

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Badania zależności pomiędzy strukturą chemiczną wybranych związków fenolowych, występujących w surowcach żywnościowych oraz ich soli a ich podatnością na biodegradację

MARIOLA SAMSONOWICZ¹, MARZENA MATEJCZYK², MARTA TROC¹

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, WYDZIAŁ BUDOWNICTWA I INŻYNIERII ŚRODOWISKA,
¹ZAKŁAD CHEMII, ²ZAKŁAD BIOLOGII SANITARNEJ I BIOTECHNOLOGII

Słowa kluczowe: fenolokwasy, struktura molekularna, biodegradacja

STRESZCZENIE

W ostatnich latach związki polifenolowe zyskują coraz większe zainteresowanie konsumentów i wytwórców żywności. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują na prozdrowotne efekty spożywania żywności bogatej w polifenole przede wszystkim ze względu na ich właściwości przeciwutleniające i przeciwrodnikowe. Do tej grupy związków należą hydroksylowe pochodne kwasu benzoowego. W pracy przedstawiono badania podatności na biodegradację soli wybranych fenolokwasów, różniących się ilością oraz położeniem grup hydroksylowych w cząsteczce oraz toksyczność ostrą w stosunku do wybranych organizmów wskaźnikowych. Stopień biodegradacji oceniano na podstawie redukcji wskaźników zanieczyszczeń tj. RWO i BZT. Określono strukturę analizowanych związków posługując się metodami spektroskopowymi (UV-VIS, FT-IR) oraz teoretycznymi obliczeniami kwantowo-mechanicznymi.

Study on the correlation between chemical structure of selected phenolic compounds, present in raw foods, and their salts and their biodegradability

Keywords: phenolic acids in food, molecular structure, biodegradability

ABSTRACT

Nowadays phenols are compounds of an increasing interest of costumers and food producers. Results of epidemiological researches indicate a health promoting effect of eating foods rich in polyphenols, mainly due to their anti-free radicals and antioxidant properties. Hydroxyl derivatives of benzoic acid belong to this group of compounds. In this paper investigations of biodegradability and the acute toxicity toward indicator organisms of selected phenolic acids differing in the number and location of hydroxyl groups in the molecule and their salts were presented. The degree of biodegradation was determined based on reduction of pollution indicators such as DOC and BOD. The molecular structures of studied compounds were determined by spectroscopic method (UV-VIS, FT-IR) and using quantum-mechanical calculations.

1. WPROWADZENIE

Kwasy fenolowe są bardzo ważnymi składnikami produktów spożywczych pochodzenia roślinnego. Stanowią one liczną grupę substancji, które są metabolitami wtórnymi roślin. Zainteresowanie tymi związkami spowodowane jest ich właściwościami antyutleniającymi i przeciwrodnikowymi. Mechanizm ich działania polega między innymi na wychwytywaniu i unieszkodliwianiu wolnych rodników, przerywaniu łańcuchowych reakcji rodnikowych, przekształcaniu rodników w związki o mniejszej reaktywności, wiązaniu jonów metali ciężkich, pobudzaniu niektórych enzymów uczestniczących w niszczeniu substancji toksycznych. Znane są również właściwości bakterio- i grzybobójcze kwasów fenolowych [1].

Oprócz posiadania wartości odżywczych i antyoksydacyjnych, związki fenolowe wpływają na właściwości sensoryczne żywności, takie jak smak, zapach czy barwa.

Kwasy te są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym, a ich obecność w roślinie zależy np. od jej gatunku, okresu wegetacji czy sposobu uprawy. Występują zarówno w owocach jak i warzywach. Ponadto są obecne w produktach pochodzenia roślinnego, np. w oliwie z oliwek czy białym winie. [2]

Terminem „związek fenolowy” określa się cząsteczki posiadające w swoim składzie pierścień benzenowy, w którym co najmniej jeden atom wodoru podstawiony jest grupą hydroksylową. Związki te mogą być zakwalifikowane do różnych grup ze względu na ilość pierścieni fenolowych w cząsteczce i inne elementy strukturalne, które wiążą te pierścienie ze sobą. Proste kwasy fenolowe są zwykle pochodnymi kwasu benzoowego lub cynamonowego. Występują one w roślinach w formie związanej jako składniki lignin i tanin hydrolizujących, w postaci estrów – głównie hydroksypo pochodne kwasu cynamonowego oraz glikozydów.

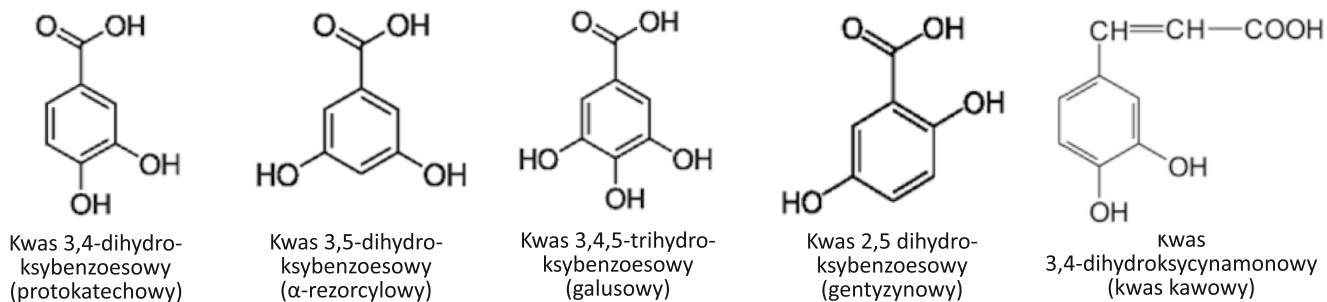
Obecnie w handlu istnieje wiele preparatów o działaniu konserwującym i dezynfekcyjnym. Jednak poszukiwanie nowych środków konserwujących jest nadal aktualne, ponieważ efektywność działania dotychczas stosowanych konserwantów jest coraz mniejsza z powodu uodparniania się drobnoustrojów na te substancje. Poza tym często wywołują one efekty uboczne, w tym nietolerancje pokarmowe i odczyny alergiczne. Szeroko stosowanym konserwantem jest kwas benzo-

esowy, który charakteryzuje się aktywnością mikrobiologiczną szczególnie w stosunku do pleśni i drożdży w pH <5,0. Fenolokwasy, pochodne kwasu benzoowego, wykazują również aktywność przeciwdrobnoustrojową [3].

Aktywność mikrobiologiczna w szerszym zakresie pH oraz brak toksycznego wpływu na organizm człowieka dałyby podstawy zastosowania tych związków jako nowych konserwantów w żywności.

Celem prowadzonych przez nas prac badawczych jest poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych, selektywnych i mniej szkodliwych dla środowiska naturalnego substancji dezynfekujących oraz konserwujących opartych na związkach naturalnie występujących w środowisku i ich solach z metalami. Każdy preparat przed wprowadzeniem na rynek musi być przebadany pod kątem wpływu na środowisko naturalne. Dlatego jednym z etapów prowadzonych przez nas badań jest ocena degradacji zsyntezowanych związków. W prezentowanej pracy badano podatność dihydroksybenzoanów, galusanów, kawianów litu, sodu i potasu na biodegradację. Wybierając w/w związki kierowano się: (1) możliwością ich praktycznego wykorzystania jako dezynfektantów ze względu na ich dobrą rozpuszczalność w wodzie, (2) dostępnością i łatwością przygotowania, (3) dużym biologicznym znaczeniem jonów sodu i potasu. Na Rysunku 1 przedstawiono wzory strukturalne kwasów, których sole analizowano w pracy.

Badania polegały na oznaczeniu podstawowych wskaźników jakości wód, to jest biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT) oraz rozpuszczonego węgla organicznego (RWO), dla roztworów soli wybranych hydroksykwasów przygotowanych przez rozcieńczenie wodą powierzchniową. BZT jest wskaźnikiem biologicznym jakości wód, ponieważ przebiega z udziałem mikroorganizmów. BZT oraz RWO stanowią źródło informacji o zawartości substancji organicznych podatnych na rozkład w określonych warunkach, zaś pomiar rozpuszczalnego węgla organicznego daje informacje o zawartości wszystkich substancji organicznych rozpuszczonych w wodzie, a więc wszystkich zanieczyszczeń zawierających węgiel organiczny. Na podstawie zarejestrowanych w zakresie UV widm badanych soli analizowano ich zawartość w badanej wodzie w trakcie trwania procesów. Za pomocą programu komputerowego Gaussian 09W [4] zoptymalizowano struktury badanych związków oraz obliczono ich ener-



Rysunek 1 Struktury chemiczne wybranych kwasów fenolowych

Figure 1 Chemical structures of the selected phenolic acids

gię i moment dipolowy, a także rozkład ładunku elektronowego w cząsteczce metodą Mullikena. Do obliczeń zastosowano metodę B3LYP z bazą 6-311++G**. Na podstawie otrzymanych danych oraz literatury określono wpływ struktury badanych soli na ich podatność na biodegradację. Dodatkowo przeprowadzono testy toksyczności ostrej badanych związków w stosunku do wybranych organizmów wskaźnikowych.

2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

2.1 Synteza badanych związków

Materiał do badań stanowiły sole kwasów: 3,4-dihydroksybenzoesowego, 3,5-dihydroksybenzoesowego, 2,5-dihydroksybenzoesowego (gentyzynowego), 3,4,5-trihydroksybenzoesowego (galusowego), 3,4-dihydroksycynamonowego oraz dla porównania kwasu benzoesowego (najprostszyszy z kwasów aromatycznych). Synteza tych związków polegała na rozpuszczeniu odpowiednich naważek badanych kwasów w roztworach wodorotlenków w ilościach stechiometrycznych. Otrzymane roztwory były ogrzewane na łaźni wodnej do całkowitego rozpuszczenia kwasów, następnie odparowane, a otrzymane osady były suszone w temperaturze 140°C.

2.2 Metodyka badań

W celu oceny wpływu badanych związków na wskaźniki zanieczyszczeń wody dodawano je w odpowiedniej ilości do wody powierzchniowej (zawierającej zestaw mikroorganizmów nieadaptowanych do rozkładu hydroksylowych pochodnych kwasu benzoesowego) wraz z pożywką, tak aby ich końcowe stężenie wynosiło 10 mg/dm³. użytą do badań wodę napowietrzano przez kilka godzin. Do oznaczania zawartości tlenu rozpuszczonego w wodzie zastosowano metodę Winklera, w której tlen rozpuszczony w wodzie utlenia

w środowisku alkalicznym wodorotlenek manganu (II) do związków manganu (IV). W kwaśnym środowisku jony Mn(IV) wydzielają z jodku potasu wolny jod w ilości równoważnej zawartości tlenu w wodzie. Jod oznacza się miareczkowo tiosiarczanem sodu wobec skrobi. Z ilości zużytego tiosiarczanu oblicza się zawartość tlenu.

Oznaczanie biochemicznego zapotrzebowania na tlen przeprowadzono wg Polskiej Normy PN-EN (ISO)1899-2. Oznaczanie biochemicznego zapotrzebowania tlenu po n dniach (BZT_n). Biochemiczne zapotrzebowanie na tlen obliczano na podstawie wartości tlenu rozpuszczonego oznaczanego w kolejnych dniach pomiarów:

$BZT = (a - b) \text{ mgO}_2 / \text{dm}^3$, gdzie a – zawartość tlenu w próbce przed inkubacją, b – po inkubacji.

Oznaczanie rozpuszczonego węgla organicznego przeprowadzono wg Polskiej Normy: PN-EN ISO 7827. W celu oznaczenia RWO zarejestrowano widma elektronowe absorpcyjne związków w nadfiolecie. Widma zostały zarejestrowane przy użyciu spektrofotometru DR/4000 firmy Hach w zakresie 300 – 190 nm, przy rozdzielczości 0,2.

Z otrzymanych widm odczytywano absorbancję przy długości fali 254 nm, i obliczano RWO na podstawie wzoru: $RWO = [(Ab_{254})^{b*} 5] / b \text{ (mgC/dm}^3\text{)}$. Widma te służyły również do analizy położenia pasm charakterystycznych dla danych związków. Wszystkie wymienione powyżej parametry były oznaczane w stałych odstępach czasowych przez okres 20 dni. Dla badanych soli na podstawie widm w zakresie UV wyznaczono analityczne długości fali i przy tych długościach mierzono absorbancję roztworów wzorcowych, w celu przygotowania krzywej wzorcowej. Następnie z krzywych wzorcowych odczytywano stężenie danego związku w próbce. Badania były wykonane 1, 9 i 16 dnia pomiarów (Rys. 5).

Na podstawie redukcji ww. wskaźników oceniano stopień ich biodegradacji.

Badanie toksyczności związków chemicznych na dafniach (rozwiłtkach), ochotkach oraz wodzieniach przeprowadzono z wykorzystaniem metody probitowej, pozwalającej określić stężenie śmiertelne dla wybranych organizmów wskaźnikowych. W tym celu wykonano dziewięć seryjnych rozcieńczeń analizowanych soli kwasów, o stężeniu wyjściowym wynoszącym 1000 mg/l (skok $q = 2$) każda, w następujący sposób: po odważeniu 0,04 g poszczególnych soli kwasów, naważki przeniesiono do kolb miarowych, do których wlało po 40 ml wody destylowanej. Po przygotowaniu roztworów podstawowych badanych związków chemicznych, wykonano rozcieńczenia wodą destylowaną, w szeregu malejących stężeń. Na szalki wlało po 20 ml z każdego przygotowanego rozcieńczenia, a następnie do każdego naczynia dodano po 10 sztuk organizmów wskaźnikowych. Próbkę kontrolną stanowiła woda destylowana bez dodatku związków chemicznych. Po upływie 24 h przeprowadzono pierwszą obserwację śmiertelności organizmów wskaźnikowych, a po upływie 48 h kolejną. Do organizmów martwych zaliczono wszystkie osobniki nie poruszające

się oraz wykazujące brak jakiegokolwiek reakcji w porównaniu do organizmów znajdujących się w próbce kontrolnej.

Badania toksyczności zostały przeprowadzone na następujących organizmach wskaźnikowych:

ochotki – larwy owadów z rodziny ochotkowatych, które są przystosowane do zamieszkiwania miejsc z ograniczoną obecnością tlenu w wodzie bądź też obszarów odznaczających się wysokim zanieczyszczeniem organicznym; *Daphnia magna* (rozwiłtka) – słodkowodny skorupiak z rodzaju stawonogów, zaliczany do grupy wioślarek;

wodzenie (*Chaoborus*) – rodzaj owadów należący do rzędu muchówek (*Diptera*), których larwy, w zależności od gatunku, zasiedlają wody stojące [5].

3. WYNIKI

3.1 Obliczenia teoretyczne

Wyniki zamieszczono w Tabeli 1.

Nie dla wszystkich struktur udało się policzyć dane teoretyczne.

Tabela 1 Momenty dipolowe, energie cząsteczki oraz sumaryczny ładunek atomowy pierścienia aromatycznego obliczone dla kwasów fenolowych i ich soli

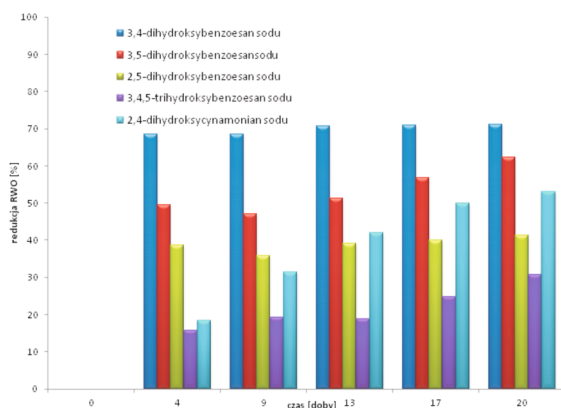
Table 1 Dipole moments and energies and summary atomic charges of aromatic ring calculated for phenolic acids and its salts

Związek		Energia [Hartree]	Moment dipolowy [D]	Sumaryczny ładunek pierścienia	ładunek na atomie węgla grupy karboksylowej
Kwas 2,4-dihydroksy benzoesowy	H	-571,44	3,7051	-0,752	0,295
	Li	-578,44	2,0970	0,11	-0,265
	Na	-733,20	4,9210	0,282	-0,409
	K	-1170,84	6,5933	-0,554	-0,08
Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy	H	-571,43	4,8634	-0,793	0,373
	Li	-578,43	1,5419	-0,169	0,022
	Na	-733,19	3,9122	-0,049	-0,086
	K	-1170,84	5,6405	-0,743	0,316
Kwas 3,4-dihydroksy benzoesowy	H	-571,43	5,9305	-0,041	-0,072
Kwas 3,4,5-trihydroksybenzoesowy	H	-646,69	0,5181	-0,426	0,233
	Li	-653,69	5,8221	0,445	-0,342
	Na	-808,45	8,7361	0,601	-0,473
	K	-1246,09	10,4739	-0,244	-0,114
Kwas 3,4-dihydroksycynamonowy	H	-648,87	6,0673	-0,59	0,145
	Li	-655,86	3,2139	0,617	-0,048
	Na	-810,63	5,1618	-0,538	0,069
	K	-1248,27	6,7030	-0,53	0,321

Energia cząsteczek analizowanych kwasów maleje w szeregu: kwas 2,4-dihydroksybenzoesowy = 2,5-dihydroksybenzoesowy = kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy > kwas 3,4,5-trihydroksybenzoesowy > 3,4-dihydroksycynamonowy. Natomiast dla soli kwasów dihydroksylowych energia jest taka sama dla wszystkich soli sodowych (-733,2) i dla soli potasowych (-1170,84). Energia układu jest największa, kiedy w miejsce wodoru w grupie karboksylowej podstawiony jest atom potasu. Momenty dipolowe mają największą wartość dla soli potasowych, dla kwasów momenty dipolowe rosną w szeregu: kwas 2,4-dihydroksybenzoesowy < kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy < 3,4,5-trihydroksybenzoesowy < kwas 3,4-benzoesowy < 2,4-dihydroksycynamonowy.

3.2 Biodegradacja

Stopień biodegradacji analizowanych związków oceniano na podstawie procentu redukcji badanych wskaźników zanieczyszczeń, co przedstawiono na Rysunkach 2 i 3.



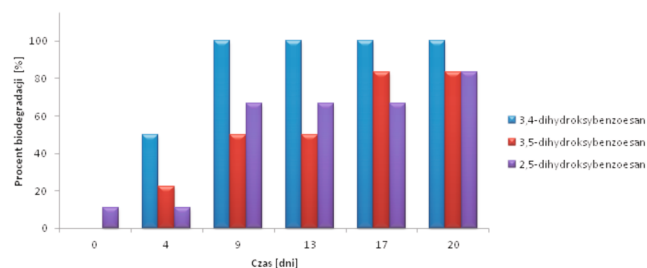
Rysunek 2 Procent redukcji RWO w zależności od czasu pomiaru dla soli sodowych

Figure 2 Percent of reduction of DOC in relationship of time for sodium salts

Tabela 2 Zestawienie wyników z biodegradacji soli wybranych hydroksykwasów

Table 2 Summary of results from biodegradation of selected hydroxy acids salts

	3,4-dihydroksybenzoesan	3,5-dihydroksybenzoesan	2,5-dihydroksybenzoesan	3,4,5-trihydroksybenzoesan	3,4-dihydroksycynamonian
Procent redukcji RWO [%]					
Li	74,3	40,1	16,4	18,1	50
Na	71,2	62,2	41,4	30,7	53
K	74,7	65	32,3	54,3	64
Procent redukcji BZT [%]					
Li	100	83,3	43,3	-	40
Na	76,5	47,1	45,2	-	30
K	100	100	80	-	100



Rysunek 3 Procent redukcji BZT w zależności od czasu trwania procesu dla soli litowych dihydroksykwasów

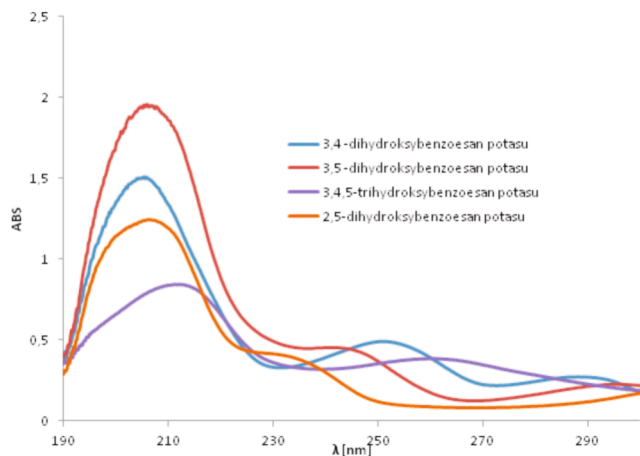
Figure 3 Percent of reduction of BOD in relationship of time for sodium salts of dihydroxy acids

W Tabeli 2 zestawiono wyniki z analizy uzyskanych stopni biodegradacji w ostatnim dniu pomiarowym, ocenianych na podstawie redukcji wskaźników BZT i RWO soli litowych, sodowych i potasowych wybranych kwasów fenolowych.

Z Tabeli 2 wynika, że najwyższy stopień biodegradacji uzyskano dla soli potasowych, a najniższy dla soli litowych (analizując % redukcji RWO). Jeżeli porównamy biodegradację soli poszczególnych kwasów, to najwyższy procent redukcji RWO uzyskano dla soli kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego, najniższy dla soli kwasu 2,5-dihydroksybenzoesowego. Stopień biodegradacji maleje w szeregu: 3,4-dihydroksybenzoesany > 3,4-dihydroksycynamoniany > 3,5-dihydroksybenzoesany > 3,4,5-trihydroksybenzoesany > 2,5-dihydroksybenzoesany.

W przypadku, gdy badanym wskaźnikiem jest BZT najwyższy stopień biodegradacji uzyskano dla soli potasowych. Jeżeli porównamy biodegradację soli sodowych analizowanych kwasów to maleje ona w szeregu: 3,4-dihydroksybenzoesany > 3,4-dihydroksycynamoniany > 3,5-dihydroksybenzoesany > 2,5-dihydroksybenzoesany.

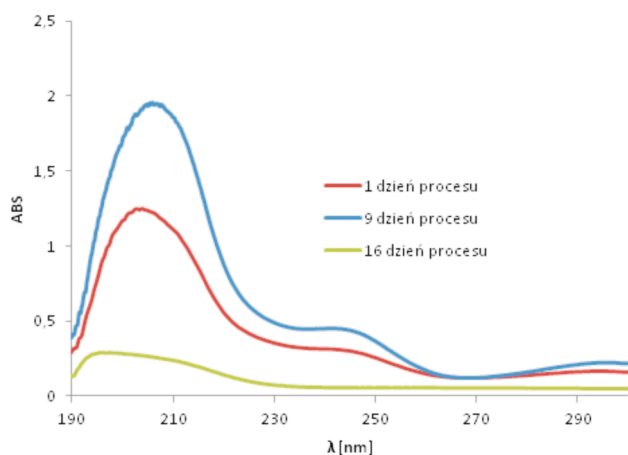
Na podstawie widm w zakresie UV analizowanych związków obliczano ich stężenia w próbce w czasie trwania procesu. Na Rysunku 4 przedstawiono widma soli potasowych kwasów dihydroksybenzoesowych i trihydroksybenzoesowego. Natomiast na Rysunku 5 przedstawiono widma rozтворów 3,5-dihydroksybenzoesanu potasu (w badanej wodzie) otrzymane w różnych dniach procesu (stężenie wyjściowe wynosiło 10 mg/dm³).



Rysunek 4 Widma soli potasowych wybranych hydroksykwasów

Figure 4 The spectra of potassium salts of selected hydroxy acids

W widmach analizowanych soli kwasów fenolowych stwierdzono obecność pasma pochodzącego od przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ o maksimum absorpcji przy długości fali w granicach od 205 – 212 nm w zależności od kwasu. Zauważono, że podstawienie wodoru w grupie karboksylowej atomem litowca powoduje przesunięcie tego pasma w stronę niższych wartości długości fali (w stosunku do samego kwasu).



Rysunek 5 Widma badanych próbek zawierających 3,5-dihydroksybenzoesan potasu otrzymane w trakcie procesu

Figure 5 The spectra of tested samples containing potassium 3,5-dihydroxybenzoate obtained in the process

3.3 Testy toksyczności ostrej

W badaniach toksykologicznych najczęściej wykorzystuje się skorupiaki – rozwielitki, ponieważ organizmy te charakteryzują się krótkim cyklem rozwojowym, a ponadto są łatwe w hodowli. Nie wielkie rozmiary tych skorupiaków oraz wrażliwość na działanie trucizn pozwalają na bardzo szerokie wykorzystanie ich w toksykologii [6].

W celu obliczenia stężenia śmiertelnego (tj. stężenia substancji toksycznej, wywołującej śmierć określonej liczby organizmów w populacji) śmierć musiała ponieść najmniej 50% osobników danej populacji. W związku z tym obliczenie takiego stężenia w przypadku larw ochotek i wodzieni było niemożliwe, gdyż uzyskano zbyt niską śmiertelność. Związki te w badanych stężeniach okazały się nietoksyczne w stosunku do tych organizmów. Natomiast w przypadku dafni, śmiertelność była stosunkowo wysoka, co pozwoliło na określenie wartości stężenia LC₅₀ dla niektórych soli poszczególnych kwasów.

W Tabeli 3 przedstawiono wartości LC₅₀ dla soli potasowych badanych kwasów w stosunku do *Daphnia magna*. Inne badane sole okazały się w zakresie badanych stężeń niezwykle toksyczne w stosunku do dafni.

Związek	Wartość LC ₅₀ [mg/dm ³] (<i>Daphnia</i>)	Klasa toksyczności wg: Dockal i Solda
3,4-dihydroksybenzoesan potasu	0,1132	mocno toksyczny
3,5-dihydroksybenzoesan potasu	1	mocno toksyczny
2,5-dihydroksybenzoesan potasu	0	niezwykle toksyczny
3,4,5-trihydroksybenzoesan potasu	9,75	silnie toksyczny

Tabela 3 Wartości LC₅₀ uzyskane dla soli potasowych badanych kwasów dla *Daphnia magna*

Table 3 LC50 values for exposed to potassium salts of tested acids

4. WNIOSKI

Właściwości fizyczne i chemiczne benzenu ulegają znacznej zmianie, jeżeli w strukturze cząsteczki pojawiają się podstawniki. Niektóre z nich aktywują pierścień, w efekcie czego łatwiej zachodzą reakcje substytucji i addycji elektrofilowej. Grupami aktywującymi są m.in. podstawnik metylowy (-CH₃) lub hydroksylowy (-OH). Z kolei obec-

ność innych podstawników, takich jak grupa aldehydowa (-CHO), karboksylowa (-COOH), nitrowa (-NO₂), czy atomy chlorowców, powoduje dezaktywację pierścienia aromatycznego. Obecność podstawników może wpływać na obniżenie lub wzrost aromatyczności związku, co również decyduje o podatności związków fenolowych na biodegradację.

Z przeprowadzonych badań i na podstawie literatury [7] można stwierdzić, że wpływ na biodegradację i toksyczność związku ma ilość grup hydroksylowych (monohydroksypochodne kwasu ben-

zoowego są mniej toksyczne od dihydroksylowych pochodnych) i od pozycji podstawników hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym. Łatwiej ulegają biodegradacji te sole kwasów, które mają większy moment dipolowy.

5. PODZIĘKOWANIA

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/01/B/NZ9/06830.

LITERATURA

- [1] Stevenson D. E., Hurst R. D., Polyphenolic phytochemicals – just antioxidant or much more?, *Cell Mol. Life Sci.* 64, 2007, 2900–2916.
- [2] Gawlik-Dziki U., Fenolokwasy jako bioaktywne składniki żywności, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 4 (41) S (2004) 29–40.
- [3] Rodriguez Vaquero M. J., Alberto M. R., Manca de Nadra M. C., Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines, *Food Control*, 2007; 18: 93-101.
- [4] Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Zakrzewski V. G., Montgomery J. A., Jr., Stratmann R. E., Burant J. C., Dapprich S., Millam J. M., Daniels A. D., Kudin K. N., Strain M. C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G. A., Ayala P. Y., Cui Q., Morokuma K., Rega N., Salvador P., Dannenberg J. J., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Cioslowski J., J. V. Ortiz, A. G. Baboul, Stefanov B. B., G. Liu, Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong M. W., Andres J. L., Gonzalez C., Head-Gordon M., Replogle E. S., Pople J. A., Gaussian 98, Revision A.11.2, Inc., Pittsburgh PA, 2001.
- [5] Łebkowska M., Załęska-Radziwiłł M., Słomczyńska B., Toksykologia środowiska. Ćwiczenia laboratoryjne, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1999.
- [6] Walker C. H., Hopkin S. P., Sibly R. M., Peakall D. B., Podstawy Ekotoksykologii, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- [7] Kamaya Y., Fukaya Y., Suzuki K., Acute toxicity of benzoic acids to the crustacean *Daphnia magna*, *Chemosphere* 59 (2005) 255–261.