

CUPRINS

INTRODUCERE	3
PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOA TERII ÎN DOMENIU	4
CAPITOLUL I – Surfactan i: tipuri, utiliz ri i ecotoxicitate	4
CAPITOLUL II - Biomarkeri ai stresului oxidativ la pe ti	6
CAPITOLUL III – Acte normative care reglementeaz regimul detergen ilor in mediul acvatic	7
PARTEA II – CONTRIBU II ORIGINALE	7
CAPITOLUL IV – Controlul analitic al surfactan ilor cationici i amfoterici	8
CAPITOLUL V – Evaluarea biodegradabilit ii	9
CAPITOLUL VI – Evaluarea toxicit ii asupra unor specii de organisme acvatice	13
CAPITOLUL VII – Evaluarea stresului oxidativ indus de expunerea la surfactan ii cationici i amfoterici	18
CAPITOLUL VIII - Evaluarea modific rilor histologice	27
CAPITOLUL IX - Caracterizarea riscului acvatic	28
CONCLUZII GENERALE	31
LISTA PUBLICATIILOR	37
BIBLIOGRAFIE SELECTIV	39

INTRODUCERE

În cadrul industriei chimice, industria de detergenți a fost întotdeauna o industrie competitivă, cu o mare deschidere pentru inovație și spre creșterea economică. În ultimul secol a fost și va continua să fie, un factor cheie pentru progresul societății. Aceasta este industria responsabilă pentru creșterea nivelului de igienă al oamenilor și al spațiilor locuite de aceștia și în același timp pentru reducerea timpului și efortului necesar îndeplinirii acestui scop. Consumul crescând de detergenți a contribuit la mărirea concentrațiilor acestora în rețeaua de canalizare a orașelor și implicit, la impurificarea apelor de suprafață, dar și la crearea unor depozite de deșeuri solide atât în faza de fabricare și utilizare cât și în faza de „sfârșit de viață” al produselor.

Cele mai importante substanțe chimice din compoziția produselor de curățat – agenții de suprafață (surfactanți) se încadrează în categoria chimicale HPV (high-production-volume) și sunt responsabili pentru influența detergenților asupra factorilor de mediu. După utilizare, detergenții sunt eliminați în apele uzate fără să sufere modificări structurale, ceea ce face ca agenții de suprafață să-și păstreze proprietățile superficiale și deci ecotoxicitatea.

În acest context, prezenta teză de doctorat abordează o tematică de mare actualitate și noutate atât la nivel național, cât și al Uniunii Europene și anume **implementarea celei mai importante reglementări legislative europene privind detergenții și produsele de curățat – Regulamentul European CE nr. 648/2004** și amendamentele sale ulterioare, prin care sunt stabilite reguli stricte privind libera circulație a detergenților pe piața U.E. Actualul Regulament impune producătorilor/ importatorilor/ distribuitorilor de detergenți și produse de curățat, să furnizeze, prin intermediul fișelor cu date de securitate, informații privind biodegradabilitatea agenților de suprafață și riscul generat asupra mediului acvatic, evaluat pe baza datelor obținute în urma efectuării de teste de toxicitate.

Principalul scop al lucrării a fost de a caracteriza din punct de vedere ecotoxicologic agenții de suprafață cationici și amfoterici respectând cerințele **Regulamentului European CE nr. 648/2004** și de a **evalua riscul generat de aceștia asupra componentei acvatice a mediului.**

În cadrul lucrării, o atenție deosebită a fost acordată surfactanților cationici, utilizați frecvent în fabricarea detergenților și balsamurilor de rufe și vase, dar și în produse biocide, precum și **surfactanților amfoterici**, folosiți la fabricarea produselor de îngrijire personală (ampoane, balsam pentru păr, șampun lichid și loțiuni de curățare pentru față) și în industria detergenților de curățare, deoarece:

- *controlul agenților de suprafață cationici și amfoterici nu a fost legiferat până la apariția Regulamentului European nr. 648/2004 și nu a existat o metodă standard – normă europeană EN sau internațională ISO sau metodă asociată unei directive europene pentru determinarea chimic cantitativă a acestor categorii de substanțe active;*
- *până la nivelul anului 2004, nu a existat nici pe plan european, nici la nivel național, o metodă standard sau asociată unei directive pentru testarea biodegradabilității agenților de suprafață cationici și/sau amfoterici, deși existau reglementări privind gradul minim de biodegradabilitate acceptat pentru aceste tipuri de substanțe active utilizate în compoziția detergenților comerciali;*
- *în literatura de specialitate referințele privind caracteristicile ecotoxicologice și efectele subletale a agenților de suprafață cationici și amfoterici sunt foarte reduse;*
- *sunt substanțe nenormate în efluenții stațiilor de epurare și ape de suprafață, atât la nivel național cât și la nivel internațional, deși sunt utilizate frecvent în produse comerciale și se regăsesc desigur în probe de mediu;*

Contribuțiile originale aduse tematicii de cercetare în prezenta teză de doctorat vizează în mod special informații noi privind caracterizarea ecotoxicologică a surfactanților cationici și amfoterici (toxicitate, biodegradare, inducerea stresului oxidativ, modificări histologice) și identificarea / evaluarea potențialelor riscuri directe și indirecte determinate de prezența acestora în mediul acvatic.

S-au obținut informații importante privind acțiunea toxică a clorurii de benzențoniu (surfactant cationic) și cocamidopropil betainei (surfactant amfoteric) asupra sistemelor enzimatiche de apărare ale organismelor acvatice (pești din specia *Cyprinus carpio*) și modificările induse de acestea la nivel tisular, subiecte neabordate în literatura de specialitate.

De asemenea, deoarece aceste substanțe nu sunt normate în legislația de mediu, cercetările efectuate au condus la evaluarea riscului acvatic determinat de prezența acestor două categorii de surfactanți (cationici și amfoterici) în apa de suprafață și stabilirea limitelor maxime admise astfel încât să nu fie afectat viaa acvatică.

Din punct de vedere metodologic și economic, pe parcursul studiilor efectuate în cadrul acestei lucrări, s-au verificat / dezvoltat și s-au implementat în practică curentă la Laboratorul Bioteste – Analize Biologice al INCD ECOIND București (gazdă și susținător financiar al studiilor de cercetare) diverse metode de evaluare a toxicității (inhibiția asupra creșterii algelor, inhibiția bioluminescenței bacteriilor, inhibiția creșterii microbiene) și biodegradabilității ultime, aplicate, în urma acreditării, și la diverși beneficiari pentru produse de curățat în compoziția cărora se găsesc aceste tipuri de surfactanți.

Prezenta lucrare de doctorat a fost structurată în 9 capitole reprezentative pentru subiectele abordate după cum sunt descrise mai jos. Stadiul cunoașterii și analiza reglementărilor privind detergenții a fost realizat în proporție de **21%** din totalul lucrării. Contribuția originală privind caracterizarea ecotoxicologică și evaluarea riscului acvatic al surfactanților cationici și amfoterici (experimente, rezultate, metodologii, interpretări, concluzii) reprezintă **67%** din volumul lucrării. Restul de **12%** reprezintă introducerea, listele de abrevieri, diseminările, cuprinsul și bibliografia.

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

Obiectivul principal al primei părți a lucrării l-a reprezentat analiza literaturii de specialitate și a reglementărilor internaționale privind detergenții și în special substanțele active din compoziția lor (surfactanții, mai ales cei cationici și amfoterici). S-a avut în vedere identificarea următoarelor aspecte: clasificare și tipuri de surfactanți, ecotoxicitate (biodegradare, cicli de degradare, toxicitate, bioacumulare), efecte la nivelul sistemelor enzimatiche (în special la nivelul sistemului enzimatic antioxidant) și acțiunile normative internaționale, în vederea evidențierii contribuțiilor originale pe care această lucrare le aduce domeniului.

CAPITOLUL I – Surfactanți: tipuri, utilizări și ecotoxicitate

Conform rapoartelor CESIO (European Committee of Surfactants and their Organic Intermediates), jumătate din consumul de detergenți s-a utilizat în aplicații casnice iar cealaltă jumătate în industria cosmetică, prelucrarea metalelor, fabricarea hârtiei și în industria pielăriei. La nivelul anului 2007 cei mai utilizați surfactanți au fost anionici și neionici, împreună acoperind jumătate din volumul de surfactanți produși [Ute M. B., 2009]. În anul 2008, s-a estimat că în Europa de Est s-au folosit anual >4,2 milioane de tone de detergenți și 1,2 milioane de tone de balsamuri, în creștere față de anul 2006 [Tomislav I., 2010].

S-a constatat că în perioada 1990-2010, în apele uzate internaționale au fost identificate următoarele intervale de concentrații ale surfactanților: anionici 330 -9450 μg/l, neionici 5 – 395 μg/l, cationici 0,1 – 325 μg/l (și chiar 6000 μg/l în apele uzate provenite de la spitale)[Berger H., 1997; Guang G. Y., 2006; Tomislav I., 2010; HERA, 2008; NICNAS, 2003]. Nu au fost identificate date privind concentrația surfactanților amfoterici în apele uzate.

În apele de suprafață s-au estimat următoarele intervale de concentrații: anionici <4 – 81 μg/l, neionici <0,002 – 31 μg/l, amfoterici <0,01 – 3,8 μg/l, cationici <0,1 – 34 μg/l [Kazuaki M. și colab., 2008; Kees van L. și colab., 1992; Detergent Products Environmental Project, 2001].

Primul criteriu în evaluarea riscului de mediu și respectarea condițiilor impuse prin reglementările în vigoare este evaluarea biodegradabilității. Literatura de specialitate evidențiază că biodegradabilitatea primară a surfactanților cationici și amfoterici îndeplinește condițiile impuse de legislație, aceasta fiind în majoritatea cazurilor >80%. În ceea ce privește biodegradabilitatea ultimă a surfactanților cationici și amfoterici, studiul literaturii a evidențiat că majoritatea acestor compuși prezintă biodegradabilitate ultimă în condiții de aerobie (>60% – 100%) dar și anaerobie (64 – 100%). Probleme de biodegradabilitate se evidențiază în cazul surfactanților cationici quaternizați atât în condiții de aerobie (>5%) cât și în lipsa oxigenului (24%), și în cazul alchil betainelor în condiții anaerobe (0 – >60%).

Metodologia de testare a gradului de biodegradare primară și ultimă este impusă prin Regulamentul nr. 648/2004 privind detergenții, anexele III și VIII, care prevede limitele de biodegradare ale substanțelor active surfactante din produsele de curățat în vederea comercializării.

Datele de biodegradabilitate și informațiile de utilizare, consum și condițiile actuale de expunere în mediu a substanței (ex. situația tratării deeurilor), fac posibil **precizarea concentrației de substanță în mediu (PEC)**.

Comportamentul ecotoxicologic (evaluarea toxicității compusului asupra organismelor acvatice) reprezintă al doilea criteriu în evaluarea riscului ecologic. Detergenții pot manifesta efecte toxice pentru toate tipurile de organisme acvatice dacă se regăsesc în cantități suficiente și dacă includ detergenți biodegradabili. Toți detergenții distrug mucoasele externe care protejează organismele de paraziți și bacterii, în plus pot afecta grav branhiile.

Deoarece este imposibil să se realizeze studii de ecotoxicitate asupra tuturor organismelor care pot fi expuse la un anumit compus, la nivel internațional s-au stabilit anumite specii reprezentative pentru lanțul trofic acvatic, pornind de la microorganisme, alge, crustacee (bentonice și planctonice) și finalizând cu peștii (evidențiate în metodologia OECD, EN ISO, EPA). Odată cu implementarea Regulamentului REACH, gama de teste s-a diversificat prin implementarea de microbioteste (teste de toxicitate la scară mică) ca alternativă la testele convenționale pentru reducerea sau înlocuirea animalelor utilizate în testare.

Aplicarea testelor de toxicitate acute sau cronice conduce la estimarea concentrațiilor CL50/ CE50 (concentrațiile la care se pot înregistra mortalități / imobilizări pentru 50% din organismele testate) și NOEC (concentrația la care nu se observă efecte adverse față de martor) care reprezintă o bază considerabilă în stabilirea **valorilor PNEC (concentrațiile la care sunt excluse efectele toxice ale unui contaminant asupra organismelor dintr-un compartiment al mediului)** necesar procedurii de evaluare a riscului de mediu. Datele experimentale obținute în laborator se extrapolează prin aplicarea unor factori introduși de UE pentru evaluarea riscului. Valoarea factorilor de evaluare depinde de numărul de specii pe care s-au realizat testele de toxicitate (pești; pești + crustacee + alge) și regimul testului (acut sau cronic). Acești factori variază în mod normal între 10 și 1000.

Datele ecotoxicologice identificate în literatura de specialitate pentru câteva surfactanți cationici și amfoterici relevanți pentru industria detergenților / cosmeticilor/ biocidelor au evidențiat următoarele:

- Toți surfactanții (cationici și amfoterici) manifestă o toxicitate moderată spre toxică în majoritatea testelor de toxicitate acută efectuate pe diverse specii de pești (CL50 = 0,07 – 42 mg/l), iar valorile de concentrație fără efect observabil (NOEC) sunt cuprinse în intervalul 0,004 – 3,5 mg/l.

- Toxicitatea acută față de *Daphnia* variază în intervalul 0,006 – 520 mg/l, iar NOEC în intervalul 0,043 – 3mg/l.

- Efectul toxic acut asupra algelor al surfactanilor cationici variază în intervalul 0,03-11 mg/l, cu valori NOEC în intervalul 0,12-1,8 mg/l, în timp ce pentru surfactanii amfoterici prezintă valori CE50 mai mari cuprinse în intervalul 0,5 – 48 mg/l și NOEC 0,09 – 3,2 mg/l.
- Surfactanii cationici cuaternari inhibă drastic respirația bacteriană în testele de toxicitate acută desfășurate pe bacterii, cu CE50 în intervalul 0,15 – 6,9 mg/l pe când esterii prezintă valori CE50 >130 mg/l. Surfactanii amfoterici manifestă o toxicitate scăzută asupra bacteriilor.

Se remarcă că intervalele valorilor de toxicitate sunt foarte extinse și diversificate, chiar pentru același organism testat și metoda aplicată iar din această cauză literatura de specialitate este foarte permisivă.

Analiza datelor de literatură expuse în capitolul I al prezentei lucrări a condus la următoarele concluzii:

- Se apreciază că există suficiente studii de evaluare a ecotoxicității surfactanilor anionici precum și pentru o mare parte dintre cei neionici, și de aceea cercetarea viitoare ar trebui îndreptată în mod special pentru elucidarea efectelor toxice ale surfactanilor cationici și amfoterici al căror profil ecotoxicologic este puțin cunoscut, iar proprietățile lor fizico-chimice pot influența semnificativ rezultatele studiilor ecotoxicologice.
- S-a constatat un număr redus și neclar de informații privind biodegradabilitatea și toxicitatea compușilor selectați pentru cercetare (cationici – clorura de benzetoniu și amfoterici – cocamidopropil betaina).
- În general pentru evaluarea ecotoxicității se recomandă metodologia standardizată OECD și ISO, reglementată și recunoscută la nivel mondial;
- În ceea ce privește evaluarea gradului de biodegradare, cel mai des se utilizează metodele de biodegradabilitate ultimă aerob reglementate de către Regulamentul 648/2004 privind detergenții.
- Gradul de toxicitate se evaluează utilizând o baterie de teste care să acopere toate nivelele trofice din mediul acvatic, pentru acestea se recomandă teste acute și cronice în sistem clasic sau alternativ.
- S-a constatat că surfactanii cationici întâmpină probleme de biodegradare aerobă, în timp ce surfactanii amfoterici sunt ușor biodegradabili.
- Atât surfactanii cationici cât și cei amfoterici determină toxicitate acută (clasificați în clasele de toxicitate TOXIC sau MODERAT TOXIC) asupra peștilor, crustaceelor, algelor și bacteriilor.

În consecință, cercetarea experimentală din prezenta lucrare a ținut cont de concluziile analizei de literatură prin utilizarea metodologiei OECD și ISO pentru evaluarea ecotoxicității și bateriilor de teste de toxicitate acute, cu timp de execuție și costuri reduse, conduse pe organisme acvatice specifice apelor de suprafață din România (crap, purici de baltă, alge verzi și bacterii).

CAPITOLUL II - Biomarkeri ai stresului oxidativ la pești

Prezentul capitol și-a propus evidențierea aspectelor privind apariția antioxidantă și stresul oxidativ la nivelul organismelor acvatice (în special pești) cu sublinierea efectelor induse de prezența surfactanilor cationici și amfoterici.

Analiza literaturii de specialitate a vizat scoaterea în evidență a informațiilor privind efectele surfactanilor la nivelul sistemului enzimatic antioxidant al organismelor acvatice (pești) și modificări survenite la nivel tisular. Surfactanii determină deteriorarea componentelor lipidice din membranele celulare, iar la concentrații mai mari pot conduce la suprimarea proceselor metabolice din celulă. Aceste modificări celulare rezultă în special ca urmare a insuficienței respiratorii prin alterarea epiteliului branhiilor. În general se constată că fiecare specie reacționează la toxic în mod specific, biomarkerii stresului oxidativ (enzimele antioxidante, carbonilarea proteinelor, peroxidare lipidică, deteriorările ADN, etc.) fiind influențate prin creșterea sau scăderea capacității lor de funcționare, în funcție de specificitatea fiecărui poluant, de modul de acțiune și condițiile de testare.

De asemenea studiul literaturii de specialitate a condus la ipoteza că, în general, surfactanții determină deteriorări la nivel subcelular. Majoritatea studiilor histologice conduse pe pești de apă dulce au fost realizate pentru evidențierea impactului surfactanților anionici și neionici (dodecil benzen sulfonat, linear alchil benzen sulfonat), celelalte tipuri (cationici și amfoterici) fiind foarte puțin studiate din acest punct de vedere.

Din analiza literaturii de specialitate s-a observat că nu există date privind efectele surfactantului cationic - clorura de benzenetoniu și amfoteric - cocamidopropil betain, asupra sistemelor enzimatice de apă rare din organismul peștilor. De asemenea s-a constatat un număr redus de informații privind efectele claselor de surfactanți cationici și amfoterici, în general, asupra sistemelor de apă rare ale organismelor acvatice;

Literatura de specialitate recomandă pentru evidențierea stresului oxidativ la nivelul organismelor acvatice (pești) urmărirea următorilor biomarkeri: modificări la nivelul activității enzimelor antioxidante, nivelul peroxidării lipidice, nivelul glutathionului redus, modificări oxidative ale proteinelor, modificări oxidative la nivel muscular, etc. Prin urmare cercetările experimentale realizate în acest sens în prezenta lucrare au fost conduse înănd cont de acești indicatori și de metodele indicate în literatură.

CAPITOLUL III - Acte normative care reglementează regimul detergenților în mediul acvatic

Obiectivul prezentului capitol a fost analiza actelor normative privind comercializarea, testarea și normarea în compartimentele de mediu a detergenților (substanțelor active din compoziția lor – surfactanți), în vederea evidențierii noutății și originalității lucrării privind stabilirea de limite în apa de suprafață pentru surfactanții cationici și amfoterici.

Studiul literaturii de specialitate privind reglementarea detergenților a condus la următoarele concluzii:

- La nivel internațional, și implicit la nivel național prin transcriere, este aplicabil **Regulamentul 648/2004 privind detergenții și amendamentele sale ulterioare** care impune reguli stricte de comercializare a produselor de curățat în vederea asigurării protecției sănătății umane și a mediului. De asemenea prezentul regulament prevede și ghiduri de evaluare a riscului complementar determinat de surfactanți în urma biodegradării prin formare de metaboli și potențial recalcitrant.
- În România există un singur laborator acreditat pentru evaluarea gradului de biodegradabilitate ultimă a surfactanților în conformitate cu Regulamentul 648/2004 privind detergenții (Laboratorul Bioteste – Analize Biologice din cadrul INCD ECOIND București);
- Surfactanții cationici și amfoterici nu sunt normați în apele uzate și apele de suprafață de către legislația națională și nici în cea internațională, deși sunt clasificați în clasa contaminanților periculoși pentru mediul acvatic („emerging contaminants”);
- Există pe plan mondial preocupare pentru evaluarea riscurilor surfactanților și promovarea practicilor de producție și consum durabile.

PARTEA II – CONTRIBUȚII ORIGINALE

Partea a doua a lucrării prezintă contribuțiile originale aduse domeniului prin cercetări experimentale de laborator privind caracterizarea ecotoxicologică a surfactanților cationici și amfoterici (determinări analitice, evaluarea biodegradabilității și toxicității directe și indirecte, efecte asupra sistemelor enzimatice de apă rare și modificări histologice) și evaluarea riscului acvatic.

CAPITOLUL IV – Controlul analitic al surfactanilor cationici și amfoterici

Obiectivul prezentului capitol a fost stabilirea parametrilor de performanță a metodelor de determinare cantitativă a surfactanilor cationici și amfoterici în vederea asigurării controlului analitic în testele de ecotoxicitate în probele de mediu (apă de suprafață și ape uzate).

Determinările analitice ale surfactanilor studiați au fost efectuate în conformitate cu metodele specificate în Anexa II – C a Regulamentului 648/2004 privind detergenții, după cum urmează :

- **Metoda de control analitic al surfactanților cationici- DIN 38409:1989, partea 20.**
- **Metoda de control analitic a surfactanilor amfoterici - metoda spectrofotometrică descrisă de Boiteux, 1984.**

Rezultate experimentale

Parametrii de performanță a metodelor de determinare cantitativă a surfactanilor cationici și amfoterici sunt prezentate succint în **tabelul nr. 1**.

Tabelul nr. 1 Parametrii de performanță ai metodelor de determinare a surfactanilor cationici și amfoterici

Parametrii de performanță ai metodei	DIN 38409:1989, partea 20 Surfactanți cationici	Metoda Boiteux, 1984 Surfactanți amfoterici
	Hyamin 1622 (clorură de benzetoniu) 99,99%	Cocamidopropil betaina 34,6%
Exactitate[%]	96,8%	99%
Fidelitate [CV (RSD)%]	CV (RSD)% = 6,508 %	CV (RSD)% = 3,392 %
Repetabilitate ®	$r = 2,8 \times 0,0314 = 0,088 \text{ mg/l}$	$r = 2,8 \times 0,0403 = 0,1128 \text{ mg/l}$
Reproductibilitate intern (R _L)	R _L = 0,0115	R _L = 0,5161
Sensibilitate	$x = 6,9108y - 0,0069$	$x = 5,7837y - 0,0925$
Limita de detectivă (LoD)	0,003 mg/l	0,002 mg/l
Robustețe	Metoda este robustă dacă nu se modifică pH-ul de lucru, factor care produce scăderea semnificativă a concentrației măsurate. Excesul de albastru de disulfină produce, în schimb, o creștere a valorii măsurate.	Metoda este robustă dacă nu se modifică pH-ul de lucru, factor care produce scăderea semnificativă a concentrației măsurate. Excesul de Orange II produce, în schimb, o creștere a valorii măsurate.
Limita de cuantificare (LoQ)	0,035 mg/l	0,032 mg/l
Domeniul De Lucru	0,003 - 4 mg/l.	0,002 - 2 mg/l.
Recuperarea	80 % - 110 %	80 % - 110 %
Interferențe	Surfactanții anionici interferă puternic chiar și la concentrații foarte mici (5-10 mg/l), determinarea surfactanților cationici în prezența lor neputând fi realizată decât după trecerea și reținerea surfactanților anionici pe un schimbător de ioni adecvat.	Agenții de suprafață anionici și cationici interferă în determinarea surfactanților amfoterici, chiar la concentrații foarte scăzute. Interferențele se reduc prin trecerea și reținerea surfactanților anionici / cationici pe un schimbător de ioni adecvat.

Metodele analitice aplicate pentru determinarea cantitativă a surfactanilor cationici și amfoterici (specificate în anexele Regulamentului European nr. 648/2004/CE) sunt tehnici spectrofotometrice, de rutină care implică costuri scăzute. Limitele de detecție în soluții apoase sintetice / probe de mediu contaminate (ape uzate și ape de suprafață) oferite de aceste metode sunt: 0,003 mg/l pentru surfactanții cationici și 0,002 mg/l pentru surfactanții amfoterici. Interferențele metodelor sunt determinate de prezența altor categorii de surfactanți

(anionici, cationici, substan e organice) care reac ioneaz fie cu surfactantul int fie cu reactivul de culoare formând compu i stabili. Aceste probleme pot fi înl turate prin utilizare r inilor schimb toare de ioni care separ surfactan ii int .

Selectivitate metodei pentru probele sintetice a fost asigurat prin utilizarea curbelor etalon realizate pentru principalele substan e studiate (Hyamin , Tetranyl i cocamidopropil betain).Pentru detec ia selectiv a compu ilor cationici din probele de mediu recomand m utilizarea de tehnici performate tip HPLC.

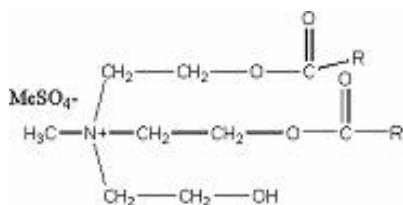
CAPITOLUL V – EVALUAREA BIODEGRADABILIT II

Pentru respectarea primului criteriu de evaluare a ecotoxicit ii / riscului acvatic, respectiv determinarea gradului de biodegradabilitate a surfactanilor cationici i amfoterici au fost efectuate urm toarele experimente ri:

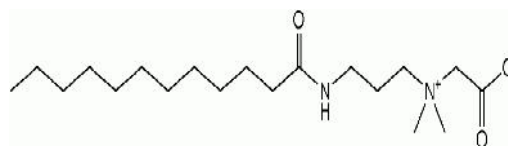
- **Experimente de determinare a biodegradabilit ii primare** conduse pe solu ii sintetice ale substan elor active surfactante utilizate în produse de cur at i solu ii sintetice ale unor produse de cur at comerciale pe baz de surfactan i cationici, în conformitate cu metoda specificat în Anexa VIII.1 a Regulamentului 648/2004 – *Testul de confirmare OECD (Metoda 303A) – Activated Sludge Units-Simulation Test*;
- **Experimente de determinare a biodegradabilit ii ultime / finale** conduse pe solu ii sintetice ale substan elor active surfactante utilizate în produse de cur at comerciale i solu ii sintetice ale unor produse de cur at pe baz de surfactan i cationici i amfoterici, în conformitate cu metodele specificate în Anexa III a Regulamentului 648/2004 (SR EN ISO 10707/2008 / OECD 301D/ EC C4-E i SR EN ISO 7827/2001 / OECD 301A/ EC C4-B)

Surfactan ii selecta i pentru testarea biodegradabilit ii

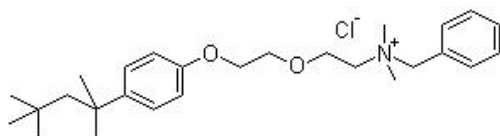
- ✓ agen i de suprafa cationici – s ruri quaternare de amoniu – **Hyamin 1622 (clorur de benzetoniu)** puritate >99,99% (Sigma) CAS 121-54-0 i **TETRANYL AT 7590 (dialchil hidroxietil amoniu metasulfat)** puritate >99% (KAO Corporation) CAS 93334-15-7;
- ✓ agent de suprafa amfoteric – alchil amino betain - **AMFODAC LB (cocamidopropil betain / lauril amido propil betain / CAPB)** puritate 34,6% (SASOL Italy) CAS: 4292-10-8;
- ✓ produse pe baz de agen i de suprafa cationici i amfoterici: Biocid cationic - Bromur de cetilpiridiniu (CAS 140-72-7); produse de cur at comerciale (balsam de rufe) care con in substan e cationice (TEA esterquat CAS 91995-81-2 i CAS 157905-74-3); produs comercial de cur are pe baz de surfactant amfoteric – detergent de toalet detrartant.



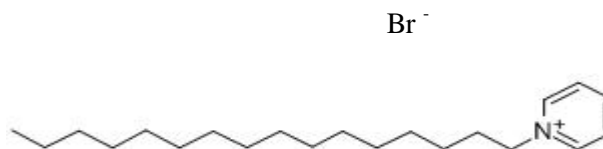
Dialchil hidroxietil amoniu metasulfat



Cocamidopropil betain



Clorur de benzentoni



Bromur de cetilpiridiniu

[Structuri chimice preluate din fișele tehnice de securitate]

Studiile de biodegradabilitate s-au efectuat în duplicat pentru fiecare substanță sau amestec de substanțe, conform cerințelor metodelor de testare, iar valorile prezentate reprezintă media valorilor parametrilor monitorizați. Pentru reprezentarea grafică s-a utilizat programul Microsoft –XCEL.

Rezultate experimentale

Evaluarea biodegradabilității primare (Testul de confirmare OECD -Metoda 303A – Activated Sludge Units-Simulation Test)



Figura nr. 2 Instalație pilot de laborator cu n mol activ în flux continuu

În **tabelul nr. 2** sunt prezentate centralizat rezultatele obținute după realizarea studiilor de biodegradabilitate primară efectuate în instalația pilot de laborator.

În conformitate cu testul de confirmare OECD – metoda de referință pentru evaluarea biodegradabilității agenților de suprafață, publicat în Regulamentul European nr. 648/2004/CE, nivelul de biodegradabilitate primară trebuie să fie de cel puțin 80%, pentru ca agentul de suprafață studiat să poată fi declarat biodegradabil și în consecință, să poată fi utilizat în compoziția de bază a unui produs comercial, care circule liber pe piața europeană. Procentul de 80% trebuie obținut în perioada efectivă de biodegradare – minim 21 zile, după perioada de amorsare, necesară instalației biologice cu alimentare în flux continuu, pentru a intra în regim normal de funcționare.

Se constată procente de biodegradare primară >90% în cazul surfactantului cationic (Tetranyl), surfactantului amfoteric (cocamidopropil betain) și amestecurilor sintetice de surfactanți (cationici + amfoterici), în timp ce pentru surfactantul Hyamin și produsul comercial pe bază de cationic biocid (compus similar din aceeași clasă) gradul de biodegradare primară se află la limita admisă (80-84%).

Având în vedere criteriul de biodegradabilitate impus de Regulamentul 648/2004, putem afirma că agenții de suprafață testați – *dialchil hidroxietil amoniu metasulfat (cationic)*, *clorura de benzentoni (cationic)*

cocamidopropil betaina (amfoteric) – îndeplinesc condițiile impuse, procentul de biodegradabilitate obținut în toate cele 5 experimente de laborator realizate în conformitate cu metoda de referință menționată, fiind 80%.

Rezultatele obținute (**tabel nr. 2**) se află în concordanță cu literatura de specialitate privind biodegradabilitatea primară a surfactanților cationici și amfoterici care indică procente >80% pentru aceste două categorii [**Domsch A., 1995; Comber S.D.W., 2002; HERA 2008**].

Tabelul nr. 2 Rezultatele finale obținute pentru testarea biodegradabilității primare

PARAMETRII	CATIONIC <i>Dialchil hidroxietyl amoniu metasulfat (TETRANYL AT 7590)</i>	CATIONIC <i>Clorur de benzentoniu (Hyamin 1622)</i>	AMFOTERIC <i>Cocamidopropil betain</i>	AMESTEC <i>(clorur de benzentoniu +cocamidopropil betain)</i>	AMESTEC <i>(dialchil hidroxietyl amoniu metasulfat + cocamidopropil betain)</i>	PRODUS COMERCIAL <i>Bromur de cetilpiridiniu</i>
Durata experimentală	36 zile		36 zile	30 zile	30zile	36 zile
Perioada de inițiere	10 zile			12 zile		10 zile
Perioada efectivă de biodegradare	26 zile			18 zile		26 zile
Randament de îndepărtare CCO	70-89%		90%	61%	68%	50%
Randament de îndepărtare surfactant cationic	90%	84%	-	-	-	77-80%
Randament de îndepărtare surfactant amfoteric	-	-	99%	-	-	-
Randament de îndepărtare total a surfactanților cationic + amfoteric	-	-	-	80%	90%	-
Randament de biodegradare	91%	84%	97%	90,7%	97,6%	80%

Evaluarea biodegradabilității ultime [SR EN ISO 10707:2001 –Metoda prin analiza consumului biochimic de oxigen (test în fiole închise)]

Conform metodologiei descrise de SR EN ISO 10707:2001, un compus organic este biodegradabil, atunci când **procentul de biodegradare este >60%, după 28 zile de testare** și curbele de biodegradare prezintă o formă tipică, din care se pot deduce: timpul de latență, timpul de degradare și gradul maxim de degradare.

Luând în considerare prevederile mai sus-menționate, se poate aprecia că substanțele cationice analizate (dialchil hidroxietyl amoniu metasulfat și clorura de benzentoniu) și produsele comerciale – balsam de rufe pe bază de surfactant cationic - sunt biodegradabile, înregistrându-se pentru acestea procente de biodegradabilitate >70%.

În corelație cu literatura de specialitate pentru compuși cationici asemănători ca structură apreciem că rezultatele obținute experimental pentru surfactantul *dialchil hidroxietyl amoniu metasulfat (78%)* cât și produsele balsam de rufe pe bază de acesta (**77%, 85%**), pot fi comparabile cu valorile de biodegradabilitate ultimă pentru esterqua și diesterqua, intervalul de valori fiind cuprins între >60% - 79% utilizând aceeași metodă de testare sau 75% - 92% utilizând alte metode recomandate de OECD.

În ceea ce privește biodegradabilitatea ultimă a *clorurii de benzetoniu*, literatura consultată specific valori cuprinse în intervalul 0-81% utilizând diverse metode OECD și >5% utilizând metoda OECD 301D similară cu SR EN ISO 10707 aplicat. Prin urmare, valoarea experimentală de 67% obținută după 28 zile de testare se poate corela cu datele existente.

Tabel nr. 3 Centralizarea rezultatelor finale pentru experimentele de biodegradabilitate ultimă conduse pe metoda SR EN ISO 10707/2001

PARAMETRII	Dialchil hidroxietilamoniu metasulfat (TETRANYL AT 7590)	Clorur de Benzetoniu (Hyamin 1622)	Balsam de rufe I (TEA esterquat)	Balsam de rufe II (TEA esterquat)	Substanță de referință Anilin
Durata testului	28 zile				
Țimp de latență	7-10 zile	7-10 zile	7-10 zile	7 zile	7 zile
Țimp de biodegradare	14 zile	14 zile	14 zile	21 zile	12-14 zile
Randament de îndepărtare surfactant cationic	83,86%	73,15	84,70%	99,16%	-
Procent de biodegradabilitate	78,37 % la 28 zile	67,23% la 28 zile	77,34% la 28 zile	85,80% la 28 zile	95,23% la 28 zile

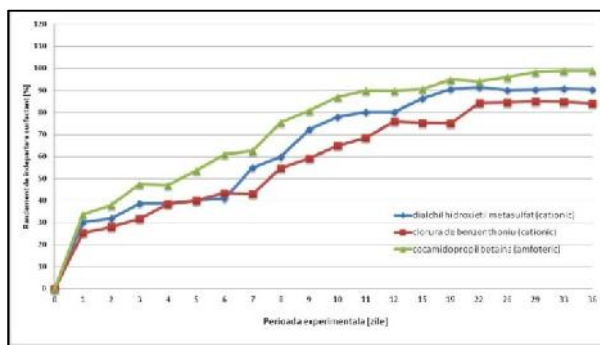


Figura nr. 1 Eficiența de îndepărtare a agenților de suprafață cationici și amfoterici în teste de biodegradare primară

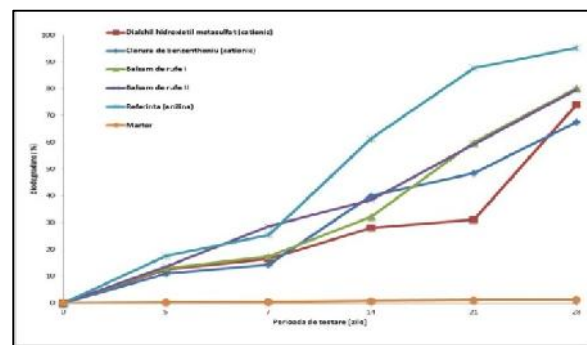


Figura nr. 2 Curbele tipice de biodegradare ultimă (SR EN ISO 10707) pentru surfactanți cationici

Evaluarea biodegradabilității ultime (SR EN ISO 7827/2001 - Metoda prin analizarea carbonului organic dizolvat – COD)

Testul de biodegradabilitate efectuat în conformitate cu standardul SR EN ISO 7827: 2001 apreciază că o substanță este biodegradabilă dacă substanța / produsul de testat nu se elimină abiotically în mod semnificativ, iar curba de degradare prezintă o formă tipică, cu o fază de latență și una de degradare și în consecință eliminarea COD poate fi atribuită procesului de biodegradare.

În concluzie, analizând comparativ rezultatele obținute pentru soluția produsului inoculat cu un microorganism activ și respectiv neinoculat și luând în considerare condițiile impuse de standardul aplicat, apreciem că:

- procentul total de îndepărtare al carbonului organic dizolvat (% COD) pentru produsul testat (detergent de toaletă pe bază de surfactant amfoteric) este ~ 92%, din care 14% eliminare abiotically;
- timp de biodegradare (intervalul cuprins între sfârșitul timpului de latență și momentul în care se atinge un procent de eliminare de 90%) – 20 zile;
- produsul comercial detergent de toaletă pe bază de surfactant amfoteric este biodegradabil.

În corelație cu literatura de specialitate putem aprecia că valoarea biodegradabilității ultime de **91%** (îndeplinire CCOCr sau COD) obținute experimental pentru *cocamidopropil betain* poate fi încadrat în intervalul de valori 57% -100% obținute prin aceeași metodă sau prin diverse metode recomandate de OECD pentru testarea biodegradabilității ultime a surfactanților amfoterici.

Tabel nr. 4 Rezultatele finale obținute pentru testarea biodegradabilității ultime prin metoda SR EN ISO 7827: 2001

PARAMETRII	PRODUS COMERCIAL DE CURA ARE PE BAZĂ DE SURFACTANT AMFOTERIC (detergent detartrant de toaletă)
Durata experimentală	30 zile
Nivel maxim de biodegradare	91,80% - îndeplinire COD 91,43% - îndeplinire CCOCr
Timp necesar atingerii nivelului maxim de degradare	28-30 zile
Timp de latență	3 zile
Timp de biodegradare	20 zile
Procent total de îndeplinire a agenților de suprafață amfoterici	72,85 % după 30 zile
Procent de eliminare abiotică pentru martor	14% pentru COD și CCOCr

CAPITOLUL VI - EVALUAREA TOXICITĂȚII ASUPRA UNOR SPECII DE ORGANISME ACVATICE

Pentru respectarea celui de-al doilea criteriului al caracterizării ecotoxicologice/ riscului acvatic, prezentul capitol a avut ca obiectiv determinarea gradului de toxicitate acvatică asupra unor specii de organisme reprezentative ale lanțului trofic și apelor de suprafață din România. Capitolul a urmărit prezentarea experimentelor și rezultatelor privind evaluarea toxicității directe și indirecte determinate de intoxicația cu surfactanți (cationic – clorura de benzetoniu și dialchilhidroxietilamoniu metasulfat și respectiv amfoteric – cocamidopropil betain).

În primul subcapitol s-a urmărit efectuarea unei serii de teste de toxicitate acută directă (respectiv intoxicație cu substanțele ca atare) pentru stabilirea valorilor de concentrație letală medie (CL_{50} / CE_{50}) și evaluarea efectelor generate asupra organismelor acvatice.

Activitățile desfășurate au presupus efectuarea biotestelor de toxicitate acută asupra următoarelor specii de organisme acvatice: pești (*Cyprinus carpio*), crustacee (*Daphnia magna*), alge verzi (*Selenastrum capricornutum* / *Raphidocelis subcapitata* / *Pseudokirchneriella subcapitata*), bacterii luminescente (*Vibrio fischeri*) și bacterii gram negative și pozitive.

Testele de evaluare a toxicității acute a surfactanților studiați s-au efectuat în duplicat pentru toate organismele testate, conform protocoalelor de testare internaționale și luând în considerare prevederile Regulamentului REACH cu privire la reducerea numărului de animale utilizate în testare, valorile prezentate reprezentând valoarea medie a parametrilor monitorizați.

Metodele de toxicitate acvatică aplicate au fost următoarele:

- ✚ Bioteste de toxicitate letală acută pentru determinarea valorilor concentrațiilor letale medii (CL_{50}) fa de organismele acvatice (pești - sp. *Cyprinus carpio*) - OECD 203/ SR 13216:1994;
- ✚ Bioteste de toxicitate acută pentru determinarea valorilor concentrațiilor letale / imobilizare medii (CE_{50}) fa de crustacee (sp. *Daphnia magna*)- OECD 202;

- ✚ Bioteste de toxicitate acut pentru determinarea valorilor concentrațiilor inhibitorii medii (CE₅₀) fa de alge (*sp. Selenastrum capricornutum*)- OECD 201 i SR EN ISO 8692:2005;
- ✚ Bioteste de toxicitate acut pentru determinarea valorilor concentrațiilor inhibitorii medii (CE₅₀) fa de bacterii luminescente (*sp. Vibrio fischeri*)- DIN EN ISO 11348-3;
- ✚ Biotestede toxicitate microbial – testul MARA (Microbial Array for toxicity Risk Assessment).

Utilizând acele i metode s-a evaluat i toxicitatea acvatic a efluen iilor (lichidelor) rezulta i în urma testelor de biodegradare a surfactan ilor cationici pentru evaluarea riscului complementar i toxicitatea acut a unui produs comercial algicid.

Rezultate experimentale toxicitate direct

Pentru o vedere de ansamblu a efectelor înregistrate în cadrul bateriei de teste utilizate pentru testarea toxicit ii directe a surfactan ilor studia i, rezultatele finale au fost centralizate în **tabelul nr. 5**.

Tabelul nr. 5 Centralizarea datelor de toxicitate ob inute pentru surfactan ii testa i

ORGANISMUL TEST	Clorur de benzentoniu (cationic) logPow 3			Dialchil hidroxietil amoniu metasulfat (cationic) logPow < 3			Cocamidopropil betain (amfoteric) logPow < 3		
	CL/CE50 mg/l	NOEC mg/l	LOEC mg/l	CL/CE50 mg/l	NOEC mg/l	LOEC mg/l	CL/CE50 mg/l	NOEC mg/l	LOEC mg/l
<i>Cyprinus carpio</i>	4,57 interval încredere “-“ 1,94 mg/l “+“ 9,77 mg/l	0,5	1	22,90 interval încredere “-“ 11,22 mg/l “+“ 33,65 mg/l	2	7	6,16 interval încredere “-“ 2,81 mg/l “+“ 11,74 mg/l	0,84	3
<i>Daphnia magna</i>	0,39 interval încredere “-“ 0,15 mg/l i “+“ 0,48 mg/l	0,05	0,1	4,78 interval încredere “-“ 3,05 mg/l i “+“ 6,13 mg/l	0,05	0,1	9,54 interval încredere “-“ 7,25 mg/l i “+“ 11,08 mg/l	1	5
<i>Selenastrum capricornutum</i>	0,56 interval încredere “-“ 0,12 mg/l i “+“ 1,25 mg/l	0,05	0,1	3,48 interval încredere “-“ 1,67 mg/l i “+“ 5,12 mg/l	0,05	0,1	5,55 interval încredere “-“ 3,59 mg/l i “+“ 7,21 mg/l	0,5	1
<i>Vibrio fischeri</i>	1,2	0,3	-	2,89	0,4	-	>100	12	16
Bacterii gram “-“ si gram “+”	1,1	-	0,021	1,6	-	0,041	-	-	-
Clasificarea toxicit ii	PUTERNIC TOXIC (crustacee, alge) / TOXIC (pe ti, bacterii)			TOXIC (crustacee, alge, bacterii) / NOCIV (pe ti)			FOARTE SLAB TOXIC (bacterii) / TOXIC (pe ti, alge, crustacee)		
Compara ia cu literatura de specialitate / interval de toxicitate	Pe ti: LC50 - 0,28 – 42 mg/l; NOEC: 0,004 – 3,5 mg/l Crustacee: EC50 - 0,0059 – 78 mg/l ; NOEC – 0,0041 – 3 mg/l Alge: EC50 – 0,09 -11 mg/l; NOEC – 0,16 -4,8 mg/l Bacterii: EC50 -0,5 ->130 mg/l; NOEC: -						Pe ti: LC50 - 2 – 31 mg/l; NOEC: 0,16 – 1,7 mg/l Crustacee: EC50 - 2,15 – >200 mg/l; NOEC – 0,9 – 1,6 mg/l Alge: EC50 – 0,55 -48 mg/l; NOEC – 0,09 -10 mg/l Bacterii: EC50 – 5,2 - 900 mg/l; NOEC: -		

Din analiză comparativă a rezultatelor de toxicitate letală acută obținute pentru surfactanții cationici se poate observa că substanța – *clorură de benzentoniu* (puritate >99,99%) care prezintă catene aromatice, manifestă un efect toxic pronunțat, în timp ce *dialchil hidroxietil amoniu metasulfatul* (puritate 99%) care prezintă catene lineare alchilice, manifestă un efect toxic spre nociv asupra organismelor acvatice, ceea ce indică faptul că toxicitatea asupra organismelor acvatice a fost influențată de structura chimică a compusului cationic fapt indicat și în literatura de specialitate [Abel P.D., 1974; Masayuki Y. și colab., 2008].

Se remarcă efectul toxic pronunțat al clorurii de benzentoniu datorită proprietăților sale de biocid asupra bacteriilor, algelor și daphniilor, ceea ce indică un risc sever asupra mediului luând în calcul cazul cel mai defavorabil. În comparație cu acesta, dialchil hidroxietil amoniu metasulfatul fiind un surfactant cationic de tip esterquat prezintă efecte mai puțin toxice asupra claselor de organisme testate.

Surfactantul amfoteric (cocamidopropil betaina) datorită proprietăților sale de spumare intensă, determină blocarea schimbului de gaze la nivelul branhiilor și membranelor celulare ceea ce se finalizează cu mortalitate / imobilizare și inhibiția creșterii la pești, daphnii și alge, însă asupra bacteriilor nu prezintă efect toxic.

Conform **tabelului nr. 5** al Sistemului de clasificare globală a substanțelor chimice **GHS 2011** (capitolul 3.10), putem aprecia că surfactantul cationic - clorura de benzentoniu, se încadrează în **categoria 1 de toxicitate acută** deoarece prezintă efecte puternic toxice pentru crustacee și alge la concentrații < 1 mg/l. Surfactanții - cationici (dialchil hidroxietil amoniu metasulfat) și amfoterici (cocamidopropil betaină) se încadrează în **categoria 2 de toxicitate acută** deoarece prezintă efecte toxice la concentrații cuprinse în intervalul 1- 10 mg/l pentru majoritatea organismelor.

Valorile de toxicitate acută dar și valorile NOEC obținute experimental pentru cele trei substanțe testate se încadrează în intervalele de valori rezultate în urma analizei literaturii de specialitate pe clase de surfactanți, drept pentru care apreciem că sunt relevante din punct de vedere științific și pot constitui baza de date necesară caracterizării riscului asupra mediului acvatic.

Caracterul inovativ al experimentelor de toxicitate acvatică constă în selectarea celor doi compuși utilizați în testare (clorura de benzentoniu și cocamidopropil betaina) pentru care nu sunt disponibile date de toxicitate acută specifice asupra speciei de pește *Cyprinus scarpio*, specifică apelor dulci din România.

Rezultate experimentale pentru toxicitatea complementar

În cadrul acestui subcapitol s-a încercat să se răspundă cerinței de evaluare a efectului toxic acvatic a efluenților de biodegradare, Conform Ghidului Tehnic pentru abordarea stratificată a implementării Regulamentului (CE) nr. 648/2004 emis de Parlamentul și Consiliului European în anul 2005, prin efectuarea de bioteste de toxicitate acută pentru doi efluenți rezultați în urma testelor de biodegradare a clorurii de benzentoniu (Hyamina 1622) și dialchil hidroxietil amoniu metasulfat (Tetranyl AT 7590).

Efluenții de biodegradare testați au manifestat efecte toxice asupra organismelor testate, gradul de toxicitate variind în funcție de organismul testat, astfel încât algele și bacteriile au fost organismele cele mai sensibile, aspect care poate fi corelat cu efectul determinat de compușii originali asupra acestor specii.

Încadrarea în clasele de toxicitate a efluenților

Există în literatură recomandări privind sistemul de clasificare a toxicității efluenților evacuați în mediul acvatic [Persoone G., 2003]. Principiul presupune determinarea și cuantificarea toxicității acute a efluenților utilizând o baterie de microbioteste. Evaluarea toxicității efluenților este bazată pe două categorii de valori: o valoare de toxicitate acută care poate încadra efluentul respectiv într-una din cele 5 clase de toxicitate și o valoare a scorului de greutate pentru fiecare clasă de toxicitate.

Clasele de toxicitate acut

Efectul rezultat obținut pentru fiecare microbiotest este transformat în unități de toxicitate (TU) cu ajutorul formulei: $TU = [1/L(E)C50] \times 100$

Clasificarea probelor testate în una din clasele de toxicitate de mai jos, se efectuează pe baza celei mai mari valori TU înregistrate pentru unul din testele aplicate:

Clasa I: f r toxicitate acut – pentru nici unul din testele aplicate nu s-au înregistrat efecte toxice;

Clasa II: toxicitate acut u oar – procentajul efectului observat într-unul din testele de toxicitate aplicate este semnificativ mai mare decât martorul, dar mai mic de 50% (<1TU);

Clasa III: toxicitate acut - valoarea CL(E)50 reiese din cel pu în un test din cele aplicate, dar proba diuat în raport 1:10 are efect mai mic de 50% (1-10 TU);

Clasa IV: toxicitate acut mare - valoarea CL(E)50 reiese din dilu ia 1:10 a probei, din cel pu în un test din cele aplicate, dar nu i la dilu ia de 1:100 (10- 100 TU);

Clasa V: toxicitate acut foarte mare - valoarea CL(E)50 reiese din dilu ia 1:100 pentru cel pu în un test din cele aplicate (>100 TU).

Greutatea scorului - reprezintă importanța cantitativă a toxicității în aceea clasă și se apreciază după cum urmează :

- efect toxic nesemnificativ = scor 0
- efect toxic semnificativ dar <1 TU = scor 1
- 1-10 TU = scor 2
- 10-100 TU = scor 3
- >100 TU = scor 4

Calculul scorului de greutate a clasei se efectuează după cum urmează :

Scorul de greutate a clasei = (toate scorurile testelor)/n (n= numărul de teste aplicate)

În **tabelul nr. 6** este prezentată încadrarea efluenților rezultați în urma biodegradării în clasele de toxicitate acut după sistemul de clasificare **Persoone G., 2003**. Conform acestei clasificări efluentul de biodegradare a clorurii de benzenoniu prezintă toxicitate acută valabilă pentru toate tipurile de organisme testate, în timp ce efluentul de biodegradare a dialchil hidroxietil amoniu metasulfatului determină un efect toxic slab valabil pentru bateria de teste efectuate, cu o influență mai mare asupra algelor și bacteriilor pentru ambele substanțe testate.

Tabelul nr. 6 Clasificarea gradelor de toxicitate pentru efluenții de biodegradabilitate testați

Test de toxicitate acută efectuat /	Unitate de toxicitate (TU) calculat pentru fiecare tip de test pe baza valorii LC(E)50		Sistem de clasificare a efluenților deversați în mediul acvatic
	Efluent biodegradare clorur de benzenoniu (0,9mg/l)	Efluent biodegradare dialchil hidroxietil amoniu metasulfat (0,25mg/l)	
<i>Cyprinus carpio</i>	0 * scor 0	0 scor 0	TU < 0,4 Clasa I – nu există toxicitate acută
<i>Daphnia magna</i>	2 scor greutate 2	0 scor 0	0,4<TU<1 Clasa II – toxicitate acută slabă
<i>Selenastrum capricornutum</i>	3,32 scor greutate 2	1,2 scor greutate 2	1<TU<10 Clasa III – toxicitate acută
<i>Vibrio fischeri</i>	4,98 scor greutate 2	2,24 scor greutate 2	10<TU<100 Clasa IV – toxicitate acută ridicată
TU calculat pentru bateria de teste / Clasificare toxicitate	2,57 / Clasa III – toxicitate acută scor greutate 2	0,86 / Clasa II – toxicitate acută slabă scor greutate 1	TU>100 Clasa V – toxicitate acută foarte ridicată

* Se atribuie 0 unități de toxicitate, deoarece conform testului de toxicitate acută pe peți realizat pentru clorura de benzenoniu, soluția sintetică de 1 mg/l nu a prezentat toxicitate în 96h de testare, prin urmare apreciem că efluentul de biodegradare (conc. 0,98 mg/l surfactant) nu prezintă efect toxic asupra peștilor.

În tabelul nr. 7 sunt prezentate succint efectele de toxicitate determinate de efluenții de biodegradare comparativ cu substanțele originale conform normelor internaționale. Din analiza datelor experimentale reiese faptul că clorura de benzentoniu (Hyamina 1622) determină un impact toxic pronunțat în comparație cu dialchil hidroxietil amoniu metasulfatul (Tetranyl AT 7590). Faptul că s-au evidențiat efecte toxice nu conduce la următoarele ipoteze:

- posibilitatea persistenței în soluție a unei concentrații de surfactant nebiodegradat, ceea ce se poate corela cu rezultatele obținute în cadrul testelor de biodegradabilitate ultimă a surfactanților cationici (în special a clorurii de benzentoniu) pentru care am obținut cea mai mică valoare de biodegradare ultimă (67%) și de asemenea cu literatura de specialitate care indică valori de biodegradare scăzute pentru această clasă de surfactanți;
- apariția în urma biodegradării de intermediari / metaboliți posibil recalcitranți care pentru momentul tehnicii analitice disponibile nu permite detectarea lor;

Prin extrapolare *in situ* (în apele de suprafață), valorile de toxicitate prezentate obținute în condiții de laborator se vor diminua considerabil având în vedere debitele râurilor care efectuează diluția (de 100 de ori până la 1000 de ori). Comportarea *in situ* a substanțelor studiate din punct de vedere toxicologic depinde de o serie de factori fizico-chimici (pH, temperatură, oxigen, concentrație, încărcare microbiană, schimbări climatice, prezența altor compuși chimici, etc.) care pot modifica biodisponibilitatea acestor compuși la organismele acvatice.

Tabelul nr. 7 Clasificarea gradelor de toxicitate pentru efluenții de biodegradabilitate testată

Organism acvatic	Toxicitate conform normelor internaționale (EPA, OECD, Persoane G. 2003)			
	Compus original clorur de benzentoniu	Efluent biodegradare clorur de benzentoniu	Compus original dialchil hidroxietil amoniu metasulfat	Efluent biodegradare dialchil hidroxietil amoniu metasulfat
<i>Cyprinus carpio</i>	TOXIC: 1 mg/l < LC ₅₀ /2 10 mg/l	Clasa I – nu există toxicitate acută TU < 0,4	NOCIV / PERICULOS PENTRU MEDIUL ACVATIC 10mg/l < LC ₅₀ /2 < 100mg/l	Clasa I – nu există toxicitate acută TU < 0,4
<i>Daphnia magna</i>	PUTERNIC TOXIC LC ₅₀ < 1mg/l	Clasa III – toxicitate acută 1 < TU < 10	TOXIC: 1 mg/l < LC ₅₀ /2 < 10 mg/l	Clasa I – nu există toxicitate acută TU < 0,4
<i>Selenastrum capricornutum</i>	PUTERNIC TOXIC LC ₅₀ < 1mg/l	Clasa III – toxicitate acută 1 < TU < 10	TOXIC: 1 mg/l < LC ₅₀ /2 < 10 mg/l	Clasa III – toxicitate acută 1 < TU < 10
<i>Vibrio fischeri</i>	TOXIC: 1 mg/l < LC ₅₀ /2 10 mg/l	Clasa III – toxicitate acută 1 < TU < 10	TOXIC: 1 mg/l < LC ₅₀ /2 < 10 mg/l	Clasa III – toxicitate acută 1 < TU < 10
Toxicitate microbială	TOXIC	TOXIC	TOXICITATE SCAZUT	TOXICITATE SCAZUT

.....zona marcată indică scăderea gradului de toxicitate al compusului original și după biodegradare;

.....zona marcată indică scăderea efectului de toxicitate;

.....zona marcată indică scăderea efectului de toxicitate până la nepericulos pentru mediul acvatic.

Rezultate experimentale toxicitate în produse

În acest subcapitol s-a urmărit evidențierea efectelor toxice ale substanțelor active (surfactanți cationici) din compoziția produselor comerciale tip biocid (algicid) în vederea estimării comportamentului toxicologic în amestec cu alte ingrediente.

Pentru a evalua toxicitatea unui produs cationic comercial (clasat ca biocid – algicid) au fost efectuate teste de laborator pentru determinarea toxicității acute a acestuia asupra creșterii algelor verzii pe bază de clorură de dialchilbenzildimetil amoniu C12-C16 (50%) CAS 68424-85-1.

Experimentul efectuat a evidențiat că surfactanții cationici utilizați în produse biocide și în menținerea în gradul de toxicitate în amestec cu alte ingrediente, în funcție de proporția utilizată (ex. în cazul de mai sus proporția de surfactant cationic a fost de 50%, 2% etilenglicol și 48% apă, doza recomandată fiind de 2 mg/l) și de scopul în care este utilizat produsul.

Conform reglementărilor internaționale în vigoare putem afirma că **produsul algicid, este puternic toxic / foarte toxic pentru algele de apă dulce din specia *Selenastrum capricornutum*, valoarea CE_r50 estimat experimental fiind <1mg/l.**

CAPITOLUL VII - Evaluarea stresului oxidativ indus de expunerea la surfactanți cationici și amfoterici

Un alt obiectiv important al lucrării îl constituie identificarea și evaluarea efectelor toxice ale surfactanților cationici și amfoterici la nivelul sistemului antioxidant de apărare al peștelor.

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv s-a selectat specia de pește *Cyprinus carpio*, reprezentativ pentru apele de suprafață din România și au fost selectați pentru testare: clorura de benzenotoniu (cationic, CAS 121-54-0, Hyamina 1622) și cocamidopropil betaina (amfoteric, CAS 4292-10-8, CAPB).

Caracterizarea testului de toxicitate acută efectuat în vederea prelevării de organe

A fost efectuat un test de toxicitate acută, 96 h, semistatic (cu schimbarea soluțiilor de testat în proporție de 75% la 48h pentru menținerea constantă a concentrațiilor de surfactant), în vase de testare de 100 litri, utilizând 40 de exemplare de pește / substanță testată și martor, respectându-se condițiile de testare ale metodei de referință - OECD 201. Materialul biologic utilizat a fost puiet de crap (*sp. Cyprinus carpio*) în vârstă de 1 an, specie autohtonă, specifică apelor dulci din România, aclimatizat în laborator.

S-au testat clorura de benzenotoniu și cocamidopropil betaina în concentrații individuale de 1mg/l. Concentrații analitice determinate în soluțiile de testare pe parcursul testului (monitorizare la fiecare 24h) au fost: clorura de benzenotoniu 0,54 – 0,87 mg/l (DIN 38409/20-1989); cocamidopropil betaina 0,55-0,89 mg/l - Metoda Orange II (Boiteux, 1984).

În timpul testului s-au monitorizat și alți parametri fizico-chimici precum: CCOCr [pentru clorura de benzenotoniu, în medie - 14,4 mgO₂/l (24 h), 28,8 mgO₂/l (48 și 72h) și 105,6 mgO₂/l (96h); pentru cocamidopropil betaină, în medie - 28,8 mgO₂/l (24 h), 86,6 – 115,2 mgO₂/l (48 și 72h) și 259,2 mgO₂/l (96h)], pH (6,94 – 7,86 unități de pH), oxigen dizolvat (3-4mgO₂/l), materii în suspensie (5,2 – 12,4 mg/l) și temperatură (20-21°C).

După 96h de testare s-au înregistrat următoarele mortalități: clorura de benzenotoniu (1 mg/l): 4 pești – 10%; cocamidopropil betaina (1mg/l): 0 pești – 0%; martor: 0 pești – 0%.

Prelevarea probelor - a efectuat la 24h, 48h și 96h s-au sacrificat câte 5 exemplare intoxicate și martor pentru fiecare substanță testată în vederea prelevării organelor de interes: ficat, intestine, branhie, mușchi roșii, mușchi albi, gonada pentru analiza biochimică (probe conservate prin îngheț la -80°C și histologic (probe fixate în formol tamponat).

Omogenitatea loturilor de organisme luate în testarea a fost asigurată prin cântărirea (58 ± 10 g) și măsurarea (15 ± 2 cm) fecundității individului și calculul indicilor hepatosomatici și gonadosomatici care nu au evidențiat modificări semnificative din punct de vedere statistic față de lotul martor.

Extractele proteice s-au obținut din fiecare probă de organe intoxicate și martor (ficat, rinichi, intestin și branhie prelevate la 24h, 48h, 96h), utilizând tampon 0,1M TRIS-HCl 5mMEDTA, pH 7,4. Omogenatele au fost incubate 60 min la 4°C, centrifugate 30 min la 8000-10000 rpm la 4°C, după care s-a preluat supernatantul limpede, utilizat ulterior în analiza biochimică.

Testele biochimice au presupus urm rirea urm torilor biomarkeri:

- ✚ *activit ile enzimatic specific a enzimelor antioxidante implicate în procesul de stres oxidativ*: Superoxid dismutaza (SOD) – metoda **Paoletti (1986)**, Catalaza (CAT)- metoda **Aebi (1974)**, Glutation peroxidaza (Gpx)–metoda **Beutler (1984)**, Glutation S transferaza (GST)-metoda **Habig (1974)**, Glutation 6 fosfat dehidrogenaza (G6PDH) – metoda **Lohr i Waller (1974)**, Lactat dehidrogenaza (LDH) [**Bergmeyer H. U. i Bernt E., 1974**]., Glutation reductaza (Gred) – metoda **Goldberg i Spooner (1983)**;
- ✚ *peroxidare lipidic prin determinarea indirect a malondialdehidei (MDA) – metoda **Draper and Hadley (1990)**;*
- ✚ *grup ri carbonil (metoda **Levine R.L., 1990**), tiol (metoda **Jocelyn P.C., 1987; Riener C. i colab., 2002**) i glutation (Kit Chemicon)*;
- ✚ *profil proteic din muschi alb i ro u [S.A.M. Martin i colab, 2001, Anderson N.L si cola., 1991]*.
- ✚ *eviden iere zimografic metaleproteinaze matriceale MMP2 i MMP9 din mu chi ro u i alb [Chadzinska M., 2008]*

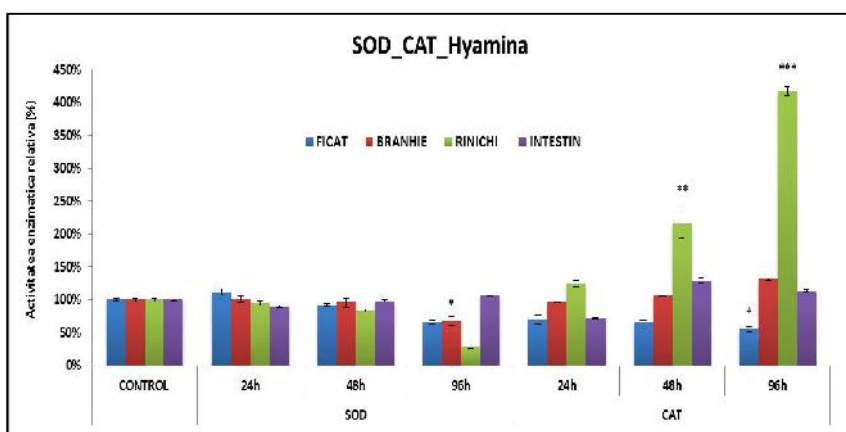
Rezultate experimentale

Dozare enzimelor antioxidante

Experimentele de dozare a activita ii enzimatic a enzimelor antioxidante au fost conduse pe lizate celurare ale organelor (ficat, branhii, rinichi, intestine) prelevate de la pe tii (crap – *Cyprinus carpio*) supu i ac iunii toxice a surfactan ilor. Analizele biochimice au fost efectuate pe un lot de câte 5 indivizi per substan testat i interval de intoxicare (24h, 48h, 96h), procedurile biochimice fiind aplicate în triplicat pentru ob inerea de date relevante i reproductibile. Pentru fiecare interval s-a calculat devia ia standard i s-a evaluat statistic cota nivelului efectului toxic comparativ cu martorul utilizând programul XCEL, func ia TTEST.

Activitatea enzimatic SOD i CAT

În **figurile 3 i 4** se eviden iaz sc derea activit ii catalazei, în cazul surfactantului amfoteric, mult mai pronun at fa de tratamentul realizat cu Hyamin în cazul ficatului, precum i cre terile importante observate la branhii, rinichi i intestin, ceea ce a scos în eviden toxicitatea CAPB prin generare de radicali liberi ai oxigenului precum anion superoxid.



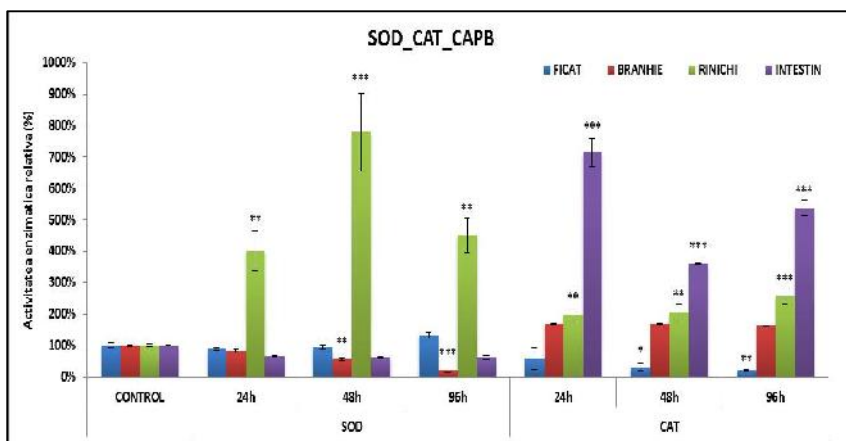


Figura nr. 4 Nivelul activita ii enzimatic SOD i CAT în ficat, branhie, rinichi i intestin intoxicatecu 1 mg/l CAPB în intervalul de testare 24h, 48h i 96h. *P<0,05 – efect semnificativ fa de martor;

Dozarea acestor enzime antioxidante din organele analizate intoxicate cu Hyamin au eviden iat amplificarea activit ii CAT ceea ce indic prezen a unui nivel ridicat de peroxid de hidrogen care inactiveaz SOD, fapt confirmat de al i cercet tori [Bray i colab, 1974]. Se poate aprecia c expunerea la CAPB, genereaz un r spuns adaptativ la nivelul rinichiului, branhiei i intestinului.

Zimografie SOD

În **figura nr. 5** se poate observa c în intoxica ia cu Hyamin la nivelul ficatului, izoforma de Mn- SOD are o activitate mai redus în compara ie cu martorii de interval. Forma Cu-SOD prezint o arie a peak-ului relativ mai mare în primele 24h de intoxica ie cu Hyamin , dup care efectul scade gradual comparativ cu martorul pân la 96h. Aceast diferen de activitate între cele doua izoforme sugereaza faptul ca prima int a toxicita ii Hyaminei este mitocondria, fiind probabil cea mai afectat . Efectul cel mai pronun at se observ la 96h dup intoxica ie în cazul ambelor izoforme de SOD. De asemenea se poate observa variabilitatea între indivizi în ceea ce prive te num rul izoformelor existente la nivelul citosolului i mitocondriei.

Analizând comparativ valorile activita ii superoxid dismutazei totale determinate prin metoda spectrofotometric i cele eviden iate zimografic se poate concluziona c sc derea activita ii SOD la nivel celular se datoreaz în egal masur ambelor izoenzime.

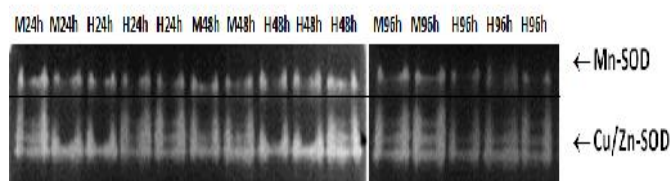


Figura nr. 5 Zimografie SOD (Hyamin)

Activitatea enzimatic a GPX, GST i GRED

Figurile nr. 7 i 8 eviden iaz , activitatea GRED sc zut eviden iat la toate intervalele de intoxicare cu Hyamin i CAPB, ceea ce indic într-o mare m sur nivelul sc zut de GSH (tioli liberi) existent la nivelul ficatului, rinichiului i intestinului. Deci, se poate sugera implicarea glutatationului în reac iile de detoxifiere a organismului de compusul poluant i metaboli ii s i. O biodisponibilitate sc zut a glutatationului împiedic exercitarea func ie i la valori normale a enzimei antioxidante GPX.

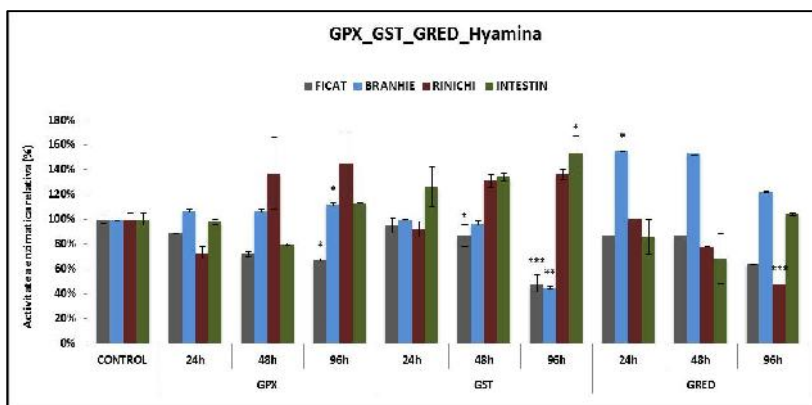


Figura nr. 7 Nivelul activita ii enzimatic GPX, GST i GRED în ficat, branhie, rinichi i intestin intoxicate cu 1 mg/l Hyamina în intervalul de testare 24h, 48h i 96h. *P<0,05 – efect semnificativ fa de martor; **P<0,01 – efect distinct semnificativ fa de martor; ***P<0,001 – efect foarte semnificativ fa de martor.

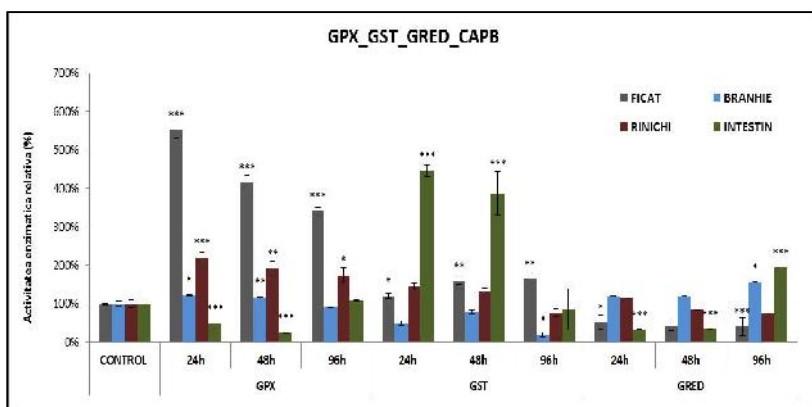


Figura nr. 8 Nivelul activita ii enzimatic GPX, GST i GRED în ficat, branhie, rinichi i intestin intoxicate cu 1 mg/l CAPB în intervalul de testare 24h, 48h i 96h. *P<0,05– efect semnificativ fa de martor; **P<0,01 – efect distinct semnificativ fa de martor; ***P<0,001 – efect foarte semnificativ fa de martor.

Modularea activit ii specifice a LDH i G6PDH

Intoxica ia cu surfactan ii studia i, au condus în ambele cazuri, la modific ri de activitate enzimatic ale enzimelor LDH i G6PDH, toate organele fiind afectate. S-a observat, c în general activit ile LDH i G6PDH scad, excep ie la nivelul rinichiului în cazul ambelor substan e testate, activitatea LDH cre te semnificativ dup 96h. Având în vedere faptul c LDH catalizeaz transformarea piruvatului în lactat, cre terea activit ii observat la nivelul rinichiului sugereaz intensificarea metabolismului anaerob pentru perioada de timp în care se acumuleaz excesiv compu i la nivel tisular. Este posibil ca în prezența acestor surfactanți să se modifice structura membranelor mitocondriale deranjând probabil fosforilarea oxidativ . În acest context, este posibil ca glicoliza sa fie activat pentru sintez rapid de ATP.

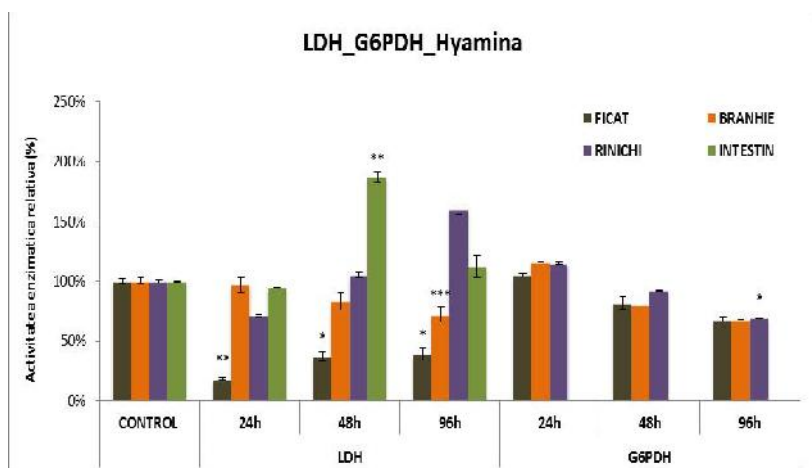


Figura nr. 9 Nivelul activita ii enzimatic LDH i G6PDH în ficat, branhie, rinichi i intestin intoxicate cu 1 mg/l Hyamina în intervalul de testare 24h, 48h i 96h. *P<0,05 – efect semnificativ fa de martor; **P<0,01 – efect distinct semnificativ fa de martor; ***P<0,001 – efect foarte semnificativ fa de martor.

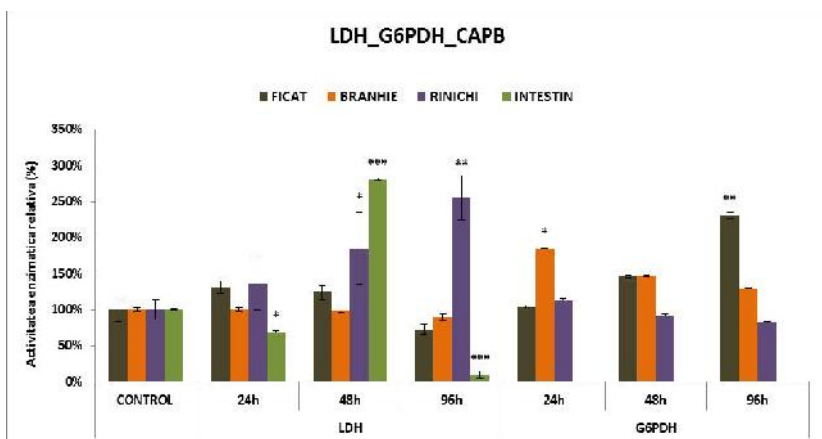


Figura nr. 10 Nivelul activita ii enzimatic LDH i G6PDH în ficat, branhie, rinichi i intestin intoxicate cu 1 mg/l CAPB în interval de testare 24h, 48h i 96h. *P<0,05 – efect semnificativ fa de martor; **P<0,01 – efect distinct semnificativ fa de martor; ***P<0,001 – efect foarte semnificativ fa de martor.

Peroxidare lipidic

Nivelul peroxidarii lipidice exprimate sub formă de malondialdehid în organele analizate de la pe tii expu i la cele dou tipuri de surfactan i sunt prezentate în **figurile nr. 11 i 12**.

Analizând rezultatele s-a apreciat ca intoxica ia cu Hyamin afecteaz organele în urm toarea ordine: branhie, ficat, rinichi, intestin; iar intoxica ia cu CAPB prezint specificitate în primul rând pentru rinichi i branhiile, urmate de ficat i intestin.

Peroxidarea lipidic înregistrat dup intoxica ia acut cu CAPB este net superioar Hyaminei, fapt ce puncteaz în mod cert o deteriorare a membranelor celulare, pierderea homeostaziei celulare i formarea aduc ilor dintre MDA i proteine sau ADN, care explic toxicitatea compusului i conduc în cele din urm la carcinogeneza .

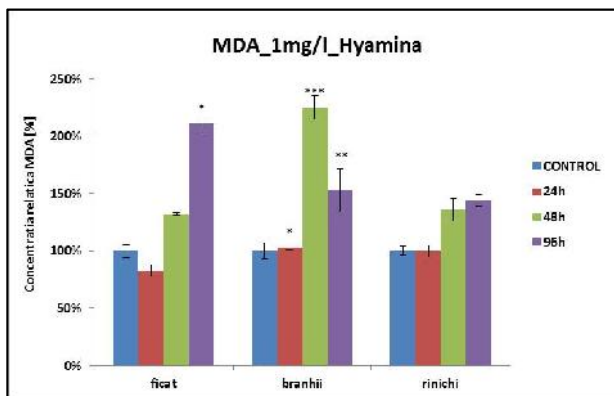


Figura nr. 11 Varia ia MDA în ficat, branhiile i rinichi intoxicate cu 1mg/l Hyamin

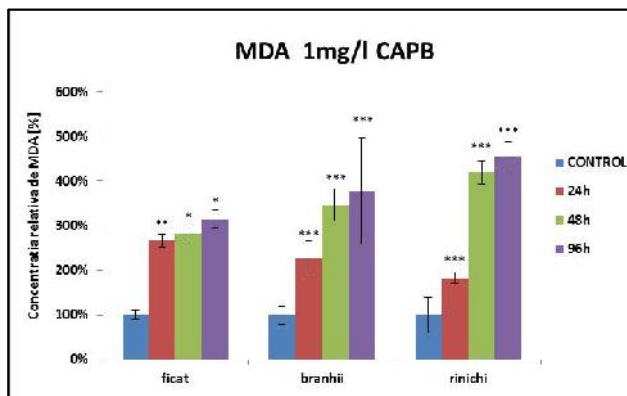


Figura nr. 12 Varia ia MDA în ficat, branhiile i rinichi intoxicate cu 1mg/l CAPB

*P<0,05 – efect semnificativ fa de martor; **P<0,01 – efect distinct semnificativ fa de martor; ***P<0,001 – efect foarte semnificativ fa de martor.

Evaluarea nivelului de Glutation redus (GSH)

Concentra ia de GSH la nivelul ficatului, rinichiului i branhiilor, a sc zut în raport cu martorii la toate intervalele de expunere la ambele substan e testate (**figurile nr. 13 i 14**). Aceste rezultate ne conduc la

concluzia inducerii unei stări de stres oxidativ la nivelul acestor organe ca urmare a unei concentrații crescute de radicali liberi determina și de prezența acută a toxicului. Rezultatele pot fi corelate de asemenea cu nivelele scăzute ale activității enzimelor GRED și GST care utilizează moleculele de GSH în procesul de detoxifiere a organismului.

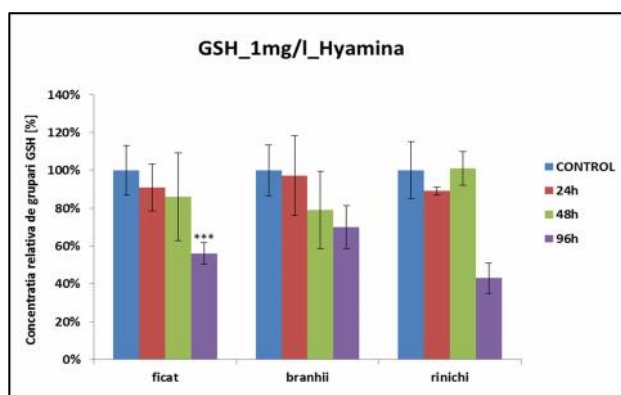


Figura nr. 13 Variația GSH în ficat, branhiile și rinichi intoxicate cu 1mg/l Hyamin ,

***P<0,001 – efect foarte semnificativ față de martor

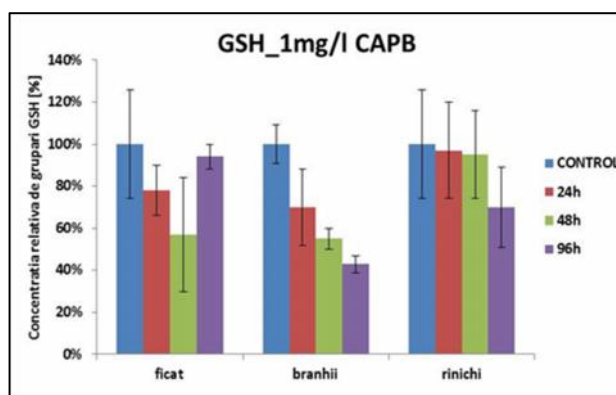


Figura nr. 14 Variația GSH în ficat, branhiile și rinichi intoxicate cu 1mg/l CAPB

Dozare grupuri tiol (SH)

În cazul nivelului de *SH proteice*, la nivelul ficatului, modificările sunt foarte semnificative, începând cu scderea la 24h și 48h și continuând cu o creștere foarte semnificativă la 96h. În cazul branhiilor intoxicate cu Hyamin s-a putut observa creștere la 24h și 48h, însă după 96h s-a constatat revenirea în limitele martorului, ceea ce ar putea specula că branhiile reușesc să treacă cu bine peste ocular intoxicației acute cu Hyamin , deși acest lucru nu este confirmat de celelalte determinări.

În intoxicația cu CAPB a branhiilor s-a observat încadrarea în limitele martorului la 24h și 48h, însă după 96h nivelul *SH proteice* crește foarte semnificativ.

În preparatele obținute din mușchiul alb s-au observat creșteri distinct semnificative în cazul ambelor substanțe testate. În mușchiul roșu creșterile distinct semnificative de la 24h și 48h sunt compensate de scderea bruscă la 96h, efect ce se poate pune pe seama micorării stocului existent de GSH și alii antioxidanți neproteici cu masă moleculară mică.

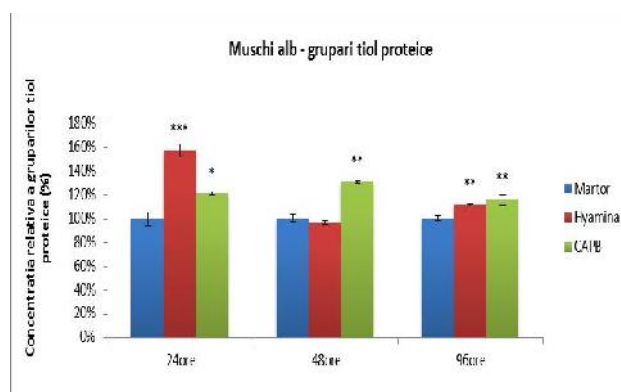


Figura nr. 15 Variația SH proteice în mușchiul alb

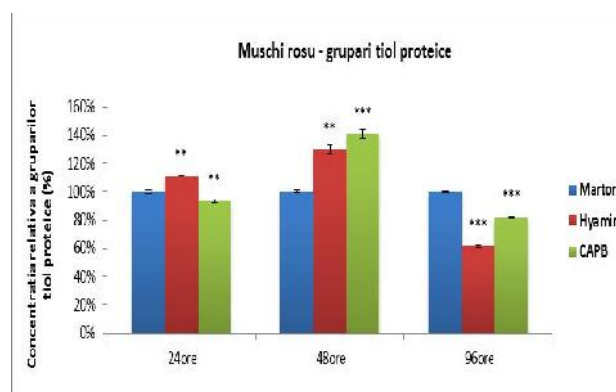


Figura nr. 64 Variația SH proteice în mușchiul roșu

*P<0,05 – efect semnificativ față de martor; **P<0,01 – efect distinct semnificativ față de martor; ***P<0,001 – efect foarte semnificativ față de martor.

Dozarea grup rilor carbonil

În mu chiul alb i ro u (**figurile nr. 17 i 18**) s-a eviden iat cre terea semnificativ a concentra iei de carbonili la toate intervalele de intoxicare în cazul ambelor substan e studiate. Semnificativ este cre terea gradual înregistrat la nivelul mu chiului ro u care se datoreaz în special metabolismului aerob al acestui esut, expunerea la surfactan i determinând oxidarea proteinelor i formarea grup rilor carbonil.

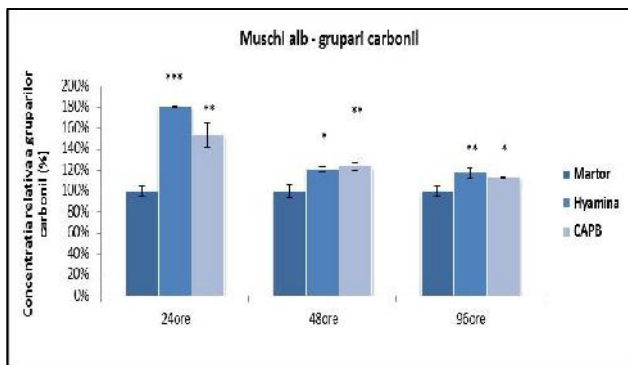


Figura nr. 17 Varia ia gruparilor carbonil în mu chiul alb

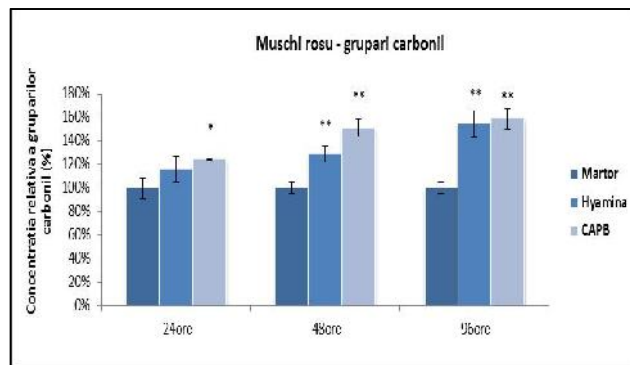


Figura nr. 18 Varia ia gruparilor carbonil în mu chiul ro u

*P<0,05 – efect semnificativ fa de martor; **P<0,01 – efect distinct semnificativ fa de martor.

Profil proteic mu chi

Intoxica ia acut cu Hyamin a determinat în mu chiul alb, la 96 h, o cre tere a densit ilor optice a formelor moleculare cu masele de: 327, 142, 64, 51, 29, 22 kDa, cea mai mare cre tere eviden iindu-se pentru forma molecular cu masa de 64kDa (**figura nr. 19**).

La nivelul mu chiului ro u, Hyamina a provocat o cre tere a densit ii optice a formei moleculare cu masa de 42 kDa. Dup 48 h nu s-au înregistrat modific ri semnificative în raport cu martorul de interval, iar dup 96h de expunere la poluant s-a observat sc derea valorilor densit ii optice a formelor moleculare cu masele de 176, 118, 42 i 3 kDa (**figura nr. 20**).

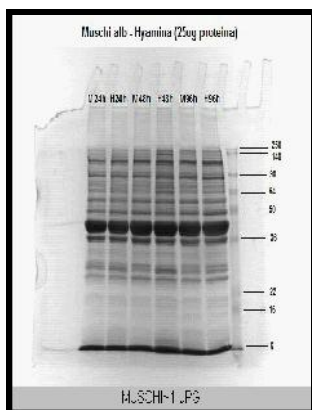


Figura nr. 19 Profil proteic muscular – mu chi alb, intoxicatie cu 1mg/l Hyamin

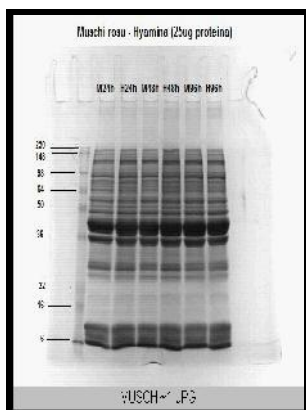


Figura nr. 20 Profil proteic muscular – mu chi ro u, intoxicatie cu 1mg/l Hyamin

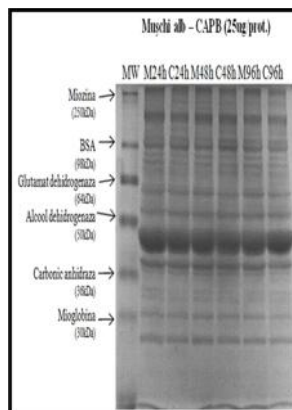


Figura nr. 21 Profil proteic muscular – mu chi alb, intoxicatie cu 1mg/l CAPB

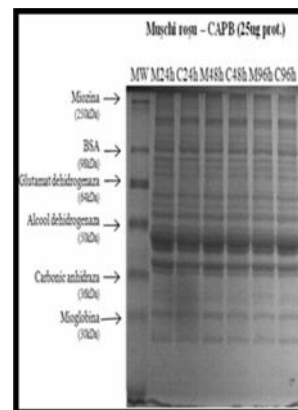


Figura nr. 22 Profil proteic muscular –mu chi ro u, intoxicatie cu 1mg/l CAPB

S-a constatat c CAPB determin cre terea densita ii optice a formei moleculare cu masa de 42 kDa. Dup 96h de expunere la poluant s-a înregistrat cre tere ariei peak- ului b-actinei cu 31% fa de martor (**figurile nr. 21 i 22**)

Metaloproteinaze matriceale în mu chi

Nivelul activit ii metaloproteinazelor matriceale MMP2 (cu mas molecular de 72 kDa) din extractul de mu chi alb intoxicat cu Hyamin , înregistreaz o sc dere în raport cu martorul la începutul intervalului de expunere, cre te semnificativ dup 48 h i p streaz valori crescute i dup 96 h. Activitatea MMP9, cu mas molecular de 92 kDa a crescut în toate intervalele de expunere la poluant fa de martorul de interval (**figura nr. 21**).

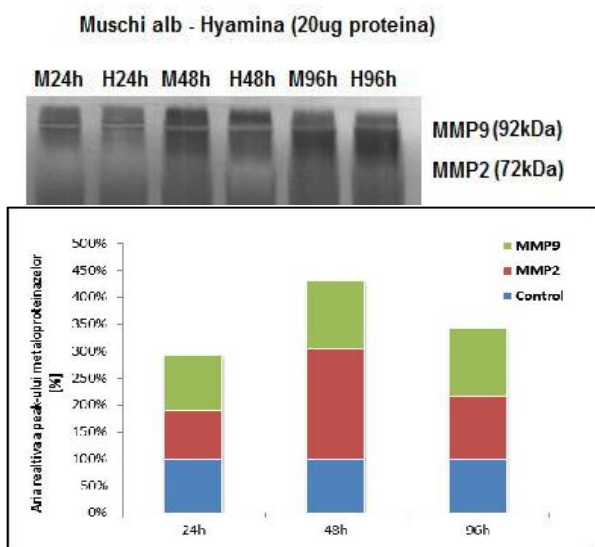


Figura nr. 21 Activitatea metaloproteinazelor MMP2 i MMP9 din mu chiul alb, intoxicat ie cu 1mg/l Hyamin

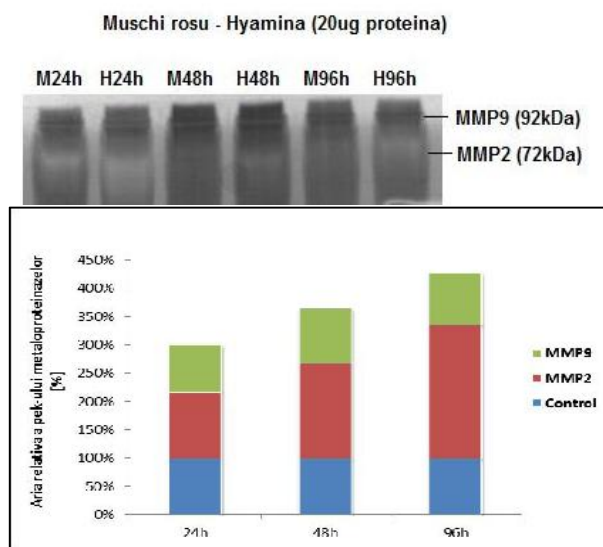


Figura nr. 22 Activitatea metaloproteinazelor MMP9, MMP2 din mu chiul ro u, 1mg/l Hyamin

Nivelul activit ii metaloproteinazelor matriceale MMP2 din extractul de mu chi ro u intoxicat cu Hyamin , înregistreaz o cre tere în raport cu martorul la toate intervalele de intoxicare. Activitatea MMP9, este inhibat la începutul intervalului de expunere i cre te dup 48 si 96 h de expunere (**figura nr. 22**).

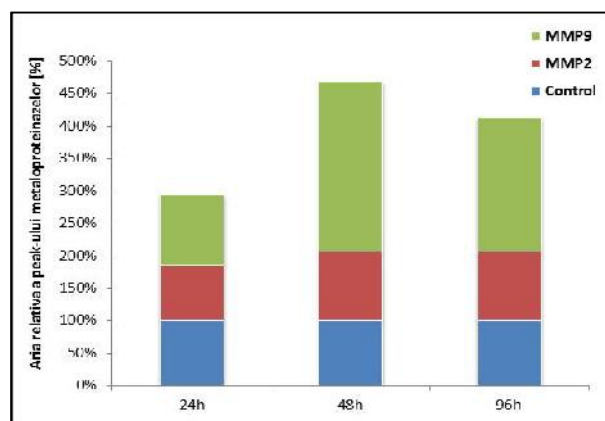
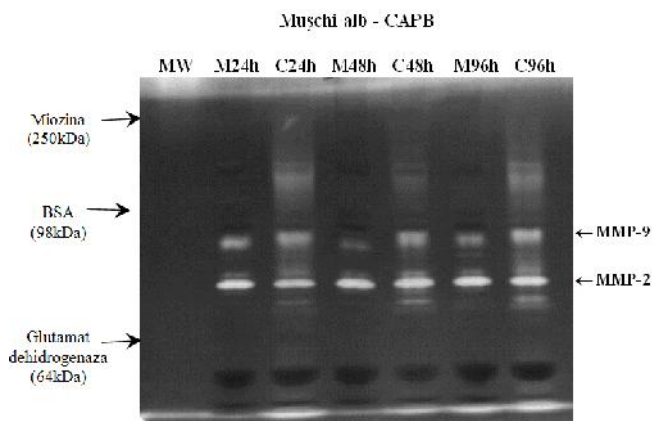


Figura nr. 23 Activitatea metaloproteinazelor MMP2 i MMP9 din mu chiul alb, intoxicat ie cu 1mg/l CAPB

Nivelul activit ii metaloproteinazelor matriceale MMP2 din extractul de mu chi alb intoxicat cu CAPB, înregistreaz o sc dere în raport cu martorul la începutul intervalului de expunere, dup care înregistreaz cre teri u oare la 48h i 96h. Activitatea MMP9 a crescut în toate intervalele de expunere la poluant fa de martorul de interval (**figura nr. 23**)

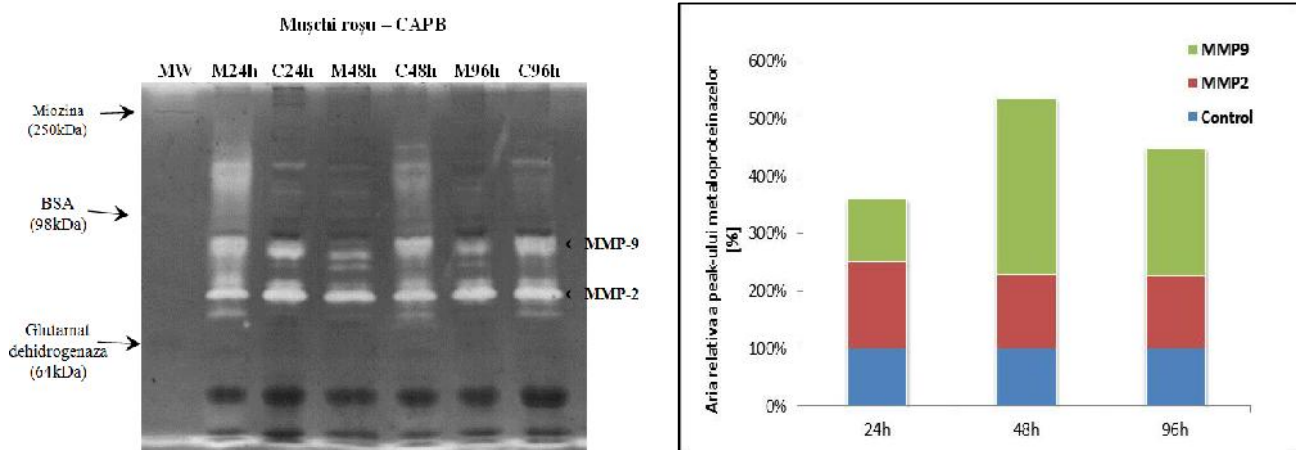


Figura nr. 24 Activitatea metaloproteinazelor MMP2 i MMP9 din mu chiul ro u, intoxicat ie cu 1 mg/l CAPB

Nivelul activit ii metaloproteinazelor matriceale MMP2 in extractul de mu chi ro u intoxicat cu CAPB (**figura nr. 24**), înregistreaz o cre tere în raport cu martorul în toate intervalele de timp testate. Activitatea MMP9 se încadreaz în limita martorului la începutul intervalului de expunere, dar cre te dup 48 i 96 h de expunere.

Interesant este faptul c în cazul intoxica iei acute cu Hyamin se activeaz MMP-2, iar în cazul intoxica iei cu CAPB se activeaz MMP-9. Acest diferen eviden iaz enzime i mecanisme diferite implicate în refacerea matrixului extracelular i regenerarea tisular la nivelul celor dou tipuri de mu chi. Cre terea nivelului de activare a metaloproteinazelor MMP2 i MMP9 determin refacerea tisular i vindecarea leziunilor survenite din cauza ac iunii toxice a poluantului la nivelul mu chiului ro u.

CAPITOLUL VIII - EVALUAREA MODIFIC RILOR HISTOLOGICE

Scopul prezentului capitol a fost eviden ierea modific rilor histologice la nivel tisular provocate de intoxica ia pe tilor cu clorur de benzentoniu (Hyamin 1622) i cocamidopropil betain . Pentru eviden ierea efectelor acute ale surfactan ilor testa i s-a ales metoda de colorare hematoxinin -eozin , permi ând decelarea efectelor structurale la nivelul mai multor organe vitale (ficat, branhie, rinichi, intestine, mu chi alb i ro u, etc.).Pe tii supravie uitori (specia *Cyprinus carpio*, crap) intoxicat i timp de 96h cu câte 1mg/l surfactant cationic i amfoteric, au fost sacrificat i la intervalele de 24h, 48h i 96h pentru prelevarea organelor de interes în vederea investiga iilor histopatologice.

S-a constatat c surfactantul cationic (clorura de benzentoniu) determin urm toarele modific ri: ficat – vacuolizarea hepatocitelului i hipertrofierea unor nuclei ai celulelor hepatice; branhie – congestie vascular , lamele branhiale clavate i fuziune; rinichi – vacuolizarea epiteliului tubulilor uriniferi, formare de agregate de macrofage i dilatarea spa iului capsulei Bowman; intestine – vacuolizarea citoplasmei celulelor epiteliale i tendin de fuziune a vilozit ilor (**figurile nr. 26, 27, 28, 29**).

În cazul surfactantului amfoteric (cocamidopropil betain) s-au observat următoarele efecte: ficat – apariția zonelor necrotice, formare de agregate de macrofage și capilare dilatate; bronhii - congestie vasculară, lamele branhiale clavate și fuziune; rinichi- hipertrofierea nucleilor, necroze la nivelul epitelului tubulilor uriniferi; intestine - vacuolizarea citoplasmei celulelor epiteliale și tendință de fuziune a vilozităților (**figurile nr. 25 și 30**).

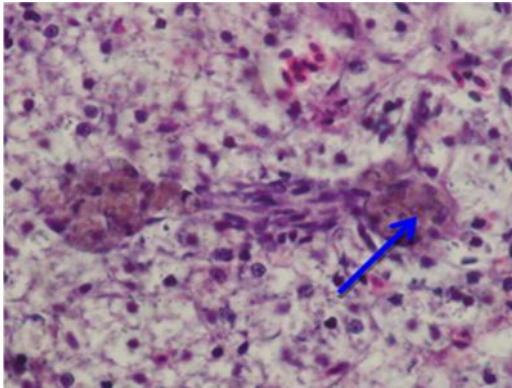


Figura nr. 25 Secțiune prin ficat după intoxicație acută cu CAPB după 96 h; H-E, x 40; Agregate de macrofage; Capilare sinusoidale dilatate

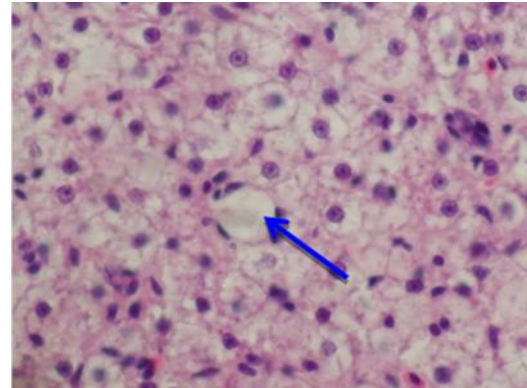


Figura nr. 26 Secțiune prin ficat după intoxicație acută cu Hyamin 96 h; H-E, x 40; Vacuolizarea hepatocitelor



Figura nr. 27 Secțiune prin ficat după intoxicație acută cu Hyamin 48 h H-E, x 20; Lamelă clavată sau anevrism lamelar



Figura nr. 28 Secțiune prin ficat după intoxicație acută cu Hyamin 48 h H-E, x 240; Fuziunea lamelilor branhiale

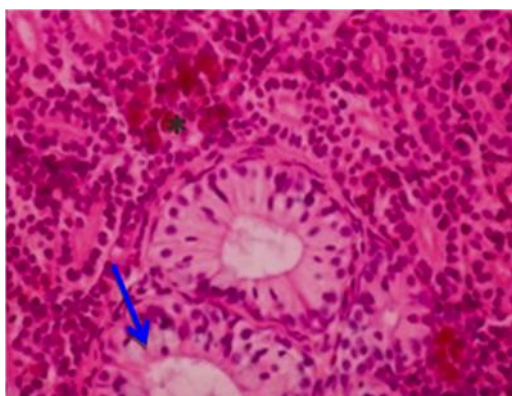


Figura nr. 29 Secțiune prin rinichi după intoxicație acută cu Hyamin 96 h, H-E, x 40; Sgeată-Vacuolizarea epitelului tubulilor uriniferi; Steluță-Agregat de macrofage

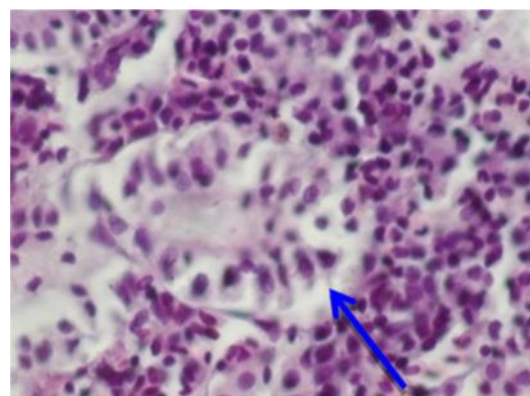


Figura nr. 30 Secțiune prin rinichi după intoxicație acută cu CAPB 96 h, H-E, x 40; Necrozarea epitelului tubulilor uriniferi

Analiza histologică a organelor analizate a scos în evidență următoarele:

- Modificările structurale provocate de cei doi agenți de suprafață nu sunt specifice și au fost identificate și în cazul expunerii la alte categorii de xenobiotice;

- Modificările structurale au afectat organe vitale implicate în detoxifierea organismului: ficat, rinichi, bronhii, debutând după intervale scurte de expunere acută la poluant (24 h);
- Majoritatea modificărilor structurale sunt considerate compatibile cu funcționarea esuturilor și supraviețuirea, însă au apărut și anomalii severe și foarte severe: anevrism, rupturi celulare, focare de necroză care periclitază buna funcționare a esutului;
- Analiza histologică a fragmentelor de organe poate constitui un biomarker în monitorizarea calității apei și al efectelor compozițiilor deversate în bazinele acvatice

CAPITOLUL IX - CARACTERIZAREA RISCULUI ACVATIC

Prezenta lucrare s-a finalizat prin elaborarea unei metodologii de evaluarea a riscului acvatic utilizat în scopul evaluării efectelor adverse ale expunerii surfactanților cationici și amfoterici asupra componentei acvatice.

Scopul metodologiei a fost de a evalua și caracterizarea riscului acvatic generat de agenții de suprafață cationici (Hyamina 1622 CAS 121-5400) și amfoterici (cocamidopropil betaina CAS 4292-10-8) și estimarea unor concentrații maxime admise în apele de suprafață astfel încât să nu fie pus în pericol viața organismelor acvatice pe întreg lanțul trofic.

Evaluarea riscului acvatic presupune colectarea de informații și obținerea de date in-house pentru a se estima concentrația de surfactanți cationici și amfoterici în componenta acvatic (*predicted exposure concentration, PEC acvatic*) și concentrația la care nu sunt observate efecte adverse asupra organismelor (*no-effect concentration, PNEC acvatic*). Compararea acestor informații ne-a permis să stabilim dacă substanțele studiate au sau nu efecte nocive asupra mediului acvatic prin raportul PEC/ PNEC în care valoarea PEC trebuie să fie mai mică decât valoarea PNEC astfel încât substanțele să nu prezinte risc acvatic. Pentru substanțele individuale raportul PEC/PNEC trebuie să fie <1, ceea ce indică faptul că nu va fi nevoie de noi cercetări pentru identificarea unui potențial risc.

Având în vedere metodologiile internaționale de evaluare a riscului ecologic [**EPA 1997, CESIO 1996, HERA 2008, HERA 2005, TDG 2003**] și informațiile obținute în cadrul acestei lucrări, pentru evaluarea și caracterizarea riscului acvatic al surfactanților studiați, propunem următoarele etape conform **figurii nr. 31**:

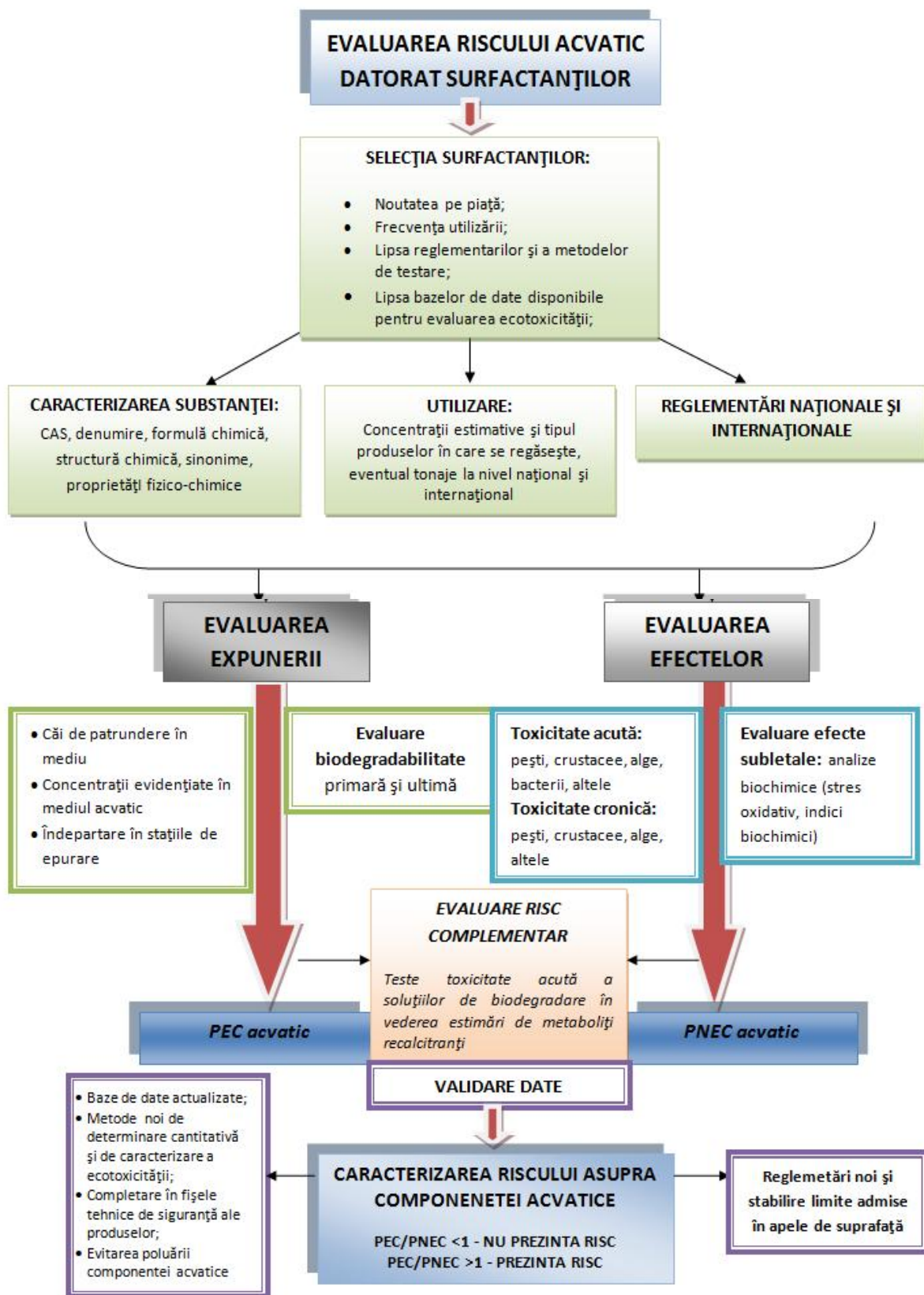


Figura nr. 31 Plan de evaluare a riscului acvatic pentru surfactanți

Metodologia aplicat a permis elaborarea a doua studii de caz privind evaluarea riscului acvatic, dup cum urmeaz :

Surfactan i cationici de tipul s rurilor quaternare de amoniu (ex. Clorura de Benzetoniu / Hyamina 1622 CAS: 121-54-0)

Tabel nr. 8 Estimarea coeficien ilor de risc acvatic conform normelor OECD, EC i ECETOC

Valoare PEC (ap de suprafa)	Valoare CE50/NOEC	Factor de aplicare la cea mai mic valoare CE50/NOEC	Valoare PNEC acvatic	Coeficient de Risc (PEC/PNEC)
PEC _{max} = 0,2 mg/l [NICNAS, 2003]	0,39 mg/l (alge) [*] [in-house]	100 (OECD) 1000 (EU) 200 (ECETOC)	0,0039 0,00039 0,00195	51,28 512,20 102,56
	0,004 mg/l (Daphnia) [**] [NICNAS, 2003]	10 (conform OECD si EU)	0,0004	500
	0,05 mg/l (alge) [***] [in-house]	100 (OECD)	0,0005	400
PEC _{min} =0,002 mg/l [NICNAS, 2003]	0,39 mg/l (alge) [*] [in-house]	100 (OECD) 1000 (EU) 200 (ECETOC)	0,0039 0,00039 0,00195	0,51 5,12 1,025
	0,004 mg/l (Daphnia) [**] [NICNAS, 2003]	10 (OECD si EU)	0,0004	5
	0,05 mg/l(alge)[***] [in-house]	100 (OECD)	0,0005	4
PEC _{max} =0,01 mg/l [in- house]	0,39 mg/l (alge) [*] [in-house]	100 (OECD) 1000 (EU) 200 (ECETOC)	0,0039 0,00039 0,00195	2,56 25,64 5,12
	0,004 mg/l (Daphnia) [**] [NICNAS, 2003]	10 (OECD si EU)	0,0004	25
	0,05 mg/l (alge) [***] [in-house]	100 (OECD)	0,0005	20
Concluzia final	Coeficient de risc >1 – surfacta ii cationici (s rurile quaternare de amoniu /Hyamina 1622) prezint risc asupra componentei acvatice la concentra ii estimate de 0,01-0,2 mg/l. Conform datelor experimentale ob inute in- house i/sau publicate în literatur , exist posibilitatea ca la concetra ii 0,002 mg/l in apa de suprafa , s nu mai prezinte efecte toxice asupra organismelor acvatice.			

Observa ii: [*] Au fost efectuate trei teste de toxicitate acute (pe ti, alge i crustacee) i s-a selectat cea mai mica valoare CE50; [**] Au fost identificate în literatur valorile de toxicitate cronic pentru crustacee i pe ti din care s-a selectat cea mai mica valoare NOEC; [***] S-a determinat in-house NOEC pentru alge.

Surfactan i amfoterici de tipul Coco alchil deriva i (ex. Cocamidopropil betain / laurilamidopropil betaine / AMFODAC LB CAS: 4292-10-8)

Tabel nr. 9 Estimarea coeficien ilor de risc acvatic conform normelor OECD, EC i ECETOC

Valoare PEC _{acvatic} (ap de suprafa)	Valoare CE50/NOEC	Factor de aplicare la cea mai mic valoare CE50/NOEC	Valoare PNEC acvatic	Coeficient de Risc (PEC/PNEC)
0,002 mg/l [in- house]	5,55 mg/l (alge) [*] [in-house]	100 (conform OECD) 1000 (conform EU) 200 (conform ECETOC)	0,055 0,0055 0,027	0,036 0,36 0,074
	0,5 mg/l (alge) [***] [in-house]	100 (OECD)	0,005	0,4
	0,09 mg/l (alge) [**] [IUCLID 2000]	10 (conform OECD / EU)	0,009	0,22
0,0019 mg/l [Kazuaki M. et al, 2008].	5,55 mg/l (alge) [*] [in-house]	100 (conform OECD) 1000 (conform EU) 200 (conform ECETOC)	0,055 0,0055 0,027	0,034 0,34 0,07
	0,5 mg/l (alge) [***] [in-house]	100 (OECD)	0,005	0,38
	0,09 mg/l (alge) [**] [IUCLID 2000]	10 (conform OECD / EU)	0,009	0,21
Concluzie final	Coeficient de risc <1 – substanta nu prezinta risc asupra componentei acvatice la concentratii estimate in componenta acvatice pana la 0,01 mg/l			

Observa ii: [*] Au fost efectuate trei teste de toxicitate acute (pe ti, alge i crustacee) i s-a selectat cea mai mic valoare CE50; [**] Au fost identificate în literatur valorile de toxicitate cronic pentru crustacee i pe ti din care s-a selectat cea mai mic valoare NOEC; [***] S-a determinat in-house NOEC pentru alge.

CONCLUZII GENERALE

Prezenta teză de doctorat a avut ca principal obiectiv caracterizarea ecotoxicologică a agenților de suprafață cationici și amfoterici respectând cerințele **Regulamentului European CE nr. 648/2004** și evaluarea riscului acvatic.

Pentru evidențierea aportului de noutate al prezentei teze de doctorat, **în prima parte a tezei** de doctorat s-a realizat stadiul cunoașterii, cu accent deosebit asupra surfactanților cationici și amfoterici, privind considerațiile generale ale detegentilor, respectiv tipuri și utilizări, aspecte ecotoxicologice (biodegradabilitate, toxicitate, bioacumulare, metabolizare), efecte subletale evidențiate la nivel fiziologic (stres oxidativ, posibili biomarkeri ai contaminării cu surfactanți potențial modificări histologice). De asemenea s-au studiat reglementările naționale și internaționale privind normarea în diverse tipuri de ape și produse de curățat, criteriile de comercializare și etichetare ecologică.

Analiza datelor de literatură expuse în **capitolul I** a condus la concluzia generală că există suficiente studii de evaluare a ecotoxicității surfactanților anionici precum și pentru o mare parte dintre cei neionici, și de aceea cercetarea viitoare ar trebui îndreptată în mod special pentru elucidarea efectelor toxice ale surfactanților cationici și amfoterici al căror profil ecotoxicologic este puțin cunoscut, iar proprietățile fizico-chimice pot influența semnificativ rezultatele studiilor ecotoxicologice. De asemenea s-a constatat un număr redus și neclar de informații privind biodegradabilitatea și toxicitatea compușilor selectați pentru cercetare (cationici – clorura de benzetoniu și amfoterici – cocamidopropil betaina).

În general pentru evaluarea ecotoxicității se recomandă metodologia standardizată OECD și ISO, reglementată și recunoscută la nivel mondial. În ceea ce privește evaluarea gradului de biodegradare, cel mai des se utilizează metodele de biodegradabilitate ultimă aerobă reglementate de către Regulamentul 648/2004 privind detergenții, iar pentru evaluarea toxicității se utilizează baterii de teste care să acopere toate nivelele trofice din mediul acvatic (pentru acestea se recomandă teste acute și cronice în sistem clasic sau alternativ).

S-a constatat că surfactanții cationici întâmpină probleme de biodegradare aerobă, în timp ce surfactanții amfoterici sunt ușor biodegradabili, iar din punct de vedere al toxicității atât surfactanții cationici cât și cei amfoterici determină efecte acute (fiind clasificați în clasele de toxicitate TOXIC sau MODERAT TOXIC) asupra peștilor, crustaceelor, algelor și bacteriilor.

În consecință, cercetarea experimentală din prezenta lucrare a utilizat pentru metodologia OECD și ISO pentru evaluarea ecotoxicității și baterii de teste de toxicitate acute, cu timp de execuție și costuri reduse, conduse pe organisme acvatice specifice apelor de suprafață din România (crap, purici de balt, alge verzi și bacterii).

Capitolul II a evidențiat că în literatura de specialitate nu există date privind efectele surfactantului cationic - clorura de benzetoniu și amfoteric - cocamidopropil betain, asupra sistemelor enzimatiche de apărare din organismul peștilor, drept pentru care rezultatele obținute în acest sens au constituit o noutate la nivel internațional.

Capitolul III a scos în evidență importanța alinierii la reglementările internaționale privind detergenții, respectiv **Regulamentul 648/2004 privind detergenții și amendamentele ulterioare** care impune reguli stricte de comercializare a produselor de curățat în vederea asigurării protecției sănătății umane și a mediului. De asemenea prezentul regulament prevede și ghiduri de evaluare a riscului complementar determinat de surfactanți în urma biodegradării prin formare de metaboli și potențial recalcitranti.

Acest capitol a subliniat un aspect foarte important pentru evidențierea noutății subiectului abordat, acela că surfactanții cationici și amfoterici nu sunt normați în apele uzate și apele de suprafață de către legislația națională și internațională.

În a doua parte a tezei au fost prezentate experimentele de laborator și rezultatele (privind biodegradarea, toxicitatea și efectele la nivelul sistemelor de apă rare ale organismelor acvatice – pești) care au condus în final la caracterizarea ecotoxicologică a surfactanților cationici și amfoterici și evaluarea riscului acvatic.

În acest scop, în vederea experimentării au fost selectați surfactanții *cationici (din clasa sursurilor quaternare de amoniu)*, utilizați frecvent în fabricarea detergenților și balsamurilor de rufe și vase, dar și în produse biocide, precum și *surfactanții amfoterici (din clasa cocoalchil derivaților)* folosiți la fabricarea produselor de îngrijire personală (ampoane, balsam pentru păr, șampoani lichizi și loțiuni de curățare pentru față) și în industria detergenților de curățare.

În **capitolul IV** au fost prezentate metodele analitice și parametrii lor de performanță, aplicate pentru determinarea cantitativă a surfactanților cationici și amfoterici (specificate în anexele Regulamentului European nr. 648/2004/CE) sunt tehnici spectrofotometrice, de rutină care implică costuri scăzute. Limitele de detecție în soluții apoase sintetice / probe de mediu contaminate (ape uzate și ape de suprafață) oferite de aceste metode sunt: 0,003 mg/l pentru surfactanții cationici și 0,002 mg/l pentru surfactanții amfoterici. Interferențele metodelor sunt determinate de prezența altor categorii de surfactanți (anionici, cationici, substanțe organice) care reacționează fie cu surfactantul înțeles fie cu reactivul de culoare formând compuși stabili. Aceste probleme pot fi înlăturate prin utilizarea reșinilor schimbătoare de ioni care separă surfactanții înțeles.

Selectivitatea metodei pentru probele sintetice a fost asigurată prin utilizarea curbelor etalon realizate pentru principalele substanțe studiate (Hyamin, Tetranyl și cocamidopropil betain). Pentru detecția selectivă a compușilor cationici și amfoterici din probele de mediu recomandăm utilizarea de tehnici performante tip HPLC.

Capitolul V a prezentat testele de biodegradabilitate (realizate conform anexelor Regulamentului European nr. 648/2004/CE) care au demonstrat că surfactanții cationici de tipul sursurilor quaternare de amoniu (ex. dialchil hidroxietil amoniu metasulfat / Tetranyl AT 7590, clorura de benzetoniu / Hyamina 1622, bromura de cetilpiridiniu și TEA esterquarii) și amfoterici tip cocoalchil derivați (ex. cocamidopropil betaina / ANFODAC LB) prezintă o biodegradabilitate primară 80% și o biodegradabilitate ultimă >60%. Conform criteriilor de conformare ale metodelor aplicate pentru evaluarea gradului de biodegradabilitate, surfactanții studiați și amestecurile lor respectă procentele de biodegradare impuse. Se remarcă o biodegradabilitate mai scăzută a surfactanților cationici comparativ cu surfactanții amfoterici. Rezultatele obținute au fost comparabile cu datele specificate în literatura de specialitate pentru compuși similari privind gradul de biodegradabilitate a acestor compuși.

Capitolul VI a prezentat experimentele de toxicitate acută care au evidențiat că surfactanții cationici (clorura de benzetoniu / Hyamina 1622 și dialchil hidroxietil amoniu metasulfat / Tetranyl AT 7590) a manifestat un efect de la foarte toxic la nociv pentru toate organismele acvatice testate, cele mai afectate organisme fiind crustaceele, algele și bacteriile. În ceea ce privește surfactanții amfoterici (cocamidopropil betaina / ANFODAC LB), aceștia au manifestat efect toxic asupra peștilor, crustaceelor și algelor, iar asupra bacteriilor a avut efect slab toxic / practic netoxic.

Conform reglementărilor în vigoare și sistemelor de clasificare am apreciat că surfactantul cationic - clorura de benzetoniu, se încadrează în **categoria 1 de toxicitate acută** deoarece prezintă efecte puternic toxice pentru crustacee și alge la concentrații < 1 mg/l. Surfactanții - cationic (dialchil hidroxietil amoniu metasulfat) și amfoteric (cocamidopropil betain) se încadrează în **categoria 2 de toxicitate acută** deoarece prezintă efecte toxice la concentrații cuprinse în intervalul 1- 10 mg/l.

Caracterul inovativ al experimentelor de toxicitate acută constă în selectarea celor doi compuși utilizați în testare (clorura de benzetoniu și cocamidopropil betaina) pentru care nu sunt disponibile date de toxicitate acută asupra speciei de pește *Cyprinus carpio*, specifică apelor dulci din România.

Tot în acest capitol s-a încercat completarea bazei de informații privind ecotoxicitatea surfactanților cationici și estimarea unui potențial risc complementar, prin studii de toxicitate efectuate pentru lichidele rezultate în urma biodegradării. Efluenții de biodegradare ai surfactanților cationici testați au manifestat efecte toxice asupra organismelor, gradul de toxicitate variind în funcție de tipul organismului, astfel încât algele și bacteriile au fost organismele cele mai sensibile, aspect care poate fi corelat cu efectul determinat de substanțele chimice originale asupra acestor specii. Din analiza datelor experimentale s-a evidențiat că *Hyamina 1622* / clorura de benzențoniu determină un impact toxic pronunțat în comparație cu *Tetranyl AT 7590* / dialichil hidroxietil amoniu metasulfatul, iar faptul că s-au înregistrat efecte toxice ale soluțiilor de agenți de suprafață rezultate în urma proceselor de biodegradare, ne conduce la ipoteza apariției unor metaboli de biodegradare cu potențial recalcitrant sau persistența surfactantului în mediul de testare. Pentru moment dotarea analitică nu permite determinarea metaboliților ai surfactanților fiind necesare echipamente moderne.

Efectele surfactanților selectați pentru testare (clorura de benzențoniu și cocamidopropil betaina) asupra sistemului antioxidant de apărare și inducerea stresului oxidativ, au fost prezentate în **capitolul VII**. Concluziile generale obținute în acest sens au fost următoarele:

- s-a constatat că ficatul și branhiile au fost organele cele mai afectate de acțiunea toxică a surfactantului cationic cu schimbări semnificative în metabolismul celular. Alături de afectarea sistemului enzimatic antioxidant, intensificarea peroxidării lipidice și scăderea GSH confirmă faptul că *Hyamina* determină toxicitate la nivelul ficatului și branhiilor din *Cyprinus carpio* prin instalarea stresului oxidativ. Aadar, clorura de benzențoniu (*Hyamina 1622*) manifestă un efect toxic sub-letal acut cu tendința de impact toxic pe termen lung.
- intoxicația cu surfactant amfoteric, a evidențiat o acțiune toxică selectivă la nivelul organelor, ficatul și branhia fiind cele mai afectate. Pe baza analizelor biochimice, care au evidențiat instalarea stresului oxidativ și a peroxidării lipidice la nivelul organelor studiate, rezultă că această substanță, care se regăsește la o puritate destul de mică (<50%) manifestă un efect toxic sub-letal acut cu tendință de impact toxic pe termen lung.

Capitolul VIII a evidențiat modificările histologice la nivel tisular provocate de intoxicația pe țesuturile cu clorura de benzențoniu (*Hyamina 1622*) și cocamidopropil betaină. S-au constatat modificări ale structurilor tisulare în ambele cazuri de intoxicare, efectelor fiind evidențiate imediat după 24 h de la intoxicare. Cele mai drastice modificări în raport cu martorii s-au evidențiat în intoxicația cu clorura de benzențoniu care determină vacuolizarea hepatocitelului la nivelul ficatului, congestie vasulară la nivelul branhiilor, vacuolizare și fomiare de agregate de macrofage la nivelul epiteliului urinifer. Nici efectele surfactantului amfoteric (cocamidopropil betainei) nu sunt neglijate acesta determinând zone necrotice la nivelul ficatului și fuziunea lamelor branhiale.

Prezenta lucrare s-a finalizat cu elaborarea unei metodologii și cu două studii de caz privind caracterizarea riscului asupra componentei acvatică, prezentate în **capitolul IX**. Prin aplicarea metodologiei de evaluare risc propusă în ultimul capitol al lucrării, s-a evaluat riscul acvatic generat de clorura de benzențoniu / *Hyamina 1622* (surfactant cationic din clasa surfactanților quaternari de amoniu) și cocamidopropil betaină / ANFODAC LB (surfactant amfoteric din clasa cocoalchil derivaților).

Evaluarea riscului acvatic a presupus colectarea de informații privind expunerea la substanțele testate (caracterizare, proprietăți, utilizare, condiții de persistență în mediu, prezență în mediu, biodegradare, etc.) astfel încât să se permită predicția concentrației în apa de suprafață (*Predicted Exposure Concentration, PEC*). Un al doilea set de informații (toxicitate acvatică, efecte sub-letale, efecte complementare, etc.) a presupus estimarea celei mai mari concentrații la care nu sunt observate efecte adverse asupra organismelor acvatice

(*Predicted No-Effect Concentration*, PNEC). Compararea acestor informații a permis stabilirea riscului generat de substanțele testate asupra mediului acvatic. Utilizarea acestor substanțe în produse de curățat este permisă atunci când PEC este mai mic decât PNEC.

Concluziile finale ale studiilor de caz au fost următoarele:

Surfactanți cationici

Majoritatea valorilor coeficienților de risc acvatic estimați pentru surfactanți cationici (săruri quaternare de amoniu) din care face parte clorura de benzetoniu (Hyamina 1622) au fost >1, ceea ce atestă faptul că aceste substanțe implică cea studiată de către noi **prezintă risc asupra organismelor acvatice**, apreciere susținută de efectele sub-letale evidențiate la nivelul sistemelor de detoxifiere a organismelor, precum și de efectele complementare pe care aceste substanțe le poate determina în urma biodegradării prin persistență sau generare de metaboli și recalcitranți.

Ca urmare a datelor obținute prin acest studiu de risc și având în vedere faptul că monitorizarea și normarea concentrațiilor de agenți de suprafață cationici nu sunt reglementate de legislația națională și internațională privind calitatea apelor de suprafață, recomandăm ca **valoarea de 0,002 mg/l să fie stabilită ca limită maxim admisă în apa de suprafață pentru agenții de suprafață cationici cu azot quaternar** (implicit clorura de benzetoniu, dialchil hidroxietil metasulfat, bromura de cetilpiridiniu), astfel încât să nu fie afectată viaa ecosistemului acvatic.

Surfactanți cationici

Coeficientul de risc determinat pentru surfactanți amfoterici (cocoalchil derivați, ex. cocamidopropil betain / laurilamidopropil betain / ANFODAC LB) este < 1 ceea ce conduce la concluzia că această clasă de substanțe **nu prezintă risc** asupra componentei acvatice din România, înșă datorită efectelor sub-letale negative evidențiate la nivelul organelor de pește mai sunt încă necesare studii în acest sens.

De asemenea, ca urmare a acestui studiu de risc și având în vedere faptul că agenții de suprafață amfoterici nu sunt normați de legislația națională și internațională, estimăm că valoarea de **0,01 mg/l poate fi considerată calimită maxim admisă în apa de suprafață pentru compușii de tip cocoalchil derivați (ex. Cocamidopropil betaina / laurilamidopropil betain / ANFODAC LB)**, astfel încât să nu fie afectată viaa ecosistemului acvatic.

Contribuții originale ale prezentei teze de doctorat au fost următoarele:

- Informații noi privind caracterizarea ecotoxicologică (biodegradare și toxicitate) a surfactanților cationici și amfoterici (în special clorura de benzetoniu și cocamidopropil betaina). Surfactanții studiați se biodegradează primar (>80% eficiență de îndepărtare) și ultim (>60% eficiență de îndepărtare), cu mențiunea că surfactanții cationici au obținut cele mai mici valori. În ceea ce privește toxicitatea acută acvatică s-a constatat că surfactanții cationici sunt toxici pentru crustacee, alge și bacterii („toxicitate acută categoria 1”), iar surfactanții amfoterici sunt toxici pentru pești, crustacee și alge („toxicitate acută categoria 2”).
- Inițierea evaluării riscului complementar a surfactanților cationici prin efectuarea de teste de toxicitate a lichidelor rezultate în urma biodegradării. Efluenții rezultă și în urma biodegradării surfactanților cationici și în menținerea toxicității după biodegradare asupra algelor și bacteriilor, în timp ce surfactanții amfoterici determină o toxicitate mai slabă comparativ cu substanța originală.
- S-au obținut informații importante privind efectele clorurii de benzetoniu și cocamidopropil betainei asupra sistemelor enzimatiche de apă rare a peștilor, respectiv detalii privind inducerea stresului oxidativ de către surfactanții cationici și amfoterici. Ambele substanțe induc modificări ale activităților enzimatiche specifice ale enzimelor antioxidante din organele studiate (cele mai afectate organe fiind ficatul și branhiile) și deteriorări

oxidative ale proteinelor ceea ce indic toxicitatea acută (la 0,5mg/l surfactant) cu tendință de impact pe termen lung.

- S-au evidențiat efectele acute ale surfactanților cationici și amfoterici la nivel tisular, cele mai drastice modificări fiind identificate la nivelul ficatului, bronhiilor și rinichiului. Majoritatea modificărilor structurale sunt considerate compatibile cu funcționarea esuturilor și supraviețuirea, însă au apărut și anomalii severe și foarte severe: anevrism, rupturi celulare, focare de necroză care periclizează buna funcționare a esutului;
- Metodologie de evaluare ecotoxică a surfactanților cationici și amfoterici asupra componentei acvatice și două studii de caz specifice claselor de surfactanți studiate. Aplicarea metodologiei a condus la obținerea următoarelor coeficienți de risc ecotoxici: surfactanții cationici (clorura de benzetoniu – PEC/PNEC >1 – prezintă risc asupra organismelor acvatice; surfactanții amfoterici (cocamidopropil betaina - PEC/PNEC <1 - nu prezintă risc asupra organismelor acvatice);
- S-au stabilit concentrațiile maxime admise de surfactanți cationici (0,002mg/l) și amfoterici (0,01mg/l) în apele de suprafață astfel încât să nu fie afectat viaa ecosistemului acvatic pe întreg lanțul trofic;

Aplicabilitate

- S-au dezvoltat / implementat metode pentru evaluarea biodegradabilității ultime și toxicității acvatice (conduse pe alge și bacterii) în vederea aplicării în cercetare și la beneficiarii direcți. Metodele aplicate au fost propuse în 2011 pentru implementarea în practică curentă de laborator și acreditare RENAR. De asemenea unele din metodele experimentate au fost utilizate în testarea produselor de curățat / biocide ale beneficiarilor pentru obținerea de rezultate necesare completării fișelor tehnice de securitate și conformare la legislația în vigoare.
- În ceea ce privește aplicabilitatea legislativă, rezultatele obținute (coeficienții de risc și limitele maxime admise în apa de suprafață) pot completa / modifica actele normative existente pentru normarea calității apei de suprafață (ex. Ordinul 161/2006) și pot influența factorii de decizie pentru elaborarea de programe de monitorizare a surfactanților indiferent de tipul lor, în apa de suprafață și apele uzate municipale. De asemenea pot influența factorii de decizie responsabili pentru implementarea Regulamentului 648/2004 privind detergenții pentru efectuarea unui control mai riguros al produselor din această clasă pentru stabilirea caracteristicilor de ecotoxicitate și evaluarea riscurilor.

Recomandări pentru consumatori

- Respectarea dozajelor și utilizarea corectă a produselor conform etichetei sau prospectului;
- Folosirea detergenților compacți sau a celor lichizi, pentru evitarea fosforilor;
- Folosirea detergenților ecologici identificați pe piață cu un simbol grafic specific în formă de floare;
- Depozitarea și evacuarea adecvată a deeurilor;
- Evitarea spălărilor inutile;
- Alegerea corectă a produselor, respectiv utilizarea unui produs universal adecvat pentru mai multe aplicații.

Ca urmare a cercetărilor efectuate până în prezent și a informațiilor / datelor prezentate în acest studiu, am identificat câteva **perspective de cercetare privind subiectul agenților de suprafață cationici și amfoterici:**

- Dezvoltarea de noi metode analitice de control a agenților de suprafață cationici și amfoterici, care datorită complexității structurale și a matricelor de mediu în care aceștia se regăsesc, pot produce interferențe, iar utilizarea metodelor clasice spectrofotometrice ridică probleme de sensibilitate și selectivitate. De asemenea dezvoltarea de metode noi pentru detecția metaboliților pentru toate clasele de surfactanți.
- Caracterizarea și evaluarea riscului determinat de agenții de suprafață cationici și amfoterici asupra microorganismelor din noul mediu activ și organismelor din sediment și sol, deoarece aceste substanțe active prezintă o mare capacitate de adsorbție pe diverse materii.
- Există încă foarte multe substanțe cu proprietăți surfactante cationice și amfoterice pentru care nu există date de literatură privind ecotoxicitatea și riscul asupra componentelor de mediu.
- La nivelul României, dar și la nivel internațional, studiile de monitorizare a concentrațiilor de agenți de suprafață în apele de suprafață sunt foarte rare, aceste substanțe datorită proprietăților lor fizico-chimice ridicând probleme de calitate a ecosistemelor acvatice.
- Datele privind acțiunea surfactanților asupra sistemelor de detoxifiere a organismelor active evaluarea impactului pe termen lung și gradul de bioacumulare în diverse țesuturi ale organismelor acvatice, sunt foarte limitate.

LISTA PUBLICA IILOR

Lista lucr rilor publicate în reviste ISI

Nr. crt	Autori	Titlul Lucr rii, numele revistei, Vol , Nr, Anul apari iei
1	Gheorghe tefania, Irina Lucaciu, Rozalia Grumaz	Detergents legislative framework and ecotoxicological testing methodology, Journal of Environmental Protection and Ecology, book 3A, vol.12 (2011), 1525-1532, ISSN 1311-5065
2	Gheorghe tefania, Lucaciu Irina, Pascu Luoana	Biodegradability assessment of cationic and amphoteric raw materials, Journal of Environmental Protection and Ecology, vol.13, no.1 (2012), 155-164, ISSN 1311-5065
3.	Gheorghe tefania, Irina Lucaciu, Grumaz Rozalia Stoica C t lina	Acute toxicity assessment of several cationic and amphoteric surfactants on aquatic organisms, Journal of Environmental Protection and Ecology, nr vol.13, no.2 (2012), 541-553, ISSN 1311-5065
4.	St. Gheorghe, I. Lucaciu, E.Stanescu, C. Stoica	Romanian aquatic toxicity testing strategy under REACH, Journal of Environmental Protection and Ecology, <i>transmis spre publicare</i>

Lista lucr rilor în curs de publicare

Nr. crt	Autori	Titlul Lucr rii
1.	Gheorghe ., Mitroi D.N., Stan M., Dinischiotu A.	The acute toxicity of benzenthonium chloride on <i>Cyprinus carpio</i> sp, în curs de transmitere spre publicare în revista ISI
2.	Gheorghe tefania, Stan Miruna, Mitroi Daniel, Stoica C t lina, St nescu Elena, Irina Lucaciu, Anca Dinischiotu	Cocamidopropil betaine impact on oxidative stress biomarkers of the <i>Cyprinus carpio</i> sp., în curs de transmitere spre publicare în revista ISI
3.	Gheorghe Stefania, Irina Lucaciu, Paun Iuliana	Surfactants ecotoxicity, <i>Capitol carte „Biodegradation”, InTech Open Aceso, in curs de transmitere spre publicare</i>
4.	Irina Lucaciu, <u>Stefania</u> <u>Gheorghe</u> , Iuliana Paun, Catalina Stoica, Margareta Nicolau	Aquatic risk assessment of cationic surfactants - case study for quaternary ammonium salts, <i>în curs de transmitere spre publicare în Journalul Environmental Science and Pollution Research</i>

Lucrări comunicate și publicate în cadrul conferințelor și simpoziunilor

Nr. crt	Autori	Titlul Lucrării, denumire manifestare științifică, perioada
1	Gheorghe tefania, Irina Lucaciu, Rozalia Grumaz	„Detergents legislative framework and ecotoxicological testing methodology “- Conferința Internațională UAB-BENA” 2009 Management and Sustainable Protection of Environment” Alba Iulia, POSTER, ISBN 978-973-1890-30-2;
2	Gheorghe tefania, Irina Lucaciu, Pascu Luana	“Removal of surfactants from household cleaning products and/or cosmetic detergents during the ready biodegradability tests performed in conformity with the new European regulations”, Internațional Symposium „The environment and industry” (SIMI) 28-30 octombrie, 2009, Vol. II, Pag. 332-342, PREZENTARE ORAL, ISSN 1843-5831;
3	Gheorghe tefania, Lucaciu Irina, Pascu Luana	Ultimate biodegradability assessment of cationic and amphoteric surfactants “Internațional conference on fishery and aquaculture - a view point upon the sustainable management of the water resources in the Balkan area”, 26-28.05.2010 Galați, România, PREZENTARE ORAL, publicare CD conferință.
4	Gheorghe tefania, Irina Lucaciu, Grumaz Rozalia, Stoica Cătălina	Assessment of cationic and amphoteric surfactants acute toxicity on several aquatic organisms, WORKSHOP Internațional B.EN.A. “GLOREP 2010”, 26-28.11.2010, Timișoara, PREZENTARE ORAL, publicare volum II, pag. 70-73, PREZENTARE ORAL; ISBN: 978-606-554-210-5; ISBN 978-606-554-212-9
5	Gheorghe tefania, Irina Lucaciu, Grumaz Rozalia, Stoica Cătălina	Efectele poluării antropice cu surfactanți (cationici și amfoterici) asupra organismelor acvatice, NEWSLETTER NR. 10 aprilie 2011, al Proiectului POSDRU/79/1.4/S/53587 “Dezvoltarea capacității Comitetului Sectorial pentru formare profesională în Domeniul Protecției Mediului în sprijinul îmbunătățirii calității formării profesionale continue din România” SOMEDIU, www.unimed.ro .
6.	Gheorghe tefania, Irina Lucaciu, Anca Dinischiotu, Stoica Cătălina, Păun Iuliana	Aquatic safety assessment for cationic and amphoteric surfactants, SIMI 16 – 18.11.2011 (Simpozion Internațional “Mediul și Industria” organizat de INCD ECOIND București), vol. II, pp. 232-246, PREZENTARE ORAL, ISSN 1843-5831;
7.	Gheorghe tefania, Irina Lucaciu, Elena Stănescu, Cătălina Stoic	Romanian aquatic toxicity testing strategy under REACH, Internațional BENA Conference, Sustainable Landscape Planning And Safe Environment, 21-23.06.2012, Istanbul, Turcia, pp. 667-624, PREZENTARE ORAL, ISBN 978-975-561-421-2; 3 rd SETAC CEE Annual Meeting, 17-19 September 2012, Cracovia, Polonia – POSTER, pp.138, ISBN 978-83-935990-0-4.
8.	Gheorghe tefania, Stan Miruna, Damache Georgiana, Stoica Cătălina, Stănescu Elena, Irina Lucaciu, Anca Dinischiotu	Effects of cocamidopropyl betaine on oxidative stress biomarkers of the <i>Cyprinus carpio</i> sp., 3 rd SETAC CEE Annual Meeting, 17-19 September 2012, Cracovia, Polonia, PREZENTARE ORAL, publicat în Proceedings “Ecotoxicology revisited”, pp.33-35, ISBN 978-83-935990-0-4.

BIBLIOGRAFIE SELECTIV

1. **Abel P. D.**, Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *Journal of Fish Biology*, 6: 279–298 (1974);
2. **Aebi H.**, Catalase in vitro. In: Packer L (eds) *Methods in enzymology*, vol.105. Academic, New York, pp.673-684, 1984;
3. **AISE/CESIO**, Environmental Risk Assessment of Detergent Chemicals, Proceedings of the AISE/CESIO Limelette III Workshop, 28–29 November 1995, Brussels (1996);
4. **Berger H.**, Environmentally compatible surfactants for the cosmetic industry, presented at the SCS Symposium Bristol 7–8 April 1997 *International Journal of Cosmetic Science* 19, 227–237 (1997);
5. **Beutler E.**, Glutathione peroxidase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune & Syratton, New York, pp.74-76, 1984;
6. **CESIO**, Environmental Risk Assessment of Detergent Chemicals, Proceedings of the AISE/CESIO Limelette III Workshop, 28–29 November 1995, Brussels (1996);
7. **Comber S.D.W., Painter H. and Reynolds P.**, Cationic & Amphoteric Surfactant Primary Biodegradability Ring Test, European Union, ETD/98/502063, WRc Ref: CO 4909, (2000);
8. **Detergent Products Environmental Project**, Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic, 615, 2001;
9. **Domsch Andreas and Klaus Jenni.**, Biodegradability of amphoteric surfactants, in D.R. Karsa and M.R. Porter (eds.), *Biodegradability of surfactants*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, United Kingdom, 231-254 (1995);
10. **Draper HH, Hadley M**, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. In: Packer L, Glazer AN (eds) *Methods in enzymology*, vol.186. Academic, San Diego, pp. 421 -431, 1990;
11. **ECETOC**, Technical Report No. 89, (Q)SARs: Evaluation of the commercially available software for human health and environmental endpoints with respect to chemical management applications. ISSN-0773-8072-89 Brussels (2003);
12. **Ecological Risk Assessment Guidance for Superfund**: Process for Designing and Conducting Ecological Risk Assessment” EPA 540-R-97-006, JUNE 1997;
13. **EPA (US Environmental Protection Agency)**, Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC), Preliminary risk assessment, Office of Pesticide Programs, April 2006;
14. **GHS (Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals)**, revizia 4, www.unece.org, United Nations, New York and Geneva, 2011;
15. **Goldberg DM, Spooner RJ**, Glutathione reductase. In: Bergmayer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edn. Verlag Chemie, Dearfield Beach, pp.258-265, 1983.
16. **H.G. nr. 658/27.06.2007** privind stabilirea unor masuri pentru asigurarea aplicarii Regulamentului (CE) nr.648/2004 al Parlamentului European si Consiliului Uniunii Europene privind detergentii;
17. **Habig WH, Pabst MJ, Jakoby W**, Glutathione S transpherase, The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem* 249: 7130-7139, 1974;
18. **HERA**, Esterquats Environmental Risk Assesement Report Editia 1 (2008);
19. **Irina Lucaciu, Iuliana Ciurcanu, Elena Voinea**, INCD ECOIND Bucharest, Romania, „Techniques and methods of controlling and evaluating the characteristics of biodegradation of anionic and non-ionic surfactants”, poster, 1st International Conference on Environmental Research and Assessment – ICERA 2003, Bucharest, March 23 – 27, 2003;
20. **IUCLID Dataset** pentru CAS 6178-40-0 (Cocoamido propel betaine) (2000);
21. **IUCLID Dataset** pentru CAS 911995-81-2 (Fatty acids, C10-20 and C16-18 –unsatd., reaction products with triethanolamine, di-Me sulfate-quaternized) (2000);
22. **Iuliana Ciurcanu, Irina Lucaciu, Elena Mihaila**, INCD ECOIND Bucharest, Romania, „Experimental research to elaborate and verify a spectrophotometer method for the determination of cationic surfactants concentration in aqueous solution”, “Environment and Industry” Symposium, organized by INCD-ECOIND Bucharest, October 29 – 31, 2003, symposium volume -pag.102;
23. **Jocelyn P. C.**, Spectrophotometric assay of thiols *Methods Enzymol.*143, 44-67 (1987);

24. **Kazuaki Miura, Naohiro Nishiyama and Akiko Yamamoto**, Aquatic environmental monitoring of detergent surfactants, *Jurnal of Oleo Science* 57, (3) 161-170 (2008);
25. **Kees van Leeuwen, Carla Roghair, Ton de Nijs and Jodi de Greef**, Ecotoxicological risk evaluation of the cationic fabric softener DTDMAC. III. Risk assessment, *Chemosphere*, vol. 24, issue 5, 629-639 (1992);
26. **Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzimology*, 186:464-478 (1990);
27. **Lohr, G. W., and H. D. Waller.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase, p. 636-643. In H.-U. Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, vol. 2. Academic Press, Ltd., London, 1974.
28. **Longman G.F.**, *The analysis of Detergents and Detergents Products*, Wiley, N.Y. (1975);
29. **Luminita Bratucu, Iuliana Ciurcanu, Irina Lucaciu, Elena Mihaila**, "Laboratory assimilation and implementation of analytical methods used for cationic and amphoteric surfactants concentrations assessment from aqueous solutions", *The XXIX National Conference of Chemistry, Oltchim*, Oct. 04-06, 2006, Calimanesti-Caciulata, Valcea;
30. **Masayuki Yamane, Takamasa Toyo, et al**, Aquatic toxicity and biodegradability of advanced cationic surfactant APA – 22 compatible with the aquatic environment, *Jurnal of Oleo Science* 57, (10) 529-538 (2008);
31. **NICNAS** (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme), Full public report, Stepantex Esterquat, 28 ianuarie 2003;
32. **OECD** – Guidance Document for Aquatic Effects Assessment;
33. **OECD Guidelines for the thesting of chemicals**, 2006;
34. **Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A.**, A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analyt Biochem*, **154**: 538–541, 1986;
35. **Persoon Guido, Marsalek Blahoslav, Blinova Irina, Törökne Andrea, Zarina Dzidra, Manusadzianas LevonasNalecz-Jawecki Grzegorz, Tofan Lucica, Stepanova Nadejda, Tothova Livia, Kolar Boris**, A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters, *Environmental Toxicology*, Volume 18, issue 6, pp. 395 - 402(2003);
36. **Radru Avram, Ioan Calinescu**, "Surfactants. Syntheses", *Industrial Chemical Faculty, Bucharest* – 2004;
37. **Regulamentul (CE) NR. 1907/2006** al Parlamentului European și al Consiliului din 18 decembrie 2006 privind înregistrarea, evaluarea, autorizarea și restricționarea substanțelor chimice (REACH);
38. **Regulamentul Comisiei Europene (CE) nr. 907/2006** – primul Amendament al Regulamentului nr. 648/2004;
39. **Regulation (EC) no. 2004/648** of European Parliament and European Council, *Official Journal of European Union*, L104/1, April 2004;
40. **Roméo M., Bennani N., Gnassia-Barelli M., Lafaurie M. and Girard J. P.**, Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*. 48, 185-194(2000);
41. **Technical Guidance Document on Risk Assessment**, European Chemicals Institute for Health and Consumer Protection Bureau, Part II, 2003;
42. **Tehnicul Guidance Document on Risk Assessemnt**, TDG Part IV, Comisia Europeana ER20418EN, 2003;
43. **Tomislav Ivankovic and Jasna Hrenovic**, Surfactants in the Environment, *Arh. Hig. Rada Toksicol*: 61: 95-110 (2010);
44. **Ute Merrettig-Bruns and Erich Jelen**, Anaerobic Biodegradation of Detergent Surfactants, *Materials*, 2, 181-206 (2009);
45. **Ying Guang-Guo**, Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment, *Environ. Int.*32(3):417-31(2006);