



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE  
AGRICOLE ȘI MEDICINĂ  
VETERINARĂ  
CLUJ – NAPOCA  
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**FACULTATEA DE MEDICINĂ  
VETERINARĂ**



**Ing. chim. MIRELA-ILEANA MICLEAN**

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

### **Rezumat**

**METODE DE DETERMINARE, LA NIVEL DE NANOSCALĂ, A UNOR  
DISRUPTORI ENDOCRINI ÎN FACTORI DE MEDIU ȘI FLUIDE  
ANIMALE**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,**

**Prof. univ. dr. IOAN ȘTEFAN GROZA**

**Cluj-Napoca  
2014**

## **INTRODUCERE**

Numeroase studii au indicat prezența și gradul extins al contaminării mediului cu compuși organici și anorganici. O mare varietate de contaminanți din mediu perturbă sistemul endocrin al multor specii, inclusiv cel uman, fiind denumiți disruptori endocrini. Între aceștia, pesticidele organoclorurate (POC) și bifenilii policlorurați (PCB), grupați generic sub denumirea de compuși organoclorurați (COC), precum și metalele grele (MG), sunt cei mai răspândiți și mai persistenți, fiind lipofili și lent biodegradabili. Fiind ubicuitari în mediu, acești compuși sunt implicit prezenți și în hrana animalelor. Transferul acestor compuși toxici din hrana animalelor în produsele comestibile ale acestor animale (carne, organe, lapte, ouă) determină expunerea consumatorului uman la acești contaminanți, prin ingerarea acestor produse.

Pentru determinarea compușilor chimici disruptori endocrini în probe de mediu și alimente, sunt necesare metode analitice extrem de sensibile, deoarece acești compuși sunt prezenți în probe în concentrații reduse și datorită nivelurilor de detecție foarte scăzute impuse de legislație, metodele analitice utilizabile implică prepararea eficientă a probei, precum și detecția, identificarea și cuantificarea la nivel de urme și ultra-urme, analiza finală realizându-se invariabil cu ajutorul unei tehnici puternice de separare, în special cromatografia, cuplată cu un detector potrivit, iar pentru determinarea contaminanților anorganici (metale) se recomandă utilizarea spectrometriei de absorbție sau emisie atomică.

Deși metodele de detecție au devenit foarte specifice și sensibile, prepararea probei este încă o etapă dificilă și consumatoare de timp. În analiza compușilor prezenți în urme, prepararea probei este în mod particular importantă, iar metodele existente nu sunt destul de selective pentru îndeplinirea cerințelor pentru siguranța alimentului. Dezvoltarea unor metode de preparare a probei, mult mai selective și sensibile, care pot fi aplicate unor matrice complexe, cum sunt alimentele, vor permite atât analiza concentrațiilor extrem de scăzute impuse de legislația pentru reziduurile și contaminanții probelor alimentare, cât și obținerea de date pentru evaluarea riscului alimentar.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

**Capitolul 4 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII** prezintă organizarea cercetării desfășurate în vederea atingerii tuturor obiectivelor asumate, face o scurtă descriere a zonei de studiu precum și modul de prelevare a probelor (sol, apă, vegetație și lapte).

**Scopul prezentei teze**, cu un puternic caracter interdisciplinar, constă în determinarea la nivel de nanoscală a unor disruptori endocrini în factori de mediu (apă, sol, vegetație-iarbă utilizată ca furaj) și fluide animale (lapte) în vederea evaluării riscului asupra organismului uman rezultat prin consum de lapte și asupra organismului animal în urma ingerării de sol, apă și vegetație – iarbă (furaj).

**Obiectivele tezei de doctorat:** ► alegerea unei zone reprezentative – zona de studiu este Baia Mare; ► alegerea unor compuși disruptori endocrini cu potențial de bioacumulare și toxicitate ridicată: pesticide organoclorurate (POC), bifenili policlorurați (PCB) și metale grele (MG); ► elaborarea, dezvoltarea, validarea și implementarea unor metode analitice avansate, rapide, sensibile și ecologice de determinare a disruptorilor endocrini organici în probe de mediu (sol, vegetație, apă) și aliment (lapte): microextracția în fază solidă (SPME), extracția în fază solidă (SPE), extracția ultrasonică (USE), dispersia matricei pe fază solidă (MSPD), anterior determinării multireziduale prin gaz cromatografie; ► elaborarea, dezvoltarea, validarea și implementarea unor metode analitice avansate, rapide, sensibile și ecologice de determinare a disruptorilor endocrini metalici în probe de mediu (sol, vegetație, apă) și aliment (lapte): ablația laser (LA) în tandem cu spectrometrul de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS), digestia cu microunde (MW) anterior determinării analitice cantitative cu spectrometrul de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-AES) sau ICP-MS; ► evaluarea contaminării cu disruptori endocrini a solului, vegetației, apei și a laptelui din zona rurală adiacentă municipiului Baia Mare; ► determinarea caracteristicilor de transfer al disruptorilor endocrini din sol în vegetale și, respectiv, din vegetale în lapte; ► evaluarea riscului asupra sănătății animalelor, datorită ingerării de vegetație, apă și sol; ► evaluarea riscului asupra sănătății populației expuse, datorită ingerării de lapte, prin compararea cu valorile tolerabile zilnice (TDI) sau săptămânale (PTWI); ► evaluarea riscului multiplu asupra

stării de sănătate umană, rezultat în urma expunerii la disruptori endocrini, prin metoda coeficienților de hazard țintă (THQ).

Probele de apă, sol, vegetație și lapte au fost recoltate de la crescători particulari de vaci, care livrează lapte cu regularitate în Piața Agroalimentară ”Izvoare” din municipiul Baia Mare, jud. Maramureș. Locațiile de prelevare a probelor de sol, vegetație, apă și lapte și rasa vacilor de la care a fost relevat laptele: **1.** Satu Nou de Sus, Str. Principală nr. 85 (Bălțata Românească), **2.** Chiuzbaia nr. 146 (Bălțata Românească), **3.** Dumbrăvița, Str. Principală nr. 286 (Bălțata Românească), **4.** Bozânta Mare nr. 109 (Bălțata Românească), **5.** Recea nr. 45 (Holstein), **6.** Lăpușel nr. 33 (Holstein), **7.** Săcălășeni nr. 108 (Bălțata Românească), **8.** Culcea (Holstein), **9.** Baia Mare, Str. Miron Costin nr. 21 (Bălțata Românească), **10.** Firiza, Str. Vălinilor nr. 16 (Bălțata Românească).

**Capitolul 5 DEZVOLTAREA UNOR METODE AVANSATE DE DETERMINARE LA NIVEL DE NANOSCALĂ A UNOR DISRUPTORI ENDOCRINI ÎN FACTORI DE MEDIU ȘI FLUIDE ANIMALE** a fost dedicat dezvoltării și validării unor metode originale, rapide, sensibile și ecologice, precum și aplicarea lor pentru determinarea unor contaminanți chimici disruptori endocrini în diferiți factori de mediu (apă, sol, vegetație, lapte).

În cadrul activității de cercetare derulate prin prezenta teză de doctorat **au fost dezvoltate următoarele metode originale:** 1.►Metodă de determinare a metalelor disruptori endocrini în sol prin LA-ICP-MS; 2.►Metodă de determinare a metalelor disruptori endocrini în apă prin UV-ICP-MS; 3.►Metodă de determinare a metalelor disruptori endocrini în vegetație prin MW-ICP-MS; 5.►Metodă de determinare a metalelor disruptori endocrini în lapte prin MW-ICP-MS; 6.►Metodă de determinare simultană a bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate în apă prin SPE-GC-ECD; 7.►Metodă de determinare simultană a bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate în lapte prin HS-SPME-GC-ECD; 8.►Metodă de determinare simultană a bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate în sol prin US-GC-ECD; 9.►Metodă de determinare simultană a bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate în vegetație prin MSPD-GC-ECD.

Pentru a confirma dacă o metodă este potrivită pentru scopul propus, s-a efectuat un proces de validare prin determinarea parametrilor de performanță analitică, necesari pentru determinarea cantitativă a disruptorilor endocrini în diferite matrice investigate: precizia, domeniul dinamic linear, limita de detecție, gradul de recuperare. Acești parametri au fost evaluați pentru fiecare metodă analitică dezvoltată.

### **Metode de determinare a conținutului de metale grele în sol, apă, vegetație, lapte**

*Metodă de determinare a conținutului de metale grele în sol prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv cu ablație laser (LA-ICP-MS)*, permite analiza rapidă a metalelor disruptori endocrini (Cd, Cu, Pb, Zn) în probe de sol prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv cu ablație laser (LA-ICP-MS). Metoda este mai rapidă decât metodele tradiționale deoarece elimină etapa de digestie a probelor. Parametrii de performanță se încadrează în țintele stabilite, metoda fiind adecvată scopului propus și a fost aplicată pe probe reale. Tehnica poate fi aplicată pentru monitorizarea rapidă a probelor de sol, pentru determinarea concentrațiilor majore, minore și în urme, inclusiv analiți cum sunt Pb, Cu, Cd, Zn care au o importanță sanitară deosebită, fiind clasificați disruptori endocrini.

*Metodă de determinare a conținutului de metale grele în apă prin digestie cu radiație UV și determinare prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv (UV-ICP-MS)* permite determinarea metalelor disruptori endocrini (Cd, Cu, Pb, Zn) în probe de apă prin spectrometrie de masă, după digestia cu radiație UV (fotoliză). Valorile obținute pentru parametrii de performanță sunt satisfăcătoare, recomandând metoda ca fiind adecvată scopului propus și putând fi aplicată pe probe reale de apă.

*Metodă de determinare a metalelor disruptori endocrini în vegetație prin digestie cu microunde și determinare prin spectrometrie de emisie atomică cu plasmă cuplată inductiv (MW-ICP-AES)* combină avantajele digestiei acide cu microunde (rapidă, utilizează volume reduse de probă și acizi, eficientă) cu avantajele înaltei temperaturi ale sursei de plasmă ale spectrometrului ICP-AES. Valorile obținute pentru gradele de recuperare și deviațiile standard relative sunt satisfăcătoare, iar metoda a fost aplicată pe probe de vegetație.

*Metodă de determinare a metalelor disruptori endocrini în lapte prin digestie cu microunde și determinare prin spectrometrie de masă cu plasma cuplată inductiv (MW-ICP-AES)* prevede determinarea unor metale (Cd, Cu, Pb, Zn) din lapte prin spectrometria de emisie atomică în plasmă și combină avantajele digestiei cu microunde cu avantajele analizei multielementale ale spectrometrului ICP-AES (MICLEAN MIRELA et al., 2011a; MICLEAN MIRELA et al., 2012a).

### **Metode de determinare a conținutului de compuși organoclorurați în sol, vegetație, apă, lapte**

*Metodă de determinare simultană a bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate în apă prin extracție în fază solidă și gaz cromatografie cuplată cu detector cu captură de electroni (SPE-GC-ECD)*, metodă originală de extracție pe fază solidă (SPE) combinată cu gaz cromatografie cuplată cu detector cu captură de electroni (GC-ECD) pentru determinarea simultană a 19 pesticide organoclorurate (POC) și a 7 bifenili policlorurați (PCB) în probe de apă. Pentru efectuarea extracției s-au utilizat cartușe de extracție SPE Oasis, HLB 200 mg, Waters (Milford, MA, USA). Procedura a fost aplicată pe probe de apă potabilă. Parametrii de performanță se încadrează în țintele stabilite, metoda fiind adecvată scopului propus și a fost aplicată pe probe reale de lapte (MICLEAN MIRELA et al., 2010a).

*Metodă de determinare simultană a bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate în lapte prin microextracție în fază solidă în headspace și gaz cromatografie cuplată cu detector cu captură de electroni (HS-SPME-GC-ECD)* metodă originală de microextracție combinată cu gaz cromatografie cuplată cu detector cu captură de electroni pentru determinarea simultană a 19 pesticide organoclorurate (OCP) și a 7 bifenili policlorurați (PCB) în probe de apă. Procedura a fost aplicată pe probe de lapte. Metoda extracției SPME, cuplata cu gaz cromatografia cu diferiți detectori a fost aplicată, de asemenea, pentru determinarea ftalaților în probe de lapte, a trihalometanilor și hidrocarburilor aromatice policiclice în apă, a pesticidului clorpirifos în sedimente, obținându-se parametrii de performanță satisfăcători (MICLEAN MIRELA et al., 2010b; MICLEAN MIRELA et al., 2011b; MICLEAN MIRELA et al., 2012b; MICLEAN MIRELA et al., 2013a).

*Metodă de determinare simultană a bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate în sol prin extracție ultrasonică și gaz cromatografie cuplată cu detector cu captură de electroni (USE-GC-ECD), metodă originală. Parametrii de performanță s-au încadrat în țintele stabilite, metoda fiind adecvată scopului propus și a fost aplicată pe probe reale.*

*Metodă de determinare simultană a bifenililor policlorurați și a pesticidelor organoclorurate în vegetație prin dispersia pe fază solidă și gaz cromatografie cuplată cu detector cu captură de electroni (MSPD-GC-ECD) se bazează pe extracția prin dispersie pe fază solidă (MSPD) a POC și PCB din matricea vegetală, urmată de gaz cromatografie cu detecția cu captură de electroni <sup>63</sup>Ni (GC-ECD). Parametrii de performanță s-au încadrat în țintele stabilite, metoda fiind adecvată scopului propus și a fost aplicată pe probe reale de vegetație/iarbă.*

**Capitolul 6 REZULTATELE CERCETĂRILOR PRIVIND APLICAREA METODELOR REALIZATE PENTRU DETERMINAREA LA NIVEL DE NANOSCALĂ A UNOR DISRUPTORI ENDOCRINI ÎN FACTORI DE MEDIU ȘI FLUIDE ANIMALE** prezintă rezultatele obținute în urma aplicării metodelor realizate pe probe reale (sol, apă, vegetație, lapte) prelevate din zona Baia Mare.

#### **Conținuturile unor disruptori endocrini în sol**

*Metale grele în sol.* Analizând rezultatele obținute se remarcă următoarele: valorile Pb au variat între 12,4...479,4 mg/kg, cu o valoare medie de 204,9 mg/kg. Concentrațiile Cd au variat între 0,75...8,36 mg/kg, media fiind de 4,34 mg/kg. În cazul Cu, domeniul de variație al concentrațiilor a fost de 38,3-211,3 mg/kg, cu o medie de 95,5 mg/kg. Concentrațiile Zn s-au situat în intervalul 116,9...590,2 mg/kg, cu o valoare medie de 283,3 mg/kg..

*Pesticide organoclorurate (POC) în sol.* Pesticide organoclorurate au fost detectate în toate probele de sol analizate, compușii predominanți fiind hexaclorociclohexanii (HCH) și dicloro-difenil-tricloro-etanii (DDT). În calculele statistice, pentru concentrațiile mai scăzute decât limita de determinare - LQ (<0,05) s-a considerat o valoare egală cu ½ din limita de determinare și anume: 0,025 μg/kg (LE FAOUDER et

al., 2007). Concentrațiile obținute pentru pesticidele organoclorurate, atât cele individuale cât și suma lor, s-au situat, în general, în jurul valorilor normale specificate de legislația națională, fiind mult mai scăzute decât pragurile de alertă pentru soluri sensibile (ORDIN 756/1997). Pentru pesticidele din clasa HCH, frecvența de determinare a acestora în probele analizate a fost de 100% pentru  $\alpha$ -HCH și  $\delta$ -HCH și de 90% pentru ceilalți trei izomeri. Compuși cloro-difenil-alifatici au fost determinați în toate probele analizate, în concentrații mai ridicate decât celelalte POC.

***Bifenili policlorurați (PCB) în sol.*** Compuși PCB au fost detectați în toate probele de sol analizate. Valorile individuale ale PCB sunt mai scăzute decât nivelurile de alertă pentru soluri sensibile prevăzute de legislația națională (ORDIN 756/1997), cu excepția a 4 concentrații ale PCB28 în probele **3** (9,03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), **5** (4,06  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), **6** (4,69  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) și **9** (2,14  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Valorile obținute pentru  $\Sigma\text{PCB7}$  se situează în domeniul de concentrații raportate de Schmid și colaboratorii pentru soluri din Europa Centrală (SCHMID et al., 2005).

### **Conținuturile unor disruptori endocrini în apă**

***Metale grele în apă.*** Concentrațiile obținute pentru metale, în probele de apă sunt mai mici decât concentrațiile maxime admise corespunzătoare (CMA), conform legislației naționale în vigoare (LEGEA 311/2004), cu excepția concentrației de Pb în proba nr. **10**, care este mai ridicată decât CMA (10  $\mu\text{g}/\text{l}$ ).

***Pesticide organoclorurate (POC) în apă.*** În fiecare probă de apă analizată au fost detectate pesticide organoclorurate. Concentrațiile obținute pentru pesticidele organoclorurate individuale sunt mult mai scăzute decât valorile CMA corespunzătoare, specificate de legislația națională (LEGEA 311/2004), cu aproximativ cu 2 ordine de mărime. Concentrațiile obținute pentru POC totale sunt mai scăzute decât valorile CMA cu aproximativ 1 ordin de mărime. În calculele statistice, pentru concentrațiile mai mici decât limitele de determinare s-au considerat valori egale cu  $\frac{1}{2}$  din limita de determinare corespunzătoare.

***Bifenili policlorurați (PCB) în apă.*** Compuși PCB au fost detectați în cinci probe de apă din cele zece analizate. Legislația națională (LEGEA 311/2004) și cea europeană



(DIRECTIVA CADRU A APEI, 2000) nu prevăd valori maxime admise pentru concentrațiile PCB în apa potabilă.

### **Determinarea conținuturilor unor disruptori endocrini în iarbă/furaj**

**Metale grele în furaj/iarbă.** Concentrațiile Pb în probele de iarbă/furaj au variat între 0,15 mg/kg (proba 1) și 2,24 mg/kg (proba 10), cu o valoare medie de 0,80 mg/kg, sub valoarea CMA (30 mg/kg), specificată în legislația națională (ORDIN 18/22.02.2007). Concentrațiile Cd au variat între 0,10 mg/kg (proba 6) și 1,44 mg/kg (proba 10), media fiind de 0,41 mg/kg și deviația standard de 0,42 mg/kg, valori mai scăzute decât CMA (1,0 mg/kg) prevăzută de legislația națională (ORDIN 18 / 22.02.2007), cu excepția Cd din proba 10, care a depășit CMA. În cazul Cu, domeniul de variație al concentrațiilor a fost de 3,43-10,8 mg/kg, cu medie de 6,37 mg/kg și deviație standard de 2,20 mg/kg. Concentrațiile Zn s-au situat în intervalul 13,4-53,9 mg/kg, cu o valoare medie de 28,4 mg/kg. Pentru Cu și Zn nu sunt prevăzute valori ale CMA în legislație.

**Pesticide organoclorurate (POC) în furaj/iarbă.** În toate probele de iarbă/furaj analizate au fost determinate pesticide organoclorurate, speciile predominante fiind dicloro-difenil-tricloro-etanii (DDT). Analizând rezultatele obținute se remarcă faptul că valorile înregistrate pentru conținuturile de pesticide organoclorurate, atât cele individuale, cât și suma lor au fost mai scăzute decât valorile CMA prevăzute de legislația națională (ORDIN 18/22.02.2007). Compușii HCH au fost detectați în toate probele analizate, cu excepția probei 2. Concentrațiile medii au variat în ordinea:  $\epsilon$ -HCH >  $\alpha$ -HCH >  $\beta$ -HCH >  $\delta$ -HCH >  $\gamma$ -HCH. Concentrațiile totale ale HCH ( $\Sigma$  izomerilor  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -HCH) au variat între 0,13  $\mu$ g/kg (proba 2) și 24,5  $\mu$ g/kg (proba 3), cu o valoare medie de 4,67  $\mu$ g/kg și deviația standard 7,47  $\mu$ g/kg. Concentrațiile determinate ale POC sunt relativ scăzute, ceea ce indică absența aplicării recente a acestor pesticide, dar și ubicuitatea lor în zona investigată.

**Bifenili policlorurați (PCB) în furaj/iarbă.** Compuși PCB au fost detectați în toate probele de iarbă/furaj analizate. Concentrațiile medii ale congenerilor PCB au variat în ordinea: PCB28 > PCB180 > PCB52 > PCB138 > PCB153 > PCB101 ~ PCB194. Congenerii PCB 101 și PCB194 nu au fost detectați în nici una din probele analizate. Contribuția cea

mai ridicată la conținutul total de PCB o au congenerii PCB28, urmat de PCB180. Concentrațiile totale ale PCB (exprimate ca suma celor 7 congeneri - PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180 și 194) au variat între 0,93 și 18,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cu valori ale mediei și deviației standard de 7,36  $\mu\text{g}/\text{kg}$  și respectiv 5,96  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

### **Determinarea conținuturilor unor disruptori endocrini în fluide animale (lapte)**

**Metale grele în lapte.** Metalele grele au fost detectate în toate probele analizate, în domeniul de variație foarte largi. Concentrațiile Pb au variat între 6,02  $\mu\text{g}/\text{l}$  și 48,2  $\mu\text{g}/\text{l}$ , cu o valoare medie de 22,7  $\mu\text{g}/\text{l}$  (deviația standard 14,9  $\mu\text{g}/\text{l}$ ), depășind CMA în cinci din cele zece probe. Concentrațiile Cd au variat între 2,79  $\mu\text{g}/\text{l}$  (proba 7) și 11,4  $\mu\text{g}/\text{l}$  (proba 4), media fiind de 6,75  $\mu\text{g}/\text{l}$  și deviația standard de 3,30  $\mu\text{g}/\text{l}$ . În cazul Cu, domeniul de variație al concentrațiilor a fost de 94,7 (proba 6)-446 (proba 10)  $\mu\text{g}/\text{l}$ , cu medie de 265  $\mu\text{g}/\text{l}$  și deviație standard de 96,3  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Concentrațiile Zn s-au situat în intervalul 2389-4384  $\mu\text{g}/\text{l}$ , cu o valoare medie de 3178  $\mu\text{g}/\text{l}$  și deviație standard de 544  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Rezultatele arată că Cd a depășit CMA în probele 4 (11,4  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) și 8 (10,6  $\mu\text{g}/\text{l}$ ), iar Cu și Zn nu au înregistrat depășiri în probele analizate.

**Pesticide organoclorurate (POC) în lapte.** Pesticide organoclorurate au fost detectate în toate probele de lapte investigate. Metaboliții 4,4'-DDE și 4,4'-DDT au fost determinați în toate probele analizate. 4,4'-DDE (11,5 ng/g grăsime),  $\beta$ -HCH (10,1 ng/g grăsime) au fost compușii predominanți, cu concentrațiile medii cele mai ridicate. Concentrațiile obținute pentru pesticidele organoclorurate, atât cele individuale, cât și suma lor, s-au situat sub concentrațiile maxime admise, specificate de legislația națională (ORDIN 23 / 26.02.2007).

**Bifenili policlorurați (PCB) în lapte.** Compuși PCB au fost detectați în toate probele de lapte analizate. Contribuția cea mai ridicată la conținutul total de PCB o are congenerul PCB180, analog cu probele de sol și apă. Concentrațiile totale ale PCB (exprimate ca suma a 7 congeneri și anume: PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180 și 194) au variat între <0,60 ng/g grăsime (proba 7) și 15,3 ng/g grăsime (proba 4), cu valori ale mediei și deviației standard de 9,12 ng/g grăsime și respectiv 4,99 ng/g grăsime. În nici o probă de lapte analizată, concentrația maximă admisă nu a fost depășită.

**Capitolul 7 DETERMINAREA COEFICIENȚILOR DE TRANSFER ȘI A FACTORILOR DE BIOTRANSFER PENTRU METALE ȘI COMPUȘI ORGANOCLORURAȚI** prezintă rezultatele obținute privind calculul coeficienților de transfer și a factorilor de biotransfer pentru metale și compuși organoclorurați conform metodei prezentate în Capitolul 3.1.

### **Determinarea coeficienților de transfer**

*Determinarea factorilor de transfer pentru metale, din sol în iarbă.* Factorii de transfer ai metalelor din sol în iarbă au variat între 0,0024 (Pb) și 0,2079 (Zn) – cu 2 ordine de mărime, având o valoare medie de 0,0707 și deviație standard de 0,0537. Valorile medii ale FT au variat în ordinea:  $FT(Cd) > FT(Zn) > FT(Cu) > FT(Pb)$ . Transferul Cd și Pb din sol în vegetație este cel mai îngrijorător, aceste metale fiind și cele mai toxice dintre cele investigate. Valorile obținute pentru FT sunt comparabile cu cele raportate de Miclean și colaboratorii pentru probele de sol și vegetație recoltate din zona Baia Mare (MICLEAN MIRELA et al., 2010d; MICLEAN MIRELA et al., 2013b).

*Determinarea factorilor de transfer pentru compușii organoclorurați, din sol în iarbă.* Valorile obținute pentru FT au variat în limite largi, între 0,0019 și 11,200 (media 0,8090, deviația standard 1,0942) – 5 ordine de mărime. Valorile foarte variabile și mai mari obținute pentru FT ai compușilor organoclorurați față de FT ai metalelor se datorează caracterului chimic instabil al acestor compuși organici în mediu, aceștia se pot metaboliza, precum și fugacității lor, aceștia se pot volatiliza (WONG et al., 2010). Astfel, în cazul compușilor organoclorurați, procesele care determină concentrația lor în plante sunt ►absorbția din sol, ►absorbția din aer prin depunerile atmosferice și ►volatilizarea lor.

*Determinarea factorilor de transfer pentru metale, din iarbă în lapte.* Valorile medii ale FT au variat în ordinea:  $FT(Zn) > FT(Cu) > FT(Pb) > FT(Cd)$ . Valorile obținute pentru factorii de transfer ai Pb, Cu și Zn sunt asemănătoare cu cele prezentate în literatura de specialitate, iar  $FT(Cd)$  obținut în prezentul studiu este mai scăzut (cu un ordin de mărime) decât cel din literatură. Diferențele obținute se pot datora diferențelor în structura edafică a solului, a speciilor de vegetație investigate, precum și a nivelurilor

foarte diferite de concentrație din sol/vegetație. În prezentul studiu, zona investigată este poluată antropogenic cu Pb, Cd, Cu și Zn

***Determinarea factorilor de transfer pentru compușii organoclorurați, din iarbă în lapte*** Valorile foarte variabile ale acestor FT se pot explica prin comportamentul diferit al compușilor organoclorurați datorită structurilor chimice foarte diverse ale acestora, ceea ce implică diferențe majore în ceea ce privește metabolizarea și biotransformarea lor în organismul animal, stocarea în diferite organe, precum și excreția lor. Valorile obținute sunt comparabile cu cele reportate de Miclean și colaboratorii pentru probe similare recoltate din localitățile Satu Nou de Sus și Ocolis, jud. Maramureș (MICLEAN MIRELA et al., 2012c).

### **Determinarea factorilor de biotransfer pentru metale și compuși organoclorurați**

***Factorii de biotransfer (FBT) ai metalelor din dieta animalului (iarbă) în lapte.*** Factorii de biotransfer ai metalelor din dieta animalelor (iarbă) în lapte au variat între 0,0003 (Cd)...0,0124 (Zn) cu o valoare medie de 0,0030 și deviația standard de 0,0027. Valorile cele mai ridicate s-au înregistrat pentru Zn.

***Factorii de biotransfer (FBT) ai compușilor organoclorurați din dieta animalului (iarbă) în lapte.*** Similar cu FT, valorile obținute pentru FBT au variat în limite largi, 0,00001...2,1016 (media 0,0682, deviația standard 0,1955), aceste valori prezentând o mare variabilitate, explicată prin structurile foarte diverse ale acestor compuși care determină comportamente diferite în mediu și organismul animal. De asemenea, valorile supraunitare ale unor FBT se pot datora acumulării și biomagnificării acestor compuși organoclorurați în organismul animal, proveniți din dieta animalului.

**Capitolul 8 EVALUAREA RISCULUI ASUPRA SĂNĂTĂȚII ORGANISMULUI ANIMAL PRIN INGESTIE DE SOL, APĂ ȘI FURAJE** a fost dedicat determinării indicilor de aport zilnic alimentar pentru metale grele și compuși organoclorurați, conform metodei prezentate în Cap. 3.2.1.

***Metale grele.*** Valorile aportului zilnic estimat ( $EDI_{\text{animal}}$ ) pentru metale, reprezentând aportul zilnic din ingerarea de iarbă, sol și apă au variat în limite largi, între 3,01 mg/zi (Cd)...1351 mg/zi (Zn), cu o valoare medie de 246 mg/zi și deviația standard

de 323 mg/zi. Valorile medii ale  $EDI_{\text{animal}}$  au variat în ordinea:  $EDI_{\text{animal}}(\text{Zn}) > EDI_{\text{animal}}(\text{Cu}) > EDI_{\text{animal}}(\text{Pb}) > EDI_{\text{animal}}(\text{Cd})$ . Datorită concentrațiilor ridicate de Pb și Cd în sol, aportul zilnic de sol al acestor două metale prevalează aportul zilnic din furaj (iarbă), deși ingestia de sol este mult mai scăzută față de iarbă (0,41 kg sol/zi, față de 20 kg iarbă/zi). Aportul zilnic de metale din apă este mult mai scăzut față de aportul zilnic din iarbă și, respectiv din sol.

**Compuși organoclorurați.** Valorile aportului zilnic estimat ( $EDI_{\text{animal}}$ ) pentru compușii organoclorurați (COC), reprezentând aportul zilnic din ingerarea de iarbă, sol și apă au variat în limite largi, între 0,51  $\mu\text{g}/\text{zi}$  (Endosulfan  $\alpha$ )...7578  $\mu\text{g}/\text{zi}$  (suma PCB), cu o valoare medie de 265  $\mu\text{g}/\text{zi}$ . În general, aportul COC zilnic din iarbă > aportul zilnic din apă > aportul zilnic din sol, în concordanță cu cantitățile ingerate zilnic.

**Capitolul 9 EVALUAREA RISCULUI ASUPRA SĂNĂTĂȚII ORGANISMULUI UMAN PRIN INGESTIE DE LAPTE** a urmărit estimarea expunerii pe termen lung, prin determinarea aportului mediu de MG, POC și PCB prin ingerare și compararea acestuia cu valorile de referință tolerabile zilnice (TDI) și săptămânale (PTWI). De asemenea, s-a evaluat riscul asupra stării de sănătate a locuitorilor din zona investigată prin calcularea coeficienților de hazard țintă individuali (THQ) pentru fiecare analit studiat și a coeficienților totali de hazard țintă (TTHQ). THQ reprezintă raportul între expunere și o doză de referință. În vederea realizării acestui obiectiv, s-au parcurs următoarele etape: ► Stabilirea rației alimentare pentru zona studiată, prin completarea unor chestionare privind structura dietei pentru trei zile consecutive, în vederea evaluării expunerii la MG, POC și PCB; ► Analiza probelor alimentare de lapte în vederea determinării concentrației metalelor grele (Pb, Cd, Cu, Zn), pesticide organoclorurate (HCB,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -HCH, aldrin, dieldrin, heptaclor, heptaclor epoxid  $\alpha$  și  $\beta$ , endosulfan  $\alpha$  și  $\beta$ , DDT cu izomerii DDE și DDD) și PCB (congenerii PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180, 194); ► Caracterizarea riscului și evaluarea expunerii unor grupuri populaționale din zona Baia Mare la MG, POC și PCB prin ingestia de lapte: prin compararea cu valorile TDI și PTWI și prin calcularea coeficienților THQ și TTHQ.

## **Determinarea indicilor de aport zilnic alimentar pentru metale grele și compuși organoclorurați**

**Metale grele.** Aportul alimentar mediu zilnic și săptămânal de Pb, respectiv Cd prin consumul de lapte, la rezidenții investigați, expuși la poluarea cronică a fost mai mic decât valorile de referință TDI și respectiv PTWI, indicând că ingestia de lapte nu reprezintă un risc pentru starea de sănătate a locuitorilor din zonă. Considerând consumul de alimente că reprezintă aproximativ 90% din aportul de metale, față de celelalte căi de expunere, rezultă că aportul total de metale prin cele trei căi de expunere este mai mare (de 1,11 ori), indicând un risc și mai mare pentru starea de sănătate a locuitorilor din zona investigată, în special pentru Pb și Cd, fiind și cele mai toxice dintre elementele studiate.

**Compuși organoclorurați.** Valorile determinate pentru expunerea dietară zilnică estimată medie (EDI) pentru POC și PCB prin ingestia de lapte, pentru adulți (femei, bărbați) și copii, din zona de studiu Baia Mare sunt foarte mici în comparație cu valorile ADI stabilite de către Autoritatea Europeană pentru Siguranță Alimentară - European Food Safety Authority (EFSA). Pentru fiecare compus organoclorurat investigat, expunerea dietară medie estimată a variat în ordinea:  $EDI_{\text{copii}} > EDI_{\text{bărbați}} > EDI_{\text{femei}}$ , în concordanță cu consumul zilnic de lapte și cu masa corporală.

## **Determinarea coeficienților de hazard țintă (THQ) pentru metale grele și compuși organoclorurați**

**Metale grele.** Coeficienții medii de hazard țintă individuali, calculați pentru consumul de lapte, scad în ordinea  $THQ_{\text{Zn}} > THQ_{\text{Cd}} > THQ_{\text{Cu}} > THQ_{\text{Pb}}$  pentru fiecare grup populațional investigat și scad în ordinea  $THQ_{\text{copii}} > THQ_{\text{bărbați}} > THQ_{\text{femei}}$ , pentru fiecare element studiat. Valorile THQ sunt mai mici decât 1, indicând că locuitorii zonei investigate nu experimentează un potențial risc asupra sănătății prin ingestia de lapte.

**Compuși organoclorurați.** Coeficienții medii de hazard țintă individuali, calculați pentru consumul de lapte scad în ordinea  $THQ_{\text{copii}} > THQ_{\text{bărbați}} > THQ_{\text{femei}}$ , pentru fiecare din cele două pesticidele organoclorurate. Valorile THQ sunt mai mici decât 1, indicând că locuitorii zonei investigate nu experimentează un potențial risc asupra sănătății prin ingestia de lapte.

## **Evaluarea riscului multiplu asupra stării de sănătate a organismului uman prin ingestie la expunerea simultană la mai mulți contaminanți prin metoda TTHQ**

În acest studiu, riscul asupra sănătății prin expunere simultană la mai mulți contaminanți (metale grele și pesticide organoclorurate) s-a calculat prin determinarea coeficienților de hazard țintă totali (TTHQ), calculați prin însumarea coeficienților de hazard țintă individuali (al fiecărui metal: Pb, Cd, Cu, Zn și al fiecărui pesticid:  $\gamma$ -HCH și 4,4'-DDT), conform metodei descrise de Sipter și colaboratorii (2008). Evaluarea riscului asupra sănătății prin calcularea TTHQ se bazează pe faptul că expunerea simultană la doi sau mai mulți poluanți poate avea efecte aditive și/sau interactive (SIPTER et al., 2008) și evidențiază contribuția ridicată a metalelor grele la valoarea totală a TTHQ, precum și valoarea ridicată a TTHQ pentru copiii din zona studiată, care consumă lapte. Valorile coeficienților TTHQ fiind mai mici decât 1 sugerează că locuitorii investigați nu experimentează deja efecte adverse sănătății umane, datorită ingestiei de lapte. Metoda pentru determinarea THQ presupune că doza ingerată este egală cu doza absorbită a poluantului, conform Ghidului U.S. EPA, (1989). Totuși, în realitate doza ingerată nu este egală cu doza absorbită de poluant, o parte din toxic fiind transformată sau excretată, doar diferența este acumulată în țesuturi și afectează negativ sănătatea umană (PETROCZI și NAUGHTON, 2009).

### **CONCLUZII GENERALE**

Metodele analitice realizate în cadrul prezentei teze de doctorat au multiple avantaje față de metodele clasice: ►sunt rapide, având detecție multielementală (pentru determinarea metalelor) și multicomponent (pentru determinarea compușilor organici), ►sunt sensibile, beneficiând de capacitățile deosebite ale spectrometrului de masă sau a detectorului cu captură de electroni, ►sunt ecologice, eliminând sau reducând drastic volumele de acizi concentrați (pentru determinarea metalelor, cum sunt tehnicile LA-ICP-MS, UV-ICP-MS, MW-ICP-MS) și volumele de solvenți organici toxici (pentru determinarea compușilor organici, cum sunt tehnicile HS-SPME-GC-ECD, SPE-GC-ECD, USE-GC-ECD, MSPD-GC-ECD). Aplicarea acestor metode pe probe sintetice, în vederea validării, a indicat obținerea unor parametri de performanță (limite de detecție,

grade de recuperare, liniarității) corespunzători criteriilor de validare IUPAC, fiind aplicabile pe domenii de concentrații la nivel de urme și ultra-urme.

Cercetarea întreprinsă în zona Baia Mare a furnizat informații privind contaminarea difuză a solului, apei, vegetației și laptelui cu metale grele, pesticide organoclorurate și bifenili policlorurați. Metalele investigate au fost prezente în toate probele analizate, în concentrații foarte variate, punând în evidență o poluare multiplă cu aceste metale, în special în solurile agricole situate în apropierea surselor de poluare. Concentrațiile metalelor grele în sol pentru zona Baia Mare, îndeosebi pentru Pb, Cd și Cu prezintă valori care depășesc uneori chiar limitele de intervenție, ceea ce evidențiază impactul pe care activitățile miniere și de metalurgie neferoasă au avut-o asupra calității solului. Situația este cu atât mai îngrijorătoare, mai ales în cazul Pb și Cd, fiind cele mai toxice dintre metalele investigate. Având în vedere caracterul specific al poluării solului cu metale grele, sub influența surselor de poluare, se constată o poluare remanentă, în special în zona Baia Mare și perimetrele iazurilor de decantare și a haldelor de steril, comparativ cu zonele neafectate sub impactul direct al surselor de poluare, unde concentrațiile metalelor grele se situează sub valorile pragurilor de referință.

În cazul probelor de apă, vegetație/iarbă și lapte, nu s-au determinat concentrații ale metalelor mai mari decât cele maxime admise de legislația în vigoare.

Dintre pesticidele organoclorurate analizate, HCH și DDT au fost componentii cei mai abundenți, atât în probele de sol, cât și cele de iarbă și lapte. HCH se consideră că provine din surse istorice, în special din HCH tehnic. Pentru DDT, principala sursă este, în majoritatea probelor, din utilizări nerecente. Compușii PCB au avut de asemenea o contribuție importantă la contaminarea solului, vegetației și laptelui. Compușii organoclorurați nu au înregistrat depășiri ale concentrațiilor maxime admise, în toate probele analizate. Totuși, luând în considerare contaminarea difuză a mediului cu acești compuși, precum și efectul acestora de disrupere endocrină ce se manifestă la concentrații extrem de scăzute, se poate considera o expunere potențială a populației consumatoare de lapte, în zona studiată. În plus, datorită aplicării continue de pesticide din clase noi, cum sunt piretroizii, amenințări necunoscute pot fi introduse în mediu și în lanțul trofic. De asemenea, luând în considerare sinergia unora dintre acești compuși, amenințările pot fi cu atât mai complexe și mai grave.



Factorii de transfer (FT) determinați pentru metale au înregistrat valori subunitare, indicând lipsa acumulării metalelor în lapte prin ingerarea de vegetație / iarbă. Factorii de transfer determinați pentru compușii organoclorurați au variat în limite largi, având valori foarte variabile, explicate prin comportamentul diferit al compușilor organoclorurați datorat structurilor chimice foarte diverse ale acestora, ceea ce implică diferențe majore în ceea ce privește metabolizarea și biotransformarea lor în organismul animal, stocarea în diferite organe, precum și excreția lor. Valorile supraunitare ale unor Factori de biotransfer (FBT) se pot explica prin acumularea și biomagnificarea compușilor organoclorurați în organismul animal, proveniți din dieta animalului. Factorii FT și FBT cuantifică transferul dietar al contaminanților din mediu în organismul animal și uman. Rezultatele obținute pot furniza informații cu privire la bioacumularea MG, POC și PCB în animale, respectiv în lapte și astfel, expunerea potențială a consumatorului uman la acest aliment.

Aportul zilnic estimat al contaminanților, reprezentând aportul zilnic din ingerarea de iarbă, sol și apă, calculat pentru evaluarea riscului asupra sănătății organismului animal a variat în limite largi și a fost comparat cu valoarea de referință a aportului zilnic admisibil/tolerabil. Pentru Pb și Cd s-au obținut unele depășiri ale valorilor de referință, indicând un risc potențial asupra stării de sănătate a organismului animal, prin consum de iarbă, apă și sol, în zonele situate în apropiere de iazurile de decantare și haldele de steril ale REMIN SA și ale Transgold SA. Pentru Cu și Zn nu s-au înregistrat depășiri ale valorilor de referință ale aportului zilnic tolerabil, indicând absența riscului potențial prin ingestie de iarbă, apă și sol în zonele investigate. Pentru compușii organoclorurați, valorile  $EDI_{\text{animal}}$  au înregistrat depășiri ale valorilor de referință ale aportului zilnic admisibil pentru  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, aldrin și dieldrin, endosulfan, DDT total și PCB total, indicând un risc potențial asupra sănătății animalelor prin ingestie de iarbă, apă și sol în aceste zone.

O problemă importantă de mediu este cantitatea de compuși organici și metale grele disruptori endocrini acumulate în vegetalele utilizate ca nutrețuri. Prin intermediul acestora, poate avea loc expunerea organismului uman la acești contaminanți prin alimentele de origine animală, ca urmare a acumulării lor în țesuturile grase ale animalelor care au fost hrănite cu nutrețuri contaminate. Produsele alimentare de origine

animală, cum este laptele, pot acumula acești compuși, care sunt extrem de persistenți și lent degradabili și care pot determina probleme de securitate alimentară pentru consumatorii umani. Calitatea, din punct de vedere chimic, a laptelui consumat de populație este o chestiune de interes public și este de importanță majoră pentru protecția sănătății consumatorului. De asemenea, calcularea valorilor aportului zilnic acceptabil (ADI) și a aportului săptămânal tolerabil provizoriu (PTWI), este în prezent, metoda cea mai potrivită de evaluare a riscului asupra sănătății datorită ingerării alimentelor contaminate cu metale grele și compuși organici. Astfel, evaluarea riscului asupra stării de sănătate umană prin consum de lapte, la grupuri populaționale rezidente în zona Baia Mare s-a efectuat prin calcularea expunerii dietare estimate (EDI) și compararea acesteia cu valorile de referință. Astfel, pentru fiecare analit investigat, expunerea dietară medie estimată a variat în ordinea:  $EDI_{copii} > EDI_{bărbați} > EDI_{femei}$ , în concordanță cu consumul zilnic de lapte și a înregistrat valori mai scăzute decât valorile de referință TDI / ADI și PTWI. Coeficienții de hazard țintă individuali (THQ) pentru metalele investigate, calculați pentru ingestia medie de lapte în zona expusă la poluare cronică cu metale grele, pentru cele trei grupuri populaționale studiate au scăzut în ordinea  $THQ_{Zn} > THQ_{Cd} > THQ_{Cu} > THQ_{Pb}$  pentru fiecare grup populațional investigat și scad în ordinea  $THQ_{copii} > THQ_{bărbați} > THQ_{femei}$ , pentru fiecare analit studiat. Valorile THQ sunt mai mici decât 1, indicând că locuitorii zonei investigate nu experimentează un potențial risc asupra sănătății prin ingestia de lapte. Riscul asupra sănătății prin expunere simultană la mai mulți contaminanți (metale grele și pesticide organoclorurate) s-a calculat prin determinarea coeficienților de hazard țintă totali (TTHQ), care au evidențiat contribuția ridicată a metalelor grele la valoarea totală a TTHQ, precum și valoarea ridicată a TTHQ pentru copiii din zona studiată, care consumă lapte. Valorile coeficienților TTHQ fiind mai mici decât 1 sugerează că locuitorii investigați nu experimentează deja efecte adverse sănătății umane, datorită ingestiei de lapte.

Studiul realizat evidențiază că evaluarea riscului contaminanților din mediu reprezintă o componentă importantă a sănătății publice și veterinară, interfațându-se și cu siguranța și securitatea alimentară, nutriția animală și umană și știința mediului.