD analizi smeše DHHB sa pola ekvivalenta hipohlorita na sobnoj temperaturi primećeno je postepeno smanjenje koncentracije DHHB UV filtra uz formiranje nekoliko proizvoda. Stepenn transformacije, kao i prinosi proizvoda, rastu s povećanjem koncentracije NaOCl u opsegu od 0,5 do 2,5 ekvivalenta. Dva proizvoda **P1** i **P2**, koji nisu primećeni u kontrolnom rastvoru DHHB UV filtra, jasno su uočeni na retencionim vremenima 11,1 i 12,8 minuta, dok je DHHB eluiran na retencionom vremenu 11,6 minuta (*Slika 36*).



Slika 36. HPLC/DAD hromatogram ($\lambda=360$ nm) reakcione smeše
DHHB i NaOCl (2,5 ekv.)

Sva tri jedinjenja pokazuju slične modele UV apsorpcije, naime, širok apsorpcioni maksimum na oko 355 nm i takozvano apsorpciono rame na talasnim dužinama od 250-275 nm (*umetak na slici 36*). Ovo jasno ukazuje na očuvanje hemijske strukture DHHB UV filtra u reakciji.

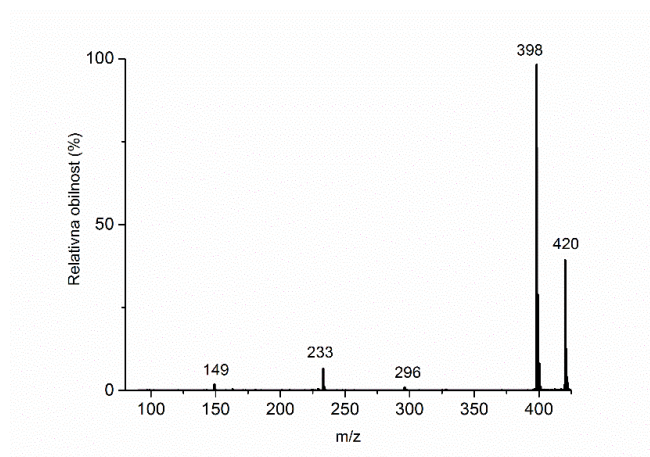
U cilju da se identifikuju nastali proizvodi, korišćene su instrumentalne tehnike HPLC-ESI-MS i HPLC-ESI-MS-MS. Snimanje je izvedeno u jon pozitivnom modu, s obzirom da nije bilo značajnog odgovora u negativnom modu. Merene su tačne mase, dok su molekulske formule i greške merenja dobijene korišćenjem softveru MassLynx V4.1 koji služi za određivanje elementarnog sastava. U analizama tandemске masene spektrometrije, tačna masa prekursorskog jona $[M+H]^+$ korišćena je kao *lock masa* (referentna masa) za tačna merenja masa nastalih fragmentnih jona. Na *slici 37* prikazan je TIC (*eng. Total Ion Current*) ESI+ hromatogram reakcione smeše DHHB UV filtra i NaOCl (2,5 ekv.). U cilju da se dobiju korisne informacije za identifikaciju nepoznatih proizvoda, detaljno je ispitana fragmentaciona šema polaznog jedinjenja, DHHB UV filtra.



Slika 37. TIC rastvora DHHB UV filtra nakon reakcije sa NaOCl (2,5 ekv).

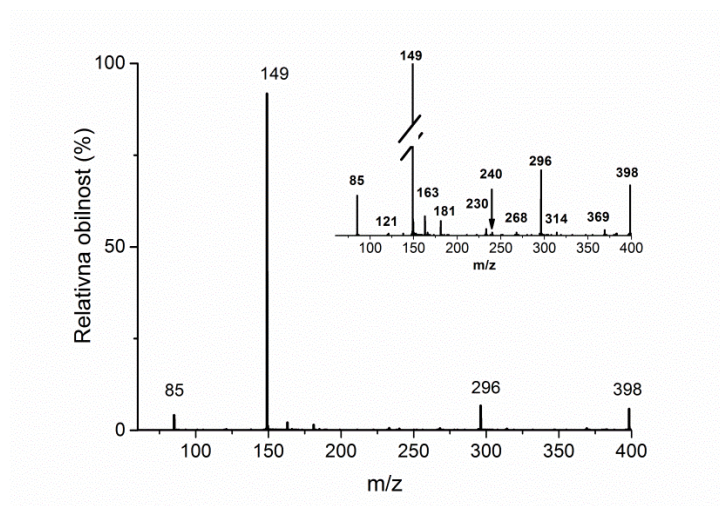
5.2.3. Analiza masenih spektara polaznog jedinjenja, DHHB

Pod primenjenim hromatografskim uslovima, DHHB eluiru na retencionom vremenu 11,6 minuta. Dva pika koja potiču od jona sa m/z vrednostima 398 i 420 dominiraju u masenom spektru i odgovaraju jonima $[DHHB+H]^+$ i $[DHHB+Na]^+$. Tačna masa protonovanog molekula (398,2327 jedinica) je u savršenoj saglasnosti sa elementarnim sastavom $C_{24}H_{32}NO_4^+$ (greška merenja je -1,0 ppm). Važno je napomenuti da su joni sa m/z 296 (**1a**), 233 (**1h**) i 149 (**1b**) takođe primećeni i u ESI spektru DHHB UV filtra (Slika 38). Ova činjenica jasno potvrđuje da se čak i u uslovima manje koncentracije NaOCl polazni jon lako razgrađuje pri čemu nastaju primarni jon **1a** i **1h**. Jon **1b**, što je jasno dokazano efektom kolizione energije (videti ispod) nastaje iz jona **1h**.



Slika 38. LC-ESI+ spektar DHHB UV filtra.

Na *Slici 39* predstavljen je CID spektar $[\text{DHHB}+\text{H}]^+$ dostignut upotrebom kolizije energije od 20 eV. Postoje tri glavna produkt jona: m/z 296 (1a), 149 (1b) i 85 (1c). Osim ovih fragmenata, nekoliko manje intenzivnih, ali relativno važnih jona sa m/z 369 (1d), 314 (1e), 268 (1f), 240 (1g), 233 (1h), 181 (1i), 163 (1j) i 121 (1k) takođe je primećeno (*umetak na slici 39*). Ovi joni su nabrojani u *tabeli 4*, dok je njihovo nastajanje objašnjeno u daljem tekstu.



Slika 39. Spektar koliziono indukovane disocijacije $[\text{DHHB}+\text{H}]^+$. Umetak (zumirani spektar) prikazuje jone sa malom obilnošću.

Tabela 4. Tačne i precizne mase i elementarni sastav prekursorskog i fragmentacionih jona **DHHB**-a i njegovih proizvoda **P1** i **P2**. Koliziona energija je podešena na 20 eV

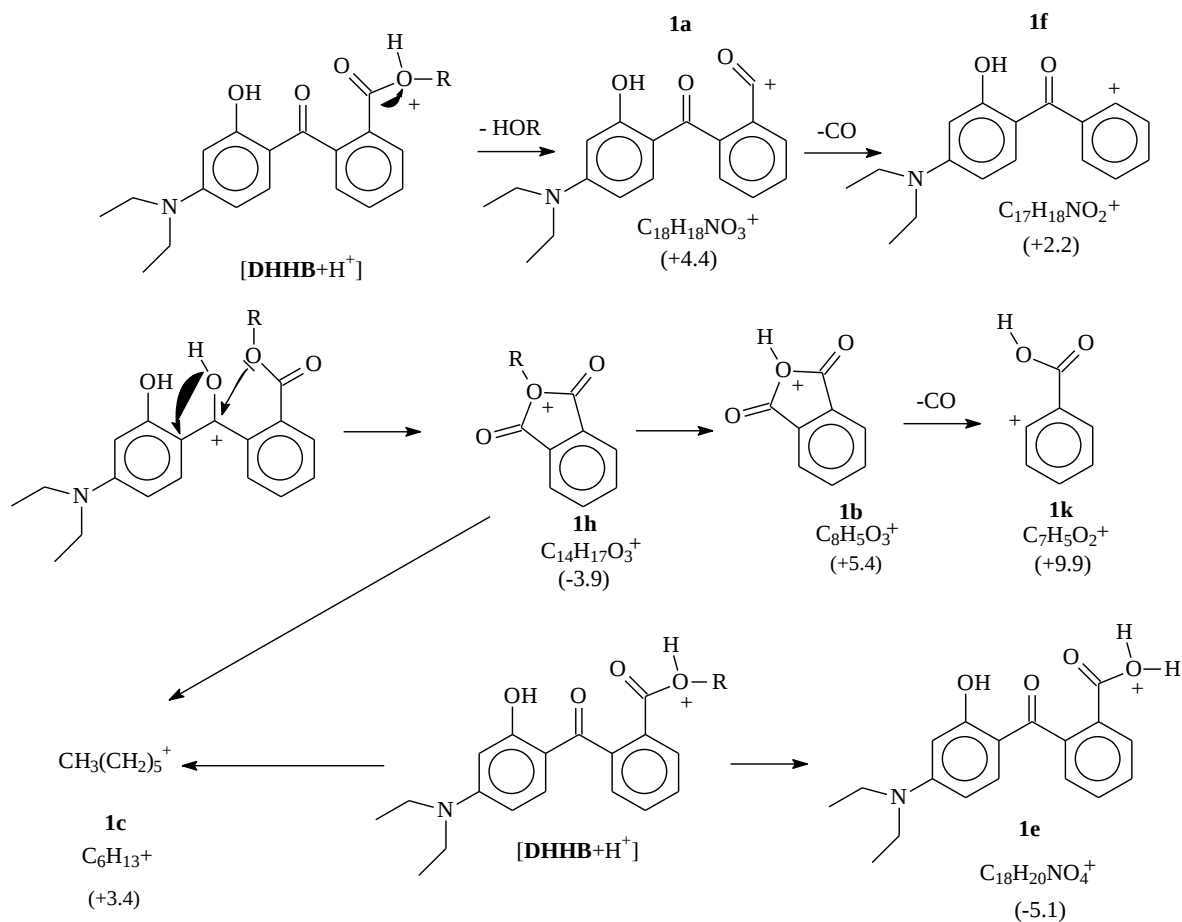
	Ret. vreme (min)	Osnovni joni	Izmerena masa	Izračunata masa	Elementarni sastav	Greška (ppm)
DHHB	11,2	[M+Na] ⁺ 420				
		[M+H] ⁺ 398	398,2327	398,2331		
		369	369,1917	369,1940	C ₂₄ H ₃₂ NO ₄ ⁺	-1,0
		314	314,1376	314,1392	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄ ⁺	-6,2
		296	296,1300	296,1287	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄ ⁺	-5,1
		268	268,1344	268,1338	C ₁₈ H ₁₈ NO ₃ ⁺	+4,4
		240	240,1386	240,1388	C ₁₇ H ₁₈ NO ₂ ⁺	+2,2
		233	233,1169	233,1178	C ₁₆ H ₁₈ NO ⁺	-0,9
		181	181,0876	181,0865	C ₁₄ H ₁₇ O ₃ ⁺	-3,9
		163	163,0253	163,0269	C ₁₀ H ₁₃ O ₃ ⁺	+6,1
		149	149,0247	149,0239	C ₁₀ H ₁₃ NO ⁺	-9,8
		121	121,0302	121,0290	C ₈ H ₅ O ₃ ⁺	+5,4
		85	85,1005	85,1017	C ₇ H ₅ O ₂ ⁺	+9,9
					C ₆ H ₁₃ ⁺	-14,0
P1	11,1	[M+Na] ⁺ 426				
		[M+H] ⁺ 404 (406)	404,1670	404,1629	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄ Cl ⁺	-4,7
		302 (304)	302,0556	302,0584	C ₁₆ H ₁₃ NO ₃ Cl ⁺	-9,3
		274 (276)	274,0648	274,0635	C ₁₅ H ₁₃ NO ₂ Cl ⁺	+4,7
		233, 163, 181, 149 i 85	Slične onima dobijenim sa DHHB-om			
P2	12,8	[M+Na] ⁺ 454				
		[M+H] ⁺ 432 (434)	432,1941	432,1942	C ₂₄ H ₃₁ NO ₄ Cl ⁺	-0,2
		403 (405)	403,1512	432,1550	C ₂₂ H ₂₆ NO ₄ Cl ⁺	-9,4
		348 (350)	348,0993	348,1003	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ Cl ⁺	-2,9
		330 (332)	330,0893	330,0897	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃ Cl ⁺	-1,2
		302 (304)	-	302,0948	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂ Cl ⁺	-
		233, 149, 121 i 85	Slične onima dobijenim sa DHHB-om			

DHHB, heksil 2-[4-(dietilamino)-2-hidroksibenzoil]benzoat.

^aDodatni joni registrovani tokom fragmentacije prekursorskog jona koji sadrže izotop hlora ³⁷Cl, prikazani su u zagradama.

^bTačne mase sa greškom većom od 10 ppm nisu date.

Elementarni sastav jona **1a** sa tačnom masom od 296,1300 je $C_{18}H_{18}NO_3^+$ (greška +4,4 ppm). Ovaj jon nastao je protonovanjem estarske grupe, a potom je usledilo heterolitičko cepanje C-O veze i odlazak heksanola. Posledični gubitak ugljen monoksida objašnjava nastanak fragmentnog jona **1f**, $C_{17}H_{18}NO_2^+$ (Šema 10). Fragment **1f** može takođe nastati iz protonovanog molekula u jednoj fragmentacionoj reakciji.

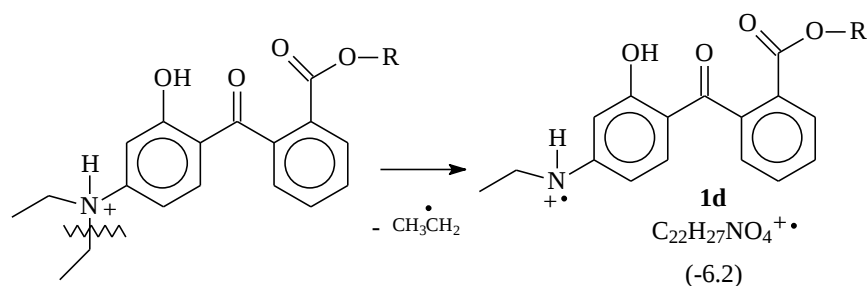


Šema 10. Putevi fragmentacije za $[DHHB+H]^+$ gde R predstavlja heksil grupu ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$). Dat je elementarni sastav, greške između izmerenih i izračunatih masa (u ppm) prikazane su u zagradama.

Drugi fragmentacioni put može se smatrati fatalnim. U slučaju protonovanja karbonilne grupe benzofenona, dolazi do nukleofilnog napada kiseonika iz estarske grupe na atom ugljenika iz karbonilne grupe koji ima pozitivno naelektrisanje, što rezultira formiranjem jona **1h**. Jon **1h** se dalje razlaže odlaskom molekula heksana i formiranjem stabilnog jona **1b** sa m/z vrednošću 149,0247 i elementarnim sastavom $C_8H_5O_3^+$, koji je inače osnovni jon u spektrima dialkiltalata. Proučavanje spektralnih promena sa promenom kolizione energije pokazuje da površina pika za jon **1h** naglo opada, dok za jon **1b** raste sa povećanjem kolizione energije. Štaviše, na kolizionoj energiji većoj od 20 eV jon **1b** se dalje fragmentiše dajući jon **1k** (m/z 121,302) zbog gubitka ugljen monoksida.

Jon **1c** (m/z 85,1017) sa elementarnim sastavom $C_6H_{13}^+$ odgovara heksil grupi. Proces je očigledan i može da uključuje protonovani molekul ili jon **1h** kao prekursor (Šema 10).

Jon **1d** (369,1917) sa elementarnim sastavom $C_{22}H_{27}NO_4^+$ (greška mase -6,2 ppm) nastaje gubitkom etil radikala sa atoma azota protonovanog molekula (Šema 11).

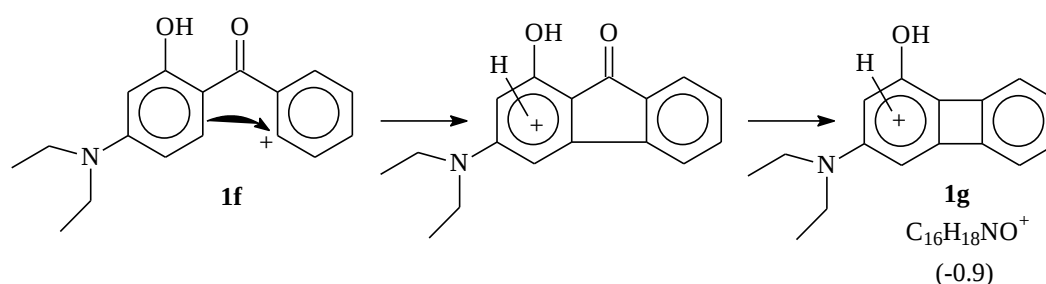


Šema 11. Nastanak jona **1d**. Prikazan je elementarni sastav i u zagradi data greška (u ppm) između izmerene i izračunate mase.

Zbog toga što ova reakcija protivureči pravilu jona sa parom elektrona (Karni i Mandelbaum, 1980) i u njoj nastaju radikal-katjoni, obilnost **1d** jona je na prilično niskom nivou. U nekoliko radova prikazano je da se takva homolitička disocijacija dešava u nekoliko konstitutivnih amina (Fitch *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Le Fur *et al.*, 2013). Alternativna eliminacija kompletnog aromatičnog dela molekula (cepanje N-Ar

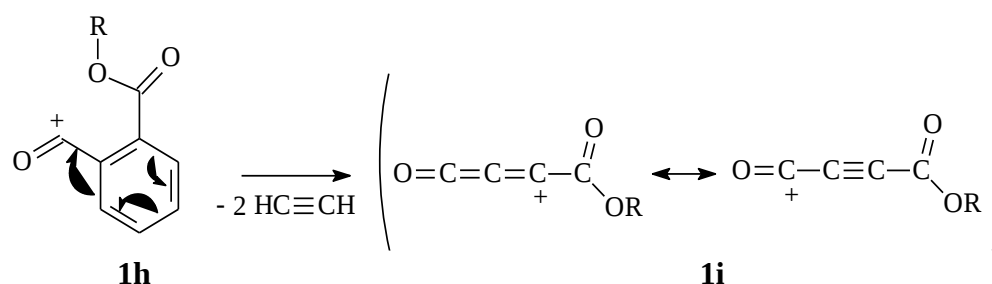
veze) se iz nekog razloga ne dešava, s obzirom da se njegov odgovarajući jon (m/z 73) ne pojavljuje u spektru ni na jednoj vrednosti kolizione energije.

Jon **1g** (240,1386 masenih jedinica) sa elementarnim sastavom $C_{16}H_{18}NO^+$ (greška mase 0,9 ppm) može da nastane od jona **1f** preuređivanjem koje prethodi gubitku ugljen monoksida (Šema 12). Proces počinje ciklizacijom uključujući *orto*-položaje na oba benzenova prstena. Ciklizacija je prilično izražena kada prati fragmentaciju Ph-X-Ph vrsta (Lebedev, 2003).



Šema 12. Fragmentacija jona **1f**. Dat je elementarni sastav i u zagradama je prikazana greška (u ppm) između izmerenih i izračunatih masa.

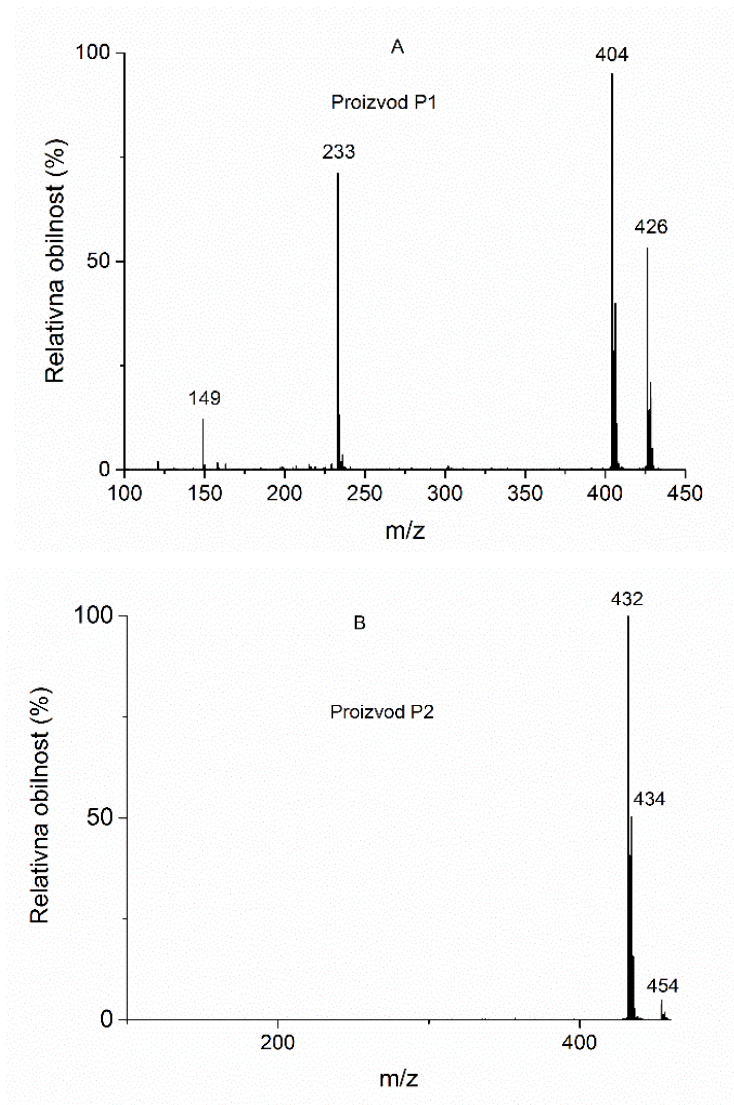
Jon **1j** (163) ne može biti pouzdano razjašnjen. Nađeno je da je njegova tačna masa $m/z = 163,0253$ Da, što dovodi do zaključka da je njegova moguća hemijska formula $C_{10}H_{13}NO^+$. Otvorena struktura jona **1h** može biti odgovorna za nastanak jona **1i** (181,0876 Da). Proces može da podrazumeva dekompoziciju aromatičnog prstena u **1h** jonu (ciklične ili otvorene strukture) prema procesu prikazanom na Šemi 13.



Šema 13. Predloženi proces nastanka jona **1i**.

5.2.4. Identifikacija dobijenih proizvoda

Proizvod **P1** formiran je već u ranim fazama reakcije između DHHB UV filtra i NaOCl, dok se njegova koncentracija kontinuirano povećavala u toku reakcionog vremena. Proizvod je monohlorovan, njegovo retenciono vreme je 11,1 minut i dva osnovna jona $[\mathbf{P1}+\mathbf{H}]^+$ (m/z 404) i $[\mathbf{P1}+\mathbf{Na}]^+$ (m/z 426) primećeni su u ESI masenom spektru (*Slika 40A*).

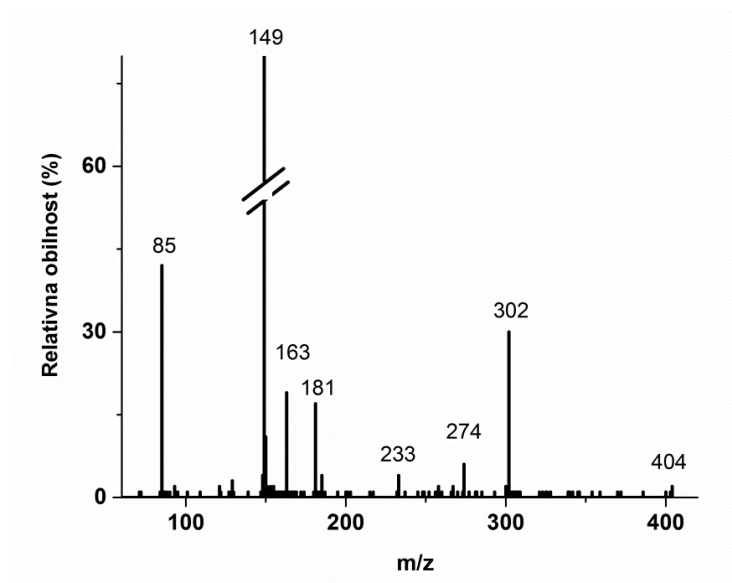


Slika 40. LC-ESI+ spektar proizvoda **P1** (A) i **P2** (B).

Proizvod **P2** eluira na 12,8 minuta dok se njegova koncentracija takođe povećava u toku vremena. U ESI uslovima nastaju $[\mathbf{P2}+\mathbf{H}]^+$ i $[\mathbf{P2}+\mathbf{Na}]^+$ joni sa m/z vrednostima 432 i 454. Ovaj proizvod je takođe monohlorovan, što je dokazano prisustvom jona sa m/z 432 i 434 u odnosu 3:1. Kada se masa ovog proizvoda uporedi sa masom $[\mathbf{DHHB}+\mathbf{H}]^+$ pokazuje razliku od 34 masene jedinice. Sa tačnom masom od 432,1941 Da nađeno je da je elementarni sastav jedinjenja **P2** $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_4\text{Cl}^+$ sa procenjenom greškom od 0,2 ppm. Za razliku od **P1** i **DHHB**, nema drugih jona primećenih za **P2** u ESI spektru (*Slika 40B*).

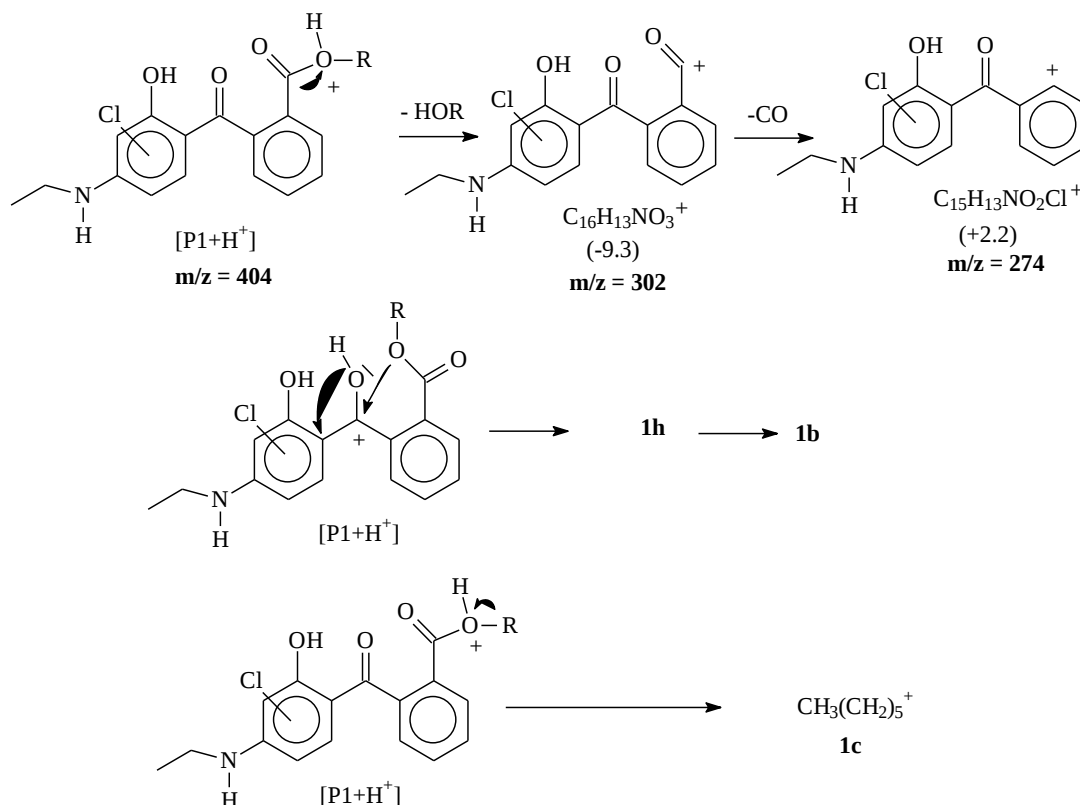
5.2.4.1. LC-MS-MS analiza

U cilju da se identifikuju ova dva proizvoda, izvođeni su LC-MS-MS eksperimenti. Obzirom da su oba proizvoda monohlorovana, fragmentacija je izazvana odabirom oba protonovana molekula sa ^{35}Cl i ^{37}Cl izotopima za prekursore (na primer, u skladu sa tim m/z 404 i 406 za **P1**). Najobilniji proizvod joni koji su primećeni u CID spektru (*Slika 41*) nabrojani su u *Tabeli 4*.



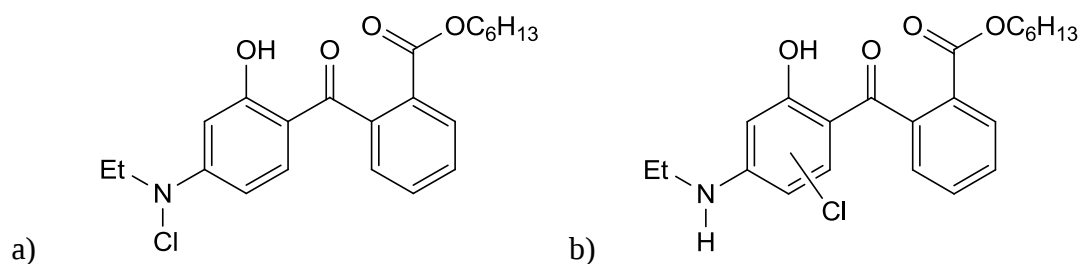
Slika 41. CID spektar $[\mathbf{P1}+\mathbf{H}]^+$ prekursorskog jona (koliziona energija 20 eV).

Prisustvo atoma hlora je jasno zapaženo na osnovu jona sa m/z vrednostima 302 i 274. Njihove tačne mase od 302,0556 i 274,0648 jedinica potvrđuju da je njihov elementarni sastav $C_{16}H_{13}NO_3Cl^+$ i $C_{15}H_{13}NO_2Cl^+$, sa greškama mase od -9,3 i +4,7 ppm. Fragmentacioni joni sa m/z 233, 149 i 85 su slični onima dobijenim u procesu fragmentacije $[DHHB+H]^+$ i identifikovani su kao **1h**, **1b** i **1c** (Šema 14).



Šema 14. CID fragmentacioni put prekursorskog $[P1+H]^+$ jona (strukture jona **1h** i **1b** prikazane su u Šemi 10).

Uzimajući u obzir ove rezultate, molekulu **P1** evidentno nedostaje etil grupa a umesto nje sadrži atom hlora. Moguće strukture proizvoda **P1** prikazane su na slici 42.

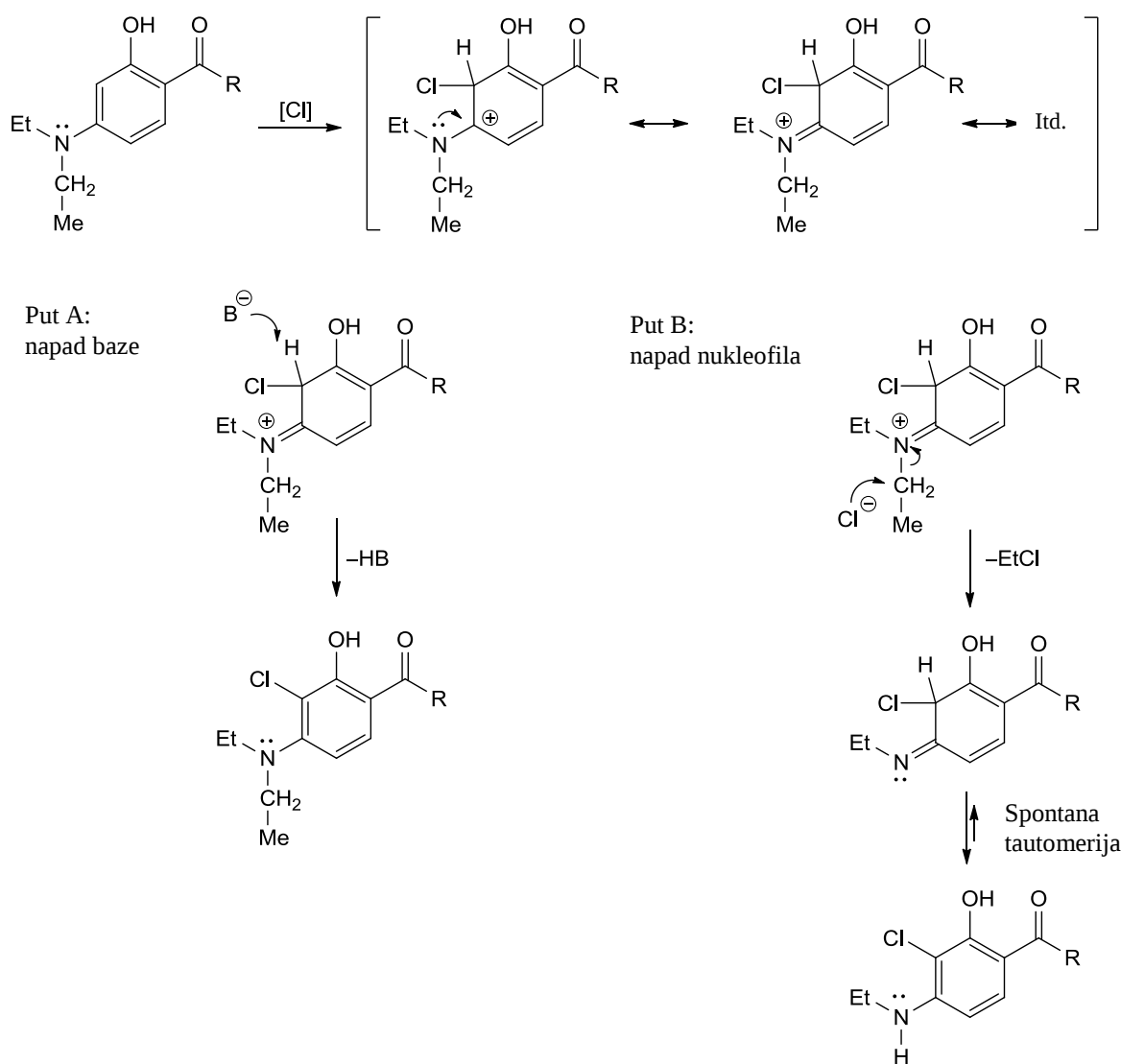


Slika 42. *Moguće strukture proizvoda P1.*

Na prvi pogled, direktna supstitucija etil grupe atomom hlora se čini mogućom, pri čemu bi nastalo N-hloro jedinjenje (*Slika 42 a*). Međutim, pretraživanje literature pokazalo je da su jedinjenja ovog tipa gotovo nepoznata i veoma nestabilna, jer bi najverovatnije došlo do eliminacije HCl i potom do hidrolize nastalog imina, što ovaj put čini malo verovatnim. Verovatnije je da se atom hlora supstituiše na položajima 3 ili 5 na aromatičnom prstenu (*Slika 42 b*). Fenolni prsten DHHB UV filtra je ekstremno reaktivan za elektrofilnu aromatičnu supstituciju. Intermedijerni katjon je stabilizovan donacijom elektronskih parova sa susedne OH ili NR_2 grupe. Njegova najvažnija rezonantna struktura prikazana je u *Šemi 15*. Reakcija odavde može da teče u dva pravca:

A) napadom baze na proton koji je u susedstvu hlorovog atoma, što je uobičajeni put elektrofilne aromatične supstitucije;

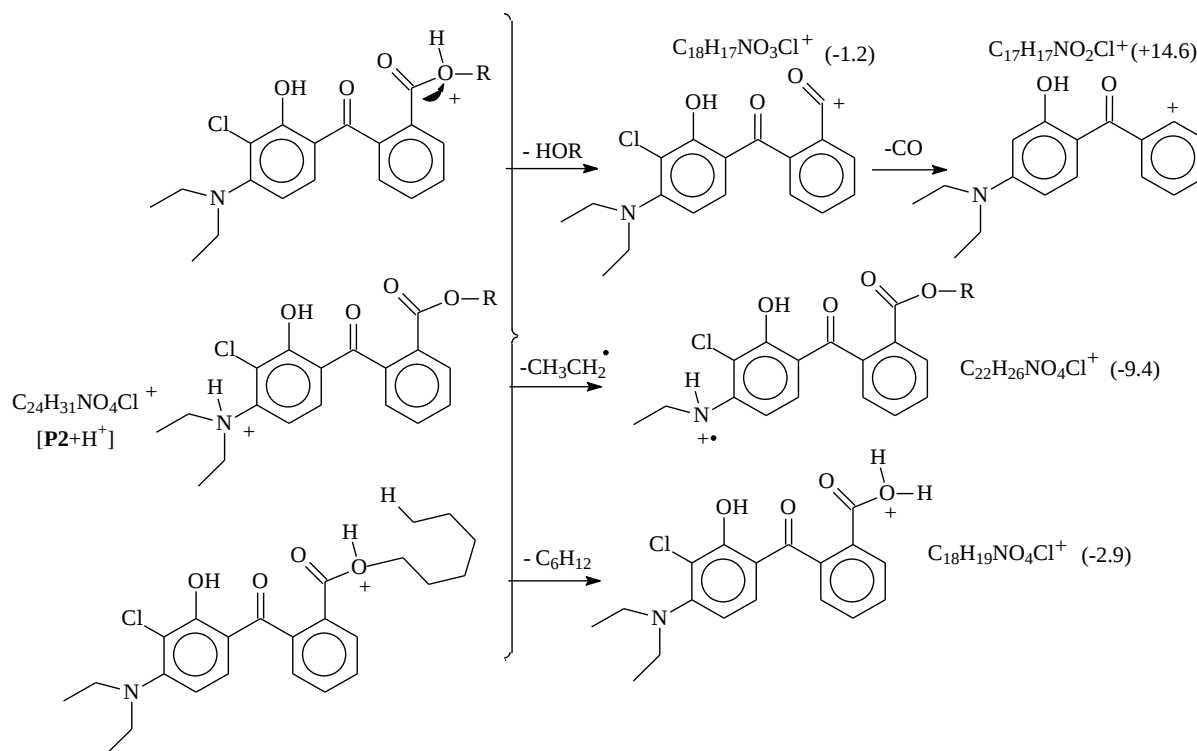
B) napadom nukleofila (Luisove baze) na jako aktiviranu CH_2 grupu koja se nalazi na amino (NEt_2) delu molekula. U ovom slučaju, elektrofilna aromatična supstitucija odigrava se na neobičan način, hlorovanjem benzenovog prstena uz eliminaciju alkil grupe sa susedne amino grupe. U eksperimentalnim uslovima u ovom radu mogući nukleofil je hlor, kog je bilo u značajnoj meri. Mehanizam reakcije izgleda prihvatljiv, iako će biti potreban dodatni rad da razjasni ovaj mehanizam u više detalja.



Šema 15. Predloženi mehanizam nastanka proizvoda **P1**.

Fragmentacija protonovanog molekula **P2** sa ^{35}Cl i ^{37}Cl kao prekursora (sa odgovarajućim m/z vrednostima 432 i 434) dovodi do formiranja nekoliko obilnih proizvoda jona (Tabela 4): vrednosti m/z 403, 348, 330 i 302 su karakteristične za **P2**, a m/z vrednosti 233, 149, 121 i 85 su slične onima koje su primećene kod **DHBB** i **P1** (identifikovani kao **1h**, **1a** i **1c**). Prisustvo ovih zajedničkih jona jasno pokazuje da nije došlo ni do kakvih

hemijskih promena u odgovarajućem delu **DHBB** molekula. Tačna masa karakterističnih fragmentacionih jona (403,1512; 348,0993; 330,0893 i 302,0992) odgovara hemijskim formulama $C_{22}H_{26}NO_4Cl^+$, $C_{18}H_{19}NO_4Cl^+$, $C_{18}H_{17}NO_3Cl^+$ i $C_{17}H_{17}NO_2Cl^+$. Prema tome, hlorovanje se podrazumeva na fenolnom delu molekula **DHBB** UV filtra.



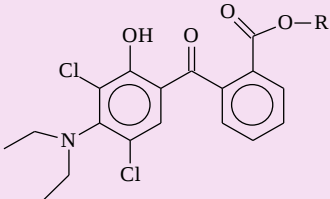
Šema 16. Predloženi fragmentacioni put $[P2+H]^+$.

Postoje tri pozicije na prstenu dostupne za elektrofilnu supstituciju hlorom. Prema pravilima organske hemije, očekuje se da su najpovoljniji položaji za supstituciju 3 i 5, pošto su to *orto*- i *para*- položaji u odnosu na primarne supstituente (hidroksilnu i amino grupu). S obzirom da je nastao samo jedan proizvod, bilo je nemoguće identifikovati njegovu strukturu isključivo na osnovu masenih spektara, i zbog toga je bilo neophodno sintetisati oba izomera, dokazati njihovu strukturu i sprovesti slične LC-MS eksperimente. NMR spektar odgovara monohlorovanom proizvodu sa atomom hlora na položaju 3 na fenolnom prstenu.

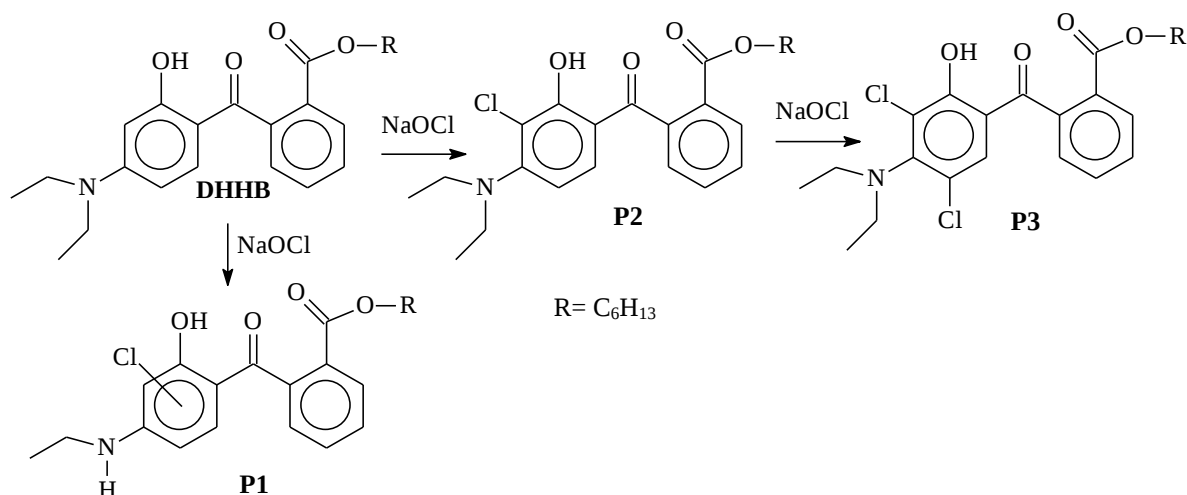
Iako su CID spektri oba izomera bili identični, njihova retenciona vremena bila su sasvim različita. Retenciono vreme za izomer sa atomom hlora na položaju 3 fenolnog prstena bilo je 12,8 min, tj. poklopilo se sa retencionim vremenom jedinjenja **P2**. Zabeleženi putevi fragmentacije ovog jedinjenja sumirani su u *Šemi 16*.

U TIC hromatogramu reakcione smeše koja je sadržala DHHB i NaOCl primećen je i pik koji potiče od trećeg proizvoda (**P3**) na 15,8 min (*Slika 37*). Uprkos slabom intenzitetu, razjašnjenje strukture ovog proizvoda bilo je moguće korišćenjem iste procedure kao i kod **P1** i **P2**. Njegova tačna masa od 466,1564 jedinice odgovara elementarnom sastavu $C_{24}H_{30}NO_4Cl_2^+$ (greška 2,6 ppm) u skladu sa dihlorovanjem **DHHB** UV filtra. CID spektar jona $[P3+H]^+$ otkriva nastajanje proizvod jona sa m/z vrednostima od 437, 382, 364, 336, 149 i 85. Njihove mase sa greškama navedene su u *tabeli 5*. Joni sa m/z 149 i 85 slični su onima dobijenim za DHHB ukazujući na očuvanje benzoil strukture tokom reakcije sa NaOCl. Oba Cl atoma su nakačena na fenolni prsten što je jasno dokazano prisustvom ostalih jona. Oni su formirani u istom fragmentacionom procesu kao što je predloženo i za generaciju jona **1a**, **1d**, **1e** i **1f**. Prema tome, **P3** predstavlja proizvod sa dva atoma hlora supstituisana na položajima tri i pet na fenolnom prstenu DHHB UV filtra. Ovaj proces je u potpunoj saglasnosti sa pravilima organske hemije.

Tabela 5. Tačne i precizne mase i elementarni sastav fragment jona **P3** proizvoda u CID eksperimentima

P3  466,1564 Da	Tačna masa	Elementarni sastav	Izračunate mase	Greška (ppm)
	437,1074	$C_{22}H_{25}NO_4Cl_2^+$	437,1161	-19,9
	382,0576	$C_{18}H_{18}NO_4Cl_2^+$	382,0613	-9,7
	364,0442	$C_{18}H_{16}NO_3Cl_2^+$	364,0507	-17,9
	336,0509	$C_{17}H_{16}NO_2Cl_2^+$	336,0558	-14,6
	149,0232	$C_8H_5O_3^+$	149,0239	-4,7
	85,1000	$C_6H_{13}^+$	85,1017	-20,0

Prema tome, masena spektrometrija nedvosmisleno objašnjava prirodu proizvoda nastalih tokom reakcije NaOCl sa DHHB UV filtrom na sobnoj temperaturi i neutralnoj pH vrednosti. Prvobitna reakcija podrazumeva ili supstituciju vodonikovog atoma u položaju tri fenolnog prstena atomom hlora ili hlorovanje fenolnog prstena simultanom eliminacijom etil grupe sa azotovog atoma (Šema 17) uz nastanak **P1** i **P2** na odgovarajući način. Oba proizvoda imaju slične apsorpcione maksimume kao što je pokazano na Slici 36. **P2** dalje podleže daljem procesu hlorovanja pri čemu nastaje **P3**. Pod primenjenim reakcionim uslovima, nisu primećeni neki drugi proizvodi koji nastaju hlorovanjem ostalih delova molekula **DHHB** UV filtra.

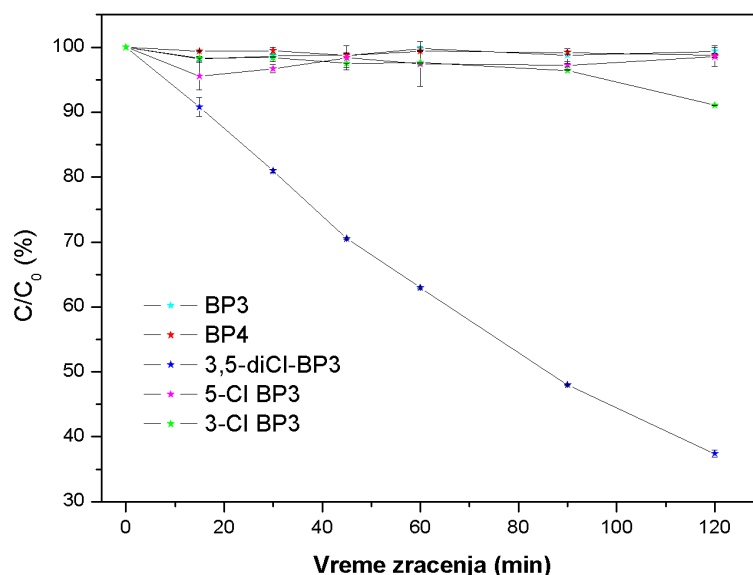


Šema 17. Reakcija DHHB UV filtra sa vodenim rastvorom NaOCl ($R = -C_6H_{13}$).

5.3. Ispitivanje fotostabilnosti

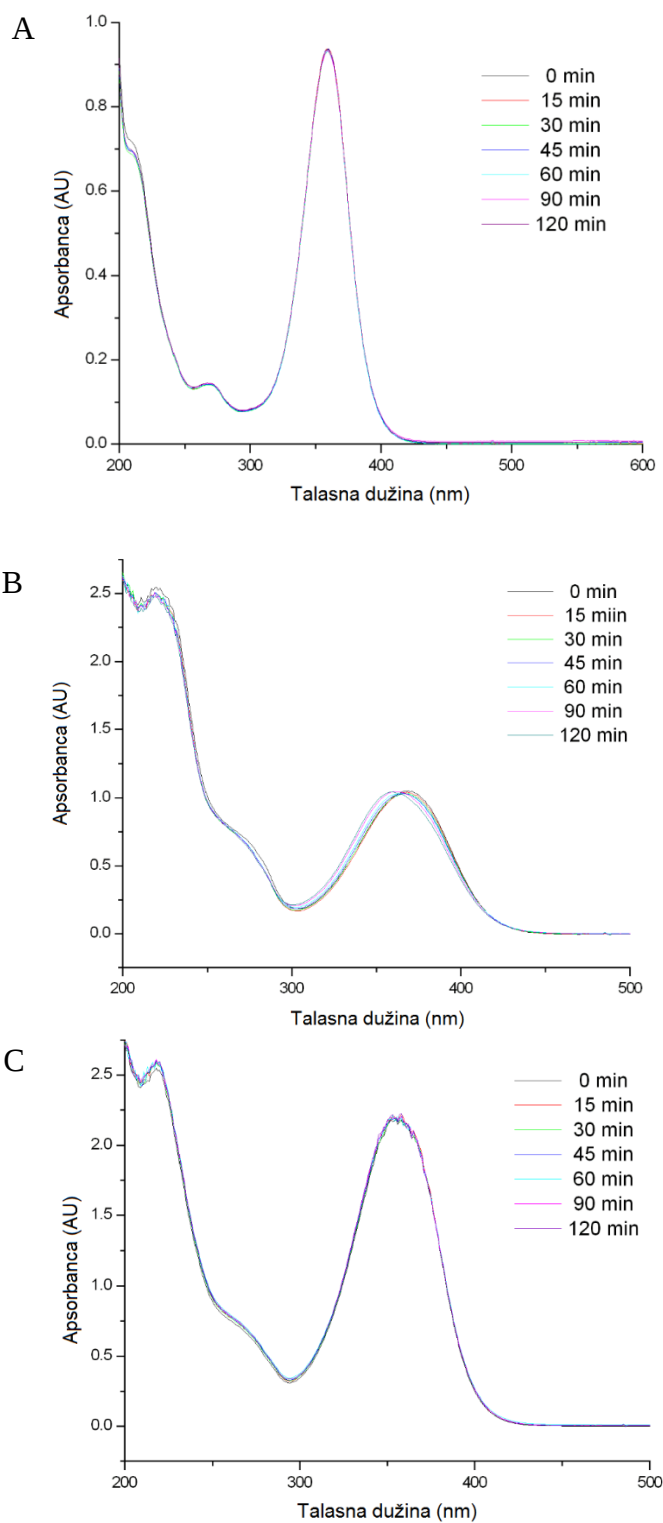
Ispitivana je fotostabilnost rastvora BP3, BP4 i DHHB UV filtra, kao i njihovih hlorovanih proizvoda. Ovi eksperimenti podeljeni su u dva seta. U okviru jednog, ispitivani su BP3 i BP4 UV filtri i njihovi hlorovani proizvodi, a u okviru drugog DHHB i njegovi hlorovani proizvodi. Nakon 120 minuta izloženosti UVA zračenju, rezultati su pokazali da UV filtri BP3 i BP4, kao i njihov hloro-proizvod, 5Cl-BP3 imaju prilično ujednačenu

stabilnost i zanemarljiv je procenat smanjenja početne koncentracije. U slučaju 3Cl-BP3 taj procenat je nešto veći, ali i dalje manji od 10%, što je takođe beznačajno i može se pripisati greškama merenja. Izuzetak je 3,5-diCl-BP3 koji se pokazao kao fotonestabilno jedinjenje. Pod uslovima UVA zračenja, stepen degradacije ovog jedinjenja bio je veći od 40% u odnosu na polaznu koncentraciju, kao što se može videti na *slici 43*. To je, sa stanovišta životne sredine, najmanje povoljno, jer su eksperimenti hlorovanja pokazali da je upravo ovo jedinjenje dominantan proizvod BP3 i BP4 UV filtra u vodenoj sredini u prisustvu hlora. Degradacioni proizvod koji je u ovom procesu nastao, nažalost, nije identifikovan. To predstavlja izazov i cilj za buduća istraživanja.



Slika 43. Fotostabilnost BP3, 5-hloro i 3,5-dihloro derivata BP3 i BP4 UV filtra pod UVA zračenjem.

Eksperimenti ispitivanja fotostabilnosti DHHB UV filtra i njegovih hlorovanih proizvoda u rastvoru smeše acetonitril-voda pokazuju da sva ispitana jedinjenja prilično stabilna pod dejstvom UVA zračenja. Na *slici 44 (A, B i C)* možemo videti rezultate spektrofotometrijskih merenja njihovih rastvora u toku eksperimenta fotodegradacije.



Slika 44. Fotostabilnost DHHB UV filtra (A), 5-Cl DHHB (B) i 3-Cl DHHB (C).

Apsorbanca, kao ni položaj apsorpcionih maksimuma se ne menja sa dužinom izloženosti zračenju, što bi trebalo da znači da se ništa značajno ne menja ni u strukturi ispitivanih jedinjenja. Nedavno istraživanje (Gong *et al*, 2015) u kome je potvrđena stabilnost DHHB UV filtra pod dejstvom UV zračenja, u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Rezultati eksperimenata fotostabilnosti pokazuju da su ispitivani UV filtri i njihovi hlorovani proizvodi uglavnom stabilni pod dejstvom UVA zračenja, koje bi u laboratorijskim eksperimentima trebalo da simulira prirodnu svetlost. Međutim, u kompleksnom okruženju, kao što su prirodni vodeni sistemi ili bazenska voda, mnogi su faktori koji utiču na fotohemiju organskih jedinjenja.

5.4. Određivanje UV filtera u bazenskim vodama

U okviru ovog rada ispitivani su uzorci bazenskih voda 13 lokaliteta u Sloveniji i sa 7 lokaliteta u Srbiji. Analize su rađene da se utvrdi prisustvo DHHB, BP3 i BP4 UV filtra i njihovih hlorovanih proizvoda. Primenjenom metodom ekstrakcije (opisane u poglavlju 4.5) i analitičkim postupkom opisanom u poglavlju 4.6.7. utvrđeno je prisustvo BP3 UV filtra na dve lokacije u koncentracijama 0,3 µg/l i 1,7 µg/l. U oba slučaja, bazeni su punjeni svežom gradskom vodom. Od hlorovanih proizvoda primećeno je prisustvo 5Cl-BP3 čija je koncentracija bila ispod limita kvantifikacije i 3,5-diCl-BP3 u koncentraciji 6,6 µg/l. Vrednost r^2 regresione linije za BP3 bio je 0,9955 i za 3,5-diCl-BP3 0,9962.

Činjenica da je najveća koncentracija nađena za 3,5-diCl-BP3 u saglasnosti je sa eksperimentalnim rezultatima, i ne isključuje mogućnost prisustva BP4 UV filtra budući da i on daje ovo jedinjenje kao proizvod u prisustvu hlora u vodenoj sredini. Primenjena metoda ekstrakcije ukazala je na prisustvo BP3 UV filtra i njegovih hlorovanih proizvoda na relativno malom broju lokacija. Da bi bili sigurni u ovaj rezultat i dobili još pouzdanije podatke, bilo bi potrebno primeniti i neke druge metode ekstrakcije kako bi se utvrdilo prisustvo i drugih UV filtera u uzorcima bazenskih voda, što može biti predmet nekog budućeg istraživanja.

5.5. Toksikološki testovi

Primarni fokus izvedenih toksikoloških ispitivanja bilo je ispitivanje toksičnosti DHHB UV filtra i njegovih hlorovanih proizvoda na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri*, slatkovodnoj jednoćelijskoj algi *Pseudokirchneriella subcapitata* i slatkovodnom račiću *Daphnia magna*.

5.5.1. Rezultati toksikoloških testova na *Vibrio fischeri*

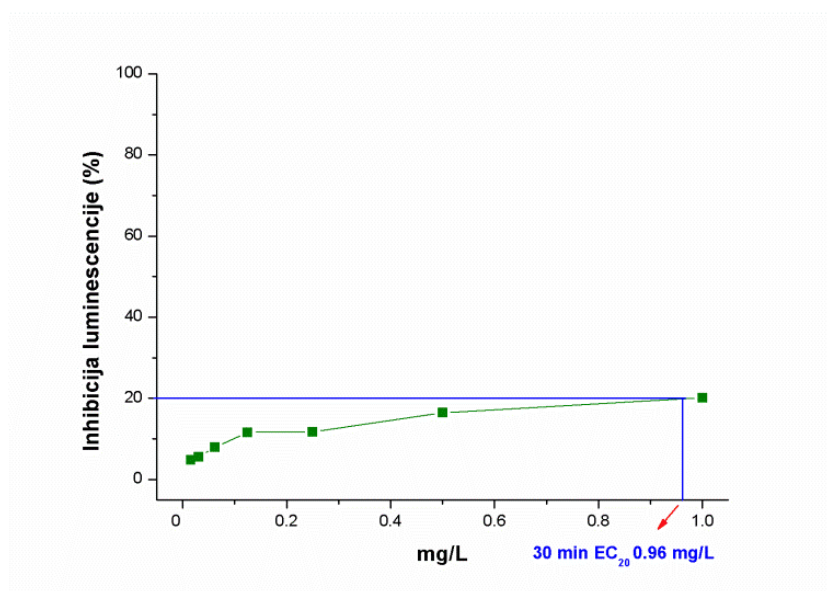
Ispitivani su toksični efekti DHHB UV filtra i njegovih hlorovanih proizvoda, 3-hloro DHHB i 5-hloro DHHB, na tečno-sušenoj luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri* na osnovu ISO standarda (ISO 10706, 2000). Kao odgovor organizma meri se smanjenje luminescentne emisije, odnosno inhibicija luminescencije nakon 30 minuta inkubacije sa određenim koncentracijama ispitivanih jedinjenja. Kao rezultat se obično izračunava vrednost EC_{50} koja predstavlja efektivnu koncentraciju test supstance (*eng. effective concentration*) koja izaziva 50% efekta na posmatrano svojstvo test organizma (u ovom slučaju inhibicije luminescencije).

Tabela 6. Inhibicija (%) luminescencije bakterije *V. fischeri* u rastvorima DHHB, 3-Cl DHHB i 5-Cl DHHB

Koncentracija (mg/l)	Inhibicija luminescencije (%)		
	DHHB	3-Cl DHHB	5-Cl DHHB
1	20,11 ± 1,0	20,26 ± 0,7	20,32 ± 2,0
0,5	16,46 ± 2,1	17,21 ± 0,4	16,23 ± 0,3
0,25	11,72 ± 1,4	11,92 ± 2,0	12,05 ± 0,2
0,125	11,58 ± 1,9	10,78 ± 1,4	11,34 ± 0,5
0,0625	7,93 ± 3,2	8,06 ± 0,1	9,01 ± 1,9
0,0313	5,58 ± 1,0	5,63 ± 1,2	5,89 ± 2,6
0,0156	4,77 ± 3,7	4,82 ± 3,8	4,65 ± 0,9

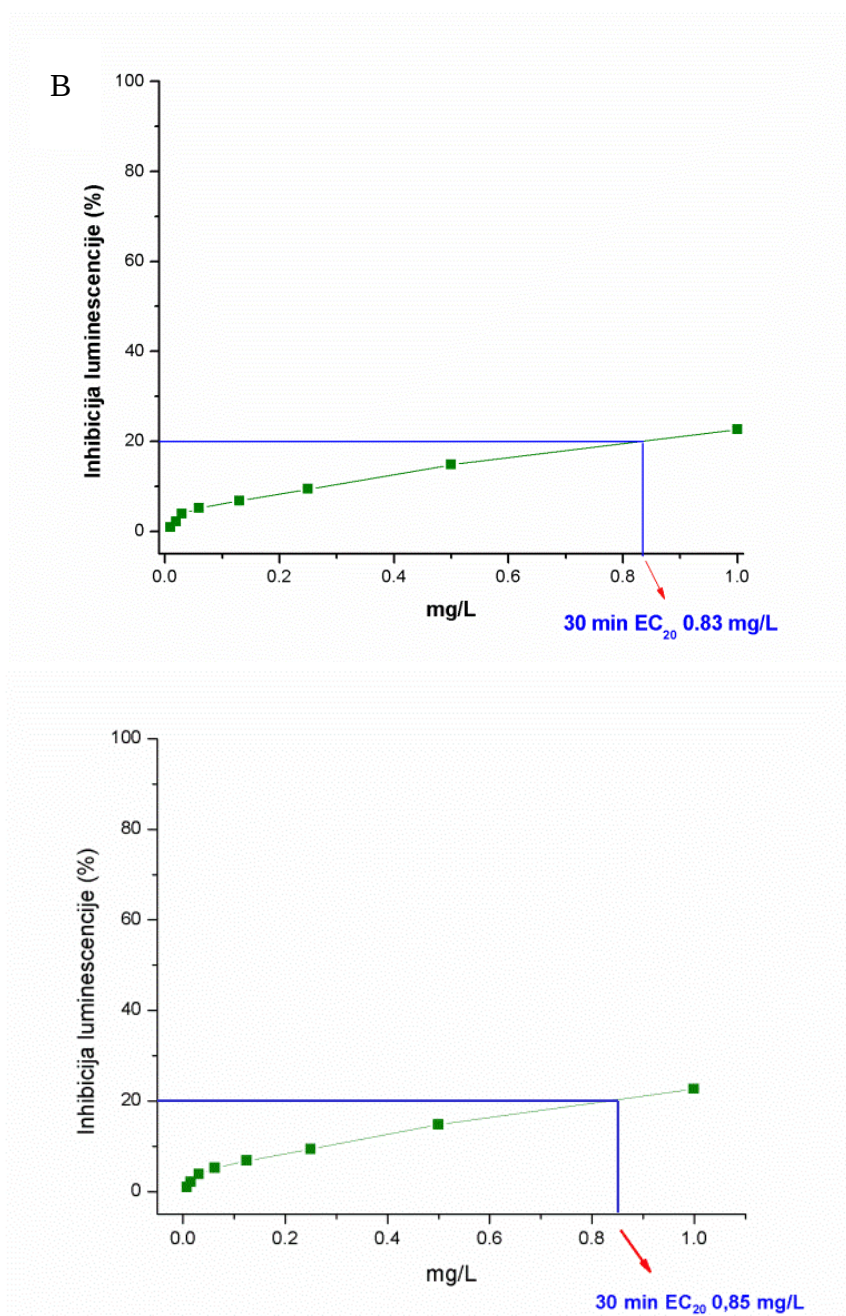
Inhibicija luminescencije pri ispitivanim koncentracijama (*Tabela 6*) bila je isuviše mala da bi se izračunale vrednosti EC_{50} nakon 30 minuta ekspozicije. Zbog toga su određivane 30 min EC_{20} vrednosti, koje predstavljaju koncentraciju ispitivanih rastvora pri kojoj dolazi do 20% inhibicije luminescencije bakterije *V. fischeri* nakon 30 minuta izloženosti. Rezultati su pokazali najveću vrednost u slučaju DHHB UV filtra, mada sve tri supstance ne pokazuju značajne vrednosti inhibicije luminescencije na bilo kojoj koncentraciji.

Na osnovu rezultata prikazanih u *tabeli 6*, izvedena je kriva zavisnosti doza-odgovor za DHHB UV filter, i vrednost 20% inhibicije luminescencije nakon 30 minuta izloženosti je $EC_{20} = 0,96 \pm 0,011$ mg/l. Kriva doza-odgovor za DHHB data je na *slici 45*.



Slika 45. Kriva doza-odgovor za rastvor DHHB UV filtra sa luminescentnom bakterijom *Vibrio fischeri* nakon 30 minuta ekspozicije.

Na osnovu dobijenih podataka, izvedene su i krive dozne zavisnosti za 3-hloro DHHB i 5-hloro DHHB (*Slika 46*). Iz krive su određene koncentracije koje dovode do 20% inhibicije luminescencije bakterije *Vibrio fischeri*. EC_{20} vrednost nakon 30 minuta ekspozicije za 3-Cl DHHB iznosi $0,83 \pm 0,014$ mg/l, a za 5-Cl DHHB $0,85 \pm 0,011$ mg/l.



Slika 46. Kriva doza-odgovor za rastvore A) 3-Cl DHHB i B) 5-Cl DHHB sa luminescentnom bakterijom *Vibrio fischeri* nakon 30 minuta ekspozicije.

Na osnovu dobijenih rezultata nije primećena značajna statistička razlika između EC₂₀ vrednosti 3-hloro DHHB i 5-hloro DHHB ($p > 0,05$; 3-hloro DHHB u odnosu na 5-

hloro DHHB). Takođe se može videti da se u poređenju sa DHHB UV filtrom vrednosti EC_{20} za hlorovane derivate mnogo ne razlikuju ($p > 0,05$ u poređenju sa DHHB). To znači nakon procesa hlorovanja ne dolazi do promene toksičnosti DHHB UV filtra. To se može objasniti činjenicom da se struktura polaznog jedinjenja u dezinfekcionim procesima ne menja značajno, odnosno da i DHHB i njegovi hlorovani proizvodi imaju sličan efekat na luminescentnu bakteriju *Vibrio fischeri*.

Zakonodavstvom Evropske unije (European Commission Directive 93/67/EEC) uspostavljene su kategorije toksičnosti (Prilog 2). Uvedeni su termini:

- „veoma toksične za vodene organizme“ – $EC_{50} \leq 1$ mg/l,
- „toksične za vodene organizme“ – EC_{50} u osegu od 1-10 mg/l, i
- „štetne za vodene organizme“ – EC_{50} u opsegu od 10-100 mg/l.

Prema Hernando *et al.* (2007), uvedena je i dodatna kategorija:

- „nije štetan za vodene organizme“ za vrednosti $EC_{50} > 100$ mg/l.

Ovi podaci su dalje primenjivani u ovom istraživanju kako bi se ispitivane supstance klasifikovale prema odgovarajućoj kategoriji.

Kao što je već spomenuto, za DHHB UV filter i njegove hlorovane proizvode nije bilo moguće odrediti vrednosti EC_{50} nakon 30 minuta ekspozicije jer je inhibicija luminescencije pri ispitivanim koncentracijama bila isuviše mala. Zbog toga su određene EC_{20} vrednosti

Rezultati toksikoloških testova za BP3 i BP4 na luminescentnu bakteriju *Vibrio fischeri* dati su u tabeli 7.

Tabela 7. 30 min IC (inhibitorne koncentracije) vrednosti dobijene za BP3 i BP4

Jedinjenje mg/l	BP3	BP4
EC ₂₀ (30 min)	33,2	67,3
EC ₅₀ (30 min)	151 (150-152)*	301 (300-302)*
EC ₈₀ (30 min)	268	1350

*Interval pouzdanosti 95%

Rezultati su pokazali da BP4 UV filter nije toksični za bakteriju *Vibrio fischeri*. Nakon 30 minuta ekspozicije 50% inhibicije luminescencije izmereno pri koncentraciji od 301 mg/l. Mala toksičnost BP4 UV filtra se slaže i sa nekim literaturnim podacima (JEEN Internacionalna korporacija, 2002) gde EC₅₀ vrednost nakon 16 h ekspozicije za BP4 iznosi 210 i 250 mg/l ispitivano na *Pseudomonas putida* kao test organizmu.

Zbog male rastvorljivosti BP3 UV filtra u vodi, osnovni rastvor pripremljen je u acetonu (Health and Consumer Protection, 2006). Kada se organski rastvarač koristi za pripremu rastvora, ispituje se i toksičnost rastvarača u rastvoru sa najvećom testiranom koncentracijom (negativna kontrola). Utvrđeno je da BP3 nije toksičan pri niskim koncentracijama. Međutim, na višim koncentracijama došlo je do njegovog taloženja, tako da nije moguće ispitati njegovu toksičnost u tom slučaju, jer bi tada i toksičnost rastvarača došla do izražaja.

Rastvorljivost 5Cl-BP3 u organskim rastvaračima, acetonu ili etanolu, niža je nego rastvorljivost polaznog jedinjenja, BP3. Osnovni rastvor 5Cl-BP3 pripremljen je u dimetilsulfoksidu (DMSO) u koncentraciji 75 g/l. Zatim su razblaživanjem sa vodom napravljeni uzorci za testiranje različitih koncentracija, ali je na koncentracijama višim od 50 mg/l primećeno taloženje. Međutim, na koncentracijama nižim od 50 mg/l nije primećen toksični efekat 5Cl-BP3 na luminescentnu bakteriju *Vibrio fischeri*.

5.5.2. Rezultati toksikoloških testova na *Pseudokirchneriella subcapitata*

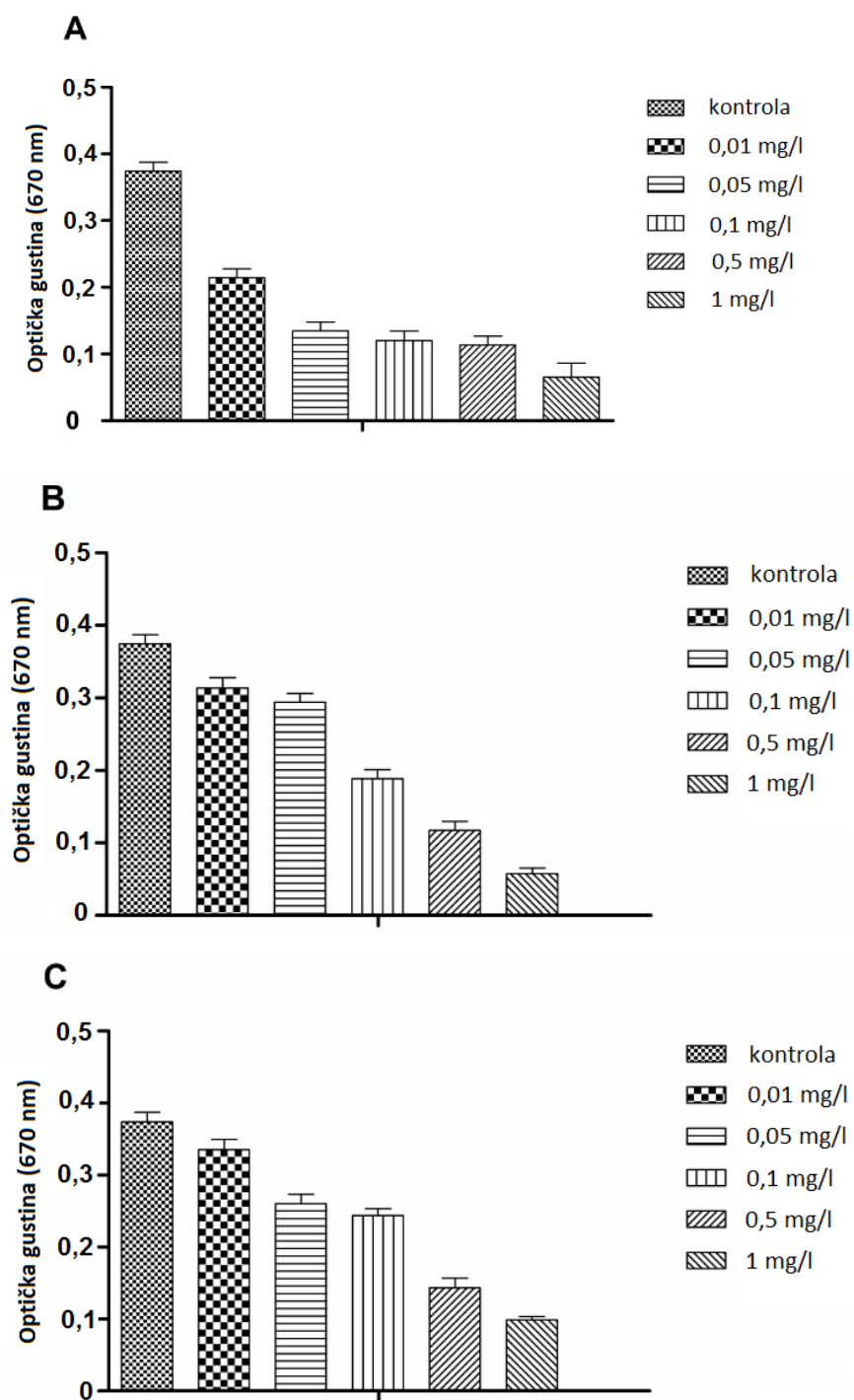
Ispitivani su mogući štetni efekti rastvora DHHB UV filtra i sintetisanih 3-hloro i 5-hloro DHHB u smeši vode i acetonitrila na algu *Pseudokirchneriella subcapitata*. Toksikološki test izvođen je korišćenjem Algaltoxkit FTM (1996) prema ISO standardu ISO 8692, 2012. Kao mera potencijalnog toksičnog efekta uzeta je inhibicija rasta algi. Određivana je koncentracija koja inhibira 50% rasta algi. Data koncentracija označena je kao mera toksičnosti, a izražava se kao EC₅₀ analizom nelinearne regresije 72 h EC₅₀ vrednosti računane su ISO metodom „površina ispod krive“.

Rezultati su pokazali da je planktonska alga *P. subcapitata* mnogo osetljivija na DHHB (EC₅₀= 0,01 ± 0,001 mg/l) nego na njegove hlorovane proizvode, 3-Cl DHHB (EC₅₀= 0,117 ± 0,004) i 5-Cl DHHB (EC₅₀= 0,181 ± 0,004). Rezultati su prikazani u tabeli 8 (p<0,001; DHHB u poređenju sa oba hlorovana proizvoda).

Tabela 8. Rezultati testova toksičnosti sa planktonskom algom *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*)

Uzorak br.	Naziv uzorka	EC ₅₀ (72 h) (mg/l)
1	DHHB	0,011 ± 0,001
2	3-Cl DHHB	0,117 ± 0,004
3	5-Cl DHHB	0,181 ± 0,004

Rast algi određivan je merenjem optičke gustine na 670 nm. Na slici 47 prikazana je zavisnost rasta algi od promene koncentracije ispitivanih jedinjenja. Može se videti da povećanje koncentracije DHHB UV filtra značajnije inhibira rast algi u odnosu na svoje hlorovane proizvode. Prema dobijenim vrednostima EC₅₀ i pomenutoj kategorizaciji toksičnosti, može se reći da su ova jedinjenja veoma toksična za algu *P. subcapitata*.



Slika 47. Optička gustina (OD) izražena kao inhibicija rasta algi izloženih ratvorima različitih koncentracija A) DHHB; B) 3-hloro DHHB i C) 5-hloro DHHB.

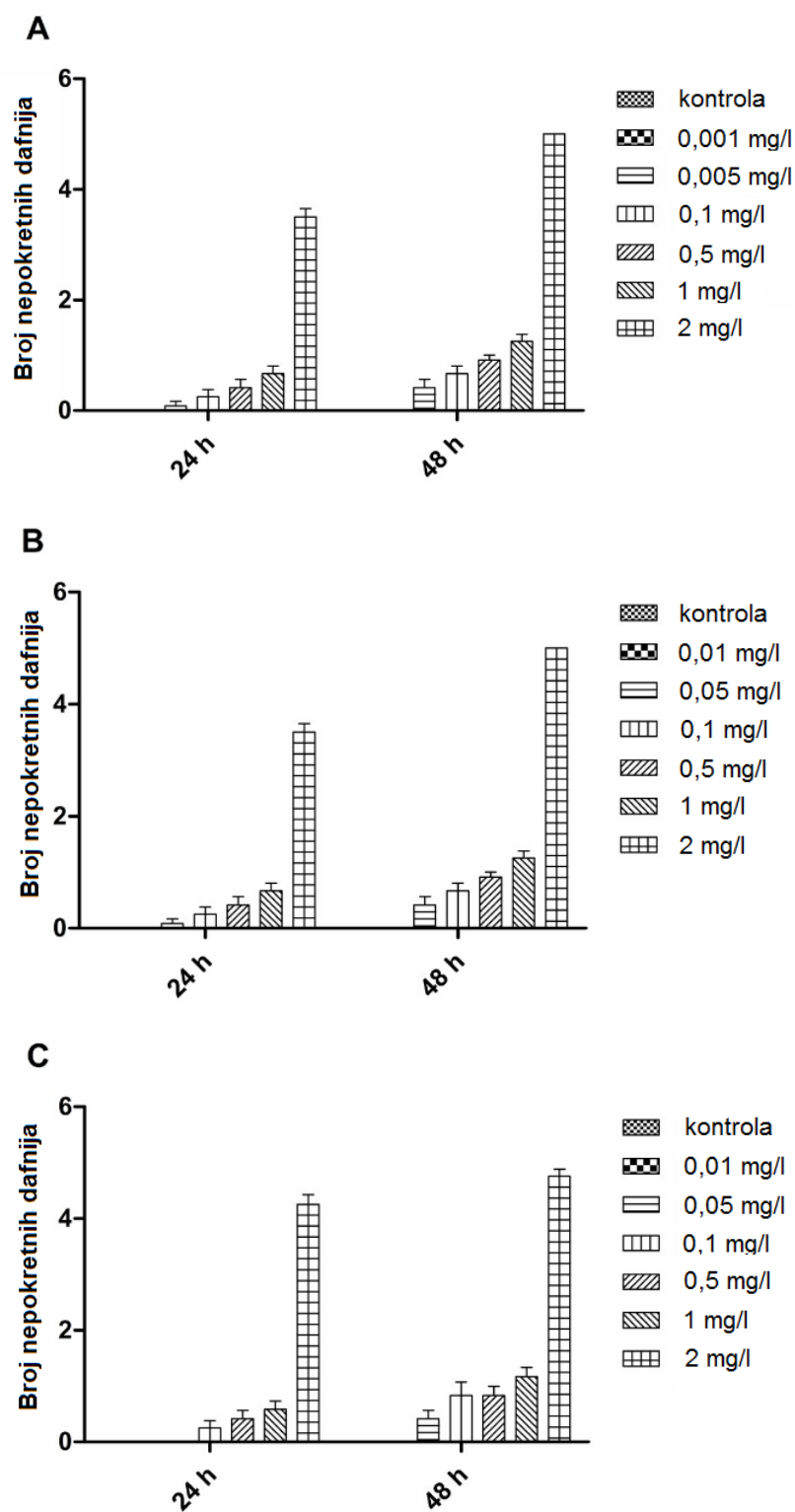
5.5.3. Rezultati toksikoloških testova na *Daphnia magna*

Ispitivana je akutna toksičnost DHHB UV filtra i njegovih hlorovanih proizvoda na test organizam *Daphnia magna* korišćenjem *Daphtoxkit FTM magna* prema ISO protokolu (ISO 6341, 2012). Nakon 24 h i 48 h inkubacije na 20 ± 1 °C zabeležen je broj nepokretnih (imobilizovanih) dafnija. Procenat nepokretnih dafnija analiziran je probit analizom kako bi se odredila efektivna EC₅₀ koncentracija koja uzrokuje 50% nepokretnih dafnija.

Rezultati su pokazali da je *Daphnia magna* osetljivija na hlorovane proizvode DHHB UV filtra nego na DHHB (Tabela 9; Slika 48). *D. magna* je posebno osetljiva na 3-hloro DHHB nakon 24 sata izloženosti, pri čemu je za 3-hloro DHHB EC₅₀ vrednost iznosila $0,89 \pm 0,025$ mg/l ($p < 0,001$; u poređenju EC₅₀ za DHHB $1,42 \pm 0,021$). Toksični efekti 3-hloro DHHB-a su bili čak i viši nakon 48 sati izloženosti sa EC₅₀ vrednostima od $0,38 \pm 0,031$ mg/l i statistički značajnom razlikom kada se porede sa EC₅₀ vrednostima nakon 24 sata izloženosti ($p < 0,001$). U oba slučaja, nakon 24 i nakon 48 sati izloženosti, 3-hloro DHHB se pokazao kao biološki potentniji nego 5-hloro DHHB ($p < 0,001$).

Tabela 9. Rezultati testova toksičnosti na vodeni organizam *Daphnia magna*

Uzorak br.	Naziv uzorka	EC ₅₀ (24 h) mg/l	EC ₅₀ (48h) mg/l
1	DHHB	$1,42 \pm 0,021$	$0,44 \pm 0,030$
3	3-Cl DHHB	$0,89 \pm 0,025$	$0,38 \pm 0,031$
4	5-Cl DHHB	$1,03 \pm 0,021$	$0,53 \pm 0,030$



Slika 48. Broj nepokretnih dafnija nakon 24 i 48 h izloženosti A) DHHB; B) 3-hloro DHHB i C) 5-hloro-DHHB.

5.5.4. Usporedni testovi toksičnosti na dafnije, mikroalge i fotobakterije

Imobilizacija dafnija i promjenjen rast mikroalgi su uzeti kao mera potencijalnog toksičnog efekta UV filtera na određeni test organizam. Poređene su EC₅₀ (IC₅₀) vrednosti vodenih organizama izloženih različitim benzofenonskim UV filtrima (Tabela 10).

Tabela 10. Toksikološki podaci koji se odnose na UV filter DHHB i njegove hlorovane proizvode testirane na *Vibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* i *Daphnia magna*

Jedinjenje mg/l	DHHB (analitički standard)	3-hloro DHHB	5-hloro DHHB
<i>Vibrio fischeri</i> EC₂₀ (30 min)	0,96 ± 0,011	0,83 ± 0,014 (* vs. DHHB)	0,85 ± 0,011 (*vs. DHHB)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> EC₅₀ (72 h)	0,01 ± 0,001	0,12 ± 0,004 (*** vs. DHHB i 5-hloro DHHB)	0,18 ± 0,004 (*** vs. DHHB)
<i>Daphnia magna</i> EC₅₀ (24 h)	1,42 ± 0,021	0,89 ± 0,025 (*** vs. DHHB i 5-hloro DHHB)	1,03 ± 0,021 (*** vs. DHHB)
EC₅₀ (48 h)	0,44 ± 0,030	0,38 ± 0,031 (*** vs. 5-hloro DHHB)	0,53 ± 0,030 (* vs. DHHB)

Statistički značaj: p<0,05 = *; p<0,01 = **; p<0,001 = ***

Skraćenice: EC₂₀ i EC₅₀ – koncentracije pri kojima se ispoljava 20%, odnosno 50% maksimalnog efekta;

Utvrđeno je da DHHB ima najizraženiji efekat na *D. magna* nakon 48 sati izloženosti u poređenju sa drugim testiranim UV filtrima pod istim uslovima ekspozicije. Međutim, ovaj efekat je još izraženiji kod hlorovanih proizvoda DHHB UV filtra. U slučaju planktonskih algi, testirane vrste organizama nisu iste kao u našoj studiji. Ipak, može se uočiti da DHHB ima slično inhibitorno dejstvo na rast algi kao i BP3 UV filter nakon 72 h

ekspozicije (EC_{50} vrednost za DHHB je 0,01 mg/l, a za BP3 0,014 mg/l). Međutim, oba ova UV filtra su toksičnija od BP4 (>10 mg/l). Vezivanjem hlora u reakciji elektrofilne supstitucije na benzofenonski, odnosno fenolni prsteni DHHB UV filtra, smanjuju se toksični efekti na alge, što se može videti iz izračunatih EC_{50} vrednosti za 3-hloro DHHB i 5-hloro DHHB (0,12 i 0,18 mg/l).

Četrnaest parova EC_{50} vrednosti (u opsegu koncentracija od 2,35-706,54 mg/l) za benzofenonske UV filtre procenjeno je pre i posle procesa hlorovanja kako bi se odredilo u kojoj meri se na taj način menja njihov nivo toksičnosti. Primećeno je da, uglavnom, nema značajnih promena ili značajnog smanjenja: samo je kod BP4 uočeno značajno povećanje toksičnosti (*Tabela 11*).

Mnogi radovi pokazuju da je toksičnost hlorovanih organskih jedinjenja dobijenih u procesu hlorovanja veća nego toksičnost polaznog jedinjenja (Hu *et al.*, 2002a; 2002b; 2003; 2006). Ovi radovi pokazuju sumnju da toksičnost može poticati od nekog od hlorovanih proizvoda. U literaturi je zabeleženo da hlorovanjem benzofenona može doći do značajnog povećanja ili do smanjenja toksičnosti, ali takođe ne mora da dođe do promene toksičnih efekata. Promena toksikološkog efekta benzofenona nakon hlorinacije zavisi od njihove molekulske strukture, tj. pozicije, broja i tipa supstituenata, kao i stepena transformacije (Liu *et al.*, 2014). Sklonost transformaciji prekursora predstavlja suštinski faktor za promenu toksičnosti tokom tretmana hlorinacije. U ovom radu, takođe je pretpostavljeno da proces hlorovanja može da uzrokuje promene toksičnosti DHHB UV filtra. Nepromenjena toksičnost nakon hlorovanja, kao što je slučaj sa DHHB UV filtrom i njegovim hlorovanim proizvodima testiranim na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri*, može se pripisati ili niskom nivou transformacije početnog jedinjenja ili sličnom toksikološkom efektu hlorovanog proizvoda i njegovog prekursora. U nekim slučajevima, nepromenjena toksičnost nakon procesa hlorovanja može takođe biti rezultat stvaranja novih netoksičnih molekula, kao što su sirćetna ili mravlja kiselina, ili čak manjih molekula kao rezultat cepanja aromatičnog prstena fenola (Michalowicz *et al.*, 2007).

Tabela 11: Pregled prethodno publikovanih ekotoksikoloških radova na temu uticaja benzofenonskih i srodnih UV filtera i njihovih hlorovanih derivata na dafnije, mikroalge i fotobakterije. Mereni odgovori organizma: imobilizacija, rast i reprodukcija (koncentracija pri polovini maksimalnog efekta – EC_{50} ; koncentracija pri polovini maksimalnog inhibitorskog dejstva – IC_{50})

Model organizam	Dužina izloženosti/Završna tačka testa	Koncentracija analita	UV filter ili DBP	Efekti	Reference
Microcrustacean					
<i>Daphnia magna</i>	24 h/imobilizacija	0,63-10 mg/l	BP3	$EC_{10} = 1,24 \text{ mg/l}$	Sieratowicz <i>et al.</i> , 2011.
		0,001-1000 mg/l	DHBP	$EC_{50} = 24 \text{ mg/l}$	Chen <i>et al.</i> , 2002.
		0,01-1 mg/l	DHHB	$EC_{50} = 1,42 \text{ mg/l}$	Rezultati ovog rada
	48h/imobilizacija	0,625-10 mg/l	BP3	$EC_{50} = 1,9 \text{ mg/l}$	Fent <i>et al.</i> , 2010.
		0,63-10 mg/l	BP3	$EC_{50} = 1,67 \text{ mg/l}$	Sieratowicz <i>et al.</i> , 2011.
		0,5-20 mg/l	BP1	$EC_{50} = 7,9 \text{ mg/l}$	Li, 2011.
		0,001-1000 mg/l	DHBP	$EC_{50} = 12 \text{ mg/l}$	Chen <i>et al.</i> , 2002.
		1-70 mg/l	BP4	$EC_{50} = 50 \text{ mg/l}$	Fent <i>et al.</i> , 2010.
		0,01-1 mg/l	DHHB	$EC_{50} = 0,44 \text{ mg/l}$	Rezultati ovog rada

Tabela 11. Nastavak

Microalgae					
<i>Isochryis galbana</i>	72 h/rast	5-15 µg/l	BP3	EC ₅₀ = 13,87 µg/l	Parades <i>et al.</i> , 2014.
<i>Scendesmus vacuolatus</i>	24 h/reprodukcija	7–1740 µg/l	BP3	IC ₅₀ = 0,36 mg/l	Rodil <i>et al.</i> , 2009.
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72 h/rast	0,06-1,0 mg/l	BP3	IC ₅₀ = 0,56 mg/l	Sieratowicz <i>et al.</i> , 2011.
<i>Isochryis galbana</i>	72 h/rast	5-15 µg/l	BP4	EC ₅₀ = >10 mg/l	Parades <i>et al.</i> , 2014.
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 h/rast	0,01-1,0 mg/l	DHBB	EC ₅₀ = 0,01 mg/l	<i>Rezultati ovog rada</i>

Tabela 11. Nastavak

Chlorinated by-products					
<i>Vibrio fischeri</i> (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)	30 min/preživeli	0,0039-1 mg/l	DHHB	EC ₂₀ = 0,96 mg/l	Rezultati ovog rada
			3-hloro DHHB	EC ₂₀ = 0,83 mg/l	
			5-hloro DHHB	EC ₂₀ = 0,85 mg/l	
<i>Daphnia magna</i>	24 h/imobilizacija	0,01-2 mg/l	3-hloro DHHB	EC ₅₀ = 0,89 mg/l	
			5-hloro DHHB	EC ₅₀ = 1,03 mg/l	
	48 h/imobilizacija	0,01-2 mg/l	3-hloro DHHB	EC ₅₀ = 0,38 mg/l	
			5-hloro DHHB	EC ₅₀ = 0,53 mg/l	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 h/rast	0,01-1 mg/l	3-hloro DHHB	EC ₅₀ = 0,12 mg/l	
			5-hloro DHHB	EC ₅₀ = 0,18 mg/l	
<i>Vibrio fischeri</i> (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)	15 min/preživeli	0-800 mg/l	BP4	EC ₅₀ = 700 mg/l	Liu et al., 2014.
			hloro BP4	EC ₅₀ = 440 mg/l	

Sa druge strane, toksičnost hlorovanih proizvoda DHHB UV filtra (tj. 3-hloro DHHB) je mnogo veća u poređenju sa njihovim prekursorom kada se testira na test organizam *Daphnia magna*. Slično je u slučaju povećanja toksičnosti BP4 nakon procesa hlorovanja u eksperimentu sa *Vibrio fischeri* (Liu *et al.*, 2014). Takve toksikološke promene mogu se pripisati prirodi supstituenta i efektu koji oni imaju na ukupnu reaktivnost molekula. Ovo je takođe u saglasnosti sa stanovištem da uvođenje atoma hlora u molekul dovodi do povećanja akutne toksičnosti (Li, 2011). Međutim, prema nekim literaturnim podacima (Liu *et al.*, 2014) toksičnost većine benzofenonskih UV filtera smanjuje se nakon procesa hlorovanja, što se obično objašnjava strukturnim razlikama koje uzrokuju različite mehanizme transformacije. Ovakva niža toksičnost hlorovanih dezinfekcionih proizvoda takođe je zabeležena i u ovom istraživanju. Inhibitorski efekat na rast algi je jači u slučaju kada su one izložene DHHB UV filtru nego njegovim hlorovanim dezinfekcionim proizvodima. Razlike između DHHB UV filtra i njegovog hlorovanog proizvoda, 3-hloro DHHB, mogu se pripisati transformacionoj aktivnosti prekursora nakon hlorovanja. U ovom istraživanju, mnogo je verovatnije da je različit toksični potencijal između DHHB UV filtra i njegovog hloro proizvoda uzrokovan specifičnim odgovorom na određenu vrstu (*species-specific*) svakog od testiranih model organizama.

Pored toga, razmatrajući hemijske osobine nekih transformacionih proizvoda, može se pretpostaviti da se veći toksični efekat može aktivirati pod prirodnim uslovima životne sredine. Podaci o akutnoj toksičnosti benzofenona mogu da se odnose na uslove čiste vode ili simulirane dezinfekcione uslove, međutim, posebni slučajevi povećane toksičnosti, kao i specifičan odgovor različitih organizama na određeni UV filter potvrđuju potrebu za dodatnim istraživanjima (Liu *et al.*, 2014).

Uporedni prikaz toksikoloških podataka predstavljen u ovom radu pokazuje da se toksični potencijal benzofenonskih UV filte

ra vezuje za: a) razlike u vrsti, odnosno strukturi UV filtra (kao polaznog jedinjenja); b) promenu efekta nakon hlorovanja (promena molekulske strukture); i c) specifične efekte vrste/specie (vrsta organizma).

6. ZAKLJUČCI

U okviru ovog rada ispitivana je stabilnost i toksičnost tri UV filtra benzofenonskog tipa, DHHB, BP3 i BP4 i njihovih transformacionih proizvoda u prisustvu hlora u vodenoj sredini. S obzirom da je DHHB UV filter relativno nov na tržištu i podataka o njegovoj transformaciji u životnoj sredini i ekotoksičnosti ima jako malo, on je bio glavni predmet ovog rada, a pored njega ispitivani su i BP3 i BP4 kao najčešće korišćeni benzofenonski UV filtri.

Dezinfekcioni uslovi koji vladaju u bazenima i sličnim vodenim sistemima simulirani su u laboratoriji dodatkom natrijum hipohlorita ili trihloroizocijanurne kiseline u rastvore ispitivanih UV filtera na sobnoj temperaturi i pri neutralnoj pH vrednosti. Eksperimenti su pokazali da je reakcija sa hlorom gotovo trenutna i ireverzibilna u slučaju sva tri UV filtra.

Praćenjem reakcije DHHB UV filtra sa različitim koncentracijama NaOCl utvrđeno je da se kao glavni transformacioni put dešava zamena vodonikovog atoma atomom hlora u reakciji elektrofilne aromatične supstitucije, pri čemu kao proizvod nastaje 3-hloro DHHB. Istovremeno se formira i proizvod P1, za koji se pretpostavlja da nastaje hlorovanjem fenolnog prstena sa simultanom eliminacijom etil grupe sa susednog azotovog atoma. Mehanizam nastanka proizvoda P1 izgleda prihvatljiv, iako će biti potreban dodatni rad da razjasni ovaj mehanizam u više detalja. U višku dezinfekcionog sredstva 3-hloro DHHB podleže daljem procesu hlorovanja pri čemu nastaje dihlora proizvod, 3,5-diCl DHHB.

U procesu hlorovanja BP3 i BP4 UV filtra u neutralnoj vodenoj sredini sa trihloroizocijanurnom kiselinom nastaju isti proizvodi, 5Cl-BP3 i 3,5-diCl-BP3. S obzirom da BP4 UV filter u svojoj strukturi sadrži sulfonsku grupu, njegovi hlorovani proizvodi zavise od pH vrednosti. U baznoj sredini kao glavni proizvod nastaje 3,5-diCl-BP3, 5Cl-BP3 nastaje u tragovima, a u kiselim uslovima se 3Cl-BP4 javlja kao proizvod.

Rezultati ispitivanja fotostabilnosti BP3, BP4 i DHHB UV filtra i njihovih hlorovanih proizvoda pokazali su da su ova jedinjenja prilično stabilna pod dejstvom UVA

zračenja. Izuzetak je 3,5-diCl-BP3, koji se pokazao kao najmanje stabilno jedinjenje. Degradacioni proizvod koji je u ovom procesu nastao, nažalost, nije identifikovan. To predstavlja izazov i cilj za neka buduća istraživanja. Uzimajući u obzir činjenicu da je 3,5-diCl-BP3 glavni proizvod u procesu hlorovanja BP3 i BP4 UV filtera, to može imati negativne posledice po životnu sredinu.

Rezultati ispitivanja toksičnosti DHHB UV filtra i njegovih hlorovanih proizvoda na luminescentnoj bakteriji *Vibrio fischeri* pokazali su da DHHB UV filter vrednost EC_{20} iznosi $0,96 \pm 0,011$ mg/l, za 3-Cl DHHB $0,83 \pm 0,014$ mg/l, a za 5-Cl DHHB $0,85 \pm 0,011$ mg/l.) Rezultati su pokazali da nakon procesa hlorovanja ne dolazi do promene toksičnosti DHHB UV filtra. Ispitivana je i toksičnost BP3 i BP4 UV filtra na luminescentnoj bakteriji *V. fischeri*. Rezultati su pokazali da je BP4 UV filter nije toksičan za bakteriju *Vibrio fischeri* i EC_{50} vrednost nakon 30 minuta ekspozicije iznosi 301 mg/l. BP3 UV filter i njegov proizvod 5Cl-BP3 nisu toksični pri niskim koncentracijama, a njihov efekat na ovu bakteriju nije bilo moguće odrediti pri višim koncentracijama zbog slabe rastvorljivosti ovih jedinjenja u vodi.

Slatkovodna mikroalga *Pseudokirchneriella subcapitata* je pokazala značajno veću osetljivost na prisustvo DHHB UV filtra ($EC_{50} = 0,01 \pm 0,001$ mg/l) nego na njegove hlorovane proizvode. S druge strane, na vodenog račića *Daphnia magna* veći efekat su imali hlorovani proizvodi, posebno 3-hloro DHHB nakon 24 sata ekspozicije i nakon 48 h ekspozicije. U oba slučaja je toksičnost 3-Cl DHHB veća od toksičnosti 5-Cl DHHB. Generalno, na alge je više uticalo prisustvo DHHB UV filtra, dok su dafnije uglavnom osetljive na dejstvo 3-Cl DHHB.

Uporednom studijom o toksičnosti različitih benzofenonskih UV filtera, utvrđeno je da DHHB ima najizraženiji efekat na *D. magna* nakon 48 sati izloženosti u poređenju sa drugim testiranim UV filtrima pod istim uslovima ekspozicije. Međutim, ovaj efekat je još izraženiji kod hlorovanih proizvoda DHHB UV filtra. U slučaju planktonskih algi, testirane vrste organizama nisu iste kao u našoj studiji. Ipak, može se uočiti da DHHB ima slično inhibitorno dejstvo na rast algi kao i BP3 UV filter nakon 72 h ekspozicije (EC_{50} vrednost

za DHHB je 0,01 mg/l, a za BP3 0,014 mg/l). Međutim, oba ova UV filtra su toksičnija od BP4 (>10 mg/l).

Dezinfekcija bazenskih voda korišćenjem različitih hlornih agenasa je najčešći način održavanja visokog kvaliteta vode. Zbog ovoga je važno vršiti ne samo uopštenu kontrolu bazenskih voda, kako je propisano zakonom, već bi trebalo uzeti u razmatranje i kontrolu specifičnih jedinjenja, kao što su UV filtri i njihovi hlorovani proizvodi. Rezultati ovog rada pokazali su da su neki od UV filtera nađeni u životnoj sredini u relativno visokim koncentracijama (npr. BP3 0,3 µg/l i 1,7 µg/l), ali njihovi hlorovani proizvodi u još većim (3,5-diCl-BP3 6,6 µg/l). Podaci o ekotoksičnosti dobijeni u ovom radu takođe ukazuju da ispitivana jedinjenja imaju značajan uticaj na vodene organizme. Osim toga, iako je pokazano da je većina ispitivanih jedinjenja stabilna pod dejstvom UV zračenja, treba imati na umu da su ti rezultati dobijeni u laboratorijskim uslovima. Međutim, u kompleksnom okruženju, kakvi su prirodni vodeni sistemi ili bazenska voda, mnogi faktori mogu da utiču na fotohemiju organskih jedinjenja i u reakcijama fotodegradacije mogu nastati i druge štetne komponente, često toksičnije od svojih polaznih jedinjenja.

Kako upotreba proizvoda za ličnu negu raste, rašće i potreba za daljim istraživanjem transformacionih procesa i toksičnih efekata UV filtera i njihovih proizvoda koji se formiraju u životnoj sredini kako bi se naučno procenio njihov potencijalni ekološki rizik.

7. LITERATURA

Adema, D.M.M., 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59, 125-134.

Alexander, P., 1991. Ultrafine Titanium dioxide makes the grade. *Manufacturing Chemist*, 62, 21–23.

Anderson, W.C., Loehr, R.C., Smith, B.P., 1999. Environmental availability of chlorinated organics, explosives, and metals in soils. Annapolis, MD, USA. *American Academy of Environmental Engineers*, str. 206.

Aruoja, V., 2011. Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* in environmental hazard evaluation of the chemicals and synthetic nanoparticles. A Thesis for applying for the degree of doctor of philosophz in environmental protection. Estonija.

Australian therapeutic goods legislation, Therapeutic Goods Act 1989, Australian regulatory guidelines for sunscreens (ARGS), Standard AS/NZS 2604:2012.

Balmer, M.E., Buser, H.R., Muller M.D., Poiger, T., 2005. Occurence of some organic UV filters in wastewater, in surface water, and in fish from Swiss Lakes. *Environmental Science and Technology* 39, 953-962.

Barysch, M.J., Hofbauer, G.F., and Dummer, R., 2010. Vitamin D, ultraviolet exposure, and skin cancer in the elderly. *Gerontology*, 56, 410-413.

Bedner, M., MacCrehen, W.A., 2006. Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-benzoquinone and *N*-acety-*p*-benzoquinone imine. *Environmental Science and Technology*, 40, 516-522.

Blüthgen, N., Meili, N., Chew, G., Odermatt, A., Fent, K., 2014. Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 476–477, 207–217.

Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82, 1518–1532.

Brenner, M., Hearing, V.J., 2008. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84, 539–549.

Buser, H.R., Balmer, M.E., Schmid, P., Kohler, M., 2006. Occurrence of UV filter 4-methylbenzylidene camfor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology*, 40, 1427-1431.

Butt, S. T., Christensen, T., 2000. Toxicity and phototoxicity of chemical sun Filters. *Radiation Protection Dosimetry*, 91, 283–286.

Chen, M.-Y., Ike, M., Fujita, M., 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*, 17, 80–86.

Cosmetics Directive, 2009. Annex VI: list of UV filters allowed in cosmetic products in Europe. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (web: http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.results&annex_v2=VI&search).

Couteau, C., Faure, A., Fortin, J., Paparis, E., Coiffard, L.J.M., 2007. Study of the photostability of 18 sunscreens in creams by measuring the SPF in vitro. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 270–273.

Crista, D.M.A., Miranda, M.S., da Silva, J.C.G.E., 2015. Degradation in chlorinated water of the UV filter 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane present in commercial sunscreens. *Environmental Technology*, 36, 1319-1326.

Cuderman, P., Heath, E., 2007. Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1343–1350.

Díaz-Cruz, M.S., Gago-Ferrero, P., Lorca, M., Barceló, D., 2012. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 2325–2333.

Díaz-Cruz, M.S., Lorca, M., Barcelo, D., 2008. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 27, 873-887.

Díaz-Cruz, S., Barceló, D.M., 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 28, 708–717.

Dr. Dennis Kunkel Microscopy, Inc./Visuals Unlimited, Inc. (<http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000EnVts1cNFa0>).

Duirk, S.E., Bridenstine, D.R., Leslie, D.C., 2013. Reaction of benzophenone UV filters in the presence of aqueous chlorine: Kinetics and chloroform formation. *Water Research*, 47, 579–587.

Durand, L., Habran, N., Henschel, V., Amighi, K., 2009. In vitro evaluation of the cutaneous penetration of sprayable sunscreen emulsions with high concentrations of UV filters. *International Journal of Cosmetic Science*, 31, 279–292.

Eaton, A.D., Franson, M.A.H., 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: Centennial 21th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1368.

EPA, 2012. EPI Suite TM. EPA's Office of Pollution Prevention Toxics and Syracuse Research Corporation (SRC), United States.

EU, 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Union Communities* 32–53.

EU, 2009. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, Official journal of European Union. Annex VI: List of UV filters allowed in cosmetic products.

Felix, T., Hall, B.J., Brodbelt, J.S., 1998. Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadropole ion trap GC-MS. *Analytica Chimica Acta*, 371, 195-203.

Fent, K., Kunz, P.Y., Zenker, A., Rapp, M., 2010. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Marine Environmental Research*, 69, S4–S6.

Fitch, W.L., He, L., Tu, Y.-P., Alexandrova, L., 2007. Application of polarity switching in the identification of the metabolites of RO9237. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1661–1668.

Fitzpatrick, T.B., 1988. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Archives of Dermatology*, 124, 869-871.

Florentin, A., Hautemanière, A., Hertemann, P., 2011. Health effects of disinfection by-products in chlorinated swimming pools. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 461-469.

French, J.E., 1992. NTP technical report on toxicity studies of 2-hidroksi-4-metoksi benzofenon (CAS No. 131-57-7) administered topically and in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicity report series*, 21, 1-14.

Gago-Ferrero, P., Badia-Fabregat, M., Olivares, A., Pina, B., Blanques, P., 2012. Evaluation of fungal- and photo-degradation as potential treatments for the removal of sunscreens BP3 and BP1. *Science of Total Environment*, 427-428, 355-363.

Gago-Ferrero, P., Diaz-Cruz, M.S., Barcelo, D., 2011. Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plant. *Chemosphere*, 84, 1158-1165.

Gago-Ferrero, P., Mastroianni, N., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2013. Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1294, 106–116.

Gao, L., Yuan, T., Zhou, C., Cheng, P., Bai, Q., Ao, J., Wang, W., Zhang, H., 2013. Effects of four commonly used UV filters on the growth, cell viability and oxidative stress responses of the *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*, 93, 2507–2513.

Giokas, D.L., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., 2004. Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–photodiode array detection and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1026, 289–293.

Giokas, D.L., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., Lambropoulou, D.A., 2005. Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography–mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction. *Journal of Chromatography A*, 1077, 19–27.

Giokas, D.L., Salvador, A., Chisvert, A., 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 26, 360–374.

Girard, P.M., Francesconi, S., Pozzebon, M., Graindorge, D., Rochette, P., Drouin, R., Sage, E., 2011. UVA-induced damage to DNA and proteins: direct versus indirect photochemical processes. *Journal of Physics*, 261, 1–10.

Gong, P., Yuan, H., Zhai, P., Dong, W., Li, H., 2015. Degradation of organic ultraviolet filter diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate in aqueous solution by UV/H₂O₂. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 10189–10195.

Grabicova, K., Fedorova, G., Burkina, V., Steinbach, C., Schmidt-Posthaus, H., Zlabek, V., Kocour Kroupova, H., Grabic, R., Randak, T., 2013. Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96, 41–47.

Hany, J., Nagel, R., 1995. Nachweis von UV-filter substanzen in muttermilch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 91, 341–345.

Hassner, A., Alexanian, V., 1978. Direct room temperature esterification of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, 46, 4475–4478.

Hernando, M.D., De Vettori, S., Martínez Bueno, M.J., Fernández-Alba, A.R., 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*, 68, 724-730.

Hindák, F., 1977. Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae). I - Biologické Práce, 23/4, 192 pp., Veda, Bratislava.

Hindák, F., 1990. Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae). V - Biologické práce, 36, 228pp, Veda, Bratislava.

<http://eur-lex.europa.eu/legal>

content/EN/TXT/?qid=1471600079724&uri=CELEX:32009R1223

http://www.basf.com/group/corporate/en_GB/investor-relations/strategy/customers/uvinul-a-plus

<http://www.eucerin.bg/about-skin/basic-skin-knowledge/skin-structure-and-function>

<http://www.myskinrecipes.com/shop/chemical-sunscreen/998-tris-biphenyl-triazine-nano.html>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia magna](https://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia_magna)

Hu, J.Y., Aizawa, T., Ookubo, S., 2002a. Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environmental Science and Technology*, 36, 1980–1987.

Hu, J.Y., Cheng, S., Aizawa, T., Terao, Y., Kunikane, S., 2003. Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their activities. *Environmental Science and Technology*, 37, 5665–5670.

Hu, J.Y., Jin, X., Kunikane, S., Terao, Y., Aizawa, T., 2006. Transformation of pyrene in aqueous chlorination in the presence and absence of bromide ion: kinetics, products and their aryl hydrocarbon receptor-mediated activities. *Environmental Science and Technology*, 40, 487–493.

Hu, J.Y., Tu, Y.-P., Jiang, K., Pan, Y., 2010. Intramolecular charge transfer in the gas phase : Fragmentation of protonated sulfonamides in mass spectrometry. *The Journal of Organic Chemistry*, 75, 4244-4250.

Hu, J.Y., Xie, G.H., Aizawa, T., 2002b. Products of aqueous chlorination of 4-nonylphenol and their estrogenic activity. *Environmental Science and Technology*, 21, 2034–2039.

ISO (International Organisation for Standardization) 6341, Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Geneva, Switzerland, 2012.

ISO 10706, Water quality – determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea), International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2000.

ISO 11348-2, Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 2: Method using liquid-dried bacteria, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2007.

ISO 2000, Erythema referenceaction spectrum and standard erythema dose. Corrected and reprinted 2000-11-15, reference number ISO 17166:1999(E), SIE S 007/E-1998, 2000.

ISO 6341, Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2012.

ISO 8692, Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2012.

Ivry, G.B., Ogle, C.A., Shim, E.K., 2006. Role of sun exposure in melanoma. *Dermatologic Surgery*, 32, 481-492.

Jansen, R., Osterwalder, U., Wang, S.Q., Burnett, M., Lim, H.W., 2013. Photoprotection: part II. Sunscreen: development, efficacy, and controversies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69, (867-881).

Japanese standard for cosmetics ingredients, Yakuji Nippo Ltd., Tokyo, Japan, 1985.

Jeon, H.K., Chung Y., Ryu, J.C., 2006. Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1131, 192–202.

Jurado, A., Gago-Ferrero, P., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Pujades, E., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2014. Urban groundwater contamination by residues of UV filters. *Journal of Hazardous Materials*, 271, 141–149.

Kaiser, D., Sieratowicz, A., Zielke, H., Oetken, M., Hollert, H., Oehlmann, J., 2012. Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution*, 163, 84-90.

Kalister, K., Dolenc, D., Sarakha, M., Polyakova, O.V., Lebedev, A.T., Trebše, P., 2016. Chromatography/mass spectrometry in the study of aquatic chlorination of UV filter avobenzene. *Mass-spektrometria*, 14, 1-10.

Kameda, Y., Kimura, K., Miyazaki, M., 2011. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution*, 159, 1570-1576.

Karni, M., Mandelbaum, A., 1980. *Organic Mass Spectrometry*, 15, 53.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, 43, 363–380.

Katayama, A., Bhula, R., Burns, G.R., Carazo, E., Felsot, A., Hamilton, D., Harris, C., Kim, Y.H., Kleter, G., Koedel, W., Linders, J., Peijnenburg, J.G., Sabljic, A., Stephenson,

R.G., Racke, D.K., Rubin, B., Tanaka, K., Unsworth, J., Wauchope, R.D., 2010. Bioavailability of xenobiotics in the soil environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 203, 1-86.

Kim, S., Choi, K., 2014b. Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: a mini-review. *Environment International*, 70, 143–157.

Kim, S., Jung, D., Kho, Y., Choi, K., 2014a. Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)—a two generation exposure study. *Aquatic Toxicology*, 155, 244–252.

Kockler, J., Oelgemöller, M., Robertson, S., Glass, B.D., 2012. Photostability of sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology. C: Photochemistry Reviews*, 13, 91–110.

Kollias, N., Baqer, A., Razi Naqvi, K., 1986. Fiber optic spectrophotometer for noninvasive transmission and diffuser election studies. *Spectroscopy letters*, 9, 149-150

Korshikov, O.A., 1953. Pidklas Protokokovi (Protococcineae Bakyol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales). *Viznacnik prisnovodnihk vodorostey Ukrainyskoi RSR*. Kiev, Akademii Nauk Ukrainiskoy SSR, Kiev 5: 1-489.

Lambropoulou, D.A., Giokas, D.L., Sakkas, V.A., Albanis, T.A. , Karayannis, M.I., 2002. Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-*p*-aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 967, 243–253.

Lautenschlager, S., Wulf, H. C., and Pittelkow, M. R., 2007. Photoprotection. *Lancet*, 370, 528-537.

Lavtižar, V., 2014. Environmental stability and toxicity assessment of chlorantraniliprole and its derivatives. Doktorska disertacija, Nova Gorica, Univerzitet u Novoj Gorici, str. 21.

Le Fur, C., Legeret, B., de Sainte Claire, P., Wong Wah Chung, P., Sarakha, M., 2013. Liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the analysis of sulfaquinoxaline byproducts formed in water upon solar light irradiation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, 722-730.

Lebedev, A.T. *Mass spectrometry in organic chemistry*. Moscow, Binom (Rus). 2003, str. 503.

Lebedev, A.T., 2007. Mass spectrometry in the study of mechanism of aquatic chlorination of organic substrates. *European Journal of Mass Spectrometry* 13, 51-56.

Lebedev, A.T., 2013. Environmental mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6, 163-89.

Li, M.-H., 2011. Acute toxicity of benzophenone-type UV filters and paraben preservatives to freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94, 566-573.

Liu, H., Liu, L., Xiong, Y., Yang, X., Luan, T., 2010. Simultaneous determination of UV filters and polycyclic musks in aqueous samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6747–6753.

Liu, Q., Chen, Z., Wei, D., Du, Y., 2014. Acute toxicity formation potential of benzophenone-type UV filters in chlorination disinfection process. *Journal of Environmental Science*, 26, 440–447.

Lund, L.P., Timmins, G.S., 2007. Melanoma, long wavelength ultraviolet and sunscreens: Controversies and potential resolutions. *Pharmacology and Therapeutics*, 114, 198-207.

Maier, T., Korting, H.C., 2005. Sunscreens - Which and what for? *Skin Pharmacology and Physiology*, 18, 253-262.

Manaia, E.B., Kiatkoski Kaminski, R.C., Corrêa, M.A., Chiavacci, L.A., 2013. Inorganic UV filters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 201-209.

Michałowicz, J., Duda, W., Stufka-Olczyk, J., 2007. Transformation of phenol, catechol, guaiacol and syringol exposed to sodium hypochlorite. *Chemosphere*, 66, 657–663.

Moeder, M., Schrader, S., Winkler, U., Rodil, R., 2010. At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography–mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2925–2932.

Morabito, K.; Shapley, N.C.; Steeley, K.G.; Tripathi, A., 2011. Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection. *International Journal of Cosmetic Science*, 33, 385-390.

Morys, M., Berger, D.S., 1993. The accurate measurements of biologically effective ultraviolet radiation. *Atmospheric Radiation*, 2049, 152-161.

Moyal, D.D., Fourtanier, A.M., 2008. Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet–simulated radiation and natural sunlight–induced immunosuppression in human beings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58, 149–154.

Nakajima, M., Kawakami, T., Niino, T., Takahashi, Y., Onodera, S., 2009. Aquatic fate of sunscreen agents octyl-4-methoxycinnamate and octyl-4-dimethylaminobenzoate in model swimming pools and the mutagenic assays of their chlorination byproducts. *Journal of Health Science*, 55, 363-372.

Negreira, N., Canosa, P., Rodriguez, I., Ramil, M., Rubi, E., Cela, R., 2008. Study of some UV filters stability in chlorinated water and identification of halogenated by-products by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1178, 206-214.

Nohynek, G. J. and Schaefer, H., 2001. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33, 285–99.

Norval, M., Wulf, H. C., 2009. Does chronic sunscreen use reduce vitamin D production to insufficient levels? *British Journal of Dermatology*, 161, 732-736.

Nyeborg, M., Pissavini, M., Lemasson, Y., Doucet, O., 2010. Validation of HPLC method for the simultaneous and quantitative determination of 12 UV-filters in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 32, 47–53.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 1998. OECD guideline for testing of chemicals - *Daphnia magna*, Reproduction test. OECD 211. OECD, Paris, France.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 2004. OECD guideline for testing of chemicals - *Daphnia* sp., Acute immobilisation test. OECD 202. OECD, Paris, France.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 2006. OECD Guideline for the testing of chemicals, Alga, Growth inhibition test. OECD 201, Paris, France.

Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J.B., Beiras, R., 2014. Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. *Chemosphere*, 104, 44–50.

Parrish, A.J., Jaenicke, K.R., Sderon, R.R., 1982. Erythema and melanogenesis action spektra of normal human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 36, 187-191,

Patel, S.V., Patel, M.P., Patel, R.G., 2005. Synthesis and Characterization of bromoquinazolinone Substituted Spiro(isobenzofuran-1,9'-xanthene)-3-ones, *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2, 3, 220–225.

Pathak, A.M., Fanselow, D.L., 1983. Photobiology of melanin pigmentation: Dose response of skin to sunlight and its contents. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 9, 724-733,

Pathak, M.A., 1986. Topical and systematic approaches for the prevention of acute and chronic sun-induced skin reactions. *Dermatologic Clinics*, 4, 321-334.

Pedrouzo, M., Borrull, F., Marce, R.M., Pocurull, E., 2011. Analytical methods for personal-care products in environmental waters, *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 749-760.

Phillips, S.J., 2004. The role of federal programs in the transfer of biomedical technology. *Artificial Organs*, 28, 432-436.

Poiger, T., Buser, H.R., Balmer, M.E., Bergqvist, P.A., Müller, M.D., 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere*, 55, 63–951.

Pontolillo J., Eganhouse R.P. 2001. The search for reliable aqueous solubility (Sw) and octanol-water partition coefficient (Kow) data for hydrophobic organic compounds: DDT and DDE as a case study. U.S. Geological Survey. *Water Resources Investigations Report* 01-4201.

Ponzo, O.J., Silvia, C., 2013. Evidence of reproductive disruption associated with neuroendocrine changes induced by UV-B filters, phtalates and nonylphenol during sexual maturation in rats of both gender. *Toxicology*, 311, 41–51.

Printz, H., 1914. Kristianiatraktens Protococcoideer. Videnskabselskapets skrifter. I. Den Matematisk-naturvitenskapelige Klasse 1913, 6.

Ramos, S., Homem, V., Alves, A., Santos, L., 2015. Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment — a review. *Science of the Total Environment*, 526, 278–311.

Reicharth, J., 2008. Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer. Landes bioscience and Springer science + Business media, LLC.

Richardson, S., 2012. Environmnetal mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 84, 747-778.

Richardson, S.D., 2011. Disinfection By-Products: Formation and Occurrence in Drinking Water. *Encyclopedia of Environmental Health*, 110-136.

Richardson, S.D., Ternes, T.A., 2011. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, 83, 4614–4648.

Rodil, R., Moeder, M., 2008. Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179, 81–88.

Rodil, R., Moeder, M., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M., 2009a. Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1513–1524.

Rodil, R., Quintana, J.B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., 2012. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, 86, 1040–1049.

Rodil, R., Schrader, S., Moeder, M., 2009b. Non-porous membrane-assisted liquid–liquid extraction of UV filter compounds from water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4887–4894.

Román, I.P., Chisvert, A., Canals, A., 2011. Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography–mass spectrometry for UV-filter determination in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2467–2475.

Sakkas, V.A., Giokas, D.L., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2003. Aqueous photolysis of the sunscreen agent octyl-dimethyl-*p*-aminobenzoic acid. Formation of disinfection byproducts in chlorinated swimming pool water. *Journal of Chromatography A*, 1016, 211–222.

Santos, A.J.M., Miranda, M.S., Esteves da Silva, J.C.G., 2012. The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions. *Water Research*, 46, 3167–3176.

Sayre, M.R., Desrochers, D.L., Wilson, C.J., Marlowe, E., 1981. Skin type, minimal erythral dose (MED) and sunlight acclimatization. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 5, 439–443,

Sayre, R.M., Dowdy, J.C., Gerwig, A.J., Shields, W.J., Lloyd, R.V., 2005. Unexpected photolysis of the sunscreen octinoxate in the presence of the sunscreen avobenzone. *Photochemistry and Photobiology*, 81, 452–456.

Sayre, R.M., Kollias, N., Roberts, R.L., Baqer, A., Sadiq, I., 1990. Physical Sunscreens. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 41, 103–109.

Schaefer, H., Moyal, D., Fourtanier, A., 2000. State of the art sunscreens for prevention of photodermatoses. *Journal of Dermatological Science*, 23, S62–S74.

Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schauen, M., Blaudschun, R., Wenk, J., 1997. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biological Chemistry*, 378, 1247–1257.

Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerkl, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., Faass, O., Stutz, E., Jarry, H., Wuttke, W., Lichtensteiger, W., 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - an update. *Toxicology*, 205, 113–122.

Schmitt, C., Oetken, M., Dittberner, O., Wagner, M., Oehlmann, J., 2008. Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Pollution*, 152, 322–329.

Schreurs, R.H.M.M., Sonneveld, E., Jansen, J.H.J., Seinen, W., van der Burg, B., 2005. Interaction of Polycyclic Musks and UV Filters with the Estrogen Receptor (ER), Androgen Receptor (AR), and Progesterone Receptor (PR) in Reporter Gene Bioassays. *Toxicological Science*, 83, 264–272.

Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta*, 360, 794–802.

Serpone, N., Salinaro, A., Emeline, A., Horikoshi, S., Hidakab, H., Zhaoc, J., 2002. An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of

commercial sunscreen lotions and their chemical UVB/UVA active agents. *Photochemical and Photobiological Science*, 1, 970.

Shaath, N.A., 1987. On the theory of ultraviolet absorption by sunscreen chemicals. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 82, 193-207.

Shaath, N.A., 2010. Ultraviolet filters. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9, 464-469.

Shaydullina, G.M., Sinikova, N.A., Harchevnikova, N.V., Lebedev, A.T., 2004. GC-MS comparison of the behavior of chlorine and sodium hypochlorite towards organic compounds dissolved in water, *Water Research*, 38, 3713-3718.

Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M., Oehlmann, J., 2011. Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 46, 1311–1319.

Službeni list SFRJ, br. 26/83, 61/84, 56/86, 50/89 i 18/91. „Pravilnik o uslovima u pogledu zdravstvene ispravnosti predmeta opšte upotrebe koji se mogu stavljati u promet“.

Sobek, A., Bejgarn, S., Rudén, C., Molander, L., c, 2013. In the shadow of the Cosmetic Directive — inconsistencies in EU environmental hazard classification requirements for UV-filters. *Science of the Total Environment*, 461–462, 706–711.

Soehnge, H., Ouhtit, A. i Ananthaswamy, H.N., 1997. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Frontiers in Bioscience*, 2, 538-551.

Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S., 2005. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, 9-17.

SZO (WHO) 2006. Guidelines for safe recreational waters. Volume 2. Swimming pools and similar recreational-water environments. WHO, Geneve, p. 118.

Tarazona, I., Chisvert, A., León, Z., Salvador, A., 2010. Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid–liquid

microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4771–4778.

Trebše, P., Polyakova, O.V., Baranova, M., Bavcon Kralj, M., Dolenc, D., Sarakha, M., Kutin, A., Lebedev, A.T., 2016. Transformation of avobenzone in conditions of aquatic chlorination and UV-irradiation. *Water Research*, 101, 95-102.

Tsui, M.M., Leung, H.W., Wai, T.C., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., Lam, P.K., Murphy, M.B., 2014. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Research*, 67c, 55–65.

Urbach, F., 2001. The historical aspects of sunscreens. *Journal of Photochemistry B*, 64, 99-104.

US Food and drug administration, Department of health and human services, 21 CFR, Parts 310, 352, 700 and 740, RIN 0910-AA01, Federal Register (1999) 27666.

van Gestel, C.A.M., 2012. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. *ZooKeys*, 176, 275-296.

Venditti, E., Spadoni, T., Tiano, L., Astolfi, P., Greci, L., Littarru, G.P., Damiani, E., 2008. In vitro photostability and photoprotection studies of a novel 'multi-active' UV-absorber, *Free Radical Biology & Medicine*, 45, 345–354.

Vidal, L., Chisvert, A., Canals, A., Salvador, A., 2010. Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples. *Talanta*, 81, 549–555.

Vielhaber, G., Grether-Beck, S., Koch, O., Johncockb, W., Krutmann, J., 2006. Sunscreens with an absorption maximum of ≥ 360 nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1, and interleukin-6 in human dermal fibroblasts. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5, 275–282.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 1996. Principles of ecotoxicology. London, Taylor & Francis, 321.

Wang, S.Q., Balagula, Y., Osterwalder, U., 2010. Photoprotection: a Review of the Current and Future Technologies. *Dermatologic Therapy*, 23, 31-47.

Weisbrod, C.J., Kunz, P.Y., Zenker, A.K., Fent, K., 2007. Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225, 255–266.

Wick, A., Fink, G., Ternes, T.A., 2010. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2088–2103.

Wille, K., De Brabander, H.F., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., Vanhaecke, L., 2012. Coupled chromatographic and mass spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 35, 87-108.

Wu, J.-W., Chen, H.-C., Ding, W.-H., 2013. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction plus simultaneous silylation for rapid determination of salicylate and benzophenone-type ultraviolet filters in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1302, 20–27.

Xiao, M., Wei, D., Yin, J., Wei, G., Du, Y., 2013. Transformation mechanism of benzophenone-4 in free chlorine promoted chlorination disinfection. *Water Research*, 47, 6223-6233.

Xu, G., Huang, T., Zhang, J., Huang, J.K., Carlson, T., Miao, S., 2010. Investigation of collision-induced dissociations involving odd-electron ion formation under positive electrospray ionization conditions using accurate mass. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 321-327.

Yamamoto, T., Nakajima, D., Goto, S., Onodera, S., Yasuhara, A., Sakai, S., Soma, M., 2004. Mutagenecy of chlorinated products of benzophenones and its derivatives. *Journal of Environmental Chemistry* 14, 335-342.

Ye, L., Liu, J., Yang, X., Peng, Y., Xu, L., 2011. Orthogonal array design for the optimization of ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction of benzophenone-type UV filters. *Journal of Separation Science*, 34, 700–706.

Zeiger, E., Anderson, B., Hawort, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., 1987. Salmonella mutagenicity test: III. Results from the testing of 255 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 9, 61-109.

Zenker, A., Schmutz, H., Fent, K., 2008. Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 1202, 64-74.

Zhang, Z., Ren, N., Li, Y.F., Kunisue, T., Gao, D., Kannan, K., 2011. Determination of Benzotriazole and Benzophenone UV Filters in Sediment and Sewage Sludge. *Environmental Science and Technology*, 45, 3909-3916.

Žabar, R., Dolenc, D., Jerman, T., Franko, M., Trebše, P., 2011. Photolytic and photocatalytic degradation of 6-chloronicotinic acid. *Chemosphere*, 85, 861–868.

Prilog A.

Redni broj	Identifikacija supstance				Uslovi			Napomena za uslove upotrebe i čuvanja
	Hemijski naziv/INN/XAN	Univerzalni naziv	CAS broj	EC broj	Tip proizvoda	Maksimalna koncentracija u preparatu spremnom za upotrebu	Ostalo	
a	b	c	d	e	f	g	h	i
1	4-Aminobenzoeva kiselina	PABA	150-13-0	205-753-0		5 %		
2	<i>N,N,N</i> -Trimetil-4-(2-oksoborn-3-ilidenmetil) aniliniyum metil sulfat	Kamfor benzalkonijum metosulfat	52793-97-2	258-19 -8		6 %		
3	Benzoeva kiselina, 2-hidroksi- 3,3,5-trimetilcikloheksil estar/Homosalate	Homosalate	118-56-9	204-260-8		10 %		
4	2-Hidroksi-4-metoksibenzofenon/Oksibenzon***	Benzofenon-3	131-57-7	205-031-5		10 %		Sadrži benzofenon
5	Moved or deleted							
6	2-Fenilbenzimidazol-5-sulfonska kiselina i njene kalijum, natrijum i trietanolamin soli/Ensulizole	Fenilbenzimidazol Sulfonska Kiselina	27503-81-7	248-502-0		8 %(kao kiselina)		
7	3,3'-(1,4-Fenilendimetilen) bis(7,7-dimetil-2-oksobiciklo-[2.2.1]hept-1-il-metanesu fonic kiselina) i njene soli/ECamsule	Tereftaliliden Dikamfor Sulfonska Kiselina	92761-26-7, 90457-82-2	410-960-6		10 %(kao kiselina)		
8	1-(4-tert-Butilfenil)-3-(4-metoksifenil)propan-1,3-dione/Avobenzon**	Butil Metoksidibenzoilmetan	70356-09-1	274-581-6		5 %		
9	alfa-(2-Oksoborn-3-iliden)-toluen-4-sulfonska kiselina i njene soli	Benziliden Camfor Sulfonska Kiselina	56039-58-8			6 % (kao kiselina)		
10	2-Ciano-3,3-difenil akrilik kiselina, 2-etilheksil estar/Oktokrilen**	Oktokrilen	6197-30-4	228-250-8		10 %(kao kiselina)		
11	Polimer od N-[(2 i 4)-(2-oksoborn-3-iliden) metil-	Poliacrilamidometil Benziliden Camfor	113783-61-2			6 %		
12	2-Etilheksil 4-metoksicinamat/Oktinoksat***	Etilheksil Metoksicinamat	5466-77-3	0		10 %		
13	Etoksilisani etil-4-aminobenzoat	PEG-25 PABA	116242-27-4			10 %		
14	Isopentil-4-methoksicinnamat/Amiloxate***	Isoamil <i>p</i> -Metoksicinnamat	71617-10-2	275-702-5		10 %		

Opasni za životnu sredinu = **; Veoma opasni za životnu sredinu = ***

Prilog A. (nastavak)

15	2,4,6-Trianiin-(p-karbo-2'-etilheksil-1'-oxy)-1,3,5-triazin**	Etilheksil Triazon	88122-99-0	402-070-1		5 %		
16	Fenol,2-(2H-benzotriazol-2-il)-4-metil-6-(2-metil-3- (1,3,3,3-tetrametil-1-(trimetilsilil)oksi)- disiloksanil)propil)	Drometrizol Trisiloksan	155633-54-8			15%		
17	Benzoeva kiselina, 4,4-((6-(((4-(((1,1-dimetiletil)amino)karbonil)fenil)amino)-1,3,5- triazin-2,4-diil)diimino)bis-, bis (2-etilheksil) estar/Iskotrizinol (USAN)	Dietilheksil Butamido Triazon	154702-15-5			10%		
18	3-(4-Metilbenziliden)-d1 kamfor/Enzacamen***	4-Metilbenziliden Kamfor	38102-62-4/	-/253-242-6		4%		
19	3-Benziliden kamfor	3-Benziliden Kamfor	15087-24-8	239-139-9		2 %		
20	2-Etilheksil salicilat/Octisalat**	Etilheksil Salicilat	118-60-5	204-263-4		5 %		
21	2-Etilheksil 4-(dimetilamino)benzoate/Padimat O (USAN: BAN)	Etilheksil Dimetil PABA	21245-02-3	244-289-3		8%		
22	2-Hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kiselina i njene soli/Sulisobenzon	Benzofenon-4, Benzofenon-5	4065-45-6/ 6628-37-1	223-772-2/-		5 % (kao kiselina)		
23	2,2'-Metilen-bis(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3- tetrametil-butil)fenol) / Bisotrizol**	Metilen Bis- Benzotriazolil Tet- rametilbutilfenol	103597-45-1	403-800-1		10%		
24	Natrijumova so of 2,2'-bis(1,4-fenilen)-1H-benzimidazol-4,6-disulfonska kiselina) / Bisdisulizol diso- dium (USAN)	Dinatrijum Fenil Dibenzimidazol Tetrasulfonat	180898-37-7	429-750-0		10 % (kao kiselina)		
25	2,2'-(6-(4-Metoksifenil)-1,3,5-triazine-2,4-diil)bis(5- ((2-etilheksil)oksi)fenol) / Bemotrizinol	Bis-Etilheksiloksifenol Metoksifenil Triazin	187393-00-6			10%		
26	Dimetikodietilbenzalmalonat**	Polisilikon-15	207574-74-1	426-000-4		10%		
27	Titanijum dioksid**	Titanijum Dioksid	13463-67-7/ 1317-70-0/ 1317-80-2	236-675-5/ 205-280-1/ 215-282-2		25%		
28	Benzoeva kiselina, 2-[4-(dietilamino)-2-hidroksibenzoil]-heksilestar**	Dietilamino Hidroksibenzoil Heksil Benzoat	302776-68-7	443-860-6		10 % u proizvodima za sunčanje		

Opasni za životnu sredinu = **; Veoma opasni za životnu sredinu = ***

Klasifikacija prema toksičnosti za organizme u vodi

R50

Organizam	Ekspozicija (h)	Kriterijum	Koncentracija (mg/L)
Ribe	96	EC-50	< 1
Dafnije	48	EC-50	< 1
Alge	72	IC-50	< 1

veoma toksičan

R51

Ribe	96	EC-50	> 1 - < 10
Dafnije	48	EC-50	> 1 - < 10
Alge	72	IC-50	> 1 - < 10

toksičan

R52

Ribe	96	EC-50	> 10 - < 100
Dafnije	48	EC-50	> 10 - < 100
Alge	72	IC-50	> 10 - < 100

štetan

BIOGRAFSKI PODACI

Gorica (Dmitra) Veselinović, rođena Grbović, rođena je 12.11.1985. godine u Priboju, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju, prirodno-matematički smer.

Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer – diplomirani hemičar za životnu sredinu, upisala je 2004. godine i diplomirala septembra 2010. godine na temu „Triaromatični steroidi u naftama“ sa ocenom 10 i ukupnom prosečnom ocenom 8,59. Iste, 2010. godine, upisala je doktorske studije, smer – doktor hemijskih nauka, na istom fakultetu.

Kao istraživač pripravnik Centra za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, zaposlila se januara 2011. godine, a od marta 2014. radi kao istraživač saradnik. Angažovana je na nacionalnom projektu broj 176006, pod nazivom „Geohemijsko ispitivanje sedimenata – fosilna goriva i zagađivači životne sredine“.

Provela je osam meseci na stručnom usavršavanju na Univerzitetu u Novoj Gorici, Republika Slovenija, gde se bavila naučno-istraživačkim radom. Iz te saradnje proistekla su tri rada M kategorije, kao i nekoliko usmenih i posterskih saopštenja na međunarodnim i konferencijama od nacionalnog značaja.

Bila je angažovana u nastavi hemije na Hemijskom fakultetu kao asistent na vežbama Hemija voda i otpadnih voda i Industrijska hemija, kao i u radu sa studentima prilikom izrade završnih i master radova.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Gorica Veselinović
broj indeksa DH 04/2010

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje stabilnosti i toksičnost UV filtera benzofenonskog tipa i njihovih transformacionih proizvoda u prisustvu hlora u vodenoj sredini“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.12.2016.

Gorica Veselinović

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske
verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora: Gorica Veselinović

Broj indeksa: DH 04/2010

Studijski program: Doktor hemijskih nauka

Naslov rada: „Ispitivanje stabilnosti i toksičnost UV filtera benzofenonskog tipa i njihovih transformacionih proizvoda u prisustvu hlora u vodenoj sredini“

Mentori: dr Branimir Jovančičević i dr Polonca Trebše

Potpisana: Gorica Veselinović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.12.2016.

Gorica Veselinović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ispitivanje stabilnosti i toksičnost UV filtera benzofenonskog tipa i njihovih transformacionih proizvoda u prisustvu hlora u vodenoj sredini“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.12.2016.

