

Marta GMUREK, Stanisław LEDAKOWICZ

e-mail: marta.gmurek@p.lodz.pl

Katedra Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Ocena toksyczności benzyloparabenu przed i po rozkładzie fotochemicznym

Wstęp

Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że wiele substancji chemicznych, zarówno naturalnych jak i syntetycznych, może mieć wpływ na zdrowie zwierząt i ludzi poprzez zakłócanie normalnego funkcjonowania gruczołów wydzielania wewnętrznego [Vos i in., 2000]. Substancje te są nazywane ksenoestrogenami EDCs (*Endocrine Disrupting Compounds*). Należą do nich m.in. związki cynoorganiczne, parabeny, alkilofenole i fenole, a także hormony naturalne i sterydy syntetyczne, niektóre farmaceutyki, składniki środków higieny osobistej i kosmetyków, detergenty [Esplugas i in., 2007]. Są to zatem preparaty powszechnie używane w życiu codziennym, a przez to bez przeszkód trafiające do ścieków. Ponieważ są najczęściej trudno biodegradowalne, grozi to ich kumulacją i wystąpieniem nieodwracalnych zmian w przyrodzie. Ksenoestrogeny są szkodliwe, ponieważ posiadają długi czas rozpadu, wykazują zdolność do bioakumulacji w organizmach żywych, w wyniku, czego łatwo wchodzi w łańcuch troficzny. Skutki środowiskowe oraz zdrowotne działania ksenoestrogenów zostały obszernie zbadane [Orlando i Gullette, 2007], a do najważniejszych zaliczyć można m.in.: nieprawidłowy poziom hormonów, maskulinizację osobników żeńskich, feminizację osobników męskich, a w konsekwencji obojętność i zmniejszenie płodności.

Badania porównujące podobieństwo budowy związków z grupą alkilohydroksybenzoosową do alkilofenoli znanych związków estrogennych, potwierdziły, że parabeny są estrogenami. Bardziej przestrzenna grupa alkilowa potęguje lipofilowy/hydrofobowy charakter, a także wpływa na skuteczniejsze łączenie się z estrogenicznymi receptorami. Im dłuższy łańcuch tym większe działanie estrogenne [Routledge i in., 1998]. Pomimo iż w latach 90. poprzedniego wieku badania wskazywały na bezpieczeństwo stosowania parabenów przy nieprzekraczaniu dziennej dawki, to dopiero niepokojące wieści przyniosła publikacja Darbre'a i in. [2003]. Parabeny są umieszczone na Europejskiej liście związków priorytetowych w kategorii 1. jako substancje o udowodnionym działaniu na układ hormonalny [DHI Water & Environment, 2007]. Testy na działanie estrogenne wykazały, że parabeny mają mniejszą moc estrogenną od 17 β -estradiolu. Badania dowiodły że benzyloparaben ma największą moc estrogenową ze wszystkich parabenów. Wykazano, że benzyloparaben (YES test, $EC_{50} = 0,351 \text{ mg dm}^{-3}$) posiada zbliżoną estrogenność do Bisfenolu A (YES test, $EC_{50} = 0,342 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) [Beck i in., 2006; Bazin i in., 2010]. W wyniku działania estrogenowego benzyloparaben jest podejrzewany o udział w rozwoju raka piersi [Darbre i in., 2003; Darbre i in., 2004; Cashman i Warsaw, 2012; Barr i in., 2012].

Badania toksyczności i estrogenności wykazały, że benzyloparaben jest najbardziej szkodliwy ze wszystkich parabenów [Bazin i in., 2010]. Benzyloparaben wykazuje również wysoką toksyczność ostrą wobec bakterii *Vibrio fischeri*, zielonych alg- *Pseudokirchneriella subcapitata*, oraz wobec japońskiej medaki - *Oryzias latipes* (Tab.1).

W ściekach wypływających z oczyszczalni benzyloparaben został wykryty w stężeniu 0,01-0,26 $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w Hiszpanii i Kanadzie, natomiast w Szwecji w stężeniu 1 $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [Yamamoto i in., 2007b]. Wielokrotnie jednak stężenie tego ksenoestrogenu znajdowało się poniżej progu detekcji [Yamamoto i in., 2007b]. Badania potwierdzają, że nawet w tak niskich stężeniach ksenoestrogeny mogą ingerować w pracę organów wydzielania wewnętrznego [Esplugas i in., 2007, Yamamoto i in., 2007a].

Tab.1. Toksyczność benzyloparabenu [Bazin i in., 2010; Yamamoto i in., 2011]

	<i>Daphnia magna</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<i>Oryzias latipes</i>	YES test
EC_{50} $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	30 (48 h)	0,11 (15 min.)	1,2 (72 h)	0,73 (LC_{50} , 96 h)	0,351

Obszerny i wciąż rosnący zbiór dowodów naukowych potwierdza szkodliwość związków chemicznych takich jak, benzyloparaben dla gatunków żyjących w środowisku naturalnym. Istnieje uzasadniona obawa, że chemikalia te przyczyniają się do zwiększenia liczby dolegliwości związanych z układem immunologicznym, nerwowym i przede wszystkim rozrodczym.

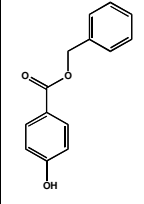
Celem przedstawionej pracy było zbadanie wpływu procesu fotosensybilizowanego utleniania na toksyczność benzyloparabenu.

Badania doświadczalne

Materiały

Benzyloparaben (czystość $\geq 98,0\%$, BeP, Tab. 2) i 5,10,15,20-Tetrafenylporfiryra (TPP) zakupiono w firmie Fluka. Odczynniki wykorzystane do sporządzenia buforów (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaOH , H_3PO_4 cz.d.a.) nabyto w firmie POCh.

Tab.2. Charakterystyka fizykochemiczna benzyloparabenu

	CAS no.C	94-18-8
	Wzór ogólny	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$
	Masa cząsteczkowa	228,25
	pK_a	8,18
	Temperatura topnienia $^{\circ}\text{C}$	111
	$\text{Log } K_{ow}$	3,61
	Rozpuszczalność w wodzie [$\text{g}/100\text{ml}$]	0,01 (25 $^{\circ}\text{C}$) 0,05 (80 $^{\circ}\text{C}$)

Aparatura i metodyka

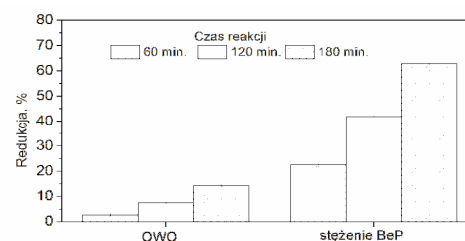
Badania prowadzono w układzie półprzepływowym w pięciu reaktorach ($0,01 \text{ dm}^3$) płytowych umieszczonych wokół lampy (100W, XBO OFR, Osram). Zanik substancji obserwowano przy zastosowaniu analizy chromatograficznej HPLC (Waters, kolumna NovaPack C18; 3,9 mm x 15 mm). Proces fotosensybilizowanego utleniania prowadzono w układzie heterogenicznym z zastosowaniem nanowłókny poliuretanowej z immobilizowanym fotosensybilizatorem (TPP). Szczegóły prowadzonych doświadczeń przedstawiono w pracach Gmurek i in. [2012; 2015].

Badania toksyczności roztworów przed i po reakcyjnych wykonano stosując test ToxTrak™ (HACH) przy użyciu metody 10017 [ToxTrak™ Toxicity Test].

Analizę zawartości ogólnego węgla organicznego (OWO) oraz jego spadek w trakcie procesu fotosensybilizowanego utleniania przeprowadzono w ramach badań wstępnych. Badane próbki zostały zanalizowane po czasie trwania procesu równego 60 min, 120 min oraz 180 min. w środowisku zasadowym przy zastosowaniu natężenia promieniowania $E_0 = 3,34 \cdot 10^{20}$ kwantów $\cdot \text{s}^{-1} \text{ dm}^{-3}$.

Wyniki i dyskusja

Jak widać na rys. 1 redukcja OWO po pierwszej godzinie naświetlania wynosiła 2,7%, podczas gdy stężenie BeP zmalało o 22,5%.

Rys.1. Ubytek OWO i stężenia BeP podczas trwania reakcji., $C^0_{\text{BeP}} = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{OWO}^0 = 69,15 \text{ ppm}$

Z biegiem czasu ubytek OWO wzrastał. Można zatem stwierdzić że reakcja BeP z tlenem singletowym w środowisku zasadowym prowadzi do częściowej mineralizacji, przy nie całkowitym usunięciu związków z roztworu.

W kolejnym etapie prac skupiono się na zbadaniu toksyczności powstających produktów rozkładu. Badania toksyczności związków przed i po 180 min. reakcji przeprowadzono w oparciu o metodę kolorymetryczną przy zastosowaniu testu *ToxTrak*TM (HACH) zawierającego resazurynę. Jako organizm testowy posłużył szczep bakterii *Escherichia coli*.

Testy *ToxTrak*TM opierają swoje działanie na procesach metabolicznych bakterii, które w środowisku resazuryny utleniając glukozę prowadzą do redukcji resazuryny. Redukcja resazuryny jest związana ze zmianą barwy. Resazuryna w formie niezredukowanej ma barwę niebieską, przy udziale bakterii ulega redukcji pod wpływem dehydrogenaz komórkowych do różowej rezorufiny. Substancje, które są toksyczne dla bakterii hamują ich metabolizm, a tym samym maleje szybkość redukcji resazuryny. To hamowanie redukcji resazuryny przyjęto jako wskaźnik toksyczności w teście *ToxTrak*TM.

Początkową i końcową absorbancję analizowano przy zastosowaniu spektrofotometru firmy HACH. Każdą próbkę zawierającą ksenoestrogen przed lub po procesie przygotowano w czterech seriach, porównywano z próbką kontrolną, którą dla zweryfikowania testu nie zawierała badanego związku. Takie porównanie pozwala na wyznaczenie tła inhibicji w określonych warunkach, w których próbka została przygotowana, a następnie poprawnego obliczenia inhibicji metabolizmu *E. coli*. Procent inhibicji został obliczony według wzoru:

$$\% \text{ Inhibicji} = \left[1 - \frac{\Delta A_{\text{próbki}}}{\Delta A_{\text{kontrola}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

gdzie:

$$\Delta A_{\text{próbki}} = \Delta A_{\text{kontrola}} - \Delta A_{\text{początek}}$$

Według producenta procent inhibicji powyżej 10% i poniżej -10% w obecności związku toksycznego uważa się za toksyczny. Wyniki pomiędzy -10% a 10% wskazują na brak toksyczności wobec bakterii. Obecność lub brak takiej tendencji w czterech powtórzeniach sprawdza się w celu wyeliminowania błędów pomiarowych. Przyjmuje się, że jeżeli w trzech powtórzeniach występuje taka sama zależność, to można określić, czy badany związek jest lub nie jest toksyczny.

Na rys. 2 przedstawiono toksyczność roztworów reakcyjnych przed i po 180 min. fotodegradacji. Na podstawie przeprowadzonych testów można stwierdzić, iż roztwór reakcyjny zawierający BeP przed procesem fotosensybilizowanego utleniania wykazuje silną toksyczność wobec bakterii *E. coli*. Natomiast po 180 min. prowadzenia procesu, toksyczność mieszaniny reakcyjnej znajdowała się w nietoksycznym zakresie (czyli wartości inhibicji mieściły się w przedziale od -10% do +10%). Sugeruje to, iż produkty transformacji BeP powstałe w wyniku reakcji z tlenem singletowym znacząco zmniejszają inhibicję bakterii *E. coli* po 180 min. procesu i mogą prawdopodobnie być bardziej podatne na proces biodegradacji.

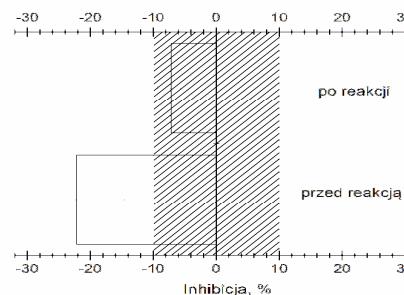
Wnioski

Po 180 min. prowadzenia procesu fotosensybilizowanego utleniania BeP można zaobserwować, że pomimo iż redukcja tych związków nie wynosiła 100%, to toksyczność roztworu reakcyjnego znacznie zmalała.

Na podstawie proponowanej metodyki (*ToxTrak*TM) można stwierdzić, że rozkład BeP przy zastosowaniu jako utleniacza tlenu singletowego prowadzi do powstania nietoksycznych produktów reakcji względem bakterii *E. coli*.

LITERATURA

- Barr, L., Metaxas, G., Harbach, C.A.J., Savoy, L.A., Darbre, P.D., 2012. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *J. Appl. Toxicol.*, **32**, 219-232. DOI: 10.1002/jat.1786
- Bazin, I., Gadal, A., Touraud, E., Roig, B., 2010. Hydroxy benzoate preservatives (Parabens) in the environment: data for environmental toxicity assessment. *Environ. Pollut.*, **16**, 245-257. DOI 10.1007/978-90-481-3509-7



Rys.2. Toksyczność BeP przed i po 180 min. reakcji.

- Beck I.C., Bruhn R., Gandrass J., 2006. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*, **63**, 1870-187. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.10.022
- Cashman, A.L., Warsaw, E. M., 2005. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis.*, **16**, 57-66. DOI: 10.2310/6620.2005.05008
- Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., Pope, G.S., 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.*, **24**, 5-13. DOI: 10.1002/jat.958
- Darbre, P.D., Byford, J.R., Shaw, L.E., Hall, S., Coldham N.G., Pope, G.S., Sauer, M.J., 2003. Oestrogenic activity of benzylparaben. *J. Appl. Toxicol.*, **23**, 43-51. DOI: 10.1002/jat.886
- DHI Water & Environment, 2007. *Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. Revised report to DG Environment.* ENV.D.4/ETU/2005/0028r (04.2015): http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/final_report_2007.pdf
- Espuglas, S., Bila, D.M., Krause, L.G.T., Dezotti, M., 2007. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J. Hazard. Mater.*, **149** (3), 631-642. DOI:10.1016/j.jhazmat.2007.07.073
- Gmurek M., Bizukojć M., Mosinger J., Ledakowicz S., 2015. Application of photoactive electrospun nanofiber materials with immobilized meso-tetraphenylporphyrin for parabens photodegradation. *Catal. Today*, **240**, 160-167. DOI:10.1016/j.cattod.2014.06.015
- Gmurek M., Mosinger J., Miller J.S., 2012. 2-Chlorophenol photooxidation using immobilized meso-tetraphenylporphyrin in polyurethane nanofabrics. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 1422 - 1427. DOI: 10.1039/c2pp25010a
- Orlando, E.F., Guillette, L.J.JR., 2007. Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. *Environ. Res.*, **104**, 163-173. DOI:10.1016/j.envres.2006.06.002
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **153**, 12-19. DOI:10.1006/taap.1998.8544
- ToxTrak*TM Toxicity Test (10.2014) <http://www.hach.com>
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I., Vethaak, A. D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.*, **30**(1), 71-133. DOI: 10.1080/10408440091159176
- Yamamoto, H., Tamura, I., Hirata, Y., Kato, J., Kagota, K., Katsuki, S., Yamamoto A., Kagami, Y., Tatarazako, N., 2011. Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach. *Sci Total Environ.*, **410-411**, 102-111. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.040
- Yamamoto, H., Watanabe, M., Hirata, Y., Nakamura, Y., Nakamura, Y., Kitani, C., Sekizawa, J., Uchoda, M., Nakamura, H., Kagami, Y., Koshio, M., Hirai, N., Tatarazako, N., 2007a. Preliminary ecological risk assessment of butylparaben and benzylparaben - 1. Removal efficiency in wastewater treatment, acute/chronic toxicity for aquatic organisms, and effect on Medaka gene expression. *Environ. Sci.*, **14**, Suppl.73-87. PMID:18382416
- Yamamoto, H., Watanabe, M., Katsuki, S., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Sekizawa, J., 2007b. Preliminary ecological risk assessment of butylparaben and benzylparaben - 2. Fate and partitioning in aquatic environments. *Environ. Sci.*, **14**, Suppl. 97-105. PMID:18382418

Badania realizowano w ramach Funduszu Małych Grantów Programu Polsko-Norweska Współpraca Badawcza, nr grantu Pol-Nor/206867/107/2015.

Marta Gmurek dziękuje „Fundacji na rzecz Nauki Polskiej” za wsparcie w ramach Stypendium START.