



**FACULTATEA DE CHIMIE SI INGINERIE  
CHIMICA  
UNIVERSITATEA BABES-BOLYAI  
SCOALA DOCTORALA CHIMIE**



**TEZA DE DOCTORAT**

**EVALUAREA COMPORTAMENTULUI COMPUSILOR  
ORGANICI IN SISTEME VII PRIN MODELARE  
EXPERIMENTALA SI NUMERICA**

**COORDONATOR STIINTIFIC:  
Prof. Dr. Luminita SILAGHI-DUMITRESCU**

**STUDENT DOCTORAND:  
Ing. Eموke-Dalma KOVACS**

**Cluj-Napoca  
2022**

# Cuprins teza

<b>Content</b>	i
<b>Abbreviation list</b>	v
<b>PART I. Background</b>	
<b>Introduction</b>	1
<b>Chapter 1. Literature review</b>	7
<b>1.1. Pharmaceuticals in environment: NSAIDs case studies</b>	7
<b>1.2. Source and ways of entries of NSAIDs into environment</b>	12
<i>1.2.1. Wastewater treatment plants end products: effluent</i>	13
<i>1.2.2. Wastewater treatment plants end products: sludge</i>	15
<i>1.2.3. Organic manure</i>	17
<b>1.3. Challenges on assessment of NSAIDs fate in environment</b>	18
<i>1.3.1. Processes that define NSAIDs pathway in environment</i>	18
<i>1.3.2. Factors affecting NSAIDs parent compound pathway in environment</i>	20
<i>1.3.3. Outline of NSAIDs path and transformation in environment</i>	22
<i>1.3.4. Parameters that define persistence of NSAIDs in environment</i>	25
<i>1.3.5. Transformation products formation potential and pathway in environment</i>	26
<i>1.3.6. Challenges in NSAIDs and related transformation products (TPs) analysis</i>	28
<b>1.4. Plants exposure to NSAIDs</b>	30
<i>1.4.1. Representative exposure routes</i>	30
<i>1.4.2. NSAIDs metabolites formation potential in plants</i>	32
<b>1.5. Ecotoxicological issues and challenges of NSAIDs</b>	33
<i>1.5.1. Way of action of NSAIDs in targeted organism</i>	33
<i>1.5.2. Indirect exposure ways to NSAIDs – the food web chain concept</i>	34
<i>1.5.3. Exposure to single compound and mixture compounds</i>	36
<i>1.5.4. Ecotoxicological effects on non-targeted living organisms</i>	37
<b>1.6. Modelling of NSAIDs pathways in complex systems</b>	40
<i>1.6.1. Modelling in complex environmental compartments</i>	40
<i>1.6.2. Modelling in complex living systems</i>	47
<b>PART II. Personal contribution</b>	
<b>Chapter 2. Experimental concept description</b>	54
<b>2.1. NSAIDs selection for study</b>	54

2.2.	Living system selection as plant model for study	56
2.3.	Exposure scenario proposed for model plant	57
2.4.	Modelling concept planned for NSAIDs pathway assessment in complex systems	59
2.5.	Challenges proposed to be solved	61
2.6.	Thesis objectives	62
<b>Chapter 3. NSAIDs (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) pathway assessment in water system</b>		64
3.1.	Experimental set-up and description	64
3.1.1.	NSAIDs biodegradation experiment in surface water	64
3.1.2.	NSAIDs sorption experiment into surface water sediment	66
3.1.3.	NSAIDs abiotic attenuation experiment in surface water	67
3.2.	Analytical approach applied for NSAIDs analysis from water samples	68
3.2.1.	NSAIDs extraction and clean-up from water samples	68
3.2.2.	NSAIDs extraction and clean-up from sediment samples	69
3.2.3.	Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of NSAIDs	71
3.2.4.	Matrix matched calibration and method validation	74
3.3.	Complementary analysis applied for NSAIDs pathways assessment in water environment	76
3.3.1.	Surface water and sediment microbiota phospholipid derived fatty acids (PLFA) extraction and clean-up	76
3.3.2.	Microbiota phenotypic profile assessment through gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID)	77
3.3.3.	Sediment organic matter assessment	79
3.4.	Results on factors contributing to NSAIDs pathway in surface water environment	79
3.4.1.	Abiotic processes influence on NSAIDs fate and persistence	79
3.4.2.	Sorption processes influence on NSAIDs fate and persistence	90
3.4.3.	Biodegradation processes influence on NSAIDs fate and persistence	97
3.5.	NSAIDs path modelling in surface water	108
3.5.1.	Structural Equation Model involving Partial Least Squares Path Modelling (SEM-PLS-PM)	108
3.5.2.	Assumed hypothesis, variables and data entries	110
3.5.3.	Path diagram for NSAIDs fate in surface water	112
3.5.4.	Proposed model veracity test: quality index evaluation	120

3.6.	Conclusions	122
<b>Chapter 4. NSAIDs (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) pathway assessment in soil system</b>		124
4.1.	Experimental set-up and description	124
4.1.1.	Soil material origin and characteristics description	124
4.1.2.	Artificial contamination experiments specification	125
4.1.3.	Experimental conditions for pot and column experiment	125
4.1.4.	Time series of sampling and monitoring parameters	127
4.2.	Analytical approach applied for NSAIDs analysis from soil samples	127
4.2.1.	NSAIDs extraction and clean-up from soil samples	127
4.2.2.	Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of NSAIDs	128
4.2.3.	Matrix matched calibration and method validation	130
4.2.4.	Gas chromatographic-mass spectrometric identification of NSAIDs related transformation products (TPs)	131
4.2.5.	Quantification of NSAIDs related TPs	132
4.2.6.	Complementary analysis applied for NSAIDs pathways assessment in soil environment	132
4.3.	Results on factors contributing to NSAIDs pathway in soil environment	133
4.3.1.	NSAIDs pathway in soil pot experiment	133
4.3.2.	NSAIDs pathway in soil column experiment	142
4.3.3.	Identified NSAIDs related TPs formation potential through assay	146
4.4.	NSAIDs path modelling in soil environment	161
4.4.1.	Reaction and mass balance equation proposal for NSAIDs and related TPs formation	161
4.4.2.	Soil column surface geometry and boundary conditions	166
4.4.3.	Data entry, model implementation and validation	168
4.5.	Conclusions	181
<b>Chapter 5. NSAIDs (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) pathway assessment in <i>Lycopersicon esculentum</i></b>		183
5.1.	Experimental set-up description	183
5.1.1.	Description of <i>Lycopersicon esculentum</i> growth in laboratory	183
5.1.2.	<i>Lycopersicon esculentum</i> artificial exposure to NSAIDs	184

5.1.3.	<i>Lycopersicon esculentum</i> plant material sampling and division into representative anatomical compartments	185
5.2.	Analytical approach applied for NSAIDs and related TPs analysis from <i>Lycopersicon esculentum</i>	187
5.2.1.	NSAIDs and related TPs gas chromatographic-mass spectrometric analysis from <i>Lycopersicon esculentum</i>	187
5.2.2	Complementary gas chromatographic approaches used for <i>Lycopersicon esculentum</i> fruit quality assessment	189
5.3.	Results of NSAIDs pathway in <i>Lycopersicon esculentum</i> after multi-route exposure	196
5.3.1.	Exposure rout influence on NSAIDs uptake by <i>Lycopersicon esculentum</i>	197
5.3.2.	Exposure rout influence on NSAIDs and related TPs translocation by <i>Lycopersicon esculentum</i> representative anatomical compartments	200
5.3.3.	NSAIDs impact on <i>Lycopersicon esculentum</i> fruit quality	203
5.4.	Modelling NSAIDs bioconcentration into <i>Lycopersicon esculentum</i> fruit considering their growth dynamics	207
5.4.1.	NSAIDs modelling framework in <i>Lycopersicon esculentum</i> fruit	207
5.4.2.	Diffusion mass of NSAIDs active ingredients in <i>Lycopersicon esculentum</i> fruit	210
5.4.3.	NSAIDs diffusion through <i>Lycopersicon esculentum</i> fruit dynamic boundary	212
5.4.4.	NSAIDs active ingredients uptake by <i>Lycopersicon esculentum</i> fruit	213
5.4.5.	Simulated NSAIDs bioconcentration factor	215
5.5.	Conclusions	216
	<b>Chapter 6. General conclusions</b>	218
6.1.	General and overall findings	218
6.2.	Recommendations for relevant entities and opportunities for further research	220
	<b>References</b>	222

## Cuprins abstract

	Cuprins	
<b>Capitolul 1.</b>	Introducere	8
<b>Capitolul 2.</b>	Descrierea conceptului experimental	11
	2.1. Scenariul de expunere propus pentru planta model	11
	2.2. Conceptul de modelare propus pentru evaluarea comportamentului NSAIDs in sisteme complexe	13
<b>Capitolul 3.</b>	Evaluarea comportarii NSAIDs-urilor (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) in matricea de apa	16
	3.1. Modelarea comportamentului NSAIDs in matricea de apa de suprafata	16
	3.2. Modelul cu ecuatii structurale (SEM) combinat cu modelul corelarii partiale prin metoda celor mai mici patrate (PLS-PM)	
	3.3. Diagramele SEM-PLS-PM obtinute pentru comportamentul NSAIDs in apa de suprafata	21
<b>Capitolul 4.</b>	Evaluarea comportamentului NSAIDs (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) in matricea de sol	28
	4.1. Potentialul de formare al produsii de transformare ai NSAIDs	28
	4.2. Modelarea comportamentului NSAIDs in sol	40
<b>Capitolul 5.</b>	Comportamentul NSAIDs (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) in <i>Lycopersicon esculentum</i>	47
	5.1. Impactul NSAIDs-urilor asupra calitatii fructului <i>Lycopersicon esculentum</i>	47
	5.2. Modelarea factorului de bioconcentrare al NSAIDs in fructul <i>Lycopersicon esculentum</i> considerand dinamica lor de crestere fruit	51
<b>Capitolul 6.</b>	Concluzii generale	55
	Referinte bibliografice (selectie)	57

## Cuvinte cheie

nsaid, lycopersicon esculentum, comportament, produse de transformare, atenuare, difuzie, sem-  
pls-pm, frontiera mobil

## Capitol 1. Introducere

Deși industria farmaceutică s-a dezvoltat continuu și progresiv începând cu ultimul deceniu al secolului al XIX-lea, includerea acesteia ca preocupare pentru mediu este destul de recentă – abia la începutul anului 2000 [4]. Până în acea perioadă, luarea în considerare a acestei ramuri de industrie ca o potențială problemă față de mediul înconjurător era atribuită ca fiind ne semnificativă. Se considera că singurul potențial de poluare a mediului ar putea proveni exclusiv din instalațiile de producție [5]. Acestea au fost estimate a fi relativ mici și cu emisii controlate, iar probabilitatea unei scurgeri accidentale a fost apreciată a fi redusă. Preocupările legate de aceste substanțe chimice au apărut în 1994, când prezenta acidului clofibrat a fost identificată de Stan et al., [6] în apele de suprafață din Germania. După aceea, o dată din cauza interesului acordat acestui subiect și în al doilea rând datorită dezvoltărilor înregistrate în tehnologiile instrumentelor analitice, compușii activi farmaceutici au început să fie raportați în mai multe matrici de mediu (ape de suprafață, apă subterană, sedimente, sol etc.) în întreaga lume [7-13]. Acum, compușii activi farmaceutici aparținând analgezicilor, antifungicilor, antiacidelor, antibioticilor, medicamentelor anticancerigene, anticonvulsivante, antidepresive, medicamente antidiabetice, antihelmintice, antihistaminice, medicamente antihipertensive, antiinflamatoare, antipsihotice,  $\beta$ -blocante, substanțe de contrast, substanțe contraceptive antivirale, diuretice, medicamente psihiatrice, antialergice, stimulente, bronhodilatatoare și alte medicamente sunt detectate pe scară largă în diferite matrici de mediu la nivel global [7; 9; 12; 14-21].

Odată cu răspândirea rapoartelor despre prezenta produselor farmaceutice în mediul înconjurător, acestea au devenit o problemă globală cu factor de îngrijorare tot mai mare. Preocupările au devenit justificate deoarece studiile au arătat că prezenta produselor farmaceutice în mediu poate fi persistentă și pseudo-persistentă [22-26] cu un potențial semnificativ de bioacumulare în organismele vii de la diferite nivele trofice [27-31]. Compușii activi farmaceutici pot pătrunde în mediul înconjurător pe cai directe și indirecte. Excreția metabolică și activitățile industriale sunt considerate ca fiind cai directe, în timp ce eliminarea necorespunzătoare și tratarea apelor uzate sunt considerate a fi caile indirecte reprezentative.

Intrucât multe produse farmaceutice sunt metabolizate parțial de organismele consumatoare iar stațiile de epurare a apelor uzate nu au în totalitate capacitatea de a elimina aceste produse, provocând eliberarea lor în mediu atât sub formă nemodificată din punct de vedere



chimic, cat si sub forma transformata, au fost ridicate numeroase intrebari legate de aparitia potentialelor efecte negative asupra mediului, biotei si nu in ultimul rand asupra oricarui organism viu conex mediului sau biotei contaminate.

*Medicamentele anti-inflamatoare nesteroidiene (NSAIDs)* sunt cunoscute ca avand cea mai mare rata de consum la nivel mondial datorita spectrului lor larg de aplicatii clinice. Astazi, NSAIDs sunt considerate ca a doua clasa de medicamente cu consum ridicat dupa antibiotice [3]. Acestea sunt medicamente fara prescriptie medicala disponibile in intreaga lume, utilizate in principal pentru proprietatile lor antipiretice (amelioreaza febra), antiinflamatoare (reduce inflamatia) si analgezice (amelioreaza durerea).

Produsele farmaceutice, ca NSAIDs, ajung in sol si in mediul acvatic prin multiple cai de unde pe urma pot fi redistribuite prin diferite compartimente de mediu. Unul dintre motive care cauzeaza acest lucru este ca tehnologiile actuale ale statiilor de epurare au esuat in eliminarea completa. Produsele rezultate din statiile de tratare al apelor menajere (efluenti si namol) ajung atat in mediul acvatic, cat si in cel terestru. Utilizarea continua a acestor produse farmaceutice si indepartarea lor necorespunzatoare asigura un aflux continuu al acestora in mediul inconjurator. In prezent, progresele tehnologiilor analitice au facut posibila detectarea si cuantificarea NSAIDs-urilor precum diclofenac, ibuprofen si ketoprofen in probe de mediu si probe biologice. Compusii activi al NSAIDs-urilor pot fi mobili sau persistenti in diferite compartimente de mediu si receptori ecologici chiar si la niveluri de ppb. Cu toate acestea, inca lipsesc date relevante despre comportamentul lor in mediu, precum si despre potentiala amenintare adusa la adresa sanatatii organismelor vii netinta. Mai mult, semnificatia ecotoxicologica a produsilor de transformare (TP) conexe NSAIDs-urilor este in mare parte necunoscuta in prezent. Astfel de date sunt necesare in mod imperativ pentru a stimula cercetarea si dezvoltarea de noi tehnologii de tratare eficiente, care sa raspunda provocarilor ridicate de prezenta produselor farmaceutice. Astfel, abordarea subiectului formarii produsilor de transformare, comportamentului in mediul inconjurator, potentialul de bioacumulare in organisme nevizate este importanta, deoarece experienta noastra anterioara cu alti contaminanti chimici organici a demonstrat ca produsii de transformare pot avea adesea efecte adverse si un impact mai accentuat asupra organismelor si mediului comparative cu compusii de baza (parinte) corespunzatori. In cazul NSAIDs, recent au inceput sa fie publicate studii toxicologice privind efectele adverse asupra organismelor vii ale produsilor de transformare

ca hidroxil ibuprofen. Aceste studii au evidentiat efecte citotoxicologice, teratogene si mutagene. Desi alti contaminanti organici, de exemplu, substantele agrochimice, sunt introdusi doar periodic in mediu, NSAIDs-urile care sunt produse farmaceutice populare, utilizate frecvent, fara prescriptie medicala si care la randul lor sunt inefficient indepartate de catre statiile de epurare, sunt introduse continuu in mediul inconjurator. Prin urmare devine evidenta si ingrijoratoare incidenta expunerii nedorite la NSAIDs a organismelor vii nevizate.

Potentialul impact al schimbarilor climatice asupra comportamentului contaminantilor organici din mediu a atins un interes tot mai mare pe masura ce frecventa si amplitudinea evenimentelor extreme (valuri de caldura, inundatii, seceta, etc.) devin mai pronuntate in intreaga lume. Impactul anomalilor meteorologice asupra compusilor activi al NSAIDs-urilor lipseste in prezent, desi exista un numar tot mai mare de studii care se ocupa cu evaluarea cantitativa al impactului acestora asupra contaminantii chimici reglementati. Pe baza literaturii de specialitate disponibila, studiile privind comportamentul NSAIDs in mediu si in special al potentialului lor de formare a produsilor de transformare sunt extrem de putine. Deci, studierea si obtinerea de dovezi cu privire la modul in care procesele chimice si biologice sunt modificate in mediu si modul in care aceste efecte indirecte ale schimbarilor climatice influenteaza comportamentul NSAIDs-urilor sunt necesare pentru a intelege comportamentul lor in mediul inconjurator. In plus este justificata presupunerea ca modificarile componentelor si proprietatilor biotice si abiotice ale mediului, atribuite schimbarilor climatice, pot avea la randul lor un impact asupra modului in care evaluam in prezent riscul de mediu al contaminantilor chimici.

## Capitol 2. Descrierea conceptului experimental

### 2.1. Scenariul de expunere propus pentru planta model

În general, produsele farmaceutice pot ajunge în mediu prin mai multe cai. Deși eliminarea necorespunzătoare sau evacuarea accidentală contribuie la intrarea acestor produse în mediu, această cale este considerată având o contribuție minoră în cazul NSAIDs dacă luăm în considerare prevalența acestora în diferite compartimente de mediu din întreaga lume. Principala cale prin care produsele farmaceutice selectate ajung în mediu este excreția umană și animală care intră în sistemele de canalizare și sistemele de apă uzată [7; 152; 369; 371]. Cantitățile crescute de namol rezultat din stațiile de epurare a apelor uzate și de canalizare prezintă un potențial de reutilizare datorită conținutului lor crescut de materie organică, minerale și alte componente fertilizante benefice [372; 373]. Acestea au făcut din imprăștierea lor pe sol (terenuri agricole, terenuri forestiere etc.) o modalitate adecvată de a le gestiona. De asemenea, deficitul crescut de apă din cauza schimbărilor climatice a făcut ca reutilizarea apelor uzate tratate să devină o soluție pentru irigația terenurilor agricole [374; 375; 376]. O problemă semnificativă legată de tehnologiile actuale ale sistemelor de canalizare și apă uzată este capacitatea redusă a acestora de a elimina noua generație de contaminanți precum produsele farmaceutice [377; 378; 379; 380; 381].

Potrivit acestora, produsele farmaceutice precum NSAIDs pot ajunge în mediul înconjurător prin mai multe moduri. Ca urmare, roșia (*Lycopersicon esculentum*) ar putea intra în contact cu NSAIDs fie prin caile precum sol, apă sau prin combinații ale acestora. În acest studiu au fost luate în considerare fiecare dintre aceste cai de expunere pentru a evalua potențiala lor amplitudine în contaminarea cu NSAIDs a *Lycopersicon esculentum*, în special partea sa comestibilă – fructul de tomate.

Plantele de tomate au fost cultivate într-un mediu controlat al unei camere de schimbări climatice. Camera pentru schimbări climatice (1 m<sup>3</sup>) a fost realizată în laborator și permite controlul ciclului lumina-intuneric, umiditate și temperatură. Pe scurt, rasaduri de roșii (*Lycopersicon esculentum*) au fost plantate în ghivece experimentale cu volum de aproximativ 2 L. Germinarea semintelor de roșii a fost efectuată la 25 °C într-un incubator (LabCompanion, Billerica, MA, SUA). După transferul rasadurilor în ghivecele experimentale, în camera climatică s-au păstrat următoarele condiții pentru dezvoltarea plantelor: 14 ore de lumină, 10 ore de

intuneric; temperatura pe durata luminii (zi) 25 °C si temperatura pe durata noptii 18 °C. Amestecul de lumina care simuleaza lumina naturala a soarelui a fost realizat cu LED Mammoth, care cuprinde o gama neintrerupta de lungimi de unda de la albastru si verde la rosu. Umiditatea solului a fost ajustata la 58 % capacitate de retinere a apei. Pentru a asigura dezvoltarea rosiilor, s-au adaugat 5 g de ingrasamant in fiecare vas conform descrierii date de Kovacs et al., [382].

In primul rand, a fost cuantificata absorbtia diclofenacului, ibuprofenului si ketoprofenului in partea comestibila a rosiilor. In al doilea rand, au fost estimati factorii de translocare ai acestor compusi activi farmaceutici din compartimentul de mediu contaminat la planta, precum si factorii de translocare dintr-un compartiment anatomic in altul al plantei. Si nu in cele din urma, au fost studiatii produsi de transformare al NSAIDs-urilor studiatii. Au fost efectuate studii care au implicat toate etapele de dezvoltare ale tomatei (timp vs. evolutia plantei). Prin urmare, s-au recoltat probe de material vegetal la fiecare dintre cele patru etape majore ale dezvoltarii: *stadiul 1* - vegetativ, *stadiul 2* – inflorire, *stadiul 3* - formarea fructelor si *stadiul 4* – obtinerea fructului matur (recoltare).

Mai mult, pe masura ce compusii activi farmaceutici ajung la unul sau mai multe compartimente de mediu [369], ele sufera mai multe transformari biotice si abiotice. Acestea sunt procese complexe care au ca rezultat formarea de noi substante chimice numite produsi de transformare despre a caror persistenta in mediu sau potentiala biodisponibilitate si toxicitate sunt putine cunostinte in acest moment. Pentru a raspunde la aceste lacune de cunostinte identificate, a fost studiatia comportamentul in mediu (sol si apa) al fiecarui NSAID selectat. In acest caz, nici o planta nu a post prezenta in experiment. Influenta proceselor biotice si abiotice a fost cuantificata prin experimente de laborator in conditii controlate (**Tabelul 6**).

**Table 6.** Evaluarea comportamentului NSAIDs in principalele compartimente de mediu

<b>Matrice de mediu</b>	<b>Process monitorizat</b>	<b>Principalii parametrii studiatii</b>
✓ Sol	✓ Biotic	✓ Cuantificarea ingredientului
✓ Apa	✓ Sorptie	active in timp
	✓ Abiotic	✓ Identificarea GC-MS al
		potentialului mecanism de
		transformare al ingredientului
		activ

Influenta diferitilor parametri fizici, chimici si biologici a fost evaluata ca si variabile experimentale suplimentare pentru o mai buna apreciere al comportamentului diclofenacului, ibuprofenului si ketoprofenului in aceste compartimente de mediu.

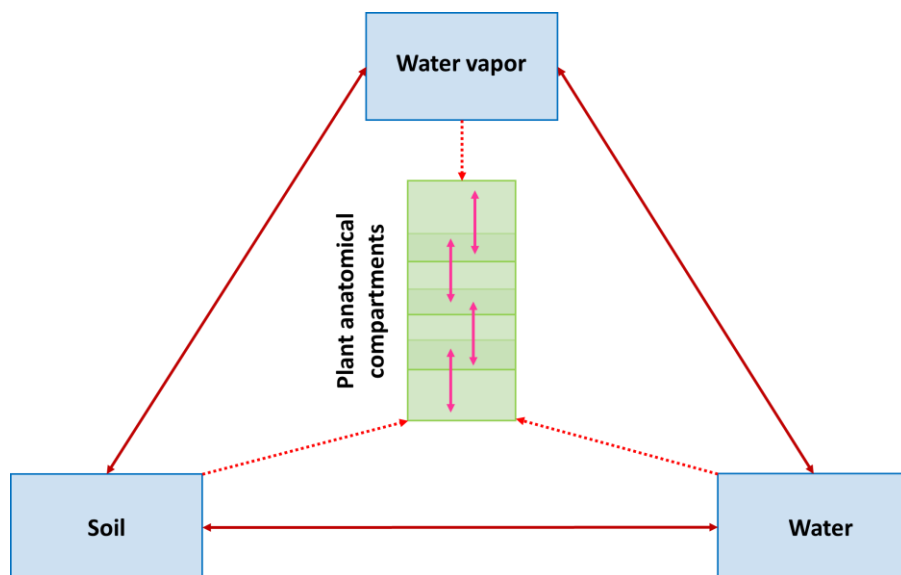
## **2.2. Conceptul de modelare propus pentru evaluarea comportamentului NSAIDs in sisteme complexe**

Intelegerea comportamentului NSAIDs-urilor in mediu este deosebit de importanta in relatiile cu evaluarea potentialului lor impact asupra organismelor vii nedorite (netintite). Este important sa se afle atat concentratiile, cat si potentialul de formare al produsilor de transformare in diferite matrice de mediu si sisteme vii de asemenea. Acesta este de interes, deoarece exista ipoteze bazate pe dovezi anterioare ca contaminantii organici chimici ar putea avea efecte nedorite asupra mediului si a biotei [383].

Pentru a estima corect impactul NSAIDs-urilor asupra unui organism viu, este necesar mai intai sa se cunoasca cat mai exact posibil comportamentul lor in compartimentele individuale ale mediului. Astfel, devine posibila obtinerea de informatii despre timpul petrecut in compartimentul specific de mediu, reactiile in care ar putea fi implicate (descompunere si potentialul de formare a noilor produse – produse de transformare), precum si impactul asupra matricei de mediu. Daca acestea sunt cunoscute, evaluarea impactului contaminantului asupra oricaror organisme vii devine mai realista, deoarece este foarte posibil ca organismele sa fie afectate nu numai de contaminantul initial, ci si de produsii de transformare rezultati.

Pornind de la aceste ipoteze, in aceasta teza, a fost aplicat modul de evaluare inter- si intra-compartimentar al comportamentului NSAIDs-urilor pentru achizitia de date experimentale (vezi **Figura 7**). Aceste date experimentale obtinute au fost folosite in continuare pentru modelul numeric construit, model care permite predictia impactului NSAIDs-urilor asupra unui organism viu – in acest caz asupra *Lycopersicon esculentum*.

Pentru fiecare sistem a fost aplicat un model numeric specific pentru a simula comportamentul NSAID-urilor si nu in cele din urma pentru a estima impactul acestor produse farmaceutice asupra *Lycopersicon esculentum*.



**Figura 7.** Concept schematic de colectare de date experimentale pentru formularea modelului numeric

Modelul cu ecuatii structurale (SEM) a fost aplicata pentru evaluarea comportamentului NSAIDs-urilor in matricea de apa de suprafata, deoarece aceasta matrice de mediu este considerata o potentiala cale importanta prin care *Lycopersicon esculentum* ar putea intra in contact cu NSAIDs-uri. Acest model combinat cu modelul corelarii partiale prin metoda celor mai mici patrate (PLS-PM) a permis testarea cantitativa a modelului teoretic propus pentru comportamenul produselor farmaceutice NSAIDs in apele de suprafata pe baza unui set de variabile experimentale care se presupune ca influenteaza comportamentul acestora in acest sistem de mediu.

In matricea de sol, cinetica de descompunere in functie de timp al compusilor activi NSAIDs si distributia spatiala al acestora si al produsilor de transformare a fost simulat utilizand software-ul COMSOL cu componente din COMSOL Multiphysics si Subsurface Flow Model. Aplicatia propusa de COMSOL pentru transportul poluantilor, construita pe baza ecuatiei lui Richard cuplata cu ecuatie de convective-dispersie a lui Fick a fost adaptat la studiul de caz propus pentru diclofenac, ibuprofen si ketoprofen in diferite conditii simuland anomalile meteorologice cauzate de schimbarile climatice (conditii de seceta si inundatii simulate).

In ambele matrici de mediu, comportamentul NSAIDs-urilor este influentat de variatiile spatiale si temporale non-aleatorii ale componentelor fizice, chimice si biologice ale matricei de mediu in cauza.

In cazul tomatei (*Lycopersicon esculentum*) a fost studiată absorbtia si bioacumularea NSAIDs-urilor din mediu (sol si apa) in diferite compartimente anatomice (radacina, tulpina, frunza, fructe). Pentru distributia dinamica al compusilor activi in fructul de tomato a fost aplicata un model numeric adaptat dupa cel propus de Xiao et al., (2021). Acest model a presupus distributia dinamica (odata cu cresterea si dezvoltarea fructului de tomato) a concentratiei de diclofenac, ibuprofen si ketoprofen in fruct.

In fiecare caz studiat, fie cel al matricilor de mediu, fie cel al plantei (*Lycopersicon esculentum*), datele obtinute prin simulare numerica au fost comparate cu cele experimentale in scopul evaluarii calitatii modelului propus si aplicat.

## **Chapter 3. Evaluarea comportarii NSAIDs-urilor (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) in matricea de apa**

Descompunerea NSAIDs-urilor in apele de suprafata implica procese precum sorbtia, degradarea abiotica si biodegradarea. Cu toate acestea, trebuie accentuat faptul ca aceste procese induc mai degraba o transformare al compusului activ al farmaceuticului decat eliminarea acestuia. Acest lucru ar putea duce la formarea unui numar mare de produse de transformare. Desi exista studii care au demonstrat ca aceste procese au impact asupra anumitor produse farmaceutice, in prezent sunt putine date disponibile pentru comportamentul si degradabilitatea NSAIDs-urilor studiate in apele de suprafata. Mai mult, dupa cunostintele noastre, nimeni nu a cuantificat contributia individuala a acestor procese asupra comportamentului diclofenacului, ibuprofenului si ketoprofenului in matricea de apa de suprafata.

### **3.1. Modelarea comportamentului NSAIDs in matricea de apa de suprafata**

Modificari ale concentratiei NSAIDs in timpul experimentelor au fost observate in toate studiile efectuate, desi amplitudinea variatiilor a fost diferita. Acest lucru ar putea fi motivat prin faptul ca impactul proceselor studiate asupra comportamentului ingredientelor active a diferit. Deoarece evaluarea ingredientelor active ale NSAIDs-urilor prin studii de monitorizare ar putea fi ineficienta din punct de vedere al costurilor si al consumului de timp, identificarea si dezvoltarea unor abordari numerice adecvate care sa permita predictia comportamentului lor devine de interes atat pentru evaluatorii de mediu, cat si pentru autoritatile de reglementare. In prezenta teza, comportamentul ingredientelor active NSAIDs in mediul acvatic a fost formulat numeric pe baza datelor experimentale obtinute in laborator.

### **3.2. Modelul cu ecuatii structurale (SEM) combinat cu modelul corelarii partiale prin metoda celor mai mici patrate (PLS-PM)**

Analiza multivariata a datelor este aplicata in mod obisnuit pentru a testa empiric corespondenta ipotetica dintre variabilele care ar putea influenta comportamentul compusilor organici in apa. Abordarile frecvente sunt regresia multipla, regresia logistica sau analiza variantei. Cu toate acestea, de-a lungul timpului, aceste abordari au demonstrat numeroase limitari. Unele dintre acestea sunt (i.) presupunerea unei structuri simple a modelului cu un set de variabile dependente



si independente; (ii.) luarea in considerare numai a variabilelor observabile, neglijand proprietatile sau attributele abstracte; si (iii.) premisa ca toate datele masurate sunt lipsite de erori.

Pentru a depasi aceste limitari, ar trebui aplicate metode de analiza multivariata a datelor. Modelarea utilizand ecuatiile structurale (SEM) ar putea fi o abordare adecvata pentru a simula comportamentul ingredientelor active farmaceutice in mediul acvatic. Aceasta abordare este potrivita pentru estimarea unei retele de relatii cauzale a proceselor abiotice, de sorbtie si biotice definite conform unui model teoretic legat de mai multe concepte complexe latente, cum ar fi in cazul compusilor activi farmaceutici potentiala atenuare datorata fotolizei, sorbtiei in sedimentele din apa sau biodegradarii efectuate de bacterii si comunitati fungice – numite variabile latente (LV), masurate printr-un numar de indicatori observabili (echivalent proprietati fizico-chimice legate de apa, caracteristici microbiologice si variatia concentratiei compusului activ farmaceutic) – numite variabile manifeste (MV).

Astfel abordarea SEM reprezinta un punct de legatura intre analiza traseului (PA) si analiza factorilor de confirmare (CFA). In plus, metoda SEM cuplata cu cea a celor mai mici patrate partiale (PLS) denumita si modelarea caili PLS (PLS-PM) a fost utilizata in continuare pentru a evalua impactul proceselor reprezentative asupra comportamentului compusilor activi NSAIDs in sistemul de apa, deoarece aceasta abordare este bazata pe o procedura de estimare pe baza de componente comparative cu metoda LISREL care este construita pe covariante. Ca algoritm iterativ, aceasta abordare rezolva problema modelului de masurare si apoi presupune coeficientii de cale in SEM. PLS-PM descrie varianta reziduala a variabilelor latent LV si uneori a variabilelor manifest MV in orice ciclu de regresie a modelului propus. Prin urmare, aceasta abordare este dedicata in principal imbunatatirii predictiilor (varianta explicata) decat estimarilor care ar putea prezenta mai putina acuratete statica.

PLS-SEM este construit prin doua seturi de ecuatii liniare dintre care prima reprezinta modelul structural (modelul interior), iar cea de-a doua reprezinta modelul de masurare (modelul exterior). Modelul structural desemneaza relatia dintre variabilele latent LV in timp ce modelul de masurare exprima relatia dintre variabilele latent LV si variabilele manifest MV corespunzatoare (variabila indicator). Variabilele latent LV care nu sunt dependente sunt numite si variabile exogene ( $\xi$ ). Daca aceste variabile sunt dependente, ele se numesc variabila endogene ( $\eta$ ). Aceste variabile sunt operationale prin variabilele indicator de masurare ( $x, y$ ). Combinatia acestor modele

(model structural si model de masurare) are ca rezultat modelul PLS. Modelul structural pentru variabilele latent LV exogen si variabilele latent LV endogen poate fi exprimat matematic prin (Ec.48.):

$$\eta_j = \gamma_{ji} \cdot \xi_i + \varsigma_j \quad (\text{Eq.48.})$$

unde  $\xi$  si  $\eta$  sunt vectori ai variabilelor latente LV exogen si, respectiv, endogen;  $\text{LV}_i$  explica  $\text{LV}_j$ ;  $\gamma$  reprezinta matricea coeficientilor relatiilor corespunzatoare;  $\xi$  reprezinta reziduurile modelului structural.

In cazul unei relatii intre doua variabile endogene, modelul structural este definit conform cu (Ec.49.):

$$\eta_j = \beta_{ji} \cdot \eta_i + \varsigma_j \quad (\text{Eq.49.})$$

unde  $\eta$  sunt vectorii variabilelor latente LV endogen;  $\text{LV}_i$  explica  $\text{LV}_j$ ;  $\beta$  reprezinta matricea de coeficienti ai relatiilor corespunzatoare;  $\xi$  reprezinta reziduurile modelului structural.

### **Ipoteze asumate, variabile si date de intrare**

*Ipoteza:* Ipoteza principala presupusa a fost ca procesele abiotice, biotice sau de sorbtie influenteaza comportamentul compusilor activi NSAIDs in matricea de apa de suprafata, desi amploarea consecintelor corespunzatoare asupra acestor compusi activi nu este cunoscuta in prezent. Relatiile ipotetice si cele testate intre procesele definite si concentratia compusilor activi NSAIDs studiatii sunt enumerate in **Tabelul 20**:

**Table 20.** Ipotezele primare si secundare corespunzatoare segmentelor SEM-PLS-PM

<b>Ipoteza</b>	<b>Segment</b>	<b>MV (variabile manifest)</b>
Ipoteza primara	Proces abiotic → Atenuare NSAID	pH → Proces abiotic
		Temperatura → Proces abiotic
		Fotoliza → Proces abiotic
		Non-fotoliza → Proces abiotic
	Proces de sorbtie → Atenuare NSAID	pH → Sorption process
		Temperatura → Proces de sorbtie
		Materia organica din sedimente → Proces de sorbtie
		Atenuare → Proces de sorbtie

<b>Ipoteza</b>	<b>Segment</b>	<b>MV (variabile manifest)</b>
	Proces biotic → Atenuare NSAID	Comunitatea totala microbiana → Proces de biodegradare Comunitate bacteriana → Proces de biodegradare Comunitatea fungala → Proces de biodegradare Comunitatea microeucariotelor → Proces de biodegradare Bacteriile aerobe → Proces de biodegradare Bacteriile anaerobe → Proces de biodegradare Bacteriile gram pozitive → Proces de biodegradare Bacteriile gram negative → Proces de biodegradare Bacterii methanotrofe → Proces de biodegradare Atenuare → Proces de biodegradare
<b>Ipoteza secundara</b>	Proces abiotic → Proces biotic	Proces abiotic MV → Proces biotic MV → Atenuare NSAID Proces abiotic MV → Proces biotic MV → Proces de sorbtie MV → Atenuare NSAID
	Proces abiotic → Proces de sorbtie	Proces abiotic MV → Proces de sorbtie MV → Atenuare NSAID
	Proces biotic → Proces de sorbtie	Proces biotic MV → Proces de sorbtie MV → Atenuare NSAID

Variabile si date de intrare: Principalele caracteristici ale MV nestandardizate corespunzatoare compusilor activi NSAIDs studiatii, sunt enumerate in Tabelul 21. Datele experimentale colectate au stat la baza modelului SEM-PLS-PM aplicat compusilor activi NSAIDs ca diclofenac, ibuprofen si ketoprofen.

**Table 21.** Principalele caracteristici ale variabilelor manifest (MV)

<b>NSAID</b>	<b>MV</b>	<b>Mean</b>	<b>Median</b>	<b>Standard deviation</b>	<b>Excess kurtosis</b>	<b>Skewness</b>
<b>Diclofenac</b>	<i>AeroB</i>	3.3	3.6	0.693	-1.643	-0.409
	<i>AnaeroB</i>	2.9	3.3	0.601	-1.906	-0.524
	<i>Bact</i>	32.8	33.2	4.786	-2.052	-0.174
	<i>Bioat</i>	23.2	24.3	7.849	-0.587	-0.631

<b>NSAID</b>	<b>MV</b>	<b>Mean</b>	<b>Median</b>	<b>Standard deviation</b>	<b>Excess kurtosis</b>	<b>Skewness</b>
	<i>Fungi</i>	2.3	2.4	0.526	-1.753	0.271
	<i>G+B</i>	3.6	3.6	0.393	-1.524	-0.031
	<i>G-B</i>	21.5	21.2	6.485	-2.073	-0.098
	<i>Methano</i>	1.4	1.4	0.128	-1.111	-0.304
	<i>Meuk</i>	9.7	9.7	0.515	-1.657	-0.223
	<i>NonPhot</i>	5.4	4.6	3.654	-1.047	0.699
	<i>pH</i>	6.5	6.5	0.057	0.413	0.028
	<i>Phot</i>	15.8	16.7	7.277	-1.546	-0.218
	<i>Som</i>	6.1	6.2	0.077	2.037	-1.923
	<i>Sorbat</i>	11.7	12.3	3.861	-0.519	-0.701
	<i>Temp</i>	12.4	12.5	0.18	0.167	-1.317
	<i>Total M</i>	77.5	78.4	9.589	-2.036	-0.181
<b>Ibuprofen</b>	<i>AeroB</i>	6.2	6	1.778	-1.403	0.246
	<i>AnaeroB</i>	1.6	1.5	0.302	-1.189	0.526
	<i>Bact</i>	29.7	28.7	5.978	-1.195	0.378
	<i>Bioat</i>	42.8	51.1	17.4	-0.909	-0.708
	<i>Fungi</i>	1.5	1.6	0.207	-0.634	-0.912
	<i>G+B</i>	2.9	2.1	1.077	-0.429	0.959
	<i>G-B</i>	17.9	18.1	5.678	-1.179	-0.020
	<i>Methano</i>	1.6	0.9	0.401	4.470	2.111
	<i>Meuk</i>	14.7	17	4.283	-0.052	-1.294
	<i>NonPhot</i>	11.1	11.3	6.539	-1.669	-0.279
	<i>pH</i>	6.5	6.5	0.045	-0.431	-0.036
	<i>Phot</i>	24.3	22.5	10.469	-11.036	0.118
	<i>Som</i>	6.2	6.2	0.097	1.919	-1.858
	<i>Sorbat</i>	19.2	20.1	10.881	-0.736	-0.624
	<i>Temp</i>	12.4	12.5	0.243	2.475	0.732
	<i>Total M</i>	75.7	76.0	15.766	-1.129	-0.125
<b>Ketoprofen</b>	<i>AeroB</i>	4.8	4.8	0.567	-1.074	0.23
	<i>AnaeroB</i>	2.1	2.1	0.273	-1.364	0.329
	<i>Bact</i>	31.1	30.6	5.396	-1.740	0.036
	<i>Bioat</i>	35.4	39.5	9.596	1.417	-1.355
	<i>Fungi</i>	1.9	2.0	0.165	-1.770	-0.534
	<i>G+B</i>	3.2	2.9	0.729	-1.003	0.729
	<i>G-B</i>	19.7	19.6	6.022	-1.696	-0.104
	<i>Methano</i>	1.3	1.2	0.248	2.189	1.469
	<i>Meuk</i>	12.2	13.3	2.372	-0.182	-1.219
	<i>NonPhot</i>	8.8	12.7	6.084	-2.231	-0.239
	<i>pH</i>	6.5	6.5	0.045	-0.431	-0.036
	<i>Phot</i>	37	42.6	19.909	-1.555	-0.492
	<i>Som</i>	6.2	6.2	0.097	1.919	-1.858
	<i>Sorbat</i>	20/5	24.7	9.395	-1.018	-0.781

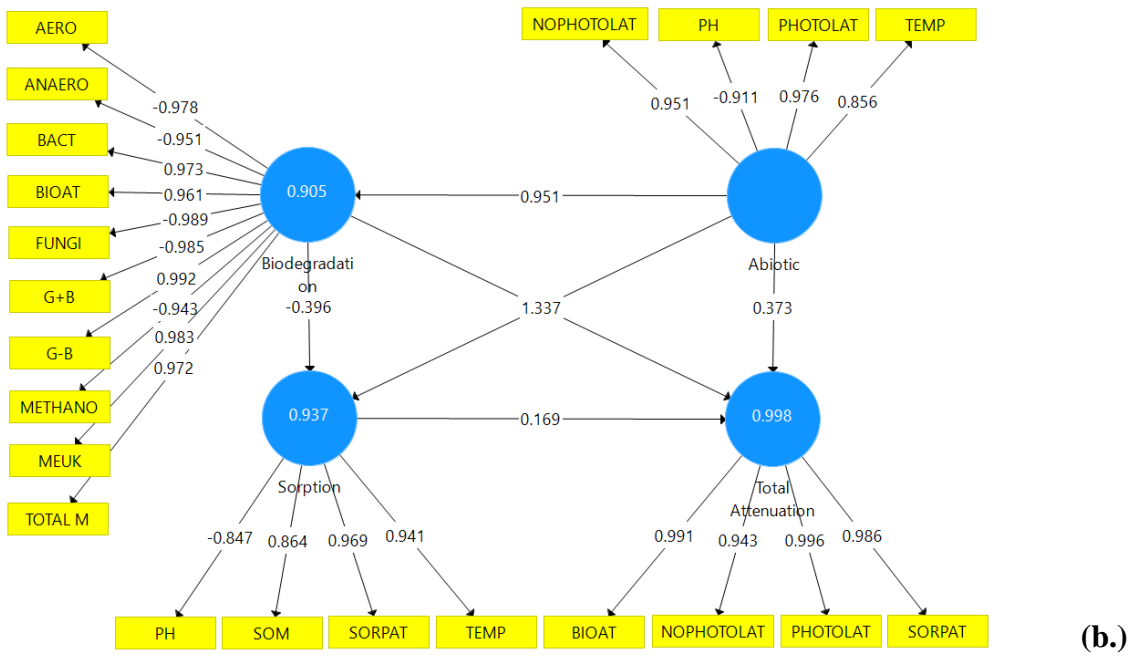
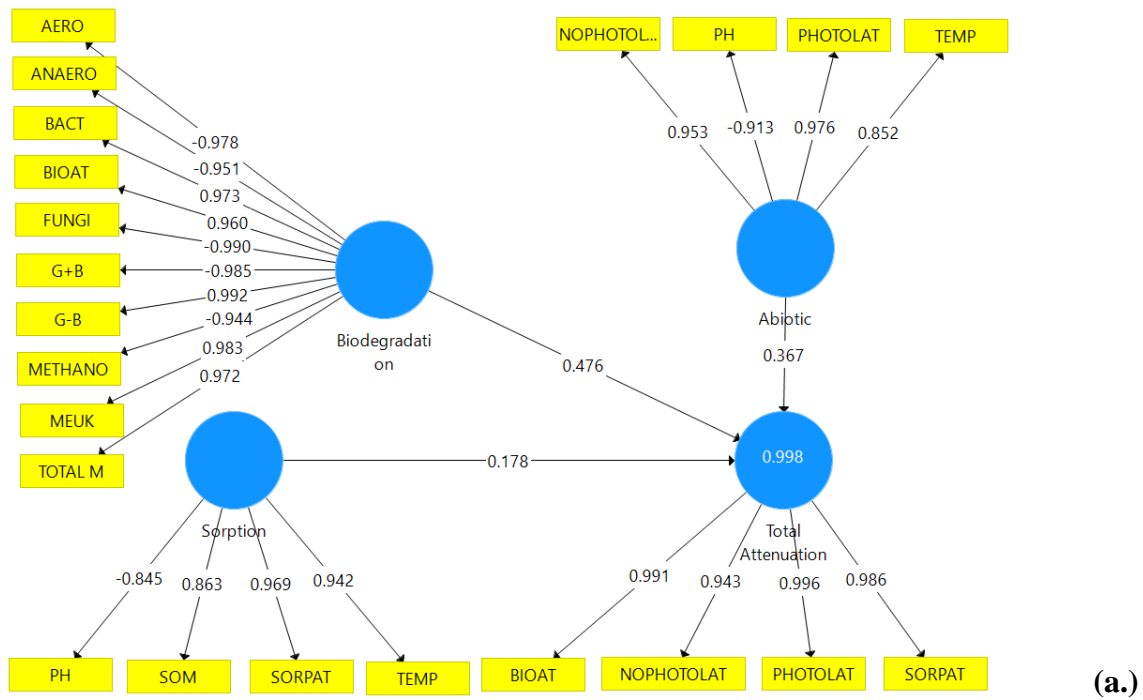
NSAID	MV	Mean	Median	Standard deviation	Excess kurtosis	Skewness
	<i>Temp</i>	12.4	12.4	0.243	2.475	0.732
	<i>Total M</i>	76.3	76.5	12.710	-1.569	-0.193

*AeroB* – aerobe bacteria; *AnaeroB* – anaerobe bacteria; *Bact* – bacteria; *Bioat* – biotic process induced attenuation; *G+B* – gram positive bacteria; *G-B* – gram negative bacteria; *Methano* – methanotroph bacteria; *Meuk* – microeukaryotes, *NonPhot* – non photolysis; *Phot* – photolysis; *Som* – sediment organic matter; *Sorbat* – sorption process induced attenuation; *Total M* – total microbiota;

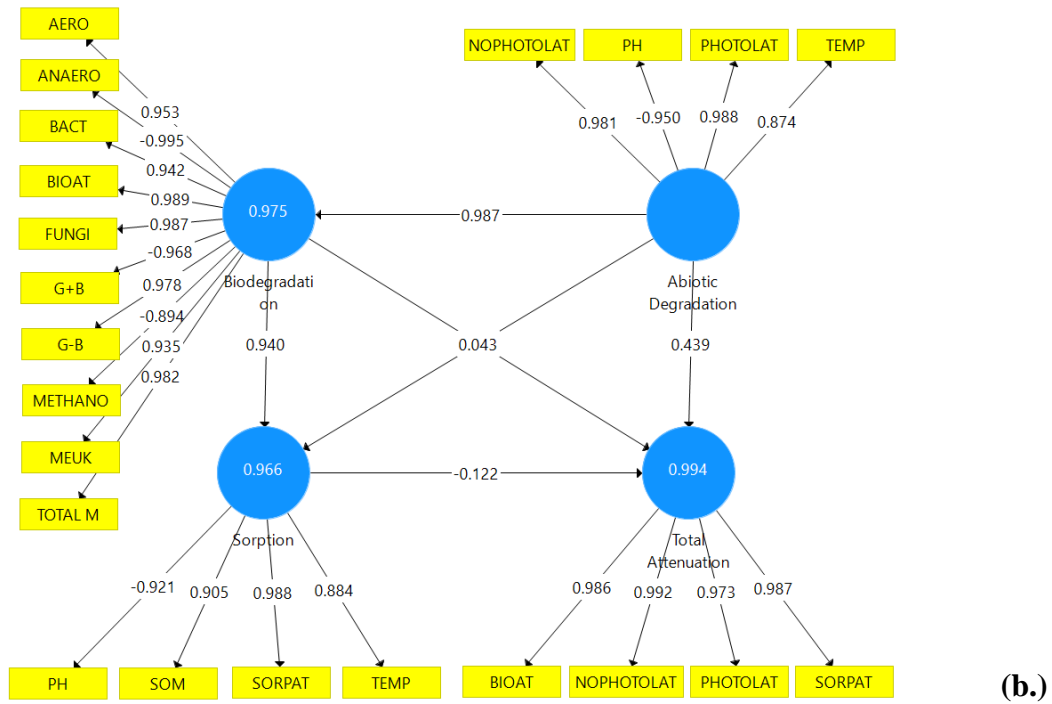
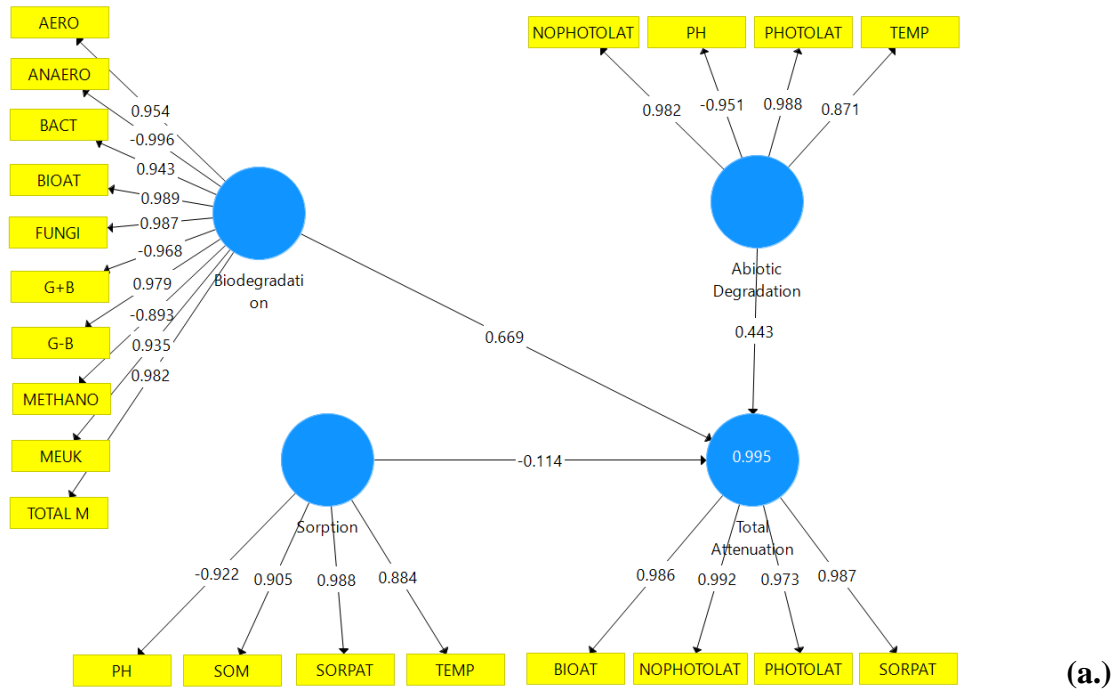
### 3.3. Diagramele SEM-PLS-PM obtinute pentru comportamentul NSAIDs in apa de suprafata

SEM-PLS-PM a fost rezolvat folosind software-ul SmartPLS. Algoritmul, prin faza pregatitoare normalizeaza variabilele manifest MV urmata de procese de aproximare externa si, respectiv, de aproximare interna. Prin aproximarea externa, variabilele latente LV sunt estimate ca agregate ponderate ale variabilelor manifest MV aplicand regresia cu metoda celor mai mici patrate. Prin aproximare interna, variabilele latent LV endogene sunt asociate cu variabilele latent LV adiacente si conexiunile sunt stabilite aplicand inca o data regresia cu metoda celor mai mici patrate. Efectuand algoritmul, se genereaza diagrama de traseu, ponderea indicatorilor formativi, indicatorii reflectivi si coeficientii fiecarei cai ipotetice intre variabilele latente LV.

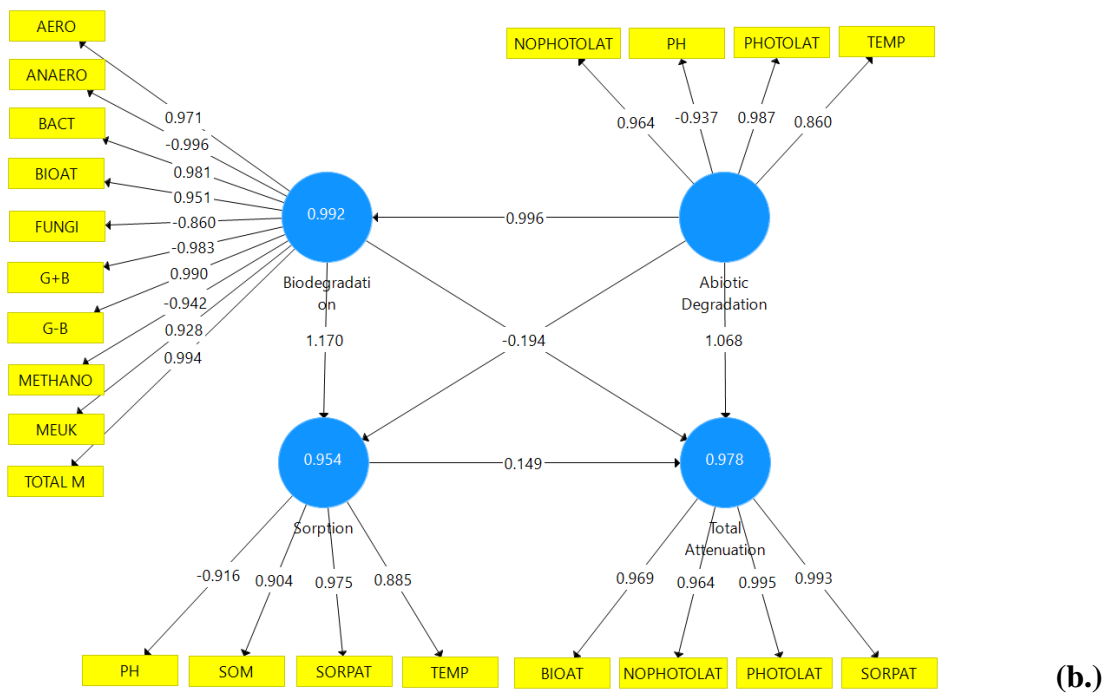
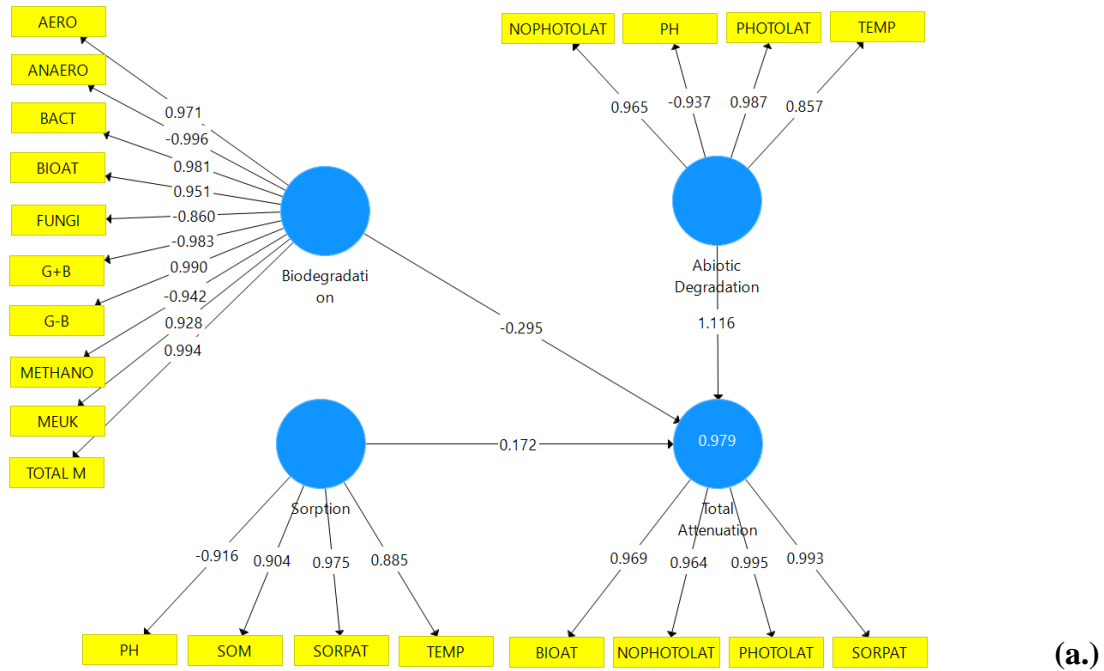
Folosind date experimentale obtinute anterior, diagrama de cale pentru ipoteza primara si ipotezele secundare sunt prezentate pentru fiecare compus acyiv NSAID studiat. In **Figura 29** sunt prezentate diagramele de traseu pentru diclofenac, in **Figura 30** sunt prezentate diagramele pentru ibuprofen, iar in **Figura 31** sunt prezentate diagramele pentru ketoprofen.



**Figure 29.** Diagrama comportamentului pentru diclofenac in apa de suprafata. a.) ipoteza primara asumata; b.) ipoteza secundara asumata.



**Figure 30.** Diagrama comportamentului pentru ibuprofen in apa de suprafata. a.) ipoteza primara asumata; b.) ipoteza secundara asumata.



**Figure 31.** Diagrama comportamentului pentru ketoprofen in apa de suprafata. a.) ipoteza primara asumata; b.) ipoteza secundara asumata.



## Testele de veridicitate ale modelelor propuse: evaluarea indicilor de calitate

In **Tabelele 25 – 27** sunt enumerati indicii calitativi reprezentativi obtinuti pentru modelele propuse. Analizand datele obtinute pentru indicii de calitate testati, au fost acceptate modelule propuse pentru comportamentul fiecarui compus activ NSAIDs in matricea de apa de suprafata.

**Table 25.** Indicii de calitate al modelului SEM-PLS-PM propus: studio de caz diclofenac

<b>Assumption</b>	<b>Parameters</b>				
<b>Primary assumption</b>	<b>Construct reliability and validity (<math>\rho</math>)</b>				
	<i>Abiotic process:</i> 0.949				
	<i>Biotic process:</i> 0.994				
	<i>Sorption process:</i> 0.942				
	<b>Discriminated validity</b>				
		Abiotic	Biotic	Sorption	Total attenuation
	Abiotic	0.925			
	Biotic	0.951	0.973		
	Sorption	0.959	0.877	0.907	
	Total attenuation	0.99	0.98	0.947	0.979
<b>Secondary assumption</b>	<b>Construct reliability and validity (<math>\rho</math>)</b>				
	<i>Abiotic process:</i> 0.947				
	<i>Biotic process:</i> 0.994				
	<i>Sorption process:</i> 0.938				
	<b>LV characteristics</b>				
			<i>Excess kurtosis</i>	<i>Skewness</i>	
	Abiotic process		-0.62	-0.252	
	Biotic process		-1.898	0.011	
	Sorption process		1.067	-1.206	
	Total attenuation diclofenac		-1.174	-0.237	
<b>Model performance</b>	<b>Reliability for diclofenac attenuation</b>				
	$\alpha$ (Cronbach alpha): 0.985				
	$\rho$ : 0.986				
	<i>Composite reliability:</i> 0.989				
	<i>Average variance extracted:</i> 0.958				

Assumption	Parameters
	$r^2$ : 0.998
	<i>Model RMSEA</i> : 0.082 (model fit)

**Table 26.** Indicii de calitate al modelului SEM-PLS-PM propus: studio de caz ibuprofen

Assumption	Parameters																									
<b>Primary assumption</b>	<i>Construct reliability and validity</i> ( $\rho$ )																									
	<i>Abiotic process</i> : 0.968																									
	<i>Biotic process</i> : 0.992																									
	<i>Sorption process</i> : 0.952																									
	<i>Discriminated validity</i>																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Abiotic</th> <th>Biotic</th> <th>Sorption</th> <th>Total attenuation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Abiotic</td> <td>0.949</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Biotic</td> <td>0.987</td> <td>0.963</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sorption</td> <td>0.972</td> <td>0.983</td> <td>0.926</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total attenuation</td> <td>0.993</td> <td>0.995</td> <td>0.974</td> <td>0.985</td> </tr> </tbody> </table>		Abiotic	Biotic	Sorption	Total attenuation	Abiotic	0.949				Biotic	0.987	0.963			Sorption	0.972	0.983	0.926		Total attenuation	0.993	0.995	0.974	0.985
	Abiotic	Biotic	Sorption	Total attenuation																						
Abiotic	0.949																									
Biotic	0.987	0.963																								
Sorption	0.972	0.983	0.926																							
Total attenuation	0.993	0.995	0.974	0.985																						
<b>Secondary assumption</b>	<i>Construct reliability and validity</i> ( $\rho$ )																									
	<i>Abiotic process</i> : 0.966																									
	<i>Biotic process</i> : 0.992																									
	<i>Sorption process</i> : 0.951																									
	<i>LV characteristics</i>																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th><i>Excess kurtosis</i></th> <th><i>Skewness</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Abiotic process</td> <td>-0.985</td> <td>-0.202</td> </tr> <tr> <td>Biotic process</td> <td>-0.812</td> <td>-0.613</td> </tr> <tr> <td>Sorption process</td> <td>0.021</td> <td>-0.845</td> </tr> <tr> <td>Total attenuation diclofenac</td> <td>-1.183</td> <td>-0.388</td> </tr> </tbody> </table>		<i>Excess kurtosis</i>	<i>Skewness</i>	Abiotic process	-0.985	-0.202	Biotic process	-0.812	-0.613	Sorption process	0.021	-0.845	Total attenuation diclofenac	-1.183	-0.388										
	<i>Excess kurtosis</i>	<i>Skewness</i>																								
Abiotic process	-0.985	-0.202																								
Biotic process	-0.812	-0.613																								
Sorption process	0.021	-0.845																								
Total attenuation diclofenac	-1.183	-0.388																								
<b>Model performance</b>	<i>Reliability for ibuprofen attenuation</i>																									
	$\alpha$ ( <i>Cronbach alpha</i> ): 0.990																									
	$\rho$ : 0.990																									
	<i>Composite reliability</i> : 0.992																									
	<i>Average variance extracted</i> : 0.970																									
	$r^2$ : 0.972																									
	<i>Model RMSEA</i> : 0.05 (model fit)																									

**Table 27.** Indicii de calitate al modelului SEM-PLS-PM propus: studio de caz ketoprofen

<b>Assumption</b>	<b>Parameters</b>				
<b>Primary assumption</b>	<b>Construct reliability and validity (<math>\rho</math>)</b>				
	<i>Abiotic process:</i> 0.961				
	<i>Biotic process:</i> 0.992				
	<i>Sorption process:</i> 0.949				
	<b>Discriminated validity</b>				
		Abiotic	Biotic	Sorption	Total attenuation
	Abiotic	0.938			
	Biotic	0.996	0.960		
	Sorption	0.970	0.977	0.921	
	Total attenuation	0.989	0.984	0.966	0.981
<b>Secondary assumption</b>	<b>Construct reliability and validity (<math>\rho</math>)</b>				
	<i>Abiotic process:</i> 0.958				
	<i>Biotic process:</i> 0.992				
	<i>Sorption process:</i> 0.948				
	<b>LV characteristics</b>				
			<i>Excess kurtosis</i>	<i>Skewness</i>	
	Abiotic process		-1.284	-0.372	
	Biotic process		-1.176	-0.397	
	Sorption process		-0.008	-0.908	
	Total attenuation diclofenac		-1.163	-0.641	
<b>Model performance</b>	<b>Reliability for ketoprofen attenuation</b>				
	$\alpha$ (Cronbach alpha): 0.987				
	$\rho$ : 0.987				
	<i>Composite reliability:</i> 0.990				
	<i>Average variance extracted:</i> 0.962				
	$r^2$ : 0.991				
	<b>Model RMSEA:</b> 0.057 (model fit)				

## **Chapter 4. Evaluarea comportamentului NSAIDs (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) in matricea de sol**

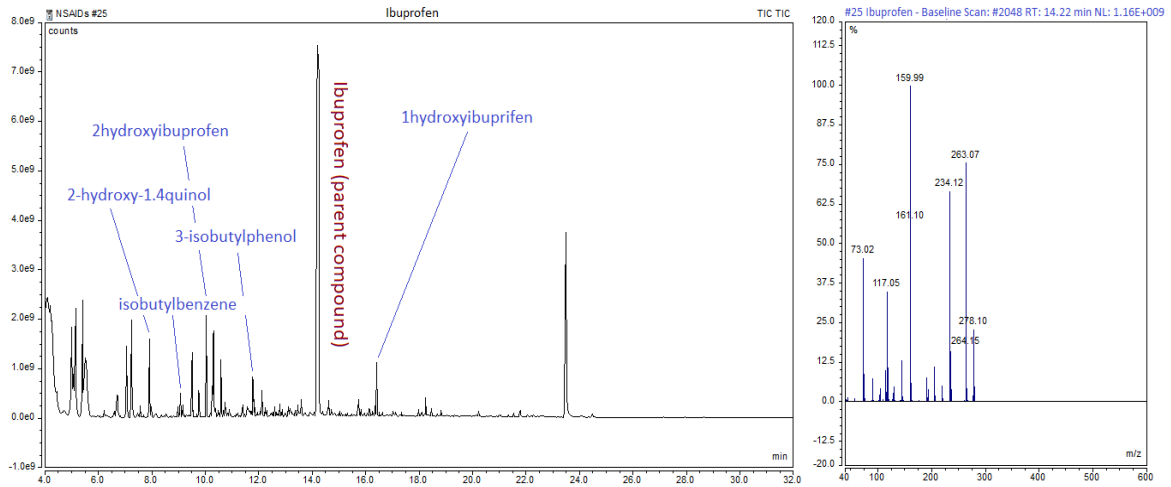
Trei procese majore ar putea influenta comportamentul compusilor activi NSAIDs in matricea de sol. Unul dintre aceste procese este cel de adsorbție a ingredientelor active farmaceutice pe suprafața activă a mediului solului, al doilea este cel al biodegradării de către microorganismele din sol, iar al treilea este potențialul de translocare de către organismele vii de nivel trofic superior. Aceste procese definesc în matricea de sol atât potențiala persistentă, precum și rata de transformare a acestor compuși.

Conform literaturii de specialitate, au fost identificate două provocări majore în evaluarea comportării NSAIDs în sol. Una dintre acestea se referă la comportamentul acestor compuși în contextul provocărilor actuale ale schimbărilor climatice, și anume sub anomaliile de precipitații și temperatură [425; 426]; în timp ce al doilea este potențialul de formare al produsilor de transformare TP, produșii care ar putea avea proprietăți ecotoxicologice mai pronunțate decât compusul activ inițial [369; 427; 363]. Pe baza acestor două provocări majore identificate, în această parte a tezei au fost studiate comportamentul și transformarea diclofenacului, ibuprofenului și ketoprofenului în sol în diferite condiții de mediu.

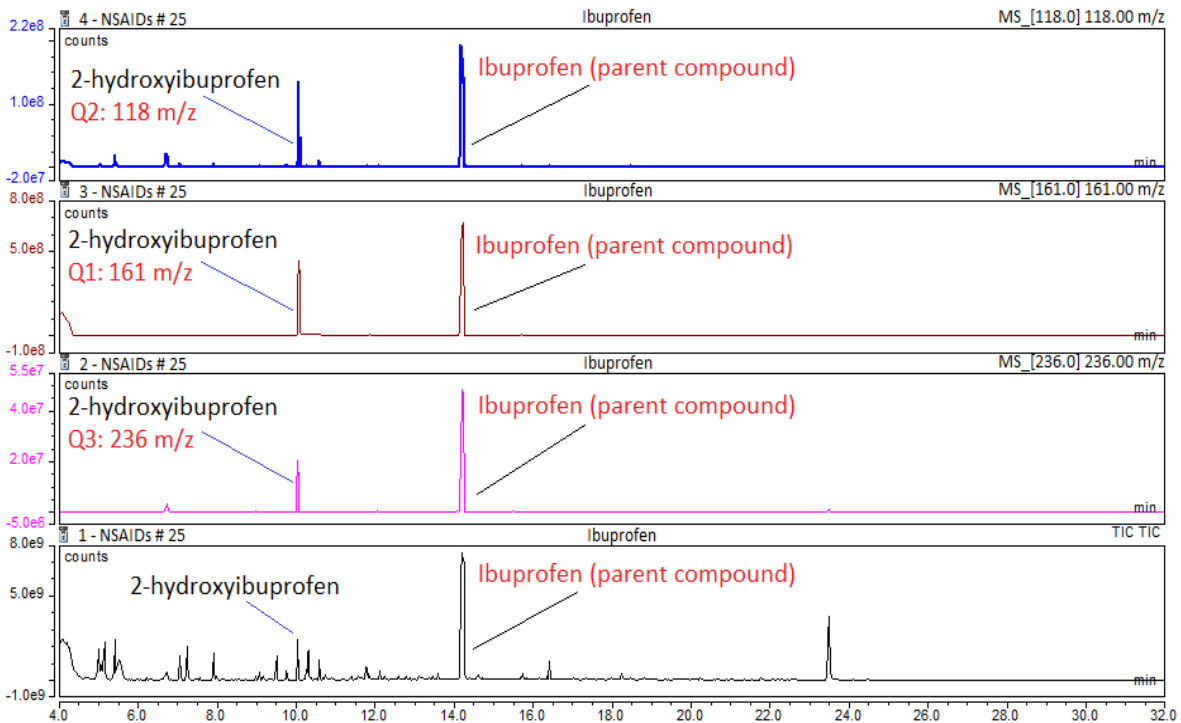
### **4.1. Potențialul de formare al produșii de transformare ai NSAIDs**

Conform datelor experimentale obținute (atât din experimentele efectuate în ghivece, cât și pe coloanal de sol), pe baza parametrilor cinetici ai ecuației Monod a fost identificată o corelație pozitivă între comunitatea specifică a microbiotei solului și consumul compusilor activi NSAIDs. Analizând literatura disponibilă, produșii de transformare se pot forma și când microorganismele folosesc în funcțiile lor metabolice acești compuși ca sursă de carbon [442-445; 250]. Prin urmare, în cadrul experimentelor s-au efectuat analize GC-MS în mod full scan pentru a identifica potențiali produșii de transformare a acestor NSAIDs studiați, având o atenție specială spre ionii de calificare și cuantificare ( $m/z$ ) corespunzători sugerați de literatura [446-450].

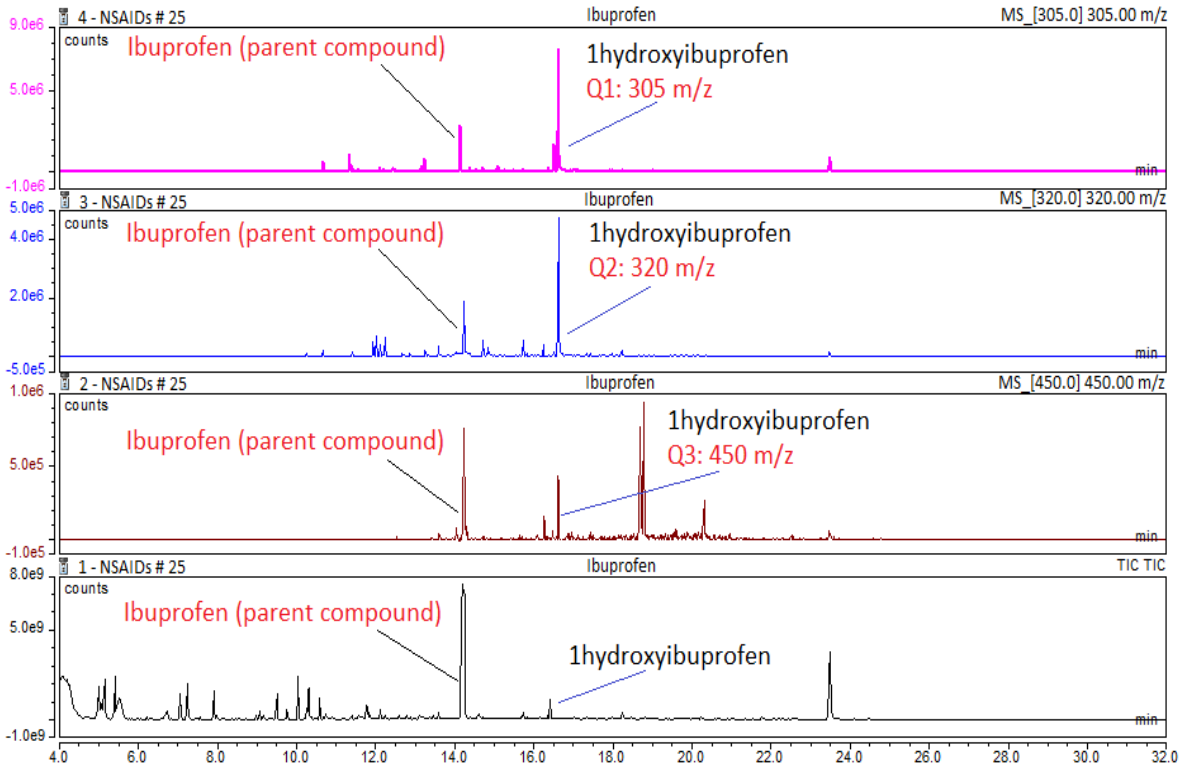
Produsii de transformare identificati pentru ibuprofen: Pe parcursul celor treizeci de zile ale experimentelor s-au identificat urmatoarii produși de transformare: 1-hidroxiibuprofen, 2-hidroxiibuprofen, 1,2-dihidroxiibuprofen, 2-hidroxi-1,4-chinol, izobutil benzen și 3-izobutil fenol. Spectrele lor de masa sunt prezentate in **Figura 42**.



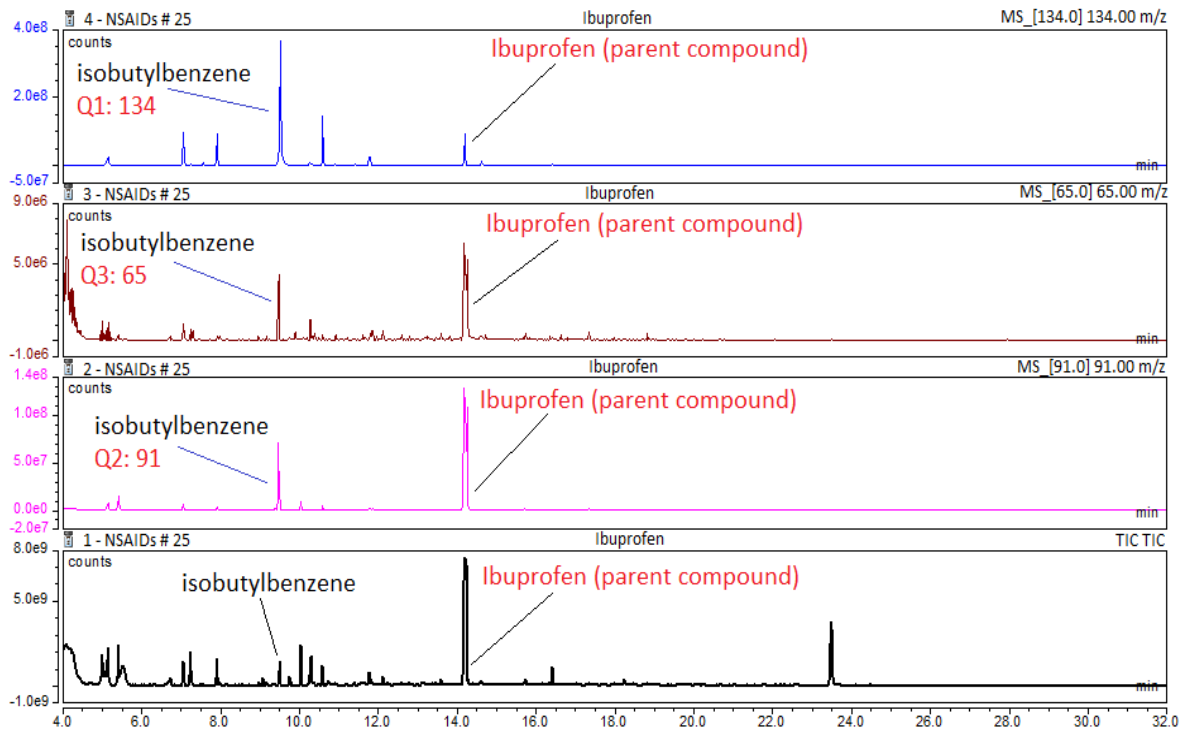
(a.)



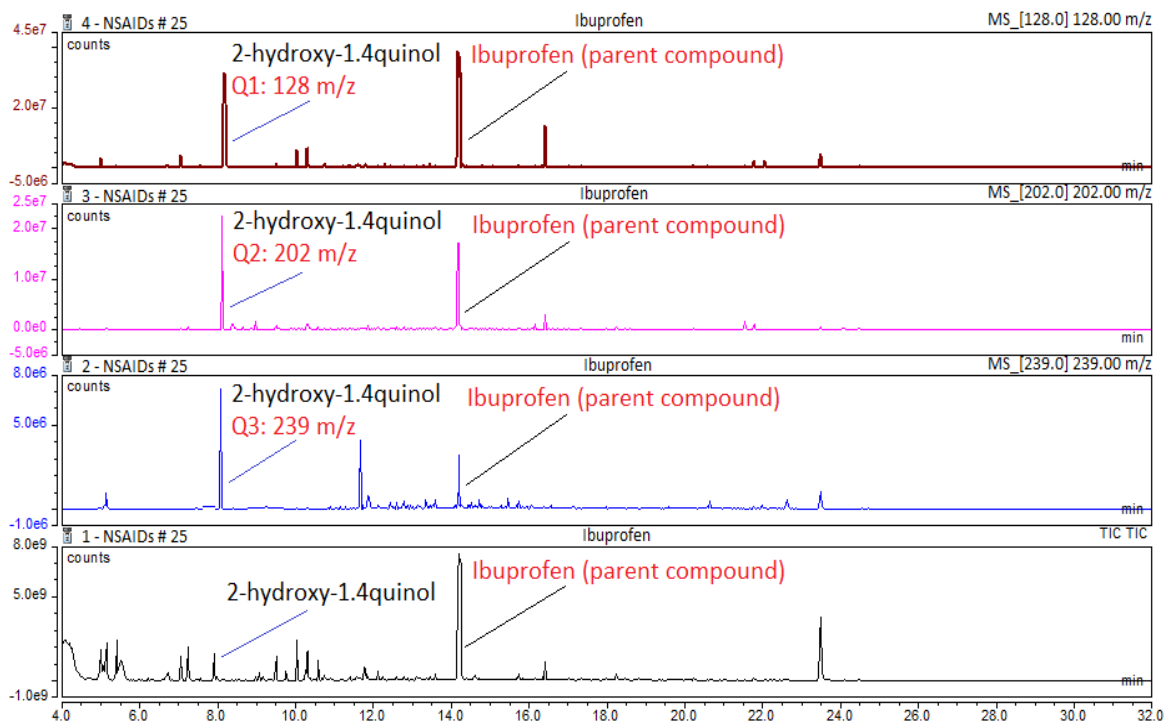
(b.)



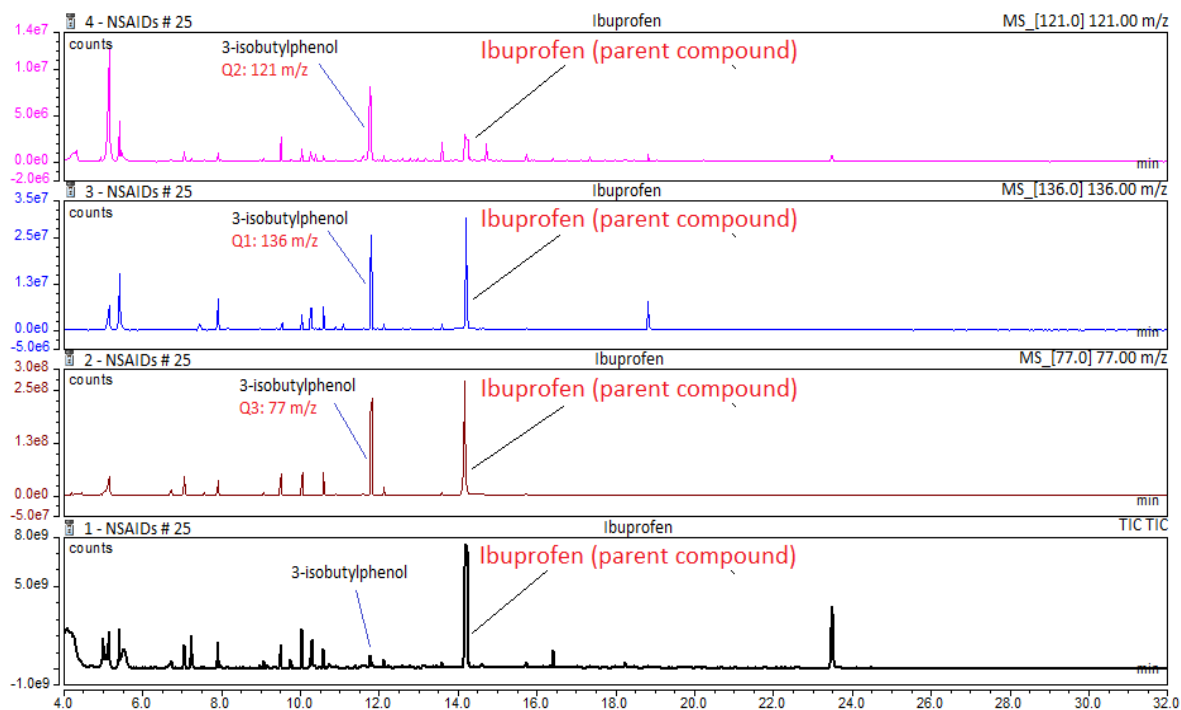
(c.)



(d.)



(e.)

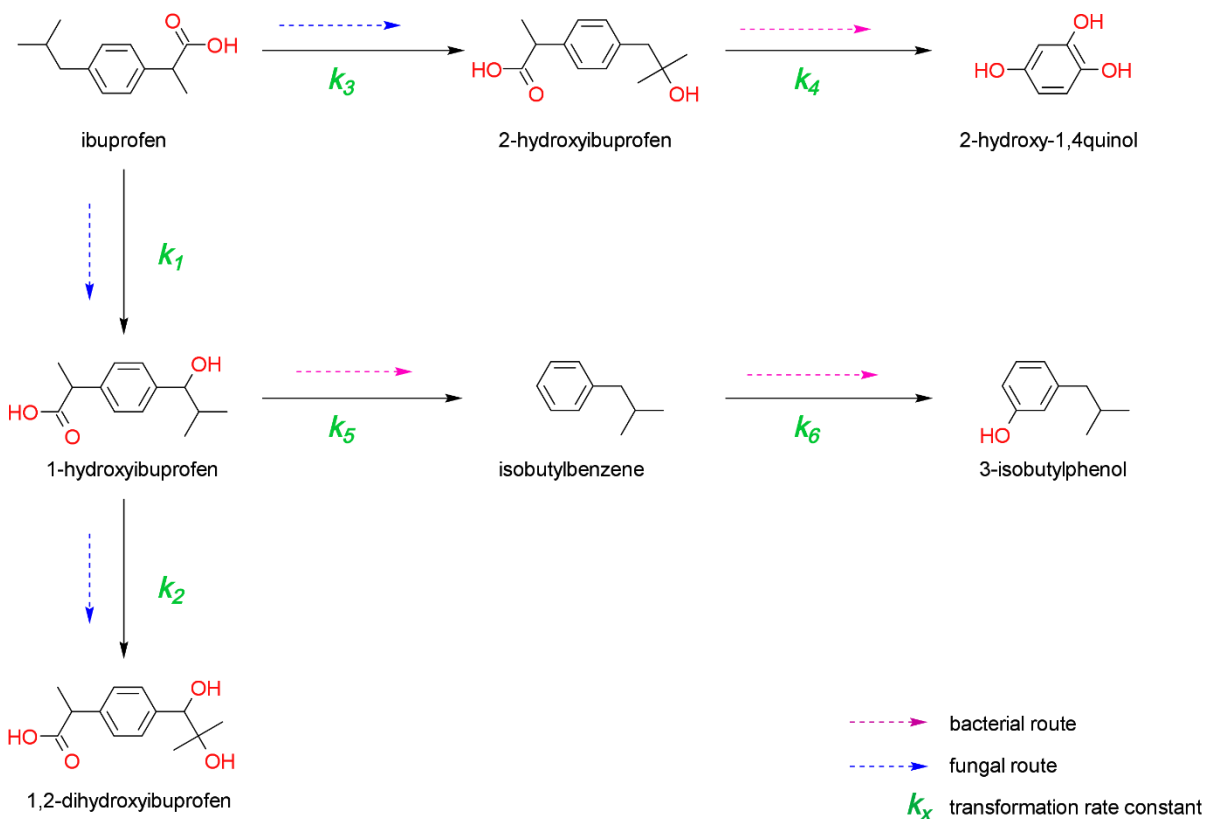


(f.)

**Figure 42.** Spectre de masa al compusilor de transformare identificati pentru ibuprofen. (a.) total ion chromatogram of ibuprofen and transformation products; (b.) mass spectra of 2-hydroxyibuprofen qualifier and quantifier ions; (c.) mass spectra of 1-hydroxyibuprofen

qualifier and quantifier ions; (d.) mass spectra of 1,2-dihydroxyibuprofen qualifier and quantifier ions; (e.) mass spectra of 2-hydroxy-1,4-quinol qualifier and quantifier ions; (f.) mass spectra of 3-isobutylphenol qualifier and quantifier ions;

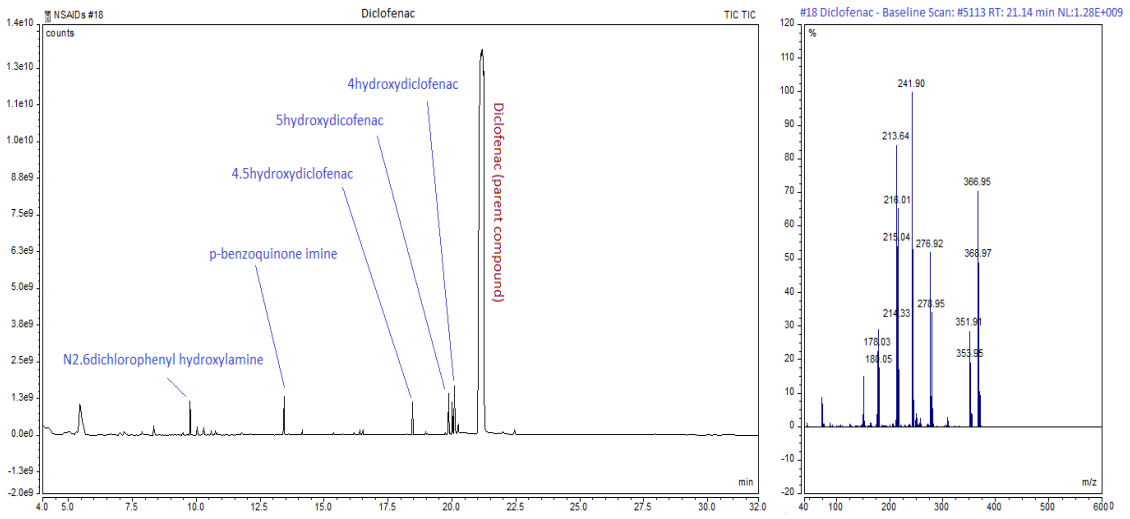
Modul de degradare propus tinand cont de timpul lor de aparitie pe durata experimentului este prezentata in **Figura 43**.



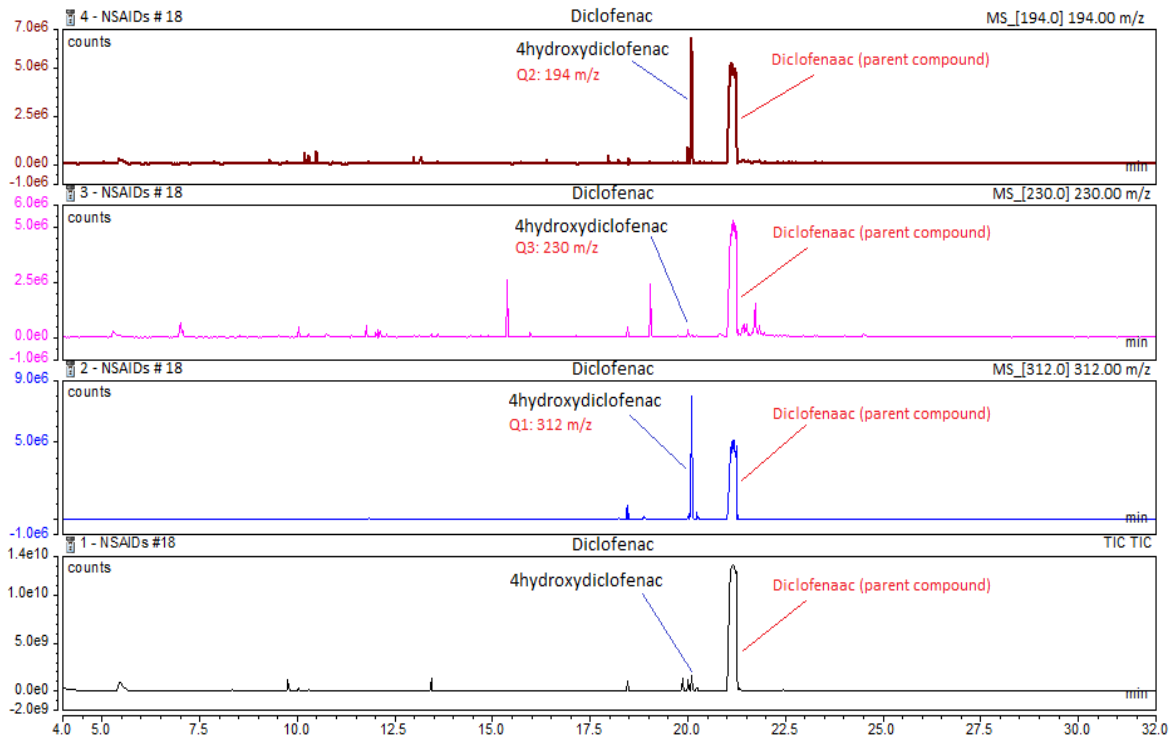
**Figure 43.** Comportamentul propus pentru ibuprofen in sol

*Produsii de transformare identifiicati pentru diclofenac:* In cazul diclofenacului au fost identificate in total cinci cinci produse de transformare pe durata experimentului. Acestia au fost 4-hidroxiciclofenac, 5-hidroxiciclofenac, 4,5-hidroxiciclofenac, N-2,6-diclorofenil hidroxilamina si p-benzochinona. Spectrele lor de masa sunt prezentate in **Figura 44**. Avand in vedere datele experimentale, comportamentul propus pentru diclofenac in sol este prezentata in **Figura 45**.

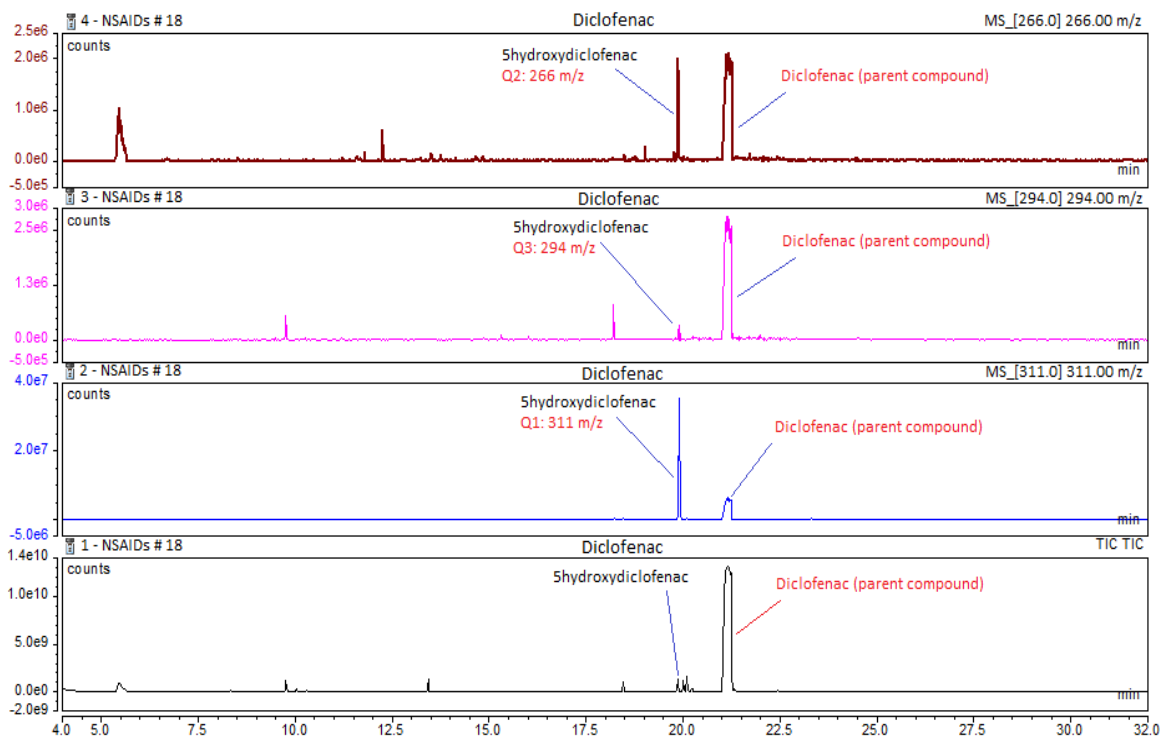




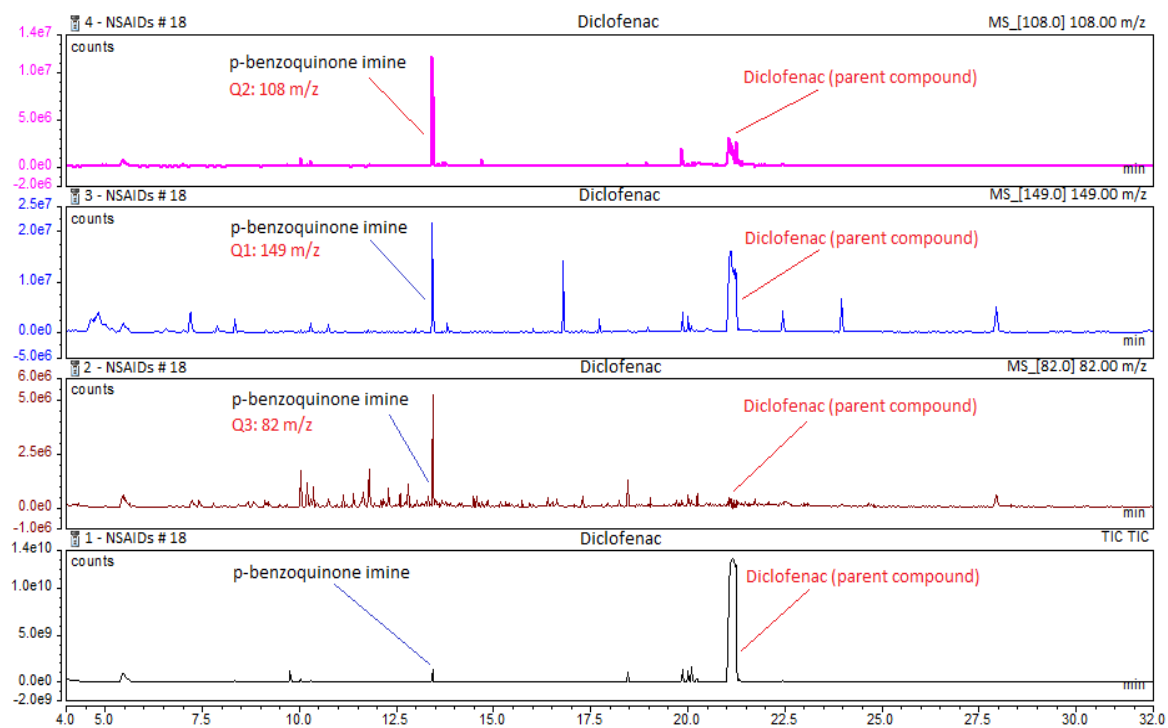
(a.)



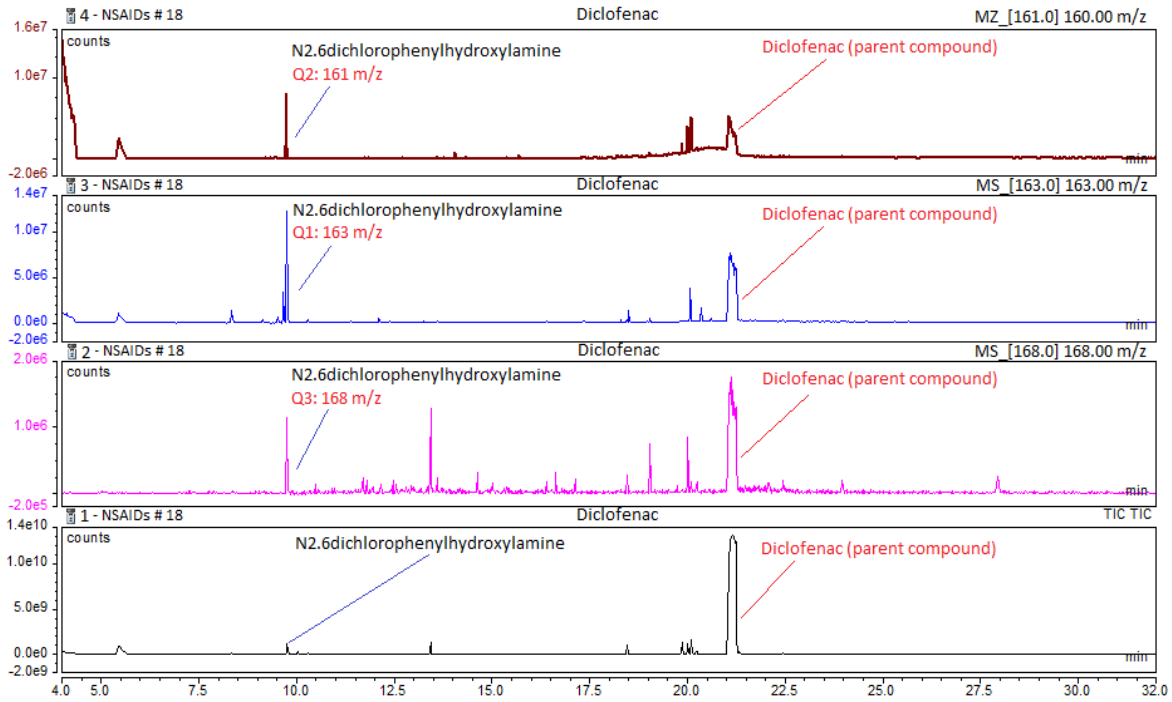
(b.)



(c.)

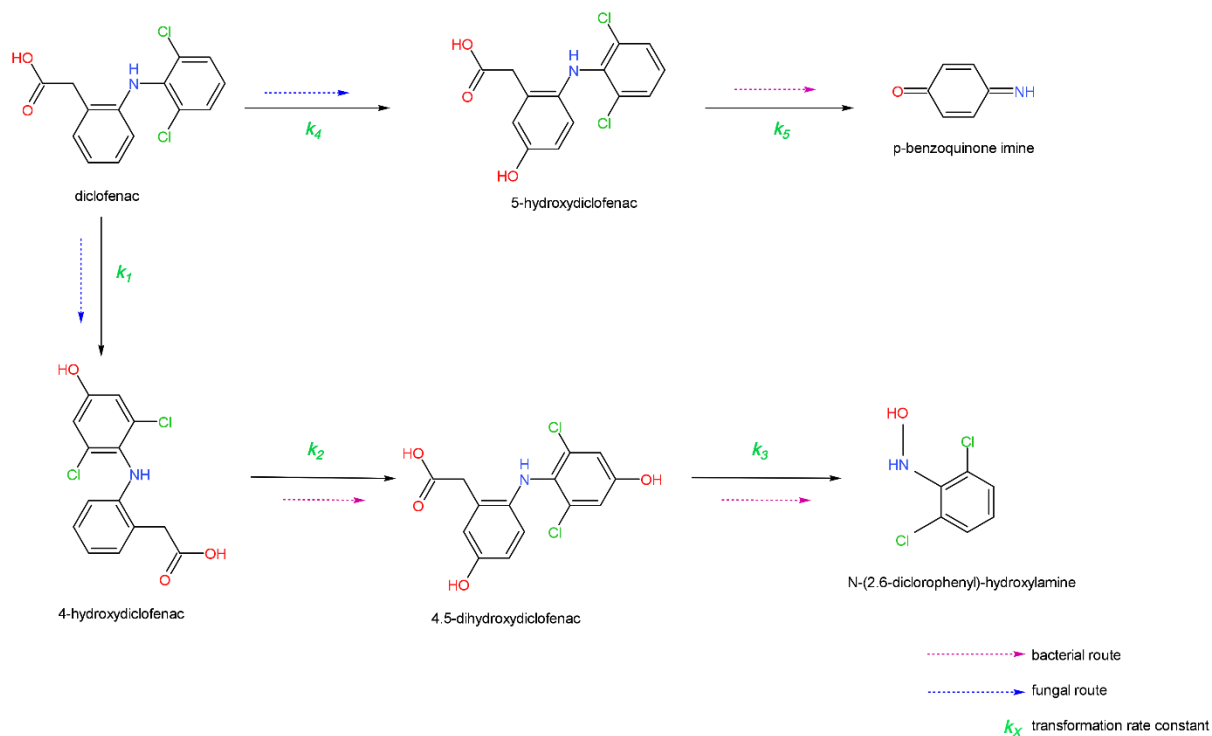


(d.)



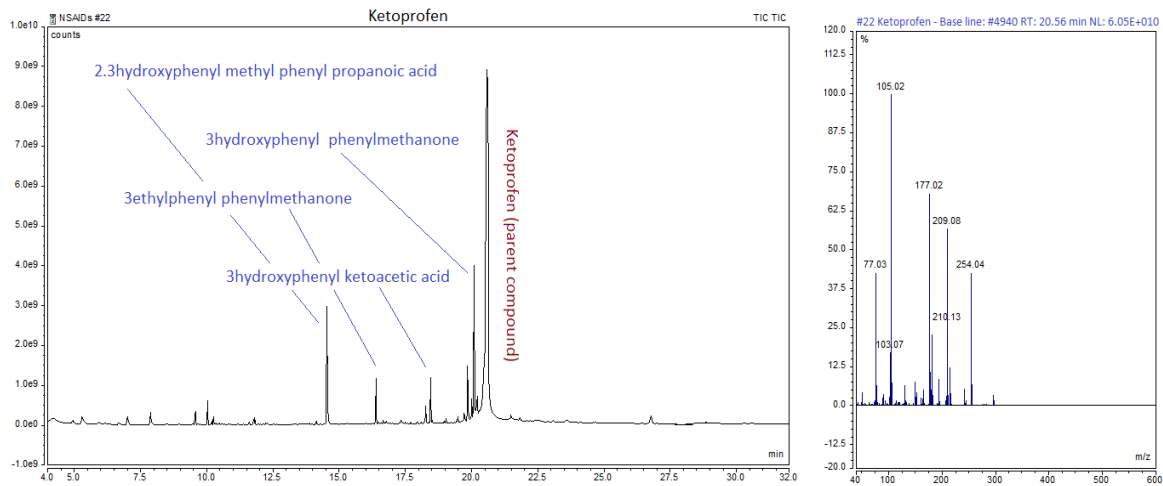
(e.)

**Figure 44.** Spectrele de masa al produsilor de transformare identificati pentru diclofenac. (a.) total ion chromatogram of diclofenac and transformation products; (b.) mass spectra of 4-hydroxydiclofenac qualifier and quantifier ions; (c.) mass spectra of 5-hydroxydiclofenac qualifier and quantifier ions; (d.) mass spectra of p-benzoquinone imine qualifier and quantifier ions; (e.) mass spectra of N-2,6-dichlorophenyl hydroxylamine qualifier and quantifier ions

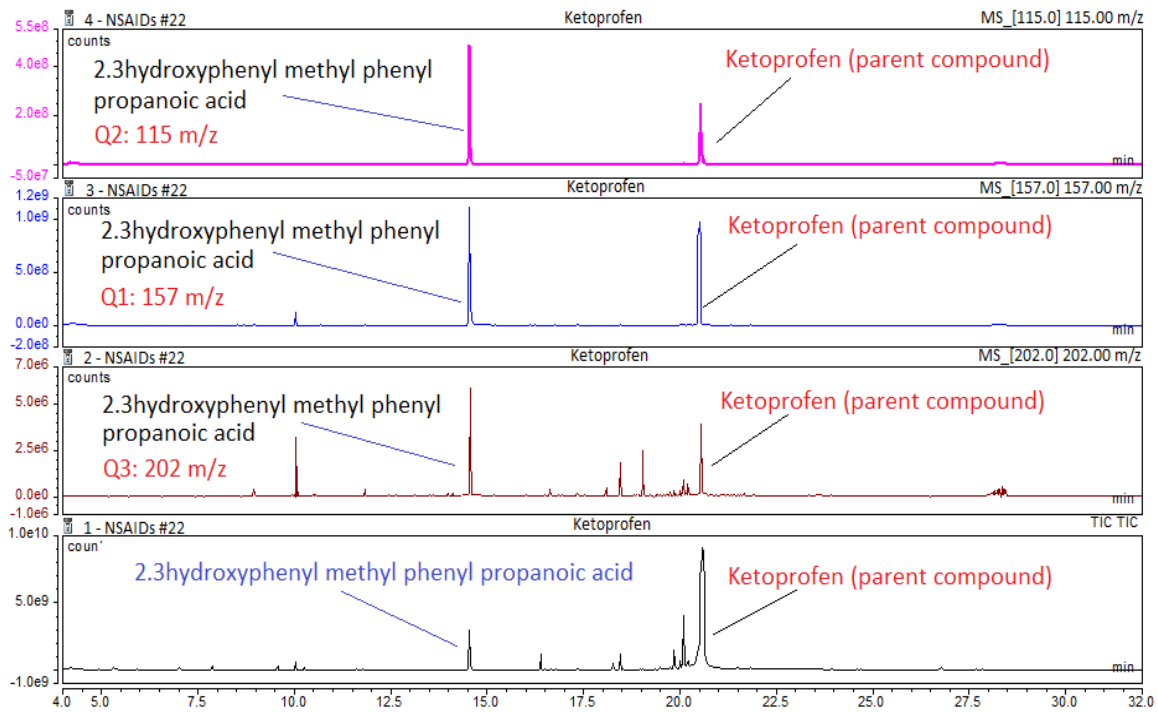


**Figure 45.** Comportamentul propus pentru diclofenac in sol

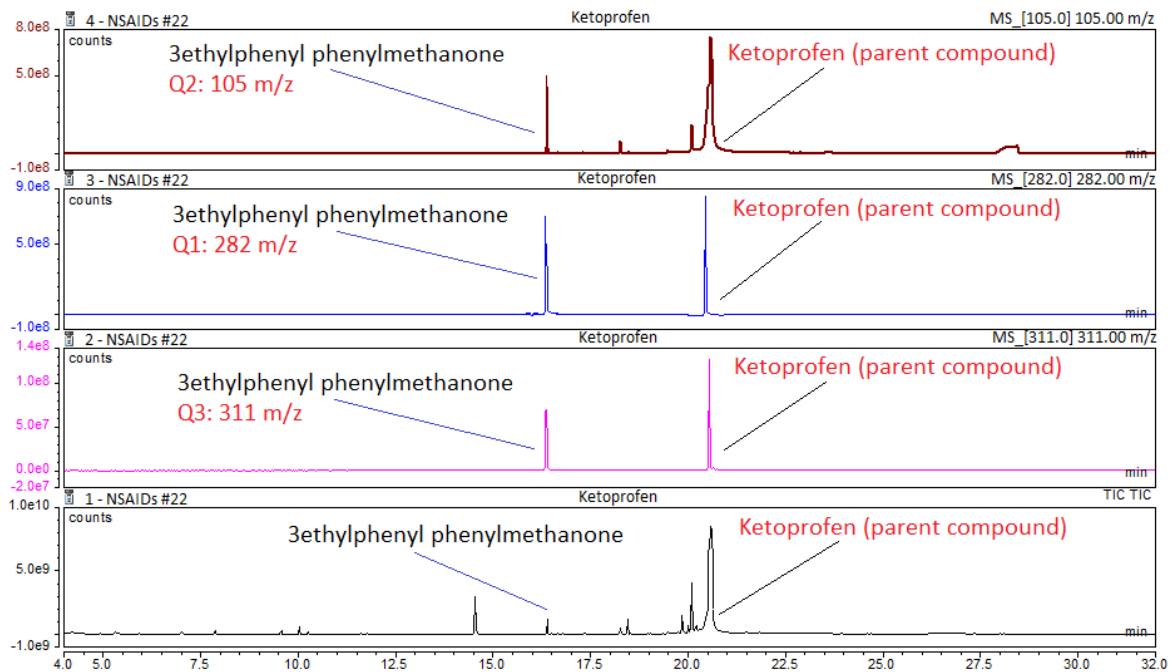
*Produsii de transformare identificati pentru ketoprofen:* In studiile de caz privind ketoprofen, produsii de transformare identificati au fost acidul propanoic 2,3-hidroxifenilmetilfenil, 3-etilfenilfenilmetanona, 3-hidroxifenilfenilmetanona si acidul 3-hidroxifenilcetoacetic. Spectrele lor de masa sunt prezentate in **Figura 46**. Comportamentul propus in sol pentru cazul ketoprofenului este prezentata in **Figura 47**.



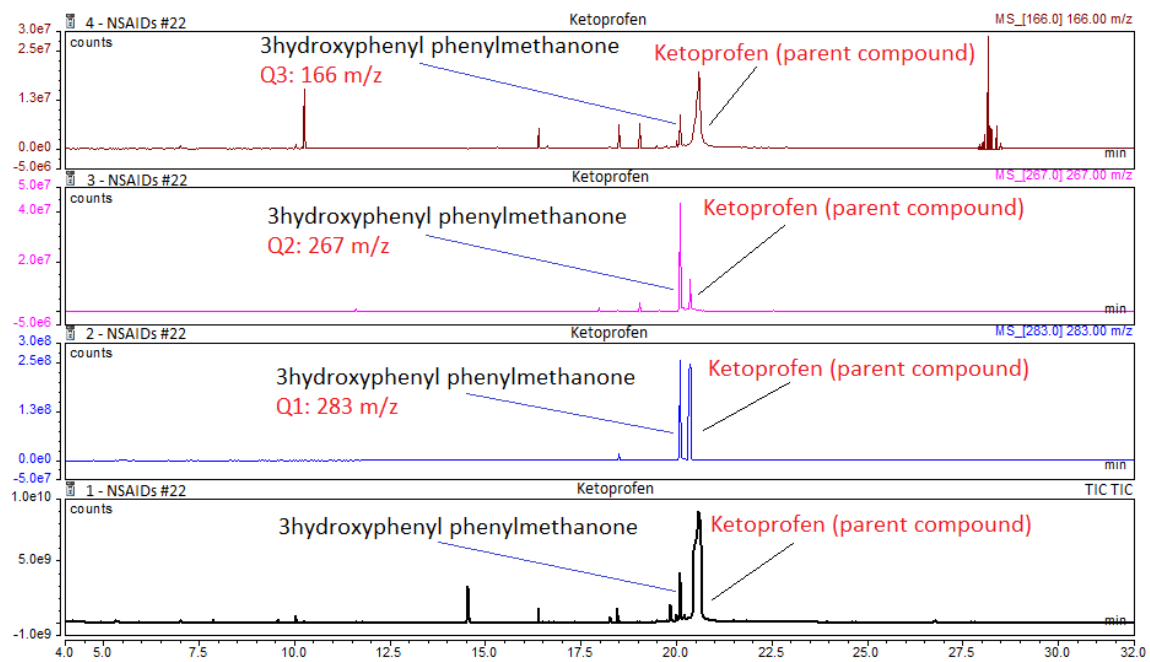
(a.)



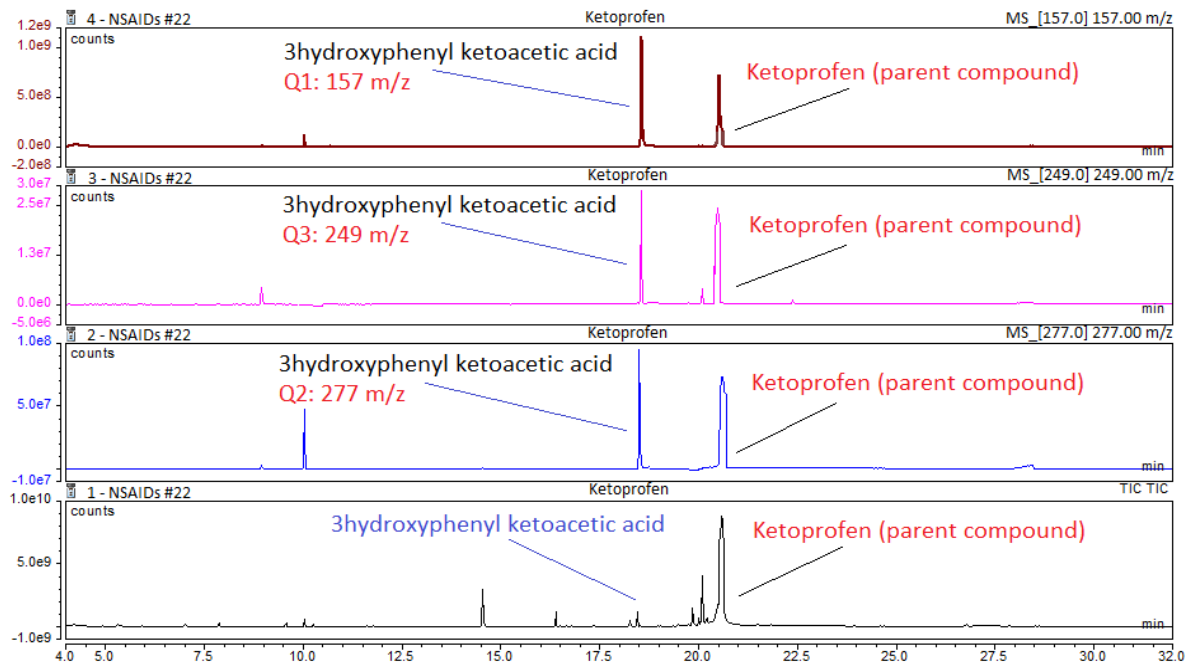
(b.)



(c.)

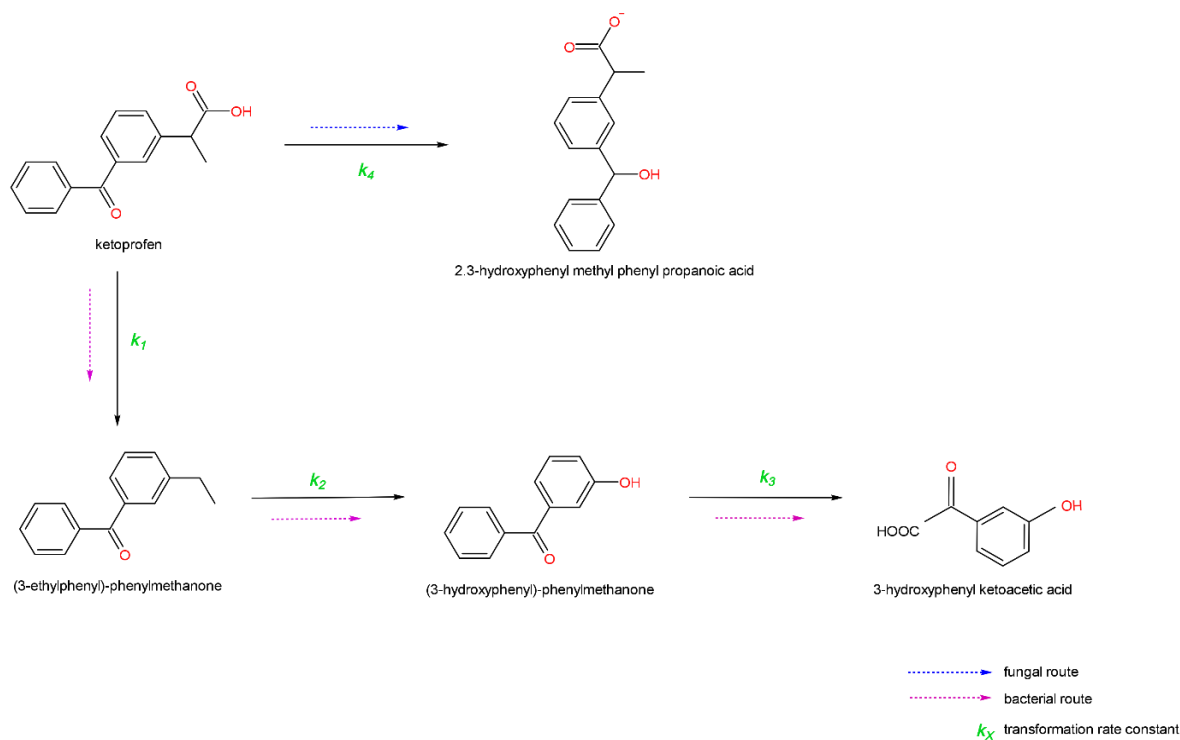


(d.)



e

**Figure 46.** Spectrul de masa al produsilor de transformare identificati in cazul ketoprofenului. (a.) total ion chromatogram of ketoprofen and transformation products; (b.) mass spectra of 2.3-hydroxyphenyl methyl phenyl propanoic acid qualifier and quantifier ions; (c.) mass spectra of 3-ethylphenyl phenyl methanone qualifier and quantifier ions; (d.) mass spectra of 3-hydroxyphenyl phenyl methanone qualifier and quantifier ions; (e.) mass spectra of 3hydroxyphenyl ketoacetic acid qualifier and quantifier ions;



**Figure 47.** Comportamentul propus pentru ketoprofen in sol

## 4.2. Modelarea comportamentului NSAIDs in sol

### Reactiile si ecuatiile de masa propuse pentru compusii activi si compusii de transformare al NSAIDs-urilor studiate

In acest studiu cu scopul de a simula comportamentul produselor farmaceutice studiate in sol, a fost aplicat un model de transport si reactie utilizand software-ul COMSOL pe baza datelor experimentale obtinute. Modelul a fost definit in functie de: (i.) rata de descompunere a diclofenacului, ibuprofenului si al ketoprofenului in functie de timp in sol; si (ii.) rata potentialului de formare a produsilor de transformare si stabilitatea acestora in functie de timp.

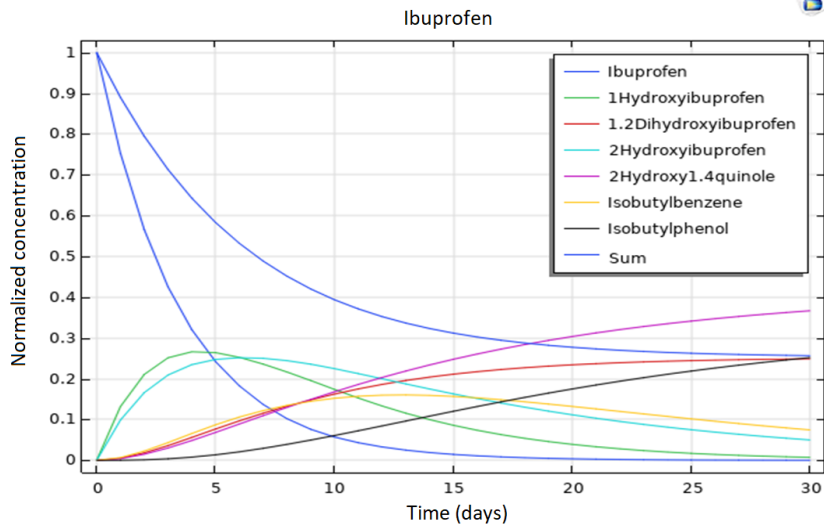
Ecuatiile de bilant de masa obtinute pentru fiecare produs de transformare al fiecarui NSAID studiat sunt prezentate in ecuatiile 58-

Ibuprofen	$\frac{\partial Ibuprofen}{\partial t} = -k_1 - k_3 \quad (\text{Eq.58.})$
	$\frac{\partial I.TP_1}{\partial t} = k_1 - k_2 - k_5 \quad (\text{Eq.59.})$

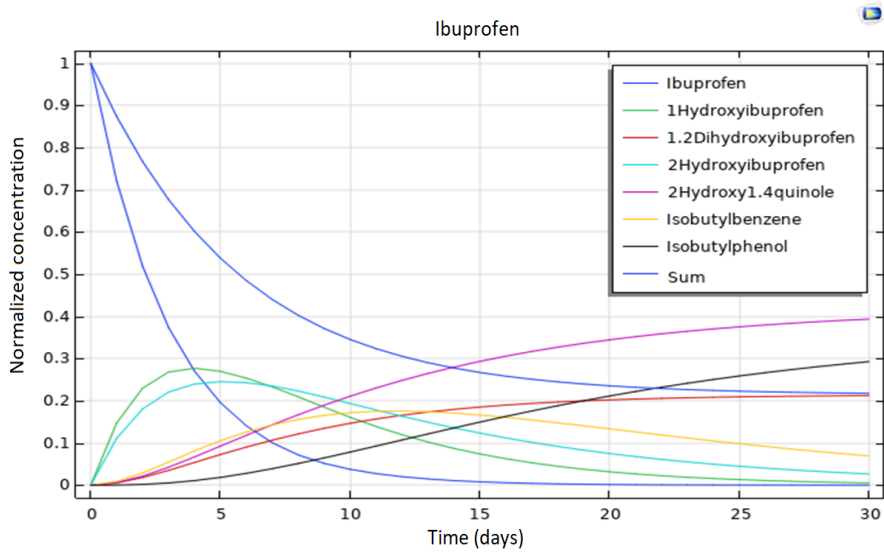


	$\frac{\partial I.TP_2}{\partial t} = k_2 \quad (\text{Eq.60.})$
	$\frac{\partial I.TP_3}{\partial t} = k_3 - k_4 \quad (\text{Eq.61.})$
	$\frac{\partial I.TP_4}{\partial t} = k_5 - k_6 \quad (\text{Eq.62.})$
	$\frac{\partial I.TP_5}{\partial t} = k_4 \quad (\text{Eq.63.})$
	$\frac{\partial I.TP_6}{\partial t} = k_6 \quad (\text{Eq.64.})$
	<p>unde <math>I.TP_1, I.TP_2, I.TP_3, I.TP_4, I.TP_5</math> and <math>I.TP_6</math> sunt produsii de transformare rezultati precum: 1-hidroxiibuprofe, 1.2-dihidroxiibuprofen, 2-iydroxiibuprofen, 2-hidroxi-1.4-quinol, izobutil benzen, si 3-izobutil fenol; <math>k</math> constanta ratei de transformare corespunzatoare fiecarui compus.</p>
Diclofenac	$\frac{\partial Diclofenac}{\partial t} = k_1 - k_4 \quad (\text{Eq.65.})$
	$\frac{\partial D.TP_1}{\partial t} = k_1 - k_2 \quad (\text{Eq.66.})$
	$\frac{\partial D.TP_2}{\partial t} = k_2 - k_3 \quad (\text{Eq.67.})$
	$\frac{\partial D.TP_3}{\partial t} = k_3 \quad (\text{Eq.68.})$
	$\frac{\partial D.TP_4}{\partial t} = k_4 - k_5 \quad (\text{Eq.69.})$
	$\frac{\partial D.TP_5}{\partial t} = k_5 \quad (\text{Eq.70.})$
	<p>unde <math>D.TP_1, D.TP_2, D.TP_3, D.TP_4</math> and <math>D.TP_5</math> sunt produsii de transformare rezultati precum: 4-hidroxiciclofenac, 4,5-hidroxiciclofenac, N-2,6-diclorofenil hidroxilamine, 5-hidroxiciclofenac, p-benzoquinone imine.</p>
Ketoprofen	$\frac{\partial K.TP_1}{\partial t} = k_2 - k_3 \quad (\text{Eq.71.})$
	$\frac{\partial K.TP_2}{\partial t} = r_3 \quad (\text{Eq.72.})$
	$\frac{\partial K.TP_3}{\partial t} = k_4 - k_5 \quad (\text{Eq.73.})$
	$\frac{\partial K.TP_4}{\partial t} = k_5 \quad (\text{Eq.74.})$
	<p>unde <math>K.TP_1, K.TP_2, K.TP_3</math> and <math>K.TP_4</math> sunt produsii de transformare rezultati precum:: 3-ethylfenilfenilmetan, 3-hidroxfenilfenilmetan, acid 3-hidroxfenilcetoacetic, 2,3-hidroxfenilmetilfenilpropionic acid.</p>

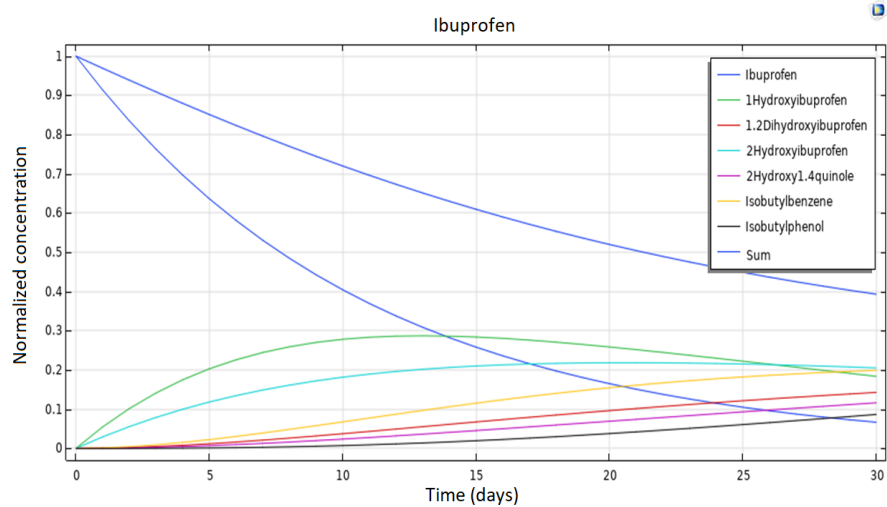
In **Figurile 48-50** sunt prezentate comportamentul ibuprofenului, diclofenacului si al ketoprofenului impreuna cu stabilitatea in timp al produsilor de transformare identificati pentru toate cele trei conditii experimentale testate.



(a.)

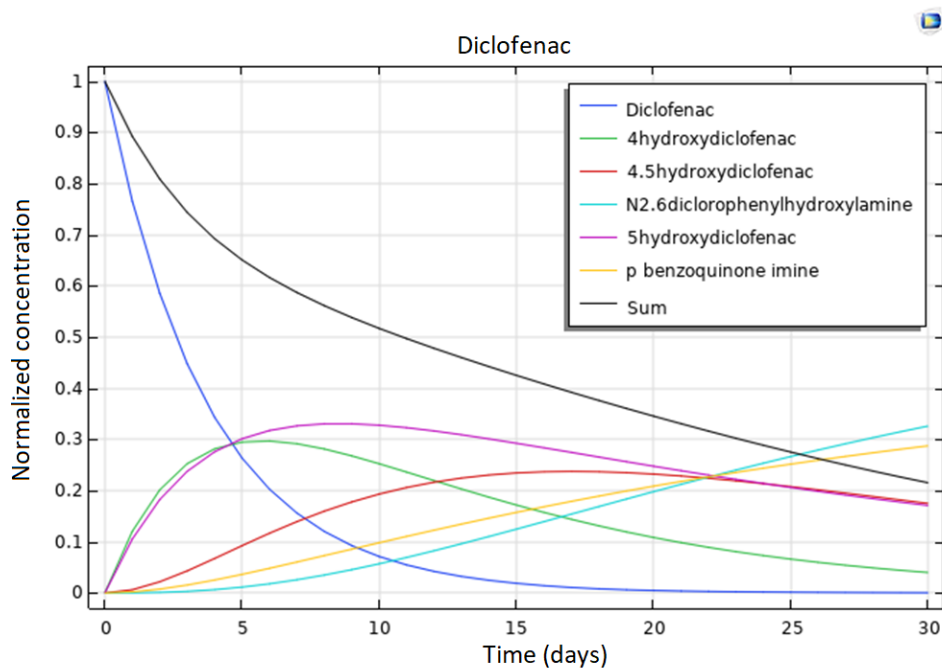


(b.)

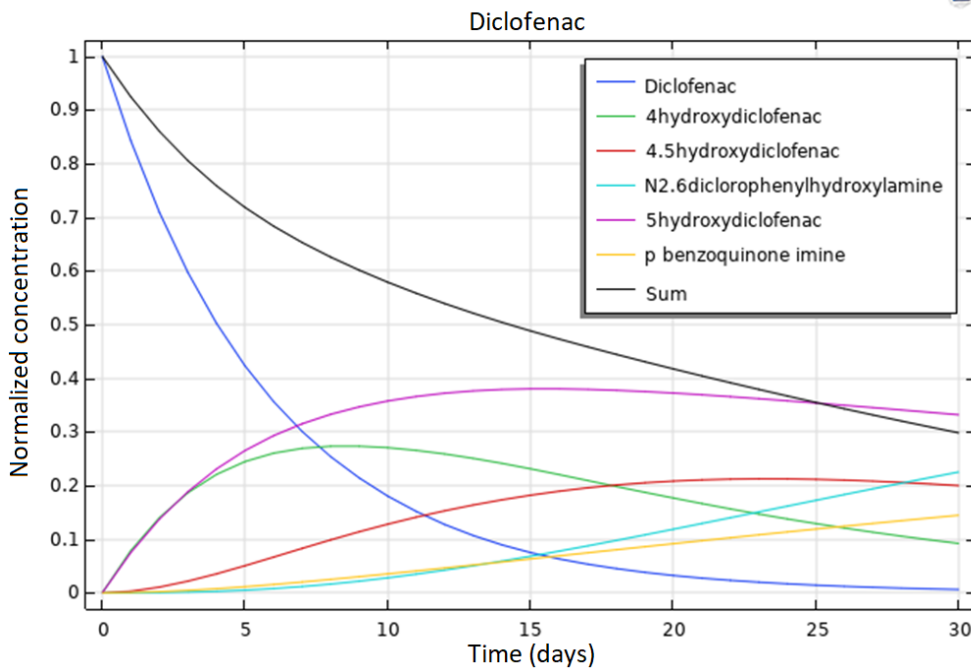


(c.)

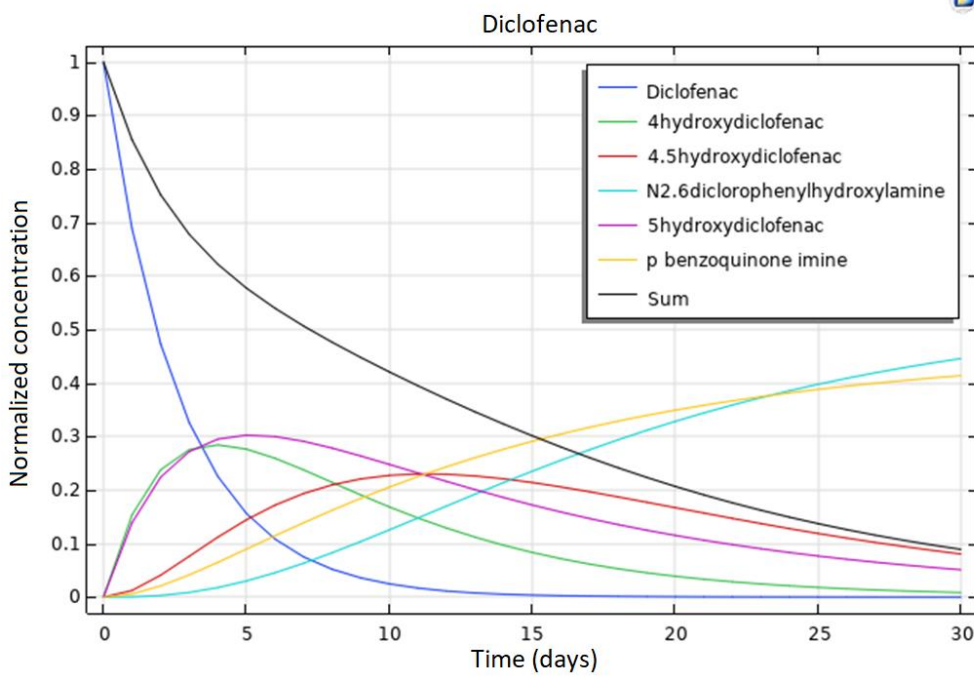
**Figure 48.** Comportamentul ibuprofenului si al produsilor de transformare simulate prin COMSOL. a.) conditii normale; b.) conditii simulate de inundatie; c.) conditii simulate de seceta



(a.)

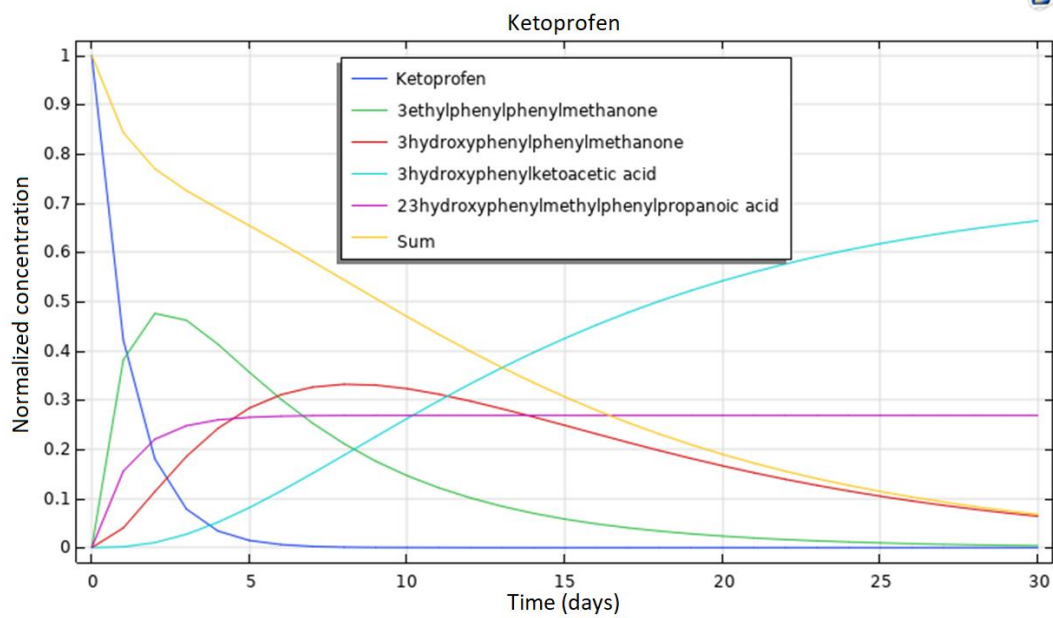


(b.)

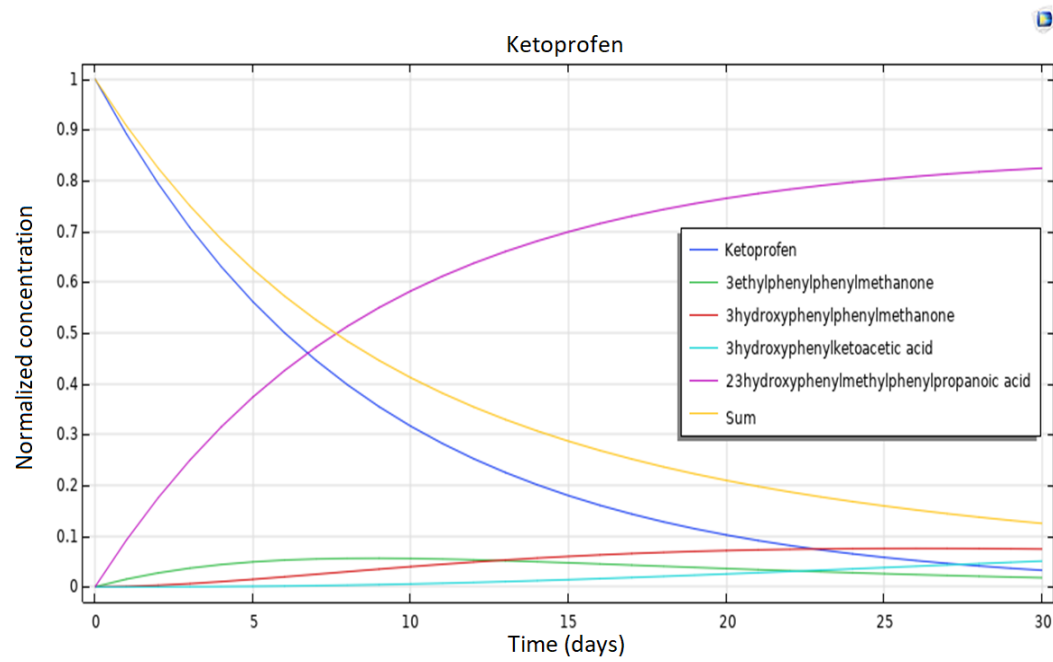


(c.)

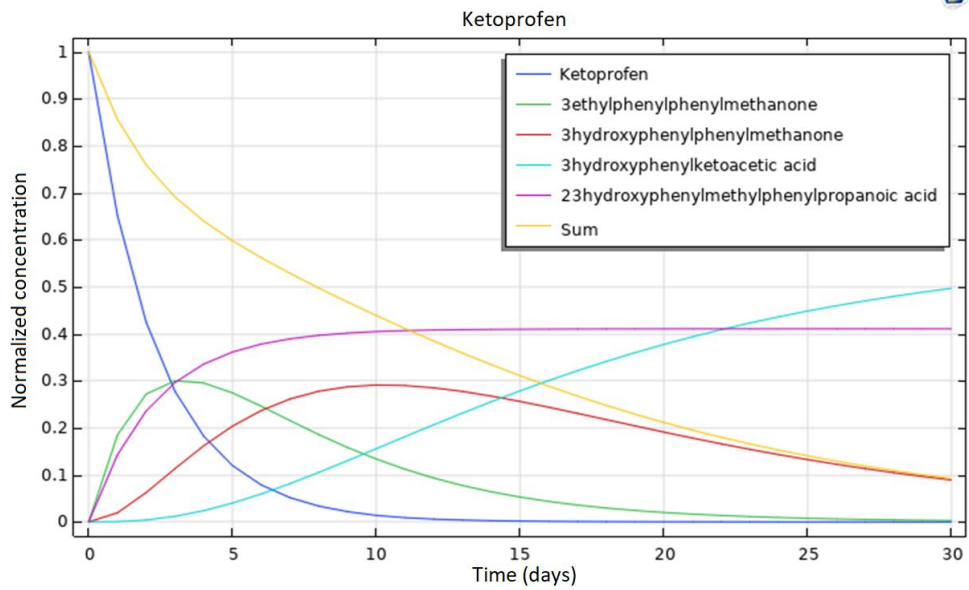
**Figure 49.** Comportamentul diclofenacului si al produsilor de transformare simulate prin COMSOL. a.) conditii normale; b.) conditii simulate de inundatie; c.) conditii simulate de seceta



(a.)



(b.)



(c.)

**Figure 50.** Comportamentul ketoprofenului si al produsilor de transformare simulate prin COMSOL. a.) conditii normale; b.) conditii simulate de inundatie; c.) conditii simulate de seceta

## Chapter 5. Comportamentul NSAIDs (ibuprofen, diclofenac, ketoprofen) in *Lycopersicon esculentum*

Riscul ca sanatatea umana sa fie compromisa creste in zilele noastre. Un mod semnificativ care ar putea contribui la deteriorarea sanatatii este alimentatia. Consumul de alimente potential contaminate ca o consecinta a cresterii si dezvoltarii lor intr-un mediu neadecvat ar putea fi o cauza. Cu toate acestea, translocarea contaminantilor din mediu la subiecti prin lantul trofic este un proces dinamic a carui amplitudine si consecinte sunt greu de estimat in acest moment.

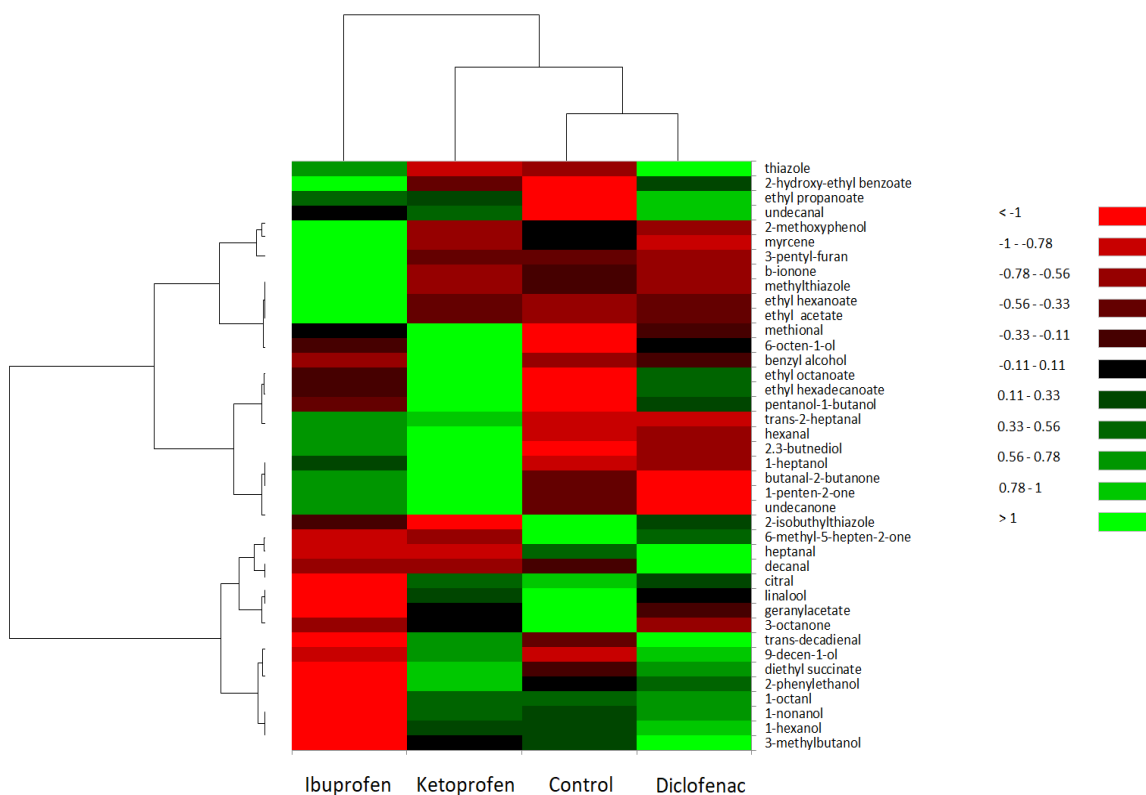
Plantele sunt o componenta importanta atat in dieta umana cat si in cea a animalelor. Desi exista reglementari critice in ceea ce priveste asigurarea calitatii si sigurantei acestora, acestea nu se refera inca in totalitate si la noua generatie de contaminanti, cum sunt de exemplu compusii activoivi farmaceutici. Deoarece planta ar putea fi expusa la contaminanti organici prin multiple cai, toate acestea vor fi luate in considerare in aceasta teza. De asemenea, deoarece datele noastre experimentale despre comportamentul NSAIDs-urilor studiate in principalele compartimente de mediu au relevat clar potentiala transformare a acestora, in experimentele pe plante expuse la NSAIDs au fost studiate si produsii de transformare identificati pentru NSAIDs-urile in studio.

### 5.1. Impactul NSAIDs-urilor asupra calitatii fructului *Lycopersicon esculentum*

Calitatea fructelor *Lycopersicon esculentum* a fost evaluata din punct de vedere al continutului de compusi organici volatili responsabili de aroma fructelor, carbohidrati, aminoacizi si esteri metilici ai acizilor grasi.

*Variatia continutului de compusi organici volatili in fructele de tomate:* Dintre compusii organici volatili au fost identificati alcoolii, cetone, aldehide, esteri, terpene, fenoli si altele. In probele martor continutul de compusi alcoolici a fost de 26,4 %, urmat de cetone (19,2 %), terpene (17,9 %), aldehide (15,9 %), fenoli (3,8 %) si esteri (2,1 %). Alti compusi au reprezentat 14,7 %. Spectrul de compusi organici volatili ai fructelor de tomate a fost diferit atunci cand plantele au fost expuse la NSAIDs-urile studiate. In **Figura 67** este prezentata diferentierea continutului de compusi organici volatili din fructele *Lycopersicon esculentum* crescute in mediu contaminat

raportat la control. S-a observat o diferentiere semnificativa in cazul contaminarii cu ibuprofen. Scaderi de pana la 34 % si 24 % au fost identificate pentru 1-hexanol si 3-metilbutanol. Dar, prezenta acestor alcooli a crescut cu 13% atunci cand *Lycopersicon esculentum* a fost expus la diclofenac. Dintre cetone, 1-penten-2-ona a prezentat modificari minore in prezenta diclofenacului, in timp ce in prezenta ibuprofenului si a ketoprofenului concentratia sa din fructele de rosii a crescut cu 44 %, respectiv 65 %. Continutul 6-metil-5-hepten-2-ona scade semnificativ in prezenta NSAIDs studiate (ibuprofen 70 %, ketoprofen 67 %, diclofenac 27 %). Scaderi au fost identificate chiar si in cazul terpenelor reprezentative.

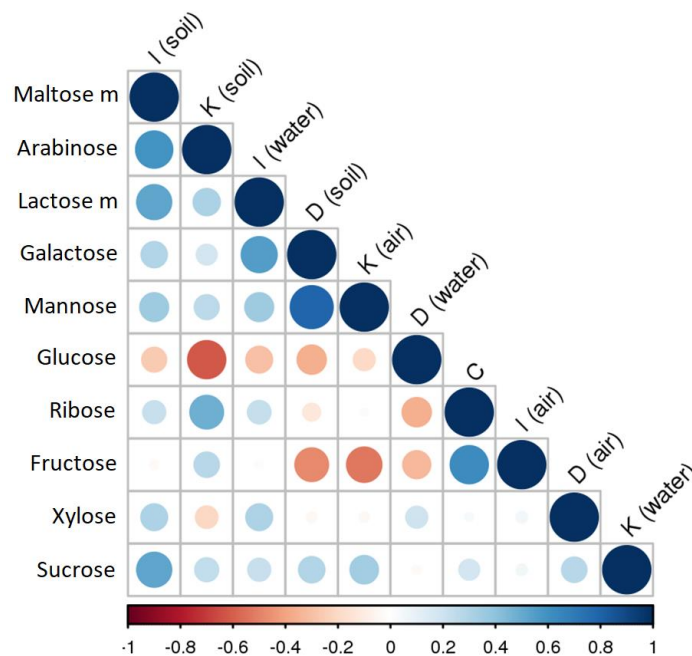


**Figure 67.** Diferentierea continutului de compusi organici volatili in fructele de tomate crescute in prezenta NSAIDs-urilor

*Variatia continutului de carbohidrati in fructele de tomate:* Ca si in cazul compusilor organici volatili, profilul carbohidratilor se modifica atunci cand au fost cultivate in medii contaminate diferite.



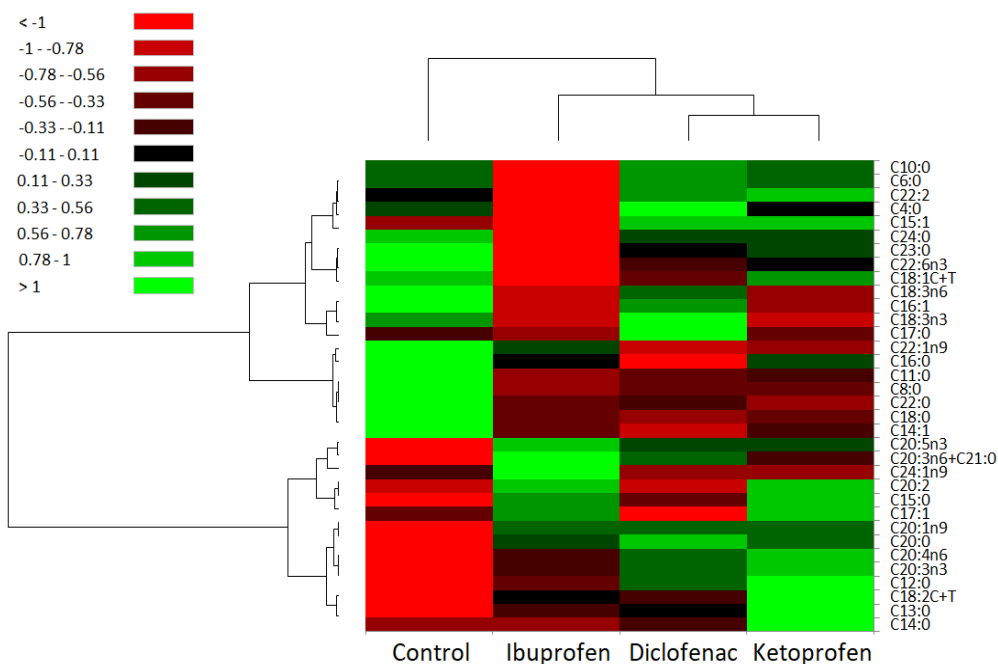
In **Figura 68** sunt prezentate modificarile care au fost identificate pentru fiecare conditie studiata. Scaderea in continut s-au observat in cazul glucozei, fructozei si xilozei mai ales cand planta de tomate a fost in contact cu mediu contaminat cu ketoprofen (sol si precipitatie contaminata), cu diclofenac (sol si apa contaminate) si ibuprofen (sol contaminat).. S-a observat o crestere a continutului de galactoză atunci cand planta de tomate a fost in contact cu apa contaminata cu ibuprofen. In mod similar, continutul de zaharoza a crescut in prezenta solului contaminat cu ibuprofen.



**Figure 68.** Matricea de corelare dintre continutul de carbohidrati din fructul de tomate expus la NSAIDs-urile studiate

*Variatia continutului de esteri metilici ai acizilor grasi (FAME) in fructele de tomate:* Dintre acest grup de compusi, C14:0 (acid miristic), C16:0 (acid palmitic), C18:1C+T, C18:2C+T (acid elaidic), C18:3n6 (acid g-linolenic), C18:3n3 (acid g-linolenic) si C24:0 (acid lignoceric) au fost identificate in cantitate predominanta. Cu corelatia heatmap (**Figura 69**) s-a evidentiat modificari ale profilului FAME atunci cand *Lycopersicon esculentum* a fost in contact cu diclofenac, ibuprofen si ketoprofen. S-au observat modificari semnificative in prezenta ibuprofenului daca raportam continutul FAME cu cel obtinut din analiza probei de control. In acest

caz, continutul de FAME a scazut cu aproximativ 43 % comparativ cu controlul. Desi diferit de control, profilul FAME al plantelor de tomate expuse la diclofenac si ketoprofen a fost comparabil.



**Figure 69.** Diferentierea continutului de esteri metilici ai acizilor grasi in fructele de tomato crescute in prezenta NSAIDs-urilor

*Variatia continutului de aminoacizi la fructele de tomate:* Acidul glutamic, alanina, lizina, valina si leucina au fost detectate in cantitati reprezentative in fructele de tomate. Cantitatea lor a reprezentat aproximativ 60 % din continutul total de aminoacizi identificati. Acidul glutamic a scazut in cazul expunerii la ketoprofen, in timp ce in cazul expunerii la diclofenac sau ibuprofen s-au observat modificari minore. Cantitatea de alanina a crescut in prezenta tuturor NSAIDs-urilor studiate (21 % – expunere la ketoprofen, 18 % – expunere la ibuprofen si 7 % in cazul expunerii la diclofenac), mai ales cand contaminarea a fost efectuata pe calea solului. Scaderea cantitatii de acid aspartic (7 %) si lizina (5 %) a fost determinata in experimente pe rosii cand aceasta a fost expusa la contaminarea cu diclofenac. Continutul de arginina a crescut cu aproximativ 11% in prezenta ibuprofenului, in timp ce in prezenta diclofenacului a scazut cu 9 % in comparatie cu probele martor.

## **5.2. Modelarea factorului de bioconcentrare al NSAIDs in fructul *Lycopersicon esculentum* considerand dinamica lor de crestere fruit**

Este o presupunere larg acceptata de comunitatea stiintifica conform careia compusii activi farmaceutici ar putea fi absorbiti de plante. Preocuparile sunt amplificate de aportul constant al acestor ingrediente active in mediul din intreaga lume si din cauza potentialului efect advers care ar putea avea ca rezultat organismele nevizate care consuma aceste plante prin dieta lor comuna. Detectarea si cuantificarea analitica atat a ingredientelor active farmaceutice, cat si a produsilor de transformare aferente acestora este dificila, laborioasa si implica costuri semnificative. Prin urmare, modelarea numerica ar putea fi o solutie care sa permita estimarea continutului de NSAIDs care ar putea ajunge la o planta care este relevanta pentru dieta unui organism viu. Astfel, modelul numeric aplicat in cele ce urmeaza, care permite estimarea bioconcentratiei compusilor activi NSAIDs studiate in fructele *Lycopersicon esculentum* a fost implementat pe baza datelor experimentale obtinute.

### **NSAIDs modelling framework in *Lycopersicon esculentum* fruit**

Prin aceasta teza, modelul dezvoltat de Xiao si colab., [385] care a fost destinat tuberculului de cartofi, a fost modificat si implementat pentru fructul *Lycopersicon esculentum* folosind datele experimentale prezentate anterior. Au fost efectuate simulari pentru fiecare compus active farmaceutic studiat si pentru fiecare mod de expunere studiat.

*Descrierea conceptuala al modelului:* Modelul utilizat este construit pe trei parti majore. Primul se refera la ecuatia diferentia partiala (PDE) care descrie limita dinamica in miscare a „sferei” fructelor *Lycopersicon esculentum* – cresterea fructelor de tomate. In acest caz, se presupune ca difuzia NSAIDs-ului are loc impreuna cu raza sferei fructelor de tomate. A fost aplicata functia logistica propusa de Xiao et al., [385]. Aceasta imita difuzia unei substante chimice dintr-un mediu contaminat in fructul comestibil al unei plante (si anume tuberculul de cartofi). PDE utilizata descrie comportamentul unei substante chimice organice intr-o sfera pe baza razei sferei, timpului, si al granitei in miscare a sferei studiate. Acesta, in ansamblu, are rolul de a simula dezvoltarea in timp a unui fruct *Lycopersicon esculentum*. Datele despre absorbtia NSAIDs de

catre fructele de tomato au fost obtinute din experimente efectuate pe plante de tomate expuse la diclofenac, ibuprofen si ketoprofen prin mai multe compartimente de mediu. Aceste date obtinute, au fost importate in continuare in modelul sfera dinamica pentru a obtine solutii numerice ale PDE implementate prin rsoftware-ul MATLAB (MATLAB, versiunea R2013b).

A doua parte este forma integrala a modelului propus care permite estimarea absorbtiei ingredientelor active NSAIDs si a factorului de bioconcentrare pentru fructul *Lycopersicon esculentum* studiat. In acea sectiune, concentratia NSAIDs-urilor a fost integrata de-a lungul razei presupuse a sferei fructelor de tomate. Acest lucru a permis estimarea concentratiei compusilor activi farmaceutici care s-a difuzat cu timpul in fructele de rosii.

In cea de-a treia parte a modelului, datele estimate obtinute sunt comparate cu cele obtinute din realizarea unui model clasic (model de difuzie). Factorul de bioconcentrare al compusilor activi farmaceutici studiat pentru fructele *Lycopersicon esculentum* este descris matematic conform cu (Ec.90.) unde acesta este definit in raport cu timpul (dinamic) in loc de raportul la starea de echilibru.

$$BCF^c(t) \equiv \frac{C_{Tomato}^c(t)}{C_{environment}^c(t)} \quad (\text{Eq.90.})$$

*Descrierea modelului cu granita variabila (dinamica):* Ipoteza principala a acestui model este ca toate fructele (inclusiv fructele *Lycopersicon esculentum*) urmeaza o functie de crestere logistica prin dezvoltarea sa in timp pana la atingerea maturitatii. Din acest motiv, este posibil ca procesul de absorbtie al compusilor activi NSAIDs sa fie influentat. Prin urmare, conform celor propuse de Xiao et al., [385] difuzia pasiva a compusilor activi NSAIDs prin sfera de tomate ar putea fi descrisa conform (Eq.91.) si (Eq.92.) care implica exprimarea matematica a unui model de difuzie radiala simpla:

$$\frac{\partial C_{Tomato}(r, t)}{\partial t} = 0; 0 \leq t \leq t_{contam}; 0 \leq r \leq r_{Tomato}(t) \quad (\text{Eq.91.})$$

$$\frac{\partial C_{Tomato}(r, t)}{\partial t} = D_{Tomato}^{adjusted} \cdot \left( \frac{\partial^2 C_{Tomato}(r, t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{\partial C_{Tomato}(r, t)}{\partial r} \right) - k_{d.Tomato} \cdot C_{Tomato}(r, t); t \geq t_{contam}; ; 0 \leq r \leq r_{Tomato}(t) \quad (\text{Eq.92.})$$

Expresiile matematice care fac legatura cu mediul contaminat sunt descise in (Eq.93.) si (Eq.94.):

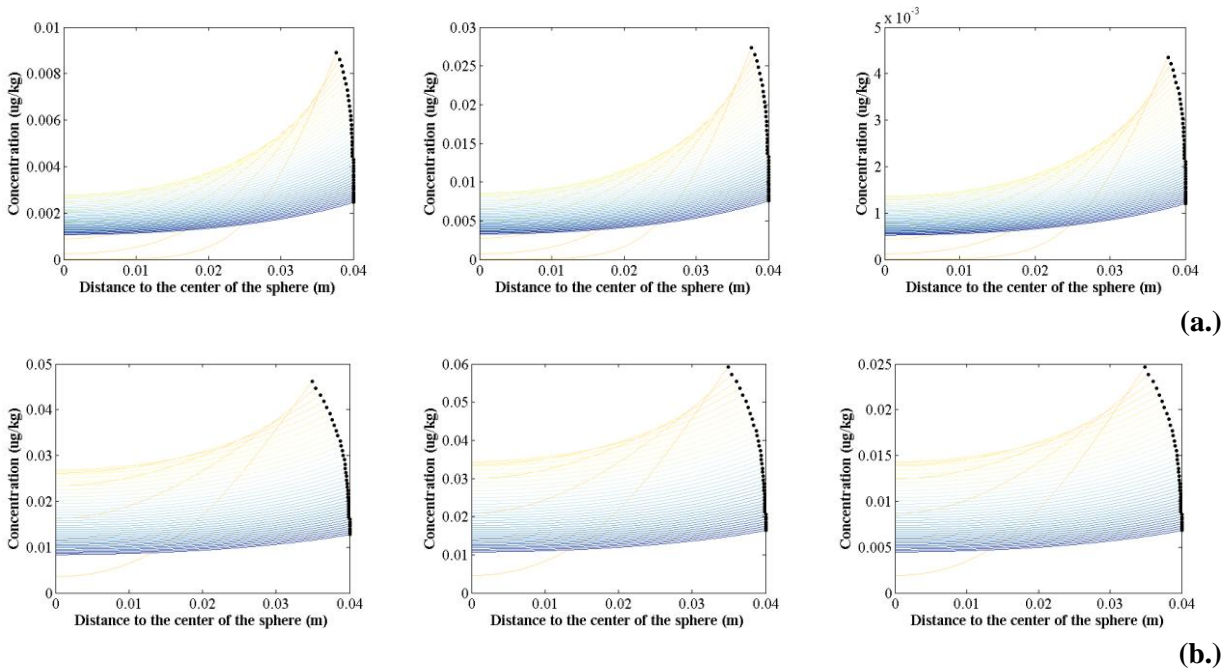
$$C(r, t) = 0; 0 \leq t \leq t_{contam} \quad (\text{Eq.93.})$$

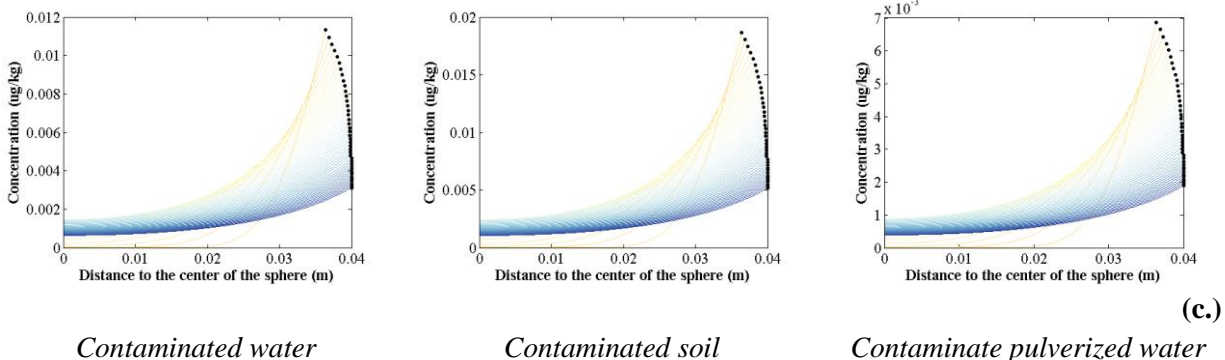
$$C(r, t) = \begin{cases} C_{Tomato}(r, t); r < r_{Tomato}(t); \text{ this describe what hapen inside of the tomato} \\ \left( \frac{K_{Tomato,enviro1}}{K_{enviro1,enviro2}} \right) \cdot C_{enviro}(t); \text{ this describe the surface of tomato}; t \geq t_{contam} \\ C_{enviro}(t); r > r_{Tomato}(t); \text{ this describe what hapens at outside of the tomato} \end{cases} \quad (\text{Eq.94.})$$

*Date de intrare:* Datele numerice utilizate in acest model au fost fie obtinute din experimente efectuate in laborator (descrise anterior).

### Concentratia de NSAID difuzat in fructul *Lycopersicon esculentum* fruit

In **Figura 70** sunt prezentate rezultatele obtinute in urma simularii difuziei compusilor activi NSAIDs studiatii prin fructul *Lycopersicon esculentum*.





*Contaminated water*                      *Contaminated soil*                      *Contaminate pulverized water*  
**Figure 70.** NSAIDs diffusion through *Lycopersicon esculentum* fruit moving-boundary exposed through different media. **(a.)** Diclofenac; **(b.)** Ibuprofen; **(c.)** Ketoprofen

Datele au aratat ca ibuprofenul difuzeaza usor prin fructele de tomate atunci cand plantele cresc in sol contaminat sau sunt udate cu apa contaminata (Figura 70.b.). Cantitatea maxima de ibuprofen difuzat a fost de  $0,0586 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (crestere in sol contaminat). Rata de difuzie a diclofenacului a fost de trei ori mai mare atunci cand *Lycopersicon esculentum* a fost cultivat in sol contaminat ( $0,0284 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , Figura 70.a.) comparativ cu contaminarea prin udare ( $0,0087 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Ketoprofenul a aratat o rata de difuzie scazuta in comparatie cu celelalte doua NSAIDs-uri studiate, cantitatea maxima a fost identificata a fi de  $0,0174 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  in cazul in care mediul contaminat este solul (Figura 70.c.). Pentru fiecare AINS a fost determinate o rata de difuzie scazuta atunci cand contaminarea a fost efectuata prin pulverizarea de vapori de apa.

Datele simulate sunt apropiate de datele experimentale (coeficienti de corelatie  $> 0,688$ ). Datele experimentale sunt necesare pentru stabilirea corecta a parametrilor componente ai modelului ca  $k_d$  atat atunci cand ne referim la atenuarea concentratiei de NSAIDs in mediu si in organismele vii precum *Lycopersicon esculentum*. Oricum, potentialul de transformare al compusilor activi farmaceutici trebui introdusa in model, mai ales atunci cand ne referim la compusi care sunt foarte bioactivi si sufera mai multe modificari atat in mediu, cat si in organismul viu. Oricum, acest model ar trebui testat pentru alti contaminanti. Astfel de date si modele sunt importante pentru a imbunatati protectia starii de sanatate a organismelor vii fata de provocarile generate de prezenta si varietatea crescuta de substante chimice din mediul inconjurator in momentul actual.

## Capitolul 6. Concluzii generale

In aceasta teza, comportamentul ibuprofenului, diclofenacului si al ketoprofenului au fost evaluate intr-un sistem viu netinta – *Lycopersicon esculentum* si mediile prin intermediul carora acesta poate sa se contamineze.

In experimentele efectuate pe medii de apa de suprafata, a fost evaluata influenta proceselor biotice, abiotice si de sorbtie asupra comportamentului diclofenacului, ibuprofenului si ketoprofenului. Datele experimentale obtinute au fost utilizate in continuare pentru a clasifica numeric participarea fiecarui proces la atenuarea concentratiei NSAIDs-urilor studiate in mediul acvatic. Ca abordare numerica, sa aplicat modelarea ecuatiilor structurale (SEM) combinat cu modelul corelarii partiale prin metoda celor mai mici patrate (PLS-PM). Dupa fiecare caz a fost propusa o diagrama de comportament. Acestea au fost testate statistic prin mai multi parametrii iar rezultatele obtinute au fost considerate satisfacatoare.

In experimentele de evaluare a comportamentului NSAIDs-urilor in sol, s-a stabilit corelatia acestora cu proprietatile fizico-chimice ale solului, abundenta structurii fenotipice a microbiotei si starea de anomalii meteorologice simulate. Rezultatele obtinute au evidentiat o corelatie negativa intre rata de atenuare a NSAIDs in conditii de seceta sau contaminare cu doze mari NSAIDs. In mod similar, s-a gasit o corelatie pozitiva intre abundenta mai mare a microbiotei solului si scaderea concentratiei de compusii activi farmaceutici. Acest lucru a fost explicat prin faptul ca exista comunitati de microorganisme care sunt capabile sa utilizeze aceste substante chimice ca sursa de carbon in procesele lor metabolice. Aceasta ipoteza a fost sustinuta de produsele de transformare identificati. Folosind datele experimentale obtinute, mecanismul comportarii ibuprofenului, diclofenacului si ketoprofenului a fost propus in termeni de ecuatii de masa, constante de viteza de reactie etc. In continuare acestea au fost simulate folosind modelul de transport si reactie prin COMSOL.

Atat compusii activi cat si produsele de transformare pot exercita o potentiala influenta *Lycopersicon esculentum*. Acest lucru a fost evaluat experimental si numeric. Experimentele au fost efectuate luand in considerare multiple cai de expunere la NSAIDs, dezvoltarea plantelor de tomate in timp (stadiile Zadock) si compartimentele anatomice ale acestuia. Datele au aratat un potential de acumulare diferentiat in toate cazurile luate in considerare. Dintre NSAIDs studiate,

diclofenacul a fost retinut mai usor de intreaga anatomie a *Lycopersicon esculentum*, in timp ce numai in partea din fruct ibuprofenul a fost acumulat semnificativ. Rezultate similare au fost obtinute si in cazul unor produse de transformare identificati. Datele au aratat, de asemenea, ca mediul de expunere ar putea contribui la potentialul de acumulare al compusilor activi NSAIDs in diferite compartimente anatomice ale plantei de tomate. Dintre acestea, solul si apa au fost contributorii reprezentativi pentru potentialul crescut de absorbtie a NSAIDs de catre rosii. Au fost studiate influenta acestor produse farmaceutice asupra calitatii fructelor de rosii in ceea ce priveste continutul de compusi organici volatili, continutul de aminoacizi, continutul de carbohidrati si continutul de esteri metilici ai acizilor grasi. Rezultatele evidentiaza ca exista compusi care in prezenta acestor produse farmaceutice ar putea creste in cantitate, in timp ce altii scad. Modelul Xiao a fost modificat pentru a simula numeric difuzia NSAID intr-un fruct de rosii in crestere. Datele estimate obtinute au fost corelate cu cele rezultate dintr-un model clasic de difuzie in care s-a neglijat cresterea in volum a fructelor de tomate din cauza procesului de crestere.



## Referinte bibliografice (selectie)

- [4] Stuer-Lauridsen F., Birkved M., Hansen LP., Luthoft HC., Sorensen H. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere*, 40(7):783-793, **2000**. Doi: 10.1016/S0045-6535(99)00453-1
- [5] Tranter D. Pharmaceutical science and technology today: evolving to reflect the modern industrial life-science environment. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(12): 399-400, **2000**. Doi: 10.1016/S1461-5347(00)00320-5
- [6] Stan HJ., Heberer T., Linkenhagner M. Vorkommen von clofibrinsäure im gewässersystem-ist der humanmedizinische gebrauch ursache für die contamination von oberflächen, ground-und trinkwasser. *Vom Wasser*, 85:57-68, **1994**.
- [7] Waleng NJ., Nomngongo PN. Occurrence of pharmaceuticals in the environmental waters: African and Asian perspectives. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 4:50-66, **2022**. Doi: 10.1016/j.enceco.2021.11.002
- [8] Ramirez-Morales D., Masis-Mora M., Montiel-Mora JR., Cambronero-Heinrichs JC., Perez-Rojas G., Tormo-Budowski R., Mendez-Rivera M., Briceno-Guevara S., Gutierrez-Quiros JA., Arias-Mora V., Brenes-Alfaro L., Beita-Sandi W., Rodriguez-Rodriguez EC. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in water samples by liquid chromatography-mass spectrometry: quality assessment and application to the risk assessment of urban-influenced surface waters in a metropolitan area of Central America. *Process Safety and Environmental Protection*, 153:289-300, **2021**. Doi: 10.1016/j.psep.2021.07.025
- [9] Jameel Y., Valle D., Kay P. Spatial variation in the detection rates of frequently studied pharmaceuticals in Asian, European and North American rivers. *Science of The Total Environment*, 724:137947, **2020**. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137947
- [10] Khan KH., Rehman MYA., Malik RN. Fate and toxicity of pharmaceuticals in water environment: an insight on their occurrence in South Asia. *Journal of Environmental Management*, 271:111030, **2020**. Doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111030
- [11] Li Y., Zhang L., Ding J., Liu X. Prioritization of pharmaceuticals in water environment in China based on environmental criteria and risk analysis of top-priority pharmaceuticals. *Journal of Environmental Management*, 253:109732, **2020**. Doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109732
- [12] Fekadu S., Alemayehu, Dewil R., Bruggen BV. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environment: a comparison of the African and European challenge. *Science of The Total Environment*, 654:324-337, **2019**. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.072
- [13] Richardson BJ., Lam KSP., Martin M. Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Marine Pollution Bulletin*, 50(9):913-920, **2005**. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.06.034
- [15] Vane HC., Kim AW., Lopes dos Santos RA., Moss-Hayes V. Contrasting sewage, emerging and persistent organic pollutants in sediment cores from the River Thames estuary, London, England, UK. *Marine Pollution Bulletin*, 175:113340, **2022**. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113340
- [16] Katsikaros AG., Chrysikopoulos CV. Occurrence and distribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) detected in lakes around the world – a review. *Environmental Advances*, 6:100131, **2021**. Doi: 10.1016/j.envadv.2021.100131
- [17] Mejias C., Martin J., Santos JL., Aparicio I., Alonso E. Occurrence of pharmaceuticals and their metabolites in sewage sludge and soil: a review on their distribution and environmental risk assessment. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 30:e00125, **2021**. doi: 10.1016/j.teac.2021.e00125

- [18] Quaik S., Embrandiri A., Ravindran B., Hossain K., Al-Dhabi NA., Arasu MV., Ignacimuthu S., Ismail N. Veterinary antibiotics in animal manure and manure laden soil: Scenario and challenges in Asian countries. *Journal of King Saud University – Science*, 32(2):1300-1305, **2020**. Doi: 10.1016/j.ksus.2019.11.015
- [19] Battaglin WA., Bradley PM., Iwanowicz L., Journey CA., Walsh HL., Blazer VS. Pharmaceuticals, hormones, pesticides, and other bioactive contaminants in water, sediment, and tissue from Rocky Mountain National Park, 2012–2013. *Science of The Total Environment*, 643:651-673, **2018**. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.150
- [20] Al-Khazraji OS., Boxall ABA. Risk-based prioritization of pharmaceuticals in the natural environment in Iraq. *Environmental Science and Pollution Research*, 23:15712-15726, **2016**. Doi: 10.1007/s11356-016-6679-0
- [21] Wohde M., berkner S., Junker T., Konradi S., Schwartz L., During RA. Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: a literature review. *Environmental Sciences Europe*, 28:23, **2016**. Doi: 10.1186/s12302-016-0091-8
- [22] Golbaz S., Yaghmaeian K., Isazadeh S., Zamanzadeh M. Environmental risk assessments of multiclass pharmaceutical active compounds: selection of high priority concern pharmaceuticals using entropy-utility functions. *Environmental Science and Pollution Research*, 28:59745-59770, **2021**. Doi: 10.1007/s11356-021-14693-w
- [23] Schwartz S., Gildemeister D., Hein A., Schroder P., Bachmann J. Environmental fate and effects assessment of human pharmaceuticals: lessons learnt from regulatory data. *Environmental Science Europe*, 33:68, **2021**. Doi: 10.1186/s12302-021-00503-0
- [24] Zhou H., Zhang Q., Wang X., Zhang Q., Ma L., Zhan Y. Systematic screening of common wastewater-marking pharmaceuticals in urban aquatic environments: implications for environmental risk control. *Environmental Science and Pollution Research*, 21:7113-7129, **2014**. Doi: 10.1007/s11356-014-2622-4
- [25] Lin K., Bondarenko S., Gan J. Sorption and persistence of wastewater-borne psychoactive and antilipidemic drugs in soils. *Journal of Soils and Sediments*, 11:1363-1372, **2011**. Doi: 10.1007/s11368-011-0421-9
- [26] Araujo L., Wild J., Villa N., Camargo N., Cubillan D., Prieto A. Determination of anti-inflammatory drugs in water samples, by in situ derivatization, solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 75(1): 111-115, **2008**. Doi: 10.1016/j.talanta.2007.10.035
- [27] Gworek B., Kijenska M., Wrzosek J., Graniewska M. Pharmaceuticals in the soil and plant environment: a review. *Water, Air and Soil Pollution*, 232:145, **2021**. Doi: 10.1007/s11270-020-04954-8
- [28] Sun M., Lin H., Guo W., Zhao F., Li J. Bioaccumulation and biodegradation of sulfamethazine in *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Ocean University of China*, 16:1167-1174, **2017**. Doi: 10.1007/s11802-017-3367-8
- [29] Orias F., Simon L., Perrodin Y. Respective contributions of diet and medium to the bioaccumulation of pharmaceutical compounds in the first levels of an aquatic trophic web. *Environmental Science and Pollution Research*, 22:20207-20214, **2015**. Doi: 10.1007/s11356-015-5243-7
- [30] Gomez E., Bachelot M., Boillot C., Munaron D., Chiron S., Casellas C., Fenet H. Bioconcentration of two pharmaceuticals (benzodiazepines) and two personal care products (UV filters) in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) under controlled laboratory conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 19:2561-2569, **2012**. Doi: 10.1007/s11356-012-0964-3
- [31] Huerta B., Rodriguez-Mozaz S., Barcelo D. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404:2611-2624, **2012**. Doi: 10.1007/s00216-012-6144-y

- [152] Madikizela LM., Chimuka L. Simultaneous determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in wastewater using solid-phase extraction with high performance liquid chromatography. *Water SA*, 43(2), **2017**. Doi: 10.4314/wsa.v43i2.10
- [250] Wang X., Chen Z., Shen J., Kang J., Zhang X., Li J., Zhao X. Effect of carbon source on pollutant removal and microbial community dynamics in treatment of swine wastewater containing antibiotics by aerobic granular sludge. *Chemosphere*, 260:127544, **2020**.
- [363] Beek TAD., Weber FA., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Kuster A. Pharmaceuticals in the environment – global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4):823-835, **2016**. doi:/10.1002/etc.3339
- [369] Maculewicz J., Kowalska D., Swiacka K., Tonski M., Stepnowski P., Bialk-Bielinska A., Dolzenek J. Transformation products of pharmaceuticals in the environment: their fate, (eco)toxicity and bioaccumulation potential. *Science of The Total Environment*, 802:149916, **2022**. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149916
- [371] Klätte S., Schaefer HC., Hempel M. Pharmaceuticals in the environment – a short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5:61-66, **2017**. doi: 10.1016/j.scp.2016.07.001
- [372] Tena M., Perez M., Solera R. Benefits in the valorization of sewage sludge and wine vinasse via a two-stage acidogenic-thermophilic and methanogenic-mesophilic system based on the circular economy concept. *Fuel*, 296:120654, **2021**. doi: 10.1016/j.fuel.2021.120654
- [373] Elmi A., Al-Khaldy A., Alolayan M. Sewage sludge lad application: balancing act between agronomic benefits and environmental concerns. *Journal of Cleaner Production*, 250:19512, **2020**. doi: 10.1016/j.jclepro.2019.119512
- [374] Woltersdorf L., Zimmermann M., Deffner J., Gerlach M., Leibr S. Benefits of an integrated water and nutrient reuse system for urban areas in semi-arid developing countries. *Resources, Conservation and Recycling*, 128:382-393, **2018**. doi: 10.1016/j.resconrec.2016.11.019
- [375] Molinos-Senante M., Hernandez-Sancho F., Sala-Garrido R. Cost-benefit analysis of water-reuse projects for environmental purposes: a case study for Spanish wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management*, 92(12):3091-3097, **2011**. doi: 10.1016/j.jenvman.2011.07.023
- [376] Hafeez MM., Bouman BAM., Giesen NV., Mushtaq S., Vlek P., Khan S. Water reuse and cost-benefit of pumping at different spatial levels in a rice irrigation system in UPRIIS, Philippines. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 33(1-):115-126, **2008**. doi: 10.1016/j.pce.2007.04.011
- [377] Pei Y., Tong Y., Li H., You J. In-situ biological effects, bioaccumulation, and multimedia distribution of organic contaminants in a shallow lake. *Journal of Hazardous Materials*, 427:128143, **2022**. Doi: 10.1016/j.hazmat.2021.128143
- [378] Eysseric E., Gagnon C., Segura P.A. Uncovering transformation products of four organic contaminants of concern by photodegradation experiments and analysis of real samples from a local river. *Chemosphere*, 293:133408, **2022**. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133408
- [379] Chao H., Sun M., Wu Y., Xia R., Yuan S., Hu F. Quantitative relationship between earthworms' sensitivity to organic pollutants and the contaminants' degradation in soil: a meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 429:128286, **2022**. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.128286

- [380] Buell MC., Drouillard K., Metcalfe CD. Ecotoxicological risks from dissolved organic contaminants in a contaminated bay: combining passive sampling with in vivo bioassays. *Journal of Great Lakes Research*, 47(5):1365-1375, **2021**. Doi: 10.1016/j.jglr.2021.07.001
- [381] Tian Z., Wark DA., Bogue K., James CA. Suspect and non-target screening of contaminants of emerging concern I streams in agricultural watersheds. *Science of The Total Environment*, 795:148826, **2021**. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148826
- [382] Kovacs ED., Silaghi-Dumitrescu L., Kovacs MH., Roman C. Determination of the uptake of ibuprofen, ketoprofen, and diclofenac by tomatoes, radishes and lettuce by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Analytical Letters*, 54(1-2):314-330, **2021**.
- [383] McMullin RM., Chen R., Niu S., Matthews W., Murschell T., Wing SR., Hageman KJ. Organic contaminants in imported salmon feed and their effects on reef ecosystems in New Zealand. *Environmental Pollution*, 298:118853, **2022**.
- [385] Xiao S., Gong Y., Li Z., Frantke P. Improving pesticide uptake modelling into potatoes: considering tuber growth dynamics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(12):3607-0616, 2021. Doi: 10.1021/acs.jafc.1c00151
- [425] Mezzelani M., Nardi A., Bernardini A., Milan M., Peruzza L., d'Errico G., Fattorini D., Gorbi S., Patarnello T., Regoli F. Environmental pharmaceuticals and climate change: the case study of carbamazepine in *M. galloprovincialis* under ocean acidification scenario. *Environmental International*, 146:106269, **2021**. Doi: 10.1016/j.envint.2020.106269
- [426] Svecova H., Grabic R., Grabicova K., Stanova AV., Fedorova G., Cerveny D., Turek J., Randak T., Brooks BW. De facto reuse at the watershed scale: seasonal changes, population contribution, instream flows and water quality hazards of human pharmaceuticals. *Environmental Pollution*, 268(Part A):115888, **2021**. Doi: 10.1016/j.envpol.2020.115888
- [427] Tarpani RRZ., Alfonsin C., Hospido A., Azapagic A. Life cycle environmental impacts of sewage sludge treatment methods for resource recovery considering ecotoxicity of heavy metals and pharmaceuticals and personal care products. *Journal of Environmental Management*, 260:109643, **2020**. Doi: 10.1016/j.envman.2019.109643
- [442] Santos JC., Lopes DRG., Silva LCF., Ramos LLJ., Dias RS., Lima SH., Sousa MP., Waldow VA., Paula SO., Ferreira SO., Silva CC. Characterization of the biofilm structure and microbial diversity of sulfate-reducing bacteria from petroleum produced water supplemented by different carbon sources. *Journal of Environmental Management*, 304:114189, **2022**. Doi: 10.1016/j.jenvman.2021.114189
- [443] Cai Y., Yan Z., Ou Y., Peng B., Zhang L., Shao J., Lin Y., Zhang J. Effects of different carbon sources on the removal of ciprofloxacin and pollutants by activated sludge: Mechanism and biodegradation. *Journal of Environmental Sciences*, 111:240-248, **2022**. Doi: 10.1019/j.jes.2021.03.037
- [444] Ratnasari A., Zaidi NS., Syafiuddin A., Boopathy R., Kueh ABH., Prasetyo DD. Prospective biodegradation of organic and nitrogenous pollutants from palm oil mill effluent by acidophilic bacteria and archaea. *Bioresource Technology Reports*, 15:100809, **2021**. Doi: 10.1019/j.biteb.2021.100809
- [445] Mandal A., Dutta A., Das R., Mukherjes J. Role of intertidal microbial communities in carbon dioxide sequestration and pollutant removal: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 170:112626, **2021**. Doi: 10.1019/j.marpolbul.2021.112626
- [446] Aguillar-Romero I., Torre-Zuniga JD., Quesada JM., Haidour A., O'Connell G., McAmmond BM., Hamme JDV., Romero E., Wittich RM., Dillewijn P. Effluent decontamination by the ibuprofen-mineralizing strain, *Sphingopyxis granuli* RW412: Metabolic processes. *Environmental Pollution*, 274:116536, **2021**. Doi: 10.1019/j.envpol.2021.116536

- [447] Waraksa E., Wojtowicz-Zawadka M., Kwiatkowska D., Jaarek A., Malkowska A., Wrzesien R., Namiesnik J. Simultaneous determination of ibuprofen and its metabolites in complex equine urine matrices by GC-EI-MS in excretion study in view of doping control. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 152:279-288, **2018**. 10.1016/j.jpba.2018.02.004
- [448] Waraksa E., Wozniak MK., Banaszkiwicz L., Klodzniska E., Ozimek M., Wrzesien R., Bobrowska-Korczak B., Namiesnik J. Quantification of unconjugated and total ibuprofen and its metabolites in equine urine samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry: Application to the excretion study. *Microchemical Journal*, 150:104129, **2019**.
- [449] Tsikas D., Kayacelebi AA., Hanff E., Mitschke A., Beckmann B., Tiilann HC., Gutzki FM., Muller M., Bernasconi C. GC–MS and GC–MS/MS measurement of ibuprofen in 10- $\mu$ L aliquots of human plasma and mice serum using [ $\alpha$ -methyl- $^2$ H $_3$ ]ibuprofen after ethyl acetate extraction and pentafluorobenzyl bromide derivatization: Discovery of a collision energy-dependent H/D isotope effect and pharmacokinetic application to inhaled ibuprofen-arginine in mice. *Journal of Chromatography B*, 1043:158-166, 2017. Doi: 10.1016/j.jchromb.2016.06.014
- [450] Weigel S., Berger U., Jensen E., Kallenborn R., Thoresen H., Huhnerfuss H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6):583-592, **2004**. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.04.018