

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Danka D. Aćimović

Elektrohemijska oksidacija policikličnih
aromatičnih ugljovodonika iz betona i
procena toksičnosti produkata njihove
degradacije

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Danka D. Aćimović

Electrochemical oxidation of polycyclic
aromatic hydrocarbons in concrete and
toxicity estimation of their degradation
products

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Mentori:

dr Suzana Dimitrijević-Branković,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-
metalurški fakultet u Beogradu

dr Tanja Brdarić,
naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne
nauke "Vinča"

Članovi komisije:

dr Aleksandra Perić-Grujić,
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-
metalurški fakultet

dr Vladimir Nikolić,
viši naučni saradnik, Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd

Datum odbrane doktorske teze:_____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ pod rukovodstvom dr Suzane Dimitrijević-Branković redovnog profesora Tehnološko metalurškog fakulteta i dr Tanje Brdarić, naučnog saradnika Instituta za nuklearne nauke “Vinča“. Ovim putem im se zahvaljujem na ukazanom poverenju i prihvatanju mentorstva, na korisnim savetima i pomoći tokom izrade i pripreme ove disertacije.

dr Vladimiru Nikoliću, višem naučnom saradniku Instituta za opštu i fizičku hemiju se zahvaljujem na idejama, sugestijama i pomoći tokom izrade elektrohemijskog dela teze.

dr Aleksandri Perić-Grujić, redovnom profesoru Tehnološko metalurškog fakulteta se zahvaljujem jer je prihvatila da bude član komisije za ocenu i odbranu ove disertacije, kao i na dugogodišnjoj podršci i saradnji.

Višim naučnim saradnicima iz Laboratorije za fizičku hemiju 050, Instituta za nuklearne nauke Vinča, dr Andreji Leskovic i dr Sandri Petrović najiskrenije se zahvaljujem na eksperimentalnoj pomoći i interpretaciji rezultata prilikom ispitivanja citotoksičnosti PAH-ova i njihovih produkata.

Zahvljujem kolegama iz Laboratorije za fizičku hemiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, kao i članovima Vodonične grupe, na čelu sa dr Milicom Marčetom Kaninski, koji su mi pružali pomoć i podršku tokom izrade teze, a posebno naučnim saradnicima dr Dragani Vasić Anićijević, Ivani Perović i Branislavu Nastasijeviću, kao i istraživaču saradniku, Snežani Brković.

Zahvalnost dugujem dr Oliveri Nešković zbog koje sam dobila mogućnost da se bavim naukom.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na razumevanju i podršci!

ELEKTROHEMIJSKA OKSIDACIJA POLIČIKLIČNIH AROMATIČNIH UGLJOVODONIKA IZ BETONA I PROCENA TOKSIČNOSTI PRODUKATA NJIHOVE DEGRADACIJE

Policiklični aromatični ugljovodonici (engl. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) predstavljaju grupu organskih jedinjenja koja se sastoje od dva ili više kondenzovanih benzenovih prstenova. Istraživanja ukazuju da PAH-ovi imaju kancerogen i mutagen uticaj na ljude i druge žive organizme. Perzistentni su i bioakumulativni i kao takvi predstavljaju opasnost po životnu okolinu.

Dodatni problem predstavljaju proizvodi degradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika, koji nastaju tokom prirodne transformacije ili fizičko-hemijskih tretmana za njihovo uklanjanje. Novoformirana jedinjenja često imaju izraženiji toksični uticaj na ljude i druge žive organizme u poređenju sa polaznim jedinjenjem. Zato se posebna pažnja posvećuje razvoju novih metoda za njihovo što bezbednije uklanjanje. Do sada su razvijene metode za analizu sledećih kontaminiranih medijuma: voda, zemljište, vazduh, sedimenti i dr. Kako je zagađenost PAH-ovima u životnoj sredini rasla, uglavnom usled antropogenih faktora, tako su se pojavili i na drugim mestima, poput betona u stambenim zgradama.

Cilj istraživanja doktorske disertacije je razvijanje nove, efikasne, neinvazivne metode za uklanjanje PAH-ova iz betona, koja je zasnovana na elektrohemijskoj oksidaciji. Da bi se osigurala bezbednost metode za praktičnu primenu, posebna pažnja posvećena je proceni toksičnosti PAH-a i njihovih produkata razgradnje nastalih tokom procesa elektrooksidacije.

Kao laboratorijski model sistem za elektrohemijšku degradaciju PAH-ova koristi se elektrolitička ćelija sa niklenim elektrodama. Praćenje koncentracije PAH-ova u betonu izvedeno je primenom novopostavljene i validirane metode na uređaju tačni hromatograf ultravisokih performansi sa fotodiodnim detektorom (UPLC-PDA). Efikasnost uklanjanja za pojedine PAH-ove dostiže vrednost i preko 90 %. Za procenu toksičnosti elektrohemijskog tretmana određuje se citotoksični i genotoksični potencijal na limfocitima i eritrocitima periferne krvi čoveka. Testovi

obuhvataju određivanje učestalosti mikronukleusa i proliferacionog potencijala ćelija, ispitivanje antioksidativne zaštite enzima (katalaze) kao i uticaja na oksidativni stres (određivanjem sadržaja malondialdehida).

Rezultati ispitivanja potvrđuju toksičnost početne smeše PAH-ova - pre elektrohemijske oksidacije - uzrokujući značajno povećanje niva DNK oštećenja, smanjujući potencijal ćelija za deobu i indukujući oksidativni stres što se ogleda kroz povećanje malondialdehida u procesu lipidne peroksidacije ćelijskih membrana i povećanju aktivnosti katalaze, enzima antioksidativne odbrane. Procesom elektrohemijske oksidacije PAH-ova nastaju produkti koji ispoljavaju različit stepen citotoksičnosti zavisno od vremena nastanka. Najtoksičniji efekti su utvrđeni u prvih 15 minuta što se manifestuje kroz povećanje učestalosti genomskih ozleda, suprimiranje proliferativnog potencijala i/ili indukciju oksidativnog stresa, kao i značajnu modifikaciju aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Nakon 60 minuta produkti oksidacije su manje citotoksični u odnosu na početno jedinjenje, ali i dalje su toksičniji u poređenju sa netretiranom kontrolom.

Ključne reči: PAH, beton, UPLC-PDA, elektrohemijska oksidacija, degradacija, citotoksičnost, genotoksičnost

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

ELECTROCHEMICAL OXIDATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN CONCRETE AND TOXICITY ESTIMATION OF THEIR DEGRADATION PRODUCTS

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are a group of organic compounds consisting of two or more fused benzene rings. Research indicates that PAHs have a carcinogenic and mutagenic effect on humans and other living organisms. They are persistent and bioaccumulative and, as such, pose a threat to the environment. Products that are formed upon natural degradation or physicochemical procedures for their removal represent a particular problem. Newly formed compounds often have a more pronounced toxic effect on humans and other living organisms compared to the initial compound. Consequently, the development of new methods for their safe removal has been the subject of extensive research. So far, methods for efficient PAH removal from the various media were developed, including: water, soil, air, sediments, etc. As the environmental pollution by PAHs is continuously increasing due to the various, mainly anthropogenic factors, they also have occurred in other places, such as concrete in residential buildings.

The aim of the doctoral dissertation is to develop novel, efficient, non-invasive method for PAHs removal in concrete, based on electrochemical oxidation. In order to ensure safeness of the method for practical application, particular attention was paid to the estimation of the toxicity of PAHs and their degradation products generated during the electrooxidation process.

Electrochemical cell consisting of two nickel electrodes was used for the laboratory model of PAH oxidation in concrete. Concentration of PAHs in concrete was monitored with the novel, particularly developed and validated method, based on ultra performance liquid chromatography (UPLC) with photo-diode array (PDA) detector. The removal efficiency for individual PAHs exceeds 90 %. Estimation of the toxicity of electrochemically treated samples was performed by determination of the cytotoxic and genotoxic potential of human peripheral blood lymphocytes and erythrocytes. The tests included determination the micronucleus

frequency and the proliferative potential of cells, determining the antioxidant protection of enzyme catalase, as well as the impact on oxidative stress (by determining the content of malondialdehyde).

The results of the study confirm the toxicity of initial PAHs showing that - before electrochemical oxidation - they significantly increase the level of DNA damage, reduce the potential of cells to divide and induce oxidative stress, which is reflected by the increase of malondialdehyde in the process of lipid peroxidation of cell membranes and the increase of the activity of catalase, an antioxidant defense enzyme. Products which are formed during electrochemical oxidation of PAHs exhibit different degrees of cytotoxicity depending on the time of their formation. The most toxic effects were determined in the first 15 minutes, which is manifested by an increased incidence of genomic lesions, suppression of proliferative potential and/or induction of oxidative stress, as well as substantial modification of the antioxidant enzyme activity. After 60 minutes, the oxidation products are less cytotoxic than the parent compound, but still more toxic compared to the untreated control.

Key words: PAH, concrete, UPLC-PDA, electrochemical oxidation, degradation, cytotoxicity, genotoxicity

Scientific Field: Technological engineering

Field of Academic Expertise: Biochemical engineering and biotechnology

Lista skraćenica

ACN, acetonitril

AO, anodna oksidacija

APCI, hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku

APPI, fotojonizacije pri atmosferskom pritisku

AOP, engl. *Advanced Oxidation Process*, napredni oksidacioni procesi

BSA, goveđi serum albumin

CAS, engl. *Chemical Abstract Service*

CBMN, citokinezis-blok mikronukleus test

CBPI, citokinezis-blok proliferativni indeks

COMT, katehol-O-metil transferaza

DNK, dezoksiribonukleinska kiselina

EI, elektronska jonizacija

ESI, elektrospej jonizacija

EU, engl. *European Union*, Evropska zajednica

FID, engl. *Flame Ionization Detector*, plameno jonizujući detektor

FL, engl. *fluorescent*, fluorescentno

GC, engl. *Gas Chromatography*, gasna hromatografija

HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*, tečna hromatografija visokih performansi

GST, glutation-S-transferaza

IUPAC, engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, Internacionalna zajednica za primenjenu i čistu hemiju

LC, engl. *Liquid Chromatography*, tečna hromatografija

LOD, engl. *Limit Of Detection*, limit detekcije

LOQ, engl. *Limit Of Quantification*, limit kvantifikacije

MN, mikronukleus

MALDI, engl. *Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization*, matricom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija

NDI, engl. *Nuclear Division Index*, indeksa nuklearne deobe

Ni elektrode, niklene elektrode

PAH, engl. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, policiklični aromatični ugljovodonici

PDA, engl. *Photo-Diode Array*

PTFE, politetrafluoretilen

RNK, ribonukleinska kiselina

ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*, reaktivne kiseonične vrste

SIM, engl. *Selected Ion Monitoring*, mod za praćenje pojedinačnog jona

SS elektrode, engl. *stainless steel*, elektrode od nerđajućeg čelika

SULT, Sulfotransferaze

TOF, engl. *Time of Flight*, analizator na bazi vremena preleta

UGT, glukuronil transferaza

UPLC, engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, tečna hromatografija ultravisokih performansi

US EPA, engl. *United States Environmental Protection Agency*

UV, engl. *ultraviolet*, ultraljubičasto zračenje

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Nomenklatura i struktura PAH-ova	2
1.2	Fizičko-hemijska karakteristike.....	5
1.3	Metode analize PAH-ova.....	7
1.4	Izvori i nastanak PAH-ova.....	10
1.4.1	“Kruženje” PAH-ova u životnoj sredini.....	12
1.5	Uklanjanje PAH-ova	14
1.5.1	Biodegradacija.....	14
1.5.2	Fizičko-hemijske metode za uklanjanje PAH-ova	16
1.5.2.1	Hemijska oksidacija	16
1.5.2.2	Fotooksidacija.....	16
1.5.2.3	Napredni oksidacioni procesi (AOPs)	17
1.5.2.3.1	Elektrohemijska (anodna) oksidacija.....	18
1.5.2.4	Elektrohemijska degradacija u čvrstim matriksima	20
1.6	Uticaj PAH-ova na žive organizme.....	21
1.6.1	Oksidativni stres kao pokazatelj toksičnosti	25
1.6.1.1	Aktivnost katalaze - parametar oksidativnog stresa u ćelijama	26
1.6.1.2	Malondialdehid kao parametar oksidativnog oštećenja lipida	27
1.6.1.3	Određivanje učestalosti mikronukleusa i proliferativnog potencijala ćelije kao pokazatelj citotoksičnih efekata	28
2	CILJ RADA.....	30
3	MATERIJAL I METODE	31
3.1	Rastvarači i reagensi.....	31
3.2	Standardi ispitivanih supstanci.....	32
3.3	Podloge.....	32
3.4	Oprema.....	32

3.5	Elektrohemijska merenja	33
3.5.1	Elektrohemijska oksidacija u laboratorijskim uslovima.....	33
3.5.2	<i>In situ</i> potenciostatska oksidacija PAH-ova u betonu	34
3.6	Instrumenti i analitički uslovi.....	35
3.6.1	Ekstrakcija PAH-ova iz vodenog elektrolita.....	36
3.6.2	Priprema uzoraka betona	36
3.6.2.1	Uzorkovanje i homogenizacija	36
3.6.2.2	Ekstrakcija	37
3.6.3	Izračunavanja.....	37
3.7	Validacija UPLC-PDA metode za određivanje koncentracije PAH-ova u betonu	38
3.7.1	Priprema rastvora	38
3.7.2	Selektivnost	39
3.7.3	Linearnost.....	39
3.7.4	Limit detekcije i kvantifikacije.....	40
3.7.5	Tačnost.....	40
3.7.6	Preciznost.....	41
3.7.7	Merna nesigurnost	41
3.8	Citotoksični efekti policikličnih aromatičnih ugljovodonika i produkata njihove elektrohemije oksidacije.....	45
3.8.1	Tretman ćelijskih kultura.....	45
3.8.2	Analiza mikronukleusa.....	45
3.8.3	Analiza proliferativnog potencijala ćelija (Citokinezis-blok proliferativnog indeksa-CBPI)	46
3.8.4	Separacija limfocita i eritrocita.....	46
3.8.5	Određivanje količine malondialdehida TBA (<i>Thiobarbituric Acid</i>) testom	46
3.8.6	Određivanje koncentracije proteina.....	47
3.8.7	Određivanje aktivnosti katalaze	47
3.8.8	Određivanje koncentracije hemoglobina	48
3.8.9	Statistička analiza	48

4	REZULTATI I DISKUSIJA.....	49
4.1	Validacija UPLC-PDA metode za određivanje koncentracije PAH-ova u betonu	49
4.1.1	Selektivnost	49
4.1.2	Linearnost.....	51
4.1.3	Limit detekcije i limit kvantifikacije	56
4.1.4	Tačnost i preciznost.....	56
4.2	Merna nesigurnost.....	57
4.3	Elektrohemijska oksidacija PAH-ova.....	59
4.3.1	Elektrohemijska oksidacija u laboratorijskim uslovima.....	59
4.3.1.1	Ciklovoltometrijska merenja.....	59
4.3.1.2	Elektroliza.....	60
4.3.2	<i>In situ</i> elektrohemijska oksidacija PAH-ova u betonu.....	66
4.4	Citotoksični efekti policikličnih aromatičnih ugljovodonika i produkata njihove elektrohemijske oksidacije.....	69
4.4.1	Rezultati analize efekata smeše PAH-ova	69
4.4.1.1	Učestalost mikronukleusa	69
4.4.1.2	Proliferativni indeks.....	72
4.4.1.3	Količina malondialdehida	72
4.4.1.4	Aktivnost katalaze	73
4.4.1.5	Korelacije između ispitivanih parametara.....	74
4.4.2	Rezultati analize efekata produkata nastalih elektrohemijskom oksidacijom smeše PAH-ova koncentracije 2 μ M	75
4.4.2.1	Učestalost mikronukleusa	75
4.4.2.2	Proliferativni potencijal ćelija	77
4.4.2.3	Količina malondialdehida	77
4.4.2.4	Aktivnost katalaze	78
4.4.2.5	Korelacije između ispitivanih parametara.....	79
4.4.3	Rezultati analize efekata produkata nastalih elektrohemijskom oksidacijom smeše PAH-ova koncentracije 6 μ M	80
4.4.3.1	Učestalost mikronukleusa	80

4.4.3.2	Proliferativni potencijal ćelija	80
4.4.3.3	Količina malondialdehida	82
4.4.3.4	Aktivnost katalaze	83
4.4.3.5	Korelacije između ispitivanih parametara.....	83
5	ZAKLJUČAK.....	85
	LITERATURA	87
6	PRILOZI.....	109
	BIOGRAFIJA	115
	Изјава о ауторству	116
	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	117
	Изјава о коришћењу.....	118

1 UVOD

Policiklični aromatični ugljovodonici (*engl. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAHs) predstavljaju grupu organskih jedinjenja koja se sastoje od dva ili više kondenzovanih benzenovih prstenova. Nastaju nepotpunim sagorevanjem organske materije (npr. ugalj, nafta, benzin i drvo) i zbog toga ih uglavnom nalazimo u smešama, a ne individualno. Brojna istraživanja ukazuju da imaju kancerogen i mutagen uticaj na ljude i druge žive organizme. Mnogi od njih su inertni (slabo reaguju sa drugim jedinjenjama dok ne dođe do njihove transformacije), perzistentni (zaostaju dugo u okolini i teško se rezgrađuju) i bioakumulativni (akumuliraju se u organizmu) i kao takvi predstavljaju opasnost po životnu okolinu. Na osnovu njihove zastupljenosti i kancerogenosti 16 PAH-ova od strane US EPA (*engl. United States Environmental Protection Agency*) i 15 PAH-ova od strane Evropske zajednice (*engl. European Union, EU*) su zavedeni kao prioritetni zagađivači životne sredine [1–3].

Dodatni problem predstavljaju proizvodi degradacije policikličnih aromatičnih ugljovodonika, koji nastaju tokom biotransformacije. Neželjeni, sporedni efekti su formiranje elektrofila i reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) koji mogu da se kovalentno vežu za dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK), ribonukleinsku kiselinu (RNK) i proteine ili da pospešuju oksidativni stres u ćeliji. Novoformirana jedinjenja često imaju izraženiji toksičan uticaj na ljude i druge žive organizme u poređenju sa polaznim jedinjenjem [4–6].

Danas se posebna pažnja posvećuje razvoju novih metoda za što bezbednije uklanjanje PAH-ova. Do sada su najviše ispitivani kontaminirani medijumi poput vode, zemljišta, vazduha, sedimenta i dr., ali kako je zagađenost PAH-ovima u životnoj sredini rasla, tako su se pojavili i na drugim mestima, poput betona u stambenim zgradama [1,2].

Poznato je da tretiranje perzistentnih organskih zagađivača konvencionalnim tehnikama (hemijska oksidacija, fotoliza, ozonizacija, adsorpcija) ne dovodi uvek do potpune razgradnje istih. Njihovom primenom mogu nastati i ekotoksičniji produkti koji su potencijalni uzročnici negativnih efekata na zdravlje živih

organizama [6–10]. Poslednjih decenija u svrhe uklanjanja organskih zagađivača se razvijaju nove tehnike poput naprednih oksidacionih procesa (*engl.* Advanced Oxidation Processes- AOP). AOP se zasnivaju na *in situ* generisanju visoko reaktivnih vrsta, poput hidroksilnih radikala ($\cdot\text{OH}$). Ovi moćni oksidacioni agensi sposobni su da efikasno ($10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) degradiraju jedinjenja sa aromatičnim prstenovima, kao što su PAH-ovi [11].

1.1 Nomenklatura i struktura PAH-ova

Prva zvanična nomenklatura za PAH-ove predložena je od strane Internacionalne zajednice za primenjenu i čistu hemiju (*engl.* International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) 1957. godine [12]. Taj način imenovanja pokazao se kao kompleksan, tako da IUPAC 2013. godine izdaje dodatak „Plavoj knjizi“ u kojem redefiniše pravila za nomenklaturu PAH-ova [13]. Ipak, do danas ne postoji jednostavan sistem za imenovanje i numeraciju policikličnih aromatičnih struktura. Najčešće koriste uobičajena imena poput naftalena, fluorena, krizena, itd. I IUPAC-ova nomenklatura koristi trivijalna i polutrivijalna imena kao osnovu prilikom imenovanja složenih struktura. Po IUPAC-u, prvo se odredi jedinjenje koje čini osnovu strukturu složenog PAH-a, dalje se određuje broj i tip prstena koji su spojeni sa osnovnom strukturom i naziv se daje tako što se na ime osnovnog jedinjenja alfabetskim redom dodaju prefiksi spojenih prstenova.

Uvođenjem novih osnovnih struktura, kao što je tetrafen, ni 16 EPA „prioritetnih“ PAH-ova nisu pošteđeni izmena u svojoj nomenklaturi. Tako je benzo(a)antracen postao tetrafen, dibenzo(a,h)antracen-benzo(k)tetrafen, a benzo(a)piren-benzo(pqr)tetrafen [14]. U tabeli 1.1. prikazana su preporučeni nazivi PAH-ova po IUPAC-ovoj nomenklaturi, CAS registarski broj¹, kao i drugi korišćeni nazivi 16 EPA PAH-ova.

¹ CAS registarski broj, CASRN ili CAS broj predstavlja jedinstvenu numeričku identifikaciju dodeljenu od strane Chemical Abstract Service (CAS) za svaku hemijsku supstancu spomenutu u naučnoj literaturi od 1957. godine

Tabela 1.1. Nazivi 16 EPA PAH-ova po IUPAC-ovoj nomenklaturi, CAS registarski broj i ostali nazivi zastupljeni u literaturi [14]

Naziv PAH-a (po IUPAC-u)	Naziv PAH-a (iz literature)	CAS registarski broj
Natalen		91-20-3
Acenaftilen		208-96-8
Acenaften	1,2-dihidroacenaftilen; 1,8-etilennaftalen; naftilenetilen; peri-etilennaftalen	83-32-9
9H-fluoren	fluoren; 2,2'-metilbifenil; o-bifenilemetan; difenilmethane	86-73-7
Fenantren	(3)helicen; ravatit	85-01-8
Antracen	paranaftalen	120-12-7
Fluoranten		206-44-0
Piren	benzo(def)fenantren	129-00-0
Tetrafen	benzo(a)antracen ; 1,2-benzantracen; 2,3-benzofenantren; benzo(b)fenantren	56-55-3
Krizen	1,2-benzofenantren; benzo(a)fenantren	218-01-9
Benzo(e)acefenantrilen	benzo(b)fluoranten ; 2,3-benzfluoranten; 3,4-benz(e)acefenantrilen	205-99-2
Benzo(k)fluoranten	11,12-benzofluoranten; 2,3,1',8'-binaftilen; dibenzo[b,j,k]fluoren; 8,9-benzofluoranten	207-08-9
Benzo(p,q,r)tetrafen	benzo(a)piren ; 3,4-benzpiren; 1,2-benzpiren; benzo[d,e,f]krizen	50-32-8
Benzo(k)tetrafen	1,2:5,6-dibenzantracen; dibenzo(a,h)antracen	53-70-3
Benzo(g,h,i)perilen	1,12-benzoperlen	191-24-2
Indeno(1,2,3-cd)piren	1,10-(1,2-fenil)piren; 1,10-(o-fenil)piren; 2,3-o-fenilpiren	193-39-5

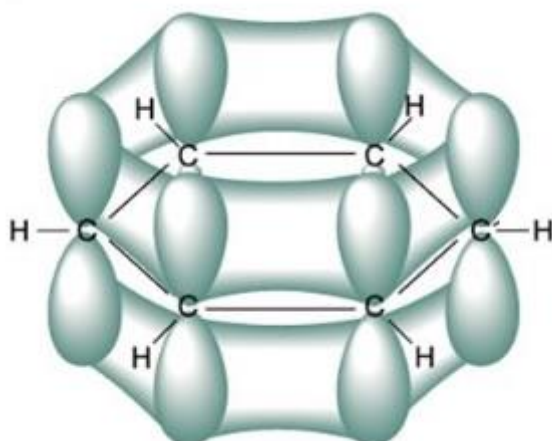
Tokom duge istorije proučavanja PAH-ova, njihova nomenklatura pretrpela je značajne promene, zato se istraživačima savetuje da budu upoznati sa starim, trivijalnim imenima (poput naftalena, fluorena, krizena, itd.) i starijom IUPAC-ovom nomenklaturom, kao i sa promenama u novoj IUPAC-ovoj nomenklaturi [13–16].

Policiklični aromatični ugljovodonici ili policiklični benzoidi nastaju spajanjem benzenovih prstenova koji dele dva ili više ugljenikovih atoma, tako da se dobije prošireni π -sistem.

Kondenzovanjem dva benzenova prstena dobija se naftalen. Dalja kondenzacija benzenovih prstenova može biti:

- Linearna- nastaju aceni (antracen, tetracen, pentacen...) i
- Angularna ili peri-kondenzacija- nastaje fenantren koji dalje može dati različite PAH-ove.

Za najveći broj policikličnih aromatičnih ugljovodonika može se reći da su aromatični ili drugim rečima da poseduju aromatičnu stabilizaciju ili rezonantnu (delokalizovanu) strukturu.



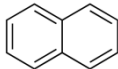
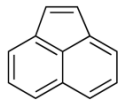
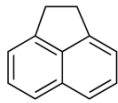
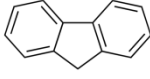
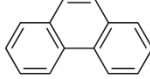
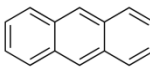
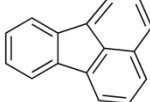
Slika 1.1. Preklapanje p-orbitala i sp^2 hibridizacija na primeru benzena


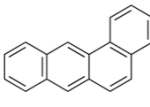
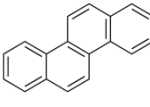
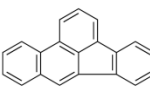
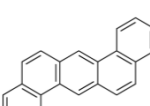
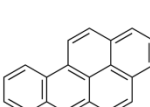
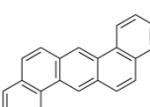
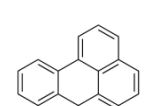
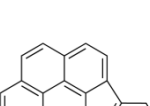
Naime, svi ugljenikovi atomi u benzenovom prstenu su sp^2 -hibridizovani, dok se p-orbitale preklapaju (slika 1.1.), a njihovi delokalizovani elektroni daju π -oblak iznad i ispod prstena. Nađeno je da u slučaju PAH-ova, gde se deli najmanje jedna π -veza, ciklična delokalizacija pojedinačnih benzenovih prstenova nije značajno poremećena. Ovakva specifična struktura razlog je neobične stabilnosti PAH-ova [17].

1.2 Fizičko-hemijska karakteristike

16 EPA PAH-ovi su čvrste supstance, bezbojni, beli do svetlo žute ili žute boje, aromatičnog mirisa [18]. Fizičko-hemijske karakteristike PAH-ova direktno su uslovljene njihovom strukturom. Sa porastom broja prstenova i sa angularnošću molekula povećava se njihova tačka topljenja i ključanja, kao i lipofilnost (koja se može okarakterisati preko oktanol/voda particionog koeficijenta), dok se smanjuju isparljivost i rastvorljivost u vodi [19–21]. U tabeli 1.2. prikazane su hemijska struktura, hemijska formula, kao i parametri koji opisuju karakteristike 16 EPA PAH-ova.

Tabela 1.2. Fizičke i hemijske karakteristike policikličnih aromatičnih ugljovodonika

PAH, hemijska formula	Hemijska struktura [22]	Mm (Da)	Rastvorlji- vost u vodi na 25°C (mg/l) [18]	Tačka ključanja (°C) [23]	Tačka topljenja (°C)[23,24]	Log Kow [25]
Naftalen, C ₁₀ H ₈		128,17	31,6	218	80-82	3,37
Acenaftilen, C ₁₂ H ₈		152,20	3,93	270	89,4	3,93
Acenaften, C ₁₂ H ₁₀		154,21	3,98	278	92-93	3,93
Fluoren, C ₁₃ H ₁₀		166,20	1,69	295	116	4,18
Fenantren, C ₁₄ H ₁₀		178,20	1,20	340	100	4,57
Antracen, C ₁₄ H ₁₀		178,20	1,29	340	218	4,45
Fluoranten, C ₁₆ H ₁₀		202,30	0,26	375	110	5,16

PAH, hemijska formula	Hemijska struktura [22]	Mm (Da)	Rastvorljivost u vodi na 25°C (mg/l) [18]	Tačka ključanja (°C) [23]	Tačka topljenja (°C)[23,24]	Log Kow [25]
Piren, C ₁₆ H ₁₀		202,30	0,135	404	151	4,88
Benzo(a) antracen, C ₁₈ H ₁₂		228,20	1,20 x 10 ⁻³	438	157	5,76
Krizen, C ₁₈ H ₁₂		228,30	2,00 x 10 ⁻³	448	255	5,73
Benzo(b) fluoranten, C ₂₀ H ₁₂		252,30	1,20 x 10 ⁻³	481	168	5,78
Benzo(k) fluoranten, C ₂₀ H ₁₂		252,30	8,00 x 10 ⁻⁴	480	215	6,11
Benzo(a)piren, C ₂₀ H ₁₂		252,30	2,30 x 10 ⁻³	495	179	6,13
Dibenzo(a,h) antracen, C ₂₂ H ₁₄		278,30	6,27 x 10 ⁻⁴	524	269	6,50
Benzo(g,h,i) perilen, C ₂₂ H ₁₂		276,30	2,60 x 10 ⁻⁴	550	278	6,63
Indeno(1,2,3- cd)piren, C ₂₂ H ₁₂		276,30	6,90 x 10 ⁻⁴	536	164	6,70

PAH-ovi su fotosenzitivni. Snažno apsorbuju u UV-A (320-400nm) i UV-B (290-320nm) oblasti elektromagnetnog zračenja [26]. Apsorbpcija svetlosti može da dovede do fotomodifikacije (fotooksidacije i fotolize) PAH-ova, kao i do formiranja

reaktivnih kiseoničnih vrsta [27–29]. Upravo ovi procesi dovode do povećanja toksičnosti u životnoj okolini.

Posmatranjem UV spektara PAH-ova, mogu se uočiti visoke vrednosti apsorpcije na početku spektra, da bi posle 300 nm vrednosti opadale. Takođe, apsorpcioni maksimum na 254 nm karakterističan je za 16 US EPA PAH-ove.

Oblik UV spektra PAH-ova uslovljen je brojem aromatičnih prstenova i njihovim rasporedom u molekulu i karakterističan je za svaki PAH. Sa porastom broja prstenova, može se uočiti manji batohromni pomeraj apsorpcionih maksimuma. Hiperhromni efekat primećen je kod molekula čiji su prstenovi manje kondenzovani [30].

Većina PAH-ova apsorpcije UV zračenja se ekscituje i snažno fluorescira. Ta karakteristika iskorišćena je za detekciju PAH-ova fluorescentnom tehnikom [31–33].

1.3 Metode analize PAH-ova

Krajem sedamdesetih i početkom osamdesetih godina prošlog veka, US EPA krenula je da razvija metode za ekstrakciju i analizu 16 “prioritetnih” EPA PAH-ova iz kontaminiranih medijuma [34,35].

Konvencionalna analiza PAH-ova je rađena dugotrajnim procedurama koju su sačinjavali sledeći koraci:

- Ekstrakcija (tečno-tečna ekstrakcija (sa dimetilformamidom ili sa dimetil sulfoksidom), kompleksiranje sa rastvorom kofein-mravlja kiselina ili saponifikacija (kalijum-hidroksid)),
- Prečišćavanje (hromatografija na koloni, tankoslojna hromatografija ili ekstrakcija na čvrstoj fazi (solid-phase)),
- Analitičko određivanje pomoću papirne ili tankoslojne hromatografije koja je praćena sa ultravioletnim (UV) ili fluorescentnom (FL) spektroskopijom.

Danas su razvijene znatno brže, efikasnije i ekonomičnije metode za ekstrakciju PAH-ova iz kontaminiranih medijuma (voda, zemlja mulj, sedimenti,

otpad, hrana i dr.), uključujući ekstrakciju Soksletom (SE), automatizovanu ekstrakciju Soksletom (ASE), ultrazvučnu ekstrakciju (UE), ekstrakciju potpomognutu mikrotalasima (MAE), superkričnu fluidnu ekstrakciju (SFE), tečnu ekstrakciju pod pritiskom (PLE) [36–38].

Dosta se radilo i na razvoju metoda prečišćavanja. Zavisno od vrsta nečistoća u primeni su hromatografija na koloni punjenoj adsorbensima (npr. aluminijum-oksidi, silika, Florisil) ili ekskluziona hromatografija (npr. Sephadex) [39]. U poslednje vreme razvijene su nove tehnike kao što je QuWChERS (*engl.* quick, easy, cheap, effective, rugged, safe), u kojoj su objedinjene ekstrakcija i prečišćavanje. Takođe od novijih tehnika spominje se termalna desorpcija čija je prednost analiza malih količina uzorka u odsustvu organskog rastvarača [40].

Klasične tehnike za analizu i detekciju PAH-ova zamenjene su gasnom hromatografijom (GC) na kapilarnim kolonama i tečnom hromatografijom (LC), a primeri mogu da se nađu u US EPA-nim metodama za analizu pijaće vode [41,42], komunalnih i industrijskih otpadnih voda [43–46], zemlje, mulja i čvrstog otpada [47], ambijentalnog vazduha [48].

Tokom analize PAH-ova tečnom hromatografijom, najčešće se koriste fluorescentni, UV i diodni (DAD ili PDA) detektori [49–54]. Fluorescentnom detekcijom postiže se bolja osetljivost i selektivnost (selekcijom specifičnih ekscitacionih i emisionih talasnih dužina) u poređenju sa UV detekcijom. Ograničenje ovog načina detekcije je nemogućnost svih PAH-ova da fluoresciraju. Tako se prilikom određivanja 16 EPA PAH-ova LC tehnikom, koristi UV detekcija za acenaftilen (koji ne fluorescira), kao i za naftalen, acenaften i fluoren koji pokazuju nisku fluorescenciju [40].

Kuplovanje LC sa masenim spektrometrom (MS) kao detektorom pokazalo se kao obećavajuća metoda prilikom analize organskih molekula. Međutim, PAH-ovi su veoma stabilna, nepolarna jedinjenja, koja se teško jonizuju tehnikama kao što su elektrospej jonizacija (ESI) ili hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku (APCI). Razvojem fotojonizacije pri atmosferskom pritisku (APPI), kao nove tehnike za LC-MS, omogućena je analiza PAH-ova [55,56]. Dalja usavršavanja ove tehnike jonizacije postiže se dodavanjem primesa, kao što je toluen, anisol ili acetone. Ova tehnika je poznata pod nazivom DP-APPI (primesama potpomognuta

fotojonizacija) [57,58]. Cai sa saradnicima iskombinovao je UPLC sa tandem masenom spektrometrijom (UPLC-APPI-MS/MS) kako bi demonstrirao dobru senzitivnost metode za analizu 16 EPA PAH-ova [59]. Laserska jonizacija pri atmosferskom pritisku predstavlja još jednu zanimljivu tehniku jonizacije, koja pomaže da se prevaziđu ograničenja LC-MS-a [60]. Kao potencijalne tehnike za analizu PAH-ova, ispituju se MALDI (matricom potpomognuta laserska desorpcija/jonizacija) TOF (analizator baziran na vremenu preleta) MS, tandem masena spektrometrija, kao i LC-GC-MS [39,61].

Pored tečne hromatografije, za analizu i detekciju PAH-ova koristi se i gasna hromatografija, koja se i danas razvija i usavršava. Kombinuje se GC sa raznim detektorima, razvijaju nove kolone. Radi boljeg razdvajanja analita, u gasnoj hromatografiji je došlo do prelaska sa pakovanih kolona na kapilarne kolone. Pod pojmom „kapilarna“ kolona podrazumeva se da je unutrašnji prečnik kolone do 0,35 mm, dok dužina varira od 15 m do 60 m. Stacionarna faza je najčešće uniformana tanka prevlaka (film). Danas se uglavnom koriste kapilarne kolone, mada je još uvek aktuelno nekoliko metoda koje zahtevaju pakovane kolone. Kod pakovanih kolona dužina kolone se kreće od 2-5 m, širina 1-5 mm, dok je unutrašnjost kolone ispunjena inertnim granulisanim česticama, koje su obložene stacionarnom fazom [62]. Tipičan primer je EPA metod 610 [44]. Na početku razvoja metoda za analizu i detekciju PAH-ova koristio se GC sa plameno jonizacionim detektorom (GC-FID), danas je primat preuzeo GC sa masenim spektrometrom kao detektorom (GC-MS). Prednosti GC-MS-a u odnosu na GC-FID su niske cene analiza, lakoća rukovanja, potreba za prečišćavanjem je minimalna (radi produženja veka trajanja kolone), dobra selektivnost koja se postiže modom za selektovanje pojedinačnog jona (SIM). Prilikom razdvajanja PAH-ova u uzorcima, najčešće se koristi elektronska jonizacija (EI) koja se odlikuje visokim prinosom molekulskih jona, za razliku od pozitivne i negativne hemijske jonizacije, koje takođe mogu da se koriste.

Takođe se ispituju tehnike poput GC-jonski trap-MS, koja pokazuje dobru osetljivost i sve se više koristi pri analizi PAH-ova u uzorcima iz životne sredine.

Druga poboljšanja GC tehnika ogledaju se u povećanju zapremine uzorka koji se injektuje (kako bi se postigla što bolja osetljivost metode), kao i u uvođenju

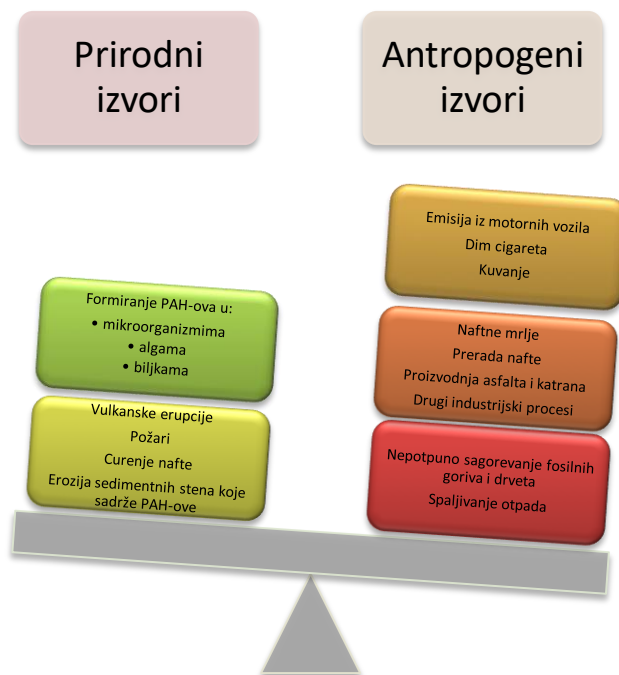
termalne desorpcije (kako bi se izbegla ekstrakcija i moguća kontaminacija iz rastvarača).

Kada se porede LC i GC tehnike, u literaturi se nailazi na podeljena mišljenja. Jedna grupa naučnika ističe prednosti GC-a koje se ogledaju u boljoj osetljivosti, rezoluciji i selektivnosti nego kod LC-a. Takođe ističu da je LC ograničena brojem analita koji mogu da se analiziraju za razliku od GC-a. Laka upotreba i kompatibilnost GC-a sa MS-om dodatni su razlozi pri izboru GC-a u odnosu na LC. Sa druge strane, navodi se da su LC tehnike brže od GC tehnika, kao i da zahtevaju znatno slabije prečišćavanje uzorka pre analize [34,39].

Uparivanjem tečne i gasne hromatografije (LC-GC) dobijena je moćna tehnika koja kombinuje najbolje karakteristike obe tehnike i omogućava analizu kompleksnih uzoraka. Prilikom korišćenja navedene tehnike, čitav uzorak se injektuje u tečni hromatograf, odakle dalje odlazi u gasni hromatograf, pri čemu se postiže odlična osetljivost metode i niska granica detekcije [34,63].

1.4 Izvori i nastanak PAH-ova

Policiklični aromatični ugljovodonici su sveprisutni zagađivači životne sredine. Izvore nastajanja PAH-ova, možemo podeliti na prirodne i antropogene (slika 1.2) [3,8]. Primeri prirodnih izvora PAH-ova su šumski požari, vulkani, sinteze od strane biljaka, mikroorganizama i algi, razgradnja vegetacije, curenje nafte i erozija sedimentnih stena [64,65]. Kao što se može videti sa slike 1.2, PAH-ovi se uglavnom formiraju ljudskim uticajem. Takve izvore nazivamo antropogenim i obuhvataju: emisiju iz motornih vozila, naftne mrlje, preradu nafte, nepotpuno sagorevanje fosilnih goriva i drveta, spaljivanje otpada i druge industrijske procese [66–69].



Slika 1.2. Prirodni i antropogeni izvori policikličnih aromatičnih ugljovodonika

Prema načinu nastajanja PAH-ova, potencijalni izvori se dele na:

- Pirogene izvore,
- Petrogene izvore i
- Biogene i diagene izvore.

Pirogena jedinjenja (monociklični aromatični ugljovodonici i policiklični aromatični ugljovodonici) se formiraju nepotpunim sagorevanjem organskih jedinjenja na visokim temperaturama i pri smanjenim količinama kiseonika (ili bez kiseonika). Ovaj proces se naziva piroliza i odvija se u opsegu temperatura od 350 °C do 1200 °C. Primeri pirogenih procesa pri kojima nastaju PAH-ovi su: destruktivna destilacija uglja u koks i katran, termalno krekovanje naftnih ostataka, nekompletno sagorevanje motornih goriva, nepotpunim sagorevanjem drveta u šumskim požarima i prilikom grejanja kuća i stanova, erupcija vulkana itd. [70,71]. Kao posledica, nađeno je da koncentracija pirogenih PAH-ova u zemljištu urbanih područja (mesta sa gustim saobraćajem, područja u kojima se stanuje) može da bude značajno veća nego u ruralnim [72–74].

Petrogena jedinjenja se definišu kao jedinjenja nastala iz nafte (*engl.* petroleum), uključujući ulja, maziva kao i njihove derivate. Primeri jedinjenja koja

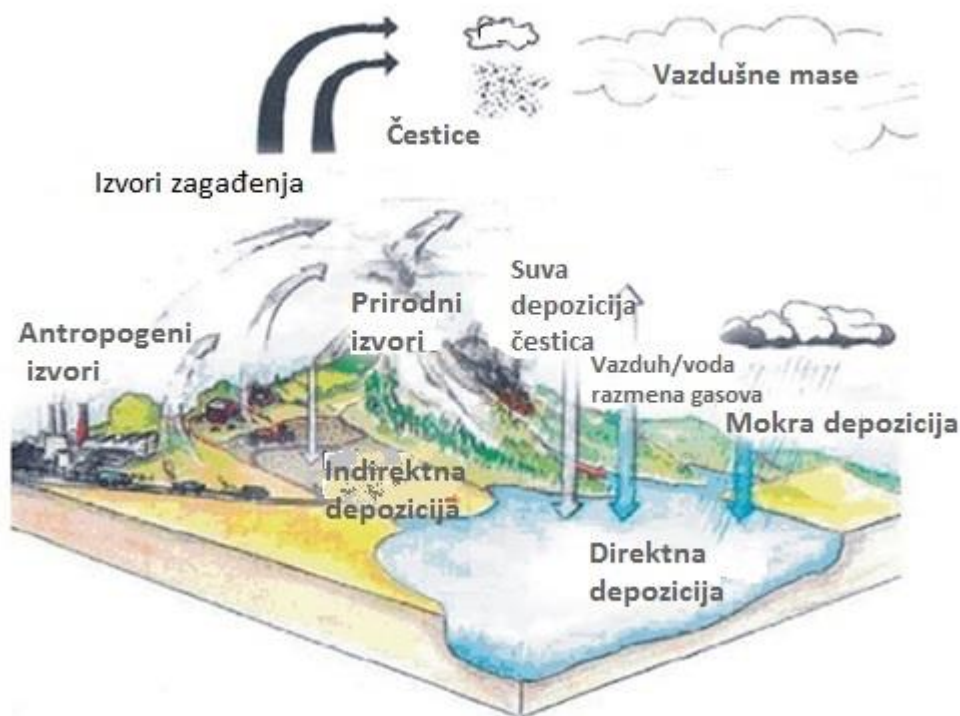
se dobijaju iz petrogenih izvora su alkani, izoprenoidni ugljovodonici, PAH-ovi i biomarkeri [64,75].

Diageni PAH-ovi nastaju tokom spore transformacije organskih jedinjenja u sedimentima, dok biljke, alge, fitoplankton i mikroorganizmi formiraju biogene PAH-ove [72,76].

1.4.1 "Kruženje" PAH-ova u životnoj sredini

Na osnovu prethodno opisanih izvora nastanka PAH-ova može se pretpostaviti da je transport PAH-ova u životnoj sredini jednostavan. Kretanje PAH-ova u životnoj sredini zavisi od njihovih fizičko-hemijskih karakteristika, kao i od načina nastanka.

PAH-ovi nastali u diogenim i biogenim izvorima su poprilično statični i ostaju u ekosistemima, gde su i formirani. Mogu da zaostanu u sedimentima, biljkama ili mikroorganizmima ili da se nađu u zemljištu, posle sinteze u bakterijama ili biljkama, ili u vodi (jezera, reke, mora) [77].



Slika 1.3. Izvori, transport i depozicija PAH-ova u životnoj sredini (preuzeto i modifikovano iz Seo i sar. [77])

Kada govorimo o sudbini PAH-ova nastalih u petrogenim ili pirogenim izvorima, kretanje PAH-ova u životnoj sredini je komplikovanije (slika 1.3) [77].

Nepotpunim sagorevanjem organske materije, bilo prirodnim ili antropogenim putem, PAH-ovi se ispuštaju u atmosferu, gde nošeni vazдушnim strujama mogu da budu transportovani daleko od izvora emisije. Kada se nađu u atmosferi, PAH-ovi su zastupljeni ili u gasnoj fazi ili adsorbovani na aerosolima ili raspodeljeni između ove dve faze, zavisno od njihove veličine, isparljivosti, rastvorljivosti, kao i od temperature i vlažnosti sredine, veličine i površine čestica na kojim se adsorbuju. Laki PAH-ovi (sa 2-3 benzenova prstena) nalaze se uglavnom u gasovitoj fazi, dok se teži PAH-ovi (4-6 benzenova prstena) adsorbuju na čestice. Uklanjanje PAH-ova iz atmosfere može se postići suvim ili mokrim postupkom taloženja, što zavisi od njihovih fizičko-hemijskih karakteristika (rastvorljivost u vodi, napona pare itd.), čestično-gasne raspodele i meteoroloških uslova [78,79]. Uglavnom su PAH-ovi u gasnoj fazi rastvorljivi u vodi i nalaze se u oblacima i kišnim kapima odakle se mokrim taloženjem uklanjaju iz atmosfere [80,81]. PAH-ovi adsorbovani na česticama uklanjaju se precipitacijom, a sam mehanizam zavisi od veličine čestice na kojoj su adsorbovani [82–84]. Degradacija PAH-ova, foto-oksidacijom, može da predstavlja faktor koji značajno utiče na koncentraciju PAH-ova u atmosferi. Brojne studije pokazuju da su PAH-ovi koji se nalaze u gasnoj fazi podložniji ovim reakcijama, nego oni koji se nalaze adsorbovani na česticama [85,86].

Dalja sudbina PAH-ova zavisi od ekosistema u kome su se nataložili. Ako se nalaze u zemljištu, na njihovo zadržavanje utiče količina organske materije [87]. Jedna grupa autora [88–91] smatra da se PAH-ovi adsorbuju na organsku materiju u zemljištu i zadržavaju, dok drugi [92–95] u svojim studijama ne ukazuju ovakvu uzročno-posledičnu vezu. Bucheli, Brandli i Nam smatraju da količina organske materije utiče na zadržavanje lakših PAH-ova [96–98]. Usled slabe rastvorljivosti PAH-ova u vodi, smatra se da su adsorbovani na organskim česticama [99].

Naravno, ne treba zanemariti uticaj živih organizama na transport PAH-ova u životnoj sredini, o čemu će biti reči kasnije (vidi poglavlje 1.5.1).

1.5 Uklanjanje PAH-ova

Poslednjih godina uporedo sa porastom obima industrije kao i sve većom zastupljenošću hemijske industrije na bazi prerade nafte i naftnih derivata raste i zagađenje životne sredine organskom materijom. Kako bi se uklonila nastala zagađenja, sve više pažnje se posvećuje razvoju tehnika za dekontaminaciju.

Danas su PAH-ovi jedni od najrasprostranjenijih zagađivača i prisutni su u svim ekosistemima. Okarakterisani su kao perzistentni organski zagađivači (*engl.* Persistent Organic Pollutants- POPs). Usled njihove hidrofobne prirode, teže se rastvaraju ili uopšte ne rastvaraju u vodi i imaju tendenciju da se zadržavaju na česticama, od kojih se teško odvajaju. Takođe, uticaj fizičkih i hemijskih parametara životne sredine (temperatura, pH, količina kiseonika, prisustvo drugih organskih zagađivača ili teških metala, tip i struktura zemljišta) može da utiče na njihovo zadržavanje u životnoj sredini [100,101].

Najpoznatiji načini uklanjanja PAH-ova iz životne sredine su:

- Biodegradacija-bioremedijacija (bakterije, gljive, alge i biljke),
- Fizičko-hemijske metode
 - Fotooksidacija
 - Elektrooksidacija
 - Hemijska oksidacija
 - Isparavanje
 - Ispiranje
 - Adsorbcija.

Svaki od nabrojanih načina za uklanjanje PAH-ova različitom brzinom degradira pojedinačne PAH-ove, zavisno od njihove strukture, a samim tim i njihovih fizičkih i hemijskih karakteristika [102,103].

1.5.1 Biodegradacija

Biodegradacija PAH-ova je spor proces. PAH-ovi treba da budu rastvoreni ili da se nalaze u gasnoj fazi, kako bi bili dostupni živim organizmima da ih unesu i metabolički degradiraju. Daljim podešavanjem uslova u životnoj sredini

(dostupnost kiseonika, vlažnosti, sadržaja hranljivih sastojaka i surfaktanta) optimizuje se biodegradacija PAH-ova [104–106].

Veliki broj bakterija, gljiva i algi sposobno da razlaže PAH-ove. Ovi procesi uglavnom su uslovljeni prisustvom kiseonika, mada se danas ispituju i anaerobni uslovi degradacije [107,108]. Brzina razlaganja PAH-ova opada sa porastom broja prstenova i pojavom angularnosti. Takođe sa porastom broja prstenova smanjuje se broj organizama koji su sposobni da razgrade PAH-ove. Detaljniji pregled organizama koji degradiraju PAH-ove prikazan je u tabeli 1.3. [107].

Tabela 1.3. Pregled organizama koji razgrađuju PAH-ove

Jedinjenje	Organizmi
PAH-ovi	Bakterije <i>Beijerinckia sp., Mycobacterium sp., Alcaligenes sp., Beijerinckia sp., Pseudomonas sp., Streptomyces sp., Microeococcus sp., Mycobacterium sp.</i>
	Gljivice <i>Aspergillus sp, Candida sp., Cunninghamella elegans, Penicillium sp., Phanerochaete chrysosporium, Ramaria sp., Trametes versicolor, Trichoderma viride, Smittium sp.</i>
	Alge <i>Oscillatoria sp., Anabaena sp., Cylinthotheca sp., Amphora sp., Nitzschia sp., Synedra sp., Navicula sp., Agmenillum quadruplicatum, Selenastrum capricornutum</i>

Proizvodi degradacije PAH-ova su razni metaboliti, koji mineralizacijom prelaze u neorganska jedinjenja, vodu, ugljen-dioksid (u aerobnim procesima) ili metan (u anaerobnim procesima) i energiju potrebnu za ćelijski rast i razvoj. Enzimi koji su uključeni u metaboličke procese razgradnje PAH-ova uglavnom su oksidaze, dehidrogenaze i lignolitički enzimi. Do danas mnogi metabolički putevi nisu u potpunosti razjašnjeni, tako da lista enzima koji učestvuju u njima nije konačna [109].

Upotreba biljaka u cilju uklanjanja zagađivača iz životne sredine naziva se fitoremedijacija. Biljke akumuliraju zagađujuće materije u korenu ili listovima, ili u koegzistenciji sa mikroorganizmima degradiraju PAH-ove [110]. Takođe, pojedine vrste leguminoza i trava (*Agropyron smithii*, *Bouteloua gracilis*, *Cyanodon dactylon*, *Elymus Canadensis*, *Festuca arundinacea*, *Festuca rubra*, *Melilotus officinalis*) mogu direktno da razgrađuju PAH-ove. Postoje i indirektni načini razgradnje PAH-ova, kada biljke iz korena ispuštaju enzime i hemijska reakcija se odvija u zemljištu [111].

1.5.2 Fizičko-hemijske metode za uklanjanje PAH-ova

U fizičko-hemijske metode ubrajaju se metode oksidacije, i to su : hemijska, fotooksidacija i pojedini napredni oksidacijski procesi (*engl.* Advanced Oxidation Processes- AOPs).

1.5.2.1 Hemijska oksidacija

Hemijska oksidacija ima za cilj mineralizaciju zagađivača pomoću oksidacionih sredstava do ugljen-dioksida, vode i neorganskih produkata ili njihovu transformaciju do netoksičnih produkata. Najčešće korišćena oksidaciona sredstva su ozon, permanganati, persulfati, vodonik-peroksid, Fentonov reagens (H_2O_2 u kombinaciji sa gvožđem) [112–114].

Primena hemijske oksidacije je uslovljena specifičnim uslovima koji su potrebni za njeno izvođenje, npr. pH sredine, ograničenja transferom mase. Osnovni nedostak metode je upotreba hemikalije, tako da se ne može reći da je pogodna za životnu sredinu [7].

1.5.2.2 Fotooksidacija

Kao što je prethodno naglašeno (vidi poglavlje 1.2.-Fizičko-hemijske osobine PAH-ova), PAH-ovi su osetljivi na svetlost. Apsorbicijom UV zračenja dolazi do njihove fotooksidacije i razgradnje. Fotooksidacija može da se odvija direktno, apsorbovanjem UV zračenja od strane PAH-ova ili indirektno, kada je fotooksidacija posredovana sa drugom supstancom koja takođe apsorbuje UV zračenje [8,27,28,115].

Za razliku od hemijske oksidacije ili elektrooksidacije, prilikom fotooksidacije ne dolazi do potpune razgradnje PAH-ova (do ugljen-dioksida, vode i neorganskog ostataka). Produkti ovih fotorazlaganja PAH-ova najčešće su hinoni, i ređe njihovi hidroksilovani derivati. Molekulska struktura PAH-ova određuje brzinu njihovog razlaganja fotooksidacijom. Sa porastom molekulske mase i kondezacije prstenova, raste i brzina fotolize [8,116,117]. Nastali produkti mogu da budu toksični po živi svet [8–10,118].

1.5.2.3 Napredni oksidacioni procesi (AOPs)

Tretiranje prezistentnih organskih zagađivača konvencionalnim tehnikama (hemijska oksidacija, fotoliza, ozonizacija, adsorpcija) ne dovodi uvek do njihove potpune razgradnje. Njihovom primenom mogu nastati i ekotoksičniji produkti koji su potencijalni uzročnici negativnih efekata na zdravlje živih organizama [6]. Stoga se, poslednjih decenija, značajna pažnja posvećuje upravo razvoju efektivnijih tehnika za uklanjanje organskih zagađivača. Posebno se izdvajaju napredni oksidacioni procesi (*engl.* Advanced Oxidation Processes- AOP). AOP se zasnivaju na *in situ* generisanju visoko reaktivnih vrsta, poput hidroksilnih radikala ($\cdot\text{OH}$). Ovi moćni oksidacioni agensi sposobni su efikasno ($10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) da degradiraju jedinjenja sa aromatičnim prstenovima, kao što su PAH-ovi [11]. U AOPs se ubrajaju [6,119–122]:

- H_2O_2 sa UVC zračenjem,
- Procesi bazirani na ozonu - O_3 , O_3/UVC , $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVC}$,
- Procesi bazirani na poluprovodnim metalima i njihovim oksidima - (TiO_2 , ZnO , WO_3 , NiO , BiTiO_3)/UV, (TiO_2 , ZnO , WO_3 , NiO , BiTiO_3)/ H_2O_2 /UV,
- Procesi bazirani na Fentonovoj metodi- Fenton - $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, foto Fenton- $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$,
- Elektrohemijski napredni procesi oksidacije (elektrohemijska oksidacija)- anodna oksidacija (AO), AO sa elektrogenerisanim H_2O_2 , elektro-Fenton, fotoelektro-Fenton, solarni fotoelektro-Fenton.

1.5.2.3.1 Elektrohemijska (anodna) oksidacija

Usled različitih fizičko-hemijskih karakteristika zagađujućih materija, ne postoji jedinstvena strategija za njihovo uklanjanje. Kao alternativna tehnika, koja se sve više razvija, navodi se elektrohemijska (anodna) oksidacija. Osnovna prednost elektrohemijske oksidacije je što se za oksidaciju organskih zagađivača koristi samo električna energija, ali ne i hemikalije. U tom smislu, elektrohemijska metoda je bezbedna za životnu sredinu jer se elektron smatra kao „čist“ reagens [123].

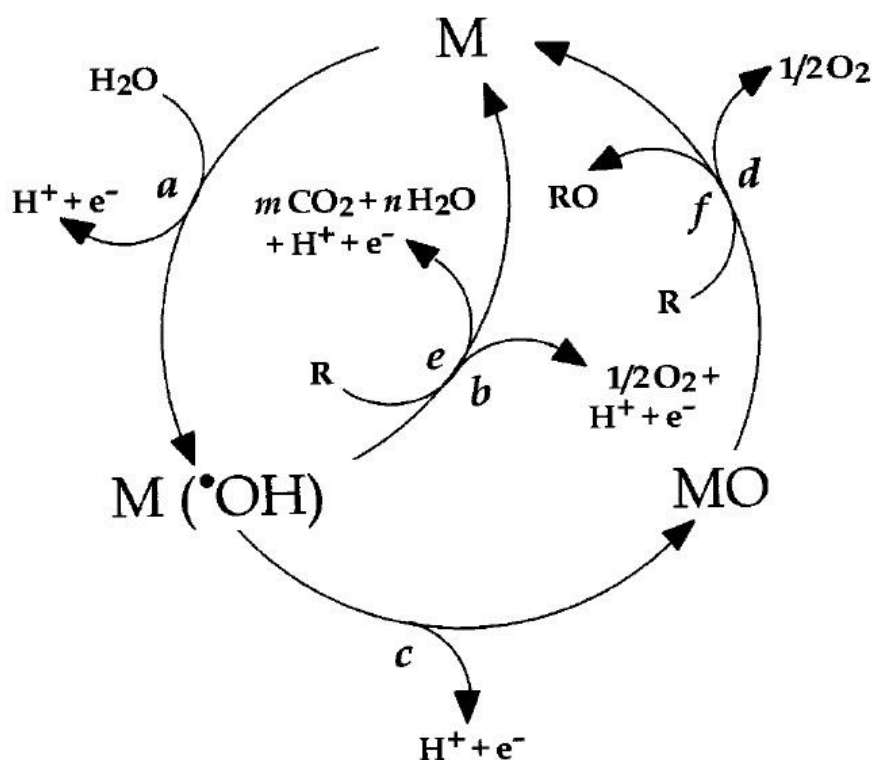
Elektrohemijska oksidacija predstavlja metodu pomoću koje se i najperzistentniji organski zagađivači potpuno mineralizuju ili se samo delimično degradiraju do oblika koji nisu toksični po životnu okolinu [123]. Poslednjih decenija, napori istraživača su usmereni na unapređenje elektrodnih materijala, ispitivanje efikasnosti oksidacije različitih zagađivača na elektrodama napravljenim od postojećih i nosintetisanih materijala, kao i na ispitivanja mehanizma i kinetike degradacije zagađivača [124,125].

Usled jednostavnosti i lake primenljivosti, elektrohemijska oksidacija se koristi za degradaciju organskih boja, organofosfornih pesticida, herbicida, fenola i naravno PAH-ova. U dosadašnjim istraživanjima, elektrohemijska oksidacija pokazala se kao efikasna tehnika za tretiranje kompleksnih kontaminiranih medijuma [123,126–131].

Anodna oksidacija organskih molekula može da se odvije na sledeće načine: direktnom oksidacijom na anodi i indirektnom oksidacijom preko reaktivnih kiseoničnih vrsta formiranih na anodi [7].

Direktnom oksidacijom tj. direktnim transferom elektrona na anodu, dolazi do razgradnje organskih molekula posle njihove adsorpcije na površinu anode. U reakciji direktne anodne oksidacije koriste se samo elektroni, ne i hemikalije. Ovi procesi uglavnom ne daju dobre rezultate zato što se na elektrodi stvaraju slojevi polimera i vremenom se smanjuje njena efikasnost.

Prilikom indirektno anodne oksidacije voda se oksiduje na površini anode (M) i stvaraju se adsorbovani hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$) (slika 1.4-a).



Slika 1.4. Šema indirektne oksidacije organskih jedinjenja: **a**-oksidacija vode do hidroksila radikala; **b**-reakcija izdvajanja kiseonika, koja je u konkurenciji sa reakcijom **e**; **c**-formiranje tzv. višeg metalnog oksida; **d**-reakcija izdvajanja kisonika; **e**- kompletna oksidacija organskih jedinjenja sa hidroksil radikalima; **f**- nepotpuna oksidacija organskih jedinjenja pomoću oksida metala (preuzeto i modifikovano iz Marselli i sar. [132]).

U zavisnosti da li se stvaraju fizisorbovani ili hemisorbovani hidroksi radikali, elektrohemijaska reakcija potpuno ili delimično razgrađuje organske zagađivače. Fizisorbovani hidroksil radikali su posle fluoridnog jona najjače oksidaciono sredstvo i dovode do potpune degradacije organskih jedinjenja do ugljen-dioksida i vode, dok hemisorbovan hidroksi radikal selektivno oksiduje organska jedinjenja i uglavnom ne dolazi do njihove potpune degradacije [133].

Jačina interakcije, tj. reaktivnost hidroksil radikala ka anodi, a samim tim i efikasnost i selektivnost anode, uslovljena je prirodom materijala anode. Komninelis i saradnici su predložili dve klase elektroda- aktivne i ne-aktivne elektrode [132].

Kod aktivnih elektroda jača je interakcija između površine elektrode i hidroksilnih jona (hemisorpcija je izraženija), i obrazuju se tzv. viši metalni oksidi (MO) (slika 1.4.-c). Redoks par MO/M se ponaša kao posrednik u reakciji oksidacije organskih jedinjenja, kao što je prikazano na slici 1.4.-f. Ova reakcija je u kompeticiji sa sporednom reakcijom izdvajanja kiseonika razlaganjem viših oksida. (slika 1.4.-d) [6,7,122,132–135].

Kod ne-aktivnih elektroda usled slabih interakcija hidroksil radikala sa površinom elektrode, oksidacija organskih jedinjenja direktno je izvršena sa hidroksilnim radikalima (slika 1.4.-e). Tokom ove reakcije organska jedinjenja uglavnom su potpuno oksidovana tj. mineralizovana. Takođe, reakcija je u kompeticiji sa reakcijom izdvajanja kiseonika (slika 1.4.-b)[122,136].

Tokom indirektno oksidacije iz rastvora mogu da se generišu i druge reaktivne vrste koje reaguju sa organskim jedinjenjima i razgrađuju ih. Aktivne vrste hlora (hlor, hipohlorasta kiselina, hipohloriti), ozon i persulfati, nastaju anodnom oksidacijom, dok vodonik-peroksid može da nastane katodnom redukcijom [137].

Usled zastupljenosti hlora u raznim kontaminiranim medijumima (voda, zemljište), elektrohemijaska oksidacija posredovana hlorom je veoma česta. Od pH vrednosti medijuma u kom se odvija elektrohemijaska oksidacija i anodnog materijala zavisi koja će aktivna vrsta hlora biti zastupljena [6,7,133].

1.5.2.4 Elektrohemijaska degradacija u čvrstim matriksima

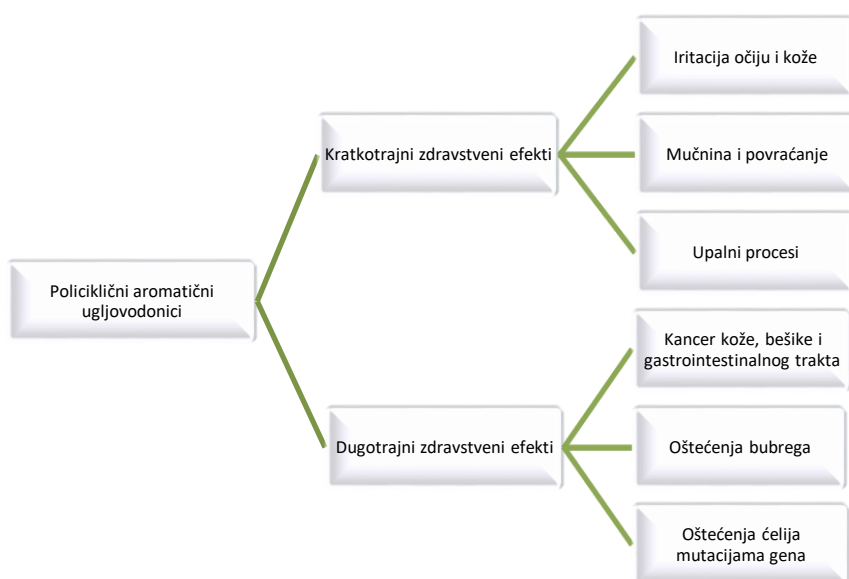
Elektrohemijaska degradacija ili remedijacija (*engl.* Electrochemical remediation technologies - ECRT) kako se u literaturi navodi, predstavlja postupak uklanjanja organskih i neorganskih zagađivača dovođenjem jednosmerne struje na izvode elektroda postavljenih u kontaminirani medijum. Uspostavljanjem gradijenta električnog polja u međuelektrodnoj sredini dolazi do elektromigracije jona (kretanje jona pod dejstvom gradijenta električnog polja) elektroosmoze molekula vode, elektroforeze (kretanje koloidnih čestica) i elektrolize vode (izdvajanje gasovitog vodonika i hidroksilnih jona na katodi i gasovitog kiseonika i jona vodonika na anodi) [138,139].

ECRT tehnologija se uspešno koristi za uklanjanje neorganskih i organskih zagađivača iz kontaminiranog zemljišta, sedimenta i podzemnih voda, *ex situ* (postavljanjem nadzemnog reaktora) i *in situ* (postavljanjem reaktora u bušotine) tehnikom [140]. Prema literaturnim podacima elektrohemijska degradacija se efikasno primenjuje i na uklanjanje PAH-ova i drugih cikličnih ugljovodonika sa temperaturom ključanja iznad 200°C [101,141].

1.6 Uticaj PAH-ova na žive organizme

Iako su PAH-ovi rasprostranjeni u životnoj sredini, oni nisu produkti živih organizama, niti imaju specifičnu ulogu u istim. Efekat koji imaju na živa bića zavisi od vremena izlaganja, koncentracije i toksičnosti smeše PAH-ova kojoj su izloženi, kao i od načina izlaganja. Osnovni načini izlaganja PAH-ovima su ingestija (unošenje hranom i vodom), inhalacija (udisanje ambijentalnog vazduha, pušenje) i direktnim kontaktom preko kože [142–145].

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da uticaj PAH-ova na živa bića može izazvati akutne (kratkotrajne efekte) i hronične (dugotrajne efekte) zdravstvene probleme (slika 1.5.).



Slika 1.5. Pregled kratkoročnih i dugoročnih zdravstvenih efekata izazvanih PAH-ovima

Akutni zdravstveni problemi usled izlaganja PAH-ovima manifestuju se iritacijom kože i očiju, mučninom i povraćanjem, a primećeno je i da utiče na smanjenje funkcije pluća kod astmatičara.

Hronični zdravstveni problemi se ogledaju u oštećenjima bubrega i jetre, problemima prilikom disanja, kao i smanjenju imunog odgovora. Dugotrajnim izlaganjem PAH-ovima, povećava se rizik od dobijanja raka kože, pluća, bešike i gastrointestinalnog trakta.

Prema US EPA sledeći PAH-ovi su izdvojeni kao potencijalni izazivači kancera kod ljudi: benzo(a)antracen, krizen, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, indeno(1,2,3-cd)piren [145–147].

Nakon ulaska u organizam, PAH-ovi cirkulišu kroz telo putem limfe i krvi. Usled lipofilne strukture, lako ulaze u ćelije (pasivnom difuzijom) i mogu da se akumuliraju u majčinom mleku i adipoznom tkivu [148].

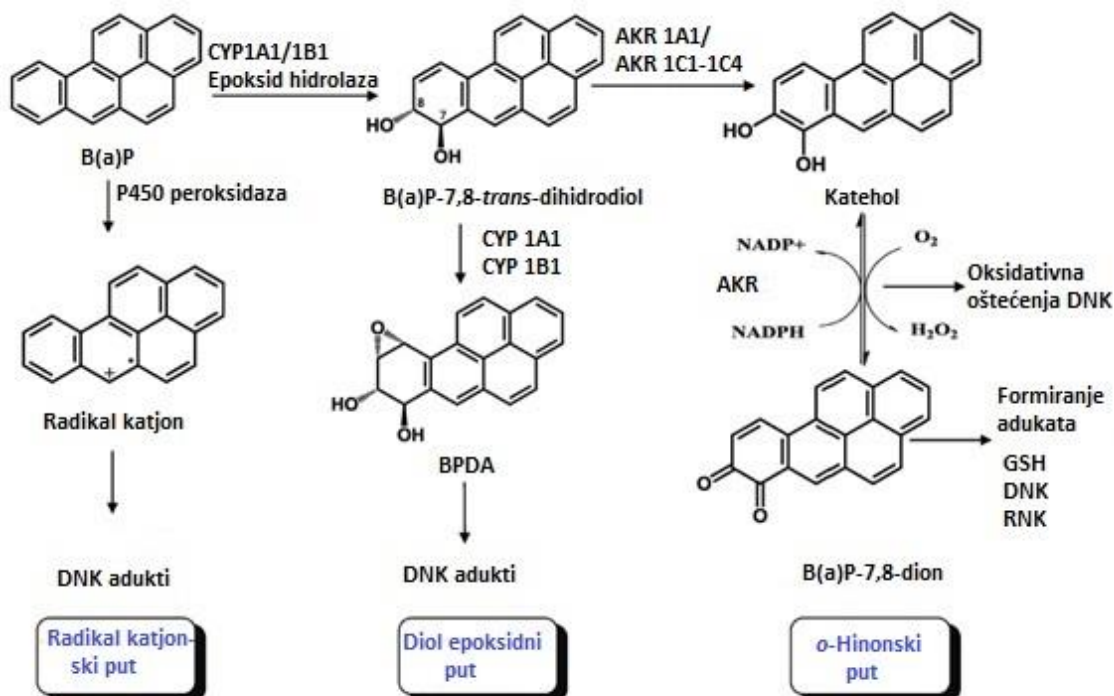
Policiklični aromatični ugljovodonici se smatraju toksičnim, sa potencijalnim prokancerogenim i promutagenim efektima. Da bi se eliminisali iz organizama, PAH-ovi se prevode u polarne derivate. Ovaj proces se odvija najvećim delom u jetri. Biotransformacija PAH-ova obuhvata dve uzastopne faze: fazu funkcionalizacije (aktivacije) i fazu konjugacije. Nažalost, u zavisnosti od vrste PAH-a i metaboličkog puta kroz koji prođe, određeni PAH-ovi postaju kancerogeni i mutageni po organizam.

Osnovni metabolički putevi preko kojih se transformišu PAH-ovi su [4]:

- Diol epoksidni put,
- P450 peroksidazni put (Radikal katjonski put),
- Aldo-keto reduktazni put (*o*-hinonski put).

Diol epoksidni put se odlikuje epoksid hidrolazom, kao i enzimima iz citohrom P450 familije (CYP1A1/2 i CYP1B1). Najveće koncentracije ovih enzima su pronađene u jetri, mada se mogu naći i u plućima, crevima, koži, limfocitima i placenti [149]. Na slici 1.6. prikazana je aktivacija benzo(a)pirena diol epoksidnim putem. Benzo(a)piren se transformiše u BP-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksid (BPDE), koji reaguje sa DNK i formira DNK adukte. Ovi adukti su pronađeni u plućnom

tkivu pušača i mogu uzrokovati mutacije na p53 tumor supresorskom genu. Mutacije na p53 genu vode do kancerogeneze i uzrokuju rak pluća [150,151].



Slika 1.6. Metabolički putevi aktivacije PAH-ova na primeru benzo(a)pirena (preuzeto i modifikovano iz Zhang i sar. [152])

Radikal katjonski put karakterišu peroksidaze koje katalizuju oksidaciju PAH-ova. Kao produkti reakcije nastaju kratkoživeći derivati PAH-radikal katjoni [148,152]. PAH-radikal katjoni su jaki elektrofil i vezuju se za N7-, N3- ili C8-pozicije purinskih baza i formiraju stabilne PAH-DNK adukate. Ovo destabilizuje N-glikozilnu vezu, što dovodi do depurinacije baza iz DNK lanca.

Takođe, PAH-radikal katjoni podležu hidroksilaciji i prelaze (enzimski ili neenzimski) u odgovarajuće hinone. Hinoni ulaze u redoks ciklus, što dovodi do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i oštećenja na DNK lancu [4,153]. Melendez-Colon i saradnici sugerišu da depurinacija DNK lanca i stvaranje PAH-DNK adukata nije primarni put ka kancerogenezi [154,155]. Mnogo veća šteta ćelijima se nanosi oksidativnim DNK lezijama [4].

Aldo-keto reduktazni put (o-hinonski put) je dobio ime po aldo-keto reduktazama, osnovnim enzimima koji učestvuju u ovom metaboličkom putu aktivacije PAH-ova. Aldo-keto reduktaze pripadaju porodici NAD(P)(H)-zavisnih oksido-reduktaza. One katalizuju transformaciju PAH-ova u odgovarajuće ketole, koji nizom reakcija prelaze u katehole i na kraju u o-hinone. Prilikom ove reakcije troši se molekularni kiseonik i nastaju reaktivne kiseonične vrste (superoksid anjon radikal, hidroksil radikal i vodonik-peroksid) koje uzrokuju DNK lezije. Ulaskom PAH-o-hinona u redoks ciklus ćelije, povećava se koncentracija produkata lipidne peroksidacije, koji reaguju sa DNK. Takođe mogu da nastanu i PAH-DNK adukti koji izazivaju depurinaciju DNK zavojnice [4,152,156–159].

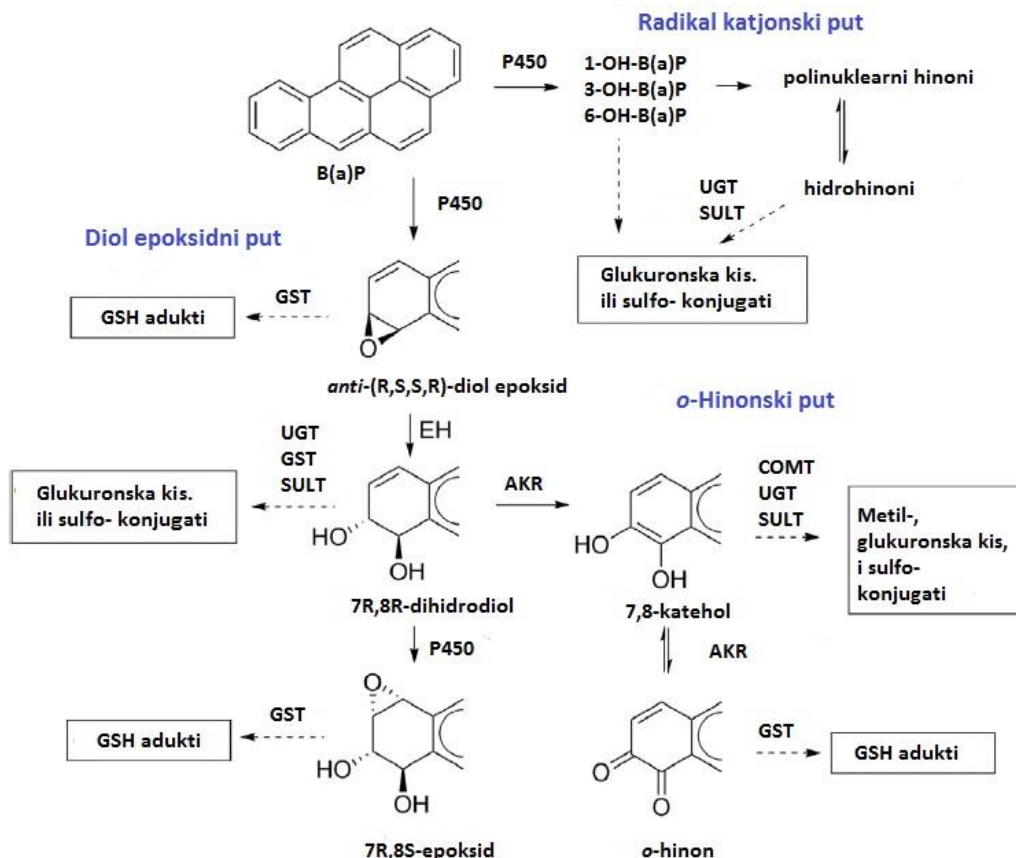
Sumarno, produkti osnovnih metaboličkih puteva aktivacije PAH-ova su proizvodi oksidacije, poput fenola, katehola, hinona, radikal katjona, diol epoksida. Ovi reaktivni metaboliti reaguju sa DNK lancima, stvarajući stabilne DNK adukate, što dovodi do nasledne DNK mutacije, abnormalne genske ekspresije ili kancerogeneze [4,150]. Takođe, navedeni metaboliti mogu da formiraju adukate sa proteinima u ćeliji, kao što su albumin i hemoglobin, što dovodi do poremećaja u njihovim funkcijama [160,161]. Kao što je prethodno navedeno, derivati PAH-ova izazivaju porast u koncentraciji reaktivnih kiseoničnih vrsta i samim tim utiču na funkciju DNK, lipida ili proteina i iniciraju kancerogenezu [4,150,162].

U cilju sprečavanja ili u nekim slučajevima ublažavanja štetnosti produkata metaboličkih puteva aktivacije PAH-ova, za njom sledi faza konjugacije. Tom prilikom, nastaju konjugati, rastvorni derivati aktiviranih PAH-ova pomoću kojih se oni izbacuju iz organizma (slika 1.7.).

Elektrofilni metaboliti, poput aren epoksida, diol epoksida i o-hinona, formiraju uglavnom glutationske konjugate. Ove reakcije su katalizovane glutation-S-transferazama (GST). Glutationski konjugati se izlučuju u žuč ili se prevode u merkapturane kiseline i izbacuju putem urina.

Fenoli, dihidrodiole, hidrohini i kateholi se izlučuju u obliku glukuronskih i sulfo-konjugata. Glukuronacija fenola, dihidrodiole, hidrohina i katehola katalizovana je UDP glukuronil transferazama (UGT) najvećim delom u jetri, bubrezima i crevima. Sulfotransferaze (SULT) takođe doprinose detoksikaciji ovih metabolita iz

organizma. Kateholi su specifični jer se njihova detoksikacija primarno izvodi preko *o*-metilacije katehol-*O*-metil transferazama (COMT) [4,149,163].



Slika 1.7. Detoksikacija derivata PAH-ova na primeru benzo(a)pirena (preuzeto i modifikovano iz Murray i sar. [4])

1.6.1 Oksidativni stres kao pokazatelj toksičnosti

Reaktivne kiseonične vrste nastaju u organizmu kao rezultat interakcije normalnog ćelijskog metabolizma i uticaja životne sredine u kojoj se organizam nalazi. Ukoliko koncentracija ovih reaktivnih kiseoničnih vrsta nije kontrolisana antioksidativnim sistemom odbrane, dolazi do oštećenja proteina, lipida i nukleinskih kiselina (DNK i RNK), što dovodi do citotoksičnosti, genotoksičnosti i eventualno do kancerogeneze [164,165]. Promena ravnoteže u ćeliji, u korist oksidanata (ROS) u odnosu na antioksidante, nazivamo "oksidativni stres". Oksidativni stres doprinosi mnogim patološkim stanjima i bolestima uključujući

kancer, neurološke poremećaje, aterosklerozu, hipertenziju, dijabetes, sindrom akutnog respiratornog poremećaja, idiopatsku pulmonarnu fibrozu i astmu [166].

Oksidativni stres može biti indukovano na sledeće načine [163]:

- Prisustvom ksenobiota kao što su hemijski zagađivači, lekovi i dr,
- Aktivacijom imunog sistema kao odgovor na prisustvo mikroorganizama u telu,
- Jonizujuće zračenje.

Održavanje ove delikatne ravnoteže u ćeliji, ključno je za njenu vijabilnost, aktivaciju, proliferaciju. Aerobni organizmi imaju integrisane antioksidativne sisteme odbrane koji su u stanju da blokiraju štetne uticaje ROS-a.

Antioksidativni sistemi odbrane mogu se podeliti na [167,168]:

- Neenzimske
 - Vitamin E,
 - Vitamin C,
 - Mokraćna kiselina,
 - β -Karoten,
 - Glutation.
- Enzimske
 - Superoksid dismutaza,
 - Glutation peroksidaza,
 - Glutation reduktaza,
 - Katalaza.

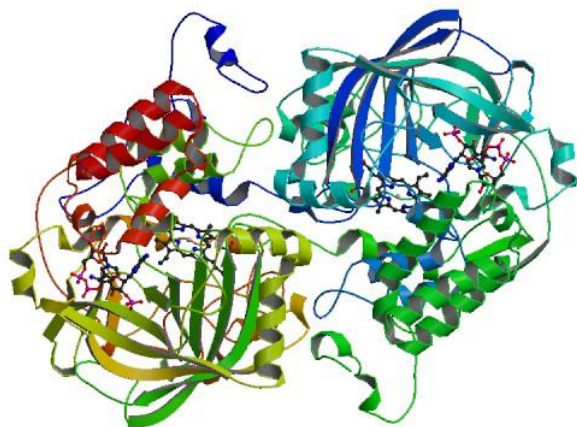
1.6.1.1 Aktivnost katalaze - parametar oksidativnog stresa u ćelijama

Katalaza (EC 1.11.1.6.) je antioksidativni enzim koji katalizuje razgradnju vodonik peroksida (H_2O_2) do vode i molekuskog kiseonika (jednačina 1.1)[169]:



Prisutna je kod aerobnih organizma, mada se može naći i kod nekih anaerobnih. U ćeliji se uglavnom nalazi u peroksizomima, mada se može naći i u

citosolu, kod eritrocita. Ona predstavlja prvu liniju ćelijske antioksidativne odbrane.



Katalaze su tetramerni proteini. Četiri subjedinice vezuju molekule hema na aktivnom mestu. U uslovima spore produkcije vodonik-peroksida može da oksiduje H⁺ donore uz utrošak jednog molekula H₂O₂. Inhibitori katalaza su azidi, aminotriazoli i cijanidi, koji se vezuju za molekule gvožđa u hemu [170,171].

Slika 1.8. Struktura katalaze iz ljudskih eritrocita (preuzeto iz Safo i sar. [172])

1.6.1.2 Malondialdehid kao parametar oksidativnog oštećenja lipida

Malondialdehid (MDA) predstavlja krajnji produkt lipidne peroksidacije ćelijskih membrana. Njegova koncentracija je direktan pokazatelj inteziteta oksidativnog stresa kome je ćelija izložena i zato se pri ispitivanju toksičnog dejstva raznih ksenobiotika uzima u obzir.

Inicijalni produkti oksidacije nezasićenih masnih kiselina su lipidni hidroperoksidi, koji podležu redukciji glutation peroksidazom do nereaktivnih alkohola, ili reaguju sa metalima pri čemu nastaju veoma reaktivni produkti (epoksidi, aldehidi itd.). Najčešći aldehidni produkti lipidne peroksidacije su: malondialdehid, čiji adukt na DNK bazama izaziva bazne zamene i „frameshift“ mutacije i 4-hidroksinonenal (HNE) sa ulogom u signalnoj transdukciji [173,174].

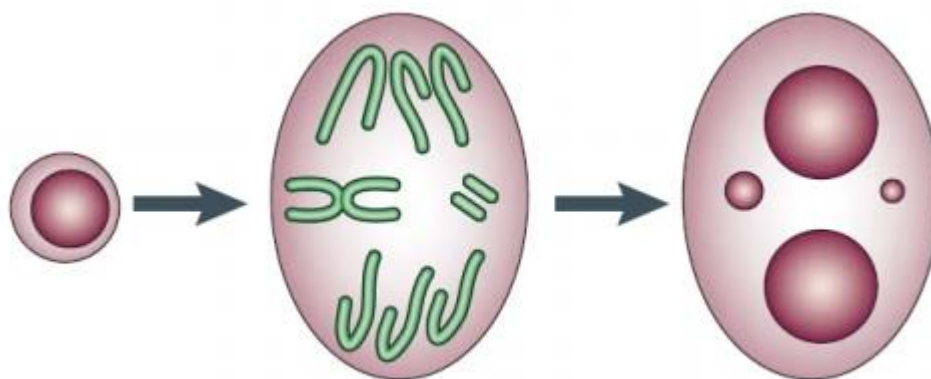
Zahvaljujući polarnoj strukturi malondialdehid lako prolazi kroz membranu jedra i kovalentno se vezuje za DNK, stvarajući insercije i delecije. Takođe reaguje i sa slobodnim amino grupama proteina i utiče na njihovu funkcionalnost.

Sve ovo narušava strukturu, a samim tim i funkciju ćelijske membrane, što vodi do niza citopatoloških efekata [175,176].

1.6.1.3 Određivanje učestalosti mikronukleusa i proliferativnog potencijala ćelije kao pokazatelj citotoksičnih efekata

Mikronukleusi (MN) predstavljaju acentrične hromozomske fragmente ili cele hromozome koji su zaostali posle ćelijske deobe, jer nisu uspeli da se vežu za deobno jedro. U ćeliji ih možemo videti kao male, dodatne nukleuse [177].

Za analizu mikronukleusa najčešće se koristi citokinezis-blok mikronukleus test (CBMN). Metodologija citokinezis-blok mikronukleus testa se zasniva na blokiranju citokineze limfocita periferne krvi *in vitro* upotrebom citohalazina B kao aktinskog inhibitora, bez remećenja biohemijskih procesa unutar ćelije. Mikronukleusi se mogu zapaziti u ćelijama (slika 1.9.) koje su prošle kroz jednu deobu, a prepoznaju se po binuklearnom izgledu – binukleusne ćelije.



Slika 1.9. Formiranje mikronukleusa

CBMN testom može se analizirati nekoliko hiljada ćelija, što metodu čini preciznom i statistički pouzdanom, tako da se često koristi prilikom biomonitoringa životne sredine.

Ovaj test se koristi za procenu genotoksičnosti, ali i citotoksičnosti, preko izračunavanjem indeksa nuklearne deobe (Nuclear Division Index - NDI) koji predstavlja meru proliferativnog statusa viabilnih ćelija (citokinezis-blok proliferativni indeks – CBPI). Indeks nuklearne deobe je indikator citotoksičnih

efekata ispitivanih agenasa i mitogenog odgovora kao važnog biomarkera imunološke funkcije limfocita [178,179].

2 CILJ RADA

Cilj istraživanja doktorske disertacije je razvijanje nove, efikasne, neinvazivne metode za uklanjanje PAH-ova iz betona, koja je zasnovana na elektrohemijskoj oksidaciji. Da bi se osigurala bezbednost metode za praktičnu primenu, posebna pažnja posvećena je proceni toksičnosti PAH-a i njihovih produkata razgradnje nastalih tokom procesa elektrooksidacije.

U skladu sa postavljenim ciljem prvi deo istraživanja obuhvata elektrohemijsku degradaciju PAH-ova. U okviru prvog dela, postavljeni su sledeći zadaci:

- Elektrohemijska oksidacija u laboratorijskim uslovima,
- *In situ* potenciostatska oksidacija PAH-ova u betonu i
- Razvoj i validacija metode za praćenje PAH-ova tokom elektrohemijske oksidacije.

Drugi deo istraživanja odnosi se na procenu toksičnosti PAH-ova i njihovih proizvoda razgradnje određivanjem citotoksičnog i genotoksičnog potencijala na limfocitima i eritrocitima periferne krvi čoveka. Ispitivanje toksičnosti obuhvata sledeće zadatke:

- Određivanje učestalosti mikronukleusa,
- Određivanje proliferativnog indeksa,
- Određivanje količina malondialdehida i
- Određivanje aktivnosti katalaze.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Rastvarači i reagensi

Tokom izrade eksperimenata predstavljenih u tezi, korišćene su sledeće hemikalije:

- Aceton (Zorka Pharma)
- Acetonitril (J. T. Baker)
- Azot 5.0 (Messer Tehnogas)
- Bakar-sulfat (Merck)
- $C_4H_4KNaO_6$ (Sigma-Aldrich)
- Citohalazin B (Sigma-Aldrich)
- Etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina –EDTA (Sigma-Aldrich)
- Fiziološki rastvor (Hemofarm)
- Folin-Ciochalaten´s fenol reagens(Merck)
- Fosfatni pufer (PBS, Bioatlas)
- Gimza (Merck)
- Hlorovodonična kiselina (Merck)
- $K_3Fe(CN)_6$
- Kalijum-hlorid (Merck)
- KCN (Sigma-Aldrich)
- KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich)
- Metanol (J. T. Baker)
- Natrijum hidroksid (Merck)
- Natrijum-dodecil-sulfat –SDS (Merck)
- Natrijum-hlorid (Merck)
- Natrijum-sulfat, 99% anhidrovani (Merck)
- n-Butanol (J. T. Baker)
- n-heksan (Carlo Erba)
- Sirćetna kiselina (J. T. Baker)

- TBA (Merck)
- TRIS (Merck)
- Vodoni-peroksid (Merck)

3.2 Standardi ispitivanih supstanci

- PAH-Mix 14 (1-metilnaftalen, 2-metilnaftalen, naftalen (Naph), acenaften (Acy), acenaftilen (Ace), fluoren (Fluo), fenantren (Phen), antracen (Ant), fluoranten (Flt), piren (Pyr), benzo(a)antracen (BaA), krizen (Chry), benzo(b)fluoranten (BbF), benzo(k)fluoranten (BkF), benzo(a)piren (BaP), dibenzo(a,h)antracen (DahA), indeno(1,2,3-cd)piren (IcdP) i benzo(g,h,i)perilen (BghiP)) u aceton/benzenu, koncentracije 2000 mg/l (Dr. EHRENSORFER GmbH)

3.3 Podloge

- PBmax hranljivi medijum (Invitrogen-Gibco)

3.4 Oprema

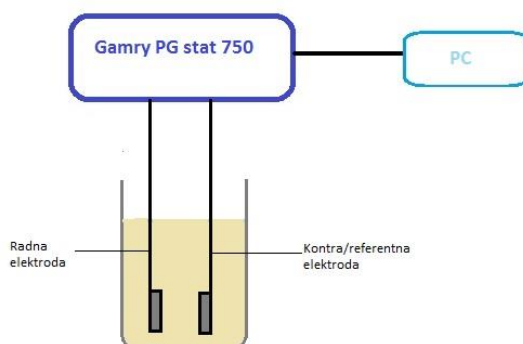
- Tečni hromatograf ultra visokih performansi- UPLC sa fotodiodnim nizom detektor (PDA) (Waters ACQUITY, USA)
- Gamry PG stat 750, (Gamry Instruments, USA)
- Rotacioni vakuum uparivač R-210 (Buchi, Švajcarska)
- Analitička vaga (Mettler Toledo, USA)
- Orbitalni šejker SSL 1 Stuart, (Bibby Scientific), UK
- Automatske mikropipete (Eppendorf, Nemačka)
- UV/VIS spektrofotometar Lambda 35, (Perkin Elmer, SAD)
- Optički mikroskop (Optech, Nemačka)
- Centrifuga (HERMLE, Nemačka)
- Inkubator (HERAEUS, Nemačka)

3.5 Elektrohemijska merenja

3.5.1 Elektrohemijska oksidacija u laboratorijskim uslovima

Elektrohemijska degradacija PAH-ova u laboratorijskim uslovima je izvedena u zatvorenoj, nepodeljenoj dvoelektrodnoj ćeliji, ukupne zapremine elektrolita od 100 ml sa parom elektroda od nikla. Elektrolit, očekivane koncentracije individualnih PAH-ova od 20 mg/l (1,87 mM), pripremljen je volumetrijskim razblaživanjem osnovnog rastvora PAH-ova koncentracije 2000 mg/l (187 mM) (PAH miks 14,) u 100 ml 10 % vodenog rastvora natrijum-hlorida (NaCl). Dodatkom NaCl obezbeđena je konstantna jonska jačina rastvora i zadovoljavajuća provodljivost elektrolita. Radi anuliranja razlika u realnim i očekivanim koncentracijama individualnih PAH-ova, koje potiču od razlike u rastvorljivosti istih u vodi, neposredno pre izvođenja elektrolize eksperimentalno je određena realna koncentracija korišćenjem UPLC-PDA tehnike (vidi odeljak 3.3.5).

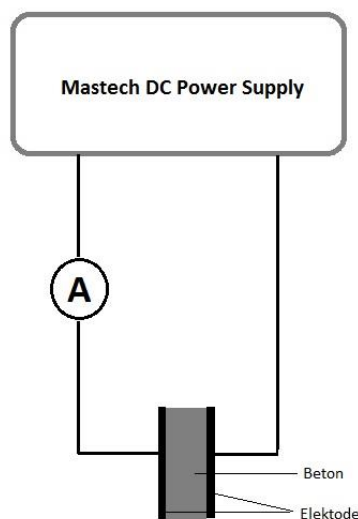
U cilju ispitivanja elektrohemijske stabilnosti elektrolita i određivanja napona elektrolitičke ćelije na kojem dolazi do potencijalno moguće oksidacije PAH-ova, na postojeći sistem primenjena je metoda ciklične voltametrije. Ciklovoltametrijska merenja izvedena su na sobnoj temperaturi uz korišćenje Gamry PG stat 750 potenciostata/galvanostata brzinom promene potencijala 100 mV/s u opsegu potencijala od 0 do 1,1 V.



Slika 3.1. Šematski prikaz aparature za elektrohemijsku oksidaciju PAH-ova u vodenom rastvoru

3.5.2 *In situ* potenciostatska oksidacija PAH-ova u betonu

In situ istraživanja elektrohemijske oksidacije PAH-ova izvedena su na zidovima kontaminirane zgrade. Aplikacija navedenog elektrohemijskog postupka degradacije sprovedena je korišćenjem parova niklenih (Ni) i elektroda napravljenih od nerđajućeg čelika (SS), dimenzija 10,0 x 2,0 x 0,2 cm i aktivnih površina 10,0 x 1,0 cm. Elektrode su postavljene u zid, tačnije u udubljenja veličine 10x1cm koja su napravljena neposredno pred eksperiment, a u cilju obezbeđenja efikasnijeg kontakta elektroda-beton. Provodljivost čvrstog elektrolita je povećana kvašenjem zida sa 10 % vodenim rastvorom NaCl tokom 2 časa pre tretmana.



Slika 3.2. Šematski prikaz aparature za elektrohemijsku oksidaciju PAH-ova u betonu

U postavljenom eksperimentu kao izvor napajanja korišćen je potenciostat modela Mastech DC Power Supply pomoću koga je zadat i održavan potencijal između fiksiranih elektroda na vrednost 5 V/cm. Merenja jačine struje rađena su ručno, digitalnim ampermetrom na svakih 5 minuta tokom 1 časa.

3.6 Instrumenti i analitički uslovi

Hromatografske analize su rađene na tečnom hromatografu (UPLC-PDA). Za akviziciju i obradu podataka korišćen je softverski paket "Empower 2.0". Razdvajanje PAH-ova iz smeše izvedeno je na koloni Pinnacle DB PAH (1,9 μm , 100 x 2,1 mm)- RESTEK, koja je zagrejana na 35°C.

Eluiranje je vršeno gradijentno, pri protoku eluenta od 0,25 ml/min. Vremenski režim eluiranja PAH-ova prikazan je u tabeli 3.1. Kao mobilna faza A korišćen je 10 % vodeni rastvor acetonitrila, a faza B je čist acetonitril. Neposredno pre upotrebe mobilne faze su filtrirane kroz membranski najlonski filter (0,22 μm , Phenomenex) a potom degazirane u ultrazvučnom kupatilu. Injekciona zapremina iznosila je 10 μl . Injektiranje je bilo automatsko. Hromatogrami su snimljeni u intervalu talasnih dužina 190-500 nm.

Table 3.1. Vremenski režim rasporeda gradijenta za eluiranje PAH-ova

Vreme, min	Udeo mobilne faze A (%)	Udeo mobilne faze B (%)
0-0,5	45	55
0,5-3,5	35	65
3,5-11,0	2	98
11,0-12,0	45	55

Identifikacija PAH-ova iz standardne smeše izvršena je na osnovu UV-VIS spektara i retencionih vremena koja su dobijena snimanjem (pod predhodno navedenim uslovima) hromatograma individualnih PAH-ova. Na retencionom vremenu gde se pojavljuje hromatografski pik (karakteristično retenciono vreme za taj PAH) pomoću softverskog paketa "Empower 2.0" dobijen je karakteristični apsorpcioni spektar (na taj način formirana je interna baza UV spektara). Takođe, UV VIS spektri i retencionna vremena potvrđeni su i snimanjem standardnog miksa PAH-ova proizvođača Supelco koji u svojoj specifikaciji navodi redosled izlaska PAH-ova iz smeše korišćenjem HPLC sistema istog tipa kolone i istih mobilnih faza. Apsorpcioni spektri PAH-ova poređeni su i sa spektrima koji se mogu naći u literaturi [180].

Identifikacija PAH-ova u uzorku je izvedena poređenjem retencionih vremena i karakterističnih apsorpcionih spektara (UV spektara) PAH-ova iz analitičkog standarda i uzorka.

Za potrebe kvantitativne analize hromatogrami su ekstrahovani na 230 nm (za naftalen i acenaftilen) i na 254 nm (za ostale PAH-ove). Iz ekstrahovanih hromatograma, integraljenjem je određena površina karakterističnog pika za identifikovani PAH koja je uneta u regresionu jednačinu.

3.6.1 Ekstrakcija PAH-ova iz vodenog elektrolita

Nakon potenciostatske oksidacije PAH-ova u 10 % vodenom rastvoru NaCl, dobijeni uzorci nisu pogodni za direktnu analizu na UPLC-PDA, stoga se moraju pripremiti postupkom ekstrakcije.

Alikvotima vodenih rastvora PAH-ova od 1 ml dodato je po 4 ml *n*-heksana. Smeša je zatim mućkana na vorteksu oko 1 minut da bi PAH-ovi prešli iz polarne faze (vodeni rastvor) u nepolarnu fazu (*n*-heksan). Nakon toga je pipetom odvojen gornji (*n*-heksanski) sloj od vodenog rastvora. Ekstrakcija je dodatno ponovljena sa još 4 ml *n*-heksana. Heksanske frakcije su spojene, i uparene na struji azota do zapremine od 1 ml. Potom je izvršena razmena rastvarača dodatkom 1 ml acetonitrila i uparavanje je nastavljeno do ukupne zapremine od 1 ml.

Neposredno pre snimanja na UPLC-PDA, ekstrakt je profiltriran kroz politetrafluoretilensku (PTFE) membranu (0,20 µm).

3.6.2 Priprema uzoraka betona

3.6.2.1 Uzorkovanje i homogenizacija

In situ uzorci dimenzija 10x10 cm su uzeti isecanjem iz zida do dubine 2 cm pomoću bušilice sa dijamantskom pločom. Potom su preneti u hermetički zatvorene staklene posude i transportovani do laboratorije. Homogenizacija uzoraka izvedena je spraišivanjem pomoću hidraulične prese sa kalupom od nerđajućeg čelika. Dobijeni prah betona je prosejan kroz laboratorijsko sito sa otvorima prečnika 1mm.

3.6.2.2 Ekstrakcija

Neposredno pre ekstrakcije određen je procenat suve materije gravimetrijski u skladu sa standardom SRPS EN 14346 [181].

Ekstrakcija PAH-ova iz betona rađena je modifikovanom čvrsto-tečnom ekstrakcijom opisanom u literaturi [182].

U erlenmajer je izmereno 20 g spraćenog uzorka betona i dodato 100 ml smeše rastvarača *n*-heksan-aceton (1:1, v/v). Ekstrakcija je nastavljena na orbitalnom šejkeru na sobnoj temperaturi (25°C) u trajanju od 18 časova. Razdvajanje taloga od tečne faze izvedeno je filtracijom kroz filter papir (Whatman No. 44). Čvrsta faza je isprana sa 50 ml *n*-heksana. Filtrati su spojeni i preneti u levak za odvajanje i isprani 2 puta sa 200 ml dejonizovane vode kako bi se uklonili aceton i soli. Heksanski sloj (gornji sloj) je "osušen" sa anhidrovanim NaSO₄, a zatim koncentrovan na rotacionom vakum uparivaču (na temperaturi od 30°C i pritisku od 200 mbar) do zapremine od 3 ml.

U daljem postupku, ekstrakt je koncentrovan do 1 ml u struji azota na sobnoj temperaturi. Zatim je izvršena izmena rastvarača dodatkom 1 ml acetonitrila i uparavanje nastavljeno do zapremine od 1 ml.

Pre snimanja na UPLC-PDA, ekstrakt je profiltriran kroz 0,20 µm PTFE membranu.

3.6.3 Izračunavanja

Koncentracija individualnog PAH-a u uzorcima vodenih elektrolita izračunava se jednačinom:

$$c = \frac{y - n}{kV} fv \quad 3.1$$

gde je:

c-koncentracija individualnog PAH-a, mg/l,

y-površina pika individualnog PAH-a,

n-odsečak na *y* osi kalibracione prave koja je konstruisana za individualni PAH,

k-koeficijent pravca kalibracione prave,

v-zapremina ekstrakta,

V-zapremina uzorka za analizu,
f-faktor razblaženja.

Koncentracija individualnog PAH-a u uzorcima betona je izračunat prema sledećoj formuli:

$$c = \frac{y - n}{km} v \frac{100}{R} f \frac{100}{d} \quad 3.2$$

c – sadržaj individualnog PAH-a u µg/kg betona,
y - površina pika individualnog PAH-a,
n - odsečak na y osi kalibracione prave koja je konstruisana za individualni PAH,
k - koeficijent pravca kalibracione prave koja je konstruisana za određeni PAH,
R – prinos,
v - zapremina ekstrakta,
m-masa uzorka koja se odmerava za ekstrakciju,
d-sadržaj suve materije u uzorku, određen u skladu sa SRPS EN 14346.

3.7 Validacija UPLC-PDA metode za određivanje koncentracije PAH-ova u betonu

Metoda određivanja koncentracije PAH-ova u betonu pomoću UPLC-PDA se validira, kako bi se osigurali što tačniji, pouzdaniji i ponovljivi rezultati. Takođe, validacijom metode dobija se bolji uvid u moguće probleme koji se javljaju tokom izvođenja metode, a samim tim pronalazi način da se preduperde i otklone isti problemi. Određeni su sledeći parametri: linearnost, selektivnost, limit kvantifikacije, limit detekcije, tačnost i preciznost.

3.7.1 Priprema rastvora

Rastvori za kalibraciju (0,025, 0,05, 0,1, 0,5 i 1,0 mg/l) pripremani su neposredno pre snimanja na UPLC-PDA serijskim razblaživanjem (u acetonitrilu)

intermedijarnog standardnog rastvora. Intermedijarni standardni rastvor, koncentracije 100 mg/l, dobijen je razblaživanjem osnovnog rastvora PAH-MIX 14 acetonitrilom i čuvan u frižideru na temperaturi 4°C.

3.7.2 Selektivnost

Selektivnost se definiše kao sposobnost metode da razdvoji analite (jedinjenja od interesa) od drugih komponenti koje mogu biti prisutne u uzorku, uključujući i nečistoće [183]. Takođe, potrebno je ukoliko se radi o više analiziranih analita, kao što je slučaj u prezentovanoj metodi (16 PAH-ova), da oni međusobno ne interferiraju tj. da su pikovi ovih analita razdvojeni na hromatogramima. Poželjno je da rezolucija pikova bude veća od 1,5 tj. da su pikovi razdvojeni sve do bazne linije hromatograma. Ukoliko je rezolucija pikova manja od 1,5, to upućuje na preklapanje pikova, tj. da nisu u potpunosti razdvojeni. Selektivnost metode je određena preko rezolucije susednih pikova (R_s) na hromatogramu spajkovanog uzorka betona (blank uzorak opterećen analitom poznate koncentracije) prema jednačini 3.3 [184]:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad 3.3$$

gde su t_{R2} и t_{R1} retenciona vremena maksimuma dva pika, а W_{b1} и W_{b2} širine osnova susednih pikova (širina pika na baznoj liniji).

3.7.3 Linearnost

Linearnost je proverena u intervalu koncentracija 0,025-1,0 mg/l. Serije standardnih rastvora PAH-ova su pripremljene u pet različitih koncentracija (0,025, 0,05, 0,1, 0,5 i 1,0 mg/l) i snimljene pomoću UPLC-PDA. Sva merenja su urađena u triplikatu.

Linearnom regresijom analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih jedinjenja u funkciji koncentracije standarda. Konstruisanje kalibracione prave, određivanje parametara regresione jednačine (nagib, koeficijent pravca,

korelacioni koeficijent i standardna devijacija) izvedeno je računarski korišćenjem programskog paketa Origin 8.

Takođe, urađen je parametarski test značajnosti za testiranje nulte hipoteze, Studentov test (t-test) kako bi se procenila linearnost.

3.7.4 Limit detekcije i kvantifikacije

Limit detekcije (LOD) predstavlja najmanju količinu analita koji se može detektovati u uzorku. Limit kvantifikacije (LOQ) najmanja količina analita koja se može kvantitativno odrediti sa odgovarajućom preciznošću i tačnošću [183]. LOD i LOQ dobijeni su statistički, upotrebom podataka dobijenih linearnom regresijom [185]. Tačnije, iz odnosa nagiba kalibracione prave (n) i standardne devijacije funkcije linearnosti (S), izračunati su LOD i LOQ prema jednačinama:

$$LOD = 3,3 \frac{S}{n} \quad 3.4$$

$$LOQ = 10 \frac{S}{n} \quad 3.5$$

3.7.5 Tačnost

Tačnost označava koliko je izmerena vrednost bliska pravoj vrednosti i pruža uvid u to da li je došlo do sistematske greske ili do odstupanja u metodi. Usled nedostatka standardnog referentnog materijala, tačnost metode je proverena određivanjem procenta prinosa (R) [183]. U tu svrhu blank uzorci matriksa (betona) opterećeni su sa analitom u koncentracijama (5, 25 i 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) koje su u opsegu kalibracione prave. Uzorci su pripremani u triplikatu. Merenja su sprovedena u skladu sa predhodno opisanim postupkom (vidi 3.6 Instrumenti i analitički uslovi). Prinos (R , %) je izračunat kao odnos eksperimentalno određene (c_{exp}) i poznate (c_{po}) koncentracije analita (PAH-ova) prema izrazu:

$$\%Prinos = \frac{c_{\text{exp}}}{c_{\text{po}}} 100 \quad 3.6$$

3.7.6 Preciznost

Ponovljivost metode predstavlja jedan od načina izražavanja njene preciznosti, pod istim radnim uslovima u kratkom vremenskom intervalu. Ona pokazuje primenljivost unutar laboratorije, dobijenu u kratkom vremenskom periodu, sa jednim analitičarem, na istoj opremi. Ponovljivost pokazuje izračunatu bliskost slaganja između međusobno nezavisnih rezultata ispitivanja i izražava se u obliku standardne devijacije ili relativne standardne devijacije. Relativna standardna devijacija (RSD, %) ili koeficijent varijacije (CV), kako se ona drugačije naziva, može biti korisna u slučajevima kada treba eliminisati uticaj koncentracije, jer je nezavisna od nje.

Ponovljivost metode utvrđena je pripremanjem i merenjem šest proba spajkovanih uzorka koncentracije 25 µg/kg i hromatografisanjem. Merenja su rađena od strane jednog analitičara u uslovima ponovljivosti (ista oprema, ista laboratorija) u kratkom vremenskom intervalu. Preciznost analitičkog postupka je izražena kao relativna standardna devijacija merenja u kratkom vremenskom intervalu.

3.7.7 Merna nesigurnost

U skladu sa preporukama iz literature [186,187] i jednačinom 3.1, sagledani su i kvantifikovani svi potencijalni izvori merne nesigurnosti koji utiču na rezultat postavljene metode.

Identifikovani su sledeći izvori: nesigurnost linearnosti kalibracione prave (metodom najmanjih kvadrata) (u_{cal}), nesigurnost pripreme kalibracionih standarda (u_{srand}), nesigurnost prinosa metode (u_{rec}), nesigurnost merenja mase (u_m), nesigurnost konačne zapremine (u_v) i nesigurnost ponovljivosti (u_{rep}).

Nesigurnost linearnosti kalibracione prave (u_{cal}) određena je primenom sledeće jednačine [187]:

$$u_{cal} = \frac{S}{n} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(c_{cal} - \bar{c})^2}{S_{xx}}} \quad 3.7$$

gde je:

S - rezidualna standardna devijacija, n - nagib kalibracione krive, P -ukupan broj merenja za konstruisanje kalibraciona krive uključujući ponovljena merenja, N- broj kalibracionih standarda različitih koncentracija, c_{cal} -koncentracija analita u uzorku, \bar{c} -srednja vrednost koncentracije kalibracionih standarda.

S_{xx} definisana je izrazom:

$$S_{xx} = \sum_{N=1}^{N=i} (c_i - \bar{c})^2 \quad 3.8$$

i predstavlja sumu kvadrata razlike pojedinačne (c_i), i srednje vrednosti koncentracija (\bar{c}) kalibracionih standarda korišćenih za konstruisanje kalibracione prave. i je broj tačaka na kalibracionoj pravoj.

Nesigurnost pripreme kalibracionih standarda (u_{stand}) je kombinacija nesigurnosti koja potiče od čistoće osnovnog rastvora PAH-ova (u_p) i nesigurnosti razblaženja standarda (u_{dill}). Određena je po jednačini:

$$u_{stand} = \frac{\sum \frac{u_{c_N}}{N}}{\bar{c}} \quad 3.9$$

$$\frac{u_{c_N}}{c_N} = \sqrt{\left(\frac{u_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{u_{dill}}{V_{dill}}\right)^2} \quad 3.10$$

gde je N broj kalibracionih standarda, \bar{c} srednja vrednost koncentracije kalibracionih standarda, c_n je koncentracija kalibracionog standarda, u_{c_N} je nesigurnost koja potiče od pripreme kalibracionog standarda koncentracije c_N , u_p je nesigurnost koja potiče od čistoće osnovnog rastvora standarda, p je čistoća osnovnog rastvora standarda, u_{dill} je nesigurnost nastala razblaživanjem rastvora i V_{dill} je izmerena zapremina rastvora.

Čistoća standarda je navedena u sertifikatu od strane dobavljača. Prema Eurachem/CITAC vodiču [187], u_p je definisana pravougaonom raspodelom prema sledećoj jednačini:

$$u_p = \frac{1 - p}{\sqrt{3}} \quad 3.2$$

$$\frac{u_{dill}}{V_{dill}} = \sqrt{\sum_{n=1}^{n=i} \frac{u_{pip,i}}{V_{pip,i}}} \quad 3.3$$

Obzirom da su kalibracioni standardi pripremani serijskim razblaživanjem osnovnog standarda pomoću automatske pipete, i komponenta nesigurnosti koja potiče od pipete (u_{pip}) je uzeta u obzir prilikom izračunavanja u_{dill} . u_{pip} je kombinacija nesigurnosti kalibracije pipete - $u_{pip,cal}$ (u kalibracionom sertifikatu automatske pipete nesigurnost je prikazana kao proširena nesigurnost sa nivoom poverenja ($k=2$) i nesigurnosti uticaja temperature (u_{temp}) prema izrazu:

$$u_V = \sqrt{(u_{pip,cal})^2 + (u_{temp})^2} \quad 3.4$$

U skladu sa Eurachem/CITAC vodiču [187], temperaturni efekat definisan je prema jednačini 3.14:

$$u_{temp} = \frac{3VQ}{\sqrt{3}} \quad 3.5$$

gde je V -zapremina izmerenog rastvora (npr. 1000 μl za pipete) i Q - koeficijent zapreminske ekspanzije acetonitrila ($1,37 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$).

Nesigurnost prinosa metode (u_{rec}) je procenjena preko preciznosti i *bias* saglasno jednačini:

$$\frac{u_{rec}}{Rec} = \frac{u_{bias}}{Rec} = \frac{S}{\sqrt{n} Rec} \quad 3.6$$

gde su n i S broj i standardna devijacija ponovljenih merenja, respektivno.

Komponenta nesigurnosti povezana sa unutar-laboratorijskom ponovljivošću (u_{rep}) izražena je kao standardna devijacija (RSD, %) od q -nezavisnih merenja koncentracije PAH-ova u istom danu:

$$u_{rep} = \frac{RSD}{\sqrt{q}} \quad 3.7$$

Komponenta nesigurnosti koja potiče od merenja mase uzorka (u_m), definisana je u uverenju o etaloniranju vage (proširena nesigurnost iznosi 0,012 g za mase manje od 200 g).

Nakon kvantifikovanja svih izvora nesigurnosti izračunata je kombinovana merna nesigurnost (U_{com}) kao koren iz zbira kvadrata pojedinačnih komponenti prema sledećoj jednačini:

$$\frac{U_{com}}{c_{analit}} = \sqrt{\left(\frac{u_{cal}}{c_{cal}}\right)^2 + \left(\frac{u_{rec}}{Rec}\right)^2 + u_{rep}^2 + u_{stand}^2 + \left(\frac{u_v}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m}\right)^2} \quad 3.17$$

Proširena merna nesigurnost metode (U) dobijena je kao proizvod kombinovane merne nesigurnosti i numeričkog faktora k koji iznosi 2 (nivo poverenja od 95%).

$$U = kU_{com} = 2U_{com} \quad 3.18$$

Proračuni merne nesigurnosti izvedeni su na primeru uzorka betona opterećenog sa analitima individualne koncentracije 25 µg/kg.

3.8 Citotoksični efekti policikličnih aromatičnih ugljovodonika i produkata njihove elektrohemijske oksidacije

3.8.1 Tretman ćelijskih kultura

Uzorak pune krvi dobijen je od zdravog donora, starosti 35 godina. Puna krv uzeta je venepunkcijom u vakutajnere sa heparinom kao antikoagulansom. Postavljeni su setovi ćelijskih kultura. Alikvoti heparinizirane pune krvi (0.5 ml) zasađeni su u PBmax hranljivom medijumu u koji su dodate odgovarajuće zapremine PAH-Mix 14 (smeša PAH-ova) do ukupne zapremine od 5 mL kako bi se postigle finalne koncentracije od 0,06 μM , 0,2 μM , 0,6 μM , 2,0 μM i 6,0 μM . i odredio uticaj koncentracije PAH-ova na ćelijske kulture.

Zatim je smeša PAH-ova je podvrgnuta elektrohemijskoj oksidaciji tokom 60 minuta, pri čemu su na vremenima 0 min, 5 min, 15 min, 30 min i 60 min uzimane odgovarajuće zapremine oksidovanog rastvora kako bi se u kulturi dobile finalne koncentracije od 2 μM i 6 μM i procenila toksičnost.

Sve kulture limfocita postavljene su u triplikatu. Netretirani uzorci služili su kao kontrola.

3.8.2 Analiza mikronukleusa

Analiza mikronukleusa rađena je citokinezis blok-mikronukleusnim (CB-MN) testom [178]. Kulture limfocita su gajene 72 sata na 37 °C, od čega poslednja 24 sata u prisustvu citohalazina finalne koncentracije 4 mg/l. Nakon toga ćelije su isprane blagim hipotoničnim rastvorom (0,56 % KCl:0,9 % NaCl, 1:1) i fiksirane u McCarnoy fiksativu (metanol: glacijalnasirćetna kiselina, 3:1), 3 - 4 puta. Između svakog koraka ćelije su centrifugirane, 10 min na 1600 rpm, a supernatant aspiriran. Preparati su pravljani nakapavanjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla. Preparati su osušeni na vazduhu i obojeni 2 %-tnim rastvorom alkalne Gimze. Analizirano je najmanje 1000 ćelija po uzorku, upotrebom Optech mikroskopa. Sva merenja su rađena u triplikatu.

3.8.3 Analiza proliferativnog potencijala ćelija (Citokinezis-blok proliferativnog indeksa-CBPI)

Proliferativni potencijal ćelija *in vitro* procenjen je izračunavanjem citokinezis-blok proliferativnog indeksa (CBPI) [179].

CBPI je izračunat prema sledećoj formuli:

$$CBPI = \frac{(MI + 2MII + 3[MIII + MIV])}{N} \quad 3.19$$

gde MI – MIV predstavljaju broj ćelija sa jednim, dva, tri, odnosno četiri jedra, a N predstavlja ukupan broj prebrojanih ćelija.

Za određivanje CBPI korišćeni su isti preparati na kojima je izvršena analiza mikronukleusa, upotrebom Optech mikroskopa na uvećanju 400x. Sva merenja su rađena u triplikatu.

3.8.4 Separacija limfocita i eritrocita

Nakon 72 sata inkubacije na 37 °C, kulture ćelija su centrifugirane 10 min na 1600 rpm. Nakon aspiriranja supernatanta ćelijskom peletu je dodat 1 mL fiziološkog rastvora. Limfociti su sakupljeni centrifugiranjem ćelijske suspenzije 10 min na 1200 rpm, a zatim 15 min na 3000 rpm na Lymphoprep gradijentu (Lymphocyte separation medium). Limfocitna suspenzija je isprana 2-3 puta fiziološkim rastvorom i zaleđena na -20 °C za kasniju analizu. Eritrociti su isprani fiziološkim rastvorom tri puta, a nakon toga dodato je četiri dela hladne vode i eritrocitni hemolizat je zaleđen na -20 °C za kasniju analizu.

3.8.5 Određivanje količine malondialdehida TBA (*Thiobarbituric Acid*) testom

Nakon odleđivanja, u 0,1 ml limfocitne suspenzije dodato je 0,4 ml 50 mM Tris-HCl pufera pH 7,4 (180 mM KCl i 10 mM EDTA), 0,5 ml sveže rastvorene 1 % TBA u 0,05 M NaOH i 0,5 ml 25 % HCl. Smeša je zatim stavljena u ključalu vodu 10 min. Reakcija je prekinuta uranjanjem epruveta u led. U ohlađenu smešu je

dodavano 3 ml *n*-butanola i uzorci su zatim centrifugirani 10 min na 5000 rpm. Apsorpcija organske faze je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 532 nm prema sledećoj jednačini [188]:

$$MDA(nM) = \frac{A_{uzorka}}{l\varepsilon} f \quad 3.20$$

gde je *l*-dužina puta svetlosti (1cm), ε -molarna apsorptivnost ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a *f* predstavlja faktor razblaženja.

Vrednosti su izražene kao nmol TBA-reaktivnih supstanci (MDA ekvivalenti) po mg proteina, upotrebom standardne prave 1,1,3,3-tetrametoksipropana. Sva merenja su rađena u triplikatu.

3.8.6 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski po metodi Lorija [189]. U epruvete je sipano 890 μl vode, 100 μl 1M NaOH i po 10 μl uzorka. Slepna proba je postavljena bez uzorka. Sadržaj je vorteksovan i ostavljen 10 minuta na sobnoj temperaturi. U svaku epruvetu je dodato po 2 ml 4 % CuSO_4 razblaženog rastvorom za proteine (2 % Na_2CO_3 , 0,16 % $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ i 1 % SDS) 10 puta. Sadržaj je vorteksovan i ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi. U svaku epruvetu je zatim dodato po 0,3 ml Folin-Ciochalaten's Phenol reagensa razblaženog vodom 1:1 i sadržaj je ostavljen 45 minuta na sobnoj temperaturi.

Optička gustina je merena spektrofotometrijski na 750 nm i poređena sa standardnom krivom ($A=0,04696 \text{ c}$). Za pravljenje standardne krive korišćen je goveđi serum albumin-BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) [189]. Sva određivanja su rađena u triplikatu.

3.8.7 Određivanje aktivnosti katalaze

Merenje aktivnosti katalaze iz hemolizata izvršeno je po metodi kojom se prati katalitička redukcija H_2O_2 , spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 240 nm [169].

Hemolizat je razblažen u odnosu 1: 500 sa 50 mM fosfatnim puferom, pH 7,4.

Merenje je izvršeno u kvarcnoj kivetu, praćenjem pada apsorpcije na svakih 30 sekundi. Slepа probа je sadržala 2 ml enzimskog hemolizata i 1 ml fosfatnog pufera bez supstrata, dok je aktivnost katalaze merena tako što je u 2 ml razblaženog hemolizata, dodato 1 ml 30 mM H₂O₂ u fosfatnom puferu.

Aktivnost je izražena kao K-konstanta reakcije prvog reda po minuti po mg hemoglobina (mg/minHb). Koncentracija hemoglobina je određena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm.

3.8.8 Određivanje koncentracije hemoglobina

Koncentracija hemoglobina u eritrocitima izmerena je spektrofotometrijski Drabkinovim reagensom (200 mg K₃[Fe(CN)₆], 50 mg KCN i 140 mg NaHCO₃ rastvoreno u 100 ml dejonizovane vode).

0,02 ml hemolizata je rastvoreno u 5 ml Drabkinovog reagensa (1:250). Nakon 15 min, očitana je apsorbanacija na 540 nm. Drabkinov reagens bez uzorka je korišćen kao blank. Srednja vrednost koncentracije Hb u krvi izražena je u g/l.

3.8.9 Statistička analiza

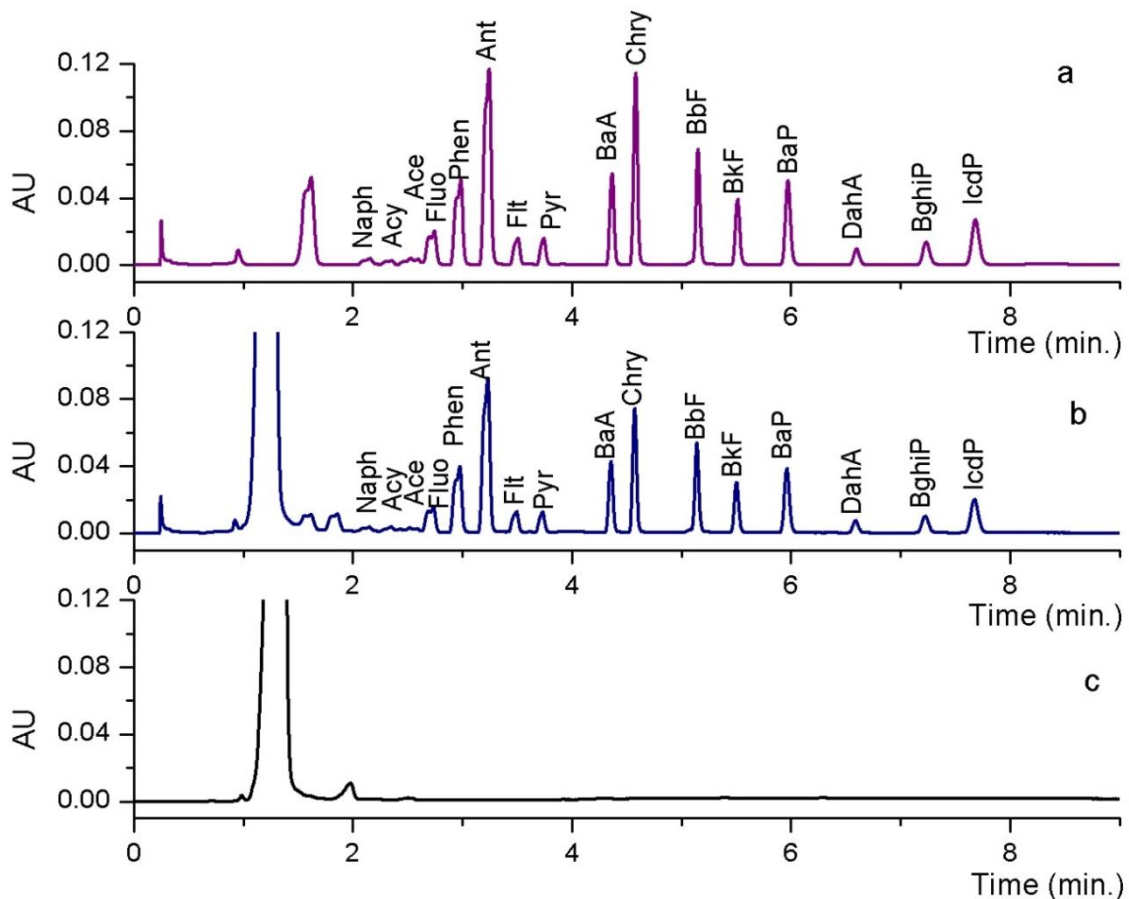
Za statističku obradu rezultata analiziranih parametara korišćeni su Student-ov T-test i linearna regresiona analiza, statistički paket "Statistika 8.0" i "Origin8" za Windows 7. Vrednosti $p < 0.05$ su smatrane značajnim.

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Validacija UPLC-PDA metode za određivanje koncentracije PAH-ova u betonu

4.1.1 Selektivnost

Selektivnost metode je procenjena poređenjem hromatograma standardnog rastvora PAH-ova, blank uzorka betona opterećenog sa PAH-ovima u koncentraciji 0,5 mg/l i blank uzorka betona koji su prikazani na slici 4.1.



Slika 4.1. UPLC-PDA Hromatogrami (254nm): a - standardnog rastvora PAH-ova individualne koncentracije 0,5 mg/l, b- blank uzorka betona opterećenog sa PAH-ovima individualne koncentracije 0,5 mg/l, c - blank uzorka betona [1]

Identifikacija individualnih PAH-ova koji su označeni na hromatogramima (slike 4.1.a i 4.1.b) je izvedena postupkom koji je opisan u poglavlju 3.6.

Razmatrajući hromatograme na slikama 4.1.a i 4.1.b može se uočiti da su svi PAH-ovi koji su predmet analize razdvojeni u potpunosti (opseg rezolucije iznosi od 1,88 do 5,63) osim acenaftena i fluorena. Njihovo slabo razdvajanje može se opravdati sličnošću u fizičko-hemijskim karakteristikama, koje samim tim uzrokuju slične interakcije sa kolonom i nemogućnost njihovog potpunog razdvajanja.

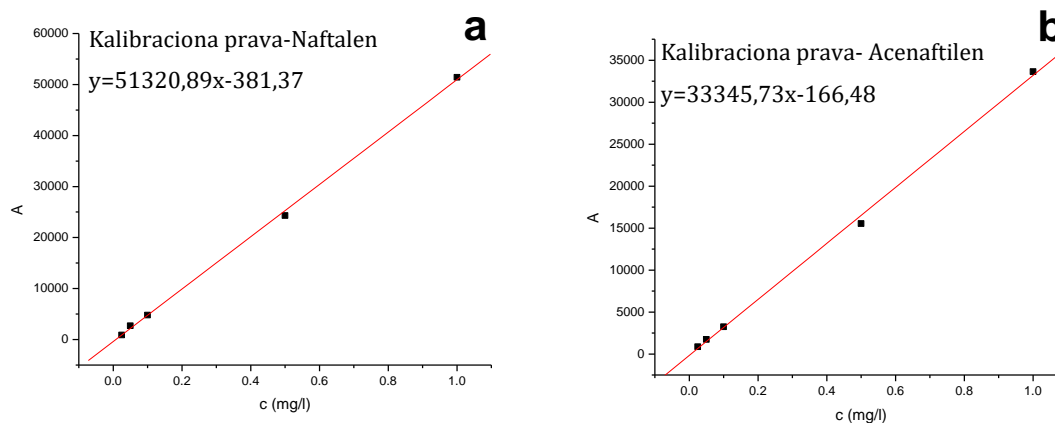
Tabela 4.1. Retenciona vremena i talasne dužine apsorpcionih maksimuma na UV-VIS spektru PAH-ova [1]

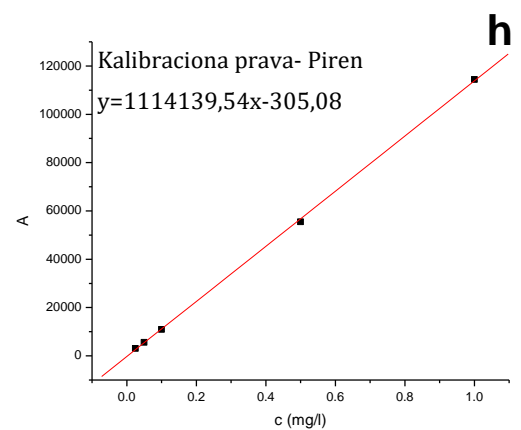
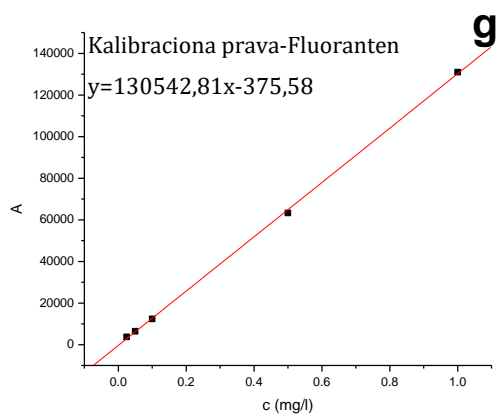
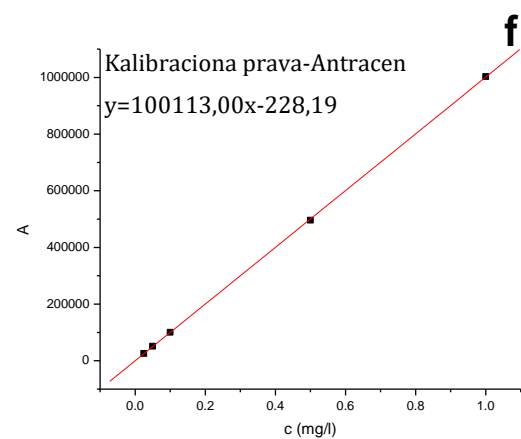
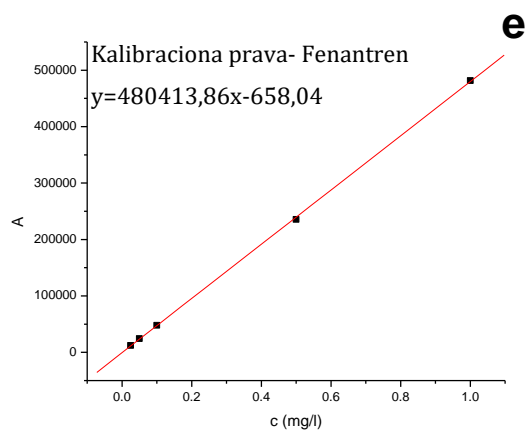
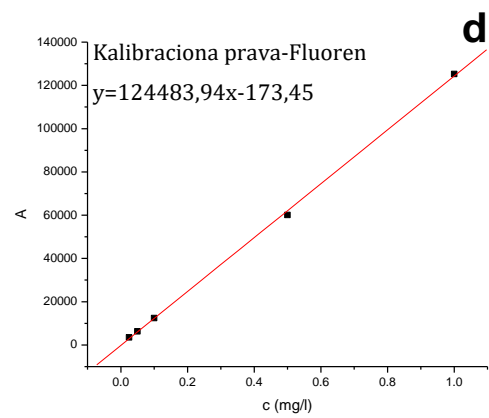
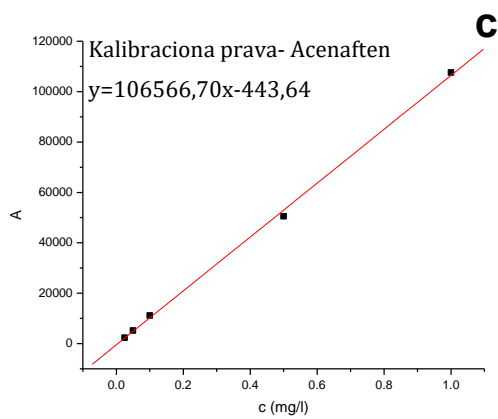
PAH	Retenciono vreme, min	Talasna dužina, nm
Naftalen (Naph)	2,15 ± 0,02	219,9; 275,6
Acenaftilen (Acy)	2,35 ± 0,02	229,1; 263,9; 321,8
Acenaften (Ace)	2,68 ± 0,02	226,6; 289,1
Fluoren (Fluo)	2,74 ± 0,02	260,9; 299,6
Fenantren (Phen)	2,97 ± 0,09	250,4; 292,8
Antracen (Ant)	3,23 ± 0,02	251,1; 375,9
Fluoranten (Flt)	3,49 ± 0,09	235,2; 286,0; 341,1
Piren (Pyr)	3,72 ± 0,09	239,4; 271,9; 318,7; 334,2
Benzo(a)antracen (BaA)	4,35 ± 0,02	286,7; 340,5
Krizen (Chry)	4,58 ± 0,09	367,0; 219,9; 306,4
Benzo(b)fluoranten (BbF)	5,14 ± 0,02	221,1; 225,3; 300,2
Benzo(k)fluoranten (BkF)	5,50 ± 0,02	236,4; 306,4; 378,4; 339,5
Benzo(a)piren (BaP)	5,96 ± 0,02	364,5; 295,3; 364,7; 384,6
Dibenzo(a,h)antracen (DahA)	6,59 ± 0,02	220,5; 296,5; 372,8
Benzo(g,h,i)perilen (BghiP)	7,22 ± 0,02	299,0; 361,6; 382,1
Indeno(1,2,3-cd)piren (IcdP)	7,68 ± 0,02	249,2; 275,0; 302,1; 359,1

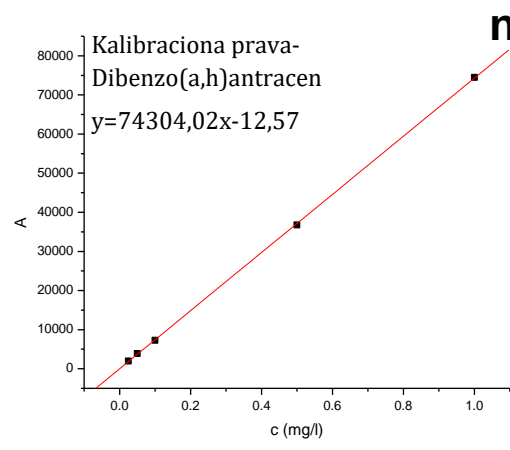
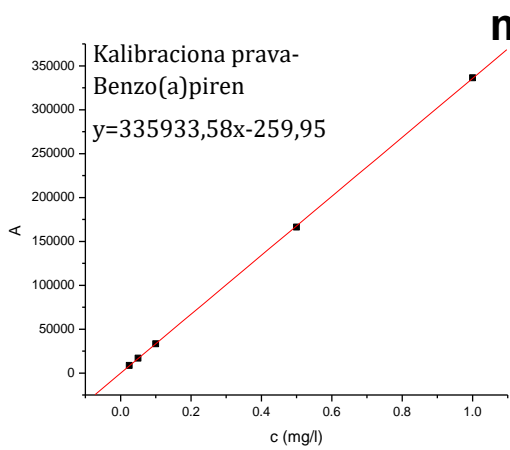
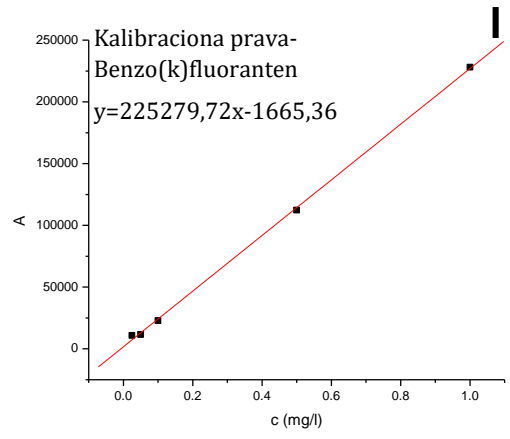
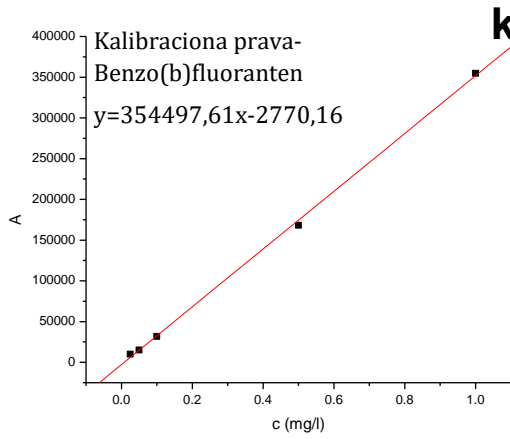
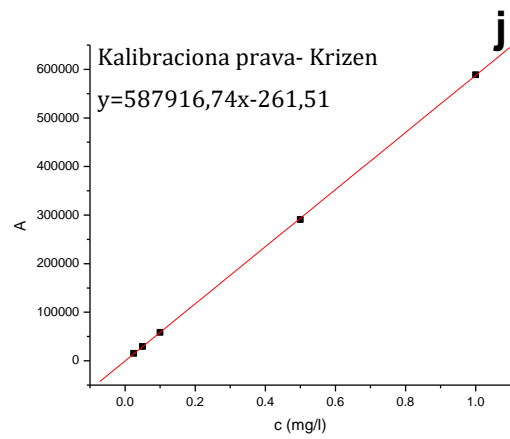
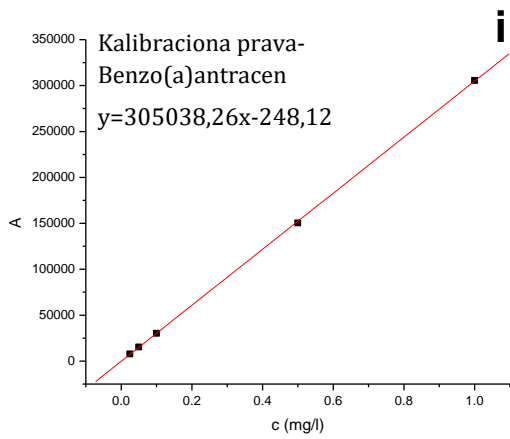
Poređenjem hromatograma na slikama 4.1.b i 4.1.c može se uočiti da na retencionim vremenima koja su karakteristična za analite nema pika koji potiče od interferirajućih komponenti, a koje utiču na selektivnost metode. Takođe nisu uočene ni značajne promene u vrednostima retencionih vremena pikova analita u standardu (slika 4.1.a) posmatrano u odnosu na opterećeni uzorak (slika 4.1.b). To navodi na potvrdu da je metoda selektivna. U prilog zadovoljavajuće selektivnosti metode ide i identičnost elektronskih apsorpcionih spektara (UV-VIS spektri) ekstrahovanih iz hromatograma opterećenog uzorka i standarda. U tabeli 4.1. prikazana su retencionna vremena i karakteristični apsorpcioni maksimuma na UV-VIS spektru individualnih PAH-ova (vidi Prilog 1).

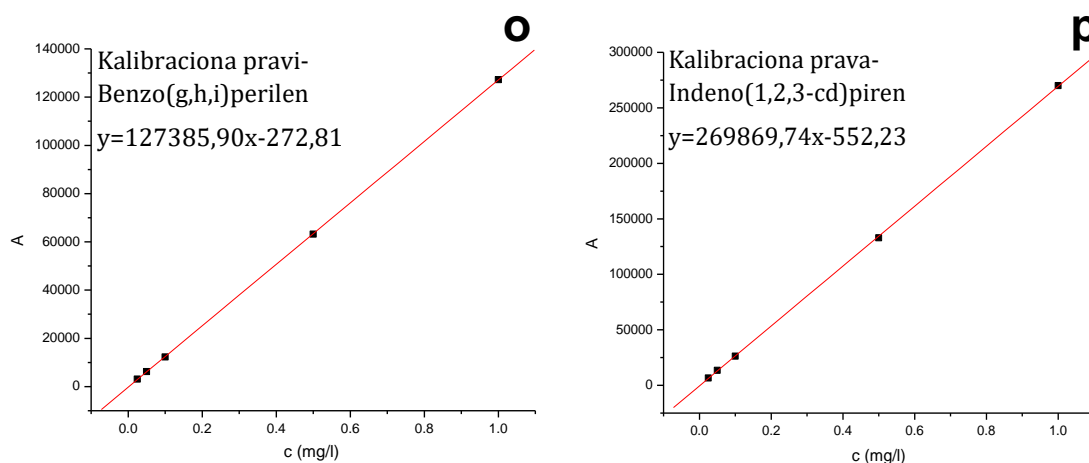
4.1.2 Linearnost

Na slici 4.2. prikazane su kalibracione prave individualnih PAH-ova u opsegu 0,025-1,000 mg/l. Svaka tačka kalibracione prave predstavlja srednju vrednost tri nezavisna merenja odgovarajuće koncentracije standardnog rastvora.









Slika 4.2. Grafički prikaz kalibracionih pravi PAH-ova: (a) Natalen, (b) Acenaftilen, (c) Acenaften, (d) Fluoren, (e) Fenantren, (f) Antracen, (g) Fluoranten, (h) Piren, (i) Benzo(a)antracen, (j) Krizen, (k) Benzo(b)fluoranten, (l) Benzo(k)fluoranten, (m) Benzo(a)piren, (n) Dibenzo(a,h)antracen, (o) Benzo(g,h,i)perilen, (p) Indeno(1,2,3-cd)piren.

Osnovni parametri regresione analize (nagib i odsečak regresione jednačine, kao i koeficijent korelacije) prikazani su u tabeli 4.2. Koeficijent korelacije (R) ima veoma visoku vrednost od 0,999 za svaki PAH, što ukazuje da je kalibraciona prava linearna unutar koncentracionog opsega od 0,025-1,000 mg/l.

Obzirom da vrednost koeficijenta korelacije jeste potvrda linearnosti, ali ne i dovoljna, izveden je statistički Studentov T-test. Dobijena vrednost t_{stat} je mnogo veća od t_{krit} (npr. Pyr: $t_{stat} \gg t_{krit}$, $109.46 \gg 3.18$), čime je dodatno potvrđena linearna zavisnost površine pika od koncentracije PAH-ova.

Tabela 4.2. Regresiona jednačina, koeficijent korelacije, LOD i LOQ individualnih PAH [1]

PAH	Regresiona jednačina	R ²	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Naftalen	$y=51320,89x-381,37$	0,999	1,912	6,374
Acenaftilen	$y=33345,73x-166,48$	0,999	2,988	9,962
Acenaften	$y=106566,70x-443,64$	0,999	2,354	7,847
Fluoren	$y=124483,94x-173,45$	0,999	1,582	5,274
Fenantren	$y=480413,86x-658,04$	0,999	0,840	2,802
Antracen	$y=100113,00x-228,19$	0,999	0,423	1,412
Fluoranten	$y=130542,81x-375,58$	0,999	1,328	4,427
Piren	$y=1114139,54x-305,08$	0,999	1,148	3,827
Benzo(a)antracen	$y=305038,26x-248,12$	0,999	0,585	1,950
Krizen	$y=587916,74x-261,51$	0,999	0,488	1,629
Benzo(b)fluoranten	$y=354497,61x-2770,16$	0,999	1,948	6,493
Benzo(k)fluoranten	$y=225279,72x-1665,36$	0,999	1,757	5,858
Benzo(a)piren	$y=335933,58x-259,95$	0,999	0,446	1,487
Dibenzo(a,h)antracen	$y=74304,02x-12,57$	0,999	0,584	1,948
Benzo(g,h,i)perilen	$y=127385,90x-272,81$	0,999	0,237	0,792
Indeno(1,2,3-cd)piren	$y=269869,74x-552,23$	0,999	0,603	2,012

4.1.3 Limit detekcije i limit kvantifikacije

Izračunate vrednosti limita detekcije i limita kvantifikacije izražene u $\mu\text{g}/\text{kg}$ betona za svaki PAH i prikazane u tabeli 4.2. Može se primetiti da vrednosti LOD variraju između 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (benzo(g,h,i)perilen) i 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (acenaftilen), dok se vrednosti za LOQ kreću od 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (benzo(g,h,i)perilen) do 10,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (acenaftilen).

Jedinjenja koja su se eluirala na početku hromatografije (PAH-ovi manje molekulske mase) imaju više LOD i LOQ vrednosti. PAH-ovi sa veće molekulske mase takođe prate trend sniženja LOD i LOQ vrednosti sa porastom molekulske mase, osim u slučaju benzo(b)fluorantena i benzo(k)fluorantena, gde se primećuje odstupanje.

Analizom prikazanih LOD i LOQ vrednosti individualnih PAH-ova, nameće se zaključak da je UPLC-PDA metoda za određivanje koncentracije PAH-ova u betonu osetljivija za PAH-ove veće molekulske mase.

4.1.4 Tačnost i preciznost

Preciznost merenja UPLC-PDA metode za određivanje koncentracije PAH-ova u betonu, izražena je kao relativna standardna devijacija, prikazana je u tabeli 4.3. zajedno sa srednjom vrednošću prinosa.

Vrednosti RSD (%) bile su niže od 13,91 % za sve PAH-ove osim za naftalen. Visoke vrednosti RSD (%) za naftalen mogu se objasniti većom isparljivošću naftalena u odnosu na ostale PAH-ove tokom pripreme uzoraka.

Tačnost metode je izražena preko prinosa koji se nalazi u opsegu 54-106 %. Najviše vrednosti prinosa za sve koncentracije dobijene su za benzo(a)antracen (oko 100 %), dok su najniže vrednosti za naftalen (oko 54 %). Može se zapaziti da je za ispitivane niže koncentracije PAH-ova (5,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 25,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) osim za naftalen, prinos bio preko 70 %.

Tabela 4.3 Srednja vrednost prinosa i relativna standardna devijacija merenja koncentracije PAH-ova u betonu za UPLC-PDA analizu [1]

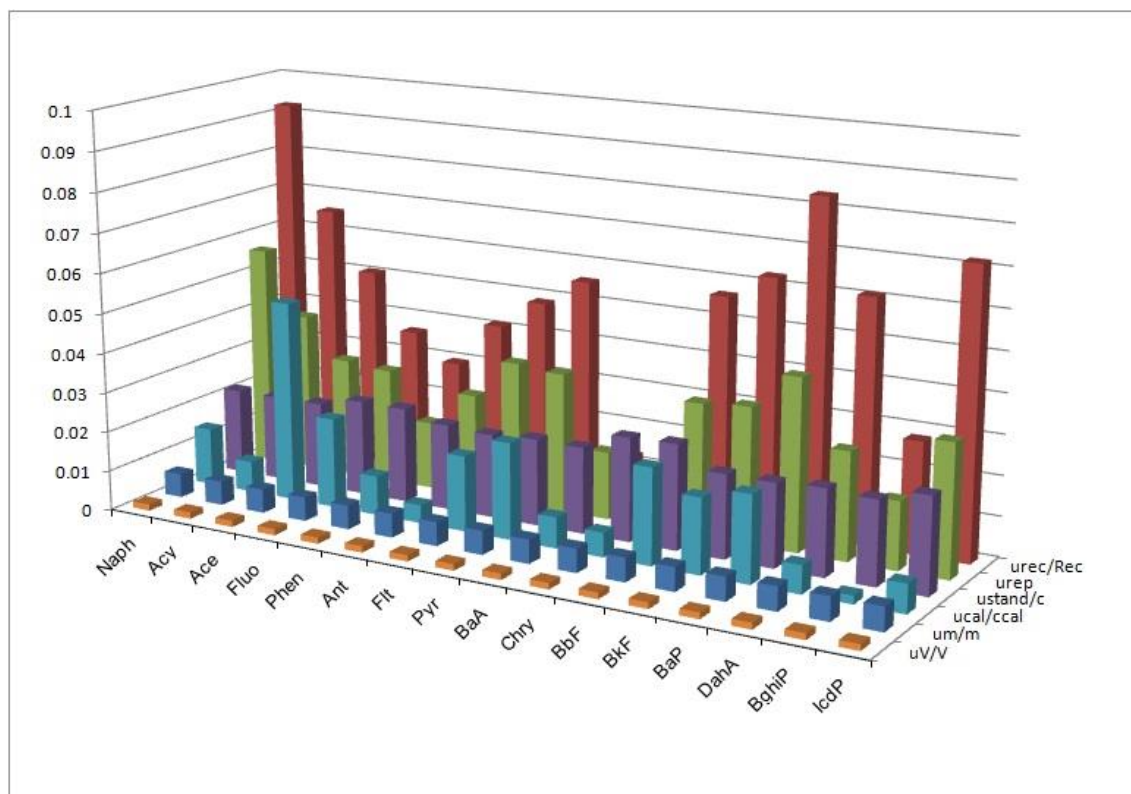
PAH	Srednja vrednost prinosa (%) \pm RSD (%)		
	50,00 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	25,00 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	5,00 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Naftalen	54,30 \pm 12,54	55,07 \pm 16,18	75,48 \pm 19,32
Acenaftilen	67,63 \pm 8,56	77,97 \pm 11,39	94,58 \pm 6,72
Acenaften	63,18 \pm 2,83	85,24 \pm 8,80	93,88 \pm 9,72
Fluoren	101,95 \pm 1,13	88,22 \pm 6,21	99,81 \pm 11,02
Fenantren	80,09 \pm 1,34	91,19 \pm 4,66	106,84 \pm 9,02
Antracen	66,63 \pm 2,67	87,49 \pm 6,16	71,71 \pm 10,50
Fluoranten	103,36 \pm 4,32	84,44 \pm 7,10	103,62 \pm 12,04
Piren	66,07 \pm 3,63	82,29 \pm 7,89	81,12 \pm 13,16
Benzo(a)antracen	100,80 \pm 0,83	103,85 \pm 2,26	97,32 \pm 3,32
Krizen	82,72 \pm 1,29	98,93 \pm 2,67	105,81 \pm 4,67
Benzo(b)fluoranten	88,93 \pm 0,68	83,19 \pm 8,08	105,14 \pm 11,51
Benzo(k)fluoranten	87,58 \pm 2,13	84,72 \pm 9,15	96,91 \pm 4,98
Benzo(a)piren	71,14 \pm 8,81	73,11 \pm 10,48	81,21 \pm 7,41
Dibenzo(a,h)antracen	95,70 \pm 3,91	85,27 \pm 8,94	97,85 \pm 13,91
Benzo(g,h,i)perilen	91,77 \pm 2,60	96,61 \pm 4,63	93,27 \pm 6,85
Indeno(1,2,3-cd)piren	88,88 \pm 10,46	83,63 \pm 10,43	102,76 \pm 12,32

4.2 Merna nesigurnost

Merna nesigurnost UPLC-PDA metode za određivanje koncentracije PAH-ova u betonu kvantifikovana je prema postupku opisanom u poglavlju 3.7.7. U proračun su uzeti svi izvori nesigurnosti koji se sreću tokom analize i predstavljeni kao kombinovana i proširena merna nesigurnost.

Na slici 4.3. prikazan je doprinos pojedninačnog izvora nesigurnosti (linearnosti kalibracione prave, pripreme kalibracionih standarda, prinosa metode,

merjenja mase, konačne zapremine i ponovljivosti) ukupnoj mernoj nesigurnosti za određivanja PAH-ova u betonu.



Slika 4.3. Pregled doprinosa pojedinačnih izvora nesigurnosti ukupnoj mernoj nesigurnosti određivanja PAH-ova u betonu [1]

Rezultati pokazuju da nesigurnosti koje potiču od merjenja mase (u_m/m) i od konačne zapremine (u_V/V) imaju najmanji uticaj na kombinovanu, a samim tim i na ukupnu, tj. proširenu mernu nesigurnost. Može se primetiti da je dominantan uticaj nesigurnosti od prinosa (u_{rec}/Rec) i ponovljivosti (u_{rep}), slede u_{stand}/c (nesigurnost koja potiče od pripreme standarda) i u_{cal}/C_{cal} (nesigurnost koja potiče od kalibracione krive). Najveći doprinos u_{rec}/Rec je očekivan zato što ekstrakcija analita predstavlja krucijalan korak analitičke metode.

Kao što je prikazano u tabeli 4.4., proširena merna nesigurnost dobijena za PAH-ove u betonu nazivne koncentracije $25 \mu\text{g}/\text{kg}$, se kreće između 5 % za benzo(a)antracen do 40 % za naftalen.

Tabela 4.4 Rezultati kombinovane merne nesigurnosti ($U_{com}(\mu\text{g}/\text{kg})$) i proširene merne nesigurnosti ($U(\%)$) za PAH-ove u betonu [1]

PAH	Masa	U_{com} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	U ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	U (%)
Naftalen (Naph)	25,03	2,76	5,52	39,91
Acenaftilen (Acy)	24,83	1,98	3,97	20,52
Acenaften (Ace)	24,71	1,56	3,11	14,81
Fluoren (Fluo)	25,06	1,32	2,64	11,93
Fenantren (Phen)	24,99	1,05	2,11	9,26
Antraceni (Ant)	25,14	1,35	2,70	12,25
Fluoranteni (Flt)	25,04	1,61	3,22	15,23
Piren (Pyr)	24,97	1,73	3,47	16,74
Benzo(a)antraceni (BaA)	24,93	0,77	1,54	5,94
Krizen (Chry)	24,97	0,81	1,61	6,53
Benzo(b)fluoranteni (BbF)	24,98	1,77	3,54	17,02
Benzo(k)fluoranteni (BkF)	25,06	1,87	3,73	17,59
Benzo(a)piren (BaP)	25,03	2,41	4,83	26,37
Dibenzo(a,h)antraceni (DahA)	25,05	1,76	3,52	16,49
Benzo(g,h,i)perilen (BghiP)	24,87	0,98	1,96	8,14
Indeno(1,2,3-cd)piren (IcdP)	24,96	2,07	4,13	19,80

4.3 Elektrohemijska oksidacija PAH-ova

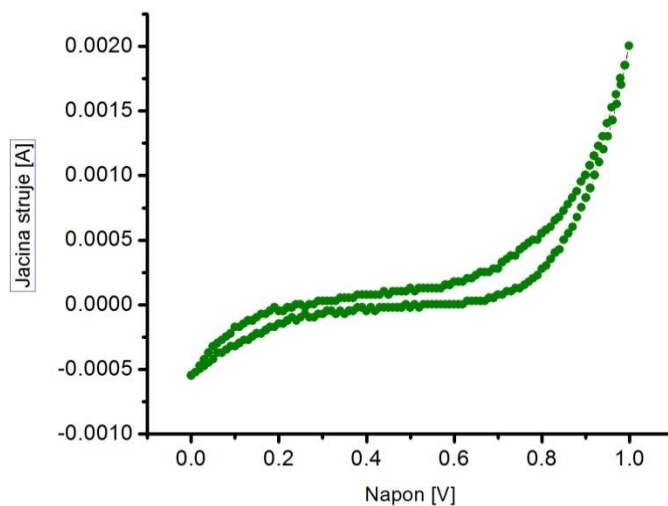
4.3.1 Elektrohemijska oksidacija u laboratorijskim uslovima

4.3.1.1 Ciklovoltametrijska merenja

Kako bi se potvrdila oksidacija PAH-ova u vodenim rastvorima i definisao opseg potencijala u kom dolazi do oksidacije, preliminarno je urađena ciklično-voltametrijska analiza pod uslovima koji su navedeni u odeljku 3.5.1.

Na slici 4.4. prikazan je ciklični voltamogram PAH-ova u 10 % vodenom rastvoru NaCl (očekivana koncentracija individualnih PAH-ova 20 mg/l) na elektrodama od nikla. Ciklični voltamogrami su snimani u 10 ciklusa, na niklenim

elektrodama, pri brzini promene potencijala 100 mV/s, i pošto nisu uočene međusobne razlike na slici 4.4. prikazan je samo poslednji.



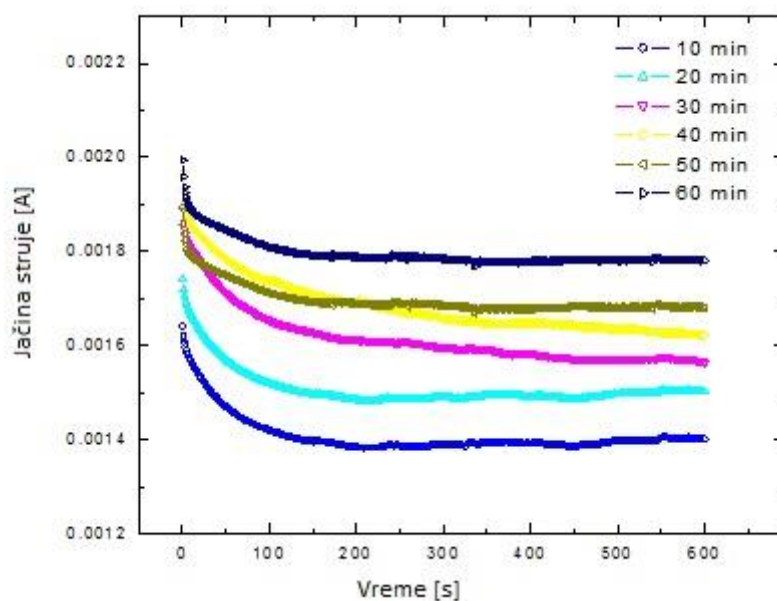
Slika 4.4. Ciklični voltamogram smeše PAH-ova u 10 % vodenom rastvoru NaCl

Kao što se može videti (slika 4.4) struja počinje da raste na naponu od 0,8 V i dostiže maksimum na 1 V. Predpostavlja se da uočeni porast anodne struje potiče od procesa oksidacije PAH-ova, elektrolitičkog izdvajanja kiseonika ili kombinacije ovih procesa .

Stoga, ispitivanje oksidacije je nadalje praćeno na 1V.

4.3.1.2 Elektroliza

Elektrohemijska (anodna) oksidacija smeše PAH-ova u 10 % vodenom rastvoru NaCl izvedena je u potenciostatskom režimu, pri radnom naponu od 1 V u trajanju od 1 časa. Tom prilikom snimljene su strujno-vremenske krive (i-t krive), predstavljene na slici 4.5. Takođe, na svakih 10 min uzeti su alikvoti elektrolita za UPLC-PDA analizu.



Slika 4.5. Strujno-vremenske ($i-t$) krive dobijene oksidacijom PAH-ova u potenciostatskom režimu na Ni elektrodama pri naponu od 1 V [2]

Uporednim pregledom $i-t$ krivi (slika 4.5.), zapaža se porast struje kroz elektrolitičku ćeliju sa vremenom. To ukazuje na kontinualni porast broja naelektrisanih vrsta u elektrolitu tokom procesa elektrolize.

Porast broja naelektrisanih vrsta u elektrolitu može se povezati sa oksidacijom PAH-ova. Obzirom da se sve vrste čestica (izuzev PAH-ova) u vodenom rastvoru odlikuju dobrom rastvorljivošću i pokretljivošću očekivano je da se stacionarna struja u potenciostatskom režimu uspostavi u roku od nekoliko sekundi ili bar u toku nekoliko minuta. Jedan od razloga porasta jačine stacionarne struje može biti pripisan naelektrisanim vrstama poreklom od PAH-ova, čiji se broj postepeno povećava usled njihove spore difuzije prema elektrodi što dovodi i do sporog uspostavljanja ravnotežnog stanja.

Oksidacija PAH-ova, kao i organskih jedinjenja prikazanih u literaturi [7,122,123], je veoma kompleksan proces u koji je uključen veliki broj vrsta nastalih u elektrolitu. Generalno prihvaćen mehanizam je indirektna oksidacija preko reaktivnih kiseoničnih vrsta formiranih na anodi koji su predložili Comninellis i saradnici (vidi poglavlje 1.5.2.3.1) [132]. Obzirom da je u predstavljenom eksperimentu korišćen 10 % rastvor NaCl, verovatniji je

mehanizam oksidacije posredovan hlorom predložen od strane Martínez-Huitle i sar. [7]. Naime, ClO^- anjon koji se formira na anodi u neutralnim ili alkalnim rastvorima (koji sadrže Cl^-), dalje reaguje sa organskim molekulima i uzrokuje razgradnju istih.

Dodatna potvrda oksidacije PAH-ova je smanjenje koncentracije PAH-ova u alikvotu sa porastom vremena elektrolize. Koncentracija PAH-ova je određena UPLC-PDA tehnikom (vidi poglavlje 3.6.3). U tabeli 4.5. je prikazana koncentracija individualnih PAH-ova u alikvotima uzetim na početku, na svakih 10 minuta tokom i na kraju elektrolize.

Na osnovu prezentovanih rezultata može se primetiti da su koncentracije PAH-ova u elektrolitu znatno niže od 20 mg/l koje su inicijalno dodate tokom pripreme rastvora, što je i očekivano zbog slabe rastvorljivosti PAH-ova u vodi.

Ipak, detektovano je značajno smanjenje koncentracije svih PAH-ova tokom elektrolize. Ovim je potvrđena pretpostavka dobijena na osnovu i-t krivi, da dolazi do elektrohemijske oksidacije PAH-ova. Štaviše, kada se deo rastvorenih PAH-ova oksiduje i na taj način ukloni iz rastvora, predviđa se da deo nerastvorenih PAH-ova prelazi u rastvor da bi se uspostavila ravnotežna koncentracija PAH-ova u vodi. Na ovaj način, očekuje se da je efektivno smanjenje količine PAH-ova u elektrolitu veće nego što je to detektovano.

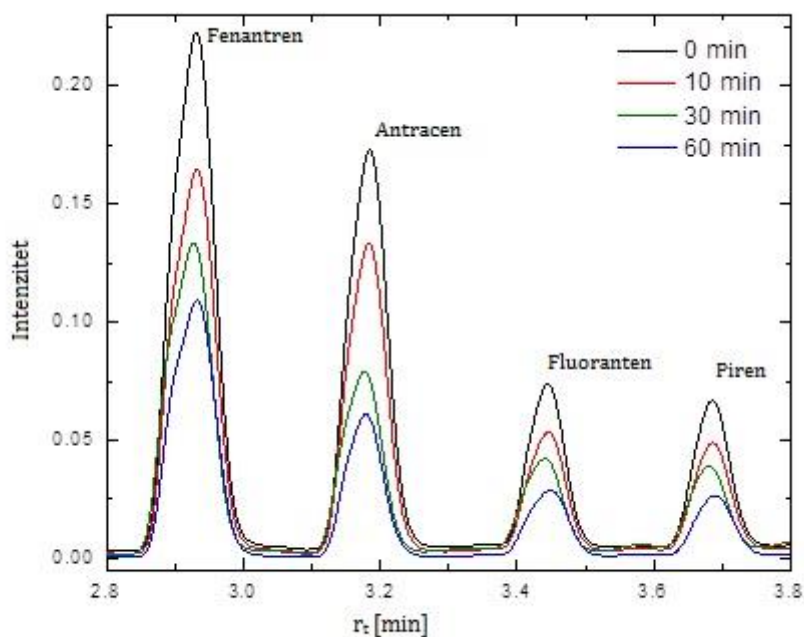
Za brzinu degradacije svakog PAH-a može se reći da predstavlja kompleksnu funkciju rastvorljivosti, elektrohemijske pokretljivosti i reaktivnosti sa oksidujućom vrstom generisanom na anodi, bilo da je u pitanju hipohloritni ili hidroksilni radikal.

Količina individualnih PAH-ova uklonjenih iz rastvora izračunata je kao razlika između koncentracije svakog PAH-a pre i posle elektrolize. Rezultati su izraženi u μM i predstavljeni u Tabeli 4.5. Količina uklonjenih PAH-ova varira između 2,2 μM za krizen do 15,0 μM za fluoranten. Uočene razlike se mogu objasniti uticajem strukture na proces degradacije.

Tabela 4.5 Koncentracija PAH-ova u elektrolitu pre i tokom elektrohemijske oksidacije [2]

Vreme (min)	0	10	20	30	40	50	60	Uklonjeni PAH-ovi (μM)
PAH	C_{PAH} (mg/l)							
Naftalen (Naph)	6,84	6,87	6,55	6,42	6,04	5,20	5,52	10,3
Acenaftilen (Acy)	2,93	2,49	2,19	1,93	1,88	1,82	1,78	7,6
Acenaften (Ace)	2,66	2,06	1,90	1,66	1,49	1,46	1,47	7,7
Fluoren (Fluo)	4,51	3,40	3,21	2,84	2,48	2,44	2,41	12,6
Fenantren (Phen)	4,05	3,06	2,70	2,55	2,07	2,06	2,04	11,3
Antracen (Ant)	1,37	1,06	0,72	0,65	0,54	0,48	0,47	5,1
Fluoranten (Flt)	4,41	3,09	2,97	2,92	1,98	1,63	1,38	15,0
Piren (Pyr)	4,24	3,02	2,51	2,31	2,02	1,90	1,75	9,9
Benzo(a)antracen (BaA)	3,36	2,50	2,09	2,08	1,84	1,52	1,26	9,2
Krizen (Chry)	1,06	1,01	0,98	0,88	0,61	0,57	0,56	2,2
Benzo(b)fluoranten (BbF)	4,57	3,42	2,96	2,7	2,05	1,90	1,85	10,8
Benzo(k)fluoranten (BkF)	2,73	1,98	1,74	1,64	1,22	1,14	1,10	6,5
Benzo(a)piren (BaP)	3,67	2,76	2,43	2,12	1,68	1,51	1,42	8,9
Dibenzo(a,h)antracen (DahA)	2,43	1,78	1,53	1,26	1,04	0,99	0,93	5,4
Benzo(g,h,i)perilen (BghiP)	3,11	2,28	1,95	1,72	1,40	1,27	1,25	6,7
Indeno(1,2,3-cd)piren (IcdP)	4,22	3,13	2,68	2,36	1,90	1,79	1,70	9,1

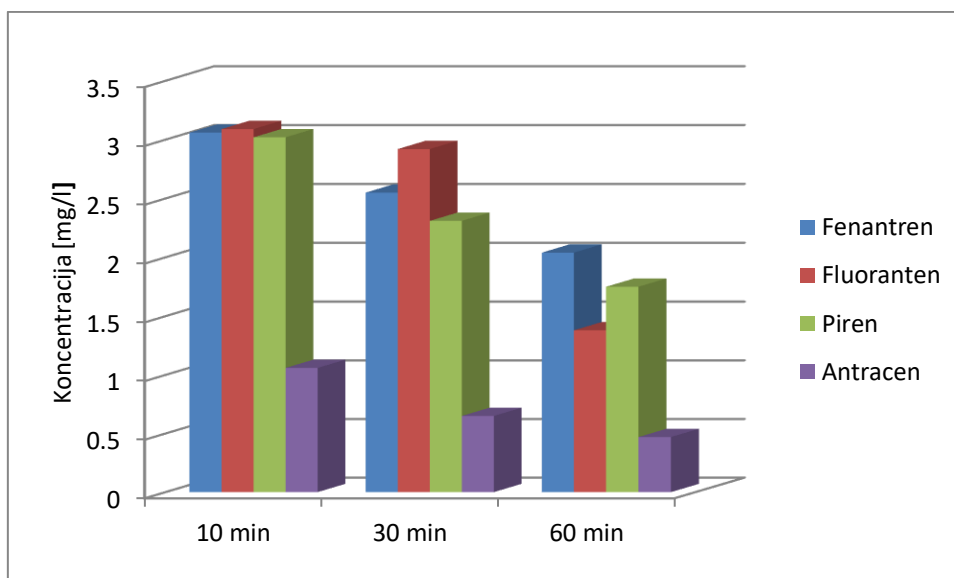
Uporedni prikaz hromatograma snimljenih za alikvotne uzorke na različitim vremenima trajanja elektrolize, za određene predstavnike PAH-ova (fenantrena, antracena, fluorantena i pirena), mogu se videti na slici 4.6.



Slika 4.6. UPLC-PDA hromatogrami snimljeni za alikvote uzete tokom elektrolize [2]

Očigledno je smanjenje intenziteta pikova sa porastom vremena elektrolize, što implicira na smanjenje koncentracija naznačenih PAH-ova. Slično hromatografsko ponašanje je uočeno i kod drugih ispitivanih PAH-ova.

U nastavku, na slici 4.7. prikazano je smanjenje koncentracije nekoliko individualnih PAH-ova tokom elektrolize.



Slika 4.7. Promena koncentracije fenentrena, fluorena, pirena i antracena tokom elektrohemijske oksidacije

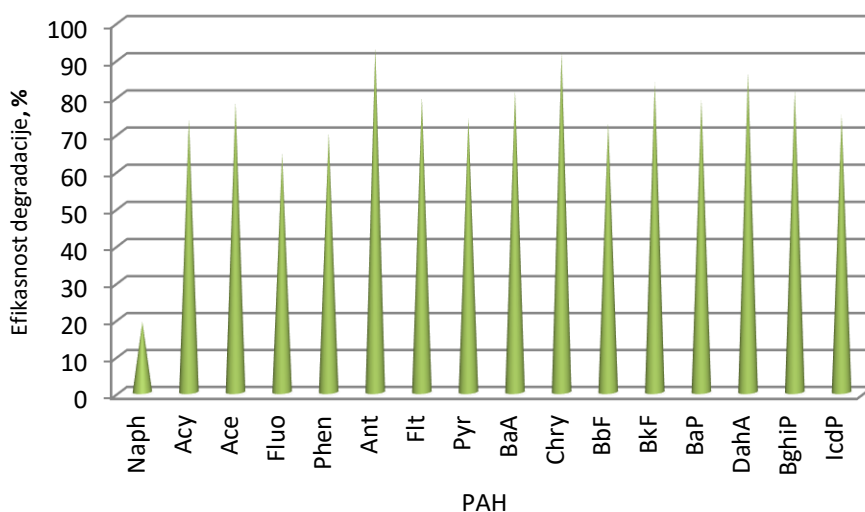
Obzirom da je anodna oksidacija u stvari postupak degradacije sa tehnološkog aspekta bilo je značajno odrediti i efikasnost procesa koristeći formulu:

$$\varepsilon = \frac{(c_0 - c)}{c_0} 100 \quad 4.1$$

gde je:

- ε efikasnost degradacije u %,
- c_0 koncentracija individualnog PAH-a na početku degradacije u (mg/l);
- c koncentracija individualnog PAH-a nakon degradacije u (mg/l).

Na slici 4.8. dat je grafički prikaz efikasnosti degradacije individualnih PAH-ova anodnom oksidacijom u vodenoj sredini.



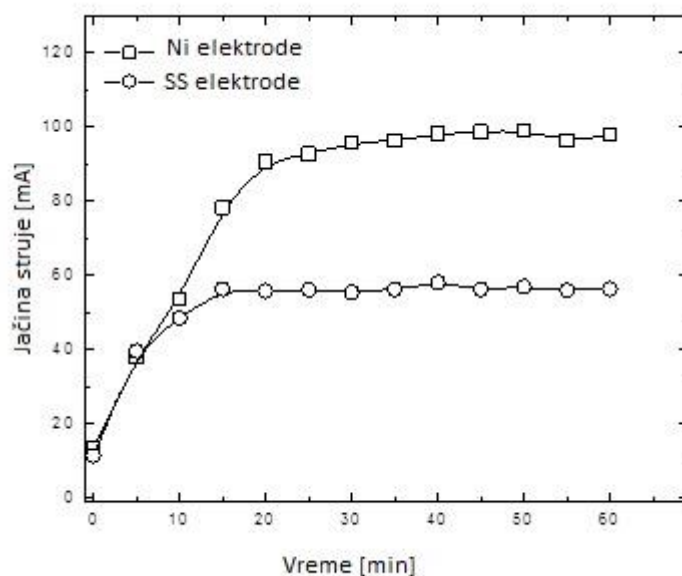
Slika 4.8. Efikasnost degradacije PAH-ova anodnom oksidacijom na Ni elektrodama u vodenoj sredini posle 60 minuta

Rezultati pokazuju da je u vodenoj sredini efikasnost degradacije ispitivanih PAH-ova putem anodne oksidacije preko 70%, osim za naftalen (19 %) i fluoranten (64%). Najefikasnije je degradiranje antracena i krizena (93% i 92%, respektivno), slede dibenzo(a,h)antracen, benzo(k)fluoranten, benzo(a)antracen, fluoranten.

4.3.2 *In situ* elektrohemijska oksidacija PAH-ova u betonu

Sposobnost jednosmerne struje da oksiduje PAH-ove u vodenim rastvorima prikazana je u prethodnom odeljku, a u narednom delu demonstrirana je njena sposobnost na realnim sistemima, tj. na kontaminiranom betonu. Način izvođenja elektrolize je opisan u poglavlju 3.5.

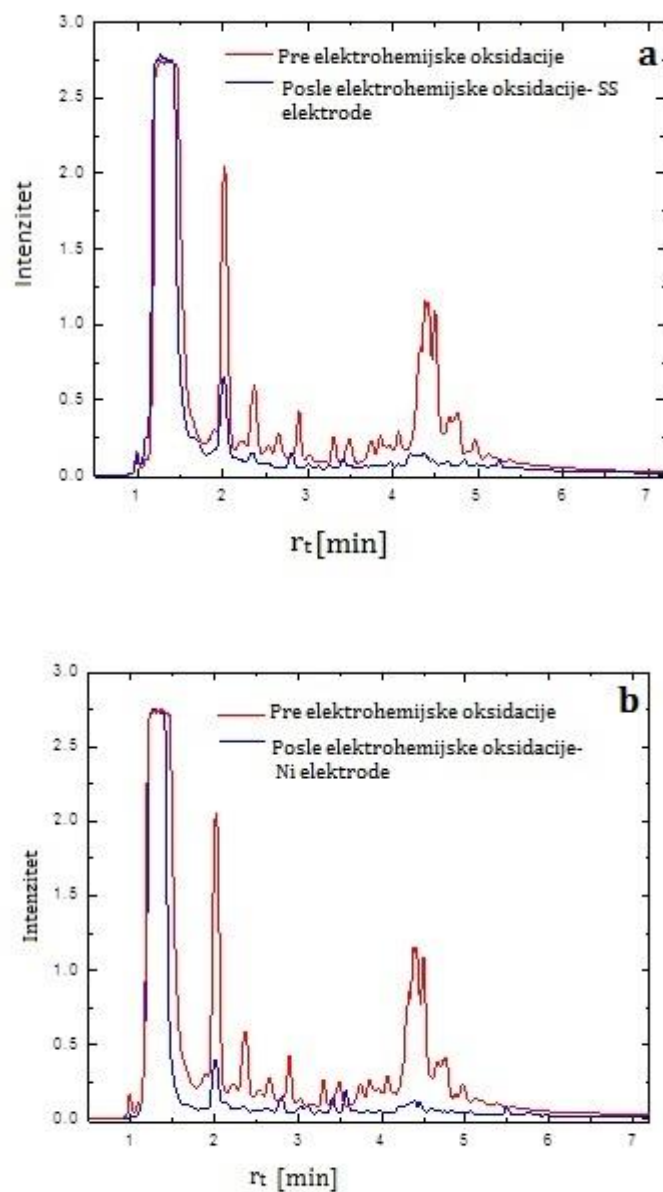
Primena jednosmernog napona (DC) od 50 V između niklenih, kao i između elektroda od nerđajućeg čelika, rezultuje u niskim vrednostima jednosmerne struje, jačine do 100 mA. Dobijene strujno-vremenske karakteristike za navedene elektrode prikazane su na slici 4.9.



Slika 4.9. Prirast jednosmerne struje kroz površinski sloj betonskog zida tokom vremena [2]

Nakon primene napona od 5 V/cm, uočava se spor porast DC tokom vremena. Stacionarni uslovi se postižu tek posle 20 minuta, u slučaju obe vrste elektroda (niklenih i od nerđajućeg čelika). Primetno duže vreme koje je potrebno da bi se postigla stacionarna struja može se objasniti usporenom difuzijom naelektrisanih vrsta iz elektrolita ka elektrodama. To je očekivano zbog značajno dužih difuzionih trajektorija u navlaženom betonu, u odnosu na medijum poput vodenog rastvora. Iz priloženog se vidi da je beton kompleksniji elektrohemijski medijum od vodenog rastvora, zato što sadrži veći broj vrsta koje mogu reagovati sa elektrodnom površinom. Takođe, u sistemu sa elektrodama od nikla mogu se zapaziti veće vrednosti struje u odnosu na sistem elektroda od nerđajućeg čelika, To potiče od veće efikasnosti Ni elektroda ka elektrolizi.

Slično kao i u prethodnom odeljku, određene su koncentracije PAH-ova u uzorcima betona pre i posle elektrolize, UPLC-PDA tehnikom (odjeljak 3.6). Na slici 4.10. predstavljeni su hromatogrami pre i posle elektrohemijske oksidacije na niklenim i elektrodama od nerđajućeg čelika.



Slika 4.10. UPLC-PDA hromatogrami nakon elektrohemijskog tretmana u kom su se koristile a) elektrode od nerđajućeg čelika (SS) b) niklene (Ni) elektrode [2]

Kada se uporede hromatogrami pre i posle elektrohemijskog tretmana betona, očigledne su promene u intenzitetu pikova na retencionim vremenima eluiranja PAH-ova.

Kako bi se dobio bolji uvid u promene na hromatogramima, urađena je kvalitativna i kvantitativna analiza PAH-ova pre i posle elektrohemijskog tretmana. Rezultati su predstavljeni u tabeli 4.6.

Tabela 4.6 Koncentracije PAH-ova određene pre i posle elektrohemijskog tretmana na različitim elektrodama [2]

PAH	Uzorak pre	Uzorak- Ni elektrode	Uzorak- SS elektrode	Efikasnost degradacije PAH-ova (%)	
	C _{PAH} (µg/kg)			Ni elektrode	SS elektrode
Naftalen	337,99	22,84	54,46	93,24	83,89
Acenaftilen	204,63	33,47	77,27	83,64	62,24
Fluoren	29,51	n.d.	19,25	100,00	34,77
Fenantren	50,57	24,02	24,91	52,50	50,74
Piren	5,93	n.d.	n.d.	100,00	100,00
Benzo(a)antracen	52,38	n.d.	n.d.	100,00	100,00
Krizen	12,58	n.d.	n.d.	100,00	100,00

Iz rezultata predstavljenih u tabeli 4.6. se vidi da dolazi do uklanjanja PAH-ova iz betona elektrohemijskom oksidacijom. Brzina oksidacije zavisi od tipa elektrode i znatno je brža kada se koriste niklene elektrode u odnosu na elektode od nerđajućeg čelika. Od detektovanih PAH-ova u betonu, nakon elektrohemijskog tretmana, najviše je zaostalo fenantrena (oko 47-49 %), dok su najefikasnije uklonjeni piren, benzo(a)antracen i krizen. Međutim, može se primetiti da u slučaju realnog uzorka betona količina uklonjenih PAH-ova najviše zavisi od njihovih početnih koncentracija u uzorku.

4.4 Citotoksični efekti policikličnih aromatičnih ugljovodonika i produkata njihove elektrohemijske oksidacije

4.4.1 Rezultati analize efekata smeše PAH-ova

4.4.1.1 Učestalost mikronukleusa

Analizom ćelijskih kultura humanih limfocita koje su tretirane smešom PAH-ova, utvrđeno je značajno povećanje učestalosti mikronukleusa ($p < 0,01$) pri svim

ispitivanim koncentracijama u odnosu na kontrolni uzorak (uzorak koji nije tretiran smešom PAH-ova).

Učestalost mikronukleusa (MN) raste sa porastom koncentracije jedinjenja sa kojim se delovalo na limfocite periferne krvi (tabela 4.7.).

Najmanja učestalost mikronukleusa uočena je dejstvom PAH-ova koncentracije 0,06 μM (povećanje broja mikronukleusa za 66 %). Pri koncentraciji od 0,2 μM broj mikronukleusa je povećan za 99 %, a pri koncentraciji od 0,6 μM za 99,5 %. Najveći broj mikronukleusa je opažen na koncentracijama 2 μM i 6 μM tj. učestalost mikronukleusa je veća za 115 % i 145 % u odnosu na kontrolni uzorak, respektivno.

Distribucije mikronukleusa u kontrolnom i tretiranim uzorcima su predstavljene kao broj binuklearnih ćelija koje sadrže od 1 do 3 mikronukleusa na oko 1000 analiziranih ćelija (tabela 4.7.). Tretman ćelijskih kultura sa PAH jedinjenjima u većim koncentracijama je povećao broj binuklearnih ćelija koje sadrže više od jednog mikronukleusa, odnosno, distribucija mikronukleusa je pomerenka ka većem broju mikronukleusa u ćelijama. Takođe, u poređenju sa kontrolnim uzorkom, pri većim koncentracijama PAH-ova (0,6, 2,0 i 6,0 μM) uočeni su i binukleari sa tri mikronukleusa.

Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature [190–195] koji ukazuju da prisustvo PAH-ova u ispitivanim medijumima (voda, vazduh i dr.) dovodi do povećanja učestalosti mikronukleusa u raznim ćelijskim kulturama (humani limfociti, humane epitelne ćelije, eritrociti i ćelije iz škruga riba, školjke).

Generalno, dobijeni rezultati pokazuju da PAH-ovi koncentracija 2 i 6 μM ispoljavaju oko dva puta jači efekat od koncentracije 0,06 μM (tabela 4.7). Stoga su kao optimalne koncentracije za naredna *in vitro* ispitivanja toksičnog efekta elektrohemijske degradacije izabrane smeše PAH-ova koncentracije 2 i 6 μM .

Tabela 4.7 Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim smešom PAH-ova

Uzorak	MN/1000 BN ćelija ²	Distribucija MN ³				PRI ⁴	
		0	1	2	3		
Kontrola (0 μM)	18,32	1128	15	3	0	1,75	
	18,04	1035	17	1	0	1,74	
	17,60	1005	18	0	0	1,74	
	17,99±0,36					1,74±0,01	
Smeša PAH-ova	0,06 μM	27,52	1062	26	2	0	1,49
		30,44	1053	29	2	0	1,50
		31,47	1081	28	2	1	1,49
		29,81±2,05					1,49±0,01
	0,2 μM	31,34	1022	29	2	0	1,47
		31,69	1042	28	3	0	1,50
		33,75	1005	29	3	0	1,50
		32,26±1,30					1,49±0,02
	0,6 μM	35,10	1021	30	2	1	1,50
		36,09	1022	26	3	2	1,47
		36,47	1008	31	2	1	1,50
		35,89±0,71					1,49±0,02
2 μM	37,11	1017	30	3	1	1,46	
	39,27	1059	31	3	2	1,48	
	39,85	1020	28	4	2	1,49	
	38,74±1,44					1,48±0,02	
6 μM	45,50	1010	42	3	0	1,45	
	42,86	1076	41	2	1	1,41	
	43,82	1098	38	3	2	1,43	
	44,06±1,34					1,43±0,02	

² MN/1000 BN ćelija-broj mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija

³ Distribucija MN-distribucija mikronukleusa po ćeliji

⁴ PRI- citokinezis-blok proliferativni indeks

4.4.1.2 Proliferativni indeks

Rezultati prikazani u tabeli 4.7 su pokazali da je pri svim ispitivanim koncentracijama PAH-ova, proliferativni potencijal ćelija (proliferativni indeks-PRI) statistički značajno niži u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$), što se slaže sa podacima iz literature [196,197].

Na osnovu izloženih rezultata može se uočiti da tretiranje limfocita periferne krvi sa različitim koncentracijama (0,06, 0,2, 0,6, 2,0, i 6,0 μM) smeše PAH-ova smanjuje indeks proliferacije bloka citokineze u odnosu na kontrolni uzorak, čak i za najmanje koncentracije (0,06 μM). Međutim, daljim povećanjem koncentracije tretirajućeg agensa vrednosti CBPI ostaju skoro nepromenjene (u odnosu na kontrolni uzorak).

4.4.1.3 Količina malondialdehida

U tabeli 4.8 prikazani su rezultati analize količine malondialdehida, indikatora lipidne peroksidacije izazvane oksidativnim stresom. Količina MDA određena je u humanim limfocitima periferne krvi u odsustvu (kontrola) i prisustvu smeše PAH-ova različitih koncentracija (0,06, 0,2, 0,6, 2,0 i 6,0 μM). Metoda za određivanje sadržaja MDA u limfocitima opisana je u poglavlju 3.8.5.

Tabela 4.8 Količina malondialdehida u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim smešom PAH-ova

	Kontrola			PAH Mix 14		
	0 μM	0,06 μM	0,2 μM	0,6 μM	2 μM	6 μM
nM	2,87	3,40	3,28	4,15	3,57	3,94
MDA/mg	3,11	3,24	3,19	3,48	3,91	4,02
proteina	2,72	3,77	3,70	3,53	3,92	3,80
	2,90 \pm0,20	3.47\pm0,27	3,39\pm0,27	3,72\pm0,37	3,80\pm0,20	3,92\pm0,11

Na osnovu rezultata može se uočiti da smeša PAH-ova dovodi do povećanja količine MDA, u odnosu na kontrolu, na koncentraciono zavisani način, što je u skladu sa podacima u literaturi [198,199]. Naime, Xia i Saunders sa saradnicima su pokazali da sa porastom koncentracija benzo(a)pirena, raste i količina malondialdehida u ćelijama.

Međutim, statistički značajno povećanje MDA može se zapaziti samo pri najvišim koncentracijama od 2 μM ($p < 0,05$) i 6 μM ($p < 0,01$), pa su ove koncentracije izabrane za dalje eksperimente.

4.4.1.4 Aktivnost katalaze

Aktivnost katalaze, enzima antioksidativne zaštite, izmerena je u eritrocitnom hemolizatu koji je tretiran sa smešom PAH-ova različitih koncentracija, prikazana je u tabeli 4.9. Pripremljeni rastvori PAH-ova su u opsegu koncentracija 0,06-6,0 μM .

U poređenju sa kontrolnim uzorcima utvrđeno je statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze u svim tretiranim uzorcima ($p < 0,01$). Najveće promene aktivnosti katalaze, u odnosu na kontrolni uzorak, dobijene su pri koncentracijama PAH-ova 2 i 6 μM (39% i 41%, respektivno), stoga su ove koncentracije izabrane za dalja istraživanja.

Nastalo povećanje aktivnosti katalaze je osnovna indikacija oksidativnog stresa ćelije (uzrokovanog indirektnim uticajem PAH-ova) i pokretanja sistema na odbranu od ROS. Povećanje aktivnosti katalaze ima važnu ulogu u adaptaciji ćelije na oksidativni stres.

Wang i saradnici su pokazali da aortne endotelijalne ćelije miševa pod dejstvom PAH-ova (benzo(a)pirena) pojačavaju ekspresiju antioksidativnih enzima (a samim tim i aktivnost ovih enzima), što je u skladu sa prezentovanim podacima [200].

Trend rasta aktivnosti katalaze sa porastom koncentracije PAH-ova koji je prikazan u tabeli 4.9 slaže se sa literaturnim podacima koji su izneli Gavrilović i Saunders sa saradnicima [198,201].

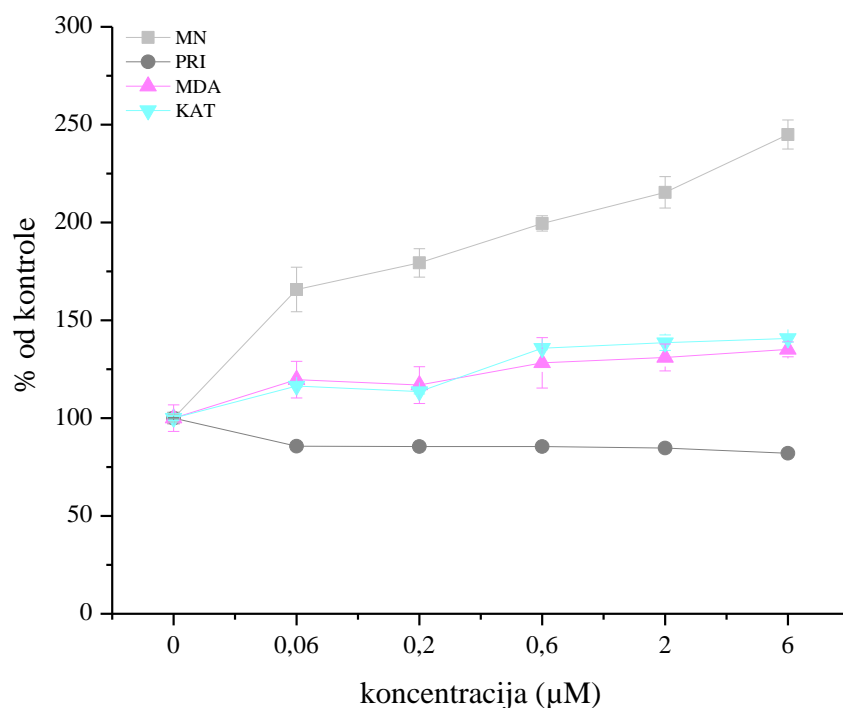
Tabela 4.9 Aktivnost katalaze u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim smešom PAH-ova

	Kontrola		PAH Mix 14			
	0 μM	0,06 μM	0,2 μM	0,6 μM	2 μM	6 μM
Aktivnost katalaze (mg / minHb)	1,38	1,62	1,60	1,91	2,00	1,99
	1,41	1,64	1,60	1,89	1,93	1,98
	1,41	1,63	1,57	1,90	1,89	1,94
	1,40\pm0,02	1,63\pm0,01	1,59\pm0,02	1,90\pm0,01	1,94\pm0,06	1,97\pm0,03

4.4.1.5 Korelacije između ispitivanih parametara

Rezultati pokazuju (slika 4.11) da sa porastom učestalosti MN, opada proliferativni potencijal limfocita u svim uzorcima tretiranim smešom PAH-ova. Linearnom regresionom analizom je utvrđena negativna korelaciju između ispitivanih parametara ($r=-0,92$, $p=0,01$).

Linearnom regresionom analizom, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između učestalosti MN i količine produkovanog MDA ($r=0,98$, $p=0,0006$), odnosno, sa povećanjem učestalosti mikronukleusa, raste i količina produkovanog malondialdehida. Takođe, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između količine produkovanog malondialdehida i aktivnosti katalaze ($r=0,97$, $p=0,001$).



Slika 4.11. Učestalost mikronukleusa (MN), proliferacioni potencijal ćelija (PRI), količina malondialdehida (MDA) i aktivnost katalaze (KAT) u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim smešom PAH-ova različite koncentracije, izraženi kao procenat od kontrole koja je 100% (srednja vrednost±S.D.).

4.4.2 Rezultati analize efekata produkata nastalih elektrohemijском oksidacijom smeše PAH-ova koncentracije 2 µM

4.4.2.1 Učestalost mikronukleusa

U tabeli 4.10 prikazani su rezultati učestalosti mononukleusa i proliferatnog indeksa koji su dobijeni posmatranjem ćelija limfocita periferne krvi nakon dejstva elektrohemijски tretirane 2 µM smeše PAH-ova.

Smeša PAH-ova i njihovih produkata degradacije nastalih elektrohemijском oksidacijom statistički značajno ($p < 0,001$) snižavaju učestalost mikronukleusa u odnosu na početno stanje tj. na broj MN dobijen dejstvom elektrohemijски netretiranog rastvora PAH-ova koncentracije 2 µM.

Može se zapaziti da smanjenje broja MN nije linearno zavisno od vremena elektrohemijске oksidacije. Najmanji procenat smanjenja broja MN, u odnosu na početno stanje, uočen je dejstvom rastvora PAH-ova koji su elektrolitički tretirani u

trajanju od 30 min i 1 min i iznosi 31% i 39%, respektivno. Slede 15 min (50%), 5 min (59%) i 60 min. (60%).

Tabela 4.10 Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u uzorcima tretiranim 2 μ M smešom PAH-ova i produktima njihove elektrohemijske oksidacije

Uzorak	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN				PRI	
		0	1	2	3		
2 μ M smeša PAH-ova	0 min	38,97	1023	20	6	3	1,49
		39,85	1021	26	5	2	1,49
		37,84	1023	29	4	1	1,46
		38,89\pm1,01					1,48\pm0,02
	1 min	24,48	1077	25	1	0	1,45
		23,90	1065	21	1	1	1,46
		22,88	1027	20	2	0	1,45
		23,75\pm0,81					1,45\pm0,01
	5 min	16,31	1027	13	2	0	1,45
		15,59	1011	14	1	0	1,45
		15,63	1008	16	0	0	1,43
		15,84\pm0,40					1,44\pm0,01
	15 min	19,48	1058	19	1	0	1,43
		20,31	1014	19	1	0	1,44
		18,26	1075	20	0	0	1,41
		19,35\pm1,03					1,43\pm0,02
	30 min	26,72	1021	26	1	0	1,43
		27,94	1011	25	2	0	1,42
		26,19	1006	23	2	0	1,47
		26,95\pm0,90					1,44\pm0,03
	60 min	16,44	1018	15	1	0	1,48
		14,59	1013	15	0	0	1,45
		15,49	1017	16	0	0	1,47
		15,51\pm0,93					1,47\pm0,02

Obzirom da sa porastom vremena trajanja elektrohemijske oksidacije koncentracija PAH-ova opada (tabela 4.5), može se pretpostaviti da najveći broj MN, a samim tim i toksičnost, najvećim delom potiče od nedegradiranih PAH jedinjenja, a samo manjim delom od produkata njihove degradacije do 1. minuta tretmana. Intenzivna oksidacija PAH-ova odvija se od 1. do 5. minuta što vodi smanjenju broja MN. Tokom elektrolize smeše PAH-ova do 30. minuta dolazi do porasta učestalosti mikronukleusa, što ukazuje da nastaju intermedijeri koji su toksičniji od polaznog jedinjenja. Do 60. minuta elektrohemijskog tretmana intermedijeri se razgrađuju do manje toksičnih oblika i učestalost MN opada.

Takođe, primenom elektrohemijski tretiranog rastvora PAH-ova na ćelijske kulture limfocita smanjen je broj binuklearnih ćelija sa jednim i dva mikronukleusa. Broj binukleara sa tri MN je u potpunosti anuliran.

4.4.2.2 Proliferativni potencijal ćelija

Proliferativni potencijal ćelija je smanjen u svim uzorcima tretiranim produktima nastalim tokom oksidacije u odnosu na početno stanje (0 min) za približno 15-18 %, statistički značajno ($p < 0,01$) nakon 5 min, 15 min i 30 min (tabela 4.10). U poređenju sa uzorkom koji nije tretiran smešom PAH-ova, svi produkti oksidacije izazivaju statistički značajno smanjenje proliferativnog potencijala ćelija ($p < 0,01$).

4.4.2.3 Količina malondialdehida

U tabeli 4.11 je prikazan uticaj PAH-ova i njihovih produkata nakon elektrohemijske oksidacije na sadržaj malonaldehida u humanim limfocitima.

Porastu sadržaja MDA doprinose i PAH-ovi zato što su sve vrednosti značajno više u odnosu na uzorke netretirane PAH-ovima (opisano u odeljku 4.4.1.3.). Takođe, količina MDA u odnosu na vreme trajanje elektrolize ne opada sa koncentracijom PAH-ova (videti poglavlje 4.3.1.2 Elektroliza), već njegova koncentracija kreće da raste sa vremenom trajanja elektrolize prvih 5 minuta ($p < 0,05$). Iz navedenog se može zaključiti da je povećanje sadržaja MDA u ćelijama uzrokovano nastankom proizvoda degradacije koji utiču na povećanje lipidne peroksidacije, a samim tim i sadržaj malondialdehida.

Vrednosti MDA na ostalim vremenima su slične vrednostima polaznog jedinjenja, što ukazuje na smanjenje toksičnosti.

Tabela 4.11 Količina malondialdehida u uzorcima tretiranim 2 μM smešom PAH-ova i produktima njihove elektrohemijske oksidacije

2 μM smeša PAH-ova i njihovih produkata						
	0 min	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
nM	3,84	4,28	5,35	3,67	3,58	4,19
MDA/mg	3,56	4,55	5,97	3,67	4,12	4,22
proteina	3,88	4,10	6,11	3,68	3,82	4,25
	3,76\pm0,17	4,31\pm0,23	5,81\pm0,40	3,67\pm0,01	3,84\pm0,27	4,22\pm0,03

4.4.2.4 Aktivnost katalaze

Kada se posmatraju podaci prezentovani u tabeli 4.12, može se uočiti trend opadanja aktivnosti katalaze nakon tretiranja elektrohemijski oksidovanom 2 μM smešom PAH-ova.

Tabela 4.12 Aktivnost katalaze u uzorcima tretiranim 2 μM smešom PAH-ova i produktima njihove elektrohemijske oksidacije

2 μM smeša PAH-ova i njihovih produkata						
	0 min	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Aktivnost						
katalaze	1,89	1,55	1,42	1,34	1,35	1,53
(mg /	1,95	1,49	1,41	1,34	1,35	1,55
minHb)	1,92	1,58	1,40	1,33	1,34	1,54
	1,92\pm0,03	1,54\pm0,05	1,41\pm0,01	1,34\pm0,01	1,35\pm0,01	1,54\pm0,01

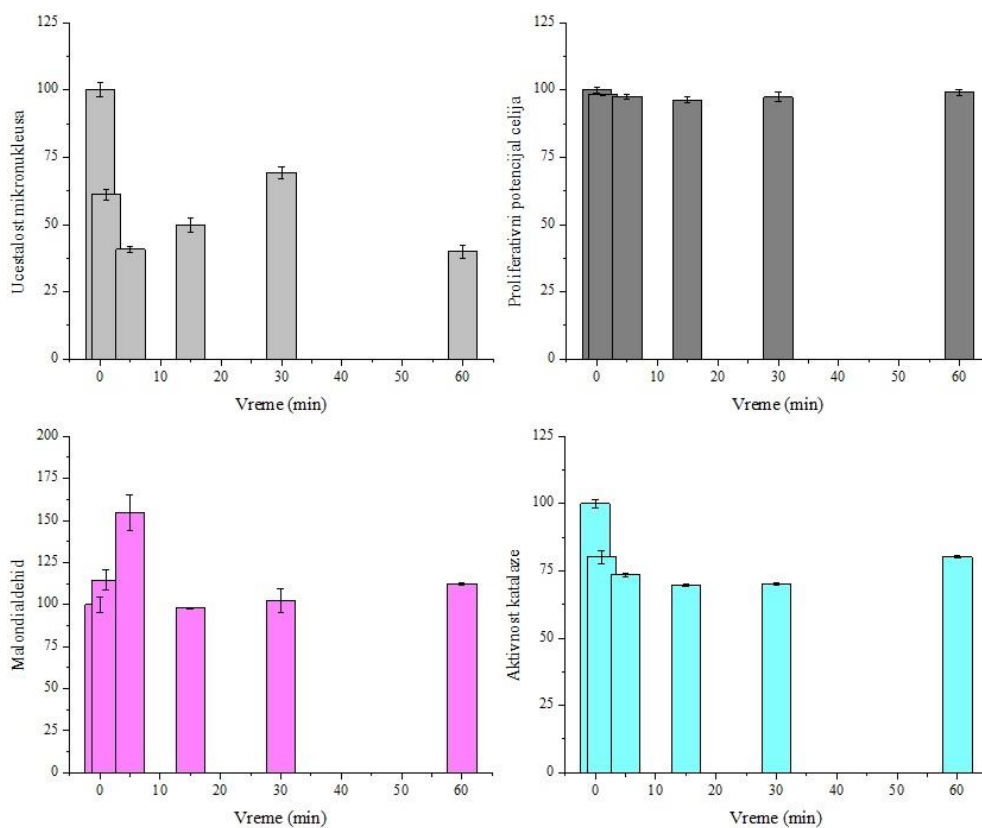
Statistički značajan pad uočava se pri svim ispitivanim vremenima ($p < 0,05$). U 15. minutu aktivnost katalaze je najniža i iznosi 1,34 mg/minHb, što je za 30% manje od vrednosti zabeležene na početku elektrolize.

Nakon 15 min i 30 min, aktivnost katalaze je satatistički značajno niža čak i u odnosu na kontrolu (uzorke netretirane smešom PAH-ova) ($p < 0,05$).

Na osnovu ovoga, može se zaključiti da elektrohemijском oksidacijom PAH-ova ne nastaju produkti koji utiču na oksidativni stres.

4.4.2.5 Korelacije između ispitivanih parametara

U slici 4.11 prikazana je korelacija između ispitivanih parametara citotoksičnosti.



Slika 4.12. Učestalost mikronukleusa (MN), proliferacioni potencijal ćelija (PRI), količina malondialdehida (MDA) i aktivnost katalaze (KAT) u uzorcima tretiranim 2 μ M smešom PAH-ova i produktima njihove elektrohemijske degradacije

Linearnom regresionom analizom, utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između proliferativnog potencijala ćelija i aktivnosti katalaze ($r=0,91$, $p=0,05$), odnosno što je niži potencijal ćelija da se dele to je i aktivnost katalaze manja.

4.4.3 Rezultati analize efekata produkata nastalih elektrohemijском oksidacijom smeše PAH-ova koncentracije 6 μ M

4.4.3.1 Učestalost mikronukleusa

U tabeli 4.13 prikazani su rezultati testa učestalosti mononukleusa i proliferativnog indeksa dobijeni posmatranjem ćelija limfocita periferne krvi nakon izlaganja 6 μ M smeši PAH-ova koje su elektrohemijски tretirane.

Rezultati pokazuju da produkti nastali elektrohemijском oksidacijom generalno snižavaju učestalost MN u odnosu na početno stanje tj. broj MN dobijen dejstvom elektrohemijски netretiranog rastvora PAH-ova koncentracije 6 μ M ($p<0,05$).

Najveći procenat smanjenja učestalosti MN, u odnosu na početno stanje, uočen je dejstvom rastvora PAH-ova koji su elektrolitički tretirani 5 minuta i iznosi 65 %. Slede 60min (46 %), 15min (43 %) i 30min (31 %). Kao u slučaju elektrohemijске oksidacije 2 μ M rastvora smeše PAH-ova (tabela 4.10), smanjenje učestalosti MN do 5. minuta može se najvećim delom pripisati dejstvu nedegradiranih PAH jedinjenja. Sa porastom vremena elektrolize, pretpostavlja se da do 30. minuta oksidacijom PAH-ova nastaju produkti koji su toksičniji od polaznog jedinjenja, što se ogleda u porastu učestalosti MN. Daljim porastom vremena elektrohemijskog procesa (do 60. minuta) intermedijeri se razgrađuju u produkte manje toksičnosti i učestalost MN opada.

Takođe, kao i kod ćelija tretiranih elektrohemijски oksidovanom 2 μ M smešom PAH-ova smanjen je broj binuklearnih ćelija sa jednim i dva mikronukleusa, dok se binukleari sa tri mikronukleusa ne mogu uočiti.

4.4.3.2 Proliferativni potencijal ćelija

Analiza rezultata je pokazala da elektrohemijска oksidacija ne utiče na proliferativni potencijal ćelija u odnosu na polazno jedinjenje, tabela 4.13..

Nasuprot tome, statistički značajno smanjenje proliferativnog potencijala je utvrđeno u svim uzorcima tretiranim produktima oksidacije (pri svim vremenima) u odnosu na uzorke netretirane PAH-ovima ($p < 0.001$).

Tabela 4.13 Učestalost mikronukleusa i proliferativni indeks u uzorcima tretiranim smešom PAH-ova i produktima njihove elektrohemijske oksidacije

Uzorak	MN/1000 BN ćelija	Distribucija MN				PRI	
		0	1	2	3		
6 μ M smeša PAH-ova	0 min	45,58	1014	32	5	2	1,41
		41,90	1016	27	4	3	1,44
		41,47	1002	29	4	2	1,44
		42,98\pm2,26					1,43\pm0,02
	1 min	18,81	1043	20	0	0	1,45
		16,02	1045	15	1	0	1,43
		17,13	1034	16	1	0	1,45
		17,32\pm1,40					1,45\pm0,01
	5 min	14,49	1088	16	0	0	1,46
		15,61	1011	12	2	0	1,45
		15,33	1028	16	0	0	1,45
		15,14\pm0,58					1,45\pm0,01
	15 min	23,09	1103	20	3	0	1,47
		25,29	1004	22	2	0	1,47
		25,67	1027	23	2	0	1,44
		24,68\pm1,39					1,44\pm0,02
	30 min	30,92	1005	28	2	0	1,40
		30,39	1024	26	3	0	1,41
		27,41	1031	25	2	0	1,39
		29,57\pm1,89					1,40\pm0,01
	60 min	22,03	1023	19	2	0	1,42
		22,97	1021	24	0	0	1,41
		25,17	1008	24	1	0	1,38
		23,39\pm1,61					1,40\pm0,02

4.4.3.3 Količina malondialdehida

U tabeli 4.14 je prikazan uticaj 6 μM smeše PAH-ova i njihovih produkata nakon elektrohemijske oksidacije na sadržaj malondialdehida u humanim limfocitima. U poređenju sa limfocitima koji nisu tretirani PAH-ovima i produktima njihove elektrohemijske degradacije, količina produkovanog malondialdehida je statistički značajno viša nakon tretmana produktima oksidacije pri svim vremenima ($p < 0,05$).

Kao i u slučaju 2 μM smeše PAH-ova i njihovih produkata nakon elektrohemijske oksidacije, sadržaj malondialdehida u ćelijama raste do 5. minuta (23 %), a nakon toga se smanjuje ili je sličan početnim vrednostima, pre elektrohemijske oksidacije. Pošto je u poglavlju 4.3.1.2 opisano kako koncentracija PAH-ova opada sa trajanjem elektrolize, može se zaključiti da porastu toksičnosti (količini malondialdehida) do 5. minuta doprinose proizvodi degradacije PAH-ova.

Smanjene vrednosti MDA na ostalim vremenima elektrolize su slične vrednostima polaznog jedinjenja, što implicira da dolazi do smanjenja peroksidativnog efekta smeše PAH-ova i njihovih produkata degradacije.

Tabela 4.14 Količina malondialdehida u uzorcima tretiranim 6 μM smešom PAH-ova i produktima njihove elektrohemijske oksidacije

6 μM smeša PAH-ova i njihovih produkata						
	0 min	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
nM	3,67	4,10	4,56	3,90	3,44	3,70
MDA/mg	4,15	4,11	4,85	3,87	3,71	4,05
proteina	3,88	4,78	4,93	3,93	3,62	3,98
	3,90\pm0,24	4,33\pm0,39	4,78\pm0,19	3,90\pm0,03	3,59\pm0,14	3,91\pm0,19

4.4.3.4 Aktivnost katalaze

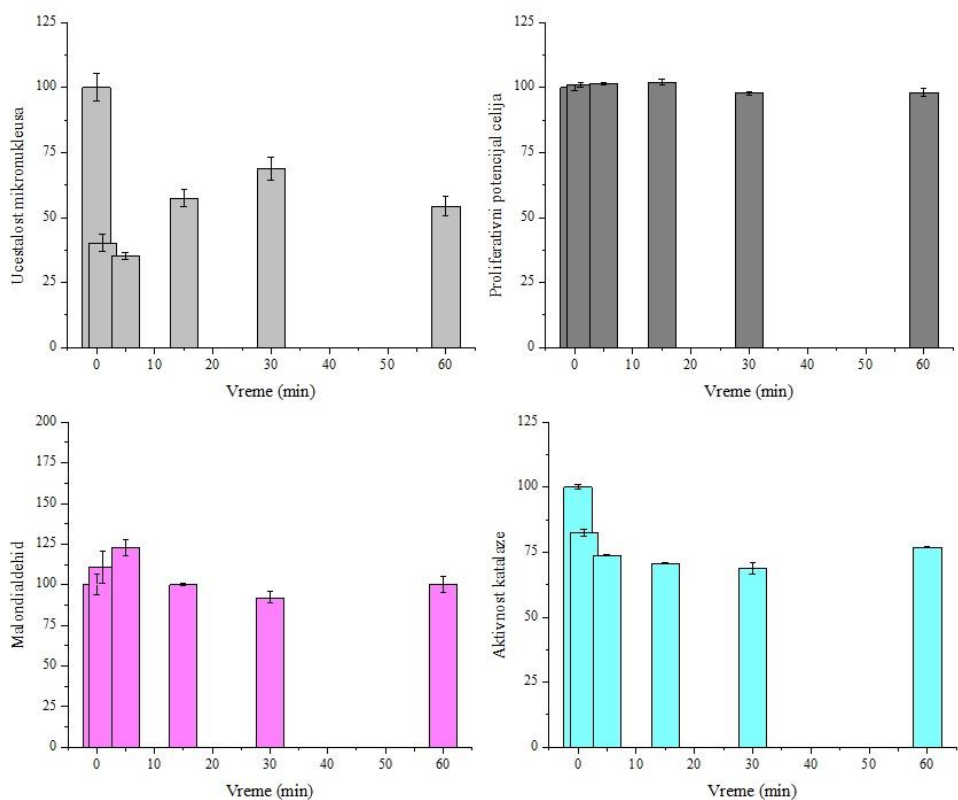
U tabeli 4.15 prikazani su rezultati aktivnosti katalaze pre i nakon elektrohemijske oksidacije 6 μM smeše PAH-ova. Na osnovu izloženih rezultata, isto kao i kod elektrooksidacije 2 μM smeše PAH-ova, može se primetiti opadanje aktivnosti katalaze, statistički značajno pri svim ispitivanim vremenima ($p < 0,01$). Najmanja aktivnost katalaze je u 30. minutu i za 31% je manja od početne vrednosti.

Tabela 4.15 Aktivnost katalaze u uzorcima tretiranim 6 μM smešom PAH-ova i produktima njihove elektrohemijske oksidacije

6 μM smeša PAH-ova i njihovih produkata						
Aktivnost	0 min	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
katalaze	1,94	1,60	1,45	1,38	1,30	1,50
(mg /	1,97	1,61	1,45	1,39	1,37	1,51
minHb)	1,97	1,65	1,44	1,39	1,38	1,51
	1,96\pm0,02	1,62\pm0,03	1,45\pm0,01	1,39\pm0,01	1,35\pm0,04	1,51\pm0,01

4.4.3.5 Korelacije između ispitivanih parametara

Linearnom regresionom analizom nisu utvrđene statistički značajne korelacije.



Slika 4.13. Učestalost mikronukleusa (MN), proliferacioni potencijal ćelija (PRI), količina malondialdehida (MDA) i aktivnost katalaze (KAT) u uzorcima tretiranim 6 μ M smešom PAH-ova i produktima njihove elektrohemijske degradacije

5 ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih zadatka i izloženih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- U vodenim rastvorima NaCl dolazi do elektrohemijske oksidacije PAH-ova, što je potvrđeno UPLC-PDA analizom, koja pokazuje smanjenje koncentracije PAH-ova sa porastom vremena elektrolize. Efikasnost elektrohemijske oksidacije za određene PAH-ove iznosi oko 90%.
- Primena jednosmernog napona od 50 V između niklenih, kao i između elektroda od nerđajućeg čelika u betonu, rezultuje smanjenjem koncentracije PAH-ova.
- Brzina oksidacije zavisi od materijala elektrode i znatno je brža kada se koriste niklene elektrode u odnosu na elektrode od nerđajućeg čelika.
- U slučaju realnog uzorka betona količina uklonjenih PAH-ova najviše zavisi od početnih koncentracija u uzorku i trajanja elektrolize.
- Razvijena je i validirana metoda za simultano identifikaciju i kvantifikaciju 16 EPA PAH-ova u betonu korišćenjem UPLC-PDA tehnike. Ovaj metod pokazuje zadovoljavajuću tačnost, preciznost i linearnost u ispitivanom koncentracionom opsegu.
- Analizirani PAH-ovi pri svim ispitivanim koncentracijama značajno povećavaju nivo DNK oštećenja, smanjuju potencijal ćelija za deobu i indukuju oksidativni stres što se ogleda kroz povećanje malondialdehida u procesu lipidne peroksidacije ćelijskih membrana i povećanju aktivnosti katalaze, enzima antioksidativne odbrane. Najizraženiji efekti su uočeni pri najvišim ispitivanim koncentracijama.
- Procesom elektrohemijske oksidacije PAH-ova (finalne koncentracije 2 μM i 6 μM) nastaju produkti koji ispoljavaju različit stepen citotoksičnosti zavisno od vremena nastanka. Najtoksičniji efekti su utvrđeni u prvih 15 minuta što se manifestuje kroz povećanje genomskih ozleda, suprimiranje proliferativnog potencijala i/ili indukciju oksidativnog stresa, kao i značajanu modifikaciju aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Nakon 60

minuta produkti oksidacije su manje citotoksični u odnosu na početno jedinjenje, ali i dalje su toksičniji u poređenju sa netretiranom kontrolom.

LITERATURA

- [1] D.D. Acimovic, Z.M. Nikolic, M.S. Tomic, D.S. Milovanovic, V.M. Nikolic, T.P. Brdaric, et al., Validation and uncertainty estimation of UPLC-PDA method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in concrete, *J. Hazard. Mater.* 325 (2017) 271–278. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2016.12.008.
- [2] D.D. Aćimović, S.D. Karić, Ž.M. Nikolić, T.P. Brdarić, G.S. Tasić, M.P. Marčeta Kaninski, et al., Electrochemical oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons in polluted concrete of the residential buildings, *Environ. Pollut.* 220 (2017) 393–399. doi:10.1016/J.ENVPOL.2016.09.075.
- [3] E. Morillo, A.S. Romero, L. Madrid, J. Villaverde, C. Maqueda, Characterization and sources of PAHs and potentially toxic metals in urban environments of Sevilla (southern Spain), *Water. Air. Soil Pollut.* 187 (2008) 41–51. doi:10.1007/s11270-007-9495-9.
- [4] J.R. Murray, T.M. Penning, U. States, Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, in: *Compr. Toxicol.*, Third Edit, Elsevier, 2018: pp. 87–153. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.95691-5.
- [5] J. Angerer, C. Mannschreck, J. Gündel, Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 70 (1997) 365–377. doi:10.1007/s004200050231.
- [6] F.C. Moreira, R.A.R. Boaventura, E. Brillas, V.J.P. Vilar, Applied Catalysis B: Environmental Electrochemical advanced oxidation processes: A review on their application to synthetic and real wastewaters, *Applied Catal. B, Environ.* 202 (2017) 217–261. doi:10.1016/j.apcatb.2016.08.037.
- [7] C. a Martínez-Huitle, S. Ferro, C.A. Martí, Electrochemical oxidation of organic pollutants for the wastewater treatment: direct and indirect processes., *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 1324–40. doi:10.1039/b517632h.
- [8] S. Bertilsson, A. Widenfalk, Photochemical degradation of PAHs in freshwaters and their impact on bacterial growth - Influence of water chemistry, *Hydrobiologia.* 469 (2002) 23–32. doi:10.1023/A:1015579628189.

- [9] R.F. Lee, Photo-oxidation and Photo-toxicity of Crude and Refined Oils, *Spill Sci. Technol. Bull.* 8 (2003) 157–162. doi:10.1016/S1353-2561(03)00015-X.
- [10] A.L. Knecht, B.C. Goodale, L. Truong, M.T. Simonich, A.J. Swanson, M.M. Matzke, et al., Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 271 (2013) 266–275. doi:10.1016/j.taap.2013.05.006.
- [11] P. Taylor, J.L. Wang, L.E.J.I.N. Xu, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: Formation of Hydroxyl Radical and Application Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: Formation of Hydroxyl Radical*, (2011) 37–41. doi:10.1080/10643389.2010.507698.
- [12] International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC, *Nomenclature of organic chemistry*, July 1957., (1958) v, 92 p.
- [13] H.A. Favre, W.H. Powell, *Nomenclature of Organic Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, 2014. doi:10.1039/9781849733069.
- [14] F.S. Ehrenhauser, PAH and IUPAC Nomenclature, *Polycycl. Aromat. Compd.* 35 (2015) 161–176. doi:10.1080/10406638.2014.918551.
- [15] J. Cioslowski, A.M. Turek, A novel compact nomenclature of the condensed benzenoid hydrocarbons, *Tetrahedron.* 40 (1983) 2161–2164.
- [16] R. Panico, W.H. Powell, J.C. Richer, *A guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993.
- [17] K.P.C. Vollhardt, N.E. Schore, *Organic Chemistry*, W. H. Freeman, 2010.
- [18] M.M. Mumtaz, J.D. George, *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons*, 1996. doi:10.3109/15569529909037564.
- [19] R.L. Efstathios Stogiannidis, *Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices: An Overview of Possibilities*, 2013. doi:10.1007/978-3-319-10638-0_2.
- [20] C. Achten, J.T. Andersson, *Overview of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC)*, *Polycycl. Aromat. Compd.* 35 (2015) 177–186. doi:10.1080/10406638.2014.994071.
- [21] K. Joa, E. Panova, N. Irha, E. Teinmaa, J. Lintelmann, U. Kirso, *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oil shale processing wastes:*

- Current practice and new trends, *Oil Shale*. 26 (2009) 59–72. doi:10.3176/oil.2009.1.07.
- [22] The PubChem Project, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed May 11, 2017).
- [23] W.M. Haynes, *CRC handbook of chemistry and physics*, (2014). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
- [24] M.J. O’Neil, *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, RSC Publishing, 2013.
- [25] C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, *Exploring QSAR: hydrophobic, electronic, and steric constants*, American Chemical Society Washington, DC, 1995.
- [26] X.-D. Huang, D.G. Dixon, B.M. Greenberg, IMPACTS OF UV RADIATION AND PHOTOMODIFICATION ON THE TOXICITY OF PAHs TO THE HIGHER PLANT LEMNA GIBBA (DUCKWEED), *Environ. Toxicol. Chem.* 12 (1993) 1067. doi:10.1897/1552-8618(1993)12[1067:IOURAP]2.0.CO;2.
- [27] K.-M. Lehto, E. Vuorimaa, H. Lemmetyinen, Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in dilute aqueous solutions detected by fluorescence, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 136 (2000) 53–60. doi:10.1016/S1010-6030(00)00321-X.
- [28] J. Sabaté, J.M. Bayona, A.M. Solanas, Photolysis of PAHs in aqueous phase by UV irradiation, *Chemosphere*. 44 (2001) 119–124. doi:10.1016/S0045-6535(00)00208-3.
- [29] S. Sanches, C. Leitão, A. Penetra, V. V. Cardoso, E. Ferreira, M.J. Benoliel, et al., Direct photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water sources, *J. Hazard. Mater.* 192 (2011) 1458–1465. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.06.065.
- [30] O.T.C. Burgess, *Uv-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*, 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [31] B. Apicella, A. Ciajolo, A. Tregrossi, Fluorescence Spectroscopy of Complex Aromatic Mixtures, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2138–2143. doi:10.1021/ac034860k.
- [32] W.S. Alves, E.A. Manoel, N.S. Santos, R.O. Nunes, G.C. Domiciano, M.R. Soares, Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in *Medicago sativa* L.

- by Fluorescence Microscopy, *Micron*. (2017). doi:10.1016/j.micron.2017.01.004.
- [33] A.M. Rivera-Figueroa, K.A. Ramazan, B.J. Finlayson-Pitts, Fluorescence, Absorption, and Excitation Spectra of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as a Tool for Quantitative Analysis, *J. Chem. Educ.* 81 (2004) 242. doi:10.1021/ed081p242.
- [34] D.L. Poster, M.M. Schantz, L.C. Sander, S.A. Wise, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: A critical review of gas chromatographic (GC) methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 859–881. doi:10.1007/s00216-006-0771-0.
- [35] EPA, United States Environmental Protection Agency | US EPA, (2017). <https://www.epa.gov/> (accessed May 17, 2017).
- [36] T. Wenzl, R. Simon, E. Anklam, J. Kleiner, Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 716–725. doi:10.1016/j.trac.2006.05.010.
- [37] G.-Y. Pee, S. Na, Z. Wei, L.K. Weavers, Increasing the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment using ultrasound, *Chemosphere*. 122 (2015) 265–272. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.072.
- [38] W. Wang, B. Meng, X. Lu, Y. Liu, S. Tao, Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques, *Anal. Chim. Acta.* 602 (2007) 211–222. doi:10.1016/j.aca.2007.09.023.
- [39] M.T. Lo, E. Sandi, Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods, *Residue Rev.* 69 (1978) 35–86. doi:10.1533/9780857098917.2.308.
- [40] S.A. Wise, L.C. Sander, M.M. Schantz, Analytical Methods for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) — A Historical Perspective on the 16 U.S. EPA Priority Pollutant PAHs, *Polycycl. Aromat. Compd.* 35 (2015) 187–247. doi:10.1080/10406638.2014.970291.
- [41] US Environmental Protection Agency, Methods for the Determination of

- Organic Compounds in Drinking Water 1, Natl. Expo. Res. Lab. Off. Res. Dev. U.S. Environ. Prot. Agency Cincinnati. SUPPLEMENT (1990).
- [42] US Environmental Protection Agency, Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water 3, Natl. Expo. Res. Lab. Off. Res. Dev. U.S. Environ. Prot. Agency Cincinnati. SUPPLEMENT (1995) 1–62.
- [43] US Environmental Protection Agency, Determination of polynuclear aromatic hydrocarbon in industrial and municipal wastewaters.pdf, Natl. Tech. Inf. Serv. (1982).
- [44] US Environmental Protection Agency, Methods for Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater - Test Method 610: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, 1984. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_610_1984.pdf (accessed May 20, 2017).
- [45] US Environmental Protection Agency, Method 625 . 1 – Base / Neutrals and Acids by GC / MS December 2014, 2014.
- [46] US Environmental Protection Agency, Method 1625 , Revision B : Semivolatile Organic Compounds by Isotope Dilution GC / MS, 1984. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1625b_1984.pdf (accessed May 20, 2017).
- [47] USEPA, Test Methods for Evaluating Solid Waste - Physical and Chemical Methods, (1999) 1–40. [http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe?Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=\(microwave+digestion\)+OR+FNAME=%2250000U6E.txt%22+AND+FNAME=%2250000U6E.txt%22&FuzzyDegree=0&ZyAction=ZyActionD&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocume](http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe?Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=(microwave+digestion)+OR+FNAME=%2250000U6E.txt%22+AND+FNAME=%2250000U6E.txt%22&FuzzyDegree=0&ZyAction=ZyActionD&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocume).
- [48] USEPA, Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air, Compendium Method TO-13A: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Cent. Environ. Res. Inf. Off. Res. Dev. U.S. Environ. Prot. Agency Cincinnati, OH 45268. II (1999) 78. <https://www3.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/airtox/to-13arr.pdf>

(accessed May 20, 2017).

- [49] J.L. Capelo, M.M. Galesio, G.M. Felisberto, C. Vaz, J.C. Pessoa, Micro-focused ultrasonic solid-liquid extraction (FUSLE) combined with HPLC and fluorescence detection for PAHs determination in sediments: Optimization and linking with the analytical minimalism concept, *Talanta*. 66 (2005) 1272–1280. doi:10.1016/j.talanta.2005.01.046.
- [50] F. Macedo, E.T. Marsico, C.A. Conte-Júnior, M.F. de Resende, T.F. Brasil, A.D. Pereira Netto, Development and validation of a method for the determination of low-ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC-fluorescence, *Food Chem.* 179 (2015) 239–245. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.046.
- [51] K.S. Williamson, J.D. Petty, J.N. Huckins, J. a. Lebo, E.M. Kaiser, HPLC-PFD determination of priority pollutant PAHs in water, sediment, and semipermeable membrane devices, *Chemosphere*. 49 (2002) 703–715. doi:10.1016/S0045-6535(02)00394-6.
- [52] S.P. Bagley, M.J. Wornat, Identification of Six- to Nine-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from the Supercritical Pyrolysis of n - Decane, (2013).
- [53] M.S. Walker, M.J. Wornat, First identification of benzo[cd]phenanthro[1,2,3-lm]perylene by high-pressure liquid chromatography with ultraviolet-visible spectroscopy and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 4568–4574. doi:10.1016/j.chroma.2010.04.072.
- [54] S. THOMAS, N.B. PODDAR, M.J. WORNAT, Identification of Methylene-Bridged Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Products of Catechol Pyrolysis, *Polycycl. Aromat. Compd.* 32 (2012) 531–555. doi:10.1080/10406638.2012.683229.
- [55] D.B. Robb, T.R. Covey, a P. Bruins, Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653–3659. doi:Doi 10.1021/Ac0001636.
- [56] L.C. Short, S.S. Cai, J.A. Syage, APPI-MS: Effects of Mobile Phases and VUV Lamps on the Detection of PAH Compounds, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18

- (2007) 589–599. doi:10.1016/j.jasms.2006.11.004.
- [57] A. Ahmed, C.H. Choi, M.C. Choi, S. Kim, Mechanisms behind the generation of protonated ions for polyaromatic hydrocarbons by atmospheric pressure photoionization, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1146–1151. doi:10.1021/ac202858k.
- [58] J.A. Syage, Mechanism of $[M + H]^+$ formation in photoionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1521–1533. doi:10.1016/j.jasms.2004.07.006.
- [59] S.-S. Cai, J. a Syage, K. a Hanold, M.P. Balogh, Ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for high-sensitivity and high-throughput analysis of U.S. Environmental Protection Agency 16 priority pollutants polynuclear aromatic hydrocarbons., *Anal. Chem.* 81 (2009) 2123–2128. doi:10.1021/ac802275e.
- [60] W. Schrader, S.K. Panda, K.J. Brockmann, T. Benter, Characterization of non-polar aromatic hydrocarbons in crude oil using atmospheric pressure laser ionization and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (APLI FT-ICR MS), *Analyst.* 133 (2008) 867. doi:10.1039/b801031e.
- [61] J. Zhang, X. Dong, J. Cheng, J. Li, Y. Wang, Efficient analysis of non-polar environmental contaminants by MALDI-TOF MS with graphene as matrix, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 1294–1298. doi:10.1007/s13361-011-0143-7.
- [62] W. Jennings, E. Mittlefehldt, P. Stremple, *Analytical gas chromatography*, Academic Press, 1997.
- [63] A. Christensen, C. Östman, R. Westerholm, Ultrasound-assisted extraction and on-line LC-GC-MS for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in urban dust and diesel particulate matter, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1206–1216. doi:10.1007/s00216-005-3065-z.
- [64] M.P. Zakaria, H. Takada, S. Tsutsumi, K. Ohno, J. Yamada, E. Kouno, et al., Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rivers and estuaries in Malaysia: A widespread input of petrogenic PAHs, *Environ. Sci.*

- Technol. 36 (2002) 1907–1918. doi:10.1021/es011278+.
- [65] L. Jiao, G.J. Zheng, T.B. Minh, B. Richardson, L. Chen, Y. Zhang, et al., Persistent toxic substances in remote lake and coastal sediments from Svalbard, Norwegian Arctic: Levels, sources and fluxes, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1342–1351. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.030.
- [66] P. HAAPEA, T. TUHKANEN, Integrated treatment of PAH contaminated soil by soil washing, ozonation and biological treatment, *J. Hazard. Mater.* 136 (2006) 244–250. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.12.033.
- [67] P. Henner, M. Schiavon, J.-L. Morel, E. Lichtfouse, Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods, *Analisis.* 25 (1997) M56--M59.
- [68] Harvey R.G., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Wiley-VCH, Inc, USA, 1997.
- [69] M.M. O'Mahony, A.D.W. Dobson, J.D. Barnes, I. Singleton, The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil, *Chemosphere.* 63 (2006) 307–314. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.07.018.
- [70] S. Wu, H. Yang, J. Hu, D. Shen, H. Zhang, R. Xiao, Pyrolysis of furan and its derivatives at 1100°C: PAH products and DFT study, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 120 (2016) 252–257. doi:10.1016/j.jaap.2016.05.013.
- [71] T. Bensabath, H. Monnier, P.A. Glaude, Detailed kinetic modeling of the formation of toxic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) coming from pyrolysis in low-pressure gas carburizing conditions, *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 122 (2016) 342–354. doi:10.1016/j.jaap.2016.09.007.
- [72] E.S. Boll, J.H. Christensen, P.E. Holm, Quantification and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment, soil, and water spinach from Hanoi, Vietnam., *J. Environ. Monit.* 10 (2008) 261–269. doi:10.1039/b712809f.
- [73] M. Elmquist, Z. Zencak, Ö. Gustafsson, A 700 year sediment record of black carbon and polycyclic aromatic hydrocarbons near the EMEP air monitoring station in Aspöreten, Sweden, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 6926–6932. doi:10.1021/es070546m.
- [74] Z. Wang, K. Li, P. Lambert, C. Yang, Identification, characterization and

- quantitation of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and other organic compounds in tire fire products, *J. Chromatogr. A.* 1139 (2007) 14–26. doi:10.1016/j.chroma.2006.10.085.
- [75] D. Saber, D. Mauro, T. Sirivedhin, Environmental Forensics Investigation in Sediments near a Former Manufactured Gas Plant Site, *Environ. Forensics.* 7 (2006) 65–75. doi:10.1080/15275920500506881.
- [76] J.S. Seo, Y.S. Keum, R.M. Harada, Q.X. Li, Isolation and characterization of bacteria capable of degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH-contaminated soil in Hilo, Hawaii, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5383–5389. doi:10.1021/jf0637630.
- [77] M.J. Suess, The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Sci. Total Environ.* 6 (1976) 239–250. doi:10.1016/0048-9697(76)90033-4.
- [78] K. Ravindra, R. Sokhi, R. Van Grieken, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 2895–2921. doi:10.1016/j.atmosenv.2007.12.010.
- [79] M. Akyüz, H. Çabuk, Gas-particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 5550–5558. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.07.063.
- [80] D. Golomb, Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons near New England coastal waters, *Atmos. Environ.* 35 (2001) 6245–6258. doi:10.1016/S1352-2310(01)00456-3.
- [81] J.H. Offenberg, J.E. Baker, Precipitation scavenging of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons along an urban to over-water transect, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3763–3771. doi:10.1021/es025608h.
- [82] K.Z. y J.H. Kiss G., Gelencsér A., Occurrence and determination of organic pollutants in aerosol, precipitation, and sediment collected at Lake Balaton, *J. Chromatogr. A.* 774 (1997) 349–361.
- [83] K. Ravindra, S. Mor, A. Ameena, J.S. Kamyotra, C.P. Kaushik, Variation in spatial pattern of criteria air pollutants before and during initial rain of

- monsoon, *Environ. Monit. Assess.* 87 (2003) 145–153. doi:10.1023/A:1024650215970.
- [84] S.O. Baek, M.E. Goldstone, P.W.W. Kirk, J.N. Lester, R. Perry, Phase distribution and particle size dependency of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere, *Chemosphere*. 22 (1991) 503–520. doi:10.1016/0045-6535(91)90062-I.
- [85] W. Esteve, H. Budzinski, E. Villenave, Relative rate constants for the heterogeneous reactions of NO₂ and OH radicals with polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on carbonaceous particles. Part 2: PAHs adsorbed on diesel particulate exhaust SRM 1650a, *Atmos. Environ.* 40 (2006) 201–211. doi:10.1016/j.atmosenv.2005.07.053.
- [86] E. Perraudin, H. Budzinski, E. Villenave, Kinetic study of the reactions of ozone with polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on atmospheric model particles, *J. Atmos. Chem.* 56 (2007) 57–82. doi:10.1007/s10874-006-9042-x.
- [87] C. WANG, S. WU, S. ZHOU, Y. SHI, J. SONG, Characteristics and Source Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Urban Soils: A Review, *Pedosphere*. 27 (2017) 17–26. doi:10.1016/S1002-0160(17)60293-5.
- [88] W. Wilcke, SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil — a Review, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163 (2000) 229–248. doi:10.1002/1522-2624(200006)163:3<229::aid-jpln229>3.0.co;2-6.
- [89] G. Maisto, F. De Nicola, P. Iovieno, M.V. Prati, A. Alfani, PAHs and trace elements in volcanic urban and natural soils, *Geoderma*. 136 (2006) 20–27. doi:10.1016/j.geoderma.2006.01.009.
- [90] F. HE, Z. ZHANG, Y. WAN, S. LU, L. WANG, Q. BU, Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of Beijing and Tianjin region: Vertical distribution, correlation with TOC and transport mechanism, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 675–685. doi:10.1016/S1001-0742(08)62323-2.
- [91] W. Wang, S.L. Massey Simonich, M. Xue, J. Zhao, N. Zhang, R. Wang, et al., Concentrations, sources and spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Beijing, Tianjin and surrounding areas, North

- China, Environ. Pollut. 158 (2010) 1245–1251. doi:10.1016/j.envpol.2010.01.021.
- [92] K.C. Jones, J.A. Stratford, K.S. Waterhouse, N.B. Vogt, Organic Contaminants in Welsh Soils: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Environ. Sci. Technol. 23 (1989) 540–550. doi:10.1021/es00063a005.
- [93] H.B. Zhang, Y.M. Luo, M.H. Wong, Q.G. Zhao, G.L. Zhang, Distributions and Concentrations of PAHs in Hong Kong Soils, Environ. Pollut. 141 (2006) 107–114. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.031.
- [94] C.Q. Yin, X. Jiang, X.L. Yang, Y.R. Bian, F. Wang, Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils in the vicinity of Nanjing, China, Chemosphere. 73 (2008) 389–394. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.05.041.
- [95] Y.F. Jiang, X.T. Wang, F. Wang, Y. Jia, M.H. Wu, G.Y. Sheng, et al., Levels, composition profiles and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban soil of Shanghai, China, Chemosphere. 75 (2009) 1112–1118. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.01.027.
- [96] T.D. Bucheli, F. Blum, A. Desaulles, Ö. Gustafsson, Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland, Chemosphere. 56 (2004) 1061–1076. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.06.002.
- [97] R.C. Brändli, T.D. Bucheli, S. Ammann, A. Desaulles, A. Keller, F. Blum, et al., Critical evaluation of PAH source apportionment tools using data from the Swiss soil monitoring network, J. Environ. Monit. 10 (2008) 1278–1286. doi:10.1039/b807319h.
- [98] J.J. Nam, G.O. Thomas, F.M. Jaward, E. Steinnes, O. Gustafsson, K.C. Jones, PAHs in background soils from Western Europe: Influence of atmospheric deposition and soil organic matter, Chemosphere. 70 (2008) 1596–1602. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.08.010.
- [99] S.E. Herbes, Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between dissolved and particulate phases in natural waters, Water Res. 11 (1977) 493–496. doi:10.1016/0043-1354(77)90035-5.
- [100] S.M. Bamforth, I. Singleton, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions, J. Chem. Technol.

- Biotechnol. 80 (2005) 723–736. doi:10.1002/jctb.1276.
- [101] M. Pazos, E. Rosales, T. Alcantara, J. Gomez, M.A. Sanromon, Decontamination of soils containing PAHs by electroremediation: A review, *J. Hazard. Mater.* 177 (2010) 1–11. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.055.
- [102] S.R. Wild, K.C. Jones, Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget, *Environ. Pollut.* 88 (1995) 91–108. doi:10.1016/0269-7491(95)91052-M.
- [103] C.E. Cerniglia, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation.* 3 (1992) 351–368. doi:10.1007/BF00129093.
- [104] S. Das, H.R. Dash, *1 Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas*, Elsevier Inc., 2014. doi:10.1016/B978-0-12-800021-2.00001-7.
- [105] P. Henner, M. Schiavon, J. Morel, E. Lichtfouse, P. Henner, M. Schiavon, et al., Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods To cite this version : HAL Id : hal-00193277, (2007).
- [106] S. Kumari, R. Kumar, N. Manickam, *Bioresource Technology Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria*, *Bioresour. Technol.* 254 (2018) 174–179. doi:10.1016/j.biortech.2018.01.075.
- [107] S.K. Samanta, O. V Singh, R.K. Jain, Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation, 20 (2002) 243–248.
- [108] W. Qin, Y. Zhu, F. Fan, Y. Wang, X. Liu, A. Ding, et al., Biodegradation of benzo (a) pyrene by *Microbacterium* sp . strain under denitrification : Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source, *Biochem. Eng. J.* 121 (2017) 131–138. doi:10.1016/j.bej.2017.02.001.
- [109] A.K. Haritash, C.P. Kaushik, Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, *J. Hazard. Mater.* 169 (2009) 1–15. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137.
- [110] P. Taylor, J.F. Shimp, J.C. Tracy, L.C. Davis, E. Lee, W. Huang, et al., *Critical Reviews in Environmental Science and Technology Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials Beneficial Effects of Plants in the Remediation of Soil and*

- Groundwater Contaminated with , (2009) 37–41. doi:10.1080/10643389309388441.
- [111] S.C. McCutcheon, J.L. Schnoor, *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*, Wiley-Interscience, 2003. [https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=5zE-swQcoPQC&oi=fnd&pg=PA3&dq=S.C.+McCutcheon,+J.L.+Schnoor+\(Eds.\),+P+hytoremediation:+Transformation+and+Control+of+Contaminants,+Wiley-Interscience,+Inc.,+Hoboken,+New+Jersey,+2003.&ots=DLduaK6b5M&sig=pg5qzwO6dmsB](https://books.google.rs/books?hl=en&lr=&id=5zE-swQcoPQC&oi=fnd&pg=PA3&dq=S.C.+McCutcheon,+J.L.+Schnoor+(Eds.),+P+hytoremediation:+Transformation+and+Control+of+Contaminants,+Wiley-Interscience,+Inc.,+Hoboken,+New+Jersey,+2003.&ots=DLduaK6b5M&sig=pg5qzwO6dmsB) (accessed November 1, 2018).
- [112] M. Usman, K. Hanna, S. Haderlein, Fenton oxidation to remediate PAHs in contaminated soils: A critical review of major limitations and counter-strategies, *Sci. Total Environ.* 569–570 (2016) 179–190. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.135.
- [113] F.J. Rivas, Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils : A short review of chemical oxidation based treatments, 138 (2006) 234–251. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.07.048.
- [114] R.J. Watts, P.C. Stanton, J. Howsawkeng, A.L. Teel, Mineralization of a sorbed polycyclic aromatic hydrocarbon in two soils using catalyzed hydrogen peroxide, *Water Res.* 36 (2002) 4283–4292. doi:10.1016/S0043-1354(02)00142-2.
- [115] D.L. Plata, C.M. Sharpless, C.M. Reddy, Photochemical degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil films, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2432–2438. doi:10.1021/es702384f.
- [116] J. Kochany, R.J. Maguire, Abiotic transformations of polynuclear aromatic hydrocarbons and polynuclear aromatic nitrogen heterocycles in aquatic environments, *Sci. Total Environ.* 144 (1994) 17–31. doi:10.1016/0048-9697(94)90424-3.
- [117] XiaoWu, Y. Shao, Study of Kinetics Mechanism of PAHs Photodegradation in Solution, *Procedia Earth Planet. Sci.* 17 (2017) 348–351. doi:10.1016/j.proeps.2016.12.088.
- [118] C. Walgraeve, K. Demeestere, J. Dewulf, R. Zimmermann, H. Van Langenhove, Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate

- matter: Molecular characterization and occurrence, *Atmos. Environ.* 44 (2010) 1831–1846. doi:10.1016/j.atmosenv.2009.12.004.
- [119] M.N. Chong, A.K. Sharma, S. Burn, C.P. Saint, Feasibility study on the application of advanced oxidation technologies for decentralised wastewater treatment, *J. Clean. Prod.* 35 (2012) 230–238. doi:10.1016/j.jclepro.2012.06.003.
- [120] C. Sociedad Química de México., P. Cañizares, F.J. Fernández, R. Natividad, M.A. Rodrigo, Electrochemical advanced oxidation processes: An overview of the current applications to actual industrial effluents, *J. Mex. Chem. Soc.* 58 (2014) 256–275. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2014000300003.
- [121] M. Cheng, G. Zeng, D. Huang, C. Lai, P. Xu, C. Zhang, et al., Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds : A review, *Chem. Eng. J.* 284 (2016) 582–598. doi:10.1016/j.cej.2015.09.001.
- [122] C. Comninellis, A. Kapalka, S. Malato, S.A. Parsons, I. Poulios, D. Mantzavinos, Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 769–776. doi:10.1002/jctb.1873.
- [123] A.J. Muff, Electrochemical Oxidation – A Versatile Technique for Aqueous Organic Contaminant Degradation. *Chemistry of Advanced Environmental Purification Processes of Water*, 2014. doi:10.1016/B978-0-444-53178-0.00003-1.
- [124] G. Chen, Electrochemical technologies in wastewater treatment, 38 (2004) 11–41. doi:10.1016/j.seppur.2003.10.006.
- [125] M.A. Oturan, P.V. Nidheesh, M. Zhou, Electrochemical advanced oxidation processes for the abatement of persistent organic pollutants, *Chemosphere.* 209 (2018) 17–19. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.049.
- [126] J. Muff, C.D. Andersen, R. Erichsen, E.G. Soegaard, *Electrochimica Acta* Electrochemical treatment of drainage water from toxic dump of pesticides and degradation products, 54 (2009) 2062–2068. doi:10.1016/j.electacta.2008.09.032.

- [127] C. Sandu, M. Popescu, E. Rosales, M. Pazos, G. Lazar, M.Á. Sanromán, Electrokinetic oxidant soil flushing: A solution for in situ remediation of hydrocarbons polluted soils, *J. Electroanal. Chem.* 799 (2017) 1–8. doi:10.1016/j.jelechem.2017.05.036.
- [128] R. López-vizcaíno, V. Navarro, M.J. León, C. Risco, M.A. Rodrigo, C. Sáez, et al., Scale-up on electrokinetic remediation: Engineering and technological parameters, *315 (2016) 135–143*. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.05.012.
- [129] C.A. Martí, S. Ferro, Electrochemical oxidation of organic pollutants for the wastewater treatment: direct and indirect processes { { (2006) 1324–1340. doi:10.1039/b517632h.
- [130] C. Comninellis, A. Nerini, Anodic oxidation of phenol in the presence of NaCl for wastewater treatment, *J. Appl. Electrochem.* 25 (1995) 23–28. doi:10.1007/BF00251260.
- [131] A. Kapałka, G. Fóti, C. Comninellis, Kinetic modelling of the electrochemical mineralization of organic pollutants for wastewater treatment, *J. Appl. Electrochem.* 38 (2008) 7–16. doi:10.1007/s10800-007-9365-6.
- [132] B. Marselli, J. Garcia-Gomez, P.-A. Michaud, M.A. Rodrigo, C. Comninellis, Electrogeneration of Hydroxyl Radicals on Boron-Doped Diamond Electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 150 (2003) D79. doi:10.1149/1.1553790.
- [133] Y. Feng, L. Yang, J. Liu, B.E. Logan, Electrochemical technologies for wastewater treatment and resource reclamation, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 2 (2016) 800–831. doi:10.1039/c5ew00289c.
- [134] Maria Francisca da Costa Moreira, *Electrochemical Advanced Oxidation Processes: Application to the Degradation of Synthetic and Real Wastewaters*, University of Porto, n.d.
- [135] O. Simond, V. Schaller, C. Comninellis, Theoretical model for the anodic oxidation of organics on metal oxide electrodes, *Electrochim. Acta.* 42 (1997) 2009–2012. doi:10.1016/S0013-4686(97)85475-8.
- [136] M. Panizza, A. Kapałka, C. Comninellis, Oxidation of organic pollutants on BDD anodes using modulated current electrolysis, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 2289–2295. doi:10.1016/j.electacta.2007.09.044.
- [137] M. Panizza, G. Cerisola, Direct And Mediated Anodic Oxidation of Organic

- Pollutants, (2009) 6541–6569.
- [138] A.T. Yeung, Y.Y. Gu, A review on techniques to enhance electrochemical remediation of contaminated soils, *J. Hazard. Mater.* 195 (2011) 11–29. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.047.
- [139] Y.-Y. Gu, A.T. Yeung, Use of Citric Acid Industrial Wastewater to Enhance Electrochemical Remediation of Cadmium-Contaminated Natural Clay, in: *GeoCongress 2012*, American Society of Civil Engineers, Reston, VA, 2012: pp. 3995–4004. doi:10.1061/9780784412121.410.
- [140] H. Niroumand, R. Nazir, K.A. Kassim, The performance of electrochemical remediation technologies in soil mechanics, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 5708–5715.
- [141] M.T. Alcántara, J. Gómez, M. Pazos, M.A. Sanromán, PAHs soil decontamination in two steps: Desorption and electrochemical treatment, *J. Hazard. Mater.* 166 (2009) 462–468. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.11.050.
- [142] M. Ciecierska, M.W. Obiedziński, Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bakery chain, *Food Chem.* 141 (2013) 1–9. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.006.
- [143] J. Lee, J.H. Jeong, S. Park, K.G. Lee, Monitoring and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in processed foods and their raw materials, *Food Control.* 92 (2018) 286–292. doi:10.1016/j.foodcont.2018.05.012.
- [144] J. Huzlik, F. Bozek, A. Pawelczyk, R. Licbinsky, M. Naplavova, M. Pondelicek, Identifying risk sources of air contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chemosphere.* 183 (2017) 139–146. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.04.131.
- [145] K.-H. Kim, S.A. Jahan, E. Kabir, R.J.C. Brown, A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects., *Environ. Int.* 60 (2013) 71–80. doi:10.1016/j.envint.2013.07.019.
- [146] D.L. Diggs, A.C. Huderson, K.L. Harris, J.N. Myers, L.D. Banks, P. V. Rekhadevi, et al., Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: A perspective, *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 29 (2011) 324–357. doi:10.1080/10590501.2011.629974.

- [147] A.C. Olsson, J. Fevotte, T. Fletcher, A. Cassidy, A. 'T Mannetje, D. Zaridze, et al., Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk: A multicenter study in Europe, *Occup. Environ. Med.* 67 (2010) 98–103. doi:10.1136/oem.2009.046680.
- [148] I. Abbas, G. Badran, A. Verdin, F. Ledoux, M. Roumié, *Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter : sources , analysis and toxicity*, Springer International Publishing, 2018. doi:10.1007/s10311-017-0697-0.
- [149] L.J. Casarett, C.D. Klaassen, *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons*, McGraw-Hill Medical, New York, 2008.
- [150] B. Moorthy, C. Chu, D.J. Carlin, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons : From Metabolism to Lung Cancer*, 145 (2015) 5–15. doi:10.1093/toxsci/kfv040.
- [151] G.P. Pfeifer, Preferential Formation of Benzo [a] pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53, 274 (1996) 7–9.
- [152] L. Zhang, Y. Jin, M. Huang, T.M. Penning, The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: Interconversion of PAH catechols and PAH o-quinones, *Front. Pharmacol.* 3 NOV (2012) 1–12. doi:10.3389/fphar.2012.00193.
- [153] G.P. Casale, M. Singhal, S. Bhattacharya, R. Ramanathan, K.P. Roberts, D.C. Barbacci, et al., Detection and Quantification of Depurinated Benzo [a] pyrene-Adducted DNA Bases in the Urine of Coal Smoke, (2001) 192–201.
- [154] V.J. Melendez-colon, A. Luch, A. Seidel, W.M. Baird, Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites, 20 (1999) 1885–1891.
- [155] B.W. Melendez-Colon VJ , Smith CA , Seidel A , Luch A , Platt KL, Formation of stable adducts and absence of depurinating DNA adducts in cells and DNA treated with the potent carcinogen dibenzo [a , l] pyrene or its diol epoxides, 94 (1997) 13542–13547. doi:10.1073/pnas.94.25.13542.
- [156] Y. Ikenaka, M. Oguri, A. Saengtienchai, S.M.M. Nakayama, S. Ijiri, M. Ishizuka, Characterization of phase-II conjugation reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish species: Unique pyrene metabolism and species

- specificity observed in fish species, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36 (2013) 567–578. doi:10.1016/j.etap.2013.05.018.
- [157] J.M. Jez, T.G. Flynn, T.M. Penning, J.M. Jez, M.J. Bennett, B.P. Schlegel, et al., Aldo-Keto-Reductases-and-Formation-of-Polycyclic-Aromatic-Hydrocarbon-o-Quinones_2004_Methods-in-Enzymology, 378 (2004).
- [158] C.A. Shultz, A.M. Quinn, J.H. Park, R.G. Harvey, J.L. Bolton, E. Maser, et al., Specificity of human aldo-keto reductases, NAD(P)H: Quinone oxidoreductase, and carbonyl reductases to redox-cycle polycyclic aromatic hydrocarbon diones and 4-hydroxyequilenin-o-quinone, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 2153–2166. doi:10.1021/tx200294c.
- [159] T.M. Penning, N.T. Palackal, S.-H. Lee, I. Blair, D. Yu, J.A. Berlin, et al., Aldo-Keto Reductases and the Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, (2009) 83–100. doi:10.1021/bk-2003-0865.ch006.
- [160] G. Berge, S. Mollerup, S. Øvrebø, A. Hewer, D.H. Phillips, E. Eilertsen, et al., Role of estrogen receptor in regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic activation in lung, *Lung Cancer.* 45 (2004) 289–297. doi:10.1016/j.lungcan.2004.02.014.
- [161] H.U. Käfferlein, B. Marczynski, T. Mensing, T. Brüning, Albumin and hemoglobin adducts of benzo[a]pyrene in humans-Analytical methods, exposure assessment, and recommendations for future directions, *Crit. Rev. Toxicol.* 40 (2010) 126–150. doi:10.3109/10408440903283633.
- [162] S.J. Kwack, B.M. Lee, Correlation between DNA or protein adducts and benzo[a]pyrene diol epoxide I-triglyceride adduct detected in vitro and in vivo, *Carcinogenesis.* 21 (2000) 629–632. doi:10.1093/carcin/21.4.629.
- [163] F. Gagné, Xenobiotic Biotransformation, in: *Biochem. Ecotoxicol.*, Elsevier, 2014: pp. 117–130. doi:10.1016/B978-0-12-411604-7.00007-6.
- [164] A.M. Salazar, P. Ostrosky-Wegman, Genotoxicity, in: *Biochem. Ecotoxicol. Princ. Methods*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2015: pp. 347–367. doi:10.1002/9781118876992.ch15.
- [165] J.E. Klaunig, Oxidative Stress and Cancer, *Curr. Pharm. Des.* 24 (2019) 4771–4778. doi:10.2174/1381612825666190215121712.
- [166] F. Gagné, Oxidative stress, in: *Biochem. Ecotoxicol.*, Elsevier, 2014: pp. 103–

115. doi:10.1016/B978-0-12-411604-7.00006-4.
- [167] E. Birben, U.M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *World Allergy Organ. J.* 5 (2012) 9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- [168] R.K. Gupta, A.K. Patel, N. Shah, A.K. Choudhary, U.K. Jha, U.C. Yadav, et al., Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 15 (2014) 4405–4409. doi:10.7314/apjcp.2014.15.11.4405.
- [169] W. Crocker, Catalase, *Bot. Gaz.* 51 (1911) 79–79. doi:10.1086/330448.
- [170] P. Chelikani, I. Fita, P.C. Loewen, Diversity of structures and properties among catalases, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2004) 192–208. doi:10.1007/s00018-003-3206-5.
- [171] J.A. Putnam, C.D.; Arvai, A.S.; Bourne, Y.; Tainer, Preliminary Full wwPDB X-ray Structure Validation Report, 0 (2015) 1–13. doi:10.2210/pdb1DGG/pdb.
- [172] M.K. Safo, F.N. Musayev, S.H. Wu, D.J. Abraham, T.P. Ko, Structure of tetragonal crystals of human erythrocyte catalase, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 57 (2001) 1–7. doi:10.1107/S0907444900013767.
- [173] H. Zhong, H. Yin, Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria, *Redox Biol.* 4 (2015) 193–199. doi:10.1016/j.redox.2014.12.011.
- [174] M.M. Gaschler, B.R. Stockwell, Lipid peroxidation in cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482 (2017) 419–425. doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
- [175] L.J. Niedernhofer, J.S. Daniels, C.A. Rouzer, R.E. Greene, L.J. Marnett, Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 31426–31433. doi:10.1074/jbc.M212549200.
- [176] L.J. Marnett, Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage, *Toxicology.* 181–182 (2002) 219–222. doi:10.1016/S0300-483X(02)00448-1.
- [177] J. Surralls, N. Xamena, A. Creus, R. Marcos, The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair, 342 (1995) 43–59. doi:10.1016/0165-1218(95)90089-6.
- [178] M.F.-M.R. and Molecular, undefined 1993, The cytokinesis-block

- micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, Elsevier. (n.d.). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002751079390049L> (accessed November 23, 2018).
- [179] J. Surrallés, N. Xamena, A. Creus, J. Catalán, H. Norppa, R. Marcos, Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutat. Res. Toxicol.* 341 (1995) 169–184. doi:10.1016/0165-1218(95)90007-1.
- [180] W.A. Lopes, P. Afonso, D.P. Pereira, H. Viertler, and 3-Nitrofluoranthene and their Correlation with Direct-Acting Mutagenicities, *Potentials*. 16 (2005) 1099–1103.
- [181] S. En, Карактеризација отпада — Израчунавање остатка или садржаја воде, 2012.
- [182] C.E.N.T.C. Bt, Soils , sludges and treated bio-waste — Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) — Method by gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC), 2007.
- [183] D.M. Bliesner, *VALIDATING CHROMATOGRAPHIC METHODS: A Practical Guide*, 2006.
- [184] S. Packwood, Resolution- Definition and Nomenclature, *J. High Resolut. Chromatogr.* 12 (1989).
- [185] ICH, ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, *Int. Conf. Harmon.* 1994 (2005) 17.
- [186] Ea, EA-4 / 16 G : 2003 EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing, 2003.
- [187] Citac, Eurachem, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2nd (2000) 126. doi:0 948926 15 5.
- [188] O.I. Aruoma, B. Halliwell, M.J. Laughton, G.J. Quinlant, J.M.C. Gutteridge, The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex, 258 (1989) 617–620.
- [189] O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.

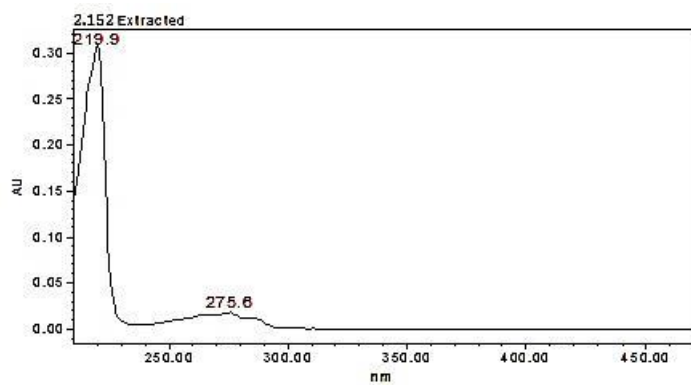
- [190] D.A. Roubicek, M.E. Gutiérrez-Castillo, M. Sordo, M.E. Cebrián-García, P. Ostrosky-Wegman, Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 631 (2007) 9–15. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.04.001.
- [191] J.C. Sasaki, J. Arey, D.A. Eastmond, K.K. Parks, A.J. Grosovsky, Genotoxicity induced in human lymphoblasts by atmospheric reaction products of naphthalene and phenanthrene, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 393 (1997) 23–35. doi:10.1016/S1383-5718(97)00083-1.
- [192] Ö. Çakal Arslan, M. Boyacıoğlu, H. Parlak, S. Katalay, M.A. Karaaslan, Assessment of micronuclei induction in peripheral blood and gill cells of some fish species from Aliğa Bay Turkey, *Mar. Pollut. Bull.* 94 (2015) 48–54. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.03.018.
- [193] R. Scarpato, L. Migliore, G. Alfinito-Cognetti, R. Barale, Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters, *Mar. Pollut. Bull.* 21 (1990) 74–80. doi:10.1016/0025-326X(90)90191-A.
- [194] I.C. Palacio, S.B.M. Barros, D.A. Roubicek, Water-soluble and organic extracts of airborne particulate matter induce micronuclei in human lung epithelial A549 cells, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 812 (2016) 1–11. doi:10.1016/j.mrgentox.2016.11.003.
- [195] R.J. Sram, V. Svecova, A. Rossnerova, Systematic review of the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay to measure DNA damage induced by exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 770 (2016) 162–169. doi:10.1016/j.mrrev.2016.07.009.
- [196] Z. Liyan, E.E. Connor, N. Chegini, K.T. Shiverick, Modulation by benzo[a]pyrene of epidermal growth factor receptors, cell proliferation, and secretion of human chorionic gonadotropin in human placental cell lines, *Biochem. Pharmacol.* 50 (1995) 1171–1180. doi:10.1016/0006-2952(95)00253-V.
- [197] E. Drwal, A. Rak, E.L. Gregoraszczyk, Differential effects of ambient PAH mixtures on cellular and steroidogenic properties of placental JEG-3 and BeWo cells, *Reprod. Toxicol.* 86 (2019) 14–22.

doi:10.1016/j.reprotox.2019.03.003.

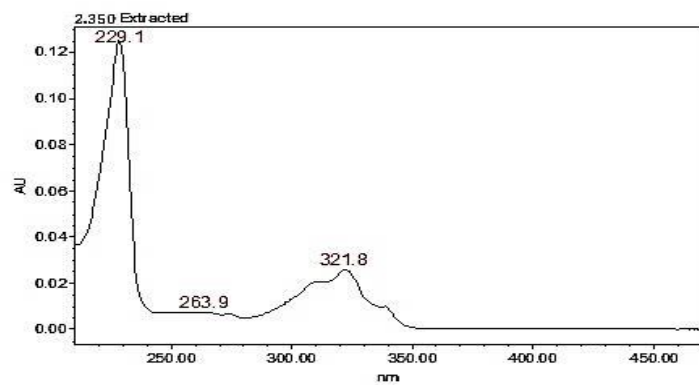
- [198] C.R. Saunders, S.K. Das, A. Ramesh, D.C. Shockley, S. Mukherjee, Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress, *J. Appl. Toxicol.* 26 (2006) 427–438. doi:10.1002/jat.1157.
- [199] Y. Xia, S. Cheng, J. He, X. Liu, Y. Tang, H. Yuan, et al., Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague-Dawley rat, *Neurotoxicology.* 32 (2011) 188–198. doi:10.1016/j.neuro.2010.12.015.
- [200] Z. Wang, H. Yang, A. Ramesh, L.J. Roberts, L.C. Zhou, X. Lin, et al., Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase accelerates benzo(a)pyrene detoxification by upregulation of the aryl hydrocarbon receptor in mouse endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 1221–1229. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.001.
- [201] A. Gavrilović, L. Ilijin, M. Mrdaković, M. Vlahović, A. Mrkonja, D. Matić, et al., Effects of benzo[a]pyrene dietary intake to antioxidative enzymes of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae from unpolluted and polluted forests, *Chemosphere.* 179 (2017) 10–19. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.083.

6 PRILOZI

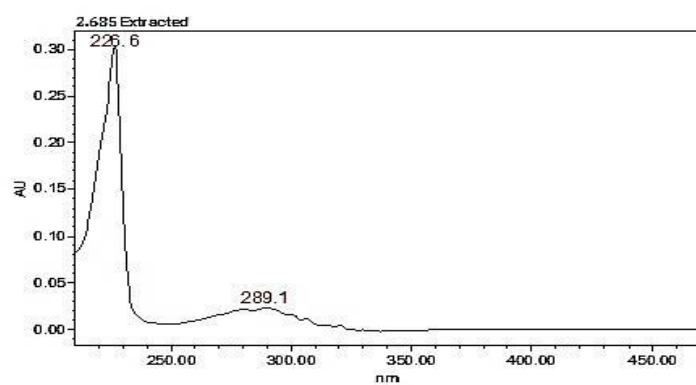
Prilog 1



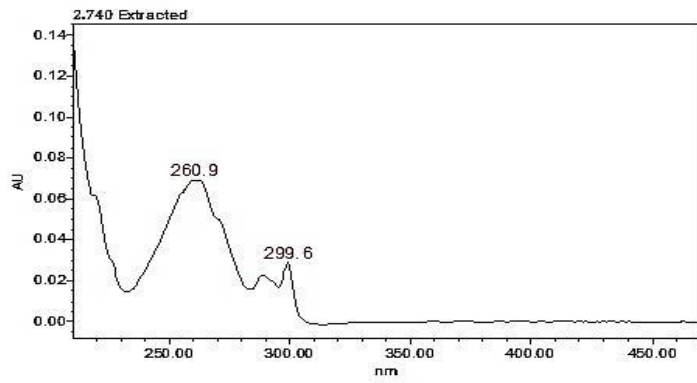
Slika 6.1 UV-VIS spektar acenaftilena



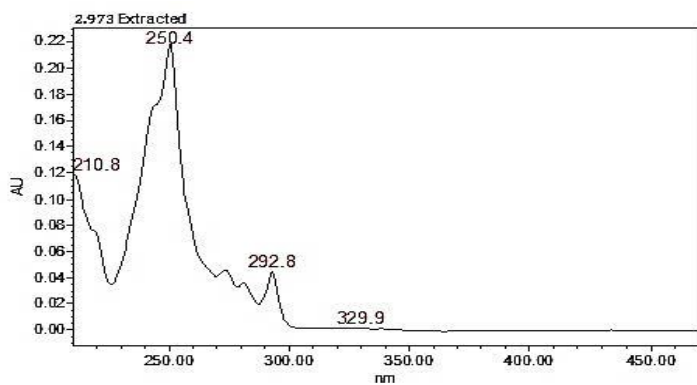
Slika 6.2 UV-VIS spektar acenaftilena



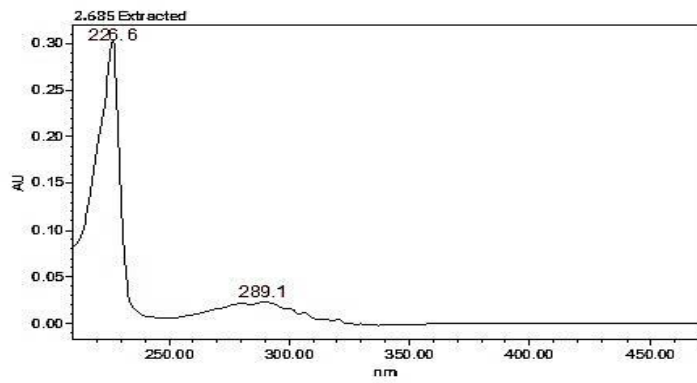
Slika 6.3 UV-VIS spektar acenaftilena



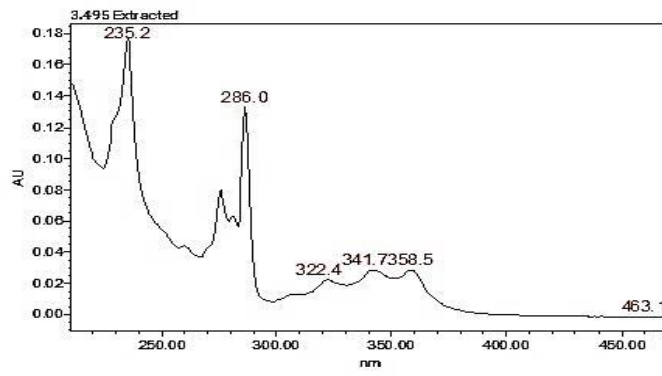
Slika 6.4 UV-VIS spektar fluorena



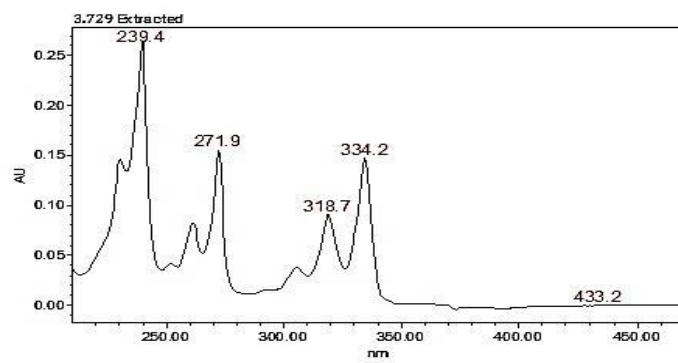
Slika 6.5 UV-VIS spektar fenantrena



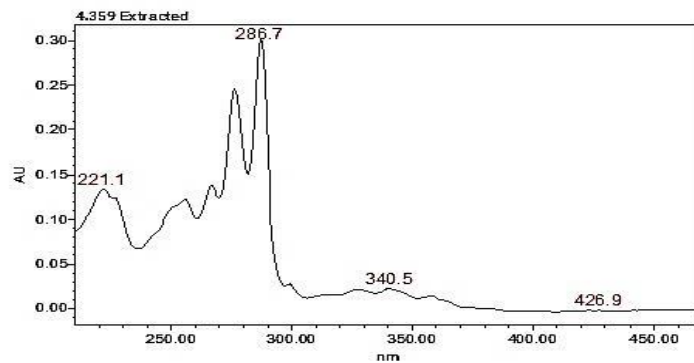
Slika 6.6 UV-VIS antracena



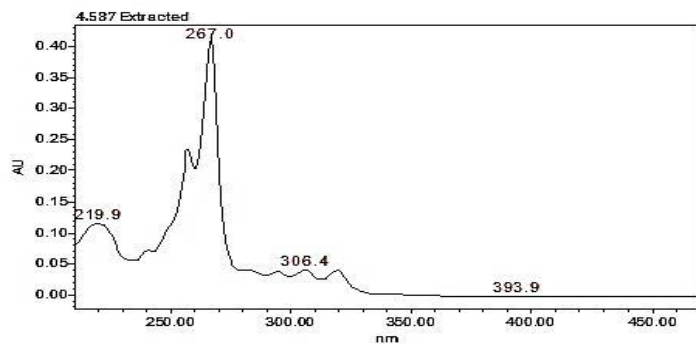
Slika 6.7 UV-VIS fluorantena



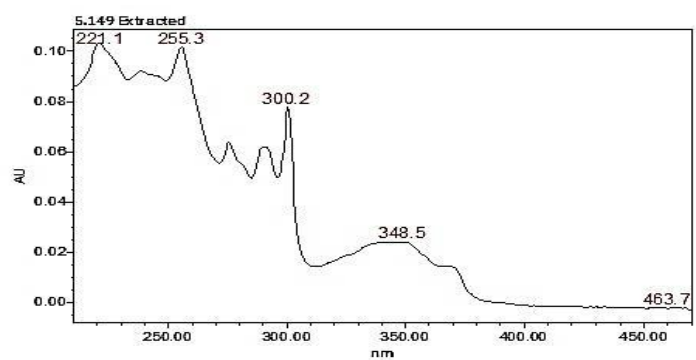
Slika 6.8 UV-VIS spektar pirena



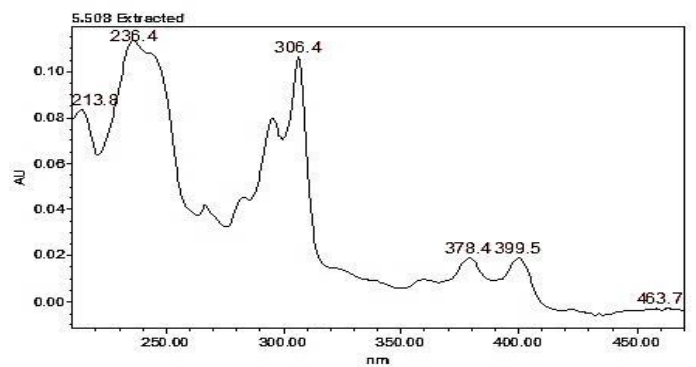
Slika 6.9 UV-VIS spektar benzo(a)antracena



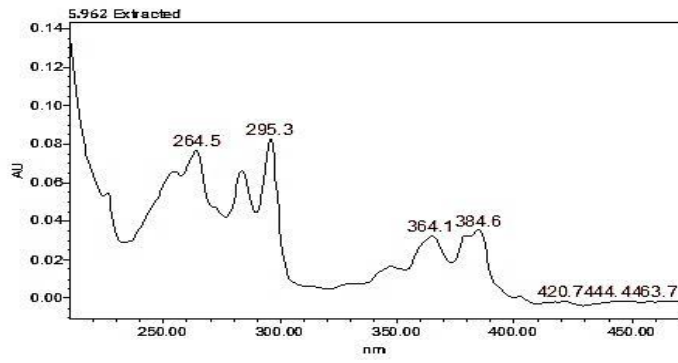
Slika 6.10 UV-VIS spektar krizena



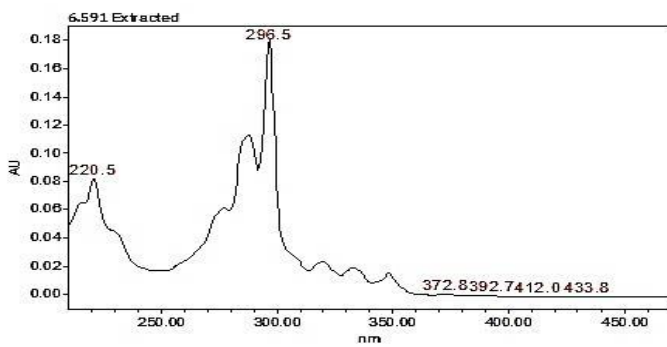
Slika 6.11 UV-VIS spektar benzo(b)fluorantena



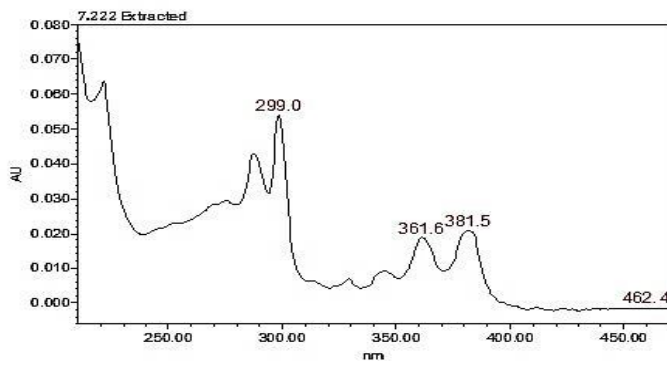
Slika 6.12 UV-VIS spektar benzo(k)fluorantena



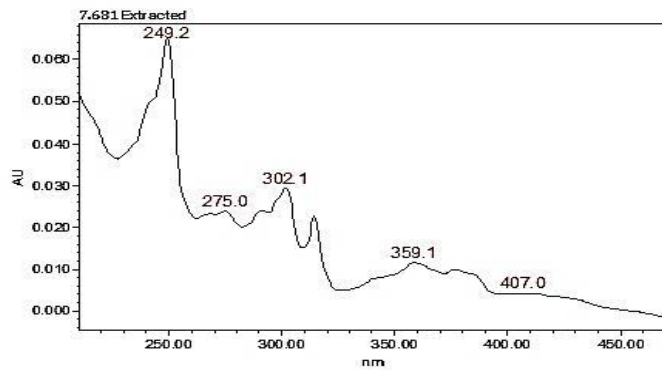
Slika 6.13 UV-VIS spektar benzo(a)piren



Slika 6.14 UV-VIS spektar dibenzo(a,h)antracen



Slika 6.15 UV-VIS spektar benzo(g,h,i)perilen



Slika 6.16 UV-VIS spektar indeno(1,2,3-cd)piren

BIOGRAFIJA

Danka D. Aćimović je rođena 05.11.1985. u Bihaću (Bosna i Hercegovina). U Zrenjaninu je završila osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera. Osnovne akademske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/05, studijski program Biohemija. Diplomirala je 2010. godine na Katedri za biohemiju, čime je stekla zvanje diplomirani biohemičar. Doktorske akademske studije je upisala školske 2010/2011. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Od avgusta 2010. godine do danas zaposlena je kao istraživač saradnik u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“. Istraživački rad je usmeren na kvalitativnu i kvantitativno ispitivanje prvenstveno policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH-ova) i drugih zagađujućih jedinjenja u životnoj sredini, mogućnost njihovog uklanjanja iz nje, kao i njihov uticaj na žive organizme.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Данка Аћимовић _____

Број индекса _____ 4048/10 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Електрохемијска оксидација полицикличних ароматичних угљоводоника из бетона и процена токсичности продуката њихове деградације

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Данка Аћимовић _____

Број индекса _____ 4048/10 _____

Студијски програм _____ Биохемијско инжењерство и биотехнологија _____

Наслов рада _____ Електрохемијска оксидација полицикличних ароматичних угљоводоника из бетона и процена токсичности продуката њихове деградације

Ментори _____ проф. др Сузана Димитријевић-Бранковић и др Тања Брдарић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Електрохемијска оксидација полицикличних ароматичних угљоводоника из бетона и процена токсичности продуката њихове деградације

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____
