

UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Știința și Ingineria Mediului

**CONTRIBUȚII PRIVIND INFLUENȚA COLORANȚILOR
TEXTILI ASUPRA UNOR FACTORI DE MEDIU**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Dumitru RISTOIU

Doctorand:

Florina-Maria ONIȚĂ (COPACIU)

CLUJ-NAPOCA

2012



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI



UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI” DIN CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Știința și Ingineria Mediului



CONTRIBUȚII PRIVIND INFLUENȚA COLORANȚILOR TEXTILI ASUPRA UNOR FACTORI DE MEDIU

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Dumitru RISTOIU

Doctorand:

Florina-Maria ONIȚĂ (COPACIU)

CLUJ-NAPOCA

-2012-



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”.

Proiectul „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”, POSDRU/88/1.5/S/59410, ID 59410, este un proiect strategic care are ca obiectiv general „Dezvoltarea capitalului uman pentru cercetare prin programe doctorale pentru îmbunătățirea participării, creșterii atractivității și motivației pentru cercetare. Dezvoltarea la nivel european a tinerilor cercetători care să adopte o abordare interdisciplinară în domeniul cercetării, dezvoltării și inovării”.

Proiect finanțat în perioada 2009 - 2012.

Finanțare proiect: 18.943.804,97 RON

Beneficiar: Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Partener: Universitatea „Babeș Bolyai” din Cluj-Napoca

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Mihaela-Luminița LUPU

Responsabil proiect partener: Prof. univ. dr. ing. Alexandru OZUNU



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI
PROTECȚIEI SOCIALE
AMFOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MI
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI"
DIN IAȘI

Mulțumiri

Adresez respectuoase mulțumiri domnului Prof. Dr. Dumitru Ristoiu, conducătorul științific al tezei de doctorat, pentru competența și permanenta îndrumare științifică pe parcursul acesteia.

Mulțumiri doamnei CS I Dr. Virginia Coman pentru contribuția adusă la formarea mea profesională, pentru sprijinul moral și profesionalismul cu care m-a ghidat pe drumul către obținerea titlului de doctor.

Mulțumiri domnului CS II Dr. Lucian Copolovici și domnului Prof. Dr. Ülo Niinemets pentru sprijinul acordat pe parcursul stagiului desfășurat la Universitatea Estonă de Științele Vieții, Departamentul de Fiziologia Plantelor, Tartu, Estonia.

Mulțumiri tuturor membrilor comisiei pentru acceptul lor de a participa la susținerea publică a acestei teze și pentru efortul depus la citirea și evaluarea manuscrisului.

Sincere mulțumiri tuturor persoanelor cu care am colaborat pe perioada desfășurării studiilor doctorale și care mi-au împărtășit cu drag din vasta lor experiență: doamna Dr. Mihaela Vlassa, doamna Dr. Dorina Simedru, doamna Dr. Miuța Filip, doamna Dr. Loredana Soran, doamna Dr. Carmen Roba, domnul Dr. Simion Beldean-Galea.

Sincere mulțumiri colegilor care mi-au fost alături în această perioadă și care m-au susținut și încurajat necondiționat.

Alese gânduri de prețuire familiei și prietenilor pentru sprijinul moral, înțelegerea și răbdarea, acordate în acești ani de studiu.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc soțului meu pentru răbdarea, susținerea și înțelegerea oferite pe întreaga perioadă a doctoratului.

Mulțumesc echipei manageriale care a condus la existența Proiectului „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”, POSDRU/88/1.5/S/59410, ID 59410 al cărui beneficiar am fost și eu în perioada elaborării prezentei teze de doctorat.

CUPRINS

INTRODUCERE

PARTEA I

CONSIDERAȚII TEORETICE

Capitolul 1. Coloranții textili și importanța studiului	5
1.1. Generalități despre coloranți	5
1.1.1. Definiția coloranților	5
1.1.2. Clasificarea coloranților	6
1.1.3. Coloranții azoici	7
1.1.4. Coloranții antrachinonici	8
1.2. Coloranții textili	9
1.3. Coloranții textili și mediul înconjurător.....	10
Capitolul 2. Tehnici de analiză utilizate în studiul coloranților textili din probe de apă reziduală.....	13
2.1. Tehnici utilizate la pregătirea probelor de apă pentru analiză	14
2.1.1. Prelevarea probelor de apă	15
2.1.2. Conservarea probelor de apă prelevate	15
2.1.3. Izolarea și concentrarea compușilor de interes din probele de apă prelevate	16
2.2. Parametrii fizico-chimici de calitate ai efluenților textili	22
2.3. Tehnici cromatografice utilizate în analiza coloranților textili din probe de apă reziduală	23
2.3.1. Cromatografia. Generalități	23
2.3.2. Clasificarea tehnicilor cromatografice	24
2.3.3. Cromatografia de lichide	27
2.3.3.1. Cromatografia pe strat subțire	29
2.3.3.2. Cromatografia de lichide de înaltă performanță	33
Capitolul 3. Ecotoxicologia coloranților textili	45
3.1. Efecte toxice ale coloranților textili asupra plantelor	47

PARTEA a II-a

CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul 4. Prezentarea și caracterizarea fizico-chimică a coloranților textili studiați.....	49
4.1. Studiul UV-Vis al coloranților textili	51
Capitolul 5. Determinarea parametrilor fizico-chimici de calitate ai unor efluenți textili	57
5.1. Parte experimentală. Determinarea parametrilor fizico-chimici de calitate ai unor efluenți textili	58
5.2. Rezultate și discuții privind determinarea parametrilor fizico-chimici de calitate ai unor efluenți textili	59
5.3. Concluzii privind determinarea parametrilor fizico-chimici de calitate ai unor efluenți textili	67

Capitolul 6. Analiza coloranților textili prin cromatografia de lichide	69
6.1. Analiza unor coloranți din efluenți textili prin tehnica cromatografiei pe strat subțire de înaltă performanță (HPTLC)	70
6.1.1. Parte experimentală. Monitorizarea coloranților textili prin tehnica HPTLC	70
6.1.2. Rezultate și discuții privind determinarea coloranților textili prin tehnica HPTLC.....	81
6.1.3. Concluzii privind determinarea coloranților textili prin tehnica HPTLC	88
6.2. Analiza coloranților textili Optilan Blue și Nylosan Red din ape reziduale prin tehnica cromatografiei de lichide cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS/MS)	89
6.2.1. Parte experimentală. Determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS...	89
6.2.2. Rezultate și discuții privind determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS	94
6.2.3. Concluzii privind determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS.....	104
6.3. Analiza coloranților textili complecși ai cromului Nylosan Dark Brown, Lanasyn Dark Brown și Lanasyn Red din ape reziduale prin tehnica LC-MS/MS	105
6.3.1. Parte experimentală. Determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS	105
6.3.2. Rezultate și discuții privind determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS	106
6.3.3. Concluzii privind determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS.....	121
Capitolul 7. Studii ecotoxicologice privind acțiunea coloranților textili asupra plantelor de <i>Triticum aestivum</i> L.	123
7.1. <i>Triticum aestivum</i> L. și stresul aplicat	123
7.2. Analiza parametrilor fotosintetici din plantele de grâu tratate cu coloranții textili luați în studiu	125
7.2.1. Măsurarea parametrilor fotosintetici	125
7.2.2. Rezultate și discuții privind efectele coloranților textili asupra parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu	126
7.2.3. Concluzii privind efectele coloranților textili asupra parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu	128
7.3. Analiza unor metaboliți secundari volatili (LOX-uri și monoterpene) emiși de plantele de grâu tratate cu coloranții textili luați în studiu	129
7.3.1. Prelevarea și analiza unor LOX-uri și a unor monoterpene	129
7.3.2. Rezultate și discuții privind efectele coloranților textili asupra emisiei de LOX-uri și monoterpene de către plantele de grâu	131
7.3.3. Concluzii privind efectele coloranților textili asupra emisiei de LOX-uri și monoterpene de către plantele de grâu	135
7.4. Analiza unor pigmenți asimilatori (clorofile și carotenoizi) din plantele de grâu tratate cu coloranții textili luați în studiu	135
7.4.1. Extracția și analiza pigmentilor clorofilieni și carotenoizi din plantele de grâu	136

7.4.2. Rezultate și discuții privind efectele coloranților textili asupra conținutului de pigmenți clorofilieni și carotenoizi din plantele de grâu	138
7.4.3. Concluzii privind efectele coloranților textili asupra conținutului de pigmenți clorofilieni și carotenoizi din plantele de grâu	143
7.5. Analiza unor metaboliți secundari nevolați (conținutul total de flavonoide) din plantele de grâu tratate cu coloranții textili luați în studiu	143
7.5.1. Extracția și analiza conținutului total de flavonoide din plantele de grâu	143
7.5.2. Rezultate și discuții privind efectele coloranților textili asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu	144
7.5.3. Concluzii privind efectele coloranților textili asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu.....	147
CONCLUZII	149
BIBLIOGRAFIE	153
Anexa I. LISTA ABREVIERILOR	167
Anexa II. LISTA PUBLICAȚIILOR ȘTIINȚIFICE COTATE ISI, ELABORATE PÂNĂ ÎN PREZENT ȘI INCLUSE TEMATICII TEZEI DE DOCTORAT	169

CUVINTE CHEIE:

Coloranți textili
 Coloranți azoici
 Coloranți antrachinonici
 Extracția pe fază solidă
 Cromatografia pe strat subțire de înaltă performanță
 Cromatografia de lichide cuplată cu spectrometrul de masă
 Stres abiotic
 Parametrii fotosintetici
 Pigmenții asimilatori
 Compuși organici volatili
Triticum aestivum L.

INTRODUCERE

Industria textilă reprezintă unul dintre cele mai comune și importante sectoare din lume, fiind cea mai mare consumatoare de apă. Acumularea de reziduuri în apă, în cantități care depășesc puterea naturală de transformare și integrare în factorii de mediu, conduce la apariția de dezechilibre ale vieții naturale care pot duce la dispariția de specii de animale și de plante, periclitând în final însăși viața noastră.

Obiectivul major al tezei de doctorat constă în elaborarea unor metode moderne și performante de izolare, identificare și cuantificare a șase coloranți textili, dintre care doi antrachinonici (Optilan Blue și Lanasyn Blue) și patru azoici (Lanasyn Red, Nylosan Red, Nylosan Dark Brown și Lanasyn Dark Brown) și aplicarea acestor metode la determinarea coloranților din probe de apă reziduală, aducând astfel contribuții la evaluarea impactului asupra calității mediului, precum și a efectelor ecotoxicologice ale acestora asupra unor plante.

Scopul cercetărilor întreprinse în teza de doctorat vizează următoarele aspecte:

- Determinarea indicatorilor fizico-chimici de calitate ai apelor uzate provenite din industria de prelucrare a fibrelor textile.
- Dezvoltarea unor metode de izolare a coloranților textili studiați din probe de apă reziduală, utilizând tehnica extracției pe fază solidă (SPE).
- Realizarea unei metode bazate pe tehnica cromatografiei de lichide de înaltă performanță pe strat subțire (HPTLC) pentru identificarea și cuantificarea coloranților textili investigați în vederea monitorizării unor efluenți colectați de la o fabrică de prelucrare a fibrelor textile care sunt deversați în rețeaua de canalizare.
- Realizarea unei metode bazate pe tehnica cromatografiei de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (LC-ESI/MS-MS) pentru identificarea și cuantificarea coloranților textili, aplicată la monitorizarea unor influenți și efluenți ai unei stații de tratare a apelor reziduale unde ajung apele din rețeaua de canalizare cu un conținut potențial de coloranți textili.
- Studiul efectelor ecotoxicologice ale coloranților textili investigați, asupra diferitelor performanțe din plante în scopul identificării și evaluării rapide a toxicității acestor coloranți textili, asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.). Au fost evaluate efectele coloranților textili privind fotosinteza frunzei, pigmentii asimilatori, metaboliți secundari volatili (emisii de produși de oxigenare sub acțiunea lipoxigenazei și emisii de monoterpene) și metaboliți secundari nevolatili (flavonoidele) asupra plantelor de grâu.

Studii privind coloranții textili investigați în prezenta teză prin tehnicile menționate anterior, cât și influența acestora asupra unor factori de mediu, nu au fost publicate până în prezent în literatura de specialitate.

Prima parte a tezei de doctorat cuprinde un studiu bibliografic privind coloranții textili, tehnicile de analiză utilizate pentru izolarea, identificarea și cuantificarea acestora din probe de apă reziduală, precum și aspecte privind ecotoxicologia coloranților textili.

În cea de a doua parte a tezei sunt prezentate contribuțiile originale aduse în vederea monitorizării coloranților textili din ape reziduale: investigații UV-Vis, determinarea parametrilor fizico-chimici de calitate ai efluenților textili, izolarea coloranților din probe de apă reziduală prin tehnica SPE, identificarea și cuantificarea acestora din diferite probe de apă reziduală prin tehnicile HPTLC și LC-ESI/MS-MS. De asemenea, au fost întreprinse studii ecotoxicologice privind acțiunea coloranților textili asupra plantelor de *Triticum aestivum* L., precum și influențe ale acestora asupra parametrilor fotosintetici și a unor metaboliți secundari menționați anterior.

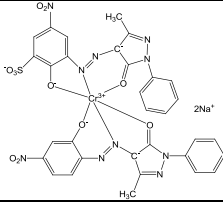
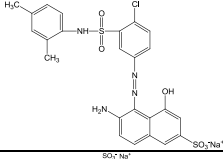
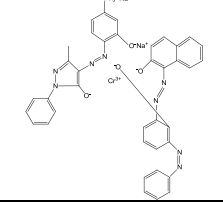
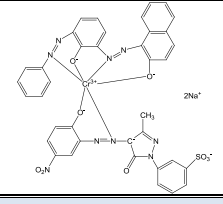
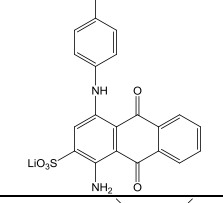
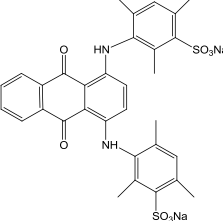
Rezultatele prezentate în lucrarea de față au fost publicate, comunicate sau sunt în curs de publicare. Lista lucrărilor elaborate și incluse tematicii tezei de doctorat este anexată la sfârșitul prezentei lucrări.

4. Prezentarea și caracterizarea fizico-chimică a coloranților textili studiați

Coloranții textili monitorizați în acest studiu fac parte din două clase importante de coloranți, și anume clasa coloranților azoici, respectiv antrachinonici. Urmărind literatura de specialitate (*Lee și Pavlostathis, 2004; Epolito et al., 2005*), au fost considerate importante pentru studiu, aceste două clase de coloranți datorită utilizării lor frecvente în vopsirea fibrelor textile.

În Tabelul 4.1 sunt prezentate cele două clase de coloranți textili studiați. Coloranții textili studiați au fost procurați de la Clariant Produkte (Switzerland) AG.

Tabel 4.1. Date privind coloranți textili studiați.

Denumire Comercială/ Număr CAS / Abreviere	Formula chimică/ Masa moleculară (g mol ⁻¹)	Structura chimică
Coloranți azoici		
Lanasyn Red M-GA CAS 70209-87-9 LR	$C_{32}H_{21}CrN_{10}O_{11}S \cdot 2Na$ 851,61	
Nylosan Red N-2RLB CAS 71873-39-7 NR	$C_{24}H_{21}ClN_4O_6S_2 \cdot Na$ 584,02	
Nylosan Dark Brown S-MBL CAS 52587-68-5 NDB	$C_{38}H_{25}CrN_8O_7S \cdot 2Na$ 835,69	
Lanasyn Dark Brown M-GLN CAS 70236-62-3 LDB	$C_{38}H_{24}CrN_9O_9S \cdot 2Na$ 880,69	
Coloranți antrachinonici		
Optilan Blue MF-GL CAS 125328-86-1 OB	$C_{24}H_{21}N_2O_5SLi$ 456,44	
Lanasyn Blue F-L 150 CAS 4474-24-2 LB	$C_{32}H_{28}N_2O_8S_2 \cdot 2Na$ 678,68	

4.1. Studiul UV-Vis al coloranților textili

Premergător analizei cantitative a coloranților textili prin tehnica HPTLC, au fost efectuate măsurători UV-Vis asupra acestora în vederea stabilirii maximului de absorbție. În general, coloranții se evidențiază în spectrul din domeniul vizibil 400-900 nm. Pentru a stabili domeniul în care se află lungimea de undă optimă pentru detecția coloranților textili prin tehnica HPTLC, au fost înregistrate spectrele UV-Vis ale unor soluții metanolice preparate din coloranții menționați. În Tabel 4.4 sunt prezentate pozițiile maximelor de absorbție în domeniul vizibil și absorbanta coloranților textili studiați.

Tabel 4.4. Pozițiile maximelor de absorbție în domeniul vizibil și absorbanta coloranților textili studiați pentru concentrația indicată.

Colorant	Poziția maximului de absorbție (nm)	Absorbanta	Concentrația (mg mL ⁻¹)
Lanasyn Red	502	1,061	0,08
Nylosan Red	511	1,030	0,06
Nylosan Dark Brown	475	1,016	0,08
	567	0,691	
	612	0,575	
Lanasyn Dark Brown	470	1,282	0,06
	615	0,557	
Optilan Blue	588	0,942	0,019
	627	1,040	
Lanasyn Blue	581	0,944	0,048
	626	1,059	

Înregistrarea spectrelor UV-Vis a coloranților textili investigați prin tehnica HPTLC, a condus la obținerea unor maxime de absorbție în domeniul 470-627 nm.

6. Analiza coloranților textili prin cromatografia de lichide

Deoarece procesul de vopsire ocupă un loc important în cadrul tehnologiilor de finisare textilă, iar apele uzate generate în urma proceselor tinctoriale textile sunt foarte complexe, conținând pe lângă coloranții utilizați și auxiliari de vopsire, acestea devin în final foarte toxice pentru mediu (*Eremektar et al., 2007*).

Cele mai utilizate tehnicile analitice pentru monitorizarea acestor coloranți în efluenții textili, respectiv în mediu sunt spectrofotometria (*Şahin et al., 2007*), cromatografia de lichide pe strat subțire (*Umbuzeiro et al., 2005*) și cromatografia de lichide de înaltă performanță (*Prevot et al., 2008; Rafaëly et al., 2008*).

În urma analizei critice privind literatura de specialitate, acești coloranți nu au mai fost studiați prin aceste tehnici până în prezent.

6.1. Analiza unor coloranți din efluenți textili prin tehnica cromatografiei pe strat subțire de înaltă performanță (HPTLC)

6.1.1. Parte experimentală. Monitorizarea coloranților textili prin tehnica HPTLC

Chimicale și reactivi

Coloranții studiați prin procedura SPE-HPTLC dezvoltată în acest studiu sunt Lanasyn Blue (colorant antrachinonic), Nylosan Dark Brown, Nylosan Red, Lanasyn Dark Brown și Lanasyn Red (coloranți azoici). Pentru prepararea probelor de analizat a fost utilizat metanol ($\geq 99,9$; HPLC, Merck), pentru condiționarea cartușelor de extracție pe fază solidă și eluția coloranților reținuți, etanol și amoniac 25% (Chimopar), iar pentru faza mobilă, *n*-butanol și acetat de etil (Merck). S-a folosit apă purificată cu sistemul Milli-Q Ultrapure (Millipore). Pentru studiul SPE au fost testate patru tipuri de cartușe Phenomenex de 500 mg/6 mL (WAX/NH₂, SAX, C18-U și C18-E).

Prepararea soluțiilor stoc și a soluțiilor standard de lucru

Pentru analiza cantitativă a coloranților textili de interes din probe de apă reziduală, a fost preparată o soluție stoc de 0,2 mg mL⁻¹ prin dizolvarea a 1 mg din fiecare colorant în 5 mL metanol care a fost păstrată la întuneric la 4°C, pentru o perioadă de o săptămână. În vederea trasării curbelor de calibrare, au fost preparate din soluția stoc prin diluții succesive cu metanol soluții de următoarele concentrații 20, 30, 40, 50 și 60 μg mL⁻¹.

Colectarea probelor de apă reziduală

Probele de apă reziduală au fost prelevate de la efluentul unei fabrici de prelucrare a fibrelor textile din România. Probele de apă au fost colectate în sticle de polietilenă, filtrate, stocate la 4°C și analizate în timp de o săptămână. Efluenții textili au fost monitorizați pe o perioadă de 6 luni.

Metoda SPE

Extracția pe fază solidă a coloranților textili din probele de apă reziduală a fost realizată cu ajutorul unui dispozitiv SPE, model Supelco (Sigma Aldrich). Pentru izolarea optimă a coloranților textili din probele de apă reziduală au fost testate patru tipuri de cartușe Strata (WAX/NH₂, SAX, C18-U și C18-E) (Copaciu et al., 2012a).

Extracția pe fază solidă a constat în patru etape importante (Poole et al., 2000; Yoshioka și Ichihashi, 2008):

1. **Condiționarea adsorbentului:** îndepărtarea impurităților, activarea cu solventul potrivit (5 mL apă Milli-Q, 20 mL acid acetic 1%) a grupărilor funcționale din patul de adsorbent pentru îmbunătățirea retenției analiților.
2. **Echilibrarea adsorbentului** prin trecerea pe cartuș a 20 mL apă Milli-Q, etapă necesară pentru pregătirea adsorbentului în scopul unei interacțiuni optime cu analitul.
3. **Încărcarea probei** de apă reziduală (2 mL min⁻¹) și retenția coloranților textili pe adsorbent.
4. **Desorbția coloranților textili** de pe adsorbent (6 mL 1% amoniac-etanol, 1:1, v/v).

Extractele obținute au fost aduse la sec (40°C), reluate în 2 mL metanol și supuse analizei HPTLC în vederea determinării coloranților textili.

Metoda HPTLC

Metoda constă în utilizarea unei faze staționare de silica gel Alugram RP-18W/UV₂₅₄ (20 × 20 cm; 0,15 mm, Macherey-Nagel) și eluția coloranților cu faza mobilă *n*-butanol–acetat de etil–5% hidroxid de amoniu, 4:4:1 (v/v) prin tehnica ascendentă pe o distanță de 5,5 cm, într-o cameră saturată în prealabil la temperatura camerei. Atât soluțiile standard cât și probele de apă reziduală au fost aplicate pe placă (1 μL per bandă de 1 mm) cu ajutorul aplicatorului Desaga AS 30 Applicator. Cromatoplăcile au fost scanate la 550 nm cu ajutorul unui densitometru Desaga CD-60 (Copaciu et al., 2012a).

Validarea procedurii SPE-HPTLC

În vederea determinării coloranților textili din probe de apă reziduală colectate de la fabrici de prelucrare a fibrelor textile, procedura SPE-HPTLC a fost validată prin parametrii de performanță: selectivitate (Gumustas și Ozkan, 2011), liniaritate (Mohammad și Zawilla, 2009), limita de detecție și limita de cuantificare (Nayak et al., 2009), acuratețe (Nayak et al. 2009) și precizie (Mehta și Morge, 2008; Gumustas și Ozkan, 2011).

6.1.2. Rezultate și discuții privind determinarea coloranților textili prin tehnica HPTLC

Rezultate SPE

Eficacitatea adsorbentilor testați a fost estimată prin compararea nivelelor de recuperare a coloranților textili eluați de pe fiecare adsorbent. Fiecare extracție a fost repetată de patru ori, fiind calculată abaterea standard relativă (RSD, %) pentru fiecare colorant. Gradele de recuperare sunt date în Tabelul 6.2.

Tabel 6.2. Gradele de recuperare ale coloranților textili studiați pentru cele patru cartușe SPE testate.

Cartuș	Gradul de recuperare ^a ± RSD ^b (%)				
	LB	LDB	LR	NDB	NR
Strata NH ₂	108,3 ± 5,0	108,7 ± 3,6	84,8 ± 3,8	109,2 ± 3,2	108,2 ± 2,6
Strata SAX	nd ^c	74,2 ± 2,3	28,5 ± 2,4	61,3 ± 11,8	59,4 ± 5,7
Strata C18-U	nd	22,7 ± 7,5	nd	nd	43,8 ± 0,73
Strata C18-E	nd	20,5 ± 8,0	nd	nd	50,0 ± 3,3

^aMedia gradelor de recuperare pentru cele patru repetări; ^bDeviația standard relativă; ^cNedetecat.

După cum se poate observa în Tabelul 6.2, cartușele Strata NH₂ au asigurat un bun grad de recuperare (peste 100%) pentru toți coloranții textili studiați, cu excepția colorantului azoic LR care a avut un grad de recuperare de 84,8%. În cazul cartușului Strata SAX, gradele de recuperare pentru coloranții azoici LDB, NDB și NR au fost peste 59%, cu excepția colorantului azoic LR pentru care gradul de recuperare a fost doar de 28,5%. Colorantul antrachinonic LB nu a fost detectat datorită interacțiunii puternice dintre acesta și adsorbent, nemaiputând fi eluat alături de ceilalți coloranți textili. Pentru cartușele Strata C18-U și Strata C18-E gradele de recuperare au avut valori foarte scăzute în cazul coloranților LDB și NR, iar coloranții LB, LR și NDB nu au fost detectați, aceștia nefiind reținuți de adsorbent.

Rezultatele bune obținute pe cartușele Strata NH₂, se datorează mecanismului de retenție polar a anioniilor prin legături de hidrogen sau schimb anionic slab. Acest adsorbent este potrivit pentru extracția anionilor puternici/slabi din probe apoase. Adsorbentul cartușelor Strata SAX este o rășină puternică

schimbătoare de anioni, astfel obținându-se rezultate scăzute ale gradelor de recuperare pentru coloranții azoici textili, datorită interacțiunii puternice între coloranții textili și adsorbent. Coloranții textili antrachinonici sunt reținuți puternic de rășina schimbătoare de anioni a cartușelor Strata SAX și nu pot fi eluați cu amestecul de solvenți utilizat. În cazul cartușelor Strata C18-E au loc mecanisme de retenție non-polare cu suprafața grupărilor silanol legate hidrofobic pentru o mai puternică retenție hidrofobică, minimalizând selectivitatea sau eliminând interacțiunile polare ale silanolului. Pe Strata C18-U are loc un mecanism de retenție primar nepolar combinat cu interacțiuni secundare ale silanolului polar, astfel fiind îmbunătățită eficiența extracției și mărită capacitatea de îndepărtare a compușilor hidrofobici care conțin grupări hidroxil sau amino (www.phenomenex.com). Coloranții LB, LR și NDB datorită polarității lor nu sunt reținuți pe cartușe de tip C18-E și C18-U. Cele mai bune rezultate au fost obținute pe cartușul Strata NH₂ care a fost selectat pentru determinarea prin metoda HPTLC dezvoltată a coloranților textili de interes din diferite matrici de apă reziduală (Copaciu et al., 2012a).

Rezultatele validării

Studiul validării procedurii SPE-HPTLC a demonstrat performanța acesteia la determinarea prezenței în probe de efluenți textili a celor cinci coloranți studiați prin: liniaritate cu coeficienți de corelație >0,99 pe întreg domeniul de concentrație 20-60 ng per bandă din fiecare colorant; limite de detecție cuprinse între 0,97-6,04 ng per bandă și limite de cuantificare cuprinse între 3,24-20,15 ng per bandă; valori ale abaterii standard relative pentru repetabilitatea aplicării probelor cuprinse între 0,6-3,5%, iar pentru repetabilitatea măsurării ariei picului cuprinse între 0,7-2,6%. Rezultatele gradelor de recuperare pentru toții coloranții textili studiați în probe de apă reziduală cu adaos standard demonstrează o bună acuratețe a procedurii SPE-HPTLC dezvoltate (Copaciu et al., 2012a).

Analiza coloranților textili studiați din probe de apă reziduală

Determinarea acestor coloranți textili din probe de apă reziduală este importantă pentru monitorizarea nivelelor de poluare a apelor cu efluenți textili. Procedura SPE-HPTLC dezvoltată a fost aplicată pentru monitorizarea celor cinci coloranți din efluenți textili pe o perioadă de șase luni. Probele de apă au fost colectate lunar de la efluentul unei fabrici de prelucrare a fibrelor textile. Placa cromatografică din Figura 6.8, ilustrează câteva probe de apă reziduală (pozițiile 11-15). În acord cu rezultatele prezentate în Tabelul 6.8, pe perioada acestei monitorizări au fost folosiți mai intens coloranții azoici, cel mai utilizat fiind Nylosan Red și ocazional Lanasyn Blue și Lanasyn Red.

În Figura 6.8 este prezentă placa HPTLC pentru coloranții studiați de la stânga la dreapta: (pozițiile 1-5) standardul individual pentru fiecare colorant textil, (pozițiile 6 și 16) reprezintă cate un amestec din cei 5 coloranți textili, (pozițiile 7-10) reprezintă extracțiile obținute pe cele patru tipuri de cartușe în vederea alegerii cartușului cu cel mai bun grad de recuperare, (pozițiile 11-15) reprezintă câteva exemple de probe de apă reziduală. Tot în această figură sunt ilustrate 2 cromatograme suprapuse, cromatograma corespunzătoare poziției 15 (proba de apă reziduală) și cromatograma corespunzătoare poziției 16 (amestecul standard al celor cinci coloranți textili).

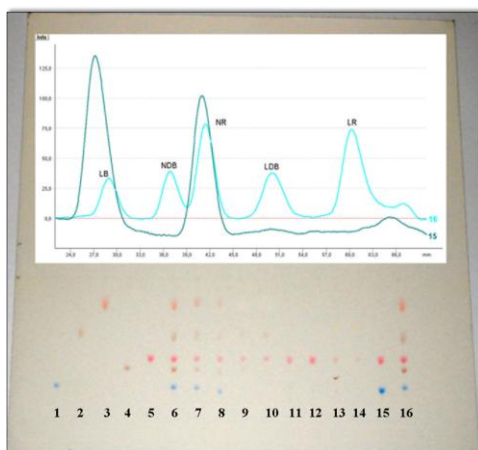


Figura 6.8. Placa HPTLC și densitogramele suprapuse (550 nm) pentru coloranții textili studiați. Pozițiile 1-5 standarde individuale din fiecare colorant textil (60 ng per bandă): 1-LB, 2-LDB, 3-LR, 4-NDB, 5-NR; Pozițiile 6 și 16 amestec standard cu cei cinci coloranți textili (60 ng din fiecare colorant textil per bandă); Pozițiile 7-10: Gradele de recuperare pe SPE ale coloranților textili, pentru cartușele Strata: NH₂ (7); SAX (8); C18-U (9); C18-E (10); și pozițiile 11-15: reprezintă probe de apă reziduală ale unor efluenți textili.

Table 6.8. Cantitățile de coloranți textili găsite pe parcursul monitorizării efluenților textili.

Nr. benzii pe placă	Data prelevării	Cantitatea găsită (mg L ⁻¹)				
		Lanasyn Blue	Lanasyn Dark Brown	Lanasyn Red	Nylosan Dark Brown	Nylosan Red
11	04.02.2011	nd	nd	nd	nd	3,7
12	18.02.2011	nd	nd	nd	nd	5,7
13	10.03.2011	nd	nd	nd	nd	1,2
14	15.04.2011	nd	nd	nd	nd	1,0
15	13.05.2011	20,4	nd	nd	nd	7,4
–	17.06.2011	nd	nd	nd	nd	12,0
–	11.07.2011	nd	nd	0,7	nd	7,6
–	25.07.2011	nd	nd	8,1	nd	1,3

Concentrațiile găsite în timpul acestei monitorizări 0,7-20,4 mg L⁻¹ arată că efluenții textili rezultați în urma proceselor de prelucrare a fibrelor textile nu sunt suficient tratați înainte de deversarea lor în rețeaua de canalizare, respectiv mediu. Dintre cele două clase de coloranți textili investigați, coloranții azoici sunt mai intens utilizați la prelucrarea fibrelor textile (Copaciu et al., 2012a).

6.2. Analiza coloranților textili Optilan Blue și Nylosan Red din ape reziduale prin tehnica cromatografiei de lichide cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS/MS)

6.2.1. Parte experimentală. Determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS

Chimicale și materiale

Coloranții textili Nylosan Red, colorant azoic, și Optilan Blue, colorant antrachinonic, procurați de la Clariant Produkte, au fost studiați prin tehnica LC-MS. Pentru prepararea tuturor probelor de analizat și eluția cromatografică a fost utilizat metanol LC-MS Optigrade ($\geq 99,8\%$, LGC Standards).

Colectarea probelor de apă reziduală

Probele de apă reziduală au fost prelevate de la influentul și respectiv efluentul unei stații de tratare a apelor reziduale din România, aceștia fiind monitorizați pe o perioadă de 6 luni. Probele au fost colectate în sticle de polietilenă, filtrate, stocate la 4°C și analizate în timp de o săptămână.

Metoda LC/ESI(-)-MS/MS

Determinarea coloranților textili a fost realizată cu ajutorul unui cromatograf de lichide (HPLC Agilent Serie 1200) cuplat cu un spectrometru de masă (3200 QTrap Applied Biosystems), utilizând o sursă de ionizare TurboV în modul negativ prin electropulverizare (LC/ESI(-)-MS/MS). Monitorizarea reacțiilor multiple (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) a fost urmată de cuantificarea ionilor moleculari precursori și a ionilor produși corespunzători. Sistemul a fost controlat cu softul Analyst 5.1. Cea mai bună separare a acestor coloranți a fost obținută pe o coloană Nucleosil 100 C18 (25 cm \times 0,46 cm, 10 μ m, Teknokroma), termostată la 25°C, prin eluție izocratică cu amestecul metanol-apă 70:30 (v/v), la un debit de 0,65 mL min⁻¹.

Metoda SPE

Pentru extracția celor doi compuși, Nylosan Red și Optilan Blue, a fost folosit un dispozitiv de extracție pe fază solidă Supelco (Sigma Aldrich). Pentru alegerea adsorbentului optim de extracție au fost testate patru tipuri de cartușe Strata (WAX/NH₂, SAX, C18-U și C18-E). Pentru a cuantifica selectivitatea adsorbentilor, în 500 mL apă deionizată a fost adăugată o cantitate de 160 ng din fiecare colorant textil investigat.

Validarea procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS

În scopul validării procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS pentru cei doi coloranți textili studiați au fost evaluați pentru fiecare colorant următorii parametri: liniaritatea, limita de detecție și limita de cuantificare, precizia, acuratețea și efectul de matrice.

6.2.2. Rezultate și discuții privind determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS

Analiza LC/ESI(-)-MS/MS

În scopul cuantificării prezenței coloranților textili, OB și NR, în probe de apă reziduală, a fost elaborată o metodă LC/ESI(-)-MS/MS. Pentru selectarea tipului de ionizare, coloranții au fost supuși atât unei ionizări negative cât și unei ionizări pozitive, fiind aleasă ionizarea prin electropulverizare în modul

negativ. Pentru stabilirea condițiilor MRM, au fost preparate soluții individuale (100 ng mL^{-1}) din fiecare colorant în metanol. Ionul precursor a fost obținut prin scanarea coloranților în quadrupol 1, urmată apoi de scanarea în quadrupol 3 pentru obținerea ionilor produși.

Obținerea parametrilor optimi dependenți de fiecare colorant a fost realizată utilizând metoda infuziei, ca urmare din fiecare colorant au fost preparate soluții standard care au fost injectate direct în spectrometrul MS prin infuzie continuă cu un debit de $5 \mu\text{L min}^{-1}$. Separarea coloranților Nylosan Red, respectiv Optilan Blue, cu o rezoluție de 1,83, a fost obținută printr-o eluție izocratică cu metanol-apă 70:30 (v/v) la un debit de $0,65 \text{ mL min}^{-1}$ utilizând o coloană Nucleosil 100 C18 termostată la 25°C . Parametrii dependenți de sursă au fost obținuți prin Flow Injection Analysis (FIA) utilizând o capilară de restricție și un debit de $200 \mu\text{L min}^{-1}$ pentru introducerea soluțiilor standard (100 ng mL^{-1}) din fiecare colorant preparat în faza mobilă. Cromatograma corespunzătoare metodei LC/ESI(-)-MS/MS pentru amestecul standard utilizat în metoda MRM este prezentată în Figura 6.12.

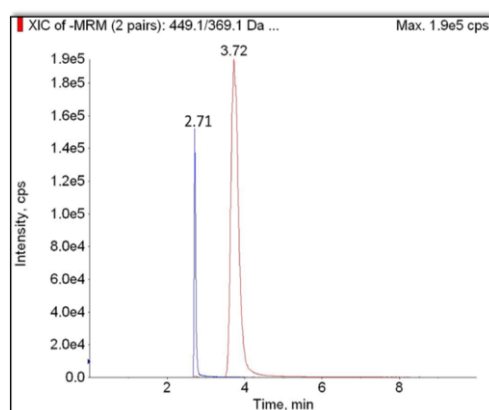


Figura 6.12. Cromatograma LC/ESI(-)-MS/MS a amestecului standard (100 ng mL^{-1}):

Nylosan Red, $t_R = 2,71 \text{ min}$; Optilan Blue, $t_R = 3,72 \text{ min}$.

Metoda SPE

Studiul SPE utilizând cartușe Strata cu fază inversă (Strata C18-E și Strata C18-U) și Strata cu schimb ionic (Strata WAX/ NH_2 și Strata SAX) arată că acești compuși pot fi reținuți prin mecanisme diferite (fază inversă, respectiv schimb anionic). Eficiența cartușelor testate a fost estimată prin compararea gradelor de recuperare ale coloranților eluați pe fiecare tip de cartuș. Fiecare extracție a fost repetată de patru ori și a fost calculat *RSD* (%) pentru fiecare cartuș testat. Gradele de recuperare sunt date în Tabelul 6.10 (Copaciu et al., 2012b).

Tabel 6.10. Gradele de recuperare ale coloranților textili studiați pe cele patru tipuri de cartușe testate.

Cartuș	Cantitatea adăugată din fiecare colorant (ng)	Nylosan Red			Optilan Blue		
		Media ^a cantității regăsite (ng)	Gradul de recuperare Media ^b ± SD ^c (%)	RSD ^d (%)	Media cantității regăsite (ng)	Gradul de recuperare Media ± SD (%)	RSD (%)
Strata NH_2	160	166,9	$104,3 \pm 6,0$	5,7	175,2	$109,5 \pm 3,3$	3,0
Strata SAX	160	92,8	$58,0 \pm 6,9$	11,8	128,8	$80,5 \pm 5,4$	6,7
Strata C18-U	160	152,7	$95,4 \pm 9,4$	9,9	139,7	$87,3 \pm 9,8$	11,2
Strata C18-E	160	135,6	$84,7 \pm 6,0$	7,0	162,6	$101,6 \pm 8,8$	8,7

^aMedia cantității regăsite pentru patru extracții; ^bMedia gradului de recuperare pentru patru extracții; ^cDeviația standard; ^dDeviația standard relativă.

După cum se poate observa în Tabelul 6.10, cartușele SPE testate au asigurat o bună recuperare (peste 84%) pentru ambii coloranți textili, cu excepția cartușului Strata SAX. Cele mai bune rezultate au fost obținute pe cartușele Strata NH₂ datorită mecanismului polar de retenție a analiților prin legături de hidrogen sau schimb anionic slab. Pentru extracțiile pe cartușe Strata SAX, gradele de recuperare obținute au fost foarte scăzute, acest fapt fiind o consecință a interacțiunilor puternice dintre coloranții textili și adsorbentul Strata SAX care este o rășină puternic schimbătoare de anioni. Pentru adsorbentii Strata C18 au fost obținute valori bune ale gradelor de recuperare datorită interacțiunilor non-polare dintre grupările funcționale ale coloranților și adsorbentii. În cazul cartușelor Strata C18-E are loc un mecanism de retenție non-polar cu suprafața hidrofobică end-capping, ceea ce minimalizează selectivitatea sau elimină interacțiunile polare ale grupărilor silanol. În cartușele Strata C18-U au loc mecanisme de retenție non-polar primare alături de interacțiuni polare, silanol secundare, crescând astfel eficiența extracției și creșterea capacității de îndepărtare a compușilor hidrofobici care conțin grupări hidroxil sau amino (www.phenomenex.com).

Validarea procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS

Studiul de validare a arătat că procedura SPE-LC/ESI(-)-MS/MS elaborată pentru determinarea celor doi coloranți textili, Nylosan Red și Optilan Blue, din probe de apă reziduală indică o bună liniaritate, cu coeficienți de corelație peste 0,99, în domeniul de concentrații 1-100 ng mL⁻¹ și limite de detecție până la 0,28 ng mL⁻¹. Pentru precizia procedurii, au fost calculate valorile *RSD* (%) în aceeași zi (Nylosan Red 0,8-2,6%; Optilan Blue 0,7-2,4%) și în zile diferite (Nylosan Red 1,0-1,4%; Optilan Blue 1,0-2,1%). Rezultatele obținute au demonstrat pentru procedura SPE-LC/ESI(-)-MS/MS elaborată o bună repetabilitate atât în aceeași zi cât și în zile diferite. Studiul de acuratețe a indicat grade de recuperare cu valori în intervalul 92,5-97,7%.

Efectul de matrice a fost evaluat pentru fiecare colorant textil în probă de apă reziduală. Acesta a fost studiat prin raportul între panta curbei de calibrare în solvent și respectiv în matrice, obținându-se valori între -20% și +20% (*Sur și Dunemann, 2004; Kmellár et al., 2008*), ceea ce demonstrează că nu există efect de matrice (*Copaciu et al., 2012b*).

Analiza coloranților studiați din probe de apă reziduală

Determinarea coloranților textili în probe de apă reziduală prezintă o mare importanță pentru monitorizarea apelor poluate de această industrie. Procedura SPE-LC/ESI(-)-MS/MS realizată a fost aplicată la determinarea din probe de apă reziduală a doi coloranți, Nylosan Red și Optilan Blue, des utilizați la colorarea fibrelor textile. Au fost colectate și analizate douăsprezece probe de apă reziduală de la o stație de tratare unde ajung ape cu potențial conținut de coloranți proveniți din industria de prelucrare a fibrelor textile (Tabel 6.15).

Cromatogramele corespunzătoare analizei LC/ESI(-)-MS/MS pentru probele monitorizate în data de 05.02.2011 sunt prezentate în Figura 6.14. Concentrația de 1,84 ng L⁻¹ regăsită în efluentul stației de tratare arată sensibilitatea metodei elaborate. Rezultatele obținute indică prezența sporadică în urme a celor doi coloranți textili în probele de apă reziduală ceea ce poate fi asociat cu utilizarea lor ocazională în finisarea textilă și cu o bună capacitate de epurare a stației (*Copaciu et al., 2012b*).

Tabel 6.15. Coloranții textili determinați în probe colectate de la influentul respectiv efluentul unei stații de tratare a apelor reziduale.

Data recoltării	Proba de apă reziduală	Cantitatea (ng L ⁻¹)	
		Nylosan Red	Optilan Blue
05.02.2011	Influent	81,2	nd
	Efluent	1,8	nd
11.03.2011	Influent	264,8	nd
	Efluent	nd ^a	nd
16.04.2011	Influent	nd	nd
	Efluent	nd	nd
14.05.2011	Influent	24,3	84,0
	Efluent	nd	nd
18.06.2011	Influent	36,8	116,0
	Efluent	nd	2,7
12.07.2011	Influent	nd	nd
	Efluent	nd	nd
26.07.2011	Influent	nd	nd
	Efluent	nd	nd

^aNedetecat

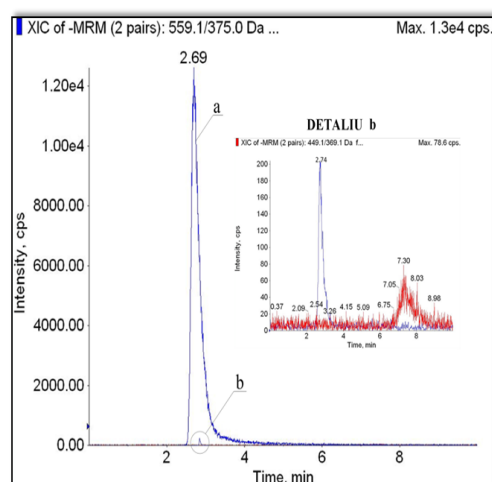


Figura 6.14. Cromatogramele LC/ESI(-)-MS/MS corespunzătoare unei probe de apă din influent (a), respectiv efluent (b), prelevată de la o stație de tratare a apelor reziduale. Colorantul găsit este Nylosan Red: (a) 81,2 ng L⁻¹ și (b) 1,8 ng L⁻¹.

6.3. Analiza coloranților textili complecși ai cromului Nylosan Dark Brown, Lanasyn Dark Brown și Lanasyn Red din ape reziduale prin tehnica LC-MS/MS

6.3.1. Parte experimentală. Determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS

Chimicale și materiale

Coloranții textili azoici complecși ai cromului studiați (Tabelul 4.1) prin metoda LC-MS/MS elaborată sunt: Nylosan Dark Brown, Lanasyn Dark Brown și Lanasyn Red. Acești coloranți au fost procurați de la Clariant Produkte. Pentru prepararea probelor și eluția cromatografică s-a utilizat metanol LC-MS Optigrade (≥98%, LGC Standards), acetonitril LC-MS Merck, format de amoniu (97%) și acid formic (≥95%) de la Sigma-Aldrich.

Metoda LC/ESI(-)-MS/MS

Determinarea coloranților textili a fost realizată utilizând același cromatograf de lichide (HPLC Agilent Serie 1200) cuplat cu un spectrometru de masă (3200 QTrap Applied Biosystems), având sursa de ionizare TurboV în modul negativ prin electropulverizare (LC/ESI(-)-MS/MS). Separarea coloranților textili a fost realizată pe o coloană Phenomenex Luna 3u C18 (2) 100A (50 × 2 mm), termostată la 40°C, prin eluție izocratică cu amestecul metanol–acetonitril–apă (2 mM formiat de amoniu și 0,2% acid formic) 47:23:30 (v/v) la un debit de 0,15 mL min⁻¹.

Metoda SPE

Pentru alegerea adsorbentului optim de extracție a celor trei coloranți au fost testate aceleași cartușe Strata (C18-U, C18-E, WAX/NH₂ și SAX) prezentate anterior. Pentru a cuantifica selectivitatea adsorbentilor, în 500 mL apă deionizată a fost adăugată o cantitate de 120 ng LR, 200 ng NDB și 200 ng LDB, urmând etapele SPE prezentate la subcapitolul 6.1. Extractele obținute cu conținut de coloranți textili au fost aduse la sec și reluate în fază mobilă.

Validarea procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS

În scopul validării procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS pentru cei trei coloranți textili au fost evaluați următorii parametri: liniaritatea, limita de detecție și limita de cuantificare, precizia, acuratețea și efectul de matrice.

6.3.2. Rezultate și discuții privind determinarea coloranților textili prin tehnica LC-MS/MS

Analiza LC/ESI(-)-MS/MS

Pentru selectarea tipului de ionizare, coloranții au fost supuși atât unei ionizări negative cât și unei ionizări pozitive, fiind aleasă ionizarea prin electropulverizare în modul negativ. Pentru stabilirea condițiilor MRM, au fost preparate soluții din fiecare colorant în acetonitril (400 ng mL⁻¹). Ionul precursor a fost obținut prin scanarea coloranților în quadropol 1, urmată apoi de scanarea în quadropol 3 pentru obținerea ionilor produși. Obținerea parametrilor optimi dependenți de fiecare colorant a fost realizată utilizând metoda infuziei, astfel că din fiecare colorant au fost preparate soluții standard și injectate direct în spectrometrul MS prin infuzie continuă cu un debit de 5 μL min⁻¹. Parametrii dependenți de sursă au fost obținuți prin FIA utilizând o capilară de restricție și un debit de 200 μL min⁻¹. Soluțiile standard cu un conținut de 400 ng mL⁻¹, din fiecare colorant preparat în faza mobilă au fost injectate în sistemul LC/ESI(-)-MS/MS.

Cromatograma corespunzătoare metodei LC/ESI(-)-MS/MS pentru amestecul standard utilizat în metoda MRM, este prezentată în Figura 6.18.

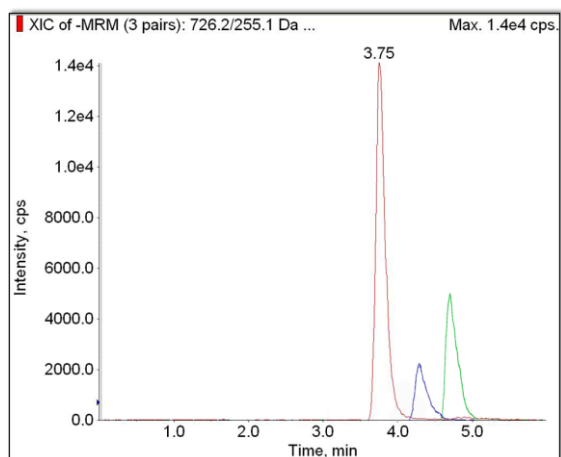


Figura 6.18. Cromatograma LC/ESI(-)-MS/MS a amestecului standard al celor trei coloranți textili studiați:

Lanasyn Red, $t_R = 3,75$ min (100 ng mL^{-1});

Lanasyn Dark Brown, $t_R = 4,34$ min (300 ng mL^{-1});

Nylosan Dark Brown, $t_R = 4,79$ min (50 ng mL^{-1}).

Metoda SPE

Eficiența cartușelor testate a fost estimată prin compararea gradelor de recuperare ale coloranților eluați pe fiecare tip de cartuș. Fiecare extracție a fost repetată de patru ori și a fost calculat *RSD* (%) pentru fiecare cartuș testat. Gradele de recuperare sunt date în Tabelul 6.17. Cartușele Strata NH_2 și Strata SAX nu au asigurat o bună recuperare pentru coloranții NDB și LDB în comparație cu cartușele Strata C18 unde rezultatele au fost mai bune. Referitor la adsorbentii Strata C18 testați, au fost obținute valori bune ale gradelor de recuperare peste 80% pentru coloranții NDB și LDB datorită interacțiunilor non-polare între grupările funcționale ale coloranților și adsorbentii. Cele mai bune rezultate au fost obținute pe cartușele Strata C18-E (grade de recuperare de $\approx 100\%$), cu excepția colorantului Lanasyn Red ($\approx 70\%$). Pentru cartușele Strata C18-U au fost obținute grade de recuperare peste 80% pentru NDB și LDB, având loc mecanisme de retenție primare non-polar combinate cu interacțiuni secundare silanol polare, crescând astfel eficiența extracției. În cazul cartușului Strata NH_2 , datorită mecanismului polar de retenție a analiților prin legături de hidrogen sau schimb anionic slab, coloranții au fost parțial reținuți (45,5% NDB și 58,8% LDB).

Pentru extracțiile pe cartușe Strata SAX, coloranții NDB și LDB au fost reținuți foarte puternic pe adsorbent și nu au mai putut fi eluați, aceasta fiind o consecință a interacțiunilor puternice între coloranții textili și adsorbentul cartușului Strata SAX, o rășină puternic schimbătoare de anioni.

Tabel 6.17. Gradele de recuperare ale coloranților textili studiați pe cele patru tipuri de cartușe testate.

Cartuș	Nylosan Dark Brown				Lanasyn Dark Brown				Lanasyn Red			
	Cantitate adăugată (ng)	Media ^a cantității regăsite (ng)	Gradul de recuperare Media ^b ± SD ^c (%)	RSD ^d (%)	Cantitate adăugată (ng)	Media cantității regăsite (ng)	Gradul de recuperare Media ± SD (%)	RSD (%)	Cantitate adăugată (ng)	Media ^a cantității regăsite (ng)	Gradul de recuperare Media ± SD (%)	RSD (%)
Strata NH₂	200	91,1	45,5 ± 1,3	2,8	200	117,7	58,8 ± 3,3	5,6	120	89,2	74,3 ± 1,0	1,4
Strata SAX	200	nd ^e	nd	nd	200	nd	nd	nd	120	83,8	69,8 ± 1,5	2,1
Strata C18-U	200	166,8	83,4 ± 3,1	3,8	200	170,5	85,2 ± 2,0	2,4	120	80,6	67,1 ± 1,0	1,4
Strata C18-E	200	187,2	93,6 ± 4,3	4,6	200	204,8	102,2 ± 3,4	3,3	120	85,2	71,0 ± 1,2	1,6

^aMedia cantității regăsite pentru patru extracții; ^bMedia gradului de recuperare pentru patru extracții; ^cDeviația standard; ^dDeviația standard relativă; ^eNedetecat.

Validarea procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS

Studiul de validare a demonstrat că procedura SPE-LC/ESI(-)-MS/MS elaborată pentru determinarea celor trei coloranți azoici complecși ai cromului din probe de apă reziduală demonstrează o bună liniaritate ($r > 0,99$) pe întreg domeniul de concentrație $1-100 \text{ ng mL}^{-1}$ pentru colorantul Lanasyn Red și $50-300 \text{ ng mL}^{-1}$ pentru coloranții Nylosan Dark Brown și Lanasyn Dark Brown.

Precizia procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS elaborate a demonstrat o bună repetabilitate prin calculul valorilor *RSD* (%) în aceeași zi / în zile diferite: $0,66-1,4\%$ / $0,84-1,5\%$ pentru Nylosan Dark Brown; $0,63-1,6\%$ / $0,82-1,2\%$ pentru Lanasyn Dark Brown și $1,0-2,3\%$ / $1,1-1,2\%$ pentru Lanasyn Red.

Studiul de acuratețe realizat pentru cei doi coloranți textili identificați (NDB și LR) în proba de apă reziduală a indicat grade de recuperare cu valori cuprinse între $93,1-99,7\%$.

Efectul de matrice a fost evaluat pentru fiecare colorant textil din proba de apă reziduală prin raportul între panta curbei de calibrare în solvent și în matrice. Valorile obținute, cuprinse în intervalul -20% și $+20\%$ (Sur și Dunemann 2004; Kvellár et al., 2008), indică absența efectului de matrice.

Analiza coloranților textili studiați din probe de apă reziduală

Procedura SPE-LC/ESI(-)-MS/MS descrisă a fost aplicată pentru determinarea coloranților Nylosan Dark Brown, Lanasyn Dark Brown și Lanasyn Red din probe de apă reziduală din influenții și efluenții unei stații de tratare a apelor reziduale din apropierea unei fabrici de prelucrare a fibrelor textile. Douăsprezece probe de apă au fost colectate de la o stație de tratare a apelor reziduale, și apoi analizate prin procedura elaborată. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 6.22.

Tabel 6.22. Cantitatea de coloranți textili studiați din probe prelevate de la influentul, respectiv efluentul unei stații de tratare a apelor reziduale.

Data recoltării	Proba de apă reziduală	Cantitatea (ng L^{-1})		
		Nylosan Dark Brown	Lanasyn Dark Brown	Lanasyn Red
19.02.2011	Influent	150,1	nd ^a	156,0
	Efluent	22,8	nd	74,0
26.03.2011	Influent	nd	nd	89,0
	Efluent	nd	nd	nd
30.04.2011	Influent	nd	200,6	nd
	Efluent	nd	nd	nd
27.05.2011	Influent	24,3	nd	183,0
	Efluent	nd	nd	89,6
4.06.2011	Influent	nd	nd	244,0
	Efluent	nd	nd	nd
23.07.2011	Influent	nd	nd	nd
	Efluent	nd	nd	nd

În urma analizelor efectuate, în influenții stației de tratare au fost găsite concentrații cuprinse între $24,3-244,0 \text{ ng L}^{-1}$ pentru cei trei coloranți textili complecși ai cromului, iar în efluenții corespunzători influenților concentrații cuprinse între $22,8-89,6 \text{ ng L}^{-1}$. Cromatograma corespunzătoare analizei LC/ESI(-)-MS/MS a probei de apă reziduală influent din data de 4.06.2011 este prezentată în Figura 6.22 și indică prezența colorantului Lanasyn Red în concentrația de $244,0 \text{ ng L}^{-1}$.

Rezultatele acestei monitorizări arată că prezența în probele de apă reziduală a celor trei coloranți textili azoici, complecși ai cromului, poate fi asociată cu utilizarea lor ocazională în finisarea textilă.

Coloranții textili determinați în urme (valori maxime de $\approx 90 \text{ ng L}^{-1}$) în efluenții de la stația de tratare arată o bună epurare a acestor ape care sunt apoi deversate în mediu.

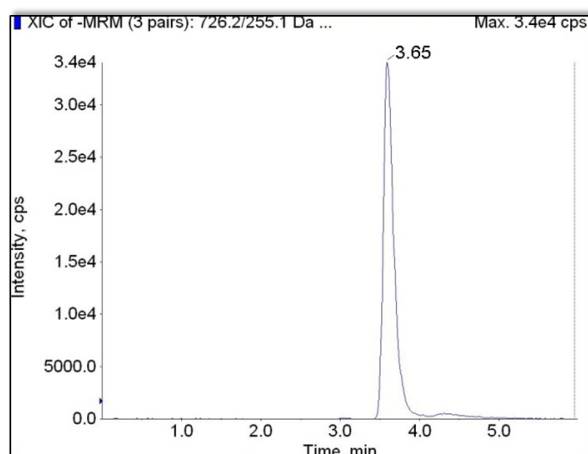


Figura 6.22. Cromatograma LC/ESI(-)-MS/MS corespunzătoare unei probe de apă din influent de la o stație de tratare a apelor reziduale. Colorantul găsit Lanasyn Red: $244,0 \text{ ng L}^{-1}$.

7. Studii ecotoxicologice privind acțiunea coloranților textili asupra plantelor de *Triticum aestivum* L.

Pentru a cunoaște efectele coloranților textili investigați în această cercetare asupra diferitelor performanțe din plante, în scopul identificării și evaluării rapide a toxicității acestora, au fost studiate efectele a doi coloranți antrachinonici (Optilan Blue și Lanasyn Blue) și a patru coloranți azoici (Lanasyn Red, Nylosan Red, Nylosan Dark Brown și Lanasyn Dark Brown) la două concentrații diferite ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ și $1,5 \text{ mg L}^{-1}$) asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L. soiul “Lovrin”). Au fost evaluate efectele privind fotosinteza frunzei, pigmentii asimilatori, metaboliții secundari volatili (emisii de produși de oxigenare sub acțiunea lipoxigenazei și emisii de monoterpene) și metaboliții secundari nevolatili (flavonoidele).

7.1. *Triticum aestivum* L. și stresul aplicat

În acest studiu au fost utilizate semințe de grâu, soiul Lovrin, achiziționate de la Fundulea, România. Experimentele au fost realizate în vase de plastic, utilizând pământ comercial, peste care a fost adăugat în prealabil fertilizator cu microelemente (Biolan, Finlanda). Semințele de grâu au fost plantate la o adâncime de 1 cm în pământ. Plantele au fost crescute în condiții controlate, într-o cameră de creștere ($0,29 \text{ m}^2$, $0,42 \text{ m}$) Percival (IA, USA), la o intensitate a luminii de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ furnizată timp de 12 ore și o temperatură zi/noapte, $25^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$.

Asupra plantelor de *Triticum aestivum* L. a fost aplicat un stres abiotic prin tratarea acestora cu coloranți textili (Tabel 4.1), doi antrachinonici (Optilan Blue și Lanasyn Blue) și patru azoici (Lanasyn Red, Nylosan Red, Nylosan Dark Brown și Lanasyn Dark Brown). Experimentul a început atunci când a doua frunză a ajuns la jumătate din capacitatea ei de creștere (faza de creștere Zadoks 1,2 (Zadoks et al., 1974)), la 14 zile după ce plantele au fost semănate. Plantele au fost udate periodic cu soluții apoase din coloranții textili OB, LB, LR, NR, NDB și LDB la două concentrații, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ și respectiv $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, iar plantele control au fost tratate cu apă distilată. Primele măsurători au fost realizate după 7 zile de la începerea tratamentului, când plantele au fost tratate cu un volum total de $0,5 \text{ L}$ per colorant. Următoarele

măsurători au fost realizate după alte 7 zile, adică după 14 zile de la începerea tratamentului, când plantele au fost tratate cu un volum total final de 1 L soluție per colorant.

7.2. Analiza parametrilor fotosintetici din plantele de grâu tratate cu coloranții textili luați în studiu

7.2.1. Măsurarea parametrilor fotosintetici

Monitorizarea parametrilor fotosintetici ai plantelor tratate cu coloranți textili a fost realizată prin schimbul de gaze, utilizând sistemul portabil GFS 3000 (3000 Portable Gas Exchange System, Walz, Effeltrich, Germany). Acest sistem prezintă o cuvă, cu mediu controlat, care este prevăzută cu o fereastră de 8 cm² în care este introdusă frunza. Cuvă este prevăzută cu o cameră fluorimetrică pentru iluminarea probei, unde sunt realizate măsurătorile fluorescenței clorofilene. Măsurătorile au fost realizate în următoarele condiții experimentale: 385 μmol mol⁻¹ concentrația CO₂, 1000 μmol m⁻² s⁻¹ intensitatea luminoasă, 25°C temperatura din cuvă, 70% umiditatea relativă și 750 μmol s⁻¹ debitul de aer.

Frunza a fost închisă în cuvă, lăsată să se stabilizeze până la starea de echilibru și apoi determinate valorile pentru viteza de asimilație netă a CO₂ (*A*) și conductanța stomatală de vaporizare a apei (*g_s*) care au fost calculate conform ecuațiilor date de *von Caemmerer și Farquhar (1981)*.

7.2.2. Rezultate și discuții privind efectele coloranților textili asupra parametrilor fotosintetici ai plantelor de grâu

Rezultate

Pentru tratamentul cu 0,5 L soluție / colorant textil, nu au fost observate diferențe semnificative în viteza de asimilație netă (*A*), între cele două concentrații aplicate (0,5 mg L⁻¹ și 1,5 mg L⁻¹) și control (Fig. 7.3a). În contrast, sub condiții de stres sever (1 L soluție colorant 1,5 mg L⁻¹), viteza de asimilație netă scade semnificativ de la 19,6 ± 0,3 μmol m⁻² s⁻¹, valoare obținută pentru control, la valorile 17,1 ± 0,8 μmol m⁻² s⁻¹ pentru colorantul OB, 16,6 ± 0,2 μmol m⁻² s⁻¹ pentru colorantul LR și 15,8 ± 0,3 μmol m⁻² s⁻¹ pentru colorantul NR (Figura 7.3b). Viteza de asimilație netă scade odată cu creșterea volumului de soluție de NR pentru concentrația de 0,5 mg L⁻¹.

Pentru conductanța stomatală de vaporizare a apei a fost observată o scădere față de control, doar în cazul tratamentului cu colorantul NDB, după ce plantele au fost tratate cu un volum de 0,5 L la concentrația de 1,5 mg L⁻¹ (Figura 7.3c). După ce plantele de grâu au fost tratate cu 1 L soluție per colorant azoic, având concentrația de 1,5 mg L⁻¹, media conductanței stomatale (±SE) scade până la 68 ± 5% pentru LR, 65,3 ± 2,2% pentru NR, 65,7 ± 3,9% pentru NDB și 77,3 ± 2,5% pentru LDB față de control (Figura 7.3d).

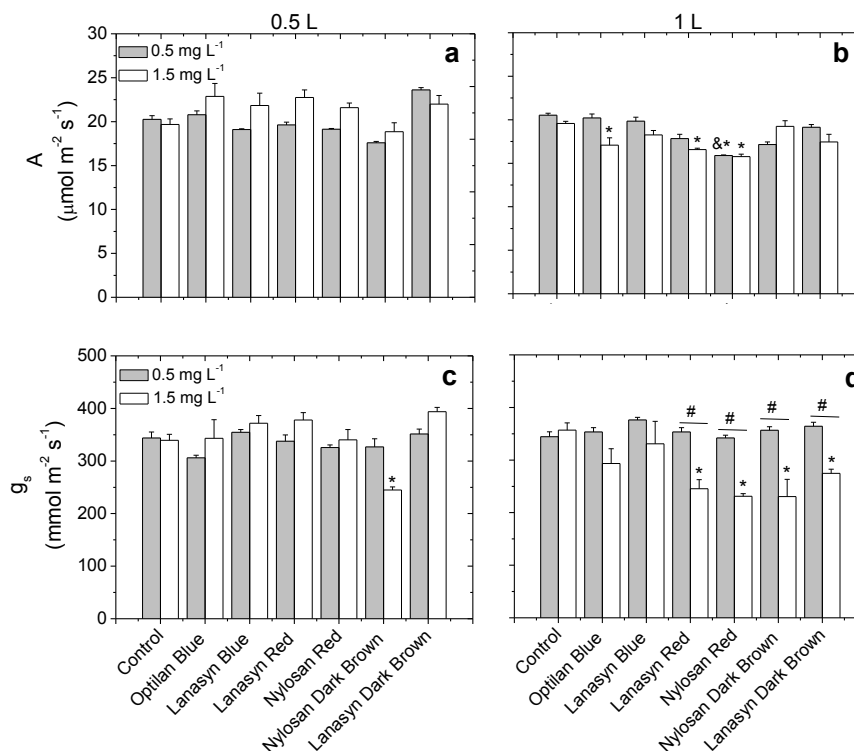


Figura 7.3. Modificări în viteza netă de asimilație (A) (a și b) și conductanța stomatală de vaporizare a apei (g_s) (c și d), pentru frunzele de *Triticum aestivum* L., soiul Lovrin, plante care au fost tratate cu șase soluții de coloranți textili, la două concentrații diferite $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ respectiv $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Măsurătorile au fost realizate după ce plantele au fost tratate cu un volum total de soluții de coloranți textili $0,5 \text{ L}$ (a și c) și 1 L (b și d). Fiecare valoare este media (\pm SE) a trei experimente replicat realizate independent cu plante diferite. Simbolurile din grafice reprezintă:

* = diferențe statistice semnificative ($P < 0,05$) între tratamentul cu coloranți textili și control; & = diferențe semnificative între volumele soluțiilor de coloranți textili utilizate pentru tratamentul plantelor ($0,5 \text{ L}$ respectiv 1 L), pentru aceeași concentrație ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ sau $1,5 \text{ mg L}^{-1}$), și # = diferențe semnificative între cele două concentrații aplicate ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ și $1,5 \text{ mg L}^{-1}$) pentru același volum de soluție de colorant textil utilizat pentru udarea plantelor ($0,5 \text{ L}$ sau 1 L).

Discuții

Fotosinteza este un proces biologic fundamental din plantă, care uneori poate fi afectat de factorii de stres biotic sau abiotic (Mittler, 2006). În acest studiu au fost aplicate concentrații reale care pot fi observate în mediu (Şahin et al., 2007; Copaciu et al., 2012a,b). Acești coloranți textili studiați dar și concentrațiile care au fost aplicate au condus la efecte negative semnificative asupra vitezei de asimilație netă din frunzele plantelor de grâu (Figura 7.3a și 7.3b). În cazul coloranților LR și NDB care sunt complecși ai cromului, procesul de fotosinteză a fost redus semnificativ față de control. Cromul este cunoscut ca factor care afectează în mod negativ fotosinteza plantelor, dar mecanismul nu este încă bine înțeles (Shanker et al., 2005, 2009). Cromul poate acționa nespecific prin inducerea stresului oxidativ, afectând în final procesul de fotosinteză (Ali et al., 2011; Dey et al., 2009). Într-un studiu recent a fost emisă ipoteza unor interacțiuni între cromul valent și efectul acestuia asupra procesului de fotosinteză (Lopez-Luna et al., 2009). Inhibarea de către Cr(IV) a transportului de electroni în procesul de fotosinteză și devierea de electroni din partea donoare de electroni a fotosistemului I, a condus la o scădere a vitezei

de asimilație în plantele tratate cu coloranți azoici care conțin în structura lor Cr (*Diwan et al., 2012*). Cu toate acestea trebuie luat în considerare, faptul că în toate aceste studii de literatură concentrațiile aplicate au fost mult mai mari în comparație cu concentrațiile aplicate de noi în acest studiu. De exemplu *Rodriguez et al. (2012)* au demonstrat o scădere a vitezei de asimilație mai mică de $0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, în plantele de *Pisum sativum* expuse la 2000 mg L^{-1} Cr.

Toți coloranții azoici la concentrația de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ au redus semnificativ conductanța stomatală de vaporizare a apei (Figura 7.3c și 7.3d). Acest lucru este în concordanță cu rezultatele obținute de *Chatterjee and Chatterjee (2000)* pe plante de *Brassica oleracea* și de *Ali et al. (2011)* pe plante de *Hordeum vulgare*, ca răspuns la tratamente cu săruri de crom.

Astfel de scăderi ale conductanței stomatale de vaporizare a apei, în plante, datorită stresului abiotic indus de metale grele au fost asociate cu reducerea activității apei din stomată (*Eckert et al., 1999; Kholodova et al., 2011*). Mai mult, reducerea conductanței stomatale este un răspuns la stresul tipic declanșat de concentrațiile crescute ale hormonului de stres acid abscisic, care este un regulator de bază al răspunsului plantelor la factorii de stres, creștere și dezvoltare (*Antoni et al., 2011*).

7.3. Analiza unor metaboliți secundari volatili (LOX-uri și monoterpene) emiși de plantele de grâu tratate cu coloranții textili luați în studiu

7.3.1. Prelevarea și analiza unor LOX-uri și a unor monoterpene

Prelevarea compușilor organici volatili (*Volatile Organic Compounds*, VOC) a fost realizată utilizând același sistem bazat pe schimbul de gaze, ca și în cazul măsurătorilor parametrilor fotosintetici. Prelevarea VOC-urilor a avut loc prin intermediul cuvei, prin legarea unei pompe (1003-SKC, SKC Inc., Houston, USA) cu flux de aer constant la sistemul schimbător de gaze, cu un debit de 200 mL min^{-1} , timp de 15 min. Prelevarea a avut loc după stabilirea stării de echilibru și după obținerea valorilor parametrilor caracteristici schimbului de gaze. Aerul colectat a fost trecut printr-un cartuș de oțel inoxidabil ($10,5 \times 3 \text{ cm}$, Supelco, Bellefonte, USA) umplut cu adsorbent Carbopack (C 20/40 mesh, C 40/60 mesh, and X 20/40 mesh) optimizat pentru reținerea produșilor de oxigenare sub acțiunea lipoxigenazei (*Lipoxygenase pathway products*, LOX) și monoterpenelor, în vederea analizei cantitative (*Copolovici et al., 2009; Niinemets et al., 2010; Niinemets et al., 2011*).

7.3.2. Rezultate și discuții privind efectele coloranților textili asupra emisieii de LOX-uri și monoterpene de către plantele de grâu

Rezultate

Pentru a avea o perspectivă privind efectele coloranților textili asupra plantelor de grâu au fost evaluate emisiile de produși de oxigenare sub acțiunea lipoxigenazei și monoterpenele. Emisiile de LOX-uri monitorizate din frunzele verzi ale grâului, sub condiții de stres abiotic prin tratarea plantelor cu coloranți textili sunt: 1-hexanol, (Z)-3-hexenol, (Z)-2-hexenal și (Z)-3-acetat de hexenil. Monoterpenle detectate sunt: α -pinen, β -pinen, camfen, limonen, 3-careen, p-cimene și β -felandren. Deoarece nu au fost observate modele diferite calitativ pentru compușii singuri ai unei clase date, în continuare vor fi prezentate rezultatele însumate pentru emisiile de LOX-uri și monoterpene.

Totalul emisiilor de LOX-uri (Φ_{LOX}) și cel de monoterpene ($\Phi_{\text{monoterpene}}$) au fost mult mai reduse în plantele control față de plantele tratate cu coloranți textili (Figura 7.5).

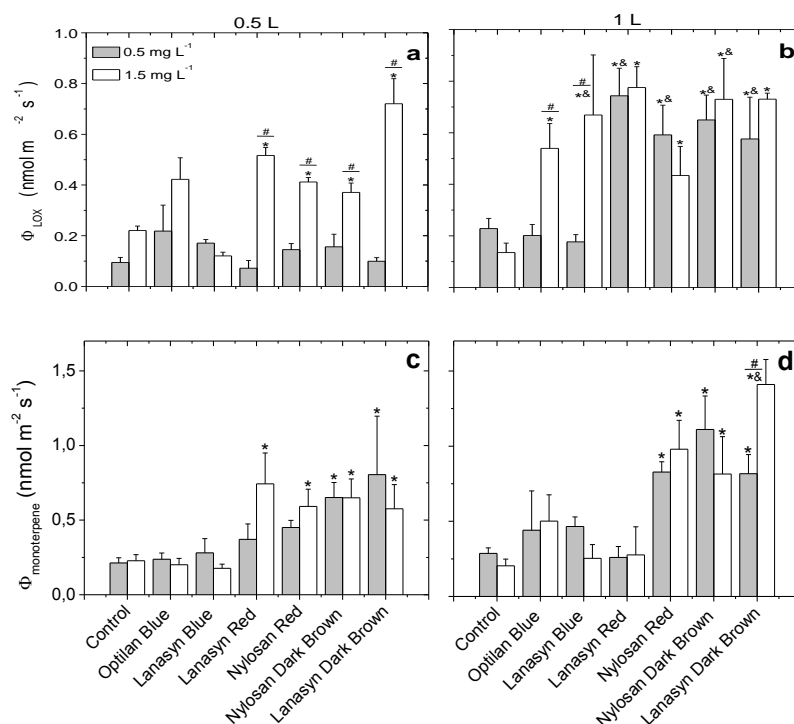


Figura 7.5. Modificări în emisia de produși de oxigenare sub acțiunea lipoxigenazei (LOX) (a și b) și emisia de monoterpene (c și d), din frunzele de *Triticum aestivum* L., ca răspuns la tratamentul cu șase soluții de coloranți textili, la două concentrații 0,5 mg L⁻¹ și 1,5 mg L⁻¹. Măsurătorile au fost realizate după ce plantele au fost tratate cu un volum total de soluții de coloranți textili 0,5 L (a și c) și 1 L (b și d). Semnificația statistică este aceeași din Figura 7.3.

După ce plantele au fost tratate cu un volum de 0,5 L soluții coloranți textili azoici, au fost observate creșteri ale emisie totale de LOX-uri, cu o medie de peste 122%, în cazul concentrației de 1,5 mg L⁻¹ (Figura 7.5a). Pentru același tratament și aceeași concentrație, coloranții antrachinonici nu influențează emisia de LOX-uri ($P > 0,1$).

Rezultatele obținute în urma stresului abiotic indus de toți coloranții textili investigați (1,5 mg L⁻¹ pentru volumul de 1 L), arată o creștere drastică a emisie totale de LOX-uri până la niveluri de $0,54 \pm 0,10 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (OB), $0,67 \pm 0,23 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LB), $0,77 \pm 0,08 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LR), $0,43 \pm 0,11 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (NR), $0,72 \pm 0,16 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (NDB) și $0,73 \pm 0,03 \text{ nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LDB). Pentru același volum, dar la concentrația de 0,5 mg L⁻¹, a fost observată o creștere a emisie totale de LOX-uri doar în cazul coloranților textili azoici ($P < 0,05$). La tratamentul cu un volum de 1 L de coloranți (1,5 mg L⁻¹ LB; 0,5 mg L⁻¹ LR; 0,5 mg L⁻¹ NR; 0,5 mg L⁻¹ și 1,5 mg L⁻¹ NDB; 0,5 mg L⁻¹ LDB), emisia totală de LOX-uri a crescut semnificativ în comparație cu tratamentele pentru aceleași concentrații, dar la volumul de 0,5 L (Figura 7.5b și 7.5a).

În cazul emisie totale de monoterpene, în urma tratamentului cu volumul de 0,5 L la concentrația de 1,5 mg L⁻¹, au fost observate creșteri semnificative în cazul tuturor tratamentelor cu coloranți textili azoici. Pentru același volum aplicat în timpul tratamentului, dar la o concentrație mai scăzută (0,5 mg L⁻¹) au fost observate creșteri semnificative doar în cazul coloranților azoici NDB și LDB (Figura 7.5c). La

volumul de 1 L soluții de coloranți azoici investigați, rezultatele arată creșteri a emisiei totale de monoterpene pentru coloranții NR, NDB și LDB la ambele concentrații testate ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$; $1,5 \text{ mg L}^{-1}$). Creșterea emisiei de monoterpene a fost mai severă pentru colorantul azoic LDB la concentrația de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ în comparație cu concentrația mai mică ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) utilizată în același tratament (1 L) (Figura 7.5d).

Discuții

Au fost evaluate emisiile de LOX-uri și monoterpene, ca răspuns al plantelor la stresul abiotic indus de coloranții textili investigați. LOX-urile volatile sunt formate din acizi grași polinesaturați care sunt eliberați de membranele plantelor în timpul stresului (*Feussner și Wasternack, 2002*). Emisiile de LOX-uri în concentrații mai mari decât cele normale, semnaleză un factor de stres asupra plantei cum ar fi de exemplu stresul la căldură și frig (*Copolovici et al, 2012*), secetă (*Permyakova et al., 2012*), ozon (*Beauchamp et al., 2005*), sau lumină puternică (*Loreto et al., 2006*). În studiul nostru a fost demonstrat faptul că emisiile de LOX-uri au fost induse de coloranții textili (Figura 7.5), indicând că tratamentul cu acești coloranți induce un stres sever plantelor de grâu. Emisiile de LOX-uri au fost evidente încă de la tratamentul cu concentrația și volumul de soluții de coloranți textili cel mai scăzut ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$; 0,5 L) (Figura 7.5a), crescând în continuare o dată cu creșterea condițiilor de stres (Figura 7.5b). Aceste rezultate sugerează faptul că emisiile de LOX-uri pot fi considerate bioindicatori în condiții de stres sau poluare cu coloranți proveniți din industria de prelucrare a fibrelor textile.

În ceea ce privește emisiile de monoterpene, este cunoscut faptul că frunzele de *Triticum aestivum* L. nu emit monoterpene în condiții fiziologice (*Kesselmeier și Staudt, 1999*). Acest lucru a fost demonstrat și în cazul nostru, pentru plantele de control, unde emisiile de monoterpene au fost foarte mici, aproape de limita de detecție. Cu toate acestea, cele mai importante emisii de monoterpene pentru diferite specii de plante, sunt induse de factorii de stres biotic sau abiotic (*Loreto și Schnitzler, 2010; Niinemets, 2010*).

În studiul nostru, tratamentul aplicat plantelor de grâu cu soluții de coloranți textili, a crescut emisia de monoterpene, dar nu au existat diferențe statistice între cele două concentrații de coloranți aplicate (Figura 7.5c și 7.5d). Acest răspuns care nu este dependent de doza de coloranți, ar putea indica un răspuns de tip prag, la care plantele încep să emită monoterpene (*Niinemets, 2010*). Monoterpenele se formează în plastidele din plante pe calea MEP (2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat) (*Lichtenthaler, 1999; Nagegowda, 2010*), dar pe această cale se formează și carotenoizii și fitolul atașat moleculei de clorofilă. Stresul aplicat plantelor de grâu a condus la emisii de monoterpene, care indică o deplasare a căii MEP către sinteze de monoterpene, însă stresul cel mai sever a condus la reducerea semnificativă a conținutului de carotenoizi (Figura 7.8).

7.4. Analiza unor pigmenți asimilatori (clorofile și carotenoizi) din plantele de grâu tratate cu coloranții textili luați în studiu

7.4.1. Extracția și analiza pigmentilor clorofilieni și carotenoizi din plantele de grâu

Extracția pigmentilor

Pigmenții fotosintetici investigați în acest studiu privind stresul abiotic indus de coloranții textili asupra plantelor de grâu au fost: pigmenții clorofilieni (clorofila *a* și clorofila *b*) și pigmenții carotenoizi (β -caroten, zeaxantin și luteina).

Extracția pigmentilor clorofilieni și carotenoizi a fost realizată după protocolul urmat de *Niinemets et al. (1998)*, cu unele modificări. După măsurarea parametrilor fotosintetici, 3 cm² de frunză verde au fost înghețați în azot lichid. Pigmenții de interes au fost extrași pe baie de gheață, la întuneric, în prezență de carbonat de magneziu și acetonă (Sigma Aldrich). Din probele astfel obținute, pigmenții de interes au fost extrași prin centrifugare (0°C, 3 min) repetată cu volume diferite de acetonă până ce reziduul a rămas incolor. Extractele supernatante au fost unite și aduse într-un volum final de 1 mL acetonă, și apoi filtrate prin filtre PTFE 0,45 μ m.

Analiza pigmentilor clorofilieni și carotenoizi prin cromatografia de lichide de înaltă performanță

Determinarea pigmentilor clorofilieni și carotenoizi a fost efectuată utilizând un cromatograf de lichide de înaltă performanță Agilent 1200 (Agilent Technologies) echipat cu detector DAD. Separarea pigmentilor a fost realizată utilizând o coloană cromatografică cu fază inversă Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m, Agilent Technologies), termostată la 10 \pm 0,1°C și un sistem de eluție binar, apă ultrapură cu HEPES (0,1 M; pH = 8) (solventul A) și acetonă (solventul B). Separarea pigmentilor clorofilieni și carotenoizi a fost realizată prin eluție cu gradient: 7,5 min amestec 25% solvent A și 75% solvent B, după care în 9,5 min se ajunge la 100% solvent B, rămânând timp de 3 min după care în 2 min se revine la condițiile inițiale (25% solvent A și 75% solvent B) sub care se echilibrează coloana cromatografică timp de 8 min. Pigmenții au fost eluați cu un debit de 1,5 mL min⁻¹ (*Niinemets et al., 1998*).

Detecția HPLC a fost realizată simultan la mai multe lungimi de undă, corespunzătoare maximului de adsorbție pentru fiecare pigment investigat. Clorofila *a* a fost măsurată la 430 nm, iar ceilalți pigmenți, clorofila *b*, β -carotenu, zeaxantina, respectiv luteina la 455 nm.

Pentru evaluarea cantitativă a acestor pigmenți din frunzele plantelor de grâu, au fost trasate curbele de calibrare pentru clorofila *a*, clorofila *b* și β -caroten utilizând etaloane Sigma Aldrich, și pentru zeaxantin și luteină etaloane Fluka.

7.4.2. Rezultate și discuții privind efectele coloranților textili asupra conținutului de pigmenți clorofilieni și carotenoizi din plantele de grâu

Rezultate

După tratarea plantelor de grâu cu 0,5 L soluție de colorant, rezultatele obținute nu arată diferențe statistice între conținutul total de clorofilă *a* și clorofilă *b* și raportul *a/b* al acestora pentru ambele concentrații aplicate (Figurile 7.8a și 7.8c). După mărirea volumului de tratament la 1 L soluție de

colorant, rezultatele arată o reducere semnificativă a conținutului total de clorofile, mai ales pentru concentrația mare ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$, Figura 7.8b) și o creștere a raportului clorofila a/b (Figura 7.8d).

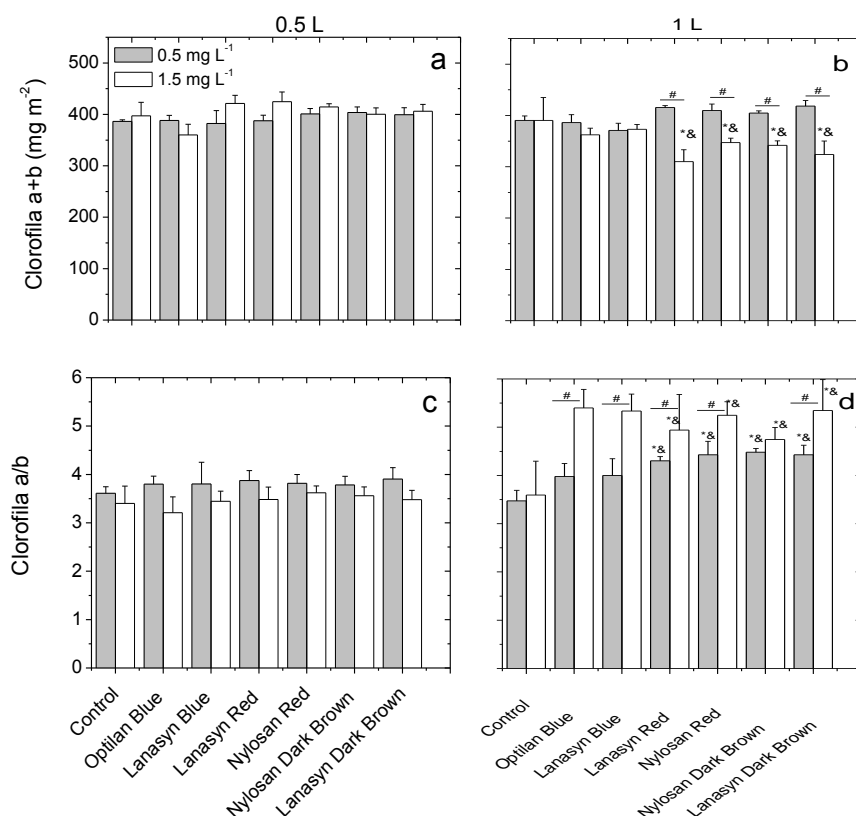


Figura 7.8. Modificări în conținutul de clorofila a și b , din frunzele de *Triticum aestivum* L., ca răspuns la tratamentul cu șase soluții de coloranți textili, la două concentrații $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ și $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Măsurătorile au fost realizate după ce plantele au fost udate cu un volum total de soluții de coloranți textili $0,5 \text{ L}$ (a și c) și 1 L (b și d). Semnificația statistică este aceeași din Figura 7.3.

Conținutul de pigmenți carotenoizi investigați (zeaxantină, luteină și β -caroten) din plantele de grâu nu a fost afectat (Figura 7.9a) în cazul tratării acestora cu un volum de $0,5 \text{ L}$ soluție de colorant textil, de concentrație $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. În cazul tratării plantelor de grâu cu $0,5 \text{ L}$ soluție colorant de concentrație $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, are loc o scădere semnificativă a conținutului de luteină și β -caroten față de control în cazul tuturor tratamentelor cu coloranți textili (Figura 7.9b). După tratamentul cu un volum de 1 L soluție colorant, pentru concentrația $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ se observă o scădere a conținutului de β -caroten în cazul tuturor coloranților textili azoici (Figura 7.9c). Pentru același volum de 1 L , dar o concentrație de colorant de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, rezultatele statistice obținute arată o scădere a conținutului pentru toți carotenoizii investigați față de plantele control (Figura 7.9d). Se poate constata un efect toxic mai sever în cazul coloranților textili azoici (Figura 7.9d) datorită scăderii de până la $\sim 27 \text{ mg m}^{-2}$ a conținutului de β -caroten (media \pm SE; $26,7 \pm 1,4 \text{ mg m}^{-2}$) în comparație cu coloranții antrachinonici unde scăderea în β -caroten a fost doar de până la $\sim 34 \text{ mg m}^{-2}$ (media \pm SE; $34,1 \pm 0,6 \text{ mg m}^{-2}$).

Discuții

Deoarece principalii pigmenți responsabili pentru absorbția luminii în procesul de fotosinteză sunt clorofilele, sensibilitatea la stres a unei plante este evaluată prin conținutul de clorofilă (Młodzińska, 2009). Urmărind literatura de specialitate, mai multe studii au demonstrat scăderi ale conținutului de

clorofilă din diferite specii, sub impactul metalelor grele (Subrahmanyam, 2008; Vernay et al., 2007; Zengin și Munzuroglu, 2005). Efectele coloranților textili asupra clorofililor din plante sunt mai puțin cunoscute. Au fost observate scăderi ale conținutului de clorofile, ca răspuns a plantelor de *Cicer arietinum* la tratamentul cu efluenți textili cu conținut de coloranți (Garg and Kaushik, 2006). În studiul realizat de noi, conținutul de clorofile a scăzut progresiv o dată cu creșterea volumului și a concentrației de coloranți textili (Figura 7.8.a și 7.8.b). Cele mai drastice scăderi au fost observate în cazul coloranților azoici care conțin în structura lor crom.

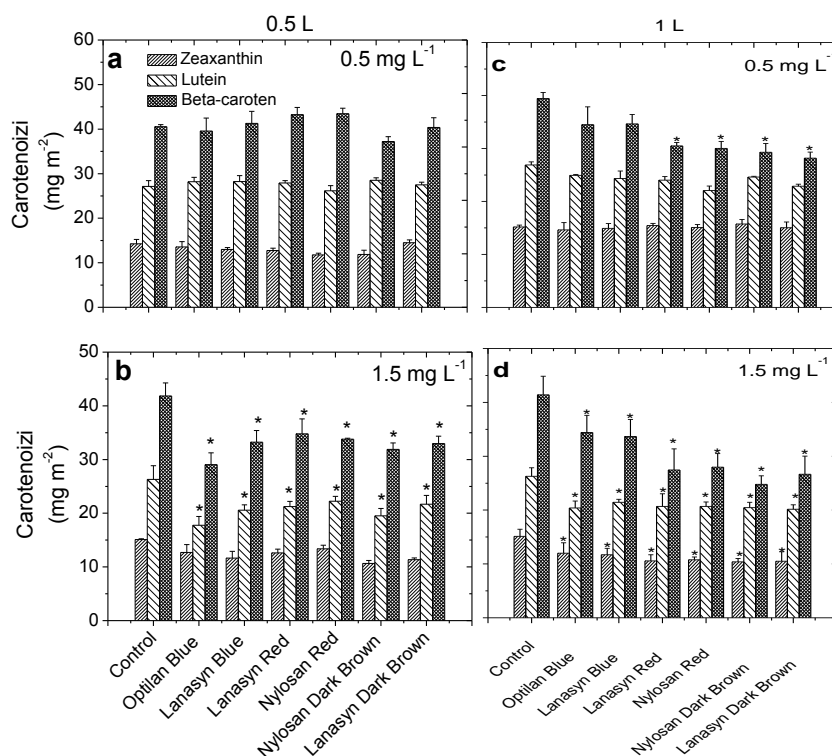


Figura 7.9. Modificări în conținutul de carotenoizi din frunzele de *Triticum aestivum* L., ca răspuns la tratamentul cu coloranți textili, la două concentrații $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ și $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Măsurătorile au fost realizate după ce plantele au fost udate cu un volum total de soluție de colorant textil $0,5 \text{ L}$ (a și b) și 1 L (c și d). Semnificația statistică este aceeași din Figura 7.3.

Efectul cromului în metabolismul direct al clorofililor este asociat cu reducerea metalului co-factor în enzimele responsabile pentru sinteza clorofililor sau ceea ce a urmat indirect prin efectul datorat scăderii Fe din clorofilă (Vernay et al., 2007). Raportul clorofila *a/b* a crescut semnificativ pentru toți coloranții textili investigați (Figura 7.8d), în special în cazul coloranților azoici. Acest raport caracterizează distribuția pigmentilor între centrele de reacție și lumina necesară maturării complexilor. Ca urmare, un raport mare al clorofililor în frunzele de grâu tratate cu coloranți textili sugerează reducerea luminii necesare maturării complexilor în centrele de reacție, de către fotosistemul II. Această unitate fotosistemică este compusă dintr-o mulțime de polipeptide dintre care unele sunt componente intrinseci ale membranei tilacoidale, iar altele sunt atașate la exteriorul suprafeței lumenului (Bercea, 2008).

Carotenoizii sunt un grup de pigmenți galbeni, cu rol important în fotoprotecția plantei, mecanism care este privit ca o valvă de siguranță care permite disiparea energiei în exces înainte de apariția daunelor la nivel celular. În condițiile unei intensități luminoase ridicate, cloroplastele receptează o cantitate de

lumină mai mare decât cea necesară în faza de întuneric, acest fapt conducând la transferul energiei în exces la moleculele de oxigen. Se formează oxigen activat, concomitent cu anumiți radicali liberi care distrug aparatul fotosintetizator. Carotenoizii au însă rolul de a prelua o parte a energiei excedentare și în acest mod de a proteja moleculele de clorofilă de acțiunea distructivă a excesului de lumină (Dobrotă, 2010). Cu toate acestea, sub stres sever conținutul de carotenoizi se reduce (Munne-Bosch și Alegre, 2000), dar pe de altă parte stresul abiotic crește în special conținutul de zeaxantină care se formează din violaxantină prin ciclul xantofilic (Demmig-Adams și Adams, 2006).

În studiul nostru, conținutul de luteină și β -caroten scade în cazul plantelor de grâu tratate cu coloranți textili în comparație cu plantele de grâu control (Figura 7.9). De subliniat că a fost observat un efect mai puternic asupra plantelor de grâu tratate cu coloranți textili azoici, ceea ce sugerează în continuare că tratamentele cu acești coloranți conduc la un stres mult mai puternic. Conținutul de zeaxantină a scăzut numai la volumul și concentrația cea mai mare aplicată (1 L; 1,5 mg L⁻¹) plantelor.

7.5. Analiza unor metaboliți secundari nevolatili (conținutul total de flavonoide) din plantele de grâu tratate cu coloranții textili luați în studiu

Din categoria metaboliților secundari nevolatili fac parte compușii fenolici care sunt biosintetizați pe două căi principale: calea acidului șikimic și calea acidului malonic. O clasă importantă din această categorie sunt flavonoizii (C₁₅) care au rolul de a atrage animalele și insectele pentru polenizare și pentru dispersia semințelor (Dobrotă, 2005).

7.5.1. Extracția și analiza conținutului total de flavonoide din plantele de grâu

Extracția conținutului total de flavonoide

Materialul vegetal, aproximativ 3 cm², a fost mărunțit cu azot lichid, peste care au fost adăugați 5 mL amestec etanol-apă 80:20 (v/v). Pentru macerare, extractele au fost păstrate timp de 10 min într-un cuptor (Model UNE 200, Memmert, Schwabach) la 35°C, după care probele macerate au fost ultrasonate 30 min într-o baie Bandelin Sonorex la aceeași temperatură. Fiecare extras a fost filtrat printr-o membrană PTFE de 0,45 μ m și adus la un volum final de 5 mL cu același amestec de solvenți (Opriș et al., 2011; Soran et al., 2012).

Analiza conținutului total de flavonoide prin tehnica spectroscopiei UV-Vis

Determinarea conținutului total de flavonoide din plantele de grâu tratate cu volume diferite de soluții de coloranți textili de concentrații diferite a fost realizată prin tehnica spectroscopiei UV-Vis, cu ajutorul spectrofotometrului UV-Vis Model UV-2550 Shimadzu.

Determinarea conținutului total de flavonoide s-a bazat pe reacția dintre flavonoide, exprimat prin standardul rutin și clorura de aluminiu (Sigma-Aldrich) care conduce la formarea unui complex galben (Petry et al., 2001). Metoda folosită a fost conform *Farmacopeei Române (1993)*. Absorbanța soluției de flavonoide a fost măsurată la 420 nm, lungimea de undă corespunzătoare maximului de absorbție pentru rutin.

7.5.2. Rezultate și discuții privind efectele coloranților textili asupra conținutului total de flavonoide din plantele de grâu

Rezultate

Rezultatele experimentale obținute în urma acestui studiu au demonstrat faptul că tratarea plantelor de grâu cu soluții de coloranți textili influențează semnificativ scăderea conținutului total de flavonoide din aceste plante (Figura 7.12). În cazul tuturor coloranților textili investigați, la concentrația de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, pentru ambele volume aplicate (Figura 7.12 a și 7.12b), acest conținut a scăzut statistic față de control. În cazul coloranților LB, NDB și LDB, o scădere a conținutului total de flavonoide a fost înregistrată chiar și la concentrația de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Aceste rezultate pun din nou în evidență toxicitatea coloranților azoici (NDB și LDB) care conțin în structura lor crom (Figura 7.12b).

Discuții

Metaboliții secundari din plante sunt de mare importanță în relația plantelor cu mediul înconjurător. Flavonoidele sunt metaboliți secundari din categoria compușilor fenolici, care sunt prezente pe scară largă în plante și procariote. Compușii fenolici funcționează ca indicatori de stres, protejând plantele de factorii de stres biotic sau abiotic (Samanta et al., 2011; Rezanejad, 2012; Di Ferdinando et al., 2012).

Rezultatele studiilor prezentate arată că plantele de grâu expuse la tratamente cu coloranți textili în diferite volume și concentrații, suferă o scădere drastică a conținutului de flavonoide.

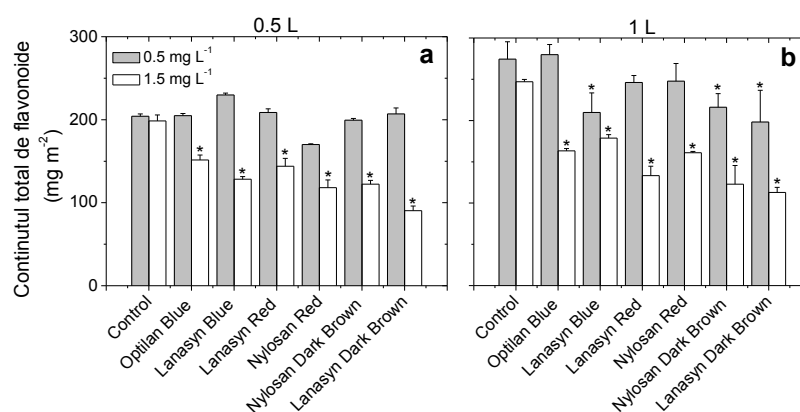


Figura 7.12. Modificări în conținutul total de flavonoide, din frunzele de *Triticum aestivum* L., ca răspuns la tratamentul cu soluții de coloranți textili, la două concentrații $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ și $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Măsurătorile au fost realizate după ce plantele au fost udate cu un volum total de soluții de coloranți textili $0,5 \text{ L}$ (a) și 1 L (b). Semnificația statistică este aceeași din Figura 7.3.

CONCLUZII

Prin tematica prezentei teze de doctorat s-a urmărit elaborarea unor proceduri moderne și performante de izolare, identificare și cuantificare a șase coloranți textili, doi antrachinonici (Optilan Blue și Lanasyn Blue) și patru azoici (Lanasyn Red, Nylosan Red, Nylosan Dark Brown și Lanasyn Dark Brown) și aplicarea acestor proceduri la determinarea acestora din probe de apă reziduală. Rezultatele cercetărilor din teză contribuie la evaluarea impactului coloranților textili investigați asupra calității mediului, precum și a efectelor ecotoxicologice ale acestora asupra plantelor de grâu.

Principalele etape parcurse au fost:

1. Studiu de literatură referitor la:
 - Coloranții textili și importanța monitorizării lor în diferiți factori de mediu;
 - Tehnicile de analiză utilizate în studiul coloranților textili din probe de apă reziduală;
 - Ecotoxicologia coloranților textili.
2. Selectarea a șase coloranți textili utilizați în prezent în industria de prelucrare a fibrelor textile.
3. Înregistrarea spectrelor UV-Vis ale coloranților textili luați în studiu pentru a stabili lungimea de undă corespunzătoare maximului de absorbție fiecărui colorant, necesare analizei HPTLC.
4. Determinarea parametrilor fizico-chimici de calitate ai apelor uzate provenite din industria de prelucrare a fibrelor textile.
 - A fost observată o variație sezonieră pentru mai mulți parametri fizico-chimici, dictată de regimul de producție sau fabricație al fibrelor textile;
 - Acești parametri au avut valori mai mari în timpul sezonului rece decât în sezonul cald, ceea ce poate fi explicat printr-un regim de producție mai intens în perioada rece și condiții meteorologice favorabile;
 - Comparând rezultatele studiului nostru cu reglementările în vigoare NTPA 002/2005 nu au fost depășite limitele maxime admise în cazul temperaturii, al totalului de materii solide în suspensie, al conținutului total de fosfor și al conținutului de detergenți, în timp ce acestea au fost depășite pentru pH, consum biochimic de oxigen, consum chimic de oxigen și azot amoniacal;
 - În cazul conținutului total de azot nu există valori maxime admise pentru deversarea apelor uzate în rețeaua de canalizare, dar monitorizarea acestui parametru este esențială, având în vedere efectele negative pe termen lung.
 - Evacuarea efluenților din industria de prelucrare a fibrelor textile în rețeaua de canalizare reprezintă o componentă majoră în poluarea apei, deoarece contribuie la creșterea consumului de oxigen din apă și încărcarea cu nutrienți a acesteia ceea ce conduce la promovarea unui ecosistem acvatic destabilizat.
5. Dezvoltarea unei proceduri SPE-HPTLC, rapidă și sensibilă, care a fost aplicată la monitorizarea din efluenți textili a colorantului antrachinonic Lanasyn Blue și a patru coloranți azoici, și anume Nylosan Dark Brown, Nylosan Red, Lanasyn Dark Brown și Lanasyn Red.
 - În vederea izolării acestor coloranți textili din ape reziduale prin extracția pe fază solidă, au fost testate patru tipuri de cartușe Strata (WAX/NH₂, SAX, C18-U și C18-E). Cele mai bune grade de recuperare au fost obținute pe cartușul Strata WAX/NH₂ ceea ce a arătat că metoda SPE elaborată este eficientă și reproductibilă pentru extracția celor cinci coloranți textili din matrice lichidă.

- Pentru determinări HPTLC cantitative, au fost înregistrate densitograme la 550 nm și realizate curbe de calibrare.
 - Validarea acestei proceduri indică rezultate bune privind selectivitatea, liniaritatea, limitele de detecție și de cuantificare, acuratețea și precizia.
 - Acești coloranți, utilizați în prezent în industria textilă, au fost determinați în efluenții textili monitorizați în cantități de ordinul ppm, prin procedura SPE-HPTLC elaborată, ceea ce indică necesitatea îndepărtării lor din acești efluenți, înainte de deversarea acestora în diferiți emisari sau rețeaua de canalizare.
6. Dezvoltarea unei proceduri SPE-LC/ESI(-)-MS/MS pentru analiza în urme a colorantului antrachinonic Optilan Blue și a colorantului azoic Nylosan Red din diferite probe de apă reziduală (influent și efluent), utilizând SPE și sistemul 3200 QTRAP LC/ESI(-)-MS/MS cu sursă de ionizare Turbo V și ionizare în modul negativ prin electropulverizare.
- Cartușul optim utilizat pentru izolarea coloranților din probe de apă reziduală este Strata NH₂.
 - Metoda SPE realizată este reproductibilă și eficientă pentru extracția acestor doi coloranți textili din probe de apă reziduală.
 - În cadrul validării procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS au fost obținute rezultate bune privind acuratețea, precizia, liniaritatea și limita de detecție (Nylosan Red 0,28 ng mL⁻¹; 0,43 ng mL⁻¹ Optilan Blue).
 - Prezența acestor coloranți la nivel de ng L⁻¹ în probe de apă reziduală prelevate din influenții unei stații de tratare indică necesitatea îndepărtării acestor coloranți din apele reziduale provenite de la fabricile de prelucrare a fibrelor textile. Absența coloranților în efluenți arată eficiența stației de tratare a apelor uzate.
7. Dezvoltarea unei proceduri SPE-LC/ESI(-)-MS/MS pentru analiza în urme a coloranților textili azoici, complecși ai cromului (Nylosan Dark Brown, Lanasyn Dark Brown și Lanasyn Red) din diferite probe de apă reziduală (influent și efluent) utilizând SPE și sistemul 3200 QTRAP LC/ESI(-)-MS/MS cu sursă de ionizare Turbo V și ionizare în modul negativ prin electropulverizare.
- Metoda SPE elaborată pentru extracția acestor trei coloranți complecși ai cromului din probe de apă reziduală este eficientă și reproductibilă, cartușul optim fiind Strata C18-E.
 - În cadrul validării procedurii SPE-LC/ESI(-)-MS/MS au fost obținute rezultate bune privind acuratețea, precizia, liniaritatea și limita de detecție (12,0 ng mL⁻¹ Nylosan Dark Brown; 15,5 ng mL⁻¹ Lanasyn Dark Brown și 0,94 ng mL⁻¹ Lanasyn Red).
 - Prezența acestor coloranți la nivel de ng L⁻¹ în probe de apă reziduală prelevate din influenții și efluenții unei stații de tratare indică necesitatea îndepărtării mai eficiente a acestor coloranți din apele reziduale provenite din fabrici textile.
8. Realizarea unui studiu privind efectele ecotoxicologice ale coloranților textili investigați asupra diferitelor performanțe din plante: fotosinteza frunzei, pigmentii asimilatori, unii metaboliți secundari volatili (emisii de produși de oxigenare sub acțiunea lipoxigenazei și emisii de monoterpene) și unii metaboliți secundari nevolatili (flavonoide) asupra plantelor de grâu (*Triticum aestivum* L.).
- Efectele coloranților textili asupra vitezei de asimilație a CO₂ au fost de cca. 10-15%, fiind mai accentuate pentru coloranții care conțin în structura lor crom.
 - Schimbările în conductanța stomatală de vaporizare a apei au fost de ansamblu, dar cu o posibilă inhibare a reacțiilor enzimatică la lumină, în special pentru coloranții azoici.

- Compușii organici volatili, în special LOX-urile și monoterpenele emise de frunzele verzi ale plantelor de grâu, au fost indicatorii cei mai sensibili la poluarea plantelor cu coloranți textili.
- Conținutul de pigmenți asimilatori, clorofile și carotenoizi, a scăzut puternic la tratamentele cu coloranți azoici, în special în cazul coloranților azoici care conțin în structura lor crom.
- Reducerea conținutului de carotenoizi, în special de zeaxantină, sugerează în general că planta a fost supusă unui stres cronic, ceea ce s-a întâmplat și în acest studiu prin stresul indus plantelor ca urmare a tratării cu coloranții textili. Conținutul redus de carotenoizi poate fi parțial responsabil pentru viteza de asimilație netă, înregistrată în studiul nostru.
- În cazul conținutului total de flavonoide, rezultatele obținute demonstrează că scăderea acestora poate fi asociată cu rolul defensiv al flavonoidelor în condiții de stres.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ali S., Zeng F., Qiu L., Zhang G., **2011**. The effect of chromium and aluminum on growth, root morphology, photosynthetic parameters and transpiration of the two barley cultivars. *Biologia Plantarum* 55, 291-296.
2. Antoni R., Rodriguez L., Gonzalez-Guzman M., Pizzio G.A., Rodriguez P.L., **2011**. News on ABA transport, protein degradation, and ABFs/WRKYs in ABA signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 547-553.
3. Beauchamp J., Wisthaler A., Hansel A., Kleist E., Miebach M., Niinemets Ü., Schurr U., Wildt J., **2005**. Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: relationships between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant, Cell and Environment* 28, 1334-1343.
4. Bercea V., **2008**. Fotosinteza. Fotoreglare și fotoprotecție. Editura Todescu, Cluj-Napoca, p. 35-44.
5. Chatterjee J., Chatterjee C., **2000**. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution* 109, 69-74.
6. **Copaciu F.**, Coman V., Vlassa M., Opreș O., **2012a**. Determination of some textile dyes in wastewater by solid phase extraction followed by high performance thin layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, accepted No. 1550.
7. **Copaciu F.**, Coman V., Simedru D., Beldean-Galea S., Opreș O., Ristoiu D., **2012b**. Determination of two textile dyes in wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, ID: 695312 DOI:10.1080/10826076.2012.695312.
8. Copolovici L., Kännaste A., Niinemets Ü., **2009**. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of monoterpene and sesquiterpene emissions from stressed plants. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Seria Chimia* 54, 329-339.
9. Copolovici L., Kännaste A., Pazouki L., Niinemets Ü., **2012**. Emissions of green leaf volatiles and terpenoids from *Solanum lycopersicum* are quantitatively related to the severity of cold and heat shock treatments. *Journal of Plant Physiology* 169, 664-672.
10. Demmig-Adams B., Adams W.W.III. **2006**. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation: Tansley review. *The New Phytologist* 172, 11-21.
11. Dey S.K., Jena P.P., Kundu S., **2009**. Antioxidative efficiency of *Triticum aestivum* L. exposed to chromium stress. *Journal of Environmental Biology* 30, 539-544.
12. Di Ferdinando M., Brunetti C., Fini A., Tattini M., **2012**. Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses, in: Ahmad P., Prasad M.N.V. (Eds.), *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. Springer, New York, p. 159–179.
13. Diwan H., Ahmad A., Lqbal M., **2012**. Chromium-induced alterations in photosynthesis and associated attributes in Indian mustard. *Journal of Environmental Biology* 33, 239-244.
14. Dobrotă C., **2010**. Fiziologia Plantelor. Vol. I, Editura Risoprint Cluj-Napoca, p. 57-61, 208-220.
15. Eckert M., Biela A., Siefritz F., Kaldenhoff R., **1999**. New aspects of plant aquaporin regulation and specificity. *Journal of Experimental Botany* 50, 1541-1545.

16. Epolito W.J., Lee Y.H., Bottomley L.A., Pavlostathis S.G., **2005**. Characterization of the textile anthraquinone dye Reactive Blue 4. *Dyes and Pigments* 67, 35-46.
17. Eremektar G., Selcuk H., Meric S., **2007**. Investigation of the relation between COD fractions and the toxicity in a textile finishing industry wastewater: Effect of preozonation. *Desalination* 211, 314-320.
18. Farmacopeea Română. **1993**. Editura Medicală, Ediția a X-a, București.
19. Feussner I., Wasternack C., **2002**. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53, 275-297.
20. Garg V.K., Kaushik P., **2006**. Influence of short-term irrigation of textile mill wastewater on the growth of chickpea cultivars. *Chemistry and Ecology* 22, 193-200.
21. Gumustas M., Ozkan S.A., **2011**. The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal* 5, 1-21.
22. Kesselmeier J., Staudt M., **1999**. Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry* 33, 23-88.
23. Kholodova V., Volkov K., Abdeyeva A., Kuznetsov V., **2011**. Water status in *Mesembryanthemum crystallinum* under heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany* 71, 382-389.
24. Kmellar B., Fodor P., Pareja L., Ferrer C., Martinez-Uroz M.A., Valverde A., Fernandez-Alba A.R., **2008**. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1215, 37-50.
25. Lee Y.H., Pavlostathis S.G., **2004**. Decolorization and toxicity of reactive anthraquinone textile dyes under methanogenic conditions. *Water Research* 38, 1838-1852.
26. Lichtenthaler H.K., **1999**. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 47-65.
27. Lopez-Luna J., Gonzalez-Chavez M.C., Esparza-Garcia F.J., Rodriguez-Vazquez R., **2009**. Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium and hexavalent chromium, using wheat, oat and sorghum plants. *Journal of Hazardous Materials* 163, 829-834.
28. Loreto F., Barta C., Brillì F., Nogues I., **2006**. On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature. *Plant Cell and Environment* 29, 1820-1828.
29. Loreto F., Schnitzler J.-P., **2010**. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends in Plant Science* 15, 154-166.
30. Mehta B.H., Morge S.B., **2008**. HPTLC-densitometric analysis of candesartan cilexetil and hydrochlorothiazide. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC* 21, 173-176.
31. Mittler R., **2006**. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11, 15-19.
32. Młodzińska E., **2009**. Survey of plant pigments: molecular and environmental determinants of plant colors. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51, 7-16.
33. Mohammad M.A.-A., Zawilla N.H., **2009**. Thin layer and column-chromatographic methods for simultaneous analysis of ambroxol hydrochloride and doxycycline hyclate in a binary mixture. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC* 22, 201-206.

34. Munne-Bosch S., Alegre L., **2000**. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210, 925-931.
35. Nagegowda D.A., **2010**. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters* 584, 2965-2973.
36. Nayak P.S., Upadhyaya S.D., Upadhyaya A., **2009**. HPTLC method for analysis of Winhaferin-A in Ashwagandha (*Withania somnifera*). *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC* 22, 197-200.
37. Niinemets Ü., Bilger W., Kull O., Tenhunen J.D., **1998**. Acclimation to high irradiance in temperate deciduous trees in the field: changes in xanthophyll cycle pool size and in photosynthetic capacity along a canopy light gradient. *Plant, Cell and Environment* 21, 1205-1218.
38. Niinemets Ü., Copolovici L., Hüve K., **2010**. High within-canopy variation in isoprene emission potentials in temperate trees: Implications for predicting canopy-scale isoprene fluxes. *Journal of Geophysical Research* 115, G04029, doi:10.1029/2010JG001436.
39. Niinemets Ü., Kuhn U., Harley P.C., Staudt M., Arneth A., Cescatti A., Ciccioli P., Copolovici L., Geron C., Guenther A.B., Kesselmeier J., Lerdau M.T., Monson R.K., Peñuelas J., **2011**. Estimations of isoprenoid emission capacity from enclosure studies: measurements, data processing, quality and standardized measurement protocols. *Biogeosciences* 8, 2209-2246.
40. Opriş O., **Copaciu F.**, Coman V., Ristoiu D., **2011**. UV-Vis study regarding the influence of two potential environmental pollutants on the total flavonoid content in *Triticum aestivum* L. and *Secale cereale* L. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Seria Chimia* LVI 4, 17-25.
41. Permyakova M.D., Permyakov A.V., Osipova S.V., Pshenichnikova T.A., **2012**. Lipoxygenase from the leaves of wheat grown under different water supply conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology* 48, 77-82.
42. Petry R.D., Ortega G.G., Silva W.B., **2001**. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride-flavonoid complex. *Pharmazie* 56, 465-470.
43. Poole C.F., Gunatilleka A.D., Sethuraman R., **2000**. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 885, 17-39.
44. Prevot A.B., Fabbri D., Pramauro E., Baiocchi C., Medana C., **2008**. High-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of intermediates produced in the initial steps of the photocatalytic degradation of sulfonated azo dyes. *Journal of Chromatography A* 1202, 145-154.
45. Rafaëly L., Héron S., Nowik W., Tchaplá A., **2008**. Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes. *Dyes and Pigments* 77, 191-203.
46. Rezanejad F., **2012**. Air pollution effects on flavonoids in pollen grains of some ornamental plants. *Turkish Journal of Botany* 36, 49-54
47. Rodriguez E., Santos C., Azevedo R., Moutinho-Pereira J., Correia C., Dias M.C., **2012**. Chromium (VI) induces toxicity at different photosynthetic levels in pea. *Plant Physiology and Biochemistry* 53, 94-100.
48. Samanta A., Das G., Das S.K., **2011**. Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology* 6, 12-35.

49. Shanker A.K., Cervantes C., H. Loza-Tavera H., Avudainayagam S., **2005**. Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31, 739-753.
50. Shanker A.K., Djanaguiraman M., Venkateswarlu B., **2009**. Chromium interactions in plants: current status and future strategies. *Metallomics* 1, 375-383.
51. Soran M.L., Opriş. O., **Copaciu F.**, Varodi C., **2012**. Determination of flavonoids in *Triticum aestivum* L. treated with ampicillin, in: Lazar, M.D. (Ed.), *Proceeding of Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2011)*. American Institute of Physics, AIP Conf. Proc., Melville, New York, 1425, p. 47-49.
52. Subrahmanyam D., **2008**. Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica* 46, 339-345.
53. Sur R., Dunemann L., **2004**. Method for the determination of five toxicologically relevant arsenic species in human urine by liquid chromatography–hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Chromatography B* 807, 169-176.
54. Şahin S., Demir C., Güçer Ş., **2007**. Simultaneous UV-Vis spectrophotometric determination of disperse dyes in textile wastewater by partial least squares and principal component regression. *Dyes and Pigments* 73, 368-376.
55. Umbuzeiro G.A., Freeman H.S. Warren S.H., Oliveira D.P., Terao Y., Watanabe T., Claxton L.D., **2005**. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere* 60, 55-64.
56. Vernay P., Gauthier-Moussard C., Hitmi A., **2007**. Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere* 68, 1563-1575.
57. von Caemmerer S., Farquhar G.D., **1981**. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376-387.
58. www.phenomenex.com
59. www.textile.clariant.com
60. Yoshioka N., Ichihashi K., **2008**. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. *Talanta* 74, 1408-1413.
61. Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak D.F., **1974**. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14, 415-421.
62. Zengin F.K., Munzuroglu O., **2005**. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47, 157-164.

ANEXA I

LISTA ABREVIERILOR

LR	L anasyn R ed
NR	N ylosan R ed
NDB	N ylosan D ark B rown
LDB	L anasyn D ark B rown
OB	O ptilan B lue
LB	L anasyn B lue
UV-Vis	U ltra V iolet- V isibil
IR	I nfra R ed; I nfraroșu
LLE	L iquid L iquid E xtraction; E xtracția lichid-lichid
SPE	S olid P hase E xtraction; E xtracția pe fază solidă
TLC	T hin L ayer C hromatography; C romatografia pe strat subțire
HPTLC	H igh P erformance T hin L ayer C hromatography C romatografia de înaltă performanță pe strat subțire
SPE-HPTLC	S olid P hase E xtraction and H igh P erformance T hin L ayer C hromatography; E xtracția pe fază solidă urmată de cromatografia pe strat subțire de înaltă performanță
HPLC	H igh P erformance L iquid C hromatography; C romatografia de lichide de înaltă performanță
DAD	D iode A rray D etection; D etector cu șir de diode
ESI	E lectro S pray I onization; I onizare prin electropulverizare
MS	M ass S pectrometry; S pectrometria de masă
SPE-LC/ESI(-)-MS/MS	S olid P hase E xtraction and L iquid C hromatography E lectro S pray I onization tandem M ass S pectrometry; E xtracția pe fază solidă urmată de cromatografia de lichide cuplată cu spectrometrul de masă cu ionizare prin electropulverizare

CCO	Consumul Chimic de Oxigen
CBO	Consumul Biochimic de Oxigen
TSS	Totalul de Materii Solide în Suspensie
TN	Total Nitrogen; Totalul de Azot
TP	Total Phosphorus; Totalul de Fosfor
Strata NH₂	Cartușe cu umplutură de silicagel modificat amino
Strata SAX	Cartușe cu umplutură de silicagel și ligand amino cuaternar
Strata C18-U	Cartușe cu umplutură de silicagel C18-U cu grupări silanol libere
Strata C18-E	Cartușe cu umplutură de silicagel C18-E cu grupări silanol legate hidrofobice
SD	Standard Deviation; Deviația standard
RSD	Relative Standard Deviation; Deviația standard relativă
LOD	Limit Of Detection; Limita de detecție
LOQ	Limit Of Quantification; Limita de cuantificare
MRM	Multiple Reaction Monitoring; Monitorizarea reacțiilor multiple
FIA	Flow Injection Analysis
g_s	Stomatal Conductance to Water Vapour; Conductanța stomatală de vaporizare a apei (deschiderea stomatei)
A	Net Assimilation Rate; Rata de asimilație a CO ₂
VOC	Volatile Organic Compounds, Compuși organici volatili
LOX	Lipoxygenase Pathway Products; Produși de oxigenare sub acțiunea lipoxigenazei

ANEXA II

LISTA PUBLICAȚILOR ȘTIINȚIFICE ISI ELABORATE PÂNĂ ÎN PREZENT ȘI INCLUSE TEMATICII TEZEI DE DOCTORAT

1. **Florina Copaciu**, Virginia Coman*, Dorina Simedru, Simion Beldean-Galea, Ocsana Opreș, Dumitru Ristoiu, Determination of two textile dyes in wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, DOI:10.1080/10826076.2012.695312, sub tipar. (*Factor de impact 0,706 / 2011*)
2. **Florina Copaciu**, Virginia Coman*, Mihaela Vlassa, Ocsana Opreș, Determination of some textile dyes in wastewater by solid phase extraction followed by high performance thin layer chromatography, *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, DOI: 10.1556/JPC.25.212.6.0, sub tipar. (*Factor de impact 0,767 / 2011*)
3. Ocsana Opreș, **Florina Copaciu***, Virginia Coman, Dumitru Ristoiu, UV-VIS Study regarding the influence of two potential environmental pollutants on the total flavonoid content in *Triticum aestivum* L. and *Secale cereale* L., *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia*, Volum 56 (4) 2011, 17-25. (*Factor de impact 0,129 / 2011*)
4. Loredana Soran, Ocsana Opreș, **Florina Copaciu**, Codruța Varodi, **2012**. Determination of flavonoids in *Triticum aestivum* L. treated with ampicillin, in: Lazar, M.D. (Ed.), Proceedings of Conference Processes in Isotopes and Molecules (PIM 2011). American Institute of Physics, AIP Conf. Proc., Melville, New York, 1425, p. 47-49.
5. **Florina Copaciu**, Ocsana Opreș, Virginia Coman, Dumitru Ristoiu, Ülo Niinemets, Lucian Copolovici*, Diffuse pollution by anthraquinone and azo dyes in environment importantly alters foliage volatiles, carotenoids and physiology in wheat (*Triticum aestivum*), *Water, Air, & Soil Pollution*, lucrare trimisă spre publicare. (*Factor de impact 1,625 / 2011*)
6. **Florina Copaciu**, Carmen Andreea Roba*, Ocsana Opreș, Vioara Mireșan, Physicochemical analysis of effluents generated by local industries from Cluj county - Romania and their possible impact on the surface water quality, *Water and Environment Journal*, lucrare trimisă spre publicare. (*Factor de impact 0,792 / 2011*)