

Słowa kluczowe: substancje promieniotworcze, filtry UV, toksyczność, Microtox®, Spirotox, Thamnotoxkit F™

Grzegorz NAŁĘCZ-JAWECKI*, Aleksandra WIELĄDEK**,**,
Ewa SIEDLECKA*

OCENA EKOTOKSYCZNOŚCI WYBRANYCH SUBSTANCJI STOSOWANYCH JAKO FILTRY CHRONIĄCE PRZED PROMIENIOWANIEM UV

Stosując trzy testy bioindykacyjne: Microtox®, Spirotox i Thamnotoxkit F™ oceniono toksyczność pięciu substancji promieniotworczych stosowanych w kosmetykach. Najwyższą toksycznością charakteryzował się 2-hydroksy-4-metoksybenzofenon, zwłaszcza w teście Microtox®, w którym wyznaczone EC50 wyniosło 19 µg/l. Dla skorupiaków najbardziej toksyczny był 4-metoksykynamonian-2-etyloheksylu, filtr UV najczęściej wykrywany w próbkach środowiskowych. Wysoka wartość logK_{OW} wskazuje, iż związek może ulegać bioakumulacji i stanowić duże zagrożenie dla populacji skorupiaków w wodach powierzchniowych.

1. WSTĘP

Rolą preparatów chroniących skórę ludzką przed promieniowaniem słonecznym jest pochłanianie, rozpraszanie i przetwarzanie szkodliwego promieniowania w nieszkodliwe promieniowanie widzialne i podczerwone [1]. Ogromna większość stosowanych w kosmetyce filtrów UV (sunscreen) to związki chemiczne wytwarzane syntetycznie. Są nimi cząsteczki aromatyczne, posiadające grupę karboksylową, która ulega polimeryzacji pod wpływem energii pochłoniętego promieniowania. Związki te mają zdolność absorbowania promieniowania z zakresu UVA jak i UVB i/lub odbijania nieszkodliwego światła (o długości fali powyżej 380 nm). Związki stosowane jako filtry charakteryzują się specyficzną dla danej grupy szerokością spektralną. Cecha ta umożliwia zaszeregowanie substancji jako filtry grup UVA, UVB oraz UVA+ B (filtry szerokozakresowe).

* Zakład Badania Środowiska, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa. Grzegorz.nalecz-jawecki@wum.edu.pl

** Zakład Farmacji Stosowanej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Związki promieniochronne dodawane są do kosmetyków (kremów ochronnych, pomadek, balsamów, lakierów do włosów, farb do włosów i szamponów), a także do wielu wyrobów przemysłowych np. opon, odlewów, tuszy w celu ochrony produktów przed fotorozkładem wywołanym przez promieniowanie ultrafioletowe [4]. Dynamiczny rozwój wymienionych gałęzi przemysłu, coraz większe zużycie wytwarzanych produktów oraz właściwości fizykochemiczne filtrów UV, takie jak trwałość i wysoka lipofilność powodują, że ich stosowanie staje się istotnym problemem środowiskowym. W Szwajcarii roczne zużycie 4 – metoksycynamonianu 2-etyloheksylu (EHMC) została oszacowana na około 20 ton.

Filtry UV stosowane w kosmetyce mogą przedostawać się do wód powierzchniowych bezpośrednio - poprzez aktywność rekreacyjną (kąpiele i pływanie), podczas której warstwa kosmetyku ochronnego nałożona na skórę zostaje zmyta. Bardziej istotna jest droga pośrednia. Duża część kosmetyku zostaje przeniesiona na ubrania bądź ręczniki, a podczas prania trafia do ścieków komunalnych [6].

W badaniach prowadzonych w latach 90-tych XX wieku substancje promieniochronne zostały wykryte zarówno w wodach powierzchniowych jak i w organizmach ryb słodkowodnych. W rzece Ren w Szwajcarii średnie stężenie EHMC w wodzie wyniosło 5,5 ng/l, a w tkankach płotki - 0,27 µg/l, zaś sandacza 2,71 µg/l [6]. EHAB w nieoczyszczonych ściekach osiągał poziom do 19 µg/l. 4-metylobenzyliden był spotykany najczęściej, ale w niższych stężeniach - do 2,7 µg/l [6]. W południowej Karolinie zawartość EHMC w ściekach nieoczyszczonych wynosiła 0,11- 10,4 µg/l, natomiast w wodzie pitnej nieuzdatnionej - 0,56–5,61 µg/l [6]. Kameda i in. wykryli filtry UV (m. in. EHMC) we wszystkich badanych próbkach rzek wpływających do Zatoki Tokijskiej w Japonii [2].

Celem pracy była ocena toksyczności wybranych związków promieniochronnych: pochodnych benzofenonu, kwasu p-aminobenzoesowego i kwasu cyjanonowego mających zastosowanie w preparatach kosmetycznych. Jako modele badawcze przyjęto klasyczne testy bioindykacyjne: Microtox® z bakteriami luminescencyjnymi *Vibrio fischeri*, Spirotox z pierwotniakami *Spirostomum ambiguum* oraz Thamnotoxkit F™ ze skorupiakami *Thamnocephalus platyurus*.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. BADANE SUBSTANCJE PROMIENIOCHRONNE

Listę badanych związków chemicznych zamieszczono w tabeli 1. Roztwory podstawowe o stężeniu 10 mg/ml wykonano poprzez rozpuszczenie substancji w metanolu (cz.d.a; Merck). Roztwory robocze do analiz bioindykacyjnych przygotowywano *ex tempore* rozcieńczając roztwory podstawowe płynem do rozcieńczeń odpowiednim do biotestu. Najwyższym badanym stężeniem było 10 mg/l.

Metanol, w stężeniu nie przekraczającym 0,1%, nie wywoływał reakcji testowych organizmów.

Tab. 1. Badane substancje promieniochronne

Skrót	Nazwa chemiczna	Numer CAS	Producent	Log Ko/w
HMB	2- hydroksy- 4 -metoksybenzofenon	131-57-7	Fluka	3,8 ¹
MCA	kwasy /trans/- metoksycynamonowy	943-89-5	Fluka	1,8 ²
EHMC	/trans/- 4 – metoksycynamonian 2- etyloheksylu	83834-59-7	Aldrich	6,0 ¹
EHAB	4- (dimetyloamino) benzoesan 2-etyloheksylu	21245-02-3	Aldrich	5,5 ²
IDAB	4- (dimetyloamino) benzoesan izoamylu	21245-01-2	Aldrich	bd

¹ Kameda i in. [3]

² <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

bd – brak danych

2.2. TESTY OCENY TOKSYCZNOŚCI

Do oceny toksyczności zastosowano trzy standardowe biotesty wykorzystujące organizmy z różnych poziomów troficznych. W teście Microtox® z bakteriami *Vibrio fischeri* reakcję testową (obniżenie luminescencji) obserwowano po 15 min inkubacji. Test Spirotox wykorzystujący pierwotniaka *Spirostomum ambiguum* pozwalał na ocenę zarówno efektów przyżyciowych jak i śmierci komórki [4]. 24-godzinny test toksyczności ostrej Thamnotoxkit F™ ze skorupiakiem *Thamnocephalus platyurus* wykonywano wg procedury producenta (MicroBioTests, Belgia).

3. WYNIKI

Rozpuszczalność badanych związków w wodzie była niska. Roztwory podstawowe przegotowano w metanolu, zaś analizy toksyczności prowadzono w stężeniach do 10 mg/l. We wszystkich badanych testach kwas metoksycynamonowy (MCA) nie wywołał reakcji toksycznych na poziomie do 10 mg/l. Kwas ten jest rzadko stosowany samodzielnie, w środowisku jest produktem hydrolizy estrów (głównie EHMC).

Związkiem najsilniej toksycznym w teście Microtox® był IDAB (tab. 2.), dla którego 15min-EC 50 wyniosło jedynie 0,019 mg/l. Dużo mniej toksyczny okazał się HMB, którego 15min-EC 50 równe było 2,68 mg/l.

Natomiast w przypadku EHMC oraz EHAB zaobserwowano ciekawą zależność (rys. 1). W niskich stężeniach (dla EHAB od 0,07 mg/l do 1,12 mg/l zaś dla EHMC od 0,0781 mg/l do 1,25 mg/l) wystąpiła silna zależność dawka- efekt.

Tab. 2. Średnie wyniki toksyczności badanych związków w testach bioindykacyjnych

Badane związki	Spirotox		Thamnotoxkit	Microtox
	24h-EC50	24h-LC50	24h-LC50	15 min-EC50
HMB	6,38 ±1,02	7,07 ±0,00	3,90 ±0,32	2,68 ±0,93
IDAB	2,45 ±0,60	2,87 ±0,80	1,48 ±0,74	0,019 ±0,016
EHAB	78,4 ±11,1	> 100	1,35 ±0,29	1,12 *
MCA	> 10	> 10	> 10	> 10
EHMC	>100	>100	0,33 ±0,05	1,25 *

*- stężenie, przy którym efekt testowy był maksymalny

HMB - 2- hydroksy- 4 -metoksybenzofenon

IDAB - 4- (dimetyloamino) benzoesan izoamylu

EHAB - 4- (dimetyloamino) benzoesan 2-etyloheksylu

MCA - kwas /trans/ - metoksycynamonowy

EHMC - /trans/- 4 – metoksycynamonian 2- etyloheksylu

Po osiągnięciu efektu testowego (obniżenia luminescencji bakterii) w przypadku EHAB 47- procentowego zaś EHMC 60- procentowego, pomimo wzrostu stężenia, toksyczność nie rosła, nawet w minimalnym stopniu malała. Było to powodem, dla którego niemożliwe stało się wyznaczenie 15min EC 50. Konieczne są dalsze analizy tych związków połączone z badaniem ich biodostępności.

Wrażliwość skorupiaków *Thamnocephalus platyurus* na badane substancje promieniochronne była odmienna niż w przypadku bakterii luminescencyjnych. Najwyższą toksyczność wykazał EHMC, związek najczęściej wykrywany w środowisku wodnym. 4-krotnie mniej toksyczne były pochodne kwasu paraaminobenzoesowego (IDAB i EHAB), zaś 10 razy mniej toksyczny był HMB.

Najniższą wrażliwość spośród zastosowanych bioindykatorów wykazały pierwotniaki *Spirostomum ambiguum*, dla których wartość LC50 wyznaczono jedynie w przypadku HMB i IDAB (tab. 2). Obserwacja efektów subletalnych jedynie w niewielkim stopniu zwiększyła czułość testu.

Dyrektywa Unii Europejskiej (93/67/EEC) odnośnie substancji zanieczyszczających środowisko dzieli je na następujące klasy toksyczności:

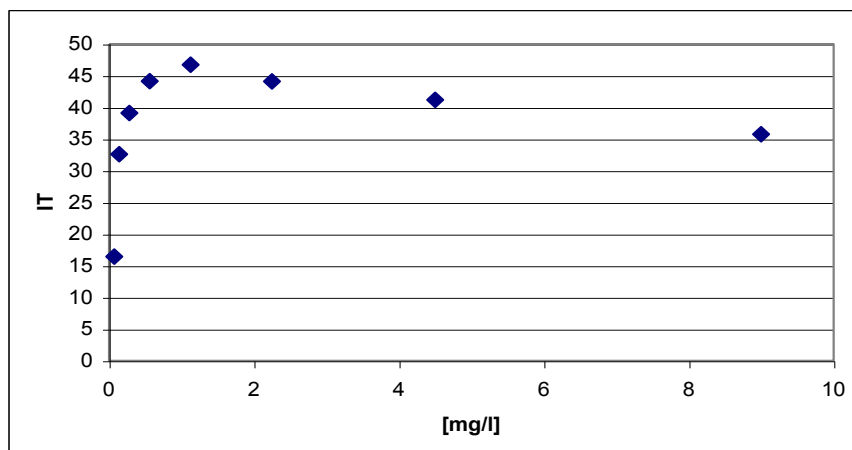
EC 50 < 1 mg/l substancje bardzo toksyczne dla środowiska wodnego

EC 50: 1 – 10 mg/l substancje toksyczne dla środowiska wodnego

EC 50: 10 – 100 mg/l substancje szkodliwe dla środowiska wodnego

EC 50 > 100 mg/l substancje praktycznie nieszkodliwe dla środowiska wodnego

Zgodnie z tą klasyfikacją IDAB i EHMC są bardzo toksyczne dla środowiska wodnego. EHAB i HMB należą do substancji toksycznych dla organizmów wodnych.



Rys. 1. Zależność efektu testowego (IT-obniżenie luminescencji) w teście Microtox® od stężenia EHAB

Europejska Agencja ds. Leków (EMA) zaleca przeprowadzenie badań ekotoksykologicznych substancji leczniczych, gdy współczynnik podziału oktanol/woda przekracza wartość 4,5. W przypadku estrów etyloheksylowych $\log K_{ow}$ wynosi 5,5–6,6 (tab. 1). Wskazuje to na możliwość kumulacji substancji w osadach dennych oraz bioakumulacji w łańcuchu troficznym. Szczególnie niebezpieczna sytuacja może wystąpić dla EHAB, związku najbardziej toksycznego dla skorupiaków, a jednocześnie najczęściej wykrywanego w próbkach środowiskowych.

Przeprowadzone przez nas wstępne analizy ekotoksyczności substancji promieniochronnych stosowanych w kosmetykach wskazały na ich potencjalnie wysokie zagrożenie środowiskowe. Stężenia IDAB toksyczne dla bakterii zbliżone są do poziomów filtrów UV obserwowanych w ściekach.

LITERATURA

- [1] Gibka J. 1998. *Syntetyczne środki promieniochronne* Biuletyn Kosmetologiczny. 2: 75–78.
- [2] Kameda Y., Yamashita H., Ozaki M. 2008 a. *Occurrence of synthetic fragrances and organic UV filters in surface waters, sediments and core sediments in Japan*. Setac Europe 18th Meeting. 25–29.05.2008. Warszawa.
- [3] Kameda Y., H. Yamashita, M. Ozaki. 2008 b. *A multiresidue analytical method to measure synthetic fragrances and organic UV filters and their occurrence in the environment*. Setac Europe 18th Meeting. 25–29.05.2008. Warszawa.
- [4] Kunz P.Y., Fent K. 2006. *Estrogenic activity of UV filters mixtures*. Toxicol Appl Pharmacol. 217: 86–99.
- [5] Nałęcz-Jawecki G. 2005. *Spirotox test – Spirostomum ambiguum acute toxicity test*. [w] Blaise Ch. Féraud J. (Eds.) Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Volume 1 - Toxicity Test Methods, Springer, Dordrecht, 299–322.

- [6] Straub J.O. 2002. *Concentrations of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic compartment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data.* Toxicol Lett. 3: 29–37.

EVALUATION OF ECOTOXICITY OF SELECTED SUNSCREENS

The toxicity of selected sunscreens was evaluated with 3 bioassays, namely Microtox® with luminescent bacteria *Vibrio fischeri*, Spirotox with ciliated protozoan *Spirostomum ambiguum* and Thamnotoxkit F™ with anostracean crustacean *Thamnocephalus platyurus*. Isoamyl 4- (dimethylamino) benzoate (IDAB) was the most toxic, especially to Microtox®, with EC50 of 19 µg/l. Anostracean *T. platyurus* was the most sensitive to ethylhexyl methoxycinnamate (EHMC), which was detected in surface waters and effluents. This compound has very high log K_{OW}, that suggest strong bioaccumulation i.e. partitioning into living organisms.