

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT FARMACIE

***DETERMINAREA CONȚINUTULUI ÎN PESTICIDE ȘI
METALE GRELE AL UNOR PLANTE CU UTILIZARE
MEDICINALĂ ȘI ALIMENTARĂ, PROVENITE DIN
CULTURI ECOLOGICE ȘI/SAU FLORA SPONTANĂ***

Rezumatul tezei de doctorat

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT
PROF. UNIV. DR. GÎRD CERASELA ELENA

STUDENT - DOCTORAND
FLOREA MIHAI - ALEXANDRU

2022

CUPRINS

Lista lucrărilor științifice publicate.....	6
Lista cu abrevieri și simboluri.....	8
INTRODUCERE.....	10
1. Considerații teoretice referitoare la tipurile de pesticide și metale grele cu potențial de acumulare în produse vegetale și impactul asupra sănătății umane.....	12
1.1. Pesticide.....	12
1.1.1. Chimia pesticidelor.....	14
1.1.2. Erbicide.....	16
1.1.3. Insecticide.....	16
1.1.4. Fungicide.....	17
1.1.5. Proprietăți fizico-chimice.....	17
1.1.6. Implicațiile toxicologice ale pesticidelor.....	17
1.1.6.1. Toxicitatea acută.....	18
1.1.6.2. Toxicitatea cronică.....	19
1.1.6.3. Intoxicația acută.....	19
1.1.6.4. Intoxicația cronică.....	19
1.1.7. Pesticide cu toxicitate crescută.....	20
1.1.8. Legislația europeană privind utilizarea pesticidelor.....	27
1.1.9. Siguranța utilizării pesticidelor pentru produsele alimentare.....	29
1.2. Metale grele.....	30
1.2.1. Chimia metalelor grele.....	30
1.2.2. Proprietăți fizico-chimice.....	30
1.2.3. Implicațiile toxicologice ale metalelor grele.....	31
1.2.3.1. Toxicitatea acută.....	33
1.2.3.2. Toxicitatea cronică.....	34
1.2.3.3. Intoxicația acută.....	34
1.2.3.4. Intoxicația cronică.....	35
1.2.4. Principalele cauze ale poluării cu metale grele.....	37

2. Stadiul actual al utilizării și frecvența de testare a reziduurilor de pesticide și metale grele pe teritoriul României, în diverse surse vegetale.....	40
2.1. Studii privind impactul pesticidelor în România.....	40
2.2. Studii privind impactul metalelor grele în România.....	49

PARTEA EXPERIMENTALĂ

3. Protocol de validare a reziduurilor de pesticide și a metalelor grele în produse vegetale complexe.....	53
3.1. Determinarea și validarea metodei optime de extracție a reziduurilor de pesticide din matrici complexe utilizând cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă. Pesticide folosite în sistemele agricole aprobate, restricționate și/sau interzise în uniunea Europeană.....	53
3.1.1. Metodologie experimentală pentru determinarea reziduurilor de pesticide din produse vegetale prin tehnici cuplate cu spectrometria de masă.....	54
3.1.2. Parametrii urmăriți/selectați în protocolul de validare experimental a metodei cromatografice multireziduu.....	59
3.1.3. Rezultate obținute în urma protocolului experimental-Raport de validare.....	59
3.1.4. Aplicarea protocolului experimental pe diverse matrici vegetale.....	60
3.1.5. Concluzii parțiale.....	65
3.2. Determinarea conținutului de metale grele din matrici complexe vegetale utilizând spectrometria de absorbție atomică.....	66
3.2.1. Selecția materiilor prime vegetale în vederea determinării conținutului de metale grele.....	67
3.2.2. Metodologie experimentală	67
3.2.3. Rezultate obținute în urma protocolului experimental.....	71
3.2.4. Concluzii parțiale.....	74
4. Determinarea reziduurilor de pesticide și a metalelor grele din produse vegetale și evaluarea gradului de transfer în diferite soluții extractive apoase.....	75
4.1. Acțiunea terapeutică a produselor vegetale.....	75
4.2. Determinarea conținutului de pesticide.....	83
4.2.1. Metodologie experimentală pentru determinarea reziduurilor de pesticide din produse vegetale.....	83

4.3. Rezultate și discuții.....	84
4.4. Evaluarea gradului de transfer a reziduurilor de pesticide din produse vegetale contaminate, în soluții extractibile apoase.....	88
4.4.1. Metodologie experimentală privind evaluarea gradului de transfer a reziduurilor de pesticide din materia primă în soluții extractibile.....	90
4.5. Rezultate și discuții.....	91
4.6. Concluzii parțiale.....	104
4.7. Determinarea conținutului de metale grele din produse vegetale.....	105
4.7.1. Metodologie de lucru pentru determinarea conținutului de metale grele din produse vegetale.....	106
4.8. Rezultate și discuții.....	107
4.9. Evaluarea gradului de transfer a metalelor grele din produse vegetale, în soluții apoase extractibile.....	112
4.9.1. Metodologie experimentală pentru determinarea conținutului de metale grele din diferite tipuri de soluții extractibile.....	112
4.10. Rezultate și discuții.....	112
4.11. Concluzii parțiale.....	119
5. Cercetări asupra componentelor volatile din materiile prime vegetale și stabilirea ratei de transfer în diferite tipuri de soluții apoase.....	121
5.1. Determinarea conținutului de compuși volatili din produsele vegetale selectate.....	122
5.1.1. Metodologie experimentală privind evaluarea conținutului de principii active volatile din materia primă vegetală.....	125
5.1.2. Rezultate și discuții.....	126
5.2. Evaluarea gradului de transfer a componentelor volatile din probe vegetale, în diferite tipuri de soluții apoase.....	128
5.2.1. Metodologie experimentală privind evaluarea gradului de transfer a componentelor volatile din materia primă în soluții extractibile apoase.....	128
5.2.2. Rezultate și discuții.....	129
5.3. Concluzii parțiale.....	137
6. Studii de monitorizare asupra reziduurilor de pesticide din proba vegetală stocată de mentă.....	139

6.1. Cultivarea răsadurilor de mentă- <i>Mentha piperita</i>	139
6.2. Contaminarea culturii de mentă.....	142
6.3. Studii privind gradul de remanență a reziduurilor de pesticide din produsul de mentă stocat.....	144
6.3.1. Metodologie experimentală pentru determinarea reziduurilor de pesticide din produsul uscat de mentă.....	144
6.4. Rezultate și discuții.....	144
6.5. Concluzii parțiale.....	154
7. Investigarea conținutului de pesticide în diferite probe de mentă și efectele induse la nivelul celulei vegetale și animale în teste de laborator.....	156
7.1. Contaminarea probei de mentă (<i>Menthae folium</i>).....	156
7.2. Extracția și determinarea cantitativă a multireziduurilor din produsul vegetal contaminat.....	158
7.2.1. Rezultate și discuții.....	158
7.3. Prepararea și determinarea cantitativă a pesticidelor din infuziile de mentă.....	160
7.3.1. Metodologie experimentală pentru determinarea conținutului de pesticide din extractul apos de mentă.....	160
7.3.2. Rezultate și discuții.....	160
7.4. Evaluarea modificărilor morfologice și anatomice la <i>Menthae folium</i>	164
7.4.1. Rezultate și discuții.....	164
7.5. Evaluarea citotoxicității prin intermediul testului <i>Daphnia magna</i>	165
7.5.1. Rezultate și discuții.....	166
7.6. Evaluarea efectului extractului de mentă contaminat cu organofosforice asupra comportamentului locomotor și a coordonării motorii.....	168
7.6.1. Evaluarea activității motorii și a tonusului muscular.....	168
7.6.2. Rezultate și discuții.....	170
7.6.3. Evaluarea gradului de acumulare a reziduurilor de pesticide în ser și organe.....	176
7.6.4. Rezultate și discuții.....	178
7.7. Determinarea concentrației speciilor oxigen reactive (SRO) din extractele vegetale, prin metoda bioluminescenței cu luminol.....	189
7.7.1. Rezultate și discuții.....	191

7.8. Concluzii parțiale.....	192
8. Concluzii generale. Grad de originalitate. Perspective de cercetare.....	193
Bibliografie.....	199
Anexe.....	215

INTRODUCERE

Plantele medicinale au o istorie îndelungată de utilizare în terapie, efectele benefice fiind recunoscute în întreaga lume, fitoterapia fiind o ramură destul de importantă a medicinei tradiționale. În general, efectul terapeutic al unei plante medicinale se datorează componentelor bioactive, care spre deosebire de medicamentele sintetice, conțin mai multe substanțe chimice, ce pot acționa sinergic [1,2]. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) estimează un procent destul ridicat (65%-80%) de utilizare a produselor de origine vegetală ca formă primară de îngrijire a sănătății [3]. În piața farmaceutică există o multitudine de suplimente alimentare sau nutritive, obținute din diverse plante medicinale indigene sau exogene. Numeroase specii medicinale sunt utilizate atât în scop terapeutic cât și în scop culinar, fiind încadrate în această categorie cimbrul - *Thymi herba*, rozmarinul - *Rosmarini folium*, busuiocul - *Basilici herba* și menta - *Menthae folium* etc.

Pentru a minimiza reamenața și eventualele efecte toxice ale acestor contaminanți, studii de monitorizare a poluării cu reziduuri de pesticide și metale grele sunt efectuate, fiind coordonate de către Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA). Standardele europene impun cu strictețe respectarea unor limite de toleranță, asigurând astfel o calitate ridicată a produselor alimentare, pătrunse pe piața unică europeană.

Pornind de la aceste premise, obiectivul principal al tezei a fost să evidențieze necesitatea unui program de monitorizare mai riguros, supunând analizelor de contaminanți (pesticide și metale grele), o gamă variată de produse vegetale, folosite atât în scop terapeutic cât și în scop culinar.

Obiectivele specifice tezei au vizat:

- documentarea privind statutul la nivel național asupra programelor de monitorizare a reziduurilor de pesticide și metalelor grele din plantele medicinale și frecvența de testare;

- dezvoltarea și validarea unei metode multireziduu de pesticide utilizând cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă, din matrici complexe de origine vegetală (GC-MS/MS);
- evaluarea profilului multireziduuri de pesticide din diverse produse vegetale provenite atât din flora spontană cât și din culturi proprii ale producătorilor;
- dezvoltarea unei metode de identificare și cuantificarea metalelor grele din matrici vegetale, utilizând spectrometria de emisie și absorbție atomică (AES / AAS);
- transferul contaminanților din produse vegetale folosite atât în scop terapeutic cât și culinar (*Menthae folium*, *Rosmarini folium*, *Basilici herba*, *Thymi herba*), în anumite tipuri de soluții extractive și țesuturi de origine animală;
- transferul componentelor bioactive din produsele vegetale (*Menthae folium*, *Rosmarini folium*, *Basilici herba*, *Thymi herba*) în diferite soluții extractive apoase;
- evaluarea toxicității matricelor vegetale contaminate prin monitorizarea efectelor induse asupra nevertebratului *Daphnia magna*; determinarea statusului oxidativ indus la nivel hepatic și cerebral;
- evaluarea gradului de remanență a reziduuri de pesticide din compoziția matricilor vegetale contaminate;

Teza de doctorat este structurată în două părți. În primă parte a tezei am adus în discuție situația actuală de la nivel mondial și național asupra reziduurilor de pesticide și metalelor grele, infiltrate în lanțul trofic și probleme generale acute/cronice ce pot fi generate, în cazul în care nu sunt respectate anumite normele de siguranță dar și nerespectarea legislației aferente. În a doua parte a tezei sunt contribuțiile personale care abordează principalele obiective propuse, prin efectuarea de teste experimentale, desfășurate pe o perioadă de 4 ani, descrise în detaliu în cele cinci capitole, fiind sumarizate într-un capitol final, în care confirmăm atingerea obiectivelor propuse. De asemenea, teza prezintă, deschide noi oportunități de cercetare ulterioară, prin evaluarea gradului de contaminare în anumite țesuturi, prin folosirea de tehnici analitice avansate.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. CONSIDERAȚII TEORETICE REFERITOARE LA TIPURILE DE PESTICIDE ȘI METALE GRELE CU POTENȚIAL DE ACUMULARE ÎN PRODUSE VEGETALE IMPACTUL ASUPRA SĂNĂȚĂII UMANE

Capitolul 1 a fost împărțit în două secțiuni, primul referindu-se la istoria, clasificarea pesticidelor, remanența dar și principalele probleme ce pot cauza anumite reziduuri ecosistemelor la nivel mondial. În a doua secțiune am descris principalele metale grele și implicațiile toxicologice ulterioare asupra sănătății oamenilor.

Pesticide

Pesticidele sunt compuși sau amestecuri de compuși aplicate diferitelor tipuri de culturi, cu scopul de a diminua pierderilor de producție și de a menține o calitate cât mai ridicată a produselor stocate, cu rol de a distruge, de a controla sau de a descuraja anumiți dăunători [4].

Progresul major în dezvoltarea pesticidelor a avut loc în perioada de după al doilea război mondial, când s-au sintetizat numeroase tipuri de substanțe eficiente și la prețuri accesibile. Această perioadă a fost marcată de descoperirea compușilor precum aldrin, diclorodifenil-triclorețan (DDT) în 1939, dieldrin, β -hexaclorură de benzen (BHC), acid 2,4-diclorfenoxiacetic (2.4-D), clordan, endrin și altele, ce și-au dovedit eficacitatea în sistemele agricole și nu numai [5,6]. Utilizarea frecventă a pesticidelor pentru atenuarea dăunătorilor, a devenit o practică obișnuită în toată lumea. Datorită creșterii producției agricole, cu scopul de a obține un randament cât mai ridicat de alimente, precum și ridicarea potențialului productiv al materiilor prime provenite din flora spontană, au condus la necesitatea unei protecții corespunzătoare a culturilor, dar și a vegetației împotriva bolilor criptogamice.

Pierderile provocate culturilor la nivel mondial, se ridică anual la peste 35-40% din recoltele totale, ceea ce conduce la obținerea unui randament destul de scăzut a produselor alimentare din comerț. Din aceste pierderi, insectelor le revin cel mai mare procent, aproximativ 13.8%, urmate de ciuperci 11.6%, buruieni 9.5% și altor organisme 0.1% [7].

La ora actuală, la nivel mondial se estimează că aproximativ 3 milioane de tone de pesticide sunt date spre folosință, dintre care 48% sunt erbicide, 29% insecticide, 17% fungicide iar restul de 6% fiind reprezentate de alte categorii de pesticide. Statistica folosirii pesticidelor arată o creștere cu 33% (aproximativ 4 milioane de tone de pesticide), în următorii ani [8].

De-a lungul anilor, s-au efectuat numeroase studii referitoare la efectele dăunătoare pe care pesticidele le pot cauza oamenilor, fie din punct de vedere acut, fie cronic. În anumite situații, efectele nocive ale pesticidelor pot conduce la moarte, dacă dozele aplicate nu sunt respectate și nu se asigură termenul limită de acțiune.

Evaluarea potențialului toxic acut al unei substanțe chimice este necesar pentru a determina impactul negativ asupra sănătății, ca urmare a unei expuneri sau a unor expuneri multiple într-un interval de 24 de ore. Aceste expuneri ne pot da informații despre tipul efectelor toxice, momentul apariției, durata și gravitatea, relațiile dintre doză și reacție, etc. [9]. Problemele investigate pot fi: modificări anormale ale greutateii corpului, modificări patologice ale țesuturilor și organelor, semne clinice ale toxicității, și altele. Sunt situații când un pesticid cu toxicitate acută mare este mortal chiar dacă corpul uman absoarbe o cantitate foarte mică [10].

Se cunoaște faptul că pesticidele din clasa organofosforicelor (clorpirifos, clorfenvinfos, diazinon, malation, fenitroion, etc.) sunt extrem de neurotoxice, inhibă ireversibil acetilcolinesteraza (enzimă implicată în hidroliza acetilcolinei), cu acumulare de acetilcolină în neuronii motori. Foarte mulți compuși de tipul ditiocarbamaților (mancozeb, zineb, urbazid) induc stres oxidativ intraneuronal, conducând la deteriorare neuronală, iar prin eliberarea ionilor de metal din compoziție (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}) în timpul biotransformării, aceștia pot îmbunătăți nivelul de echilibru al speciilor reactive de oxigen (SRO), pot stimula oxidarea indusă de SRO a lipidelor și a proteinelor sau pot inactiva anumite enzime conducând la efecte neurotoxice [11].

Numeroase studii orientate către căile de expunere ale omului, fie prin intermediul cadrului profesional (la locul de muncă), fie din mediul înconjurător arată că, ficatul este organul principal vizat pentru acumularea pesticidelor, fiind și locul biotransformării lor [12]. De asemenea, în funcție de anumite proprietăți specifice cum ar fi: afinitatea lor pentru țesuturile lipofile, remanența, metabolizarea lor, etc., acestea pot deveni o posibilă sursă de contaminare datorită biotransformării în anumite xenobiotice (DDT, atrazin, carbaril, diazinon, diuron, etc.) de la nivelul ficatului [13,14]. Al doilea organ predispus intoxicării cu pesticide este rinichiul, datorită fluxului mare de sânge, de capacitatea sa de concentrare și de convertire a acestora, fiind o țintă preferată pentru toxicitatea compușilor xenobiotici [15].

Metale grele

Organizațiile internaționale au stabilit, datorită toxicității anumitor metale din tabelul periodic (metale grele), un plan de monitorizare care să fie respectat cu strictețe, din cauza prezenței

lor la locul de muncă, sol, aer, apă sau în gospodăriile oamenilor, afectând de cele mai multe ori starea generală a acestora. Din cele 35 de metale, 23 sunt reprezentate de către metalele grele: stibiu (Sb), arsenic (As), bismut (Bi), cadmiu (Cd), ceriu (Ce), crom (Cr), cobalt (Co), cupru (Cu), galiu (Ga), aur (Au), fier (Fe), plumb (Pb), magneziu (Mg), mercur (Hg), nichel (Ni), platină (Pt), argint (Ag), teluriu (Te), taliu (Ta), staniu (Sn), uraniu (U), vanadiu (V) și zinc (Zn).

Anumite metale, precum Zn, Fe, Cu, Cr, Ni, Mn sunt printre puținele elemente esențiale active în desfășurarea proceselor metabolice ale omului (Zn este implicat în numeroase procese enzimatice care ajută digestia, carența lui conducând la scăderea imunității, pierderea gustului și a mirosului; Fe este implicat în transportul oxigenului prin intermediul hemoglobinei, deficiența lui generând o lipsă de oxigenare la nivelul creierului și carențe în gândire; cupru este un oligoelement esențial pentru buna funcționalitate a corpului uman, el fiind implicat în anumite procese esențiale de la nivelul creierului, sistemului nervos dar și a sistemului cardiovascular), dar pot deveni toxice în cantități mari [16,17]. Față de celelalte toxine prezente în mediu, metalele grele au proprietatea de a se acumula în organismul uman, iar eliminarea lor prin metodele uzuale de excreție nu sunt foarte eficiente, fiind necesare metode de chelatare a acestora, care să grăbească procesul de suprimare [18].

Cele mai afectate organe datorită asimilării metalelor grele în organismul uman sunt: creierul, tractul gastroduodenal, măduva hematogenă, nervii periferici, sistemul cardiovascular și renal. Toxicitatea depinde de tipul, cantitatea de metal, vârsta pacientului precum și perioada de expunere [17,19].

Cea mai relevantă analiză pentru depistarea reziduurilor de metale grele din organismul uman, este analiza firului de păr (analiza minerală tisulară), testele de urină sau de sânge nu sunt foarte specifice, deoarece acestea au capacitatea de a se depozita în țesutul gras, păr și unghii [20-22].

Simptomele intoxicației cu un metal greu nu sunt greu de recunoscut din cauza faptului că acestea sunt, de obicei, severe, rapide și pot fi asociate cu un eveniment recent (expunere sau ingerare). Expunerea la toxicitatea metalelor poate apărea fie din alimentația de zi cu zi, fie prin administrarea de produse farmaceutice, plante medicinale, produse derivate din plante medicinale, fie din mediul înconjurător sau din mediul profesional [23,24]. Cele mai frecvente simptomele sunt asociate cu: crampe, greață și vărsături, durere, transpirație, dureri de cap, respirație greoaie, confuzie, dificultăți în ceea ce privește capacitatea de a gândi, de a merge, de a vorbi și convulsii.

Tratamentele naturiste din plante medicinale sunt recunoscute din cele mai vechi timpuri și preferate în locul tratamentelor sistematice convenționale, dar prin folosirea în doze repetate (cu scopul de a obține efectul terapeutic dorit), contaminarea organismului cu metale grele este inevitabilă. Plantele medicinale se hrănesc cu substanțele minerale din sol prin intermediul rădăcinilor dar și prin organele aeriene, cum ar fi frunzele. Absorbția elementelor esențiale necesare dezvoltării plantelor, nu este întotdeauna benefică, deoarece prin acest proces, plantele acumulează/stochează și metale grele în compoziția lor. Astfel prin folosirea plantelor medicinale, fie în prepararea unor ceaiuri, fie cu scopul obținerii unui produs medicamentos sau unei extract/tinctură, acestea pătrund în organismul uman. Pentru a controla impactul negativ al acestor compuși, au fost necesare impunerea unor limite de toleranță, în controlul alimentelor, a solurilor, a apelor și a aerului, în fiecare țară, în funcție de natura substanței și de toxicitatea acesteia [25-27].

2. STADIUL ACTUAL AL UTILIZĂRII ȘI FRECVENȚA DE TESTARE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE ȘI METALE GRELE PE TERITORIUL ROMÂNIEI, ÎN DIVERSE SURSE VEGETALE

În capitolul 2, am descris situația actuală națională a reziduurilor de pesticide și a metalelor grele, prin prezentarea de studii științifice și rapoarte emise de către laboratoarele implicate în programele de monitorizarea a acestor contaminanți.

Foarte puține studii au fost efectuate pe teritoriul României în ceea ce privește calitatea materiei prime, din punct de vedere al contaminanților (reziduuri de pesticide, metale grele, etc.), efectele cu potențial negativ, fiind direct implicate asupra sănătății consumatorului. În urma studiilor efectuate la nivelul României în ceea ce privește remanența anumitor tipuri de pesticide, Ferencz și colab. au determinat α -hexaclorociclohexane, γ -hexachlorociclohexane, diazinon, dichlorvos în diferite probe de apă. De asemenea aceștia au testat și anumite probe de sol, unde au găsit concentrații de aproximativ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DDT și 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DDE, aceste reziduuri de pesticide făcând parte din categoria organocloruratelor [28]. Un lucru și mai grav este faptul că au fost găsite urme de HCH la mai mult de 98% din pacienții investigați din Iași (România), unde izomerul β -HCH a fost cel mai răspândit cu o valoare medie de 923 ng/g lw. Urme de DDT (p. p-DDE, o, p-DDT și p. p-DDT) au fost măsurate în toate probele de ser uman [29]. Contribuția majoră (>70%) din suma DDT a fost p. p-DDE cu o valoare medie de 1975 ng/ g lw. Nivelurile de p, p-DDE au fost semnificativ mai mari la persoanele cu reședința în zona rurală, iar concentrațiile majorității

poluanților au fost corelate semnificativ cu vârsta și anumite tipuri de afecțiuni (cancerul de sân, ovarian, testicular și de tiroidă sunt strâns asociate cu expunerea la aceste pesticide) [29]. Rusu și colab. au evaluat nivelul reziduurilor de pesticide din 54 de probe de lapte și produse procesate din lapte, colectate aleatoriu din județul Bacău, unde au depistat compuși din categoria pesticidelor organoclorurate (α -HCH, β -HCH și γ -HCH) peste limite maxime permise, ceea ce confirmă remanența și transferul pesticidelor în produsele cu conținut mare de grăsimi [30].

Din anul 2011 până în prezent, Ministerul agriculturii și dezvoltării rurale (MADR) din România, a emis cu frecvență anuală, un raport privind planul de monitorizare a reziduurilor de pesticide din diverse produse de origine vegetală (cele mai multe fac parte din categoria legumelor, fructelor și cerealelor), din producția internă și externă, respectând cerințele UE. Aceste planuri de monitorizare au fost elaborate de către Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor (ANSVSA), autoritate competentă, supusă reglementărilor UE.

Scopul primordial al acestei acțiuni, este de a controla rata de incidența în anumite zone și pentru anumite produse, cu efecte ulterioare, de a reduce consumul pesticidelor toxice și remanente. Analizele sunt efectuate de către laboratoarele competente și acreditate conform cerințelor Europene (ISO/IEC 17025:2005).

În ultimii ani, poluarea cu metale grele a devenit o problemă la nivel mondial, datorită dezvoltării sectoarelor industriale, agriculturii, mineritului, transportului, etc., aceste elemente fiind eliberate în mod continuu în mediul înconjurător, fără a cunoaște în detaliu, potențialele efecte dăunătoare [31].

Vrinceanu și colaboratorii săi au studiat potențialul de acumulare al metalelor grele în țesutul plantelor dintr-o zonă afectată de emisiile provenite de la platforma industrială din zona Copșa Mică. Au fost prelevate și eșantionate aproximativ 118 probe de plante medicinale și 103 probe de sol. Analize efectuate pentru determinarea metalelor grele (Cd, Zn și Pb) au aratat că speciile *Equisetum pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Verbascum phlomoides*, *Calamagrostis pseudophragmites* și *Asclepias syriaca* au acumulat cantități excesive de metale grele în țesuturile lor, datorită poluării solului și a aerului [32].

Altă zona unde au fost testate acumularea de metale grele în plante medicinale a fost zona Dobrogei, unde Lucica Barbes și colaboratorii săi au evaluat acumularea metalelor grele în frunzele și scoarța de *Populus nigra* L. provenite din atmosferă și sol. Metale grele precum Cu, Ni, Zn și Cd au fost determinate, probele fiind prelevate din 2 zone poluate din regiunea Năvodari (Năvodari

Camp și Năvodari Fertilizer Chemical Plant), România. Rezultatele au arăt faptul că, frunzele de *Populus nigra* L. pot fi folosite ca un bioindicator în cazul în care solul este contaminat cu urme de Cu, Ni, Pb, Zn sau Cd [33]. De asemenea, Radulescu și colaboratorii săi au studiat metalele grele din 4 plante medicinale perene: *Matricaria recutita* L., *Taraxacum officinale* L., *Achillea millefolium* L. și *Hypericum perforatum* L., probele fiind colectate din regiunea Năvodari și analizate utilizând spectrometria de absorbție atomică (AAS). În urma studiului au concluzionat faptul că, probele de plante medicinale pot absorbi concentrații semnificative de metale grele din sol și din atmosfera contaminată, indusă de traficul auto dar și de rafinaria petrolieră aflată în vecinătate [34].

PARTEA EXPERIMENTALĂ

3. PROTOCOL DE VALIDARE A REZIDUURILOR DE PESTICIDE ȘI A METALELOR GRELE DIN PRODUSE VEGETALE COMPLEXE

Capitolul 3, a fost împărțit în două secțiuni, prima referindu-se la validarea metodei de extracție și analiză a reziduurilor de pesticide din matrici complexe vegetale utilizând cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă, iar în a doua parte am dezvoltat o metodă pentru determinarea conținutului de metale grele din materii prime vegetale, utilizând spectrometria de absorbție atomică.

Pesticide

Metoda se bazează pe separarea reziduuri de pesticide extrase din probe de plante/produse vegetale și măsurarea cantitativă a acestora, prin metoda standardului intern. Extracția și purificarea probelor luate în studiu se execută prin metoda SPE-QuEChERS, iar determinarea cantitativă a pesticidelor se realizează prin tehnicile GC-MS-MS (varianta timed SRM- selected reaction monitoring).

Principalele etape ale modului de lucru privind efectuarea încercării sunt:

- prelucrarea primară a probei – se referă la omogenizarea și eșantionarea probelor de încercat în vederea obținerii de porții analitice ale unei probe;
- prelucrarea probei analitice – are drept scop extracția în ACN a pesticidelor din probă și purificarea acestora. În mod similar se va prepara și proba blanc de reactivi;
- prepararea probelor de calibrare (pentru determinările cantitative) – se realizează în vederea trasării curbelor de calibrare pe baza cărora se calculează concentrațiile de reziduuri din probe;
- analiza cromatografică a probei.

Parametrii specifici de achiziție au fost optimizați prin varianta timed SRM (selected reaction monitoring- fragmentarea ionului produs în ion precursor), fiecare analit urmărit având cel puțin un ion de confirmare. Condițiile optime de ionizare/fragmentare/detecție/separare au avut la bază documentarea din literatura de specialitate/bazelor de date precum și testărilor preliminare pentru a asigura îndeplinirea atributelor de bază de specificitate și sensibilitate.

Parametrii selectați în cadrul protocolului experimental de lucru: interval de talonare, linearitatea, limita de cuantificare (LOQ), acuratețea, precizia pe termen scurt, precizia intermediară, incertitudinea de măsurare.

Cunoscându-se complexitatea și varietatea matricilor vegetale, conform ghidului Sante 12682/2019 (fiind un document strict necesar laboratoarelor implicate în programele oficiale de monitorizare ale reziduurilor de pesticide de pe teritoriul Uniunii Europene), validarea unei metode analitice se poate face utilizând minim o matrice vegetală reprezentativă categoriei produsului vegetal [35]. Pentru o mai bună acuratețe a rezultatelor, au fost supuse testelor de validare două materii prime vegetale: frunze de Senna (*Cassia augustifolia*) și flori de hibiscus (*Hibiscus syriacus*).

Urmare a îndeplinirii criteriilor de acceptabilitate stabilite prin protocolul experimental de către majoritatea compușilor în matricile investigate, metoda analitică propusă pentru determinarea multireziduurilor de pesticide din matrici de origine vegetală corespunde scopului propus.

Metale grele

Spectrometria de emisie atomică (AES) și spectrometria de absorbție atomică (AAS) sunt tehnici analitice ce măsoară concentrația elementelor chimice (anorganice) dintr-o proba lichidă sau solidă. Tehnicile instrumentale presupun transformarea elementelor sub formă de vapori atomici la temperaturi ridicate, prin apariția emisiei sau absorbției luminii, ce poate fi măsurată cu precizie, la o lungime de undă rezonantă caracteristică elementelor în cauză.

Procesul de extracție a metalelor grele presupune 2 etape de mineralizare, urmată de o etapă finală de filtrare cu aducerea la un volum cunoscut, aplicat cu succes și de alți autori în domeniu [36-38]. După etapa de filtrare, etapă în care materia organică este îndepărtată, soluția este adusă la balon cotat și analizată cu ajutorul AAS și AES. Materiile prime folosite pentru determinarea conținutului de metale grele au fost achiziționate din comerț: roiniță (*Melissae folium*), recomandată pentru armonizarea stării psiho-emoționale și pentru îmbunătățirea memoriei; lavandă (*Lavandulae angustifoliae flores*), asociată în reducerea tensiunilor psihice, protejează organismul

împotriva stresului și armonizează starea psiho-emoțională; codițe de cireșe (*Cerasorum stipites*) cu efecte diuretice; căpșuni (*Strawberry*) consumate pentru aportul mare de vitamine. Elemente analizate: Zinc- Zn lungime de undă 213; Arsen- As lungime de undă 193; Mercur- Hg lungime de undă 253; Cupru- Cu lungime de undă 324; Crom- Cr lungime de undă 357; Cadmiu- Cd lungime de undă 228; Nichel- Ni lungime de undă 232; Plumb- Pb lungime de undă 283. Majoritatea probelor au fost analizate și cuantificate utilizând cuptorul de grafit, excepție făcând Hg și Zn care au fost analizat pe sistemul de hidrură/flacăra.

4. DETERMINAREA REZIDUURILOR DE PESTICIDE ȘI A METALELOR GRELE DIN PRODUSE VEGETALE ȘI EVALUAREA GRADULUI DE TRANSFER ÎN DIFERITE SOLUȚII EXTRACTIVE APOASE

În capitolul 4, am aplicat metodele analitice dezvoltate cu scopul de a evalua gradul de contaminare a unor produse vegetale (*Rosmarini folium*, *Menthae folium*, *Basilici herba*, *Thymi herba*) folosite uzual în fitoterapie dar și în gospodăria oamenilor. În acest scop am analizat câte 5 probe din fiecare categorie. Ulterior, probele au fost “îmbogățite” cu un număr mai mare de pesticide, pentru a evalua gradul de transfer atunci când se aplică diferite metode de preparare extractive apoase.

Pesticide

Cea mai contaminată materie primă a fost menta, fiind cuantificate reziduuri precum clorpirifos-etil în mentă-1 și mentă-5, ciflutrin (sumă de izomeri) în mentă-2 și mentă-3, lambda-cihalotrin în mentă-4 și mentă-5. În probele de rozmarin au fost dozate bifentrin, lambda-cihalotrin, fludioxonil, terbutilazin și metoxiclor (în mostra 1, 2 și 3, iar în probele 4 și 5 nu au fost cuantificate reziduuri ale pesticidelor peste LOQ metodei). Materiile prime de busuioc se prezintă mai bine din punctul de vedere al reziduurilor de pesticide, comparativ cu celelalte produse vegetale, găsindu-se contaminanți doar în probele 1 și 2 (lambda-cihalotrin, fludioxonil și tau-fluvalinat). Probele de cimbru au prezentat reziduuri ale pesticidelor în toate mostrele, cele mai mari cantități de reziduuri de pesticide găsindu-se în cimbru-2 și cimbru-5, cu 3.62 mg/kg lambda-cihalotrin și 0.045 mg/kg tau-fluvalinat. În restul probelor de cimbru, au fost cuantificate concentrații sub 0.01 mg/kg ale fludioxonilului, pirazofosului și metoxiclorului. Conform rezultatelor, 2 din 5 probe analizate din aceeași categorie de produs vegetal, prezintă reziduuri de pesticide ce pot ajunge în alimentația umană. De aceea, se va evalua transferul unui număr mai mare de reziduuri de pesticide, prin contaminarea voluntară a materiei prime vegetale, ce va fi folosită în prepararea diverselor soluții

apoase, utilizate des în fitoterapie. În funcție de proprietățile fizico-chimice ale fiecărui pesticid în parte și de afinitatea lor, acestea pot difuza din compoziția materiei prime vegetale în soluții apoase extractibile, cu riscul de a contamina involuntar organismul uman. În acest scop, s-a avut în vedere evaluarea ratei de transfer a reziduurilor de pesticide în diferite tipuri de soluții extractive (infuzii, macerări sau extracții combinate) [39].

Pesticide	Timp de retenție (min)	<i>Rosmarini folium</i> μg/kg	<i>Menthae folium</i> μg/kg	<i>Thymi herba</i> μg/kg	<i>Basilici herba</i> μg/kg	MRL μg/kg
Difenilamină	11.08	111.41	82.53	110.33	-	50
Trifluralin	11.33	88.91	86.61	182.76	-	50
BHC-alfa	11.85	-	39.44	46.68	-	10
HCB	11.80	49.58	-	80.40	54.03	20
BHC-beta	12.32	48.31	40.87	40.19	-	10
BHC-gamma	12.58	45.78	40.23	52.76	-	10
Diazinon	12.65	104.91	93.89	106.05	-	50
BHC-delta	13.12	46.47	44.12	-	-	10
Heptachlor	14.23	48.81	41.37	43.14	-	100
Heptachlor-epoxide	16.31	48.27	-	44.54	-	
Clorpirifos-etil	15.07	111.58	-	158.76	111.3	500
Aldrin	15.21	49.61	-	-	-	20
Dieldrin	18.25	43.16	-	44.13	-	20
Chlordan (sumă de	16.99/ 17.37	91.21	-	-	96.44	
Endosulfan 1	17.39	-	41.30	40.05	-	100
Endosulfan 2	19.22	-	38.66	45.93	-	
Endosulfan sulfat	20.42	-	39.74	41.14	-	
Fludioxonil	17.76	92.75	72.62	-	-	50
p,p-DDE	18.08	44.51	-	-	46.3	500
Endrin	18.83	45.76	42.37	41.07	47.12	100
p,p-DDT	20.63	-	38.76	42.57	-	500
Propargit	21.20	-	-	-	90.75	50
Bifentrin	22.29	67.44	-	-	-	100
Metoxiclor	22.40	45.44	-	49.66	47.82	100
Fenpropatrin	22.60	-	79.25	93.35	107.91	20
Cihalothrin lambda	24.15	-	-	17.89	26.99	1000
Ciflutrin (izomer)	26.65	-	139.87	-	161.48	100
Cipermetrin	27.26	195.34	-	183.61	-	100
Flucitrinate	27.63	44.21	-	44.53	50.23	50
Fenvalerate	29.15	-	77.92	74.82	86.91	100
tau-Fluvalinat	29.25	48.89	-	-	-	10
Deltamethrin	30.20	132.11	84.49	82.85	-	15000

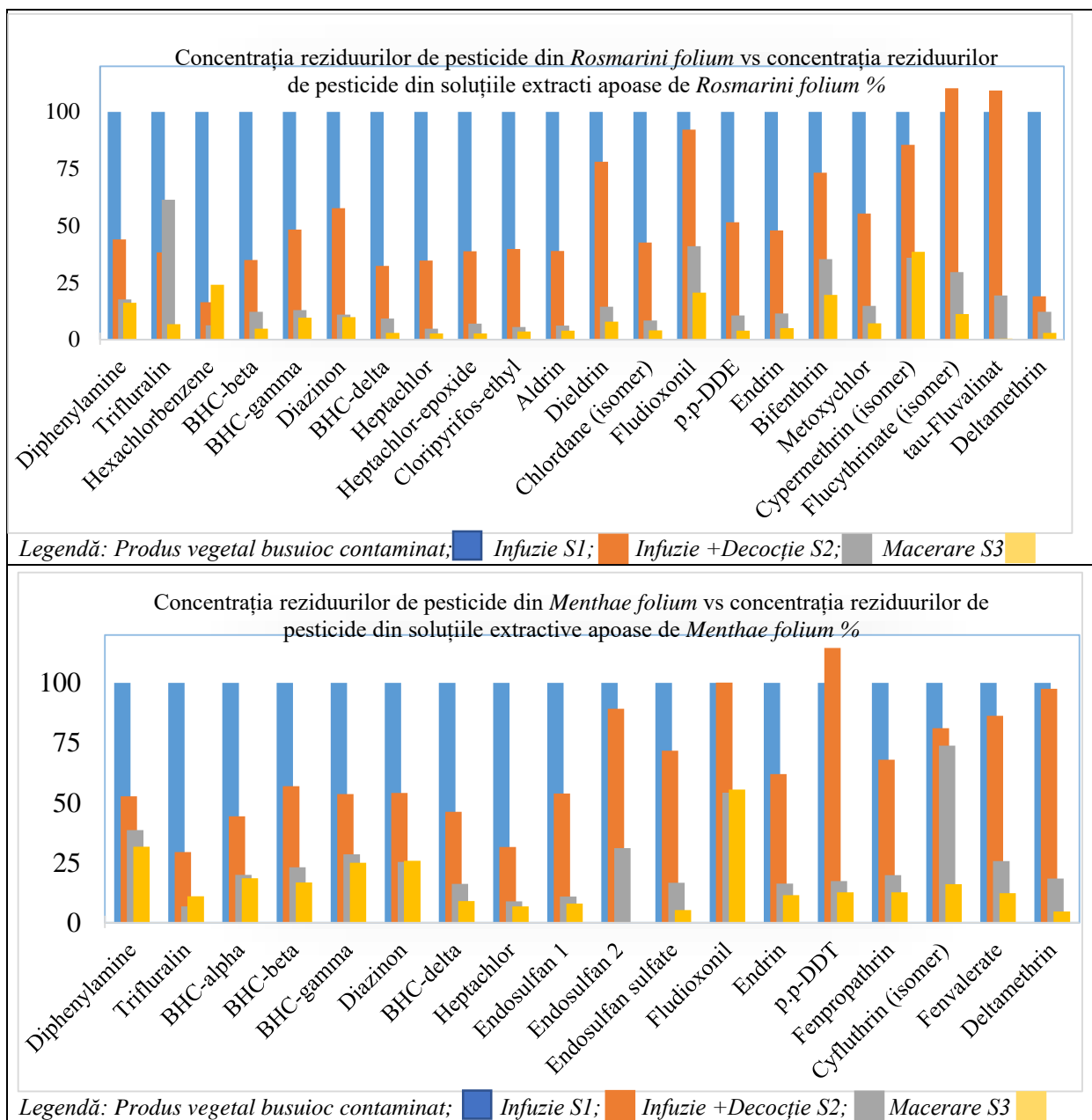
Soluțiile extractive apoase au fost preparate în 3 moduri după cum urmează:

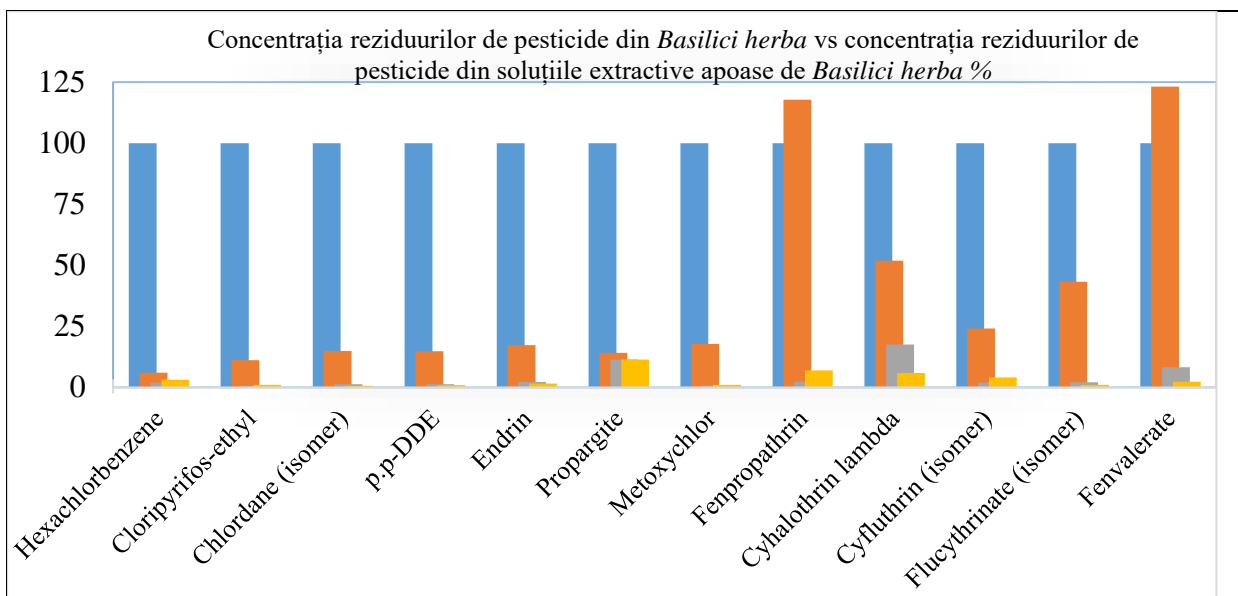
1) infuzie în apă caldă 15 min (peste materia primă vegetală se pune apă fiartă și se lasă la infuzat timp de 15 minute)- notată **S1**;

2) infuzie în apă caldă 15 min urmată de decoctie 30 min la 70°C (peste materia primă vegetală se pune apă fiartă, se lasă la infuzat 15 minute după care cu ajutorul unei plite se pune la decoctie (70 °C) timp de 30 de minute)- notată **S2**;

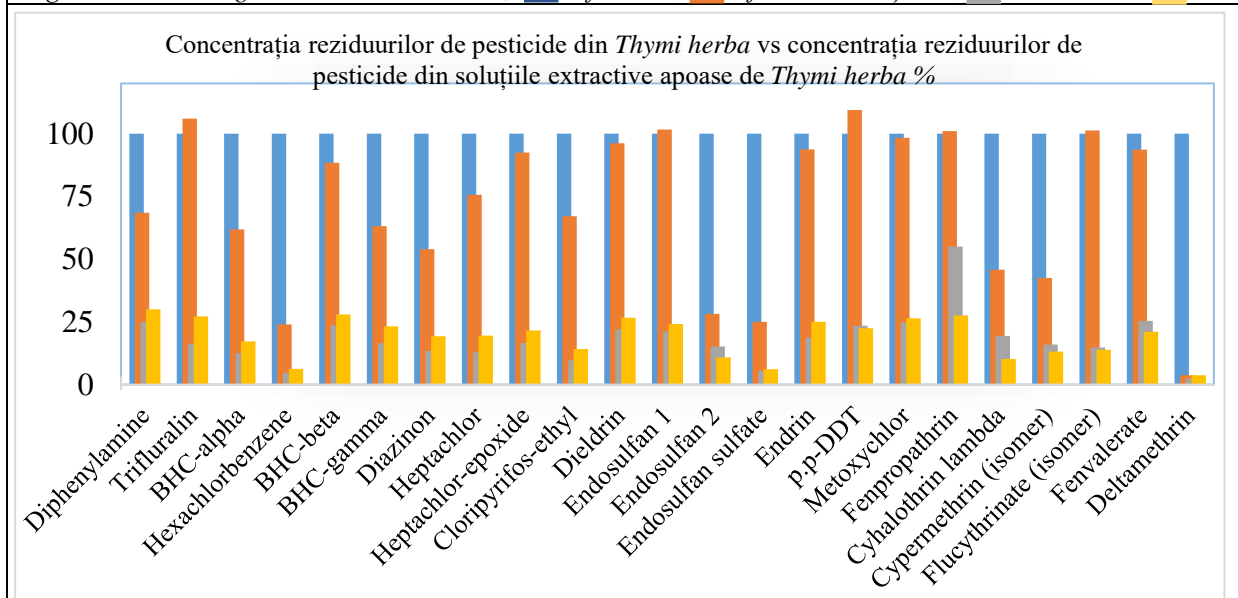
3) macerare la rece timp de 12 ore (produsul vegetal se lasă în apă rece timp de 12 ore)-notată S3.

După aplicarea proceselor de preparare a soluțiilor extractive apoase transferul reziduurilor de pesticide din materiile prime contaminate au fost variate, explicabile datorită proprietăților fizico-chimice dar și compoziției materiei prime vegetale.





Legendă: Produs vegetal busuioc contaminat; Infuzie S1; Infuzie +Decocție S2; Macerare S3



Legendă: Produs vegetal busuioc contaminat; Infuzie S1; Infuzie +Decocție S2; Macerare S3

Prin prepararea infuziilor clasice, recomandate de majoritatea producătorilor de ceaiuri medicinale, cantitatea de reziduuri de pesticide difuzată, este în unele cazuri, aproape de valoarea nominală dozată din produsele vegetale contaminate. În soluțiile extractibile, obținute prin infuzare, urmată de decoctia la cald (S2), cantitatea de pesticide regăsite scade pentru marea majoritate sub 50%. În cazul macerării la rece, cantitatea de pesticide scade semnificativ, regăsindu-se în unele cazuri sub 20%.

Metale grele

În acest scop au fost selectate plantele vegetale uscate, de tip ceai: rozmarin-5 (rozmarin uscat din plicuri de ceai), mentă-5 (mentă uscată din plicuri de ceai), busuioc-5 (busuioc uscat din plicuri de ceai), cimbru (cimbru uscat din plicuri de ceai).

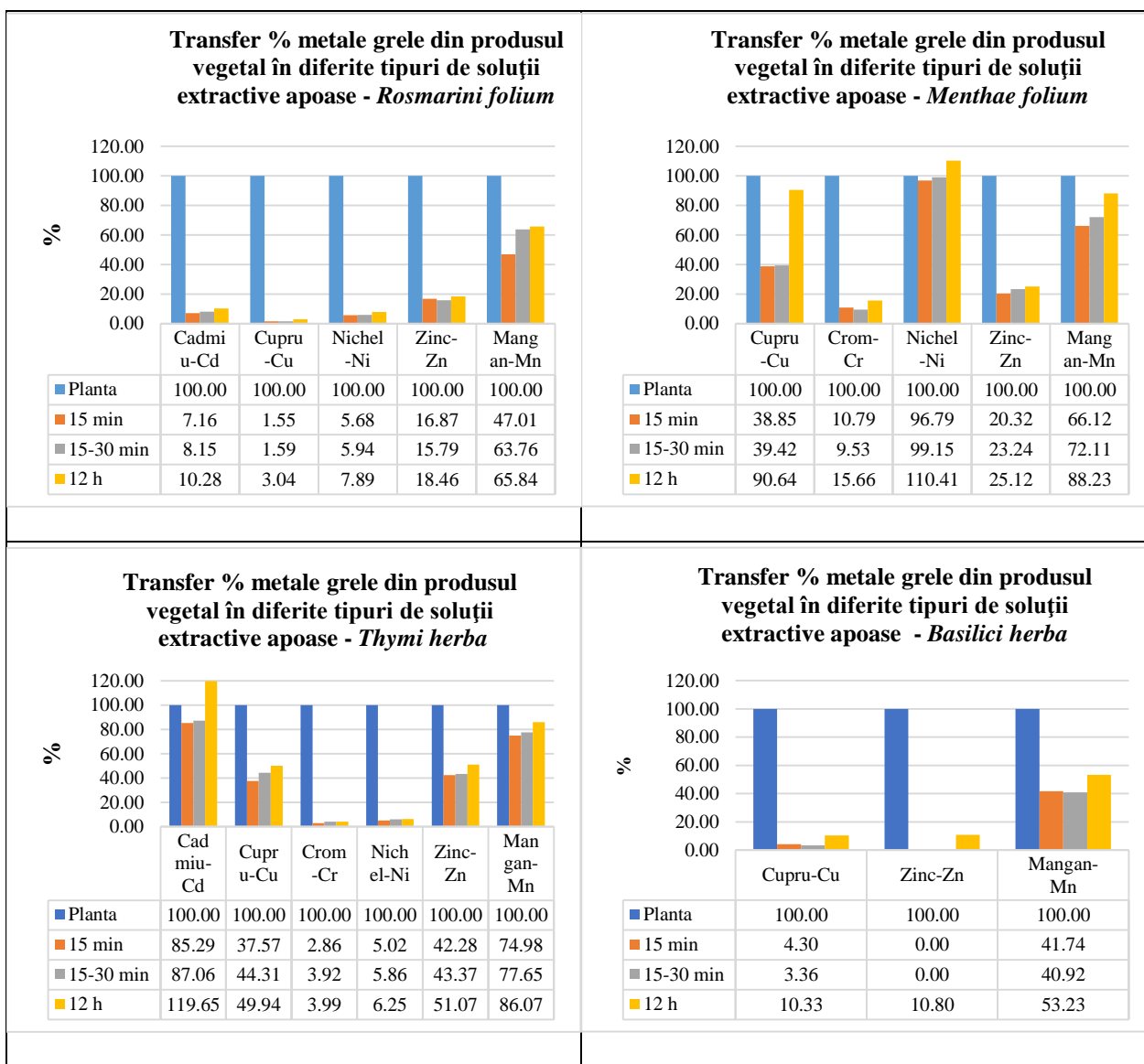
Element	<i>Rosmarini folium</i> mg/kg	<i>Menthae folium</i> mg/kg	<i>Thymi herba</i> mg/kg	<i>Basilici herba</i> mg/kg	MRL mg/kg
Cd	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05
Cu	12.9 ± 1.8	5.4 ± 1.8	8.4 ± 1.8	4.5 ± 1.8	2
Cr	2.5 ± 0.3	1.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.5
Pb	1.5 ± 0.2	2.3 ± 0.2	2.9 ± 0.2	3.6 ± 0.2	0.1
Ni	1.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1	15.9 ± 0.1	2.2 ± 0.1	N.A.
Zn	24.9 ± 2.2	30.5 ± 2.2	45.2 ± 2.2	23.6 ± 2.2	N.A.
Mn	34.6 ± 3.1	30.2 ± 3.1	59 ± 3.1	14.3 ± 3.1	N.A.

Cele mai multe dintre elementele analizate, sunt peste limitele maxime impuse (Cu, Cr, Cd, Pb), reprezentând astfel un risc major în consumul acestor materii prime. Dintre elementele dozate, Pb și Cd sunt cel mai frecvent asociate cu otrăvirea cu metale grele. De asemenea, s-a urmărit gradul de transfer a metalelor grele în soluțiile extractive apoase (infuzii, macerări sau extracții combinate).

Soluții extractibile apoase		Elemente analizate						
		Cr ng/mL	Cu ng/mL	Pb ng/mL	Ni ng/mL	Cd ng/mL	Zn ng/mL	Mn ng/mL
<i>Rosmarini folium</i>	S1	< 0.1	4	<0.5	1.3	0.1	83.9	325
	S2	< 0.1	4.1	<0.5	1.4	0.1	78.6	440.8
	S3	< 0.1	7.8	<0.5	1.8	0.2	91.9	455.2
<i>Menthae folium</i>	S1	2.4	41.7	<0.5	40.9	< 0.05	< 50	398.7
	S2	2.1	42.3	<0.5	41.9	< 0.05	123.8	434.9
	S3	3.5	157.4	<0.5	46.6	< 0.05	141.5	532.1
<i>Thymi herba</i>	S1	1.8	63	<0.5	16	0.6	382.3	884.2
	S2	2.5	74.3	<0.5	18.7	0.6	392.2	915.7
	S3	2.49	83.7	<0.5	19.9	0.8	461.8	1015.1
<i>Basilici herba</i>	S1	< 0.1	3.9	<0.5	< 0.1	< 0.05	< 50	119.6
	S2	< 0.1	3.1	<0.5	< 0.1	< 0.05	< 50	117.2
	S3	< 0.1	9.4	<0.5	< 0.1	< 0.05	51.1	152.5

Rata cea mai mare de transfer, în cazul soluțiilor extractibile o reprezintă manganul-Mn cu o rată cuprinsă între 41.74-88.23%, restul elementelor fluctuând după cum urmează: Ni, s-a observat un transfer ridicat în toate soluțiile apoase preparate pentru matricea de mentă, iar pentru celelalte

tipuri de matrici transferul a fost sub 8%; transferul ridicat al Cu pentru soluția apoasă S3 din mentă, pentru celelalte specii variind de la 1.6% (rozmarin S1) până la 49.9% (cimbru S3); Cd a fost transferat aproape în totalitate pentru matricea de cimbru soluțiile S1, S2, S3 și sub 11% în cazul rozmarinului; pentru celelalte specii concentrația elementului a fost sub LOQ; Cr a difuzat foarte puțin în soluțiile apoase, transferul fiind sub 16% la toate speciile studiate; Zn a înregistrat un transfer ridicat de 51% pentru proba de cimbru S3, rezultatele experimentale arătând că modul de extracție nu influențează gradul de transfer pentru nici o specie analizată; nu au fost detectate urme de Pb în nici o probă extrasă, chiar dacă concentrația determinată în materiile prime au fost peste limite maxime admise.



5. CERCETĂRI ASUPRA COMPONENTELOR VOLATILE DIN MATERIILE PRIME VEGETALE ȘI STABILIREA RATEI DE TRANSFER ÎN DIFERITE TIPURI DE SOLUȚII APOASE

În capitolul 5, am determinat anumite componente active, cu acțiune terapeutică recunoscute (alfa-pinen, camfen, limonen, eucaliptol, linalool, mentol, borneol, terpinen-4-ol, alfa terpineol, bisabolol) din materiile prime selectate (rozmarin, mentă, cimbru și busuioc). De asemenea, am evaluat gradul de transfer a componentelor active în soluții extractive apoase.

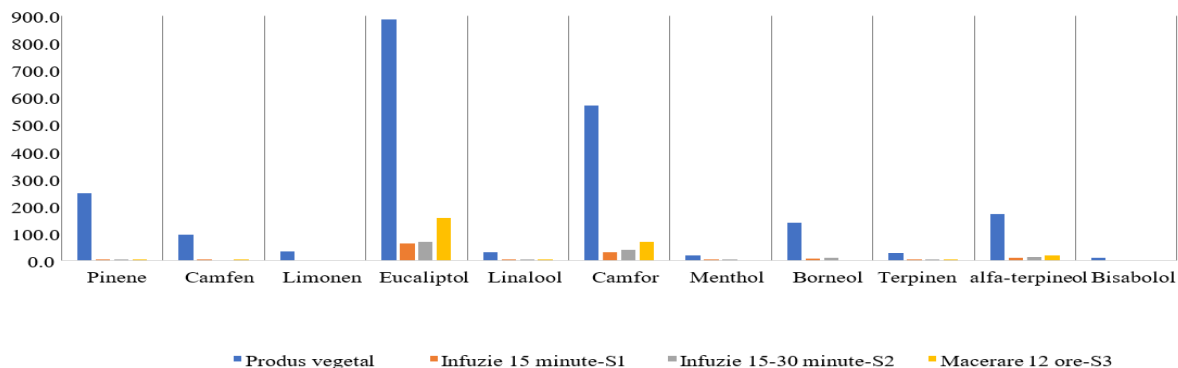
Din datele experimentale obținute, putem remarca gamă mare de concentrații ale componentelor volatile în cazul probei de rozmarin (pinen 24.6 $\mu\text{g/kg}$, 88.4 $\mu\text{g/kg}$ cineol / eucaliptol, 56.8 $\mu\text{g/kg}$ camfor, 17 $\mu\text{g/kg}$ alfa-terpineol), de mentă (mentolul a fost cel care s-a evidențiat cel mai mult 74.8 $\mu\text{g/kg}$, în comparație cu ceilalți analiți), busuioc (cineol 35.9 $\mu\text{g/kg}$, linalool 51.2 $\mu\text{g/kg}$, restul valorilor fiind sub 11 $\mu\text{g/kg}$), cea mai puțin bogată în componente volatile fiind cimbru, unde cea mai mare valoare determinată a fost pentru alfa-terpineol de 3.4 $\mu\text{g/kg}$.

Denumire compus	Rozmarin ($\mu\text{g/kg}$)	Menta ($\mu\text{g/kg}$)	Busuioc ($\mu\text{g/kg}$)	Cimbru ($\mu\text{g/kg}$)
Pinen	246.3	0.96	1.03	2.14
Camfen	92.4	2.93	3	3.07
Limonen	30.6	1.18	1.03	<LOQ
Eucaliptol	884.1	12.3	35.85	1.93
Linalool	29.8	1.55	51.20	2.58
Camfor	567.8	<LOQ	4.5	0.98
Mentol	16.8	74.84	1.84	<LOQ
Borneol	136.7	4.79	2.18	<LOQ
Terpinen-4ol	26.3	7.48	4.34	1.41
alfa-terpineol	170.1	4.47	10.75	3.38
Bisabolol	7.5	<LOQ	1.5	0.77

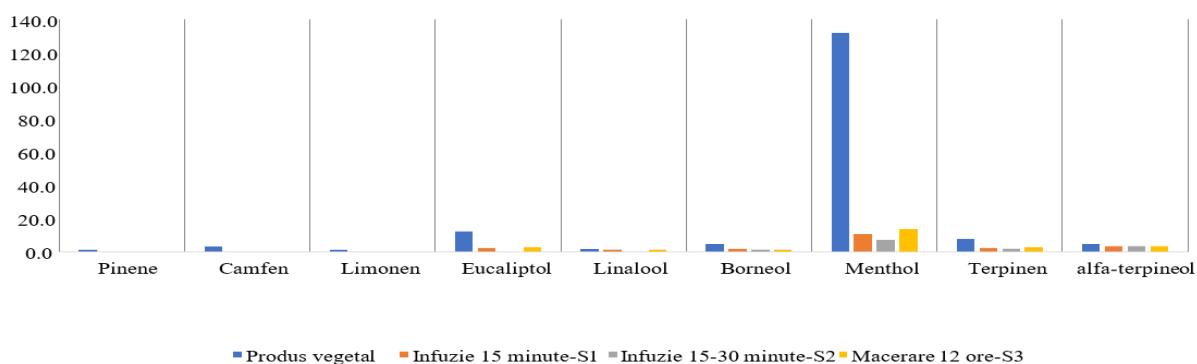
În cazul probelor extractibile de rozmarin, majoritatea concentrațiilor componentelor volatile au avut o ușoară tendință de creștere de la S1 către S3, excepție făcând camfenul și alfa-pinen. În analiza probelor extractibile de mentă, s-a observat un grad ridicat de transfer în cazul componentelor active de linalool (54.2% soluția S3, 58.1% soluția S3) și alfa-terpineol (66.4% soluția S1, 63.3% soluția S2 până la 69.6% soluția S3, aproape constantă în cele 3 soluții extractibile). Probele extractive de busuioc au prezentat 5 componente volatile transferabile, cea mai mare valoare cuantificabilă fiind în cazul compusului alfa-terpineol (28.4% soluția S3), fiind aproape constant în cele trei soluții apoase extractibile (de la 25.6% soluția S2- 28.4% soluția S3).

Probele extractibile de cimbru au prezentat doar patru componente active volatile, printre acestea remarcându-se eucaliptolul și alfa-terpineolul.

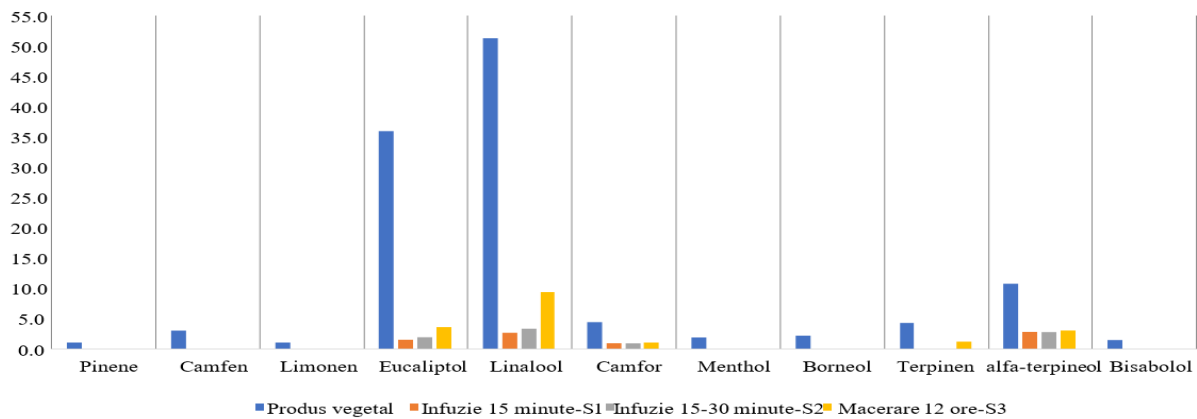
Transfer masic a componentelor active din produsul vegetal – *Rosmarini folium* în soluțiile extractive



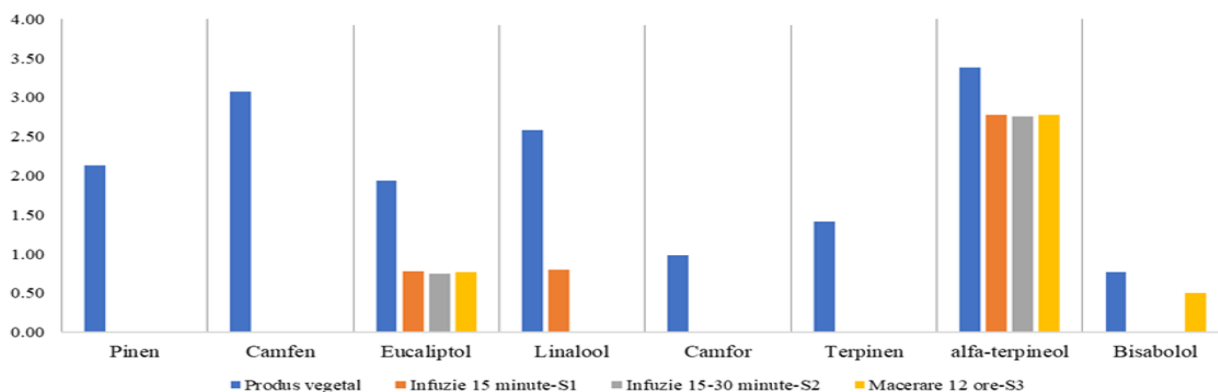
Transfer masic a componentelor active din produsul vegetal – *Menthae folium* în soluțiile extractive



Transfer masic a componentelor active din produsul vegetal – *Basilici herba* în soluțiile extractive apoase



Transfer masic a componentelor active din produsul vegetal – *Thymi herba* în soluțiile extractive apoase



Prin aplicarea metodelor de infuzare, anumite componente active volatile nu pot fi transferabile/difuzabile deoarece comportamentul acestora pot fi influențat de mai mulți factori.

6. STUDII DE MONITORIZARE ASUPRA REZIDUURILOR DE PESTICIDE DIN PROBA VEGETALĂ STOCATĂ DE MENTĂ

În capitolul 6, am monitorizat o gamă variată de pesticide (115 reziduuri de pesticide), din categoria organofosforice, triazinelor, organocloruratelor și altele, prin contaminarea voluntară în câmp deschis a unei culturi de mentă, crescută în regim propriu. Scopul primordial al acestui studiu, a vrut să evidențiere remanența reziduurilor de pesticide în produse vegetale stocate, ce pot fi ulterior folosite de către consumatori în diferite preparate terapeutice.

Proba de mentă contaminată a fost analizată la diferite intervale de timp (0 luni, 3 luni, 6 luni, 1 an, 2 ani, 3 ani, 4 ani), iar cuantificarea rezultatelor a fost realizată prin trasarea unei curbe într-un singur punct, prin compararea cu o probă de mentă blanc fortificată la nivelul LOQ. În funcție de clasa de pesticide analizată, anumite reziduuri se regăsesc în compoziția produsului vegetal și după 4 ani de studiu. Gradul de remanență a reziduurilor de pesticide în timpul stocării variază în mare măsură, de numeroși factori. Reziduurile de pesticide din categoria organofosforicelor tind să se degradeze rapid în contact cu lumina și aerul, unele dintre ele prezentând o volatilitate ridicată, reducând persistența acestora după aplicare. Pesticidele din clasa piretrinelor prezintă o remanență ridicată, la fel ca și reziduurile de pesticide din categoria organocloruratelor. De asemenea, conținutul scăzut de umiditate din produsul vegetal poate favoriza conservarea unor concentrații de pesticide. Nivelurile ridicate ale reziduurilor de pesticide rămase după terminarea experimentului, pot fi folosite ca referință pentru aprecierea gradului de remanență a acestora, în produse vegetale similare.

7. INVESTIGAREA CONȚINUTULUI DE PESTICIDE ÎN DIFERITE PROBE DE MENTĂ ȘI EFECTELE INDUSE LA NIVELUL CELULEI VEGETALE ȘI ANIMALE ÎN TESTE DE LABORATOR

În capitolul 7, am efectuat un studiu pentru a investiga dacă frunze de mentă pot fi considerate biomarkeri în stocarea reziduurilor de pesticide în diverse organe, ca o consecință a unei acumulări accidentale. De asemenea, au fost testate și alte tipuri de extracte (rozmarin și salvie) contaminate cu reziduuri de pesticide din clasa organofosforicelor.

O probă de mentă a fost contaminată cu o soluție mixtă de pesticide, folosită ulterior în prepararea unor extracte apoase de tip infuzii, care au fost administrate zilnic, prin gavaj, animalelor de laborator (șoareci NMRI). În cercetare am vizat și modificările induse de reziduurile de pesticide existente în probele vegetale asupra structurii morfologice și potențial anatomice în cazul frunzelor de mentă, determinarea citotoxicității prin biotestul *Daphnia*, și determinarea concentrației de SRO în diferite țesuturi.

Determinarea reziduurilor de pesticide din proba de mentă contaminată

Denumire pesticid	RT (min)	LOQ-plantă fortificată (μg/kg)	Mentă contaminată (μg/kg)	MRL Reg. EC 396/2005 (μg/kg)
Diphenylamine	10.88	20	195.82	50
Trifluralin	11.07	10	104.31	50
Chlorpropham	11.09	10	108.61	50
Sulfotep	11.18	10	27.77	10
BHC, Alpha	11.60	10	29.09	10
Hexachlorobenzene	11.70	10	76.70	20
Pentachloroanisole	11.79	10	69.00	10
BHC, Beta	12.12	10	29.64	10
Terbuthylazine	12.28	10	21.69	50
Diazinon	12.36	10	18.90	50
Pentachloroaniline	13.27	20	252.38	100
Tolclofos-methyl	13.68	10	111.40	50
Simetryn	13.77	10	21.53	10
Chlorpyrifos-ethyl	14.69	10	24.00	50
Chlorthal-dimethyl	14.85	10	92.53	50
Fenson	15.28	10	134.10	10
Chlordane gamma	16.58	10	27.80	20
Chlorfenson	17.30	10	141.31	100
Prothiofos	17.36	10	99.63	10
DDE p, p	17.64	10	23.97	500
Bromopropylate	21.85	10	102.44	50
Mirex	23.58	10	55.00	10

Cyfluthrin peak 1	26.18	8.15	96.50	
Cyfluthrin peak 2	26.39	11.68	139.47	
Cyfluthrin peak 3	26.49	8	92.43	100
Cyfluthrin peak 4	26.58	12.15	144.28	
Cypermethrin peak 1	26.79	13.58	185.62	
Cypermethrin peak 2	27.00	18.91	272.74	
Cypermethrin peak 3	27.09	7.78	106.67	100
Cypermethrin peak 4	27.19	9.73	135.58	
Etofenprox	27.38	10	97.46	50

Materia primă contaminată a fost folosită zilnic în prepararea extracțiilor apoase de tip infuzii, și administrată la loturi de animale aflate în studiu, pentru a evalua gradul de asimilare a pesticidelor în anumite țesuturi și în ser. În paralel a fost utilizată o proba de mentă martor, ce ne va ajuta în corelarea rezultatelor și pentru a observa dacă există diferențe statistice între loturile testate.

Datele au arătat că o parte din reziduurile de pesticide din produsul vegetal contaminat au fost transferate în procesul de infuzare, rămânând oarecum constante pe perioada de administrare. Anumite pesticide nu au fost identificate în soluțiile apoase (izomerii ciflutrin și cipermetrin, trifluralin, alfa-BHC), probabil degradate în procesul de preparare; degradarea acestora sau alte fenomene de tip fizico-chimice (afinitate) au condus, probabil la pierderea sau la nedetectarea concentrațiilor respective.

Evaluarea modificărilor morfologice și anatomice la Menthae folium

S-au observat inducerea următoarelor modificări morfologice și anatomice la frunzele provenite din loturile intoxicate: modificări ale bazei frunzei; zone cu depigmentări circulare, dominante în zona mezofilului; numeroși peri tectori viguroși evidenți pe toată suprafața frunzei. În probele martor se observă abundența perilor glandulari, fără modificări de formă sau de abundență a perilor tectori dezvoltăți.

Evaluarea citotoxicității prin intermediul testului Daphnia magna

După 24 de ore de expunere, toate pesticidele au prezentat o toxicitate semnificativă asupra D. magna. Deltamethrin, Cypermethrin și Diazinon au indus o letalitate de 100% chiar și la cea mai mică doză testată. După 48 de ore de expunere, cu excepția Fludioxonil și Diphenylamine, toate pesticidele prezintă letalitate de 100%, la toate concentrațiile testate. Nu au fost observate diferențe statistice între efectul biologic indus de extractele fără pesticide și cele tratate cu pesticide.

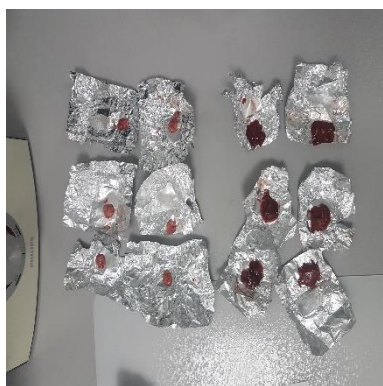
Valorile precise ale CL50 la 48 de ore au arătat concentrații semnificativ scăzute pentru toate pesticidele testate, cu excepția Diphenylamine.

Evaluarea efectului extractului de mentă contaminat cu organosfosforice asupra comportamentului locomotor și a coordonării motorii

S-a observat scăderea semnificativă a activității motorii față de inițial pentru lotul martor și pentru animalele tratate cu extracte vegetale în următoarele zile de testare (fapt datorat scăderii curiozității și dorinței de investigare a incintei de testat); pentru animalele tratate cu extracte vegetale de salvie și de mentă, scăderea activității motorii pe orizontală și verticală este mai accentuată față de martor după 28 zile de administrare. Scăderea activității motorii verticale este semnificativă statistic față de martor pentru cele două extracte menționate; pentru animalele tratate cu extract de rozmarin se constată o scădere mai redusă a activității motorii, ceea ce indică un ușor efect stimulant (deși nu se obține semnificație statistică); în cazul administrării extractelor contaminate, animalele prezintă un comportament motor și un grad de coordonare motorie similar cu cel al grupelor de control; dacă ne referim strict la proba de mentă, o posibilă explicație ar putea fi aceea că anumiți compuși bioactivi solubili în apă sunt capabili să inhibe și să protejeze împotriva toxicității sistemice a pesticidelor; un alt aspect de luat în considerare este durata limitată a studiului, de aproximativ 28 de zile (de regulă un astfel de test se efectuează pe o durată mai îndelungată).

Evaluarea gradului de acumulare a reziduurilor de pesticide în ser și organe

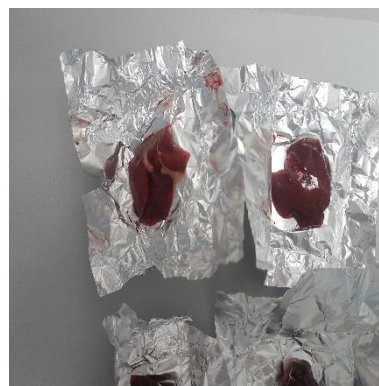
În decursul experimentelor, datele obținute au fost conflictuale, observându-se reziduuri de pesticide și în probele martor (lot șoareci tratat cu infuzie din probă vegetală necontaminată). Nu s-a putut face o corelare exactă a rezultatelor, deoarece în anumite probe martor (plasmă, ficat, creier), răspunsul reziduurilor de pesticide au fluctuat, identificându-se semnale similare sau chiar peste cele din probele contaminate cu pesticide (plasmă, ficat, creier).



A



B



C



D



E



F

De aceea, probele analizate nu au putut fi cuantificate din punct de vedere al reziduurilor de pesticide, neștiind sursa contaminării. După o investigație amănunțită am constatat faptul că, peletele de cereale cu care animalele se hrăneau zilnic, conțineau reziduuri de pesticide. Fiecare grup de șoricei primea zilnic aceeași cantitate de hrană 40g/zilnic/grup.

Chiar dacă nu am putut corela acumularea reziduurilor de pesticide prin hrănirea loturilor testate, cu infuziile de mentă contaminate, putem concluziona faptul că anumite reziduuri de pesticide se pot regăsi accidental în produsele alimentare. Numărul mare de reziduuri identificate în peletele de cereale pot fi explicate prin concentrarea acestora din diverse surse de cereale.

Determinarea concentrației speciilor oxigen reactive (SRO) din extractele vegetale, prin metoda bioluminescenței cu luminol

Extractele vegetale studiate sunt active la nivelul sistemului nervos central, demonstrând un tropism deosebit pentru țesutul cerebral. Astfel, aceste extracte au relevat o activitate antioxidantă cerebrală importantă, comparativ cu efectul observat la nivel hepatic. Nivelul speciilor oxigen reactive (SRO) a crescut semnificativ în țesutul hepatic al animalelor studiate, ceea ce relevă o posibilă metabolizare hepatică a extractelor vegetale, la metaboliți cu efect marcat pro-oxidant (intrinsec sau de modulare a sistemelor redox endogene). Țesuturile cele mai expuse la stres oxidativ sunt ficatul (compartimentul de metabolizare a extractelor studiate) și creierul (permeabilitatea barierei hematoencefalice de traversare a extractelor vegetale).

În ceea ce privește stresul oxidativ, s-a constatat că există un tropism deosebit pentru țesutul cerebral, activitate antioxidantă cerebrală importantă, comparativ cu efectul observat la nivel hepatic. Nivelul speciilor oxigen reactive (SRO) a crescut semnificativ în țesutul hepatic, ceea ce relevă o posibilă metabolizare hepatică a extractelor vegetale, la metaboliți cu efect marcat pro-oxidant (intrinsec sau de modulare a sistemelor redox endogene).

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

În urma studiilor efectuate, se pot desprinde următoarele concluzii:

- s-a dezvoltat, validat și stabilit un protocol experimental de extracție și de analiză multireziduu de identificare și cuantificare a 115 pesticide din matrici vegetale complexe, folosind ghidului Sante;
- s-a dezvoltat un protocol experimental de lucru pentru identificarea și cuantificarea metalelor grele din matrici complexe de origine vegetală (plante medicinale);
- în decursul anilor de studiu am analizat numeroase produse vegetale provenite din specii indigene și exogene (*Lavandulae flores*, *Hederae folium*, *Oleae folium*, *Hippophae fructus*, *Basilici herba*, *Origani herba*, *Menthae folium*, *Chamomillae flores*, *Bardanae radix*, *Calendulae flores*, *Plantaginis folium*, *Fragariae viridis fructus*, *Cerasorum stipites*, *Camellia sinensis*, etc.), în care am identificat și cuantificat reziduuri de pesticide, cu concentrații peste >MRL-ul stipulate de Regulamentul UE 369/2005;
- am studiat și evaluat comportamentul reziduurilor de pesticide în diverse produse vegetale (*Menthae folium*, *Rosmarini folium*, *Basilici herba* și *Thymi herba*) recoltate de la specii indigene, contaminate cu o soluție mixtă de concentrație cunoscută. În funcție de compoziția matricii vegetale, aceasta poate reține sau nu anumite reziduuri de pesticide, ceea ce poate explica și contaminarea neuniformă a produselor vegetale studiate și dispariția anumitor compuși;
- am urmărit gradul de transfer al diferitelor tipuri de pesticide și metale grele în soluții extractive apoase, plecând de la premisa că este cea mai uzuală metode de administrare pentru pacient;
- în infuziile clasice (S1), recomandate de majoritatea producătorilor de ceaiuri medicinale, cantitatea de reziduuri de pesticide difuzată, este în unele cazuri, aproape de valoarea nominală dozată din produsele vegetale contaminate.
- în cazul soluțiilor extractive obținute prin infuzare, urmată de decoctia la cald (S2), cantitatea de reziduuri de pesticide scade pentru marea majoritate sub 50%;
- în cazul macerării la rece (S3), cantitatea de reziduuri de pesticide scade semnificativ, regăsindu-se în unele cazuri sub 20%;
- rata cea mai mare de transfer, în cazul soluțiilor extractibile o reprezintă manganul-Mn cu o rată cuprinsă între 41.74-88.23%. Cu cât timpul de contact dintre produsul vegetal și

soluția extractibilă este mai mare, cu atât rata de transfer/difuzia metalelor crește (rozmarin Mn 47.01-65.84%; mentă Mn- 66.12-88.23%; cimbru Mn- 74.98-86.07%; busuioc Mn- 41.74-53.23%);

- în cazul Pb, nu se observă difuzia acestuia în nici o soluție extractivă, cu toate că în analiza cantitativă a materilor prime (*Menthae folium*, *Rosmarini folium*, *Basilici herba*, *Thymi herba*) au fost determinate concentrații peste limita maximă permisă;
- pentru Ni, s-a observat un transfer ridicat (aproape de valoarea nominală teoretică) în toate soluțiile apoase pentru matricea de mentă, iar pentru celelalte tipuri de matrici transferul a fost sub 8%;
- transferul ridicat al Cu a fost înregistrat pentru soluția apoasă S3 din mentă, pentru celelalte variind de la 1.6% (rozmarin S1) până la 49.9% (cimbru S3);
- Cd a fost transferat aproape în totalitate pentru matricea de cimbru soluțiile S1, S2, S3 și sub 11% în cazul rozmarinului; pentru celelalte specii concentrația elementului a fost sub LOQ;
- Cr a difuzat foarte puțin în soluțiile apoase, transferul fiind sub 16% la toate speciile studiate;
- Zn a înregistrat un transfer ridicat de 51% pentru proba de cimbru S3, rezultatele experimentale arătând că modul de extracție nu influențează gradul de transfer pentru nici o specie analizată;
- în urma analizei componentelor volatile conținute de produsele vegetale s-a constatat următoarele:
 - *Rosmarini folium*: varietatea concentrațiilor componentelor volatile pinen 24.6 μg/kg, 88.4 μg/kg cineol / eucaliptol, 56.8 μg/kg camfor, 17 μg/kg alfa-terpineol;
 - *Menthae folium*: mentolul a fost cel care s-a evidențiat cel mai mult 74.8 μg/kg;
 - *Basilici herba*: eucaliptol 35.9 μg/kg, linalool 51.2 μg/kg, restul valorilor fiind sub 11 μg/kg;
 - *Thymi herba*: cea mai puțin bogată în componente volatile, cea mai mare valoare determinată a fost pentru alfa-terpineol de 3.4 μg/kg;
- transferul componentelor volatile în soluțiile extractibile apoase au variat concluzionând următoarele aspecte:

- natura materiei prime vegetale studiate poate ceda sau nu anumite componente de natură organică, influențând transferul compușilor de interes;
 - datorită volatilității ridicate ale componentelor studiate, acestea se pot degrada și volatiliza prin transformarea sub formă de vapori;
 - afinitatea sau anumite proprietăți ale componentelor volatile nu sunt compatibile cu mediul apos;
- s-a studiat impactul și gradul de remanență a reziduurilor de pesticide pe produse vegetale stocate, pe o perioadă de 4 ani. Reziduurile de pesticide din categoria organofosforicelor tind să se degradeze rapid în contact cu lumina și aerul, unele dintre ele prezentând o volatilitate ridicată, reducând persistența acestora după aplicare. Pesticidele din clasa piretrinelor prezintă o remanență ridicată, la fel ca și reziduurile de pesticide din categoria organocloruratelor. De asemenea, conținutul scăzut de umiditate din produsul vegetal poate favoriza conservarea unor concentrații de pesticide;
 - anumite reziduuri de pesticide pot induce modificări morfologice și anatomice în anumite tipuri de organe;
 - nu au fost observate diferențe statistice între efectul biologic indus de extractele fără pesticide și cele tratate cu pesticide, asupra *Daphnia magna* în intervalul de 24 de ore, în schimb reziduurile de pesticide folosite ca atare au indus o letalitate de 100%, chiar și la cea mai mică doză testată;
 - scăderea semnificativă a activității motorii asupra animalelor de laborator, prin afectarea sistemului nervos central;
 - prezența reziduurilor de pesticide în plasmă, creier și ficat, denotă potențiale efectele toxice induse de acestea ca o consecință a acumulărilor de la acest nivel;
 - inducerea stresului oxidativ în anumite tipuri de țesuturi este corelat cu conținutul de pesticide.

Bibliografie selectivă

1. Sofowara A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines: AJTCAM*, 10(5), 210-229, 2013
2. Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2(3), 251-286, 2015
3. WHO. WHO global report on traditional and complementary medicine. *Organizația Mondială a Sănătății*, 1-228, 2019 from <https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/WhoGlobalReportOnTraditionalAndComplementaryMedicine2019.pdf>
4. Horsak RD, Bedient PB, Hamilton MC, Thomas FB. Pesticides. *Environmental Forensics*, 143-165, 1964
5. Pimentel D. Evolutionary and Environmental Impact of Pesticides. *BioScience*, 21(3), 109-109, 1971
6. Bertomeu-Sanchez JR. Introduction. Pesticides: Past and Present. *HoST- Journal of History of Science and Tehnology*, 13(1), 1-27, 2019
7. Popp J, Peto K, Nagy J. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33, 243-255, 2013
8. Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, Kohli S, Yadav P, Bali AS, Parihar RD, Dar OI, Singh K, Jasrotia S, Bakshi P, Ramakrishnan M, Kumar S, Bhardwaj R, Thukral. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11), 2019
9. Erhirhie EO, Ihekwereme CP, Ilodigwe EE. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdisciplinary Toxicology*, 11(1), 5-12, 2018
10. Dawson A, Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Gawarammana I, Bowe S, Manuweera G, Buckley N. Acute Human Lethal toxicity of Agricultural Pesticides: A Prospective Cohort Study. *Plos Medicine*, 7(10), 2010
11. Rath N, Rasaputra K, Liyanage R, Huff G, Huff W. Dithiocarbamate Toxicity- An Appraisal. *Pesticides in the Modern World- Effects of Pesticide Exposure*, 323-340, 2011
12. VoPham T, Bertrand K, Hart J, Laden F, Brooks M, Yuan JM, Talbott E, Ruddell D, Chang CC, Weissfeld J. Pesticide exposure and liver cancer: a review. *Cancer Causes Control*, 28(3), 177-190, 2017
13. Jayaraj R, Megha P, Sreedev P. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, 9(3-4), 90-100, 2016
14. Heys K, Shore R, Pereira G, Martin F. Levels of Organochlorine Pesticides Are Associated with Amyloid Aggregation in Apex Avian Brains. *Environmental Science & Technology*, 51, 8672-8681, 2017
15. Pereira VS, Cunha JPAR, Morais TP, Ribeiro-Oliveira JP, Morais JP. Physical-chemical properties of pesticide: Concepts, applications, and interactions with the environment. *Bioscience Journal*, 32(3), 627-641, 2016
16. Peana M, Zoroddu MA, Medici S, Nurchi V, Criponi G, Aaseth J. The Essential Metals for Humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195, 120-129, 2019
17. Engwa GA, Ferdinand PU, Friday NN, Unachukwu. Chapter: Mechanism and Health Effects of Heavy Metals Toxicity in Humans. *InterchOpen*, 1-23, 2019

18. Kim JJ, Kim YS, Kumar V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 226-231, 2019
19. Jan A, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq Q. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29592-29630, 2015
20. Liang G, Pan L, Liu X. Assessment of Typical Heavy Metals in Human Hair of Different Age Group and Foodstuffs in Beijing, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(8), 2019
21. Nowak B, Kozłowski H. Heavy Metals in Human Hair and Teeth. *Biological Trace Element Research*, 62(3), 213-228, 1998
22. Wolfsperger M, Hauser G, Göbller W, Schlagenhafen C. Heavy metals in human hair samples from Austria and Italy: influence of sex and smoking habits. *Science of The Total Environment*, 156(3), 235-242, 1994
23. Nessa F, Khan SA, Shawish A. Lead, Cadmium and Nickel Contents of Some Medicinal Agent. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(1), 111-119, 2016
24. Li X, Qian P. Identification of an exposure risk to heavy metals from pharmaceutical-grade rubber stoppers. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 723-730, 2017
25. Official Journal of the European Union. Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation (EC) No 1881/2006, 2006 from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32006R1881>
26. Codex Stan 193-1995 FAO Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed, 1-44, 1995
27. GB 2762-2017. National Food Safety Standard of Maximum Levels of Contaminants in Food, 2017
28. Ferencz L, Balog A. A Pesticide Survey in Soil, Water and Foodstuffs from Central Romania. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 5(1), 111-118, 2010
29. Dirtu AC, Cernat R, Dragan D, Mocanu R, Van Grieken R, Neels H, Covaci A. Organohalogenated pollutants in Human Serum from Iassy, Romania and their Relation with Age and Gender. *Environment International*, 32(6), 797-803, 2006
30. Rusu L, Harja M, Suteu D, Dabija A, Favier L. Pesticide Residues Contamination of Milk and Dairy Products. A Case Study: Bacau District Area, Romania. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 17(3), 1229-1241, 2016
31. Briffa J, Sinagra E, Blundell R. Heavy Metal Pollution in the Environmental and their Toxicological Effects on Humans. *Heliyon*, 6(9), 2020
32. Vrînceanu N, Motelica DM, Dumitru M, Gament E, Toti M, Tanase V, Preda M. Estimation of Some Heavy Metals Accumulation in Plants and Soils from Copsa Mica Area. *Scientific Papers, USAMV Bucharest, Series A (LII)*, 76-81, 2009
33. Barbes L, Barbulescu A. monitoring and Statistical Assesment of Heavy Metals in Soil and Leaves of Populus Nigra L., *Environmental Enhineering and Management Journal*, 16(1), 187-196, 2017
34. Radulescu C, Stihl C, Popescu I, Ionita I, Dulama ID, Chilian A, Bancuta OR, Chelarescu ED, Let D. Assessment of Heavy Metals Level in some Perennial Medicinal Plants by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Romanian Reports in Physisc*, 65(1), 246-260, 2013
35. Ghidul SANTE 12682/2019. ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND

FEED, Supersedes Document No. SANTE/2017/11813. Implemented by 01/01/2020 link: https://ec.europa.eu/food/system/files/2020-01/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf

36. Zhuykova TV, Bezel VS, Zhuykova VA, Chankina OV, Kutsenogy KP. Chemical Elements in the Mineralization of Plant Residues under Pollution with Heavy Metals. *Contemporary Problems of Ecology*, 6(2), 213-222, 2013
37. Kebir T, Bouhadjera K. Effects of Heavy Metals Pollution in Soil and Plant in the Industrial Area, West Algeria. *Journal of the Korean Chemical Society*, 55(6), 1018-1023, 2011
38. Husejnovic MS, Cilovic E, Dautovic E, Merima I, Dzambic A, Karabasic A, Beganovic M. Preparation of Samples for the Determination of Heavy Metals in Medical Plants. Conference: Proceeding of the Pharmacy Symposium Tuzla Canton, 3, 45-52, 2016
39. Wang J, Cheung W, Leung D. Determination of Pesticide Residues Transfer Rates (Percent) from Dried Tea Leaves to Brewed Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 966-983, 2014

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **Alexandru Mihai Florea**, Veronica Drumea, Roxana Andreea Nita, Adelina Bicu, Laura Olariu, Ligia Elena Dutu & Cerasela Elena Gird. Transfer rate of pesticide residues from medicinal plants in different types of extractive solutions (2020). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 102, 37-61, revistă indexată ISI, cu factor de impact **1.437**, ISSN: 0277-2248 (for Printed Edition) and ISSN: 1029-0486 (for Online Edition), link: <https://doi.org/10.1080/02772248.2020.1773466>
2. **Alexandru Mihai Florea**, Veronica Drumea, Roxana Andreea Nita, Laura Olariu, Teodora Costea & Cerasela Elena Gird. Investigation of pesticide residues and heavy metals content in various peppermint samples (2020). *Farmacia*, 68(4), 704-709, revistă indexată ISI, cu factor de impact **1.433**, ISSN: 2065-0019 (for the On-Line Edition) and 0014-8237 (for the Printed Edition), link: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2020.4.16>
3. **Alexandru Mihai Florea**, Veronica Drumea, Roxana Andreea Nita, Laura Olariu, Tartareanu Georgiana Oana & Cerasela Elena Gird. Transfer of some metals from medicinal plant used in phytotherapy, in different teas preparations (2021). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 103(2), 154-161, revistă indexată ISI, cu factor de impact **1.437**, ISSN: 0277-2248 (for Printed Edition) and ISSN: 1029-0486 (for Online Edition), link: <https://doi.org/10.1080/02772248.2021.1951732>

Articole publicate în reviste cotate BDI (Scopus)

1. Bicu Adelina, Veronica Drumea, Dan Eduard Mihaiescu, Bogdan Purcareanu, **Alexandru Mihai Florea**, Bogdan Trica, Gabriel Vasilievici, Sorin Draga, Emilia Buse & Laura Olariu. Application of FT-IR Classification Method in Silica-Plant Extracts Composites Quality Testing (2018). *Euroinvent-ICIR IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 374, revistă indexată BDI/Scopus, ISSN: 1757-8981 (for Printed Edition) and ISSN: 1757-899X (for Online Edition), link: doi:10.1088/1757-899X/374/1/012064
2. **Alexandru Mihai Florea**, Bogdan Purcareanu, Adelina Bicu, Veronica Drumea, Cerasela Elena Gird, Mihai Grigoroscuta, Dan Eduard Mihaiescu, Gabriel Vasilievici & Laura Olariu, Extraction of pesticide residues from plant extracts using regenerative MCM41 mesoporous materials (2019). *Euroinvent-ICIR IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 572, revistă indexată BDI/Scopus, ISSN: 1757-8981 (for Printed Edition) and ISSN: 1757-899X (for Online Edition), link: doi:10.1088/1757-899X/572/1/012008

Articole publicate în reviste neindexate

1. Veronica Drumea, Laura Olariu, Roxana Andreea Nita, Crina Kamerzan, **Alexandru Mihai Florea**. The Behavior of Some Pesticide Residues in Stored Medicinal Plants Samples (2018). *Chemistry Research Journal*, 3(6), 33-43, ISSN: 2455-8990

Lucrări comunicate la manifestări internaționale și naționale cu publicarea rezumatelor

1. **Mihai Alexandru Florea**, Veronica Drumea, Roxana Andreea Nita, Cerasela Elena Gird & Laura Olariu, Gas Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry Qualitative Determination of Pesticide Found in Tea Infusions (2017). *Waset Conference- World Academy of Science, Engineering and Technology*
2. Bogdan Purcareanu, Laura Olariu, **Alexandru Mihai Florea**, Bogdan Trica, Gabriel Vasilievici, Dan Eduard Mihaiescu. Mesoporous nanostructured silica support for sustained release of plant extracts in biomedical applications (2018). *International Conference on Nanosciences & Nanotechnology*

Participări la sesiuni de postere

1. **Mihai Alexandru Florea**, Cerasela Elena Gird, Roxana Andreea Nita, Laura Olariu. Determination of heavy metals content in different types of therapeutic products (2018). *Congres UMF Carol Davila, București, 7-9 iunie*, rezumat publicat în *Maedica. A Journal of Clinical Medicine*, Volume 13, Supplement, 2018, 24, ISSN: 2501-6903, ISSN-L: 2501-6903
2. **Mihai Alexandru Florea**, Cerasela Elena Gird, Veronica Drumea, Roxana Andreea Nita. Determinarea conținutului de pesticide în diferite tipuri de produse vegetale cu utilizare terapeutică (2017). Al 11-lea Congres Anual al Asociației medicale Române. București, 20-22 aprilie, 2017, rezumat publicat în *Revista Medicală Română*, ed. Medicală Amaltea, ISSN 1220-5478