

**UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN TIMIȘOARA**

**Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului**

**ORDODI LAURENTIU VALENTIN**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**STUDII PRIVIND ELABORAREA, PROIECTAREA ȘI  
REALIZAREA UNEI INSTALAȚII EXPERIMENTALE  
PENTRU EPURAREA REZIDUURILOR CITOSTATICE  
REZULTATE ÎN TRATAMENTELE ONCOLOGICE**

**Conducător științific:  
Prof. dr. ing. DELIA PERJU**

**2010**

**UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN TIMIȘOARA**

**Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului**

**ORDODI LAURENTIU VALENTIN**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Conducător științific:  
Prof. dr. ing. DELIA PERJU**

**2010**

# Cuprins

Introducere .....	1
Obiectivele lucrării .....	5
PARTEA GENERALĂ – Nivelul actual al cunoașterii .....	6
1. Metode electrochimice de transformare si/sau distrugere a poluanților ....	6
1.1. Generalități.....	6
1.2. Metode electrochimice de transformare si/sau distrugere a poluanților organici.....	7
1.2.1 Metode directe .....	7
1.2.2. Metode indirecte.....	9
2. Reactoare electrochimice cu densități de curent asimetric .....	11
2.1. Generalități.....	11
2.2. Modele de reactoare cu densități de curent asimetric utilizate în practică .....	14
3. Metode fizico-chimice de analiză a substanțelor organice .....	18
3.1. Metode spectrofotometrice .....	18
3.1.1. Generalități.....	18
3.1.2. Spectrofotometrul UV-VIS.....	20
3.1.3. Spectrofotometrul cu fluorescență .....	22
3.2. Metode cromatografice.....	23
3.2.1. Gaz cromatografia.....	24
3.2.2. Lichid cromatografia de înaltă performanță.....	29
4. Principii de chimioterapie antineoplazică. Elemente de farmacologia unor compuși citostatici.....	33
4.1. Melphalanul .....	35
4.2. Doxorubicina.....	37
4.3. Metotrexatul.....	40
4.4. Ciclofosfamida.....	42

4.5. Ifosfamida.....	44
5. Măsurarea și erorile de măsurare.....	47
5.1. Importanța și scopul teoriei erorilor de măsurare.....	47
5.2. Considerații generale privind procesul de măsurare.....	48
5.3. Caracteristicile mijloacelor de măsurare.....	53
5.4. Clasificarea și definirea erorilor.....	55
5.5. Estimarea valorii adevărate a unei mărimi măsurate.....	58
PARTEA EXPERIMENTALĂ.....	61
6. Microinstalația experimentală.....	63
6.1. Sistemul de pregătire a probei.....	64
6.2. Microreactorul electrochimic.....	69
6.3. Sistemul de automatizare.....	73
6.4. Funcționarea microinstalației experimentale.....	88
6.5. Testarea funcționării microinstalației experimentale.....	91
6.5.1. Evaluarea producției de clor liber.....	92
6.5.2. Eficiența epurării unor ape reziduale cu conținut de substanțe citostatice.....	101
6.5.2.1. Epurarea Melphalanului.....	103
6.5.2.2. Epurarea Doxorubicinei.....	115
6.5.2.3. Epurarea Metotrexatului.....	122
6.5.2.4. Epurarea Ciclofosfamidei.....	133
6.5.2.5. Epurarea Ifosfamidei.....	146
6.5.3. Studiul citotoxicității apelor reziduale sintetice epurate versus probele inițiale pentru citostaticele studiate.....	160
6.5.3.1. Studii de citotoxicitate pe culturi celulare .....	160
6.5.3.2. Studii de citotoxicitate in vivo pe animale de laborator.....	170
Lista reactivilor folosiți pentru determinările experimentale.....	173
Concluzii generale ale studiului.....	174
Contribuții personale.....	180
Bibliografie.....	183
Anexa.....	197

## Introducere

Progresele tehnologice spectaculoase din ultimele decenii precum și creșterea nivelului de trai și a speranței de viață, în special în zonele puternic industrializate ale lumii, s-au realizat cu prețul afectării drastice a mediului înconjurător.

Activitatea medicală, atât cea de diagnostic cât și în special cea de tratament, expune zi de zi atmosfera, apele și solul la acțiunea unor substanțe care în cantități mici nu au un efect poluant evident, dar care se acumulează în timp și pot duce la adevărate dezastre ecologice.

Cum evitarea poluării este practic imposibilă, ne rămâne alternativa prevenirii, reducerii și controlului strict al acestora [1,2].

Din fericire, această problemă a fost reconsiderată la nivel mondial, și în numeroase țări au fost adoptate legi severe privitoare la protecția mediului înconjurător.

Pe plan național, limitele admise pentru poluanți sunt reglementate prin Directiva 76/464, care impune controlul tuturor emisiilor de substanțe periculoase stabilite prin *Clear Water Act* din 1977. Normativele din România care reglementează limitele de încărcare cu poluanți sunt NTPA – 001/1997 și NTPA 002/2005 pentru resursele de apă și OMS 645/1997 pentru evacuarea apelor uzate în rețelele de canalizare [3,4].

Urmărind alinierea României la acest deziderat major al momentului, în lucrarea de față s-a dorit realizarea unui studiu aprofundat al metodelor electrochimice de protecție a mediului înconjurător față de deșeurile citotoxice rezultate în urma activităților medicale oncologice. Este cunoscut faptul că medicamentele antineoplazice, cunoscute sub denumirea generică de citostatice, au pe lângă activitatea antitumorală, o serie de efecte adverse deloc neglijabile printre care se numără proprietățile teratogene, mutagene și nu de puține ori chiar oncogeneza. Aceste efecte nedorite apar cel mai frecvent la pacienții care beneficiază de un astfel de tratament, însă nu trebuie omis faptul că prin eliminarea lor în mediul înconjurător odată cu deșeurile

provenite de la pacienți, precum și cantitățile de medicamente rămase neutilizate, se vor acumula în mediul înconjurător, producând profunde alterări ale ecosistemelor.

Tehnicile electrochimice de epurare a deșeurilor citotoxice oferă o serie de avantaje distincte față de cele uzuale cum este incinerarea [5,6]:

- **Compatibilitate cu mediul înconjurător:** “reactivul” folosit este electronul, un “reactiv” curat care de cele mai multe ori nu are nevoie de adaosuri chimice speciale.
- **Versatilitate:** Procesele electrochimice implică oxidări sau reduceri, directe sau indirecte, generând specii organice, anorganice sau biochimice. De cele mai multe ori produșii rezultați în urma proceselor de epurare electrochimică sunt lipsiți de efecte nocive asupra mediului înconjurător. În plus, se pot utiliza diverse forme și configurații de reactoare și electrozi; mai mult, același reactor cu modificări minore poate fi folosit pentru a epura diverși poluanți și de asemenea prin dimensionarea adecvată a instalațiilor se pot epura volume de ordinul fracțiunilor de mililitru până la sute sau mii de litri.
- **Eficiența energetică:** Procesele electrochimice necesită de cele mai multe ori condiții mult mai blânde de temperatură și presiune comparative cu metodele clasice : incinerarea și oxidarea supercritică. Tehnicile și tehnologiile care necesită temperaturi și presiuni scăzute, evident că implică un consum mult mai redus de energie. Potențialele aplicate pot fi ușor controlate și printr-o proiectare adecvată a celulelor și electrozilor se pot minimiza pierderile de curent și căderile de tensiune.
- **Siguranță:** Procesele electrochimice sunt sigure și aceasta datorită condițiilor blânde de operare cât și cantităților mici de substanțe chimice de adaos. De asemenea procesul poate fi întrerupt în orice moment fără a afecta în nici un fel siguranța operatorului.

- **Selectivitate:** Prin controlarea riguroasă a potențialului aplicat se asigură specificitatea reacțiilor și se evită ușor apariția unor compuși nedorți.
- **Posibilitatea automatizării:** În general instalațiile electrochimice se pretează foarte bine pentru automatizare, procesele putând fi ușor conduse cu calculatorul cu minima intervenție a operatorului uman.
- **Costuri reduse:** Echipamentele și operațiile sunt în general simple și relativ ieftine, și atunci când sunt corect proiectate, pot fi ușor modificate pentru alte procese și reacții [7,8,9,10].

În contextul celor prezentate anterior, prin prezenta teză de doctorat ne-am îndreptat atenția în direcția studierii posibilităților de elaborare, proiectare și realizare ca prototip de referință a unei microinstalații, care având performanțe bune să poată fi utilizată la epurarea deșeurilor rezultate din activitatea medicală oncologică.

Microinstalația realizată este în totalitate de concepție proprie fiind alcătuită din trei părți componente distincte: sistemul de pregătire al probei, microreactorul electrochimic și sistemul de automatizare împreună cu calculatorul de proces.

Cea mai importantă componentă este microreactorul electrochimic a cărui principiu de funcționare se pretează foarte bine scopului propus: favorizarea reacțiilor de oxidare anodică și generarea unor cantități de clor liber (acid hipocloros, hipocloriti și clor fizic dizolvat) cu un consum redus de electricitate și într-un timp cât mai scurt.

Microinstalația experimentală a fost testată atât din punct de vedere funcțional cât și al performanțelor tehnice legate de obiectivele propuse.

Pentru testarea microinstalației s-au utilizat următoarele metode:

- fizico – chimice
- matematice prin utilizarea tehnicilor de modelare statistică
- biologice prin utilizarea tehnicilor de culturi celulare și experimentelor pe animale de laborator.

Cercetările efectuate în cadrul acestei lucrări se referă la următoarele aspecte:

1. Elaborarea, proiectare și realizarea sub forma unui model experimental, a unei microinstalații de epurare a deșeurilor citostatice rezultate din activitatea medicală oncologică.
2. Testarea microinstalației realizate prin utilizarea metodelor menționate anterior pentru cinci substanțe medicamentoase citostatice care au fost administrate unor loturi de pacienți, urmărindu-se neutralizarea substanțelor citostatice eliminate prin urina acestor pacienți.
3. Utilizarea avantajelor oferite de tehnicile de modelare matematică pentru studierea dependențelor existente între diferiți parametri indicatori care garantează randamente de epurare cât mai ridicate.
4. Elaborarea unei metodologii simple de operare a microinstalației de epurare realizate utilizând calculatorul de proces.
5. Obținerea unor observații interesante asupra desfășurării proceselor de distrugere a substanțelor citostatice, prin studiul datelor obținute în urma determinărilor efectuate înainte, în cursul și la finalul ciclului de funcționare al microreactorului electrochimic.
6. Analiza prin metode biologice a produselor rezultate în urma epurării, în vederea determinării citotoxicității reziduale.

Având în vedere atât conținutul cât și modul de abordare și rezolvare al obiectivelor propuse spre a fi atinse, lucrarea elaborată are un puternic caracter interdisciplinar (inginerie chimică, automatizări, electronică, modelare statistică, chimie organică, medicină, farmacie), încercând astfel să satisfacă cerințele actuale ale unei teze de doctorat, să răspundă astfel unor exigențe științifice teoretice și mai ales aplicative.



## Obiectivele lucrării:

Principalele obiective ale acestei lucrări sunt:

1. Realizarea unei documentații bibliografice cu privire la nivelul actual al cunoașterii în domeniul epurării deșeurilor citostatice rezultate din activitatea medicală oncologică.
2. Elaborarea, proiectarea și realizarea unei microinstalații experimentale care să permită epurarea deșeurilor citotoxice rezultate din activitatea medicală oncologică.
3. Testarea microinstalației și prelucrarea matematică a datelor experimentale obținute prin determinări complexe fizico-chimice și de citotoxicitate.
4. Determinarea prin calcul a indicatorilor de performanță, care reflectă eficiența epurării efectuate în microinstalația experimentală.
5. Analiza prin metode biologice a produselor rezultate în urma epurării, în vederea determinării citotoxicității reziduale.
6. Elaborarea unei teorii proprii cu privire la modul în care are loc mecanismul de degradare prin oxidare electrochimică a substanțelor citostatice care au fost utilizate la testarea microinstalației.

# **PARTEA GENERALĂ – Nivelul actual al cunoașterii**

## **1. Metode electrochimice de transformare și/sau distrugere a poluanților**

### **1.1. Generalități**

Anumiți poluanți, cum sunt agenții antitumorali citostatici, fiind prezenți în efluenți în cantități foarte mici și/sau foarte toxici, nu este nici rentabil și nici recomandabil să fie separați și recuperați. Epurarea apelor reziduale ce conțin astfel de poluanți constă în transformarea acestora în compuși netoxici și/sau biodegradabili, sau, dacă este posibil și rentabil economic, în distrugerea avansată a acestora prin procedee chimice, electrochimice sau mixte.

Procesul cel mai economic este tratarea biologică care se aplică de obicei pentru apele reziduale care conțin poluanți organici “ușor biodegradabili”. Situația este complet diferită atunci când speciile poluante sunt complet rezistente la tratamentul biologic sau dacă concentrația lor este mare și /sau foarte variabilă. În această categorie intră multe dintre medicamentele cu efect citostatic deoarece acest efect se manifestă într-un anumit grad și asupra microorganismelor care formează ecosistemul cu rol epurator [11].

Metodele electrochimice de tratare a apelor reziduale cu conținut de poluanți organici au devenit recent mult mai atractive, în special datorită controlului ușor și creșterii randamentelor de curent prin folosirea de noi materiale de electrod și a reactoarelor electrochimice bipolare [7].

Transformările speciilor impurificatoare pot avea loc în următoarele modalități:

- direct, (in situ) când transformările au loc pe suprafața electrozilor.

- indirect, când reacțiile de transformare au loc în afara reactorului electrochimic folosind reactanți (oxidanți sau reducători) obținuți pe cale electrochimică.
- mixt, când reacțiile de transformare se petrec în reactorul electrochimic, dar oxidarea sau reducerea pe electrod o suferă o specie chimică intermediară.

## **1.2. Metode electrochimice de transformare și/sau distrugere a poluanților organici**

Marea majoritate a medicamentelor antitumorale citostatice sunt substanțe organice cu excepția cisplatinei. Din acest motiv lucrarea de față își propune tratatea cu predilecție a metodelor capabile să distrugă compușii poluanți organici. La ora actuală cea mai folosită metodă pentru îndepărtarea acestor poluanți este reprezentată de incinerare. Însă incinerarea deșeurilor organice ridică serioase probleme de mediu deoarece apar emisii mari de gaze cu efect nociv și sunt mari consumatoare de energie [6].

Studiul comportării poluanților organici în procesele electrochimice de depoluare a efluenților care îi contin, este dificil datorită diversității acestora.

### **1.2.1. Metode directe**

Cele mai simple metode electrochimice de tratare a apelor reziduale cu conținut de poluanți organici sunt cele directe în care transformările au loc pe suprafața electrozilor, la anod – oxidare și la catod – reducere.

Metodele electrochimice presupun reacții concomitente atât la anod cât și la catod. Pentru a separa procesul util de cel de la contraelectrod, este necesară separarea spațiilor electrodice fie prin diafragme fie prin membrane schimbătoare de ioni. Utilizarea separatoarelor complică construcția reactoarelor electrochimice, cresc substanțial prețul de cost al acestora, cresc

tensiunea necesară desfășurării procesului electrochimic (ceea ce duce implicit la creșterea consumului de energie electrică), precum și la creșterea prețului de cost al întreținerii echipamentelor prin colmatarea diaframelor. În cazul renunțării la separator este necesar ca prin selectarea condițiilor de lucru (materialele din care sunt confecționați electrozii, densitățile de curent, raportul suprafeței electrozilor) bilanțul să fie dirijat spre procesul dorit, oxidare sau reducere, cu atât mai mult cu cât procesele de la electrod sunt în general ireversibile. În cazul epurării apelor reziduale care conțin deșeuri citotoxice, electrooxidarea anodică reprezintă procesul cel mai important [12].

O reacție de oxidare are ca rezultat creșterea numărului de oxidare, în timp ce într-o reacție de reducere acest număr scade. În cazul substanțelor organice identificarea modalității în care decurge reacția redox este mai greu de realizat decât în cazul sistemelor redox care implică ioni metalici. Substanțele organice pot suferi un transfer de electroni într-o varietate de circumstanțe și medii. Principalii factori care determină comportarea lor electrochimică sunt:

- Natura grupei electroactive în molecula organică
- Natura solventului și a electrolitului suport
- Materialul din care este confecționat electrodul
- Potențialul aplicat
- Temperatura.

Un electron adăugat în procesul reducerii electrochimice de obicei decurge la un orbital de antilegătură și are ca rezultat apariția unor specii anionice de mare reactivitate. Acestea pot suferi o multitudine de reacții, inclusiv rearanjare conformațională. Asemănător, un electron îndepărtat în cursul procesului de oxidare din orbitalul de legătură, duce la formarea unui radical cationic care de obicei suferă procese de dimerizare, clivarea legăturii, atac nucleofil sau rearanjare conformațională [13,14].

**a) Reducerea electrochimică.** Procesul de reducere constă în acceptarea de electroni. Mecanismul de realizare a electroreducerii unui compus organic este relativ complicat, transferul de electroni fiind adesea însoțit, precedat sau urmat de alte reacții omogene.

**b) Oxidarea electrochimică.** Prețul metodelor de oxidare variază în funcție de agentul oxidant folosit. Oxigenul din aer este cel mai ieftin, urmat

de clor, electricitate, apă oxigenată iar cel mai scump este ozonul. Oxidarea cu oxigen la temperaturi scăzute are loc numai pe cale biologică. Clorul formează adesea compuși clorinați deosebit de stabili și toxici, fapt care limitează mult utilizarea sa. Oxidarea electrochimică este curată și foarte eficientă. Factorul limitativ pentru oxidarea electrochimică este stabilitatea redusă a anozilor folosiți în mod uzual.

Oxidarea electrochimică este considerată ca fiind un instrument foarte puternic de distrugere și a celor mai rezistenți compuși organici.

Oxidarea anodică a compușilor organici este, astfel, o metodă adecvată de control a poluanților din efluenți cu condiția ca procesul să se desfășoare cu randamente mari de curent pentru reacția de oxidare. Randamentul de curent depinde în principal de reactivitatea poluanților organici în raport cu oxidanții și concentrația lor.

Oxidarea electrochimică se realizează pe două căi:

- Direct, prin oxidarea moleculei organice adsorbite pe suprafața electrodului printr-un transfer de electroni
- Indirect, prin oxidarea moleculei de către oxigenul atomic sau radicali hidroxil formați prin electroliza apei.

Oxidarea electrochimică a compușilor organici produce în mod curent intermediari foarte reactivi care în mod obișnuit conduc la reacții globale de substituție, adiție, cuplare cu eliminare, cuplare cu adiție sau transfer ulterior de electroni [15,16].

### **1.2.2. Metode indirecte**

Procedeele indirecte de tratare a poluanților constau în utilizarea unui cuplu redox care acționează ca și un catalizator sau “purtător de electroni” pentru oxidarea sau reducerea altor specii din sistem.

Electrosintezele indirecte folosite în mod curent sunt de două tipuri:

- “in situ” sau “în celulă”: reacția între substratul organic și reactivul redox care are loc concomitent cu conversia

mediatorului la starea sa de oxidare inițială, este realizată în reactorul electrochimic.

- “ex situ” sau “în afara celulei”: reacția chimică de oxidare sau de reducere este condusă într-un alt reactor diferit de cel electrochimic.

Din punct de vedere economic este preferată varianta “in situ”, dar varianta “ex situ” are câteva avantaje de ordin tehnic: reacția electrochimică și cea chimică pot fi optimizate separat, electrolitul poate fi purificat sau tratat suplimentar între reactorul electrochimic și cel chimic [17].

Principalele cerințe pentru obținerea de randamente mari în procesele electrochimice indirecte sunt următoarele:

- Potențialul la care specia intermediară ( C ) este produsă nu trebuie să fie în apropierea potențialului de degajare al oxigenului sau al hidrogenului deoarece în acest caz o mare parte din curent se poate pierde printr-un proces secundar nedorit.
- Viteza de generare a speciei intermediare ( C ) trebuie să fie cât mai mare.
- Viteza de reacție a speciei intermediare ( C ) cu poluantul trebuie să fie mai mare decât a oricărei alte reacții competitive.
- Adsorbția poluantului sau a altor specii chimice pe electrozi trebuie să fie minimă pentru a nu împiedica generarea speciei intermediare ( C ).

## 2. Reactoare electrochimice cu densități de curent asimetrice

### 2.1. Generalități

Pentru a crește randamentul de curent și implicit pentru a reduce consumul energetic al unui reactor electrochimic, trebuie renunțat la membrana separatoare interelectrodică. Eliminarea acestei membrane separatoare conduce la o micșorare semnificativă a tensiunii aplicate la bornele reactorului. Pe lângă contribuția însemnată a separatorului la căderea ohmică de tensiune, acesta ridică probleme majore de ordin constructiv, financiar și de operare [18,19].

Utilizarea separatorului este impusă de posibilitatea ca produsul util generat la electrodul de lucru să sufere o reacție inversă la contraelectrod sau să reacționeze cu mediul de reacție și/sau produsul de la contraelectrod. Oricare din aceste cazuri conduc la micșorarea drastică atât a randamentului de transformare (prin pierderea de produs util în reacții secundare) cât și a randamentului faradic de curent. Considerăm spre exemplificare un proces redox în care produsul util este specia oxidată. În acest caz în momentul inițial al procesului, concentrația speciei active (specia redusă) este maximă, iar cea a produsului de reacție (specia oxidată) este minimă. Prin evoluția procesului, concentrația speciei active scade, în timp ce concentrația produsului util crește. Conform figurii 1 sistemul evoluează în timp până la atingerea unei stări de echilibru în care curentul limită de oxidare este egal cu curentul limită de reducere. Aceasta înseamnă ca tot ce se produce la electrodul de lucru este consumat printr-o reacție inversă la contraelectrod [20].

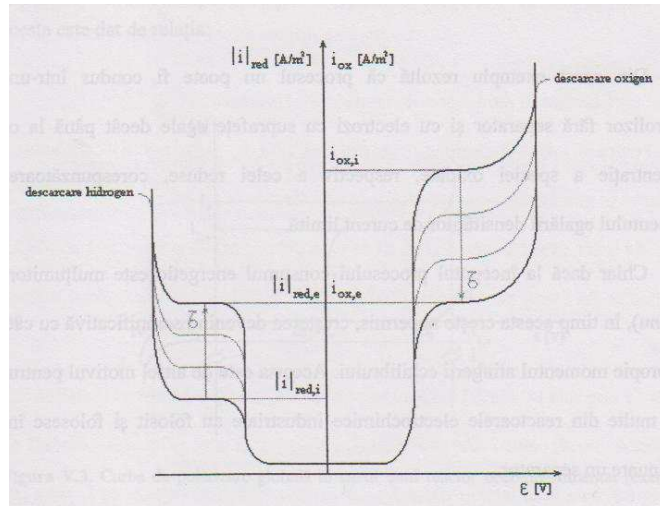


Figura 1. Evoluția în timp a unui sistem redox în soluție apoasă. (după Mirică și colab).

Randamentul de curent evoluează în acest caz către zero (figura 2), valoare pe care o atinge după momentul egalării curenților limită ai speciilor reduse, respectiv oxidate, la cei doi electrozi.

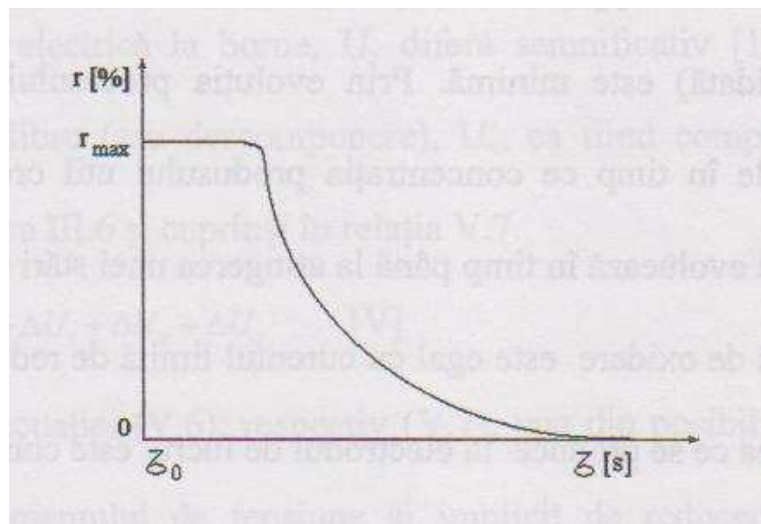


Figura 2. Evoluția randamentului de curent în timp. (după Mirică și colab).



Din acest exemplu rezultă că procesul nu poate fi condus într-un electrolizor fără separator și cu electrozi cu suprafețe egale decât până la o concentrație a speciei reduse, respectiv a celei oxidate, corespunzătoare momentului egalării densităților de curent limită.

O posibilitate de a evita aceste neajunsuri o reprezintă folosirea unor reactoare electrochimice necompartimentate dar cu suprafețe electrolice asimetrice care vor produce densități de curent anodic respectiv catodic, asimetrice. Deoarece concentrațiile oxianionilor fiind variabile în timp și densitățile de curent limită fiind proporționale cu acestea, randamentul calculat corespunde unui anumit moment. Formula fiind valabilă pentru orice moment al electrolizei rezultă că ea este valabilă și pentru momentul final. În acest caz randamentul de curent instantaneu devine:

$$r_F = 1 - \frac{[O]}{[R]} \cdot \frac{S_c}{S_a} \cdot \frac{zFD_o / (1 - t_o) \delta_c}{zFD_R / (1 - t_R) \delta_a} = 1 - \frac{[O]}{[R]} \cdot \frac{S_c}{S_a} \cdot \frac{D_o / (1 - t_o) \delta_c}{D_R / (1 - t_R) \delta_a} \quad (1)$$

Unde:

[O] și [R] sunt concentrațiile speciei oxidante, respectiv a speciei reduse;

$S_a$ ,  $S_c$  sunt suprafața anodului, respectiv a catodului;

$D_o$ ,  $D_R$  sunt coeficienții de difuzie pentru oxidant, respectiv pentru reducător;

$t_o$ ,  $t_R$  reprezintă numărul de transport al oxidantului respectiv al reducătorului;

$\delta_a$ ,  $\delta_c$  reprezintă grosimea stratului de difuzie anodic, respectiv catodic.

Relația (1) demonstrează că randamentul de curent este dependent de condițiile de electroliză, prin intermediul factorilor  $D$ ,  $t$  și  $\delta$ . Desigur, condițiile concrete de lucru micșorează sau amplifică importanța unuia sau altuia din acești factori, curentul limită fiind controlat de procesele de difuzie, convecție, migrație sau, de cele mai multe ori fiind o rezultată a influenței combinate a acestora [21].

Randamentul energetic ( $r_w$ ) al procesului este arătat în relația (2) care se deduce din relația (1):

$$r_w = \frac{U_e}{U_e + \eta_a + \eta_c + \Delta U_i + \Delta U_e} \cdot \left[ 1 - \frac{[O]}{[R]} \cdot \frac{S_c}{S_a} \cdot \frac{D_o / ((1 - t_o) \delta_c)}{D_R / ((1 - t_R) \delta_a)} \right] \quad (2)$$

Unde:

$U_e$  reprezintă tensiunea electrică de echilibru

$\eta_a$  reprezintă supratensiunea anodică

$\eta_c$  reprezintă supratensiunea catodică

$\Delta U_i$  reprezintă căderea ohmică ionică

$\Delta U_e$  reprezintă căderea ohmică electronică.

Randamentul energetic ( $r_w$ ) reprezintă indicatorul cel mai complet, însă în mod paradoxal și cel mai puțin utilizat, el fiind definit ca raportul dintre consumul specific teoretic și cel practic.

Astfel sunt puse bazele teoretice de stabilire a posibilităților și limitelor de îmbunătățire a randamentului energetic în cazul reactoarelor electrochimice cu densități de curent asimetriche. [22]

## 2.2. Modele de reactoare cu densități de curent asimetriche utilizate în practică

Reactoarele cu densități de curent asimetriche sunt folosite în special în domeniul reacțiilor de oxidare. Aplicațiile industriale ale acestora sunt în industria de fabricare electrochimică a permanganatului de potasiu și a fericianurii de potasiu. De-a lungul timpului au fost imaginate diverse variante constructive ale acestor reactoare care vor fi prezentate în continuare [12,23].

Unul din cele mai vechi reactoare de acest tip este reactorul Schultz (figura 3) care constă dintr-un vas cilindric cu fundul conic prevăzut cu un agitator mecanic pentru o bună omogenizare a masei de reacție.

Anozii sunt în număr de șase, sunt confecționați din nichel și sunt plasați în fața a șase catozi de fier. Anozii au formă de plăci iar catozii de bare.

Reactorul Schultz funcționează cu o densitate de curent anodică de 50 – 80  $A/m^2$  și cu o densitate de curent catodică de 400 – 1000  $A/m^2$ .

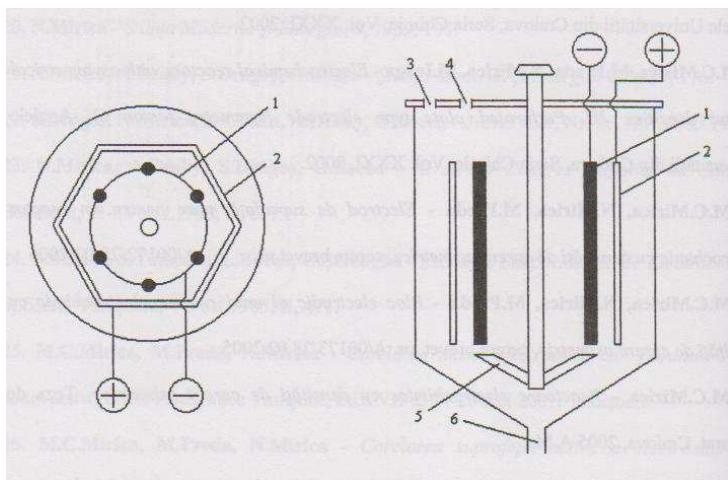


Figura 3. Reactor electrochimic tip Schultz: 1 - catod, 2 - anod, 3 – ștuț de umplere, 4 - ștuț de evacuare gaze, 5 – agitator mecanic, 6 - ștuț pentru golire (după Mirică și colab).

O construcție puțin modificată este prezentată în figura 4. Intre șase anozii cilindrici concentrici a căror suprafață totală este de 24,6  $m^2$  confecționați din tablă de nichel, sunt suspendate tijele catodice din oțel cu diametrul de 8 mm. Reactorul este prevăzut cu agitator mecanic. Densitatea de curent anodică este de 60  $A/m^2$  și densitatea de curent catodică este de 600  $A/m^2$ .

Ambele tipuri de reactoare sunt unități de capacitate mică care lucrează la intensități de curent de 500 – 1000 A. Pentru producții mai mari ar fi nevoie de un număr corespunzător de reactoare.

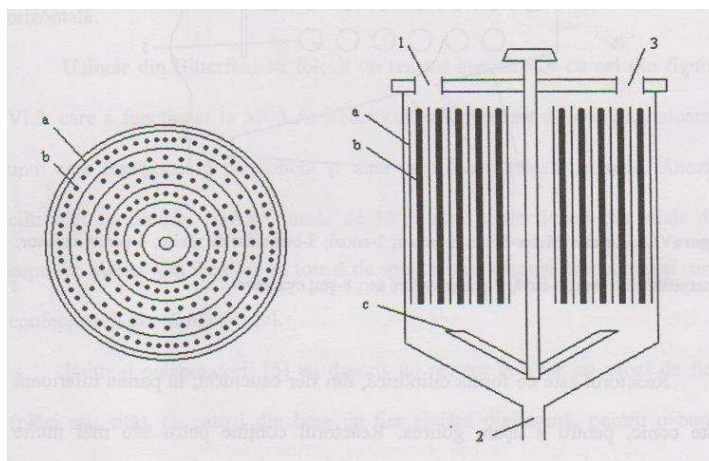


Figura 4. Reactor Bitterfeld: a – catodzi, b – anozzi, c – agitator mecanic, 1 - ștuț de umplere, 2 - ștuț pentru golire, 3 - ștuț de evacuare gaze (după Mirică și colab).

Pentru a micșora numărul de unități necesare a fost conceput un alt reactor care permite folosirea unor intensități de curent mai mari. (Figura 5).

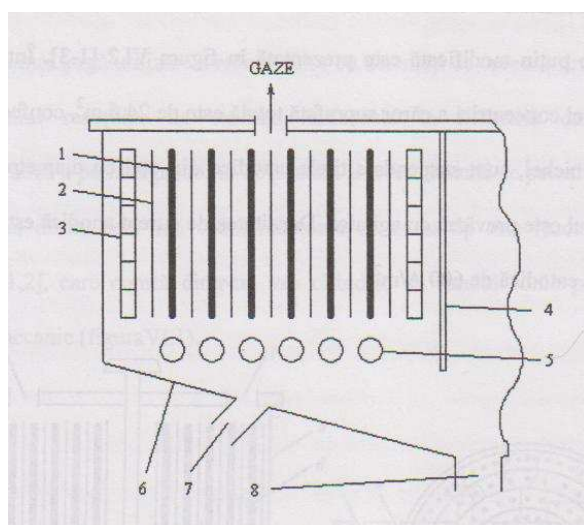


Figura 5. Reactorul Muller-Suter: 1 – catodzi, 2 – anozzi, 3 – buzunare de răcire, 4 – perete izolator, 5 – serpentine de abur, 6 – cuvă, 7 – ștuț insuflare aer, 8 - ștuț pentru golire (după Mirică și colab).

Reactorul este de formă cilindrică, din fier cauciucat; la partea inferioară este conic pentru a ușura golirea. Reactorul conține patru sau mai multe fascicule de electrozi. Catozii sunt confecționați din bare de oțel

înfășurate în țesătură de policlorură de vinil. Anozii sunt confecționați din folii de nichel lucios. Plăcile anodice sunt poziționate vertical iar barele catodice orizontal. Fiecare fascicol de electrozi, separat de celelalte prin pereți izolatori, este suspendat în partea superioară a celulei și este prevăzut cu un clopot pentru colectarea gazelor, serpentine de abur și buzunare de răcire. Datorită diferențelor de temperatură între serpentinele de abur și buzunarele de răcire, electrolitul urcă în reactor și spală electrozii, evitând blocarea anozilor prin depuneri cristaline [24,25].

Un alt tip de reactor cu densități de curent asimetrice este cel folosit la Uzinele din Usti Nad Laben. Acest reactor este realizat dintr-o vană de oțel cu manta de încălzire cu abur care permite încălzirea electrolitului până la 60°C. În vană sunt amplasate șase garnituri de electrozi. Fiecare garnitură este alcătuită dintr-un anod cilindric în care este amplasat concentric catodul înfășurat într-o folie de azbest și prevăzut cu un suport de ciment. Atât catozii cât și anozii sunt confecționați din împletitură de oțel. Agitarea se face cu ajutorul aerului comprimat. Reactorul lucrează la 1200 A., ceea ce corespunde unei densități de curent anodice de 65 A/m<sup>2</sup> și catodice de 280 A/m<sup>2</sup> (Figura 6) [12].

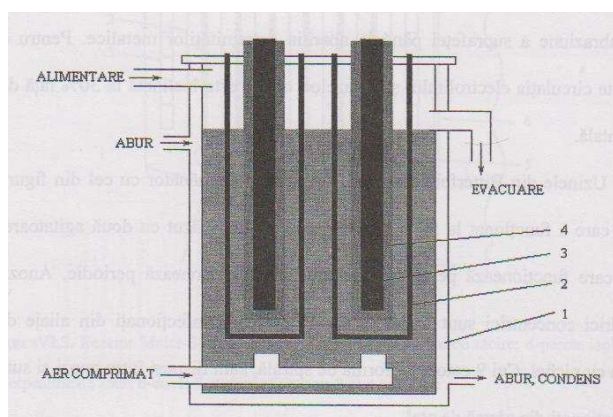


Figura 6. Reactor folosit la Usti Nad Laben: 1 – reactor, 2 – anod, 3 – catod, 4 – înveliș de azbest (după Mirică și colab)

### **3. Metode fizico-chimice de analiză a substanțelor organice**

Din numărul mare de metode fizico-chimice utilizate pentru analiza substanțelor chimice organice, vor fi prezentate cele care au fost larg utilizate în partea experimentală a prezentei lucrări.

#### **3.1. Metode spectrofotometrice**

##### **3.1.1. Generalități**

În fizică spectrofotometria se referă la studiile cantitative ale spectrelor electromagnetice denumită și spectroscopie electromagnetică. Spectrofotometria implică utilizarea unui spectrofotometru. Spectrofotometrul este aparatul optoelectronic care măsoară intensitatea luminii care traversează o anumită probă de substanță transparentă plasată într-o cuvă adecvată.

Spectrofotometrul este aparatul optoelectronic destinat măsurării cantității de lumină absorbită de probe pentru o anumită lungime de undă. Unele spectrofotometre pot măsura și lumina reflectată de probe. În această situație probele pot să nu fie transparente. De regulă spectrofotometrele sunt clasificate în funcție de domeniul de lungimi de undă în care pot efectua măsurătorile.

Spectrofotometria a apărut inițial ca denumire doar pentru domeniile vizibil – VIS și infrarosu apropiat - IRA. Ulterior spectrofotometria s-a extins și la domeniile ultraviolet UV și infrarosu - IR. Foarte puține aparate existente pe piață au incluse toate domeniile UV-VIS-IR. De regulă spectrofotometrele pentru cercetare includ domeniile UV – VIS – IR apropiat. Din cauza prețului de cost pentru aplicații țintite spectrofotometrele pot fi numai UV sau numai VIS. Spectrofotometrele măsoară absorbanța sau transmitanța probelor analizate.

Unele aparate pot stabili și spectrul de absorbție caracteristic probei în domeniul de lucru: UV; VIS; UV-VIS sau IR.

Spectrul reprezintă variația absorbanței probei funcție de lungimea de undă a radiației electromagnetice.

În general spectrele UV-VIS nu pot individualiza o anumită substanță.

Spectrul de absorbție în domeniul IR reprezintă variația absorbanței probei funcție de frecvența radiației electromagnetice. Aceste spectre individualizează probele analizate. Sistemele IR conțin biblioteci de spectre IR. Acest mod de utilizare a spectrofotometriei IR este destinat determinării unor substanțe necunoscute din matricea analizată.

Spectrofotometria în IR permite recunoașterea substanțelor funcție de spectrul dat de acestea în domeniul IR [26,27].

Legea care stă la baza spectrofotometriei este legea Lambert-Beer (relația 3). Ea apreciază atenuarea intensității unui fascicul luminos de o anumită lungime de undă care străbate o cuvă de grosimea dată (uzual 1 cm) și care conține o probă de o anumită concentrație (figura7) [28,29].

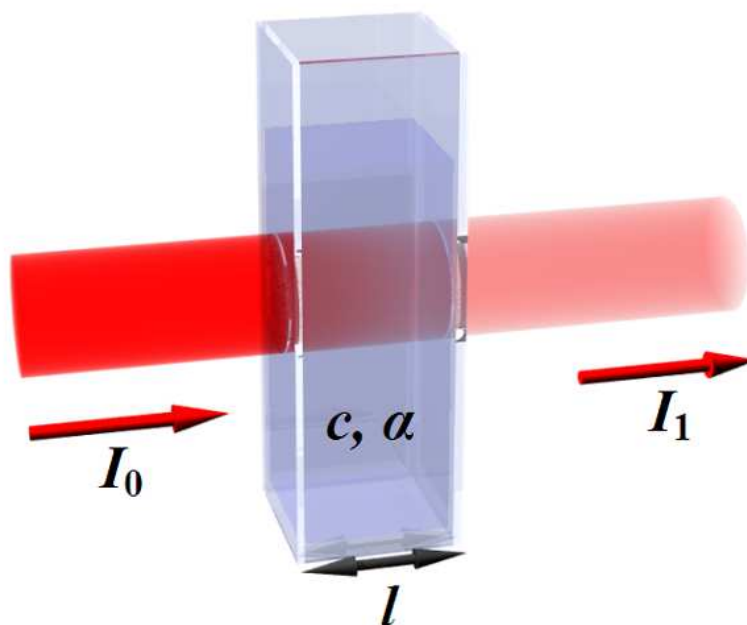


Figura 7. Ilustrarea legii Lambert Beer.

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon \cdot C \cdot \ell \quad (3)$$

Unde:

A reprezintă absorbanța probei

$I_0$  reprezintă intensitatea fasciculului de lumină incidentă

$I_1$  reprezintă intensitatea fasciculului de lumină transmisă prin probă

$\epsilon$  reprezintă coeficientul de absorbție molară al probei

C reprezintă concentrația probei

$l$  reprezintă grosimea stratului de probă (uzual 1 cm).

### 3.1.2. Spectrofotometrul UV – VIS

Spectrofotometrele au nevoie de o sursă de lumină cu spectrul de emisie cuprins în domeniul de măsură al acestuia. Din această sursă spectrofotometrele pot utiliza în procesul de măsură una sau două raze și au primit denumirea de spectrofotometru cu un spot (fascicul) sau cu două spoturi (fascicule) [29,30,34].

#### Spectrofotometrul monofascicul

În figura 8 este prezentată schema bloc a unui spectrofotometru cu un singur fascicul.

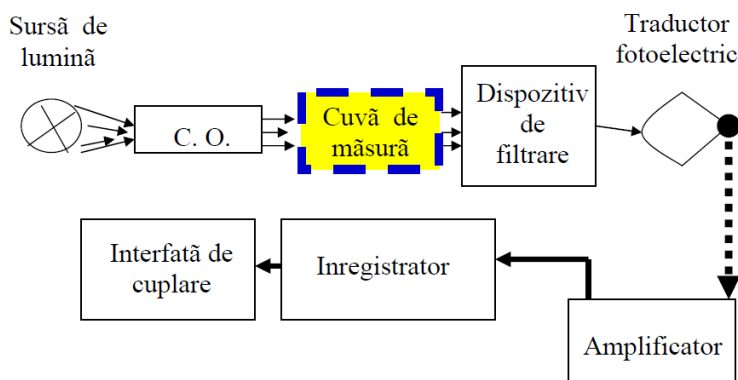


Figura 8. Schema bloc a unui spectrofotometru cu un singur fascicul. (după M. Ionică)

Descrierea elementelor din schema bloc:

Sursa de lumină - are rolul să genereze o radiație luminoasă în domeniul ultraviolet – UV - vizibil – VIS - sau infraroșu - IR. De regulă spectrofotometrele au câte o sursă de lumină pentru fiecare domeniu de radiație luminoasă pe care îl analizează. După tipul de radiație analizată,



spectrofotometrele pot fi pentru domeniile: ultraviolet – UV, vizibil – VIS, infraroșu IR, ultraviolet-vizibil UV-VIS, sau pentru UV-VIS-IR. Sursele de lumină UV sunt în general lămpile cu deuteriu, cele pentru VIS sunt lămpi cu halogen, iar pentru IR lămpi cu incandescentă. Lămpile sunt montate de regulă într-o incintă cu oglindă, lumina fiind trimisă sistemului optic printr-o fantă [31,32,33].

### Spectrofotometrul cu dublu fascicul

În figura 9 este prezentată schema bloc a unui spectrofotometru cu dublu fascicul.

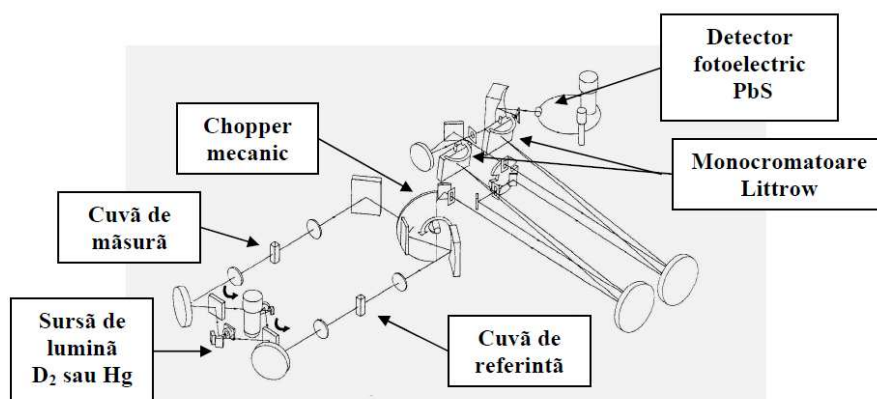


Figura 9. Schema bloc a unui spectrofotometru cu dublu fascicul. (după M. Ionică).

De la sursa de lumină se despart două raze. Cea care trece înspre panoul frontal al aparatului, traversează cuva de măsură și cea de a doua rază, de referință, trece prin partea centrală a aparatului.

Cele două raze sunt preluate alternativ de monocromatoarele Littrow prin intermediul chopperului mecanic care are o frecvență de 30 Hz. Astfel, detectorul fotoelectric va primi alternativ lumina furnizată de sursa de lumină și lumina care a trecut prin probă. Pentru corecția zgomotului generat de traductorul fotoelectric și amplificatorul electronic se face o corecție dinamică a zgomotului generat de partea electronică a spectrofotometrului [31,32].

### 3.1.3. Spectrofotometrul cu fluorescență

Fluorescența este proprietatea unor substanțe de a emite lumină simultan cu excitarea acestora cu o formă de energie (în acest caz o rază de lumină de o anumită lungime de undă). Intotdeauna lungimea de undă la care are loc excitația este mai mică decât lungimea de undă la care are loc emisia deoarece energia necesară excitației este mai mare decât cea emisă.

Măsurarea luminii emise de aceste substanțe este realizată de spectrofotometrele cu fluorescență [37].

În figura 10 este prezentată schema bloc a unui spectrofotometru cu fluorescență.

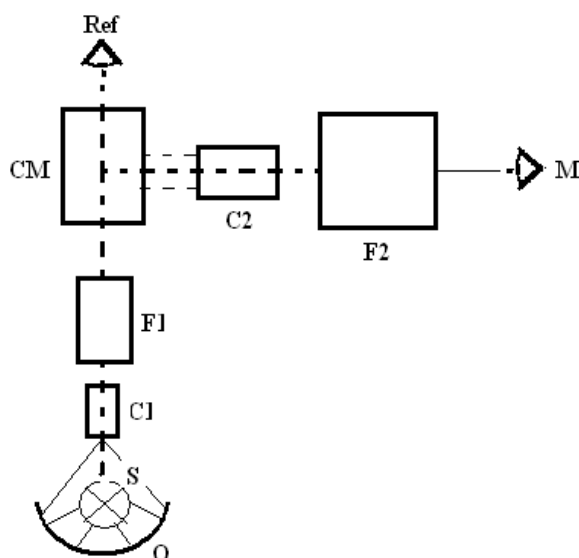


Figura 10. Schema bloc a spectrofotometrului cu fluorescență. (după M. Ionică).

Descrierea elementelor componente din schema bloc:

S - sursa de lumină, are rolul să genereze un fascicul luminos de intensitate constantă.

C1 și C2 – colimatoare, au rolul să transforme fasciculele divergente de lumină în fascicule plan-paralele.

F1 – filtrul de excitație, are rolul de a lăsa să treacă spre probă radiația luminoasă cu o anumită lungime de undă care va produce fenomenul de fluorescență. La aparatele mai performante acesta este înlocuit cu un

monocromator care permite baleierea întregului spectru de emisie al sursei de lumină pentru a putea selecta cu precizie cât mai bună lungimea de undă necesară excitării unui anumit compus fluorescent.

CM – camera de măsură în care se introduce proba, este în general confecționată din cuarț.

Ref - este traductorul fotoelectric care măsoară intensitatea fasciculului de lumină care a excitat proba.

F2 – filtrul de emisie, care permite trecerea spre detector a radiației luminoase emise de probă în urma excitației, deci fenomenul de fluorescență. Și acest filtru poate fi de tip monocromator care permite baleierea întregului spectru UV-VIS pentru a putea stabili cu precizie lungimea de undă la care are loc emisia, respectiv se va face citirea.

M – traductorul fotoelectric care măsoară intensitatea radiației luminoase emise de probă și care este proporțională cu concentrația acesteia [34,35,36].

### 3.2. Metode cromatografice

Denumirea de cromatografie (**IUPAC, 1993**) reprezintă concatenarea cuvintelor grecești  $\chi\rho\acute{\omega}\mu\alpha$ : *chroma* și  $\gamma\rho\alpha\phi\epsilon\iota\nu$ : *graphein*. Denumirea este comună pentru o serie de tehnici de laborator destinate separării mixturilor de substanțe. Acestea sunt în general separate prin interacțiunea dintre o fază mobilă în care este injectată mixtura și o fază staționară. Prin această interacțiune fizico-chimică moleculele aceleiași substanțe sunt separate de moleculele celorlalte substanțe și sunt grupate împreună. Termenul de cromatografie relativ impropriu pentru metodele moderne, a fost păstrat, rezultatul separării constă într-o curbă amplitudine funcție de timp, denumită *cromatogramă*, care este caracterizată de faptul că la apariția unei substanțe prezintă o “culme” denumită *peak* [38,39].

Astfel sunt utilizate tehnicile de cromatografie pe hârtie, în gel, lichid-gaz cromatografia, lichid cromatografia și microelectroforeza capilară. Fiecare

tehnică prezintă avantaje și dezavantaje însă toate aceste tehnici urmăresc separarea amestecurilor de substanțe.

Tehnicile de separare pe hârtie sau gel, numite și *electroforeză*, se bazează pe separarea amestecurilor sub acțiunea unui câmp electric aplicat la capetele hârtiei sau a gelului. Acronimul pentru tehnica de cromatografie pe suport solid este TLC (thin layer chromatography) (IUPAC, 1993). Substanțele migrează pe suport fiind caracterizate de distanța la care ajung după un timp prestabilit [40,41,42].

### 3.2.1. Gaz cromatografia

Gaz cromatografia - GLC (Gas-liquid chromatography) (IUPAC, 1993) este tehnica de separare a amestecurilor de substanțe aflate în stare gazoasă prin trecerea acestora printr-o coloană de gaz cromatografie având ca eluent un gaz – hidrogen, heliu, argon, azot ș.a. Gazul se alege în funcție de domeniul de aplicație al metodei și de tipul de detector utilizat [43,44].

Schema bloc a unui gaz-cromatograf este prezentată în figura 11.

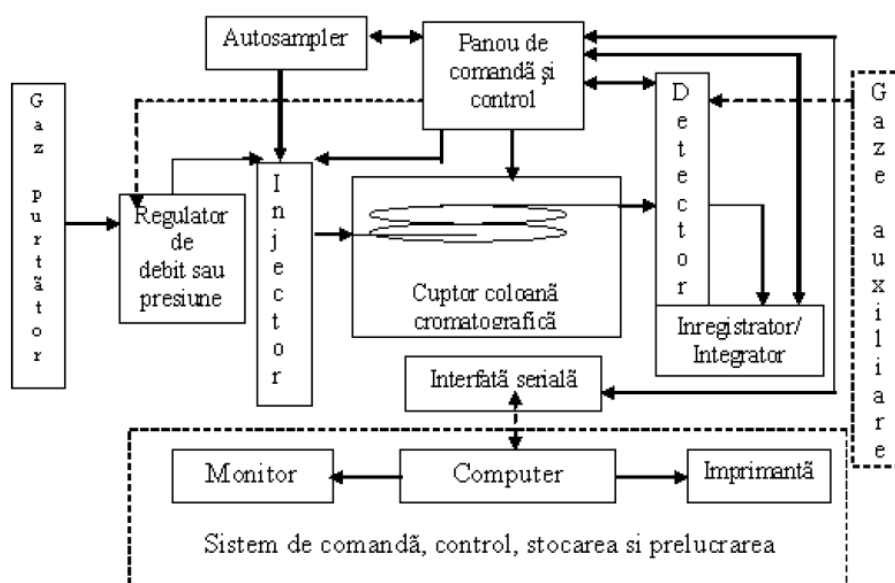


Figura 11. Schema bloc a unui sistem de gaz cromatografie. (după M. Ionică).

## Descrierea elementelor din schema bloc

Butelia de gaz are rolul să păstreze gazul purtător de înaltă puritate la presiune mare (50 – 200 atm). Regulatorul de debit (sau de presiune) este ales funcție de modul de lucru: la presiune constantă sau la debit constant de gaz. Are rolul să reducă presiunea din butelie la presiunea necesară de lucru (de maxim câteva atmosfere) independent de presiunea de gaz existentă în butelie în orice moment. Regulatele de presiune sunt de regulă mecanice. Regulatele de debit constant sunt numai electronice și au rolul să asigure prin coloana de gaz-cromatografie debitul de gaz prestabilit. Metoda asigură timpi de retenție perfect reproductibili, deoarece debitul depinde doar de temperatura injectorului și a coloanei de gaz-cromatografie.

Injectorul are rolul să primească proba (gazoasă sau lichidă), să evapore probele lichide, să introducă proba în fluxul de gaz purtător și eventual să elimine solventul în care se află mixtura lichidă.

Sistemele de gaz-cromatografie pot fi echipate cu unul sau mai multe injectoare.

Autosamplerul - injectorul automat de probe – are rolul să injecteze una sau mai multe probe. Acesta asigură pentru toate probele instalate în carusel același mod de injectare (cantitatea injectată, durata injectării și viteza de încărcare a seringii și de injectare), modul de spălare și numărul de replicare. Autosampler-ul are posibilitatea injectării probelor fără prezența operatorului, rezultatele obținute fiind interpretate ulterior. [45,46,47]

Injectarea efectuată de autosampler are avantajul creșterii reproductibilității rezultatelor cantitative, deoarece în cazul injectării manuale, eroarea poate ajunge și la 30%. [47]

Coloana de gaz-cromatografie – este un tub din oțel sau sticlă care are rolul să păstreze faza staționară în interiorul acestuia.

Coloanele pot fi împachetate cu diametrul intern de 2 – 4 mm, capilare cu diametrul intern de 0.25 – 0.5 mm, sau microcapilare, cu diametrul intern < 0.25 mm. Coloanele sunt caracterizate de lungimea lor, care poate fi de 1 – 5 m pentru coloanele împachetate și de 7.5 – 120 m, pentru coloanele capilare și microcapilare.

Umplutura coloanei, formată din substanțe care asigură separarea mixturilor funcție de caracteristicile fizico-chimice ale acestora, bazate pe polaritatea moleculelor, schimbul de ioni pe care-l pot realiza sau a activității optice (coloanele chirale). [48]

Obiectivul coloanei este acela de a separa substanțele aflate într-o mixtură. Calitatea separării substanțelor poartă denumirea de rezoluție teoretică  $R_s$  (Varian, 1995) și se calculează cu relația 4. În figura 12 sunt prezentați parametrii care se iau în calculul rezoluției.[34]

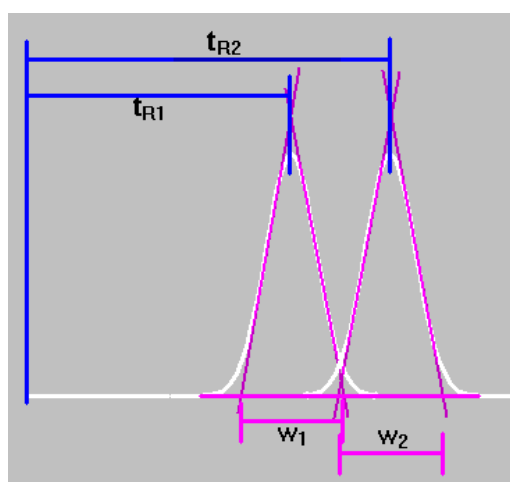


Figura 12. Parametrii măsurați pentru calculul rezoluției coloanei cromatografice. (după M. Ionică).

$$R_s = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \quad (4)$$

Unde:

$t_R$  – reprezintă timpul de retenție al unei substanțe

$W$  – lățimea peak-ului

Coloanele se mai pot caracteriza și de debitul optim de gaz eluent care trece prin ele și de temperatura maximă de lucru.

Sistemele de gaz-cromatografie pot fi echipate cu una sau mai multe coloane, funcție de domeniul de lucru al sistemului.

Detectorul – este un dispozitiv electronic care are rolul să transforme în semnal electric prezența moleculelor în spațiul acestuia. Semnalul electric este proporțional cu cantitatea de substanță prezentă în acel moment în spațiul de detecție. Funcție de principiul de detecție există următoarele tipuri principale de detectoare de gaz-cromatografie :

- cu ionizare în flacără – FID (flame ionization detector);
- spectrofotometric cu flacără – FPD (flame photometric detector);
- cu captură de electroni – ECD (electron capture detector);
- cu fotoionizare – PID (photo-ionization detector);
- cu azot și fosfor – NPD (nitrogen phosphorus detector);
- cu efect Hall – HECD (Hall electrolytic conductivity detector);
- cu energie termică – TEA (thermal energy analyzer);
- cu spectrometru de masă – MS
- cu spectrometru cu rezonanță magnetică nucleară – NMR (nuclear magnetic resonance)
- cu spectrometru de masă și spectrometru cu rezonanță magnetică nucleară MS-RMN.

Cu excepția ultimelor trei detectoare informațiile date cuprind numai cantitatea și timpul la care au fost eliberate din gaz-cromatograf, denumit și timp de retenție.

Ultimele trei detectoare, pe lângă cele două informații, oferă și informații legate de structura chimică a moleculelor prezente în spațiul de detecție [49,50].

Inregistratorul are rolul să transforme semnalul electric furnizat de detector într-o reprezentare grafică (amplitudine/timp) numită cromatogramă, afisată de regulă pe un suport de hârtie milimetrică. Integratorul, pe lângă funcția înregistratorului, poate efectua și anumite calcule, funcție de opțiunile operatorului. Astfel integratorul poate măsura timpii de retenție ai peak-urilor, înălțimea și aria acestora, cantitatea de substanță injectată după metoda standardului intern, a standardului extern sau a procentului peak-urilor.

Panoul de comandă și control are rolul să permită operatorului programarea parametrilor de lucru ai gaz-cromatografului și controlarea funcționării întregii instalații. Funcție de complexitatea sistemului de calcul

aflat în background, tot de la acest panou pot fi depistate și defectele care pot să apară în funcționarea părților componente ale gaz-cromatografului.

Sistemul de comandă, control, stocare și prelucrare a cromatogramelor este compus de regulă dintr-un microcalculator de tip personal, are rolul să ofere operatorului o interfață în limbaj evoluat pentru programarea și monitorizarea funcționării gaz-cromatografului și uneori la stabilirea cauzelor de funcționare necorespunzătoare ale acestuia. Avantajele utilizării sistemului de calcul extern constau în memorarea programelor de funcționare ale regulatorului de presiune, injectorului, cuptorului, coloanei gaz-cromatografice, detectorului și autosampler-ului, toate aceste programe individuale fiind reunite într-un singur program scris în limbaj evoluat care poartă numele de metodă de lucru. Pe lângă funcționarea instalației, sistemul de calcul stochează cromatogramele cu toate datele tehnice și pașapoartele care le însoțesc și efectuează calcule de cromatografie. De regulă calculele se execută după terminarea achiziției. Metoda de calcul poate fi modificată oricând, astfel că în anumite situații cromatogramele pot fi reprocessate după alte metode de calcul nou apărute sau imaginate de utilizator. Un alt avantaj datorat creării băncii de date de cromatograme constă în posibilitatea comparării rezultatelor obținute între două sau mai multe cromatograme, în special pentru sesizarea diferențelor neobservabile de regulă la o privire secvențială a acestora [50].

În figura 13 este prezentată o cromatogramă cu parametrii măsurați care o caracterizează.

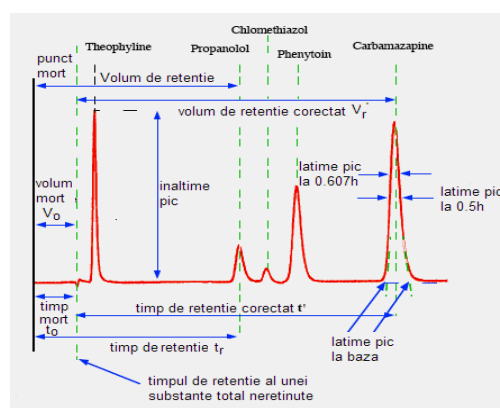


Figura 13. Gaz-cromatograma unei mixturi de medicamente. (după M. Ionică).



### 3.2.2. Lichid cromatografia de înaltă performanță

Cromatografia în care faza mobilă este un lichid poartă numele de lichid cromatografie de înaltă performanță sau lichid cromatografie de înaltă presiune HPLC (High-performance liquid chromatography sau High pressure liquid chromatography).

În general un HPLC se configurează de utilizator pentru a răspunde cerințelor aplicațiilor specifice activității analizate. Fiecare element din schema bloc poate avea structuri complet diferite, atât funcționale, cât și din punct de vedere al materialelor din care este confecționat [51].

Schema bloc a unui HPLC este prezentată în figura 14.

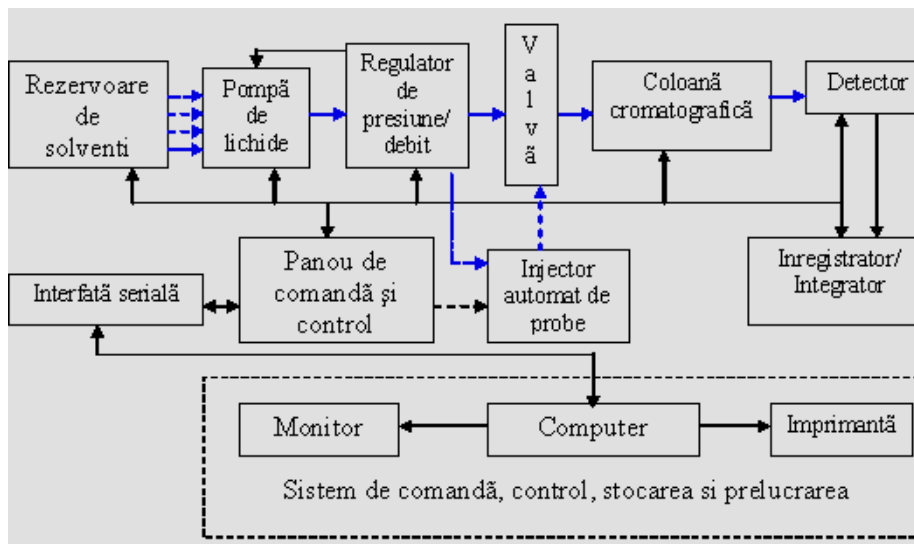


Figura 14. Schema bloc a unui sistem HPLC. (după M. Ionică).

Descrierea elementelor din schema bloc:

**Rezervorul de lichide** - are rolul să pastreze faza mobilă utilizată în sistem. Acesta poate să fie dotat cu până la patru rezervoare independente care pot alimenta pe rând, simultan sau în diferite combinații și proporții, pompele de înaltă presiune. Mixtura lichidelor poate avea loc înainte de intrarea în pompele de înaltă presiune, sau la iesirea din acestea.

**Pompele de înaltă presiune** - au rolul să asigure un debit sau presiune constantă coloanei de separare. Numărul acestora este funcție de

modul în care se face mixtura lichidelor utilizate ca fază mobilă. Pompele sunt de tipul aspiro-respingătoare și pot avea unul, două sau trei capete legate în paralel.

Dacă mixtura se face la joasă presiune, este necesară o singură pompă. Dacă mixtura se face la înaltă presiune, sunt necesare atâtea pompe câți solvenți sunt utilizați în timpul lucrului. Metoda mixturii la înaltă presiune este mult mai scumpă, dar dă o precizie maximă proporției și gradientului de utilizare al solvenților. Unele sisteme pentru aplicații speciale utilizează maxim patru solvenți.

Ele se sunt caracterizate de următorii parametrii:

- volumul maxim și minim de lucru
- presiunea maxim admisă
- pulsilitatea introdusă în sistem
- acuratețea și reproductibilitatea debitului
- acuratețea și reproductibilitatea gradientului
- timpul de schimbare efectivă a gradientului
- compensarea dinamică a compresibilității solvenților
- conservarea stării de agregare a solvenților și a impurităților dizolvate

în aceștia.

**Valva sau portul de injecție** – are rolul să introducă proba în faza lichidă pentru a fi transportată la coloana cromatografică.

**Coloana cromatografică** - are rolul să separe substanțele din mixtura primită la intrare. În funcție de principiul de separare sunt mai multe tipuri de coloane. Principiile de separare sunt următoarele :

- separare în fază normală, caracterizată de folosirea unei faze staționare polare - uzual silicagelul- și a unei faze mobile slab polară - grupările polare sunt silanol, sau alte grupări funcționale -CN, -NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub> ; rezultatul constă în faptul că moleculele polare sunt reținute mai mult sau mai puțin, în funcție de mărimea interacțiunii lor cu grupările polare din faza staționară; uzual compușii nepolari eluează primii, urmași de cei polari în ordinea polarității acestora;

- separare în fază inversată (caracterizată de folosirea de faze staționare nepolare – uzual C18 cu grupări octadecyl (C18H37) legate la

suprafată, și variante cu octil sau fenil - și a unei faze mobile polare - metanol, THF, ACN s.a.) fiind cea mai des utilizată în HPLC ;

- separare prin schimb de ioni (caracterizată de legarea de suportul mecanic -silicagel sau polimer poros - a unor centri ionici activi) destinată separării substanțelor ionice;

- separare dimensională (caracterizată de lipsa interacțiilor de natură fizico-chimică, interacțiunile utilizate sunt de natură mecanică; separarea se bazează pe porozitatea fazei staționare; moleculele mari, care nu pot pătrunde în pori, sunt antrenate de faza mobilă și eluează primele; moleculele mici pătrund în porozități și sunt antrenate lent de faza mobilă; ordinea de eluție este de la molecule mari la mici; faza mobilă are o importanță secundară și se alege nu din punct de vedere al timpilor de retenție ci din punct de vedere al caracteristicilor de solubilitate sau alte proprietăților fizico-chimice);

- separare prin bioafinitate ( caracterizată de interacțiunea legăturilor moleculare Van der Waals, interacțiunii electrostatice, hidrofobe și a legăturilor de hidrogen ale moleculelor substanței cu faza staționară) utilizată pentru separarea substanțelor biologic active ;

- separare chirală (caracterizată de separarea compușilor aceleași substanțe după activitatea optică levo sau dextro-giră) utilizată numai pentru separarea substanțelor racemice.

Indiferent de tipul de umplutură, coloanele mai sunt caracterizate de: diametrul interior, lungimea acestora și diametrul particulelor fazei staționare [34,52].

### **Detectorul**

Este dispozitivul electronic care măsoară caracteristicile fizico-chimice ale fazei mobile oferind la ieșire un semnal electric proportional cu modificările care apar în faza mobilă. După principiul de măsură, acestea pot fi de tipul: spectrofotometric UV-VIS care măsoară variațiile absorbantei fazei mobile pe o lungime de undă prestabilită; cu arie de diode care măsoară spectrul de absorbție al fazei mobile în domeniile UV-VIS; cu măsurarea indicelui diferențial de refracție, de fluorescență, de conductivitate electrică, electrochimic și spectrometru de masă. Sistemul poate avea unul sau mai multe detectoare cuplate de regulă în cascadă, dacă metoda de măsură este

nedistructivă, sau în paralel în cazul metodelor de măsură distructive (electrochimic sau spectrometrul de masă). Este caracterizat de sensibilitate și de domeniul răspunsului liniar funcție de cantitatea analitului.

Inregistratorul are rolul să transforme semnalul electric furnizat de detector într-o reprezentare grafică (amplitudine/timp) numită cromatogramă, afisată de regulă pe un suport de hârtie milimetrică. Integratorul, pe lângă funcția înregistratorului, poate efectua și anumite calcule, funcție de opțiunile operatorului. Astfel integratorul poate măsura timpii de retenție ai peak-urilor, înălțimea și aria acestora, cantitatea de substanță injectată după metoda standardului intern, a standardului extern sau a procentului peak-urilor.

Sistemul de comandă, control, stocare și prelucrarea cromatogramelor este compus de regulă dintr-un microcalculator de tip personal, are rolul să ofere operatorului o interfață în limbaj evoluat pentru programarea și monitorizarea funcționării lichid-cromatografului și uneori la stabilirea cauzelor de funcționare necorespunzătoare ale acestuia.

Rezultatul analizei constă în afișarea funcției amplitudine-timp dată de detector, funcție numită prin tradiție lichid cromatogramă sau cromatogramă, asupra căreia pot fi aplicate mai multe prelucrări matematice [53,54].

## **4. Principii de chimioterapie antineoplazică. Elemente de farmacologia unor compuși citostatici**

Chimioterapia, sau tratamentul medicamentos sistemic al cancerului, s-a dezvoltat după 1950 și în special în ultimele trei decenii. Termenul de chimioterapie, introdus de Erlich la începutul secolului XX, s-a referit inițial la folosirea de substanțe chimice în tratamentul bolilor parazitare, dar ulterior a devenit sinonim cu tratamentul medical al cancerului. Chimioterapia se bazează pe aplicarea unor medicamente care prin interferarea lor cu metabolismul celular și citoliza produsă, duc la inhibiția creșterii tumorale. Aplicarea clinică a chimioterapiei este condiționată de proprietățile farmacologice ale citostaticelor, ca și o serie de factori biologici tumorali și ai organismului bolnavului.

Medicamentele citostatice acționează asupra diferitelor faze ale metabolismului celular, având ca rezultat producerea de leziuni de intensitate și gravitate diferite, care culminează cu moartea celulelor respective. Tinta de elecție a acțiunii citostaticelor este constituită de celulele tumorale, deoarece numai prin distrugerea lor se poate obține vindecarea, dar încă nu s-a ajuns la un asemenea grad de selectivitate. Din păcate, efectele citotoxice se produc în toate celulele, fie normale sau tumorale. Distrugerea celulelor normale se manifestă prin efecte toxice în special în țesuturile și organele cu rată mare de diviziune celulară: maduva osoasă hematopoetică, intestin, ficat, rinichi.

Efectul medicamentelor citostatice depinde de modul lor biochimic de acțiune, ceea ce le conferă o anumită specificitate în raport cu ciclul celular, criteriile pe care se bazează și clasificarea lor. După modul lor de acțiune biochimică, se descriu următoarele grupe de citostatice și principalii lor reprezentanți (tabel I) [55,56].

Tabel I. Clasificarea medicamentelor citostatice.

Mecanism de actiune	Reprezentanți mai importanți
Agenti alchilanți	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ciclofosfamida,</li> <li>    Ifosfamida și alte azot     iperite</li> <li>- Nitrozoureea</li> <li>- Melphalan</li> <li>- Busulphan</li> <li>- Procarbazină</li> <li>- Tio-tepa</li> </ul>
Antimetaboliți	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Metotrexat</li> <li>- 5 – fluorouracil</li> <li>- Citozin – arabinozid</li> <li>- Analogi purinici</li> </ul>
Prođuși naturali vegetali cu efect antitumoral	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alcaloizi de Vinca</li> <li>- Podofilotoxina</li> </ul>
Antibiotice antitumorale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antraciclina</li> <li>- Bleomicina</li> <li>- Actinomicina D</li> <li>- Mitomicina</li> </ul>
Enzime	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L - asparaginaza</li> </ul>
Agenti electrofilici (complexe de platină)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cisplatin</li> <li>- Carboplatin</li> <li>- Oxaliplatin</li> </ul>

In continuare vor fi prezentate date de farmacologia unor citostatice care sunt tratate pe larg în prezenta lucrare.

## 4.1. Melphalanul

Melphalanul este un derivat fenilalaninic de mecloretamină cu efect alchilant. Are formula moleculară:  $C_{13}H_{18}Cl_2N_2O_2$ , având denumirea IUPAC: 2-amino-3-[4-[bis(2-chloroethyl)amino]phenyl] - propanoic acid. Structura chimică este aratăată în figura 15 . Denumire comercială : Alkeran.

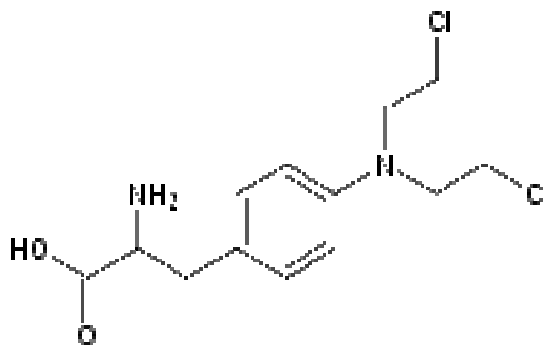


Figura 15. Melphalanul – structură.

### Indicații:

Este indicat în tratamentul mielomului multiplu și al adenocarcinomului ovarian avansat. Melphalanul este eficient în tratamentul pacienților cu policitemia vera. Melphalanul a fost utilizat ca adjuvant în tratamentul chirurgical al carcinomului de sân.

### Mod de acțiune:

Melphalanul este un agent alchilant bifuncțional.

### Farmacocinetică :

Absorbția melphalanului a fost variabilă la 13 pacienți care au primit oral doze de 0,6 mg/kg corp, prima apariție a medicamentului în plasma (limite 0-336 minute) și nivelul maxim al concentrației plasmatice (limite 70-630 ng/ml). Timpul de înjumătățire plasmatică este de 90 +/- 57 minute, iar recuperarea în urină este de 11% timp de 24 ore. Datele farmacocinetice referitoare la rolul rinichiului în eliminarea Melphalanului sunt echivoce.

### Administare:

Absorbția Melphalanului după administrare orală este variabilă. Dozele trebuie crescute cu grijă până apar primele semne de mielosupresie, pentru a se asigura atingerea unui nivel terapeutic eficient. Mielom multiplu:

numeroase scheme terapeutice au fost utilizate, dar este recomandabil să se consulte literatura de specialitate pentru detalii. Administrarea de Melphalan și Prednison este mai eficientă decât administrarea de Melphalan în monoterapie. Adenocarcinom ovarian: regimul tipic de dozaj este de 0,2 mg/kg corp/zi timp de 5 zile. Acesta se repetă la intervale de 4-8 săptămâni, sau imediat ce maduva osoasă s-a refăcut. Carcinom de sân avansat: Alkeran a fost administrat oral în doze de 0,15 mg/kg corp, sau de 6mg/m<sup>2</sup> suprafață corporală/zi timp de 5 zile și repetat la intervale de 6 săptămâni. Policitemia vera: Pentru inducția remisiunii doza obișnuită este de 6-10 mg/zi timp de 5-7 zile, urmată de administrarea a 2-4 mg/zi, până se obține un control satisfăcător al bolii. Tratamentul de întreținere se face cu doze de 2-6 mg pe săptămână. În timpul terapiei de întreținere controlul hematologic atent este esențial pentru ajustarea dozelor în funcție de rezultatele hemoleucogramei.

#### **Siguranța în utilizare:**

Alkeran este un agent citotoxic activ care trebuie folosit numai sub controlul direct al medicilor cu experiență în administrarea unor astfel de tratamente.

Utilizarea în siguranță a Alkeran tablete se va face după regulile generale de precauție în cazul medicamentelor citotoxice.

*Mutageneza:* Alkeran are efecte mutagene la animale, iar la pacienții tratați s-au observat aberații cromozomiale. *Carcinogeneza:* Melphalanul, ca și ceilalți agenți alchilanți, poate fi leucemogen la om. S-au raportat cazuri de leucemie acută după tratamentul prelungit cu Melphalan, pentru afecțiuni cum ar fi amiloidoza, melanomul malign, macroglobulinemia, sindromul de aglutinare la rece și cancerul ovarian. Un studiu comparativ la pacientele cu cancer ovarian, care au primit agenți alchilanți față de cele care nu au primit, a demonstrat ca folosirea agenților alchilanți, inclusiv a Melphalanului, crește semnificativ incidența leucemiei acute. *Teratogenicitate:* Potentialul teratogenic al Alkeran nu a fost studiat. Având în vedere proprietățile mutagenice și similitudinea structurală a compușilor teratogenici, este posibil ca Melphalan să poată cauza defecte congenitale la produsul de concepție al pacienților tratați. Utilizarea Melphalanului trebuie evitată pe cât posibil în cursul sarcinii, în mod particular în timpul primului trimestru de sarcină. În



orice caz potentialul risc pentru făt trebuie evaluat în raport cu beneficiul pentru mamă.

#### **Reacții adverse:**

Cel mai frecvent efect secundar este depresia măduvei osoase, asociată cu leucopenie și trombocitopenie. Reacții gastrointestinale (greață și vărsături) au apărut până la 30% din pacienții care au primit Alkeran. Stomatita apare rar după tratamentul cu Alkeran. Foarte rar au fost rapoarte cazuri de fibroză pulmonară fatală și anemie hemolitică apărute după tratamentul cu Melphalan. Alopecia a fost raportată, dar este rară. [55-59]

## **4.2. Doxorubicina**

Doxorubicina este o antraciclină sintetizată de *Streptomyces Peucetii*, având în structură un nucleu antrachinonic plan atașat la un zahar aminat. Este un antibiotic antitumoral. Formula moleculară a doxorubicinei este:  $C_{27}H_{29}NO_{11}$ , având denumirea IUPAC: (8S,10S)-10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene-5,12-diona. Structura chimică este prezentată în figura 16. Denumire comercială: Doxorubicin.

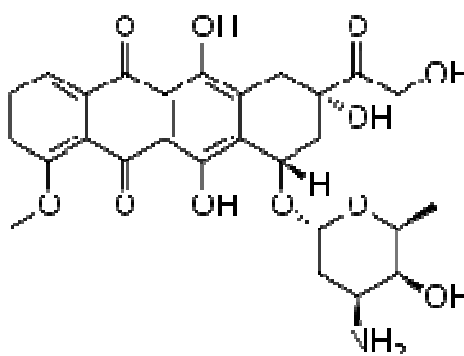


Figura 16. Doxorubicina – structură.

**Indicații:**

Doxorubicin este eficient terapeutic în regresia diverselor maladii neoplazice: leucemie limfoblastică, leucemie mieloblastică acută, tumoare Wilms, neuroblastom, osteosarcoame și sarcoame ale țesuturilor moi, carcinom de sân, ovarian, pulmonar, carcinomul vezicii biliare, carcinom tiroidian, limfoame Hodgkin și non- Hodgkin. Administrat pe cale intravezicală, Doxorubicin este eficient în tumorile vezicale superficiale, atât ca tratament adjuvant după rezecția transuretrală, cât și ca tratament propriu-zis.

**Mod de acțiune:**

Mecanismul de acțiune al clorhidratului de doxorubicin, incomplet elucidat se referă la capacitatea de a forma legături cu ADN-ul și de a inhiba sinteza acizilor nucleici.

**Farmacocinetică:**

Studiile de farmacocinetică arată că după administrarea intravenoasă de clorhidrat de doxorubicina radiomarcată este urmată de scăderea rapidă a nivelelor serice datorită legării semnificative de țesuturi. Eliminarea pe cale urinară, evidențiată prin metoda fluorimetrică, reprezintă aproximativ 4-5% din doza administrată în cinci zile. Calea principală de eliminare este calea biliară, 40-50% din doza administrată regasindu-se în bilă sau fecale șapte zile postadministrare.

**Administrare:**

Doxorubicin se administrează pe cale intravenoasă și, în cazul tratamentului locoregional al tumorilor de uroteliu pe cale intravezicală, prin intermediul unui cateter. Administrarea intravenoasă: în monoterapie, doza recomandată la adulți este de 60-75 mg/m<sup>2</sup> administrată intravenos la interval de 21 de zile. Doza recomandată se poate administra în priză unică sau divizată pe parcursul a 2-3 zile consecutive. Doza cumulativă maximă administrată pe cale intravenoasă este de 550 mg/m<sup>2</sup>. În polichimioterapie, în asocieră cu agenți chimioterapeutici cu acțiune mielosupresivă, Doxorubicin se administrează în doze uzuale de 25-50 mg/m<sup>2</sup> la interval de 3-4 săptămâni. Administrarea intravezicală: doza de Doxorubicin recomandată pentru administrare locală (intravezicală) este de 30-50 mg/institare, la intervale care variază de la o săptămână la o lună. În funcție de scopul terapeutic,

profilactic sau curativ, frecvența administrării și durata tratamentului cu Doxorubicin sunt stabilite de către medic.

#### **Siguranța în utilizare:**

Pe perioada primei cure de tratament se impune o supraveghere atentă și frecventă a pacientului. De aceea se impune spitalizarea pacienților cel puțin în prima fază a tratamentului cu Doxorubicin. Ca și în cazul tratamentului cu alți agenți citotoxici, clorhidratul de doxorubicin poate induce hiperuricemie secundară determinată de liza rapidă a celulelor neoplazice. Datorită incidenței crescute a depresiei medulare, se impune monitorizarea numărului leucocitelor, eritrocitelor și trombocitelor. Toxicitatea hematologică poate necesita reducerea dozelor de Doxorubicin sau întreruperea tratamentului. Mielodepresia severă persistentă poate determina suprainfecții și/sau hemoragii. De asemenea clorhidratul de doxorubicin determină creșterea toxicității radioterapiei asupra miocardului, mucoaselor, pielii și ficatului. Datorită creșterii toxicității dozelor uzuale recomandate în cazul producerii insuficienței hepatice, înainte de începerea tratamentului și eventual în timpul acestuia se recomandă efectuarea de examene de laborator de rutină (SGOT, SGPT, fosfataza alcalină, bilirubina, BSP), pentru a controla funcția hepatică. În scopul evitării contactului soluției de Doxorubicin cu pielea, la prepararea soluției medicamentoase se recomandă utilizarea mănușilor de protecție. În caz de contact accidental, se va proceda imediat la spălarea atentă cu apă și săpun.

#### **Reacții adverse:**

Reacțiile adverse majore, limitante ale dozelor de Doxorubicin administrate sunt: mielosupresia și cardiotoxicitatea. Reacții adverse cutanate: Cel mai frecvent efect advers este alopecia, care se manifestă la aproximativ 85% din cazurile tratate. Reacții adverse gastrointestinale: grețuri și vărsături acute se pot produce frecvent și pot fi severe. Mucozite (stomatita și esofagita) se pot manifesta la aproximativ 5-10 zile de la începerea tratamentului. Pot fi grave, conducând la ulcerații și reprezintă originea infecțiilor severe. Ulcerațiile și necrozele colonului, în special ale cecum-ului, conduc la sângerare sau la infecții severe care pot fi letale [55,56,59,60].

### 4.3. Metotrexatul

Metotrexatul este cel mai utilizat antagonist al acidului folic, diferind structural de acesta prin substituirea unui grup amino cu un grup hidroxil în poziția 4 a inelului pteridinic. Astfel metotrexatul devine un inhibitor al dihidrofolat-reductazei, enzimă care determină menținerea folatului intracelular în stare redusă, aceasta fiind implicată în sinteza nucleotidelor purinice. Formula moleculară a metotrexatului este:  $C_{20}H_{22}N_8O_5$ , având denumirea IUPAC: (2S)-2-[(4-[(2,4-diamino-7,8-dihydropteridin-6-yl)methyl](methyl)amino}phenyl) formamido] pentanedioic acid. Structura chimică este prezentată în figura 17. Denumire comercială: Methotrexat.

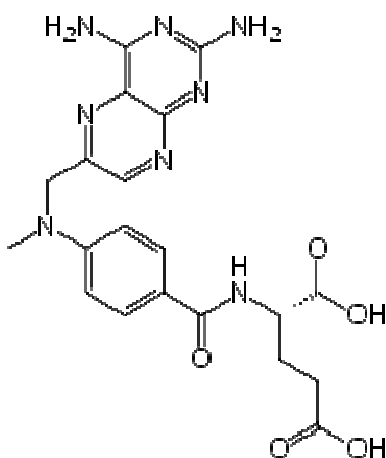


Figura 17. Metotrexat – structură.

#### Indicații:

Metotrexatul prezintă o specificitate deosebit de ridicată față de corioepiteliom, în care asigură un procent ridicat de vindecări, chiar în stadii avansate. Mai este indicat în limfosarcoame (în special la copii), în unele tumori inoperabile ale capului și gâtului, de asemenea, în mycosis fungoides. Poate fi folosit ca tratament paliativ în leucemia acută și subacută, cu efecte

dintre cele mai favorabile în leucemia limfoblastica acută, în particular în meningitele leucemice, în special la copii (administrat intratecal).

#### **Mod de acțiune:**

Metotrexatul este un antineoplazic citostatic, acționând ca antimetabolit al acidului folic, printr-un mecanism de inhibiție competitivă a reductazei acestuia, mecanism prin care interferează cu sinteza de novo a acizilor nucleici și cu replicarea celulară la nivelul țesuturilor cu proliferare activă.

#### **Farmacocinetică:**

După administrarea orală, în doze mici, metotrexat este rapid absorbit din tractul gastrointestinal. Dozele mai mari sunt mai puțin bine absorbite. Prin administrare parenterală este complet și rapid absorbit. Substanța se elimină la nivel renal, în proporție de aprox. 80% în 24 de ore. Administrarea repetată a preparatului mărește remanența sanguină a acestuia, ca urmare a unei acumulări în țesuturi. Metotrexatul nu traversează practic, bariera hematoencefalică, dar prin administrare intrarahidiană, se pot realiza concentrații ridicate în lichidul cefalo-rahidian.

#### **Administrare:**

Parenteral: intramuscular, intravenos, intraarterial și intratumoral. Tratamentul inițial se aplică numai la bolnavi spitalizați, sub control zilnic riguros al tabloului sanguin. În corioepiteliom (și în tumorile trofoblastice înrudite) se utilizează serii de tratament de câte 5 zile, administrându-se zilnic câte 5-10 mg (doza totală 25-50 mg) în injecții intramusculare. În leucemii, doza unică la copiii mici este de 1,25-2,5 mg, la copii mai mari 2,5-5 mg iar la adulți 5-10 mg; aceste doze se administrează de 3-6 ori pe săptămână în funcție de toleranța individuală și de gravitatea bolii. În meningitele leucemice se administrează intratecal, 0,2-0,4 mg/kg corp, o singură dată sau de mai multe ori, la interval de 2-7 zile, până la normalizarea citologiei lichidiene. În limfoamele maligne ne-Hodgkiniene se administrează 3 g/m<sup>2</sup> la intervale de o lună. Doze de 300 mg - 10 g/m<sup>2</sup> sunt uneori utilizate, dar numai cu administrare concomitentă de acid folic și asigurarea unei hiperdiureze alcaline (în servicii foarte specializate). Oral: în coriocarcinoame, se efectuează în mod uzual o cură de 2,5-10 mg/zi (1-4 comprimate), timp de 5 zile.

**Siguranța în utilizare:**

Poate genera anomalii congenitale; tulburări funcționale hepatice sau renale, precum și afectarea măduvei hematogene. Metotrexatul este teratogen și mutagen.

**Reacții adverse:**

Reacții ale pielii (rash eritematos, prurit, urticarie, fotodermatoză, depigmentare, alopecie, acnee), ale sângelui (deprimarea măduvei hematogene, leucopenie, trombopenie, anemie, hipogamaglobulinemie, sângerări cu sediu variabil, septicemie), ale aparatului digestiv (gingivite, faringite, stomatite, anorexie, vărsături, diaree, hematemeză, melenă, ulcerații gastrointestinale sângerânde, enterite, modificări toxice ale ficatului), ale aparatului uro-genital (insuficiență renală, azotemie, cistită, hematurie; ovogeneză și spermatogeneză imperfectă, oligospermie tranzitorie, dismenoree, sterilitate, nefropatii grave) și ale sistemului nervos central (cefalee, amețeli, tulburări vizuale, afazie, hemipareză, convulsii după administrarea intrarahidiană. De remarcat este faptul că fenomenele toxice ale produsului debutează mai ales prin stomatită, gingivite și diaree . [55,56,59,61]

#### 4.4. Ciclofosfamida

Ciclofosfamida este un derivat de mecloretamină cu proprietăți alchilante.

Formula moleculară a ciclofosfamidei este:  $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ , având denumirea IUPAC: *N,N*-bis(2-chloroethyl)-1,3,2-oxazaphosphinan-2-amine 2-oxid. Structura chimică este prezentată în figura 18. Denumire comercială: Ciclofosamid, Endoxan.

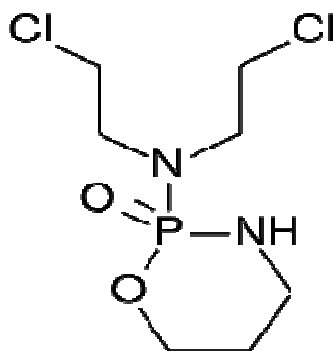


Figura 18. Ciclofosfamida – structură.

### **Indicații:**

Afecțiuni mieloproliferative, limfoproliferative și neoplasme cu diferite localizări. Ca antineoplazic, este indicat în: limfoame, incluzând limfomul Burkitt; boala Hodgkin; leucemii acute și cronice; mielom multiplu; mycosis fungoides în stadiu avansat; unele tumori solide.

### **Mod de acțiune:**

Ciclofosfamida este un antineoplazic făcând parte din clasa agenților alchilanți, derivați de azotiperită. În organism, se transformă prin metabolizare la nivelul microsomilor hepatici în metaboliți activi cu proprietăți similare azotiperitei. Produsul este mai puțin toxic decât congenerii de azotiperită și alți agenți alchilanți și este eficient atât prin administrare orală, cât și parenterală.

### **Farmacocinetică:**

După administrare orală sau parenterală, ciclofosfamida se metabolizează la nivelul ficatului în metaboliți activi, din care 50% se leagă de proteinele plasmatică. Sub această formă este transportată la țesuturi unde realizează o concentrație maximă eficientă terapeutică. Timpul de înjumătățire plasmatică a ciclofosfamidei este de 9 ore. Se elimină renal nemodificată chimic în proporție de 30% fiind prezentă în urină la 72 de ore de la administrare.

### **Administrare:**

Produsul se administrează intravenos prin injecții sau perfuzii, intramuscular, intraarterial, intrapleural, intraperitoneal. Sunt de preferat căile

de administrare care să asigure transportul substanței la nivel hepatic pentru metabolizare.

Dozele pentru tratamentul neoplasmelor *la adulti* pot fi: 2,6 mg/kg/zi, în doză unică i.v. sau 10-16 mg/kg/săptămână. *La copii*, în cazul neoplasmelor, dozele sunt: 2-8 mg/kg/zi, i.v.

#### **Siguranța în utilizare:**

Carcinogeneza, mutageneza, teratogeneza: neoplasme secundare urinare, medulare și limfatice pot să apară la pacienții tratați anterior cu ciclofosamidă. Deasemenea a fost descris efectul leucemogen al ciclofosamidei.

#### **Reacții adverse:**

În ordinea descrescătoare a incidenței, pot să apară:  
Aparat reproductiv: sterilitate la ambele sexe, uneori reversibilă; amenoree și fibroză ovariană; oligospermie sau azoospermie, fără alterarea libidoului.  
Aparat digestiv: greață, vomă, anorexie, stomatite, mai rar dureri abdominale, diaree, colite hemoragice, care dispar la întreruperea tratamentului.  
Sânge: leucopenie, în funcție de doză - valori mai mici de 2 000 celule/mm<sup>3</sup> apar la doze inițiale mari; ocazional anemie și trombocitopenie.  
Aparat urinar: cistita hemoragică, uneori fatală; fibroza vezicii urinare, reversibile la încetarea tratamentului. Infecții și diminuarea răspunsului la testele cutanate de hipersensibilizare prin efectul imunodepresor al produsului.

Aparat respirator: fibroză pulmonară. Modificări metabolice: hiperuricemie prin creșterea catabolismului purinic, creșterea eliminării sodiului și mixedem la doze mari de produs. [55,56,59,62]

## **4.5. Ifosfamida**

Ifosfamida este un izomer al ciclofosamidei, sintetizat în Germania în 1960, care diferă de aceasta prin mutarea unui radical cloroetil la azotul



inelului oxafosforic. Are acțiune alchilantă. Formula moleculară a Ifosfamidei este:  $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ , având denumirea IUPAC: (RS)-3-(2-Chlorethyl)- 2-[(2-chlorethyl)amino]- 2H-1,3,2-oxazaphosphinan-2-oxid. Structura chimică este prezentată în figura 19. Denumire comercială: Holoxan.

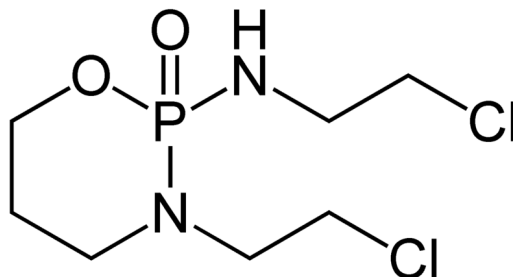


Figura 19. Ifosfamida – structură.

#### **Indicații:**

Este indicat în tumorile inoperabile sensibile la ifosfamidă, cum sunt: carcinomul bronșic, carcinomul ovarian, tumorile testiculare, sarcoamele țesuturilor moi, cancerul mamar, carcinomul pancreatic, carcinomul endometrial, limfoamele maligne.

#### **Mod de acțiune:**

Este asemănător cu cel al ciclofosfamidei. Ifosfamida suferă o hidroxilare hepatică mai lentă în etapa inițială și o rată mai mare de declorilare a lanțului alchilant, ceea ce determină scăderea marcată a efectului alchilant.

#### **Farmacocinetica:**

După administrare, se absoarbe în proporție de 100% și are un timp de înjumătățire plasmatică de 5-6 ore. Transformarea metabolică este identică cu cea a ciclofosfamidei. Aproximativ 50% din ifosfamidă se elimină renal nemodificată.

#### **Administrare:**

În general Holoxan se administrează intravenos în doze divizate de 1,2 - 2,4 g/m<sup>2</sup> suprafață corporală (până la 60 mg/kg corp) zilnic, timp de 5 zile consecutiv (durata acestor perfuzii este de 30 - 120 min, depinzând de

volumul de perfuzat. Holoxan poate fi administrat și în doză unică, de obicei sub formă de perfuzie prelungită timp de 24 ore. Doza administrată este de 5 g/m<sup>2</sup> suprafață corporală (125 mg/kg corp) și nu trebuie să depășească 8 g/m<sup>2</sup> suprafață corporală (200 mg/kg corp) pe ciclu terapeutic. Administrarea în doză unică poate produce efecte hemato-, nefro-, uro- și neurotoxice crescute. Se va acorda o deosebită atenție soluției de ifosfamidă, care nu va trebui să depășească 4%. În terapia combinată cu alte citostatice, dozele de ifosfamida trebuie adaptate tipului de schemă terapeutică. Observații: datorită urotoxicității sale, ifosfamida trebuie administrată în principiu împreună cu mesna.

Ciclurile terapeutice se pot repeta la fiecare 3-4 săptămâni. Aceste intervale vor depinde de numărul leucocitelor și de recuperarea pacientului în urma unor efecte secundare. Administrarea de uroprotectori de tipul mesna (Uroprotector, Uromitexan) va trebui menținută. Determinarea la intervale regulate a numărului de leucocite, a funcției renale și analiza urinei inclusiv examinarea sedimentului urinar sunt absolut necesare.

#### **Siguranta in utilizare:**

Carcinogeneza, mutageneza, teratogeneza: neoplasme secundare urinare, medulare și limfatice pot să apară la pacienții tratați cu ifosfamidă.

#### **Reactii adverse:**

Pacienții care efectuează tratament cu Holoxan pot acuza următoarele reacții adverse: Mielosupresie - pot apărea diferite grade de mielosupresie (leucopenie, trombocitopenie, anemie) depinzând de doza de ifosfamidă. De obicei trebuie luate în considerare leucopenia (cu riscul infecțiilor potențial letale) și trombocitopenia (cu riscul hemoragiilor). Anemia apare de obicei după mai multe cicluri de chimioterapie. Tratamentele în care ifosfomida se combină cu alți agenți mielosupresori pot necesita ajustarea dozei. Tratamentele în doză unică, cu o cantitate crescută de ifosfamidă conduc mult mai frecvent la leucopenie decât tratamentele cu doze fractionate. Se poate prevedea o mielosupresie mai accentuată la pacienții anterior tratați (chimio- sau radioterapic) sau la cei cu insuficiența renală. În cazul tratamentului cu ifosfamidă, ca și cu oricare alt agent antineoplazic, precum și în intervalele dintre ciclurile de chimioterapie, trebuie efectuată numărătoarea leucocitelor și

formula leucocitară. Depinzând de tabloul hematologic, se vor face ajustările necesare ale dozei de Holoxan [55,56,59,63].

## **5. Măsurarea și erorile de măsurare**

### **5.1. Importanța și scopul teoriei erorilor de măsurare**

Problema aproximărilor, erorilor și deci a preciziei legate de calculul numeric a prezentat din totdeauna o importanță deosebită în inginerie, știință și matematica aplicată. O recunoaștere a acestui fapt este și aceea că toate lucrările de bază din domeniile amintite acordă atenția cuvenită preciziei calculelor.

Activitatea concretă a omului nu poate fi imaginată fără soluționarea de probleme, presupunând aspecte de aproximare, de erori și de precizie.

Calitatea informațiilor obținute din măsurători este funcție directă de volumul observațiilor și precizia aparatelor și instrumentelor de măsurat. Se impune așadar, ca pornind de la scopul pentru care sunt efectuate măsurătorile să se stabilească valorile corespunzătoare ca mărime și ca precizie, luând însă în considerare aspectul economic referitor la volumul observațiilor, necesar și suficient, care se impune [64,65].

Dacă o mărime se măsoară de mai multe ori, de fiecare dată se obține o altă valoare chiar dacă măsurătorile se desfășoară în aceleași condiții de către același operator și cu instrumente de mare precizie. Cauza acestor nepotriviri de valori se datorează erorilor care afectează întotdeauna o măsurătoare, făcând ca valoarea adevărată a mărimii măsurate să nu poată fi cunoscută niciodată.

Practic neputând fi determinată valoarea adevărată a mărimii măsurate se determină o valoare apropiată de cea adevărată într-un grad mai mare sau mai mic funcție de scopul pentru care se execută măsurătorile. Apropierea

mărimii determinate față de valoarea adevărată a acesteia caracterizează precizia determinării.

Găsirea unei soluții optime pentru o operație de măsurare nu este o problemă simplă deoarece trebuie luate în considerare o serie de factori. Cel mai important este însă criteriul dat de eroarea de măsurare care determină cerințele economice și tehnice puse în fața instrumentului de măsurare [66,67].

## 5.2. Considerații generale privind procesul de măsurare

Măsurarea este prin excelență o activitate umană. În sensul cel mai general prin măsurare se caută obținerea unei informații de un caracter deosebit – informația de măsurare – de la obiectul, fenomenul sau procesul investigat.

Măsurarea este operația de evaluare cantitativă a unei mărimi pe cale experimentală, prin compararea directă sau indirectă cu o mărime de aceeași natură ce reprezintă un reper dintr-o scară [66].

Cu alte cuvinte, mărimii de măsurat  $M$  îi corespunde un multiplu  $M_m$  al unității de măsură  $U$ .

$$M = M_m \cdot U \quad (5)$$

Ecuția (5) reprezintă ecuația fundamentală a măsurării.

Prin mărime se înțelege o anumită proprietate, caracteristică sau atribut al unui material, fenomen sau proces, care este bine definit și care poate varia cantitativ.

Mărimea de măsurat este un parametru fizic care poate fi evaluat prin măsurare, comparare sau reperare, exprimându-se întotdeauna sub formă numerică.

Unitatea de măsură este mărimea care servește ca măsură de bază pentru toți parametrii de același fel. Materializarea fizică a unității de măsură este etalonul.

O mărime poate fi considerată principial măsurabilă dacă sunt îndeplinite următoarele două premise fundamentale:

- mărimea să fie observabilă (condiție necesară);
- pentru mărimea respectivă poate fi construită o scală de măsurare (condiție suficientă).

O mărime principial măsurabilă devine practic măsurabilă dacă pentru aceasta a fost construită o scală adecvată de măsurare și au fost create condițiile necesare realizării practice a observabilității, ceea ce în cazul măsurătorilor instrumentale înseamnă existența unor traductoare capabile să preleveze un semnal purtător al informației de măsurare.

Pentru a putea efectua măsurarea cele două premise fundamentale devin:

- mărimea de măsurat trebuie să fie definită univoc; ea trebuie să constituie o mulțime ordonabilă, adică o mulțime în care să se poată defini relațiile de egal, mai mic și mai mare, între elementele ei;
- unitatea de măsură trebuie să fie stabilită printr-o convenție, astfel încât să poată fi determinată cu precizie, reprodusă și păstrată cu ușurință [66].

În conformitate cu cele de mai sus, considerând măsurandul o mulțime de definiție, finită sau infinită,  $\{M\}$  ale cărei elemente  $M_j \in \{M\}$  corespund stărilor posibile în care se poate găsi caracteristica ce constituie obiectul măsurării, se poate introduce următorul model matematic al procesului de măsurare. Dacă  $\{Y\}$  este o mulțime de numere reale care permite ca prin intermediul unor proceduri speciale – proceduri de scalare – să se evidențieze una sau mai multe funcții de scalare ( $f$ ), având proprietatea că fiecărui element  $M_j \in \{M\}$  să îi pună în corespondență un anumit  $Y_j \in \{Y\}$ , atunci procesul propriu-zis de măsurare constă în identificarea corespondentului  $M_j$  prin funcția  $f$ . Informația de măsurare este deci un tip specific de informație, conținând rezultatul identificării unui măsurand prin intermediul unei funcții scalare adecvate.

Se poate afirma că rolul tehnicii măsurărilor nu se rezumă doar la obținerea unor informații cantitative cu privire la procesele examinate ci are un

rol important și în procesul cunoașterii propriu-zise, contribuind la stabilirea unor legități exprimate sub formă matematică. [68,69]

Procesul de măsurare definit conform relației (5) se poate reprezenta în mod idealizat printr-o schemă bloc (figura 20) din care rezultă că neglijând influențele parazite, valoarea măsurată sau rezultatul măsurării este influențat doar de măsurand și etalon.

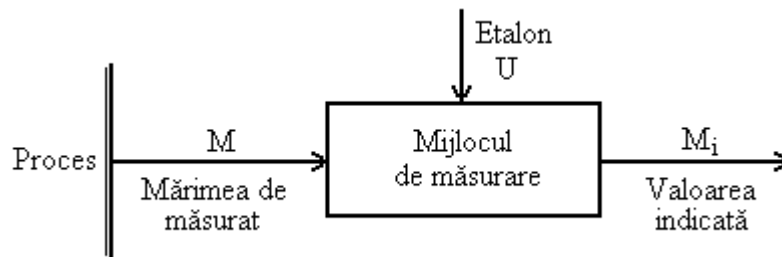


Figura 20. Schema bloc pentru operația de măsurare ideală

În figura 21 este prezentată schema bloc a unui sistem de măsurare real.

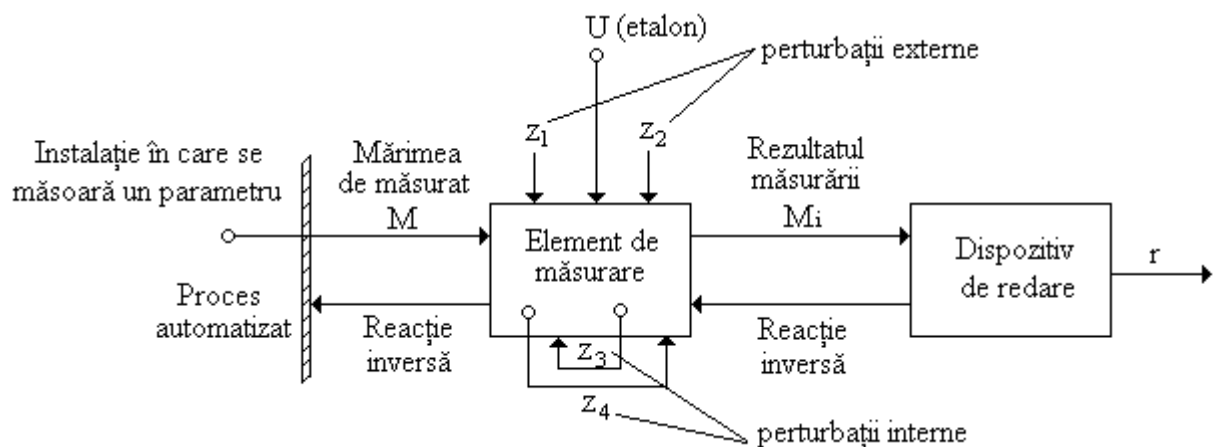


Figura 21. Schema bloc a unui sistem de măsurare real

Informația despre mărimea de măsurat, caracteristică unui proces oarecare este prelucrată în instalația de măsurare și redată de dispozitivul de indicare [70,71].

Stabilirea corespondenței dintre valoarea măsurandului și unitatea de măsură se face cu ajutorul unui mijloc de măsurare, care poate fi definit ca fiind un mijloc tehnic pentru obținerea, prelucrarea, transmiterea și stoparea

unor informații de măsurare, permițând obținerea unei informații dependente de mărimea de măsurat, accesibilă simțurilor noastre sau compatibilă cu anumite sisteme de prelucrare a datelor.

Instrumentul de măsurare cuprinde totalitatea elementelor conectate în cadrul lanțului de măsurare (traductoare, amplificatoare, calculatoare, etc.) cât și un dispozitiv de redare (indicare) a rezultatului măsurării. În cel mai simplu caz un instrument de măsurare se reduce la un aparat de măsurare sau o măsură (etalonul) care materializează unitatea de măsură a unei mărimi.

Un sistem de măsurare reprezintă o succesiune de mijloace tehnice cu ajutorul cărora se face operația de măsurare. Schematic un sistem de măsurare real cuprinde elementele prezentate în figura 22.

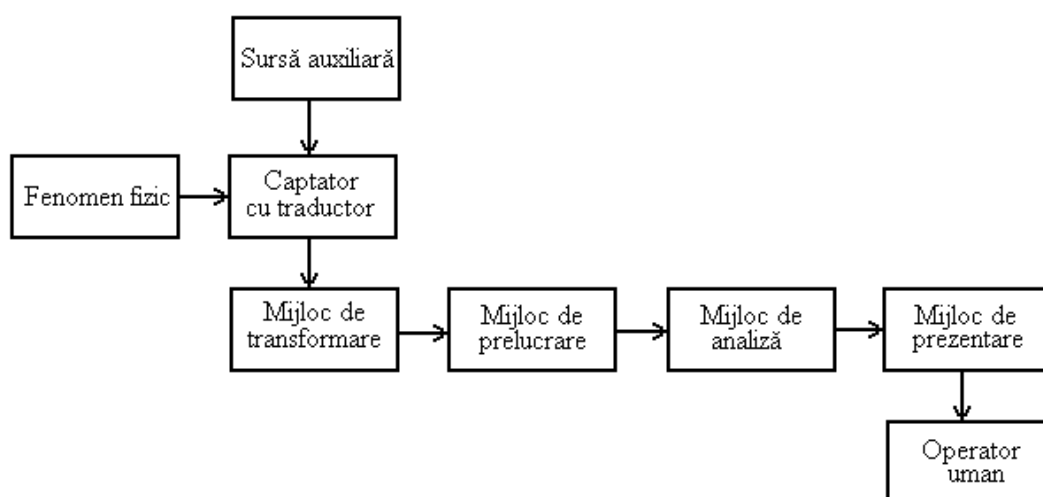


Figura 22. Schema unui sistem de măsurare

Dintre toate sistemele de măsurare s-au impus lanțurile de măsurare electrice, la care transmiterea, prelucrarea, analiza și prezentarea semnalului se face pe cale electrică.

Cele mai evoluate sisteme de măsurare sunt sistemele computerizate pentru achiziții de date [72,73].

Sistemele computerizate pentru achiziția date s-au impus datorită avantajelor pe care le prezintă:

- păstrarea preciziei semnalului pe parcursul prelucrării sale în lațul de măsurare (caracteristică sistemelor digitale față de cele numerice);

- eliminarea greșelilor de citire analogică datorată condițiilor specifice de iluminare, contrast, etc.;
- micșorarea erorii de citire în regim dinamic;
- în transmiterea semnalelor numerice se evită apariția unor erori suplimentare;
- posibilitatea stocării și prelucrării mult mai facile și mai complexe a rezultatelor experimentale;
- flexibilitatea și portabilitatea sporite, prin reconfigurarea sistemelor computerizate în funcție de tipul semnalelor provenite de la traductoare.

După modul de prezentare al măsurătorilor care se efectuează pentru a deduce valorile mărimilor ce interesează, se pot distinge trei feluri de măsurători:

- măsurători directe – fiecare din măsurători reprezintă valoarea mărimii măsurate;
- măsurători indirecte – fiecare din măsurările făcute contribuie la determinarea mai multor mărimi care nu se măsoară în mod direct; acestea sunt legate de mărimile măsurate direct prin relații matematice;
- măsurători condiționate – reprezintă un caz particular de măsurători directe și anume când mărimile măsurate direct nu sunt mărimi independente, ci sunt legate prin anumite relații de condiție.

În raport cu condițiile în care sunt executate, măsurătorile pot fi de două tipuri:

- măsurători de aceeași precizie – când , de exemplu, în cazul măsurătorilor directe, acestea s-au efectuat cu aceleași instrumente, în același mod, etc., astfel încât li se acordă la toate aceeași încredere;
- măsurători de precizii diferite – când, de exemplu, în cazul măsurătorilor directe, acestea s-au executat cu instrumente diferite, s-au aplicat metode de lucru diferite, etc., aceasta



presupune să nu li se poată acorda la toate aceleași încredere, ci din contră, să se considere că unele sunt mai precise decât altele [74].

### **5.3. Caracteristicile mijloacelor de măsurare**

Mijloacele de măsurare prezintă următoarele caracteristici: statice; metrologice; tehnice; dinamice.

Caracteristicile statice sunt: domeniul de măsurare; limita de supraîncărcare; limita de siguranță; constanta sistemului de măsurare; caracteristica statică de etalonare.

Domeniul de măsurare este domeniul de valori ale mărimii de măsurat pentru care erorile de măsură sunt reglementate prin norme legale individuale.

Limita de supraîncărcare este valoarea maximă a mărimii de măsurat pentru care după revenirea în limitele domeniului de măsurare nu se modifică caracteristicile statice sau dinamice ale elementului de măsurare [76].

Limita de siguranță este valoarea maximă admisibilă a mărimii de măsurat la care poate fi expus elementul de măsurare fără a fi distrus, cu toate că apar modificări ireversibile ale caracteristicii statice a acestuia.

Constanta de măsurare este raportul dintre valoarea mărimii de măsurat și valoarea citită pe scala aparatului. Valoarea mărimii măsurate se obține înmulțind indicația obținută cu constanta de măsurare. În practică pot să apară două, trei, scale pentru domenii diferite de valori ale aceluiași parametru.

Caracteristica statică este dependența redată grafic, matematic sau tabelar dintre indicația aparatului și mărimea măsurată.

Caracteristicile metrologice sunt: precizia; justețea; fidelitatea; sensibilitatea; pragul de sensibilitate; domeniul de histereză.

Precizia reflectă gradul de exactitate al rezultatelor măsurărilor. Cea mai utilizată formă de exprimare a preciziei este cea ca un raport între valoarea erorii maxime și valoarea domeniului de măsurare. Acest raport se

numește eroare de bază relativă și se exprimă în procente. Clasa de precizie reprezintă de fapt mărimea erorii de bază relativă iar precizia erorii de bază relativă exprimată procentual.

Justețea este proprietatea de a da rezultate apropiate de valoarea adevărată a mărimii de măsurat.

Fidelitatea se referă la proprietatea unui element de măsurare de a avea variații cât mai mici ale rezultatului la variația repetată a aceleiași mărimi în condiții identice de măsurare.

Sensibilitatea este proprietatea de a percepe și a reda variații cât mai mici ale mărimii de măsurat. În cadrul elementelor de măsurare cu caracteristica statică liniară, sensibilitatea este chiar panta caracteristicii statice care este egală cu raportul dintre variația indicației scalei dispozitivului de redare și variația corespunzătoare a mărimii de măsurare  $M$ .

Pragul de sensibilitate se definește ca cea mai mică valoare a mărimii de măsurat  $M$  pentru care se obține o variație sesizabilă la indicația dispozitivului de redare.

Domeniul de histereză este diferența maximă a valorilor indicației dispozitivului de redare care se obține pentru aceleași valori a mărimii de măsurat  $M$ , dacă la această valoare se ajunge printr-o variație lentă crescătoare sau descrescătoare a mărimii de măsurat  $M$ .

Caracteristicile tehnice sunt determinate de principiul de funcționare, formă, gabarit și modul în care influențează măsurarea factorii perturbatori.

Aceste caracteristici sunt: stabilitate; inerție; generalitate; fiabilitate.

Stabilitatea constă în menținerea caracteristicilor metrologice în timp, indiferent de condițiile externe.

Inerția reflectă modul în care elementul de măsurare răspunde în timp la variația mărimii de măsurat.

Generalitatea este caracteristica unui element de măsurare de a putea fi înlocuit în determinări similare cu echipamente de același fel cu aceleași caracteristici metrologice și tehnice.

Fiabilitatea este proprietatea care se exprimă prin probabilitatea ca un mijloc de măsurare să-și îndeplinească funcția impusă în anumite condiții prescrise în cursul unei perioade de timp date.

Caracteristicile dinamice sunt reflectate prin răspunsurile la semnal tip a elementelor de măsurare. Cel mai des este utilizat răspunsul la semnal treaptă. Cel mai important indicator ce caracterizează proprietățile dinamice este constanta de timp  $T$  care este obligatoriu să fie inserată în orice prospect în care este prezentat elementul de măsurare. Această constantă  $T$  reflectă întârzierea transmiterii informației în interiorul instalației de măsurare de la locul în care se află montat elementul sensibil la scala dispozitivului de redare.

Dacă în structura elementului de măsurare există și elemente de reglare de întârziere pură, acestea trebuie să se specifice, având ca și caracteristică dinamică timpul mort,  $T_m$  [76].

#### 5.4. Clasificarea și definirea erorilor

Eroarea poate fi definită ca fiind diferența dintre o valoare reală oarecare și rezultatul găsit pentru aceasta prin calcul sau măsurare (experimental) [74,77].

Eroarea absolută este diferența dintre valoarea adevărată a unei mărimi și valoarea obținută prin măsurare sau calcul, iar valoarea erorii relative este dată de raportul dintre eroarea absolută și valoarea adevărată.

În ansamblu, în funcție de cauzele care le generează, erorile se pot clasifica astfel:

- erori instrumentale;
- erori de metodă;
- erori datorate operatorului uman.

Din punct de vedere al dependenței lor față de măsurand, erorile se pot clasifica în:

- erori aditive, care nu depind de valoarea măsurandului;
- erori multiplicative a căror mărime depinde de valoarea măsurandului.

Erorile instrumentale sunt date de ansamblul erorilor de măsurare datorate mijloacelor tehnice prin intermediul cărora se obțin informațiile de măsurare.

Erorile de metodă se datorează imperfecțiunii metodelor utilizate pentru obținerea informației de măsurare.

Erorile datorate operatorului uman efector al măsurării și/sau adresant al informației de măsurare depind de calitățile și condiția psiho-fizică a acestuia și în mod deosebit de atenție, deprinderi specifice, acuitate senzorială.

Erorile instrumentale se pot clasifica la rândul în: erori statice; erori dinamice.

Erorile statice rezultă la un regim staționar constant al măsurandului. Regimul staționar al măsurandului corespunde situației în care derivatele acestuia în raport cu timpul sunt egale cu zero. Ele se datorează modificării caracteristicii de convertire a mijlocului de măsurare sau funcționării după o caracteristică de convertire nominală diferită de cea reală.

Erorile dinamice apar la un regim variabil al măsurandului și au cauze multiple. Sunt determinate atât de caracteristicile mijloacelor și metodelor de măsurare utilizate cât și de natura variației măsurandului. Astfel forțele masice, sistemele de amortizare, capacitățile calorice a părților componente a aparatului mecanice, condensatorii și rezistențele ohmice sunt câteva surse de erori dinamice [78].

Dacă o instalație de măsurare trebuie să măsoare o mărime variabilă în timp există întotdeauna o eroare dinamică deoarece semnalul de ieșire urmărește inexact variația semnalului de intrare. Aceste erori sunt mai mari dacă în componența instalației de măsurare intră elemente de reglare cu timp mort. Din această categorie fac parte analizoarele de gaze și lichide care trebuiesc montate la o anumită distanță de utilaj sau instalație, conductele de legătură sunt elemente de întârziere pură ce introduc timpi morți în comportarea dinamică a acestor echipamente.

Din punct de vedere al formei de manifestare și al cauzelor care le produc, erorile statice se pot grupa în trei tipuri de erori: erori sistematice; erori întâmplătoare sau aleatoare; erori grosolane.

Erorile sistematice sunt determinate de factori care acționează în același mod la o repetare a măsurărilor, rămân constante în condiții identice de operare. Acestea apar în mod sistematic în timpul operației de măsurare și se clasifică în două clase: după sursa de apariție și după aspectul analitic. Erorile sistematice au o acțiune unilaterală și deosebit de periculoasă prin efectul lor cumulativ asupra operației de măsurare, motiv pentru care trebuie eliminate.

Erorile întâmplătoare sau aleatoare sunt determinate de factori care acționează aleatoriu de la o măsurare la alta, chiar dacă măsurătorile sunt efectuate practic în condiții identice. Acestea se datorează modificării condițiilor exterioare sau acțiunii unor mărimi de perturbație exterioare accidentale. Caracteristica principală a acestor erori constă în faptul că acestea diferă între ele atât ca mărime cât și ca semn, fără a rezulta din înșiruirea datelor vreo regulă sistematică de ordonare. Aceste erori se repartizează după legi statistice ca de exemplu curba lui Gauss. În marea majoritate a situațiilor mărimea adevărată a erorii întâmplătoare rămâne necunoscută deoarece rămâne necunoscută valoarea adevărată a mărimii măsurate.

Erorile grosolane intervin atunci când se manifestă neglijențe fie în realizarea condițiilor de măsurare, fie în aplicarea corectă a metodelor de măsurare.

Erorile sistematice și cele întâmplătoare determină exactitatea, respectiv precizia măsurărilor.

Se poate spune despre o serie de măsurători repetate că este exactă dacă diferența dintre media aritmetică a măsurărilor și valoarea reală este cât mai mică posibil.

O serie de măsurători repetate este precisă dacă diferențele dintre valorile găsite și media aritmetică sunt cât mai mici posibile (grupare strânsă, reproductibilitate bună) [78].

Având în vedere modul de definire al diverselor erori prezentate mai sus, se remarcă principalele caracteristici ale erorilor de măsurare:

- se pot deduce prin calcul cunoscând cauzele lor;
- se pot elimina numai prin schimbarea principiului de măsurare;
- nu se pot observa sau elimina prin schimbarea aparatului de măsurat cu altul de același tip, prin schimbarea operatorului sau repetarea măsurărilor;
- pentru măsurări în condiții identice au o mărime constantă și același semn.

## **5.5. Estimarea valorii adevărate a unei mărimi măsurate**

Pentru determinarea calitativă a uneia sau mai multor mărimi pe cale experimentală, se efectuează un număr finit de măsurări cu o suficientă precizie, menținând aceleași condiții de măsurare [67].

Prin măsurarea repetată a unei mărimi  $M$  se obține un șir de valori  $M_1, M_2, \dots, M_m$ , fiecare din ele diferind de valoarea adevărată  $M_A$  printr-o eroare necunoscută  $e_x$ . Se pune problema de a determina valoarea adevărată cu o eroare cât mai mică.

Rezultatul corect al unei măsurări se poate obține aplicând rezultatului brut al măsurării o corecție egală cu eroarea determinabilă luată cu semn schimbat. Astfel valoarea adevărată a mărimii măsurate se poate exprima conform relației (6).

$$M_A = M_n \pm e_x ; \quad n = 1, m. \quad (6)$$

Studiul global al erorilor aleatorii se bazează pe metode ale statisticii matematice. Astfel, parametrii statistici cei mai importanți sunt:

- media aritmetică:  $\bar{M}_a = \frac{1}{m} \sum_{n=1}^m M_n$ ; (7)

- media geometrică:  $\bar{M}_g = (M_1 \cdot M_2 \cdot \dots \cdot M_m)^{\frac{1}{m}}$  (8)

- media pătratică:  $\bar{M}_p = \sqrt{\frac{(M_1^2 + M_2^2 + \dots + M_m^2)}{m}}$  (9)

Pentru stabilirea celei mai probabile valori a mărimii măsurate, care estimează valoarea adevărată, trebuie să fie cunoscută repartiția rezultatelor măsurării, respectiv repartiția frecvențelor erorilor aleatorii.

În funcție de tipul fenomenului studiat și de ipotezele făcute s-au obținut diferite forme ale legilor de repartiție: repartiție normală, binomială, Poisson, etc. Dintre acestea cea mai utilizată este legea repartiției normale [67,68].

Conform teoriei erorilor de măsurare, precizia de măsurare a unei mărimi poate fi evaluată prin mai mulți indicatori, denumiți indici ai preciziei de măsurare:

- eroarea standard:  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^m (M_n - \bar{M}_a)^2}{m-1}}$  (10)

- eroarea probabilă:  $\varepsilon = 0,6745 \cdot \sigma$  (11)

- eroarea medie absolută:  $\delta = 0,7979 \cdot \sigma$  (12)

- măsura preciziei:  $h = 0,7071 \frac{1}{\sigma}$  (13)

În mod curent se folosește eroarea standard, denumită și eroare medie pătratică, pătratul acesteia reprezentând dispersia erorilor. Curba de repartiție în acest caz este situată întotdeauna deasupra abscisei. În plus, ea este și

simetrică față de axa ordonatelor, dacă repartiția normală este și normată, adică  $\bar{M}_a = 0$  și  $\sigma = 1$ . Cunoașterea erorii standard permite determinarea câmpului de împrăștiere a mărimilor experimentale  $\varphi$ , care este  $6\sigma$ , și în care sunt cuprinse peste 99% din valorile mărimii măsurate experimental. (Figura 23)

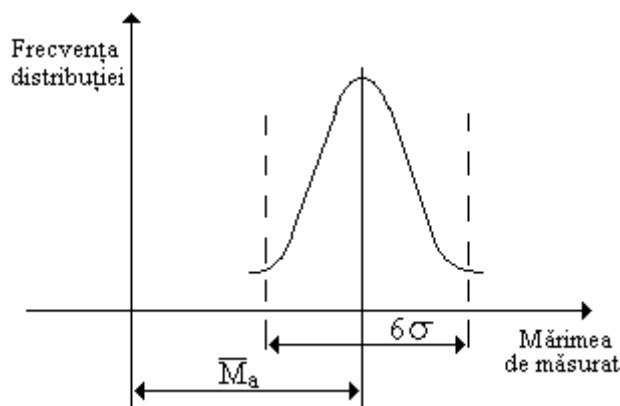


Figura 23. Câmpul de împrăștiere a mărimilor a căror medie este  $\bar{M}_a$

Cea mai bună valoare pentru o mărime pentru care s-a obținut prin măsurători un șir de valori este condiționată de minimul sumei pătratelor erorilor, luate față de o mărime de referință care este tocmai cea căutată. O justificare teoretică a acestui criteriu se deduce prin considerarea rezultatelor obținute în aplicarea teoriei probabilităților la calculul erorilor de măsurare.

Fie  $m$  mărimi independente  $X: X_1, X_2, \dots, X_m$  pentru care se obțin valorile  $M_1, M_2, \dots, M_m$ . Dacă aceste mărimi ar fi valorile exacte pe care le căutăm, am avea:  $M_1 = X_1; M_2 = X_2; M_m = X_m$  ceea ce evident nu se realizează în practică deoarece determinarea valorilor  $M_n$  ( $n = 1, 2, \dots, m$ ) sunt inevitabil afectate de erori. Presupunând eliminat erorile sistematice și greșelile, și mărginindu-ne numai la erorile întâmplătoare, problema care se pune este determinarea celei mai probabile valori  $M_n$  pentru care erorile medii pătratice să fie cât mai mici [68].

Având în vedere faptul că, studiile efectuate și concluziile obținute în cadrul lucrării, se bazează pe o serie de date experimentale obținute prin măsurători directe, documentația prezentată în acest capitol a stat la baza prelucrării matematice a datelor experimentale.



## PARTEA EXPERIMENTALĂ

Progresele spectaculoase înregistrate în medicina ultimelor decenii au condus la rezultate terapeutice excelente în multe afecțiuni considerate până nu de mult incurabile, însă aceasta cu prețul introducerii în terapie a unor substanțe chimice cu efecte extrem de nocive asupra mediului ambiant. Chiar dacă aceste substanțe – medicament - ajung în mediu în cantități mici și nu au efecte poluante imediate, în timp acestea se acumulează. În această categorie intră medicamentele cu efect citostatic – citotoxic folosite în tratamentul afecțiunilor oncologice. Din păcate aceste substanțe nu au o acțiune selectivă, ele acționează în mare măsură asupra celulelor canceroase însă afectează și celulele normale mai ales atunci când sunt administrate în doze mari. Acest tratament se recomandă în cazul afecțiunilor oncologice care beneficiază de chimioterapie cu „megadoze” asociată cu transplantul medular. Acțiunea neselectivă a agenților citostatici este cea care influențează major potențialul lor poluant. Cele mai multe medicamente citostatice au efect carcinogenic, mutagen și teratogen. Datorită acestor efecte deloc de neglijat aceste substanțe afectează atât direct cât și indirect sănătatea populației precum și sistemele ecologice. Ele ajung în mediu sub forma apelor uzate provenite din instituțiile sanitare care tratează pacienți cu afecțiuni oncologice [55,56].

Pentru eliminarea toxicității acestor ape reziduale Institutul Național de Sănătate al SUA recomandă incinerarea tuturor deșeurilor ce conțin substanțe citostatice pentru a preveni contaminarea mediului înconjurător respectiv expunerea oamenilor. Incinerarea este totuși destul de greu de realizat fiind vorba în marea majoritate a cazurilor de deșeuri lichide în cantități mari (în special urina); incineratoarele sunt scumpe și sunt mari consumatoare de energie eliberând în atmosferă mari cantități de dioxid de carbon. Analizând raportul cost-beneficii, IARC (International Agency for Research on Cancer) (1996) recomandă tratamentul chimic cu acizi sau baze puternice, respectiv cu hipoclorit pentru inactivarea agenților citostatici. Totuși manipularea unor soluții concentrate de acizi sau baze puternice în spitale nu

este recomandată. Hipocloritul de sodiu rămâne o soluție ușor de aplicat pentru inactivarea chimică a medicamentelor citostatice însă este necesar controlul permanent al calității soluției de hipoclorit de sodiu folosite [79].

Studiile abordate în cadrul acestei lucrări au fost conduse pe următoarele direcții:

- Elaborarea, proiectarea și construirea unei microinstalații experimentale complet automatizată, care efectuează detoxifierea agenților citostatici, utilizând o metoda combinată bazată atât pe oxidarea electrochimică cât și pe oxidarea chimică în prezență de oxidanți puternici cum este clorul liber.
- Testarea funcționării microinstalatiei experimentale s-a efectuat pentru cinci substanțe citostatice, utilizând următoarele metode: fizico-chimice; matematice (tehnici de modelare statistică) și biologice.
- Prelucrarea matematică a datelor experimentale obținute cu metodele de testare utilizate pentru fiecare substanță citostatică în parte.
- Analiza prin metode biologice a produselor rezultate în urma epurării acestora în vederea determinării citotoxicității reziduale.

În cele ce urmează sunt prezentate, atât microinstalația realizată (elemente componente, construcție, funcționare, metodologia de operare), rezultatele obținute în cadrul testărilor efectuate precum și modul de prelucrare al acestora.

## 6. Microinstalația experimentală

Microinstalația experimentală propusă este alcătuită din trei părți componente distincte montate pe un șasiu comun:

- sistemul de pregătire a probei
- microreactorul electrochimic
- sistemul de automatizare.

În figura 24 este prezentat ansamblul microinstalației experimentale.

Fiecare din aceste părți componente este la rândul sau alcătuită din mai multe subansamble evidențiate în figura 24. [80]

Atât sistemul de pregătirea a probei cât și microreactorul electrochimic sunt controlate de către sistemul de automatizare care include și calculatorul de proces. Trebuie menționat că întreaga microinstalație poate fi comandată atât de către calculatorul de proces cât și direct de către operator prin intermediul comenzilor manuale [81,82].

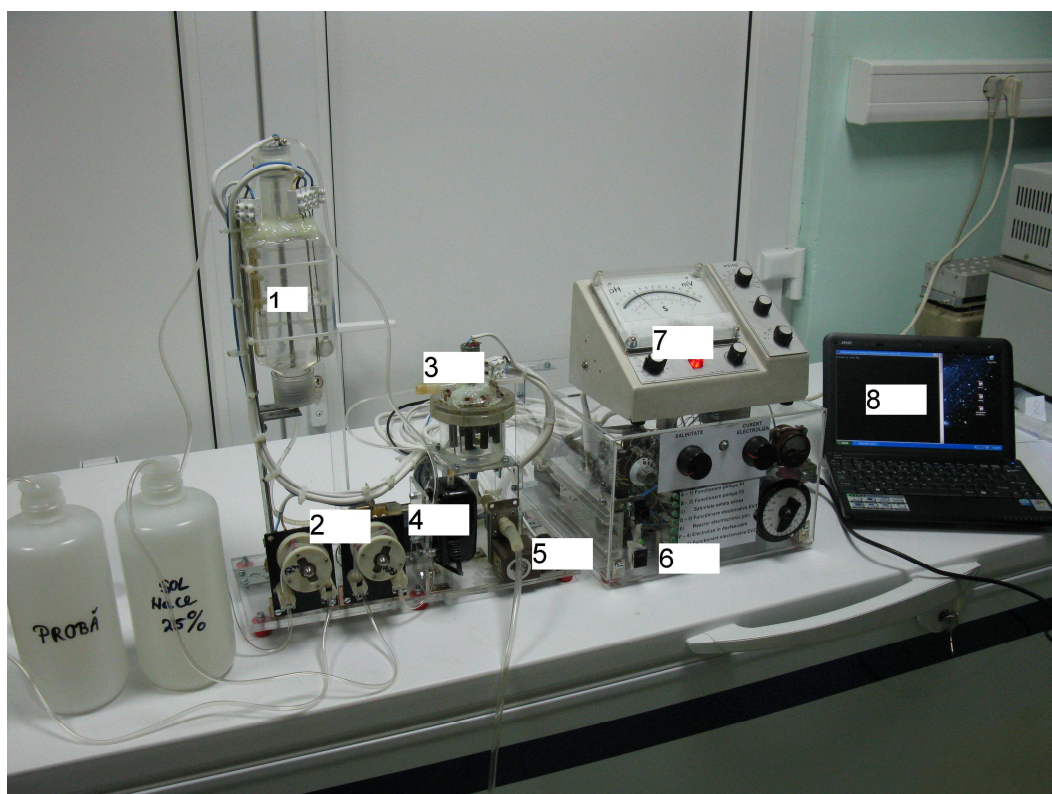


Figura 24. Microinstalația experimentală (vedere de ansamblu).

Componentele principale și subansamblele acestora:

1. Vas de amestec
2. Pompe peristaltice
3. Microreactor electrochimic
4. Microcompresor
5. Electrovalvă
6. Modul electronic
7. Conductometru
8. Calculator de proces.

În figură se observă recipientul care conține proba ce urmează să fie epurată precum și recipientul care conține soluția de sare 25% necesară aducerii probei la salinitatea dorită.

## 6.1. Sistemul de pregătire a probei

Este format din trei componente principale:

- Recipientele care conțin proba, respectiv soluția de sare 25%;
- Ansamblul pompelor peristaltice;
- Vasul de amestec propriu-zis.

**Recipientele pentru probă, respectiv sare** sunt confecționate din polipropilenă și au volumul de 1 L. Nu sunt prevăzute cu senzori de nivel, deci se impune supravegherea de către operator a nivelului de lichid existent în aceste vase în cursul funcționării microinstalației.

### **Ansamblul pompelor peristaltice.**

Microinstalația experimentală conține două pompe peristaltice care sunt comandate fie de către operator prin intermediul comenzilor manuale, fie

de către calculatorul de proces prin intermediul modulului electronic al sistemului de automatizare. In figura 25 este prezentat ansamblul pompelor peristaltice.

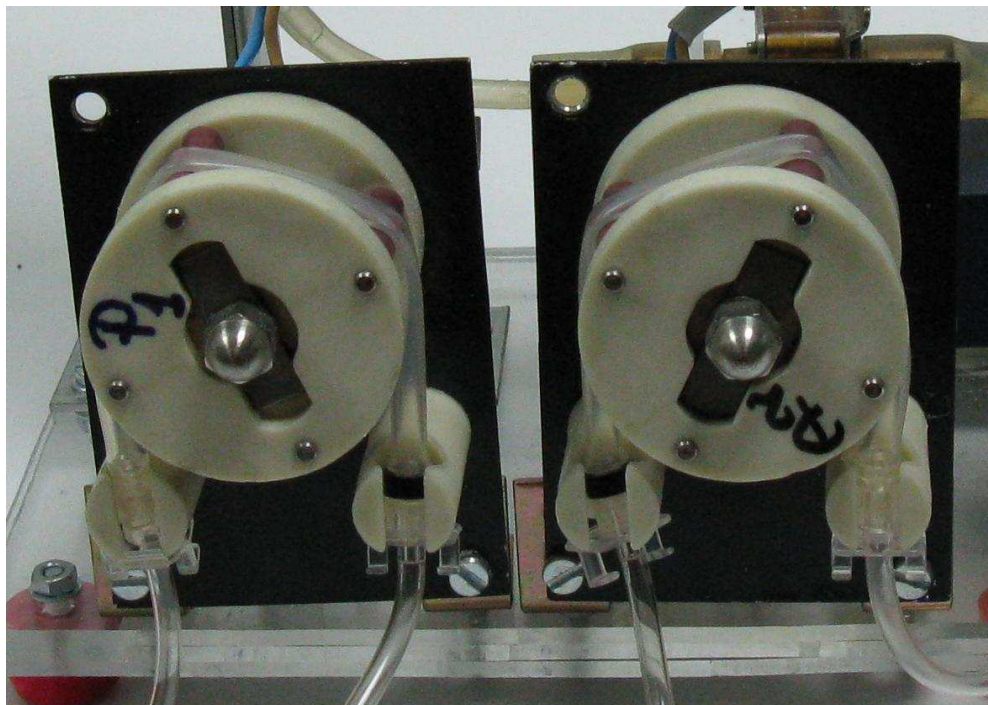


Figura 25. Ansamblul pompelor peristaltice.

Ambele pompe sunt acționate de către un motor electric de curent alternativ la o tensiune de alimentare  $U = 24 \text{ V}$  și o frecvență de 50 Hz. Pentru pornire, fiecare motor este prevăzut cu un condensator nepolarizat de 100 nF la 100 V.

Fiecare pompă este acționată de către motorul corespunzător, astfel încât capul pompei efectuează 30 rot/minut. Diametrul capului pompei este de 45 mm. Tubulatura de silicon din interiorul pompei are un diametru intern de 3 mm, asigurându-se astfel un debit de 16,5 ml/minut.

S-a ales acest tip de pompe deoarece asigură un debit suficient scopului propus, sunt robuste, fiabile, ușor de întreținut și nu au elemente constructive (supape, cilindrii, pistoane) care să intre în contact cu proba (citotoxică) sau cu soluția de saramură. Tubulatura de silicon se poate schimba ușor la nevoie.

Pompa  $P_1$  introduce probe în vasul de amestec. Semnalul de comandă pentru această pompă este produs de un senzor de nivel de tip conductometric care ocupă o poziție fixă în vasul de amestec, corespunzătoare unui volum de 300 ml. Semnalul generat de acest detector ajunge la sistemul de automatizare și aici este elaborat semnalul de comandă pentru pompa  $P_1$ .

Pompa  $P_2$  are rolul de a introduce în vasul de amestec un volum de sare 25 % care să aducă probe la salinitatea prescrisă de operator. Această pompă este de asemenea comandată prin intermediul sistemului de automatizare, semnalul de comandă fiind în acest caz generat de o celulă de conductanță conectată la un conductometru. Celula de conductanță se găsește în partea inferioară a vasului de amestec astfel încât este în contact permanent cu probe [83,84].

#### **Vasul de amestec propriu-zis.**

Este un recipient confecționat din polietilenă, conic la partea inferioară pentru a facilita golirea. Volumul său util este de 500 ml. Este poziționat pe șasiul microinstalației mai sus decât reactorul electrochimic, astfel încât golirea sa, respectiv umplerea microreactorului electrochimic să se facă gravitațional prin intermediul unei electrovalve nemaifiind nevoie de o pompă peristaltică suplimentară. Umplerea vasului de amestec se face pe la partea superioară a acestuia, unde se găsește și un ștuț pentru prelevare de probe în vederea determinărilor fizico-chimice, precum și o deschidere care realizează comunicarea cu atmosfera. În figura 26 este prezentată vederea de ansamblu a acestuia.



Figura 26. Vas de amestec - vedere de ansamblu.

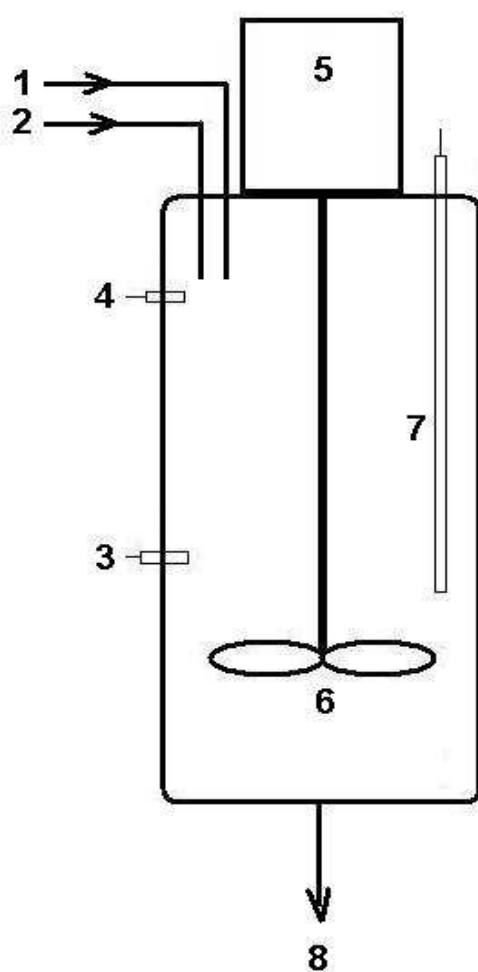
Vasul de amestec este prevăzut cu un agitator mecanic cu două palete acționat de un motor electric de curent continuu alimentat de la o sursă care furnizează o tensiune de 5 V, având un consum în sarcină de aproximativ 80 mA. Pornirea acestuia se face automat în momentul punerii sub tensiune a microinstalației experimentale. Astfel se asigură omogenizarea probei cu

soluția de saramură pentru a se atinge salinitatea stabilită de operator, în intervalul de concentrație 1 – 10 g/dl. Pentru ca salinitatea finală a probei care va ajunge la microreactorul electrochimic în vederea epurării, să fie cât mai reproductibilă de la o șarjă la alta este necesar ca omogenizarea volumului de lichid să se facă cât mai bine, iar soluția de saramură să se introducă cu un debit mic astfel încât salinitatea să crească lent și uniform și să poată fi măsurată de către conductometru [85,86,87].

Vasul de amestec este prevăzut cu senzori care permit conducerea automată a microinstalației experimentale. Aceștia sunt evidențiați pe schema din figura 27. [88,89]

- Senzorul de nivel pentru probă. Este de tip conductometric și comandă pompa peristaltică  $P_1$  și stabilește volumul de probă care va fi supus salinizării și ulterior epurării. Acest detector de nivel este fix și astfel se stabilește din construcția aparatului volumul de probă de 300 ml care este prelucrat la fiecare șarjă.
- Celula de conductanță cuplată cu conductometrul microinstalației, care asigură determinarea continuă a salinității probei, permițând astfel stabilirea gradului de salinitate dorit.
- Senzorul de supraplin. Este tot un detector de tip conductometric care generează un semnal de alarmă și oprește întreg dispozitivul în cazul în care datorită unei defecțiuni la modulul electronic, una sau ambele pompe peristaltice nu mai sunt oprite. Acest detector este independent de partea de comandă cu calculatorul de proces.





### Legenda:

- 1 - alimentare proba
- 2 - alimentare saramura
- 3 - detector nivel proba
- 4 - detector supraplin
- 5 - motor electric
- 6 - agitator mecanic
- 7 - celula de conductanta
- 8 - port de golire

Figura 27. Vas de amestec – schemă.

## 6.2. Microreactorul electrochimic

Partea cea mai importantă a sistemului de epurare este microreactorul electrochimic (figura 28). Acesta este un reactor electrochimic de dimensiuni mici cu densități de curent asimetrice care, prin construcția sa favorizează reacțiile de oxidare electrochimică a citostaticelor ce urmează să fie epurate [12,21].

Principiul de funcționare al microreactorului utilizat se pretează foarte bine scopului propus: favorizarea reacțiilor de oxidare anodică și generarea unei cantități de clor liber (hipoclorit de sodiu, acid hipocloros, clor dizolvat fizic) cu un consum de electricitate cât mai mic și într-un timp cât mai scurt.

Dispozitivul este prevăzut cu un agitator mecanic pentru omogenizarea continuă a masei de reacție. Agitatorul mecanic este acționat de un micromotor electric prevăzut cu reductor de turație și alimentat la 2 V. Viteza de agitare este de 300 rotații/minut .

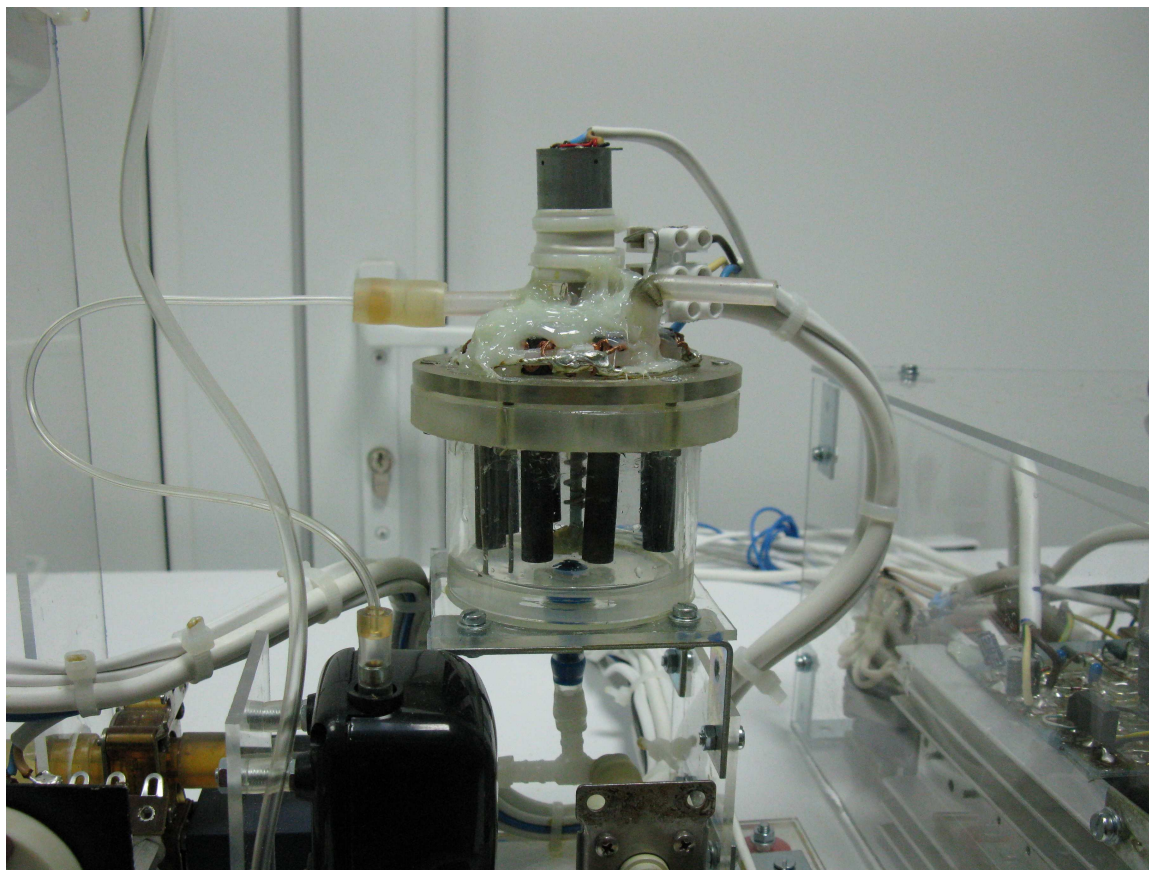


Figura 28. Microreactorul electrochimic (vedere de ansamblu).

Constructiv, microreactorul se compune dintr-un vas cilindric confecționat din plexiglas cu diametrul interior de 60 mm și înălțimea de 55 mm, prevăzut la partea inferioară cu un ștuț de umplere/golire. Volumul util de umplere este de 100 ml. La partea superioară este prevăzut cu un capac confecționat tot din plexiglas care are rolul de suport pentru anozii de grafit, catodul de inox, motorul ce antrenează agitatorul mecanic, racordurile pentru aerul comprimat, respectiv evacuarea gazelor de electroliză și un ștuț pentru prelevarea de probe în cursul electrolizei în vederea analizelor fizico-chimice. Tot la nivelul capacului se găsesc doi senzori de tip conductometric: unul care semnalizează momentul în care microreactorul este plin și electroliza poate

începe, și alt senzor de supraplin care comandă oprirea întregii microinstalații dacă electrovalva care asigură umplerea microreactorului se defectează. În figura 29 este prezentată o imagine de ansamblu a electrozilor și a sistemului de agitare mecanică [90,91].

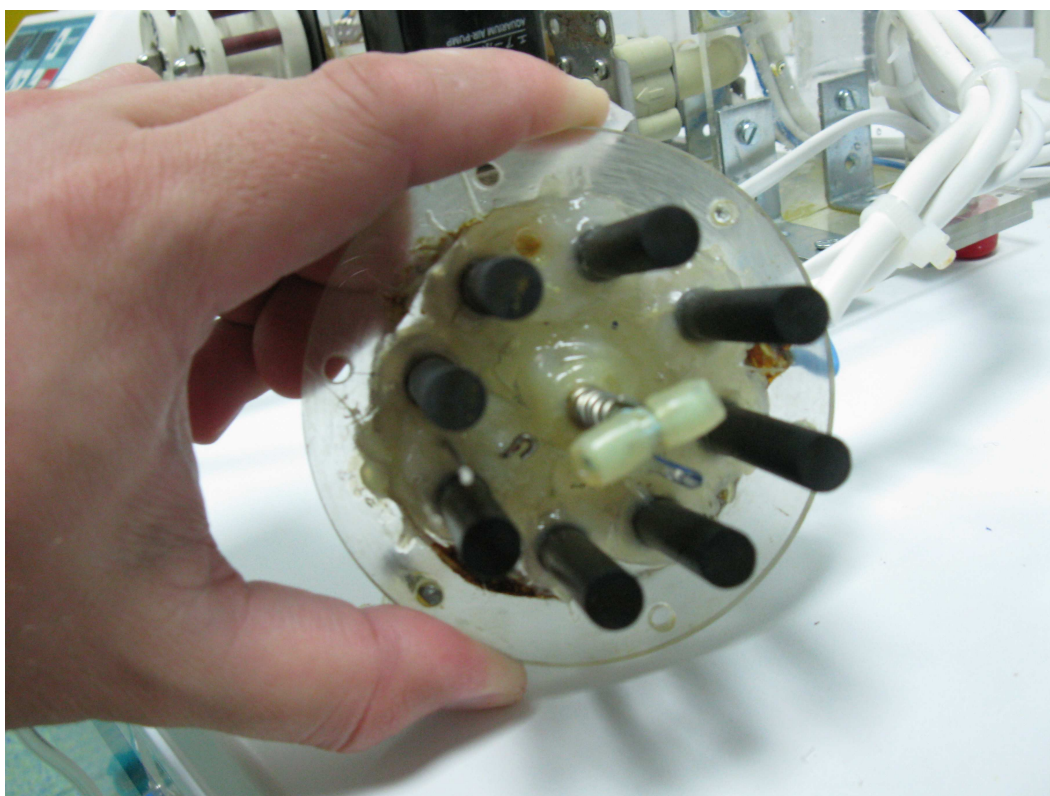


Figura 29. Ansamblul electrozi – agitator mecanic.

Schema microreactorului electrochimic este prezentată în figura 30. Caracteristicile constructive din punct de vedere electrochimic ale microreactorului cu densități de curent asimetrice sunt:

- Opt anodi de grafit cu diametrul de 6 mm și lungimea utilă de 30 mm – cu suprafața totală ( $S_a$ )  $45,21 \text{ cm}^2$
- Densitatea de curent anodică egală cu  $221 \text{ A/m}^2$ .
- Un catod din inox cu diametrul de 1 mm și lungimea totală 115 mm spiralat în jurul axului agitatorului (5 spire cu diametrul interior al spirei de 5mm) – cu suprafața ( $S_c$ ) de  $3,61 \text{ cm}^2$
- Densitatea de curent catodică egală cu  $2.770 \text{ A/m}^2$

- Raportul  $S_a/S_c = 12,5$
- Distanța relativă anod – catod este 25 mm
- Curentul de lucru maxim este 2 A.

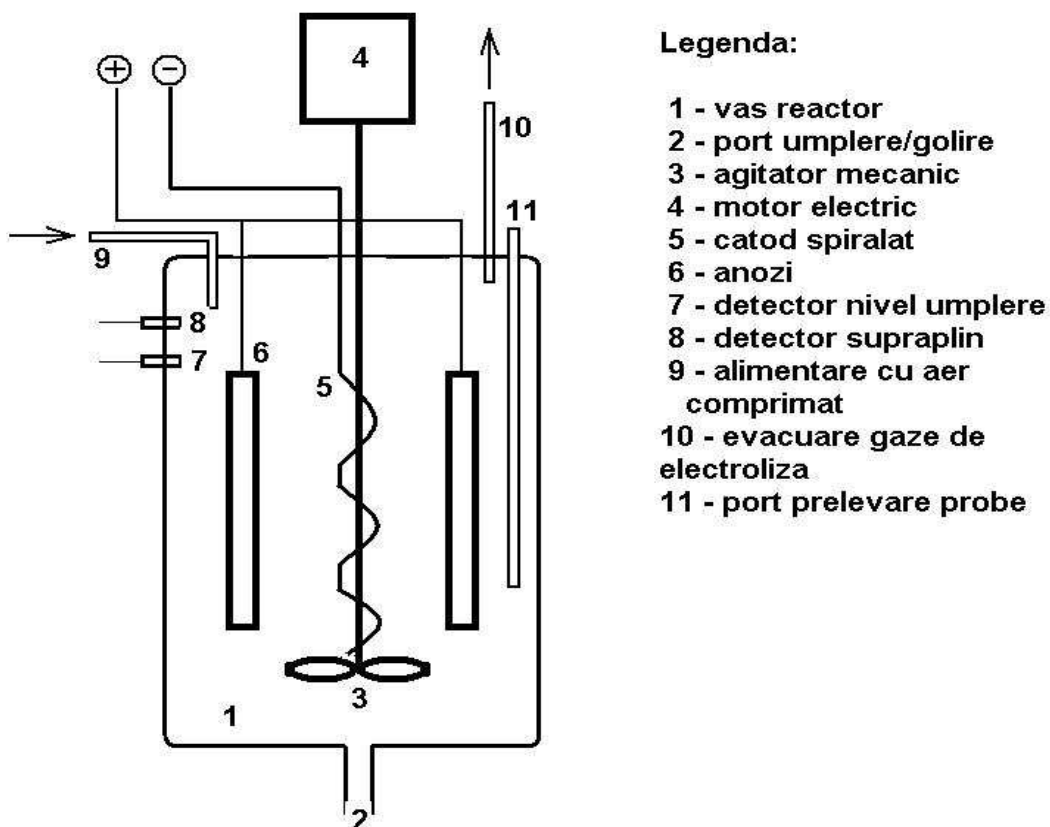


Figura 30. Microreactorul electrochimic – schemă.

Microreactorul este prevăzut cu un compresor care generează un flux de aer comprimat cu un debit de 500 ml/minut care “spală” gazele produse în timpul electrolizei și care ar avea un efect coroziv asupra componentelor dispozitivului. Datorită acestui sistem gazele rezultate prin electroliză sunt în mod eficient evacuate din reactor prin ștuțul de evacuare a gazelor (figura 30 – 10). Evacuarea gazelor se face printr-un furtun cu diametrul adecvat în afara laboratorului [92,93,94].

### 6.3. Sistemul de automatizare

Sistemul de automatizare cuprinde totalitatea părților electronice ale microinstalației experimentale. Pe lângă modulele de reglare automată, acest sistem conține și sursele de alimentare pentru circuitele implicate în procesul de reglare automată, respectiv sursa de putere pentru alimentarea reactorului electrochimic [95,96].

Modulele electronice implicate în procesul de reglare automată sunt:

- circuite comparatoare,
- circuite generatoare de semnale,
- amplificatoare operationale
- punți de măsură de tip Kohlrausch
- divizoare rezistive
- placă de achiziție pentru semnale
- calculatorul de proces.

Toate aceste componente sunt asamblate într-o carcasă de plexiglas, prevăzută cu un ventilator pentru circulația forțată a aerului în vederea evitării supraîncălzirii componentelor electronice, în special a celor din sursa de alimentare a microreactorului electrochimic.

Pe panoul frontal al acestei carcase se găsesc butoanele de comandă și reglaj a diversilor parametri ai microinstalației experimentale. (figura 31).



Figura 31. Sistemul de automatizare. Vedere frontală.

### **Sursa de alimentare a microreactorului electrochimic.**

Rolul acestei surse este de a asigura curentul necesar desfășurării în condiții reproductibile a electrolizei. Este cunoscut faptul că în timpul desfășurării procesului de electroliză, o parte din energia electrică se pierde sub formă de căldură, ceea ce duce la o inevitabilă încălzire a electrolitului. Această încălzire a electrolitului afectează reproductibilitatea experimentelor deoarece duce la creșterea conductibilității soluției și deci la creșterea curentului de electroliză.

Pentru a evita această creștere de curent trebuie să se însereze în circuitul electrolizorului un reostat care are rolul de a limita curentul de electroliză la o valoare stabilă de operator. Însă această variantă de reglaj nu este practică pentru scopuri de cercetare deoarece nu permite un control suficient de precis al curentului de electroliza.

Din aceste considerente s-a optat pentru o sursă stabilizată în curent și nu în tensiune. Sursa este prevăzută cu un sistem de reglaj a intensității

curentului de electroliză, fiind accesibil operatorului prin intermediul unui potențiomtru plasat pe panoul frontal al sistemului de automatizare alături de ampermetrul la care se citește curentul efectiv de electroliză.

Sursa este prevăzută cu un transformator coborâtor de tensiune care livrează în înfășurarea secundară o tensiune de 24 V la un curent maxim admis de 3 A. Această tensiune este redresată cu o punte redresoare de 3 A, filtrată cu un condensator electrolitic de 4700  $\mu\text{F}$  la 50 V și stabilizată în curent cu un circuit integrat specializat de tip LM350. Schema electrică de principiu a acestei surse este prezentată în figura 32.

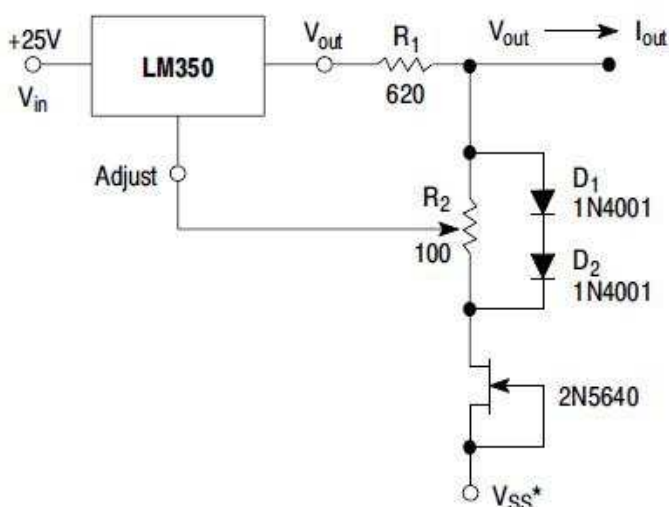


Figura 32. Schema de principiu a sursei de curent pentru alimentarea reactorului electrochimic.

Caracteristicile principale ale circuitului integrat LM 350:

- curent de ieșire maxim 3 A;
- tensiune de ieșire ajustabilă în intervalul 1,2 – 33 V;
- precizia reglării mai bună de 0,1%;
- liniaritatea reglării 0,005%/V;
- protecție internă la supraîncălzire;
- protecție la scurtcircuit.

Sursa de alimentare a microreactorului electrochimic, în modul manual de funcționare a microinstalației experimentale este comandată de un cronometru mecanic care permite reglarea duratei electrolizei în intervalul 0 - 120 minute. În modul automat, funcția acestui cronometru este preluată de

calculatorul de proces care prin intermediul unui releu comandă pornirea sau oprirea electrolizei [97 – 100].

### **Sursa de alimentare a echipamentelor de automatizare.**

Această sursă are rolul de a genera toate tensiunile necesare atât echipamentelor propriuzise de automatizare cât și pompelor peristaltice și electrovalvelor. Sursa produce următoarele tensiuni: [101 – 103]

- 24 V curent alternativ pentru alimentarea celor două pompe peristaltice.
- + 24 V curent continuu nestabilizat pentru alimentarea electromagneților din componența electrovalvelor.
- + 12 V curent continuu stabilizat pentru alimentarea circuitelor analogice.
- +/- 12 V curent continuu stabilizat pentru alimentarea generatorului de semnal necesar funcționării corecte a senzorilor de nivel de tip conductometric.
- + 5 V stabilizat pentru circuitele digitale – porturile de intrare ale plăcii de achiziție și pentru motorul agitatorului mecanic al vasului de amestec.
- + 2 V curent continuu stabilizat pentru alimentarea micromotorului agitatorului mecanic al reactorului electrochimic.

Sursa este prevăzută cu două transformatoare de rețea: unul coborâtor de tensiune, care are o înfașurare secundară cu priză mediană care livrează 2 X 15 V curent alternativ. Aceasta tensiune este redresată cu o punte de 2 A, filtrată cu doi condensatori electrolitici de 2200  $\mu$ F la 50 V, și ulterior stabilizată conform cerințelor. Al doilea transformator este tot coborâtor de tensiune, furnizând în înfașurarea secundară 24 V curent alternativ necesar acționării pompelor peristaltice și 24 V redresat și filtrat, nestabilizat, pentru alimentarea electrovalvelor. Schema electrică a acestei surse este prezentată în figura 33.

Pentru stabilizarea tensiunilor electrice generate de această sursă s-au folosit tot circuite integrate specializate: 7812, 7912, 7805 și LM317 [104 – 107].



Ambele surse de alimentare sunt conectate împreună la rețeaua de 220 V curent alternativ prin intermediul unui întrerupător de rețea și a unei unei siguranțe fuzibile de 2 A. Întrerupătorul de rețea este plasat pe panoul frontal al sistemului de automatizare alături de o diodă electroluminiscentă care indică alimentarea sistemului cu energie electrică.

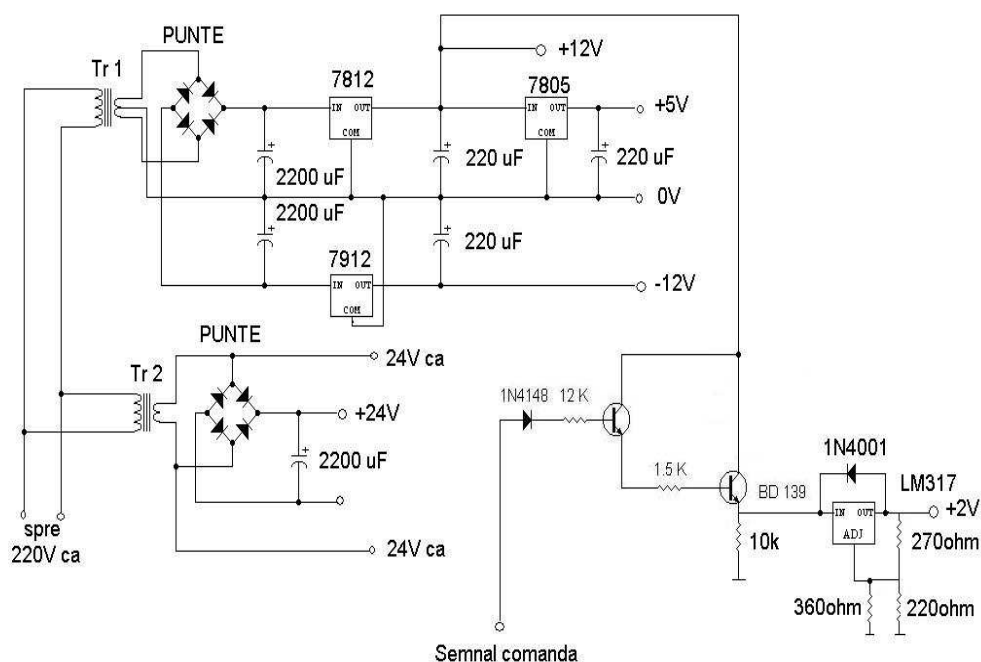


Figura 33. Sursa de alimentare a echipamentelor de automatizare.

Din figură se observă ca tensiunea de + 2V pentru alimentarea micromotorului agitatorului mecanic din reactor este comandată cu un semnal preluat de la sursa de alimentare a reactorului. Acest fapt permite functionarea acestui micromotor doar pe perioada de desfașurare a electrolizei, reducând astfel semnificativ uzura sa.

In tabelul II sunt trecute caracteristicile principale ale circuitelor 7812, 7912, 7805 si LM317.

Tabel II. Caracteristicile principale ale circuitelor 7812, 7912 si LM317.

Caracteristica	7812	7912	7805	LM317
Tensiune de ieșire (V)	+ 12 V	12 V	+ 5 V	+ 1,2V - +25V

Curent maxim de iesire (A)	1A	1A	1A	1,5A
Protecție termică	Da	Da	Da	Da
Protecție la scurtcircuit	Da	Da	Da	Da

### Generatorul de semnal.

Este realizat cu amplificatorul operațional A741 montat ca oscilator. Alimentarea amplificatorului operațional este dublă +/- 12 V curent continuu stabilizat. Curentul de ieșire este alternativ, dreptunghiular cu frecvența de 400 Hz. Semnalul generat de acest oscilator este aplicat senzorilor de nivel de tip conductometric din vasul de amestec și din reactorul electrochimic. Astfel se evită fenomenul de polarizare care ar genera erori de măsură. În figura 34 este prezentată schema electrică a oscilatorului [108 – 110].

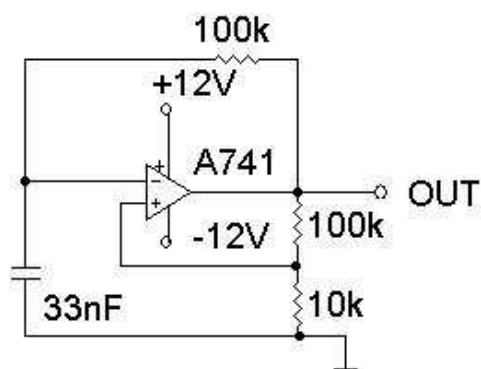


Figura 34. Schema electrică a oscilatorului.

Caracteristicile principale ale amplificatorului operațional A741 sunt:

- Tensiune de alimentare maximă +/- 18 V.
- Puterea disipată 780 mW.
- Tensiune de intrare diferențială maximă +/- 30 V.
- Temperatura de operare: 0 - +70 grade C.
- Tensiunea maximă de offset 5 mV.
- Curentul maxim de offset 20 nA.
- Rejecția în mod comun 90 dB.

### Etajul comparator.

Este realizat cu componente discrete (tranzistori) și are rolul de a comanda pompa peristaltică  $P_1$  care introduce proba în vasul de amestec. Acest etaj, în modul manual comandă singur pompa peristaltică  $P_1$ , deci are și rol de regulator electronic, iar în modul automat transmite informația la calculatorul de proces prin intermediul unor amplificatoare de separare [111,112].

Detectorul aferent este situat la nivelul vasului de amestec. Este un senzor de tip conductometric realizat din oțel inoxidabil, fiind alimentat cu o tensiune alternativă dreptunghiulară de 400 Hz produsă de generatorul de semnal prezentat anterior [113].

Tipul de reglaj realizat este cel discontinuu cu semnal treaptă [114].

Schema electrică a acestui etaj comparator este prezentată în figura 35.

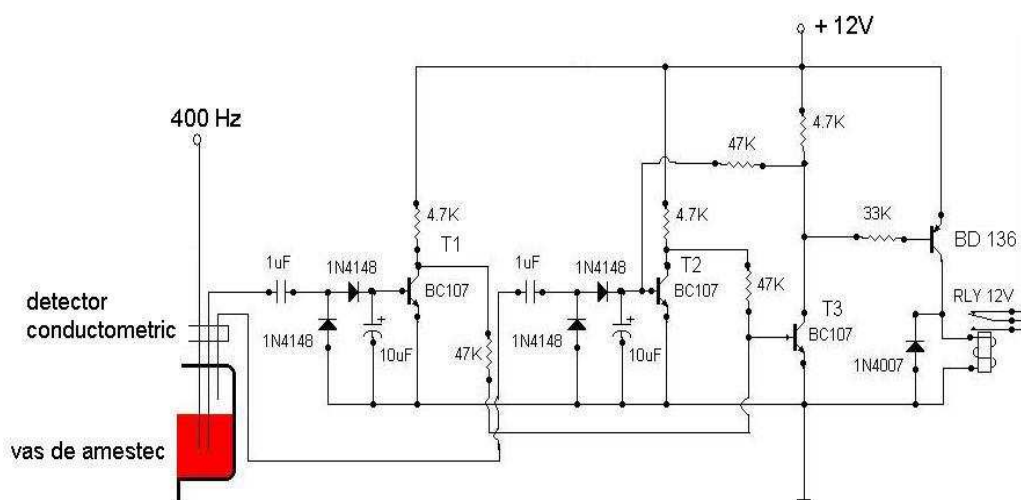


Figura 35. Schema electrică a etajului comparator.

### Funcționarea etajului comparator.

Va fi descrisă funcționarea acestui etaj în modul manual de comandă a microinstalației experimentale deci când acest circuit îndeplinește rolul de regulator electronic de tip discontinuu.

Acest regulator, cu minime modificări ale generatorului de audiofrecvență și ale senzorului de nivel a fost folosit cu succes de către autorul prezentei lucrări și pentru medii biologice bogate în proteine, fără să determine modificări ale structurii acestora prin fenomenul de electroliză care

s-ar putea produce în caz de utilizare a curentului continuu pe post de semnal de comandă.

Inițial vasul de amestec este gol. În acest moment tranzistorul T1 este blocat deoarece pe baza sa nu se aplică nici o tensiune. Prin divizorul rezistiv (rezistorii de 4,7 K $\Omega$ , respectiv 47 K $\Omega$ ) din colectorul lui T1, tranzistorul T3 se polarizează deci rezistorul de 33 K $\Omega$  din baza lui T4 este conectat practic la masă deci T4 se va deschide, iar curentul său de colector anclanșează releul electromagnetic (RLY) și alimentează pompa peristaltică P<sub>1</sub> determinând începerea umplerii vasului de amestec cu probă. În același timp T2 este blocat deoarece pe baza sa ajunge o tensiune sub 200 mV din colectorul lui T3 prin intermediul rezistorului de 47 K $\Omega$ . În momentul în care nivelul probei atinge valoarea prestabilită se deschide tranzistorul T2, iar tensiunea din colectorul său blochează T3.

La rândul său se blochează și T4 deoarece în acest caz, potențialul pe baza sa devine aproximativ egal cu cel al emitorului, deci +12V. Astfel curentul de colector a lui T4 devine nul, releul nu mai este anclanșat și pompa peristaltică P<sub>1</sub> se oprește [115].

### **Etajul de comandă al pompelor peristaltice.**

Este constituit din două amplificatoare tranzistorizate de curent continuu care au ca sarcină câte un releu electromagnetic care alimentează cele două pompe peristaltice cu tensiunea alternativă de 24 V [97,115,116].

Schema electrică a acestui etaj este redată în figura 36.

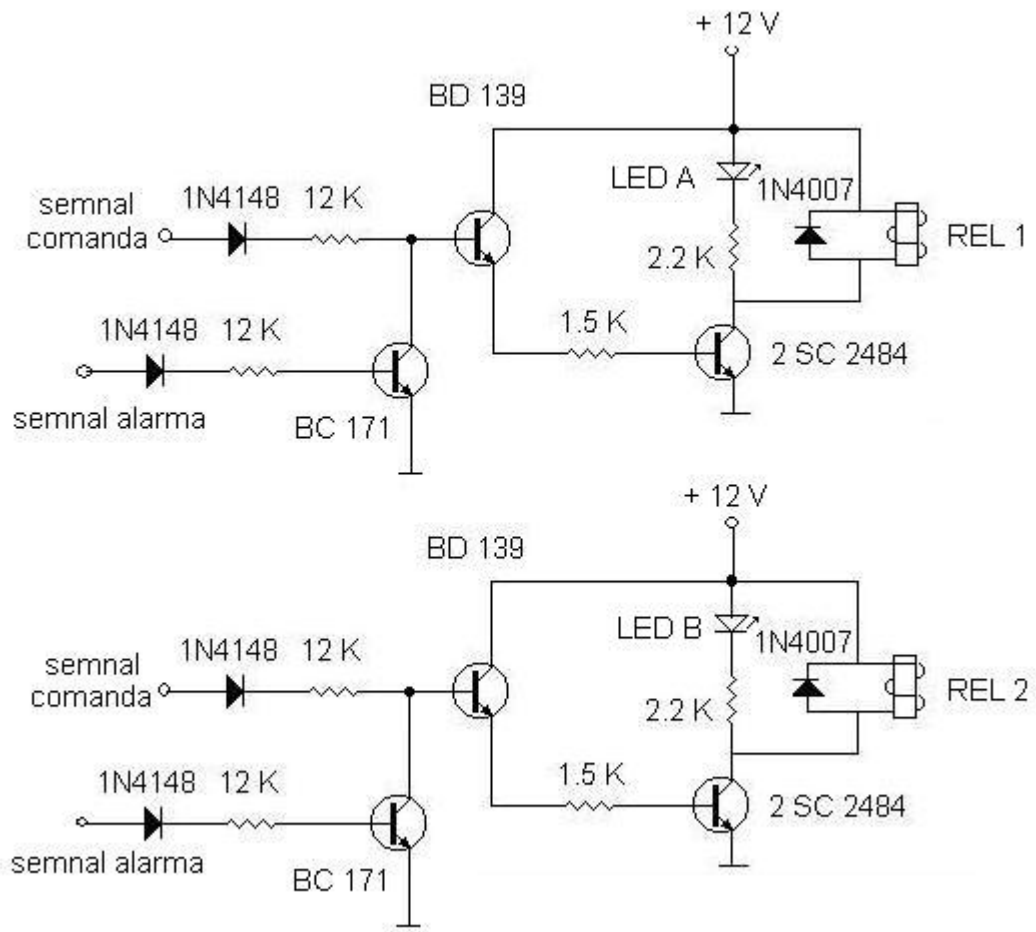


Figura 36. Schema electrică a etajului de comandă al pompelor peristaltice.

Acest etaj preia comenzile generate de către calculatorul de proces în modul automat de funcționare a microinstalației experimentale, sau de la butonul de comandă manuală situat pe panoul frontal al sistemului de automatizare atunci când instalația funcționează în modul manual. Deasemenea, acest etaj are și rolul de a opri funcționarea pompelor peristaltice în caz de eroare printr-un semnal de alarmă de +12V curent continuu generat de detectorul de supraplin al vasului de amestec. Această situație este indicată tot pe panoul frontal prin aprinderea unui LED roșu (H) corespunzător situației de “alarmă”. Ledurile verzi A și B situate pe panoul frontal indică funcționarea pompei peristaltice  $P_1$  respectiv  $P_2$ .

### Etajul de comandă al electrovalvelor.

Este asemănător celui de comandă al pompelor peristaltice, cu deosebirea ca în locul releelor electromagnetice sunt branșate direct cele două electrovalve. Electromagneții electrovalvelor se alimentează la + 24 V ceea ce impune această tensiune și pentru alimentarea etajelor amplificatoare.

Schema electrică a acestui etaj este prezentată în figura 37.

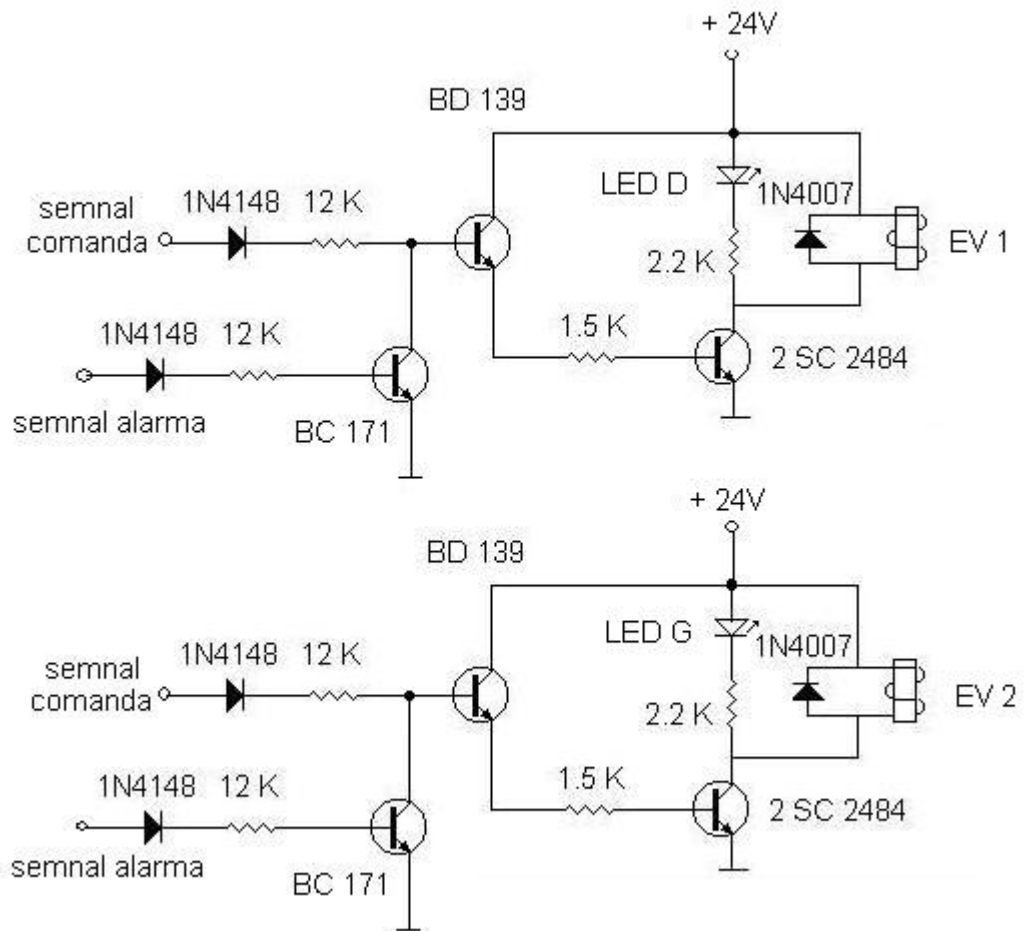


Figura 37. Schema electrică a etajului de comandă al electrovalvelor.

La fel ca și etajul de comandă al pompelor peristaltice, și acest etaj preia comenzile generate de către calculatorul de proces în modul automat de funcționare a microinstalației experimentale, sau de la butonul de comandă manuală situat pe panoul frontal al sistemului de automatizare atunci când instalația funcționează în modul manual. De asemenea, are și rolul de a opri

funcționarea electrovalvelor în caz de eroare printr-un semnal de alarmă de +12V curent continuu generat de detectorul de supraplin al reactorului electrochimic. Această situație este indicată tot pe panoul frontal prin aprinderea aceluiași LED roșu (H) corespunzător situației de “alarmă”. Ledurile verzi D și G situate pe panoul frontal indică funcționarea electrovalvelor EV1 și EV2 [97,115,116].

### **Conductometrul electronic. Determinarea conductivității unor soluții de clorură de sodiu. Calibrarea conductometrului.**

Microinstalația experimentală este prevăzută cu un conductometru electronic tip HEITO (figura 38) care are rolul de a determina salinitatea probei din vasul de amestec.

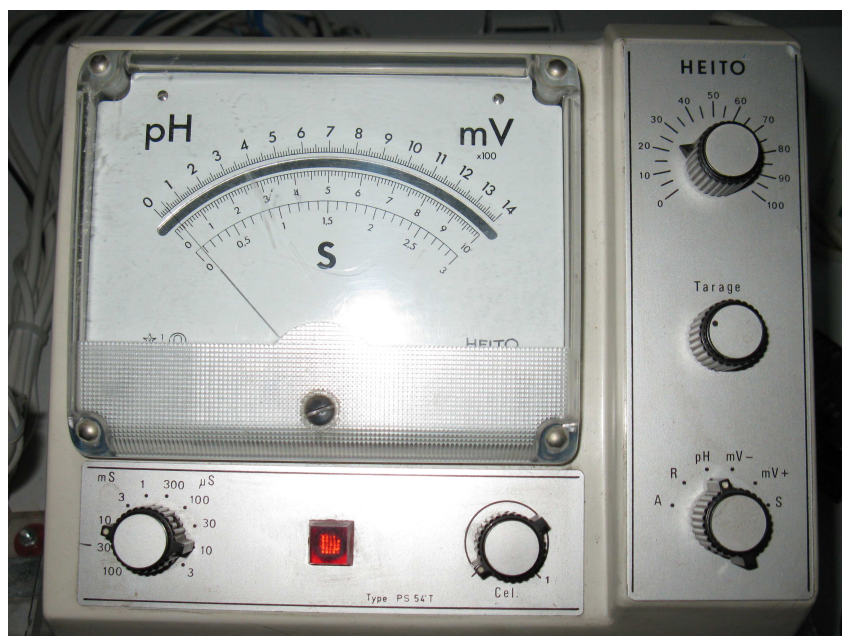


Figura 38. Conductometru electronic tip HEITO

Acest conductometru funcționează pe principiul divizorului de tensiune în care celula de conductanță (având rezistența  $R_x$ ) este legată în serie cu o rezistență etalon  $R_N$ . (figura 39). Celor două rezistențe inseriate li se aplică o tensiune alternativă perfect stabilizată -  $U$ .

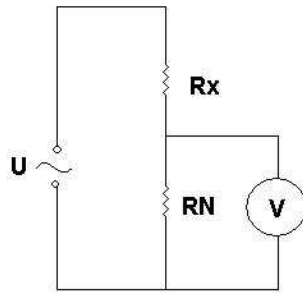


Figura 39. Divizorul rezistiv

Rezistența internă a sursei se neglijează. În acest caz curentul care trece prin circuit este dat de relația 14:

$$I = \frac{U}{R_X + R_N} \quad (14)$$

Alegând rezistența  $R_N$  mult mai mică decât rezistența conductorului ionic din celula de conductanță, rezultă:

$$I = \frac{1}{R_X} \cdot U \quad (15)$$

Căderea de tensiune pe rezistența  $R_N$  este:

$$U_N = I \cdot R_N \quad (16)$$

În care dacă se înlocuiește curentul  $I$ , dat de relația (15), se obține:

$$U_N = \frac{1}{R_X} \cdot U \cdot R_N = K \cdot \frac{1}{R_X} \quad (17)$$



Prin urmare căderea de tensiune pe rezistența etalon  $R_N$  este invers proporțională cu conductanța conductorului ionic, adică a electrolitului  $R_X$ . Măsurarea tensiunii  $U_N$  se face cu un voltmetru electronic cu rezistență mare de intrare, care se etalonează direct în unități de conductanță [117].

Celula de conductanță este constituită dintr-o teacă de material plastic în care se găsesc 2 electrozi confecționați din platină.

Este necesar ca acești doi electrozi să fie bine fixați ca să nu existe deplasare între ei care afectează constanta celulei și produce erori grave de determinare [118,119].

Deși conductanța unei probe variază cu temperatura, pentru scopul propus nu este nevoie ca soluția din vasul de amestec unde se găsește celula de conductanță să fie termostată.

Atât proba ce urmează să fie epurată cât și soluția de saramură sunt la temperatura laboratorului.

S-a determinat conductanța pentru o serie de soluții de clorură de sodiu având concentrațiile cuprinse în intervalul 0 – 20 g/dl. Valorile obținute sunt redate în tabelul III.

Tabel III. Variația conductanței în funcție de concentrație pentru soluția de clorură de sodiu.

Concentrație (g/dl)	Conductanță (mS)	Concentrație (g/dl)	Conductanță (mS)
0	0.015	7	69.3
0,1	1.87	8	75
0,2	3.37	9	80.4
0,3	4.9	10	84.9
0,4	6.24	11	91.3
0,5	7.53	12	96.3
0,6	8.77	13	100.2
0,7	9.98	14	104.7
0,8	11.09	15	108.2
0,9	12.08	16	112.1

Concentrație (g/dl)	Conductanță (mS)	Concentrație (g/dl)	Conductanță (mS)
1	12.88	17	115.9
2	34.9	18	118.4
3	43.4	19	121.7
4	50.6	20	127.7
5	57.1	-	-
6	63.6	-	-

Reprezentând grafic datele obținute (figura 40) se obține un coeficient de corelație bun, care permite să se aprecieze că variația conductivității soluției de clorură de sodiu este liniară cu concentrația.

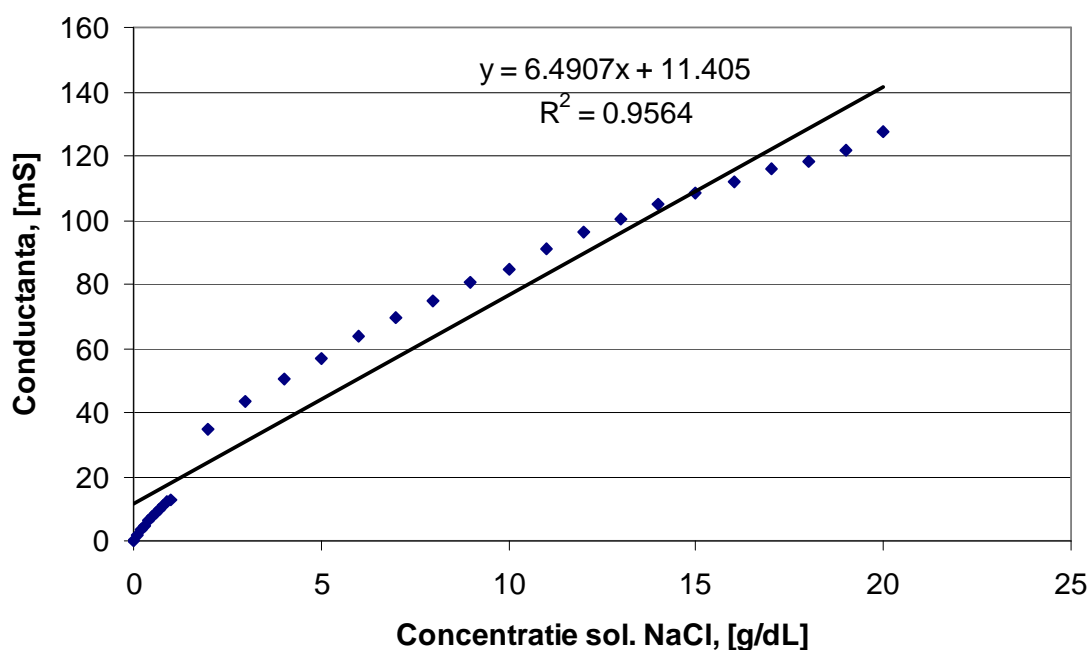


Figura 40. Dependența conductanță – concentrație pentru soluția de clorură de sodiu.

Semnalul de ieșire al conductometrului este sub forma unei tensiuni continue care crește liniar cu concentrația soluției de clorură de sodiu. Această tensiune este comparată cu o tensiune reglabilă prescrisă de către operator și care poartă numele de tensiune de referință. Ea se stabilește cu

ajutorul potențiometrului “Salinitate” de pe panoul frontal al sistemului de automatizare. În momentul în care cele două tensiuni s-au egalat, puntea de măsură care realizează comparația este echilibrată și astfel se generează un semnal care semnifică atingerea salinității dorite. Acest semnal ajunge la calculatorul de proces care comandă mai departe fluxul tehnologic. Totodată semnalul este afișat pe panoul frontal prin aprinderea ledului verde “C”.

### **Placa de achiziție.**

Microinstalația experimentală este prevăzută cu o placa de achiziție de semnale de tip LabJack U3. (figura 41).

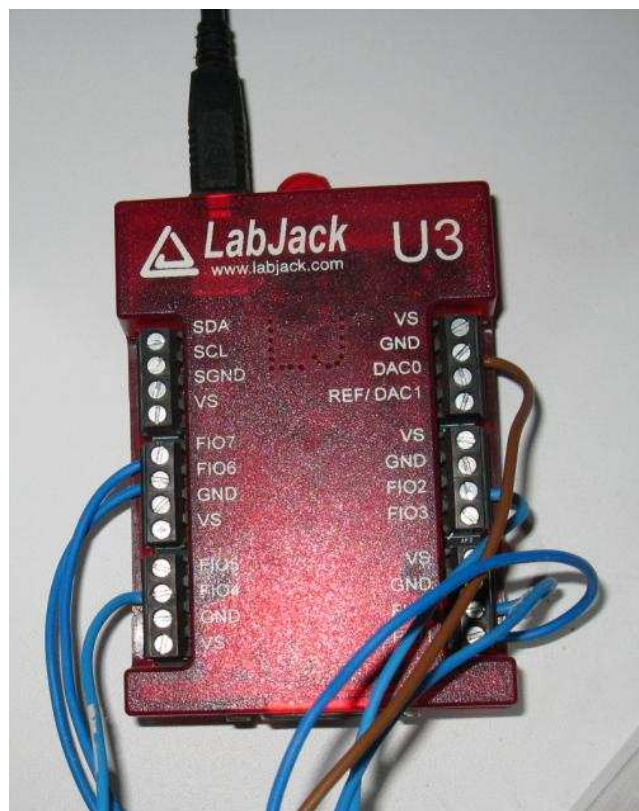


Figura 41. Placa de achiziție tip LabJack U3.

Această placă de achiziție este multifuncțională, având 8 porturi care pot fi configurate ca intrări sau ca ieșiri analogice, este compatibilă cu Windows XP, 2000, Vista, Linux, MacOS. Comunicația cu calculatorul se face prin intermediul unui port USB care asigură și tensiunea de alimentare [120,121].

Caracteristicile principale ale acesteia sunt:

- Tensiunea de intrare: 0 – 2,4 V
- Rezoluția de intrare: 12 bits.
- Viteza de eșantionare 2500 date/secundă.
- Metoda de achiziție: soft sau hard (digital trigger)
- Tensiunea de iesire 0 – 5 V.

Tensiunile corespunzătoare semnalelor din microinstalația experimentală care ajung ca semnale de intrare pe placa de achiziție sunt aduse în domeniul de valori impus de specificațiile plăcii cu divizoare rezistive realizate cu rezistori având toleranța de 1%.

#### **Calculatorul de proces.**

Drept calculator de proces s-a utilizat un microcalculator de tip personal, iar softul de comandă a întregului dispozitiv a fost conceput special pentru această aplicație. (Anexa 1).

#### **6.4. Funcționarea microinstalației experimentale.**

Funcționarea microinstalației experimentale se poate urmări în mod facil pe schema de principiu a dispozitivului experimental care este prezentată în figura 42. Sunt evidențiate aici dispozitivele hidraulice și pneumatice, fluxurile de materiale precum și plasarea senzorilor aferenți: [80]

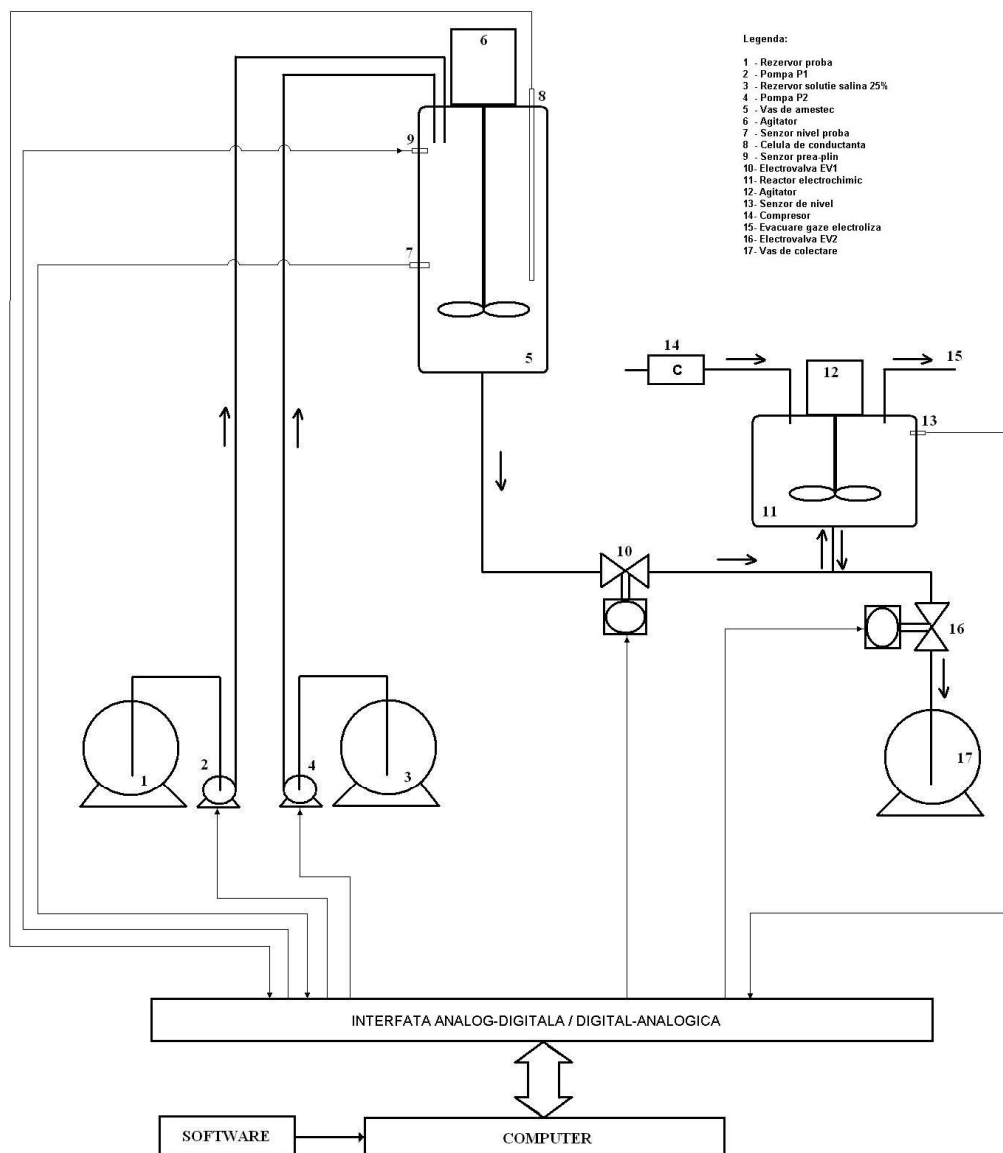


Figura 42. Schema bloc a microinstalației experimentale.

Proba care conține citostaticul/citostaticele ce trebuie epurate este aspirată cu ajutorul pompei peristaltice P1 (Fig. 42-2) din rezervorul cu apă uzată. Aceasta ajunge în vasul de amestec (Fig. 42-5) pe care îl umple până la un nivel prestabilit corespunzător unui volum de 300 ml fapt detectat cu ajutorul unui senzor de conductanță (Fig. 42-7) care comandă oprirea pompei P1. Vasul de amestec este prevăzut cu un dispozitiv de agitare (Fig. 42-6) care realizează omogenizarea continuă a probei. În momentul în care se încheie preluarea probei intră în funcțiune pompa P2 (Fig. 42-4) care introduce o soluție de saramură 25% din rezervorul 2 (Fig. 42-3). O celulă de

conductanță (Fig 42-8) existentă în vasul de amestecare măsoară permanent conductanța probei deci indirect salinitatea acesteia. Pe măsură ce se introduce un volum din ce în ce mai mare de saramură conductanța probei crește, fapt sesizat de către sistemul de conducere electronic care prin intermediul calculatorului de proces, în momentul atingerii salinității setate de operator oprește pompa P2. În acest moment conținutul vasului de amestec (citostaticul în soluție salină) este trimis către microreactorul electrochimic. În cazul în care apare o funcționare anormală a unei pompe, a senzorului de nivel pentru probă sau a celulei de conductanță și se ajunge la umplerea exagerată a vasului de amestec, un alt senzor (Fig. 42-9) plasat la nivelul marginii superioare a vasului de amestec generează un semnal de alarmă și întreaga microinstalație este oprită.

Alimentarea microreactorului electrochimic (Fig 42-11) se face prin curgere liberă. Pe traseul de alimentare se găsește electrovalva EV1 (Fig. 42-10) care este deschisă până când se atinge nivelul maxim de umplere al reactorului electrochimic, fapt sesizat de către un senzor de conductanță plasat în reactor. (Fig. 42-13). În momentul în care microreactorul este plin începe electroliza sub curent constant care durează un timp fixat de operator. În tot timpul desfășurării electrolizei amestecul de reacție este omogenizat cu ajutorul unui agitator plasat în reactor (Fig. 42-12). Curentul de electroliză este reglabil în intervalul 0 – 2 A și este menținut constant de către un dispozitiv de automatizare electronic, pentru a evita creșterea sa pe măsura încălzirii electrolitului (sursa de alimentare a reactorului electrochimic). După încheierea electrolizei microreactorul electrochimic este golit prin intermediul electrovalvei EV2 (Fig. 42-16) într-un recipient de colectare (Fig. 42-17). După ce microreactorul electrochimic e gol ciclul se reia automat și un nou volum de soluție ajunge în electrolizor în vederea epurării.

Atât vasul de amestecare cât și microreactorul electrochimic sunt prevăzute cu ștuțuri pentru colectarea de probe în timpul procesului în vederea analizelor fizico-chimice.

Microreactorul electrochimic mai este prevăzut cu un sistem de eliminare a gazelor rezultate în urma electrolizei, acestea fiind evacuate în afara spațiului de lucru (Fig. 42-14,15).

Acest sistem constă dintr-un compresor care generează un flux de aer comprimat cu un debit de 500 ml/minut care "spală" gazele produse în timpul electrolizei. Datorită acestui sistem gazele rezultate prin electroliză sunt în mod eficient evacuate din reactor prin ștuțul de evacuare a gazelor situat pe capacul reactorului.

## **6.5. Testarea funcționării microinstalației experimentale**

Funcționarea microinstalației experimentale a fost testată în privința următoarele aspecte:

- Producția de clor liber în cursul electrolizei unor soluții de clorură de sodiu cu diverse concentrații în limitele 0 – 10 g/ dl.
- Eficiența epurării unor ape reziduale sintetice cu conținut de substanțe citostatice în diverse concentrații prin metode fizico-chimice.
- Propunerea unor mecanisme teoretice care să explice degradarea citostaticelor considerate , în condițiile din reactorul electrochimic.
- Eficiența epurării unor ape reziduale reale (urină provenită de la pacienții care au urmat diverse tratamente chimioterapice) prin metode fizico-chimice.
- Analiza prin metode biologice a produșilor rezultați în urma epurării (efluentul de la microreactorul electrochimic) în vederea determinării citotoxicității reziduale.

### 6.5.1. Evaluarea producției de clor liber

Prin clor liber se înțeleg mai multe specii chimice foarte reactive: hipoclorit de sodiu, acid hipocloros și clor dizolvat fizic.

Toate acestea au un puternic caracter oxidant, fiind extrem de eficiente în oxidarea multor substanțe organice [122,123].

Clorul fizic dizolvat este foarte activ, în consecință este extrem de util în cazul substraturilor rezistente la oxidare cum sunt: heterociclii și nitroderivații aromatici.

În mediu alcalin, hipocloriții sunt oxidanți controlabili. Pe măsura scăderii pH-ului apare acidul hipocloros instabil și clorul liber. Hipocloritul este un agent oxidant activ capabil să oxideze chiar și hidrocarburile aromatice: naftalina [124].

Pentru dozarea clorului liber s-a folosit o metoda titrimetrică cu soluție de metil-orange care este decolorată cantitativ de către clorul liber care se găsește în probă [125].

#### **Determinarea clorului liber prin metoda cu metil-orange.**

##### **Principiul metodei:**

Metoda constă în aprecierea colorimetrică a acțiunii de decolorare pe care o are clorul liber asupra metil-oranjului în mediu acid.

##### **Reactivi necesari:**

- Soluție de metil-orange în apă cu concentrația 0,46 g/1000 ml. 1 ml din această soluție corespunde la 0,1 mg clor liber.
- Acid sulfuric soluție 30%.
- Apă bidistilată.

##### **Mod de lucru:**

Într-un pahar Erlenmeyer se introduc: 1 ml probă de analizat, 0,2 ml soluție de acid sulfuric 30% și 25 ml apă bidistilată. Cu o biuretă gradată se introduce soluția de metil-orange picătură cu picătură pînă la apariția unei culori roz pal care persistă 20 – 30 de secunde.



**Calcul:**

Se cunoaște că 1 ml soluție de metil-orange corespunde la 0,1 mg clor liber. Volumul de probă luat în lucru a fost de 1 ml, deci,

$$\text{mg clor liber/ 100 ml} = V \times 0,1 \times 100. \quad (18)$$

Unde: V – numărul de mililitri de soluție de metil-orange necesar la titrare.

Practic s-au supus electrolizei timp de 120 de minute soluții de clorură de sodiu cu concentrațiile: 1%, 3%, 5%, 7% și 9%. Curentul de electroliză a fost de 1A. S-au recoltat probe în vederea determinării concentrației de clor liber din zece în zece minute urmărindu-se atingerea unei concentrații constante de clor liber.

**Rezultate obținute:**

A) Electroliza soluției de NaCl 1%. (Tabel IV)

Timp prelevare probe (minute)	Volum de soluție metil-orange consumat (ml)	Concentrație clor liber (mg/dl)
10	1,1	11
20	1,6	16
30	2,1	21
40	2,1	21
50	20	20
60	2,1	21
70	2,1	21
80	2,1	21
90	2,1	21
100	2,1	21
110	2,1	21
120	2,1	21

B) Electroliza soluției de NaCl 3%. (Tabel V)

Timp prelevare probe (minute)	Volum de soluție metil-orange consumat (ml)	Concentrație clor liber (mg/dl)
10	1,9	19
20	3,2	32
30	4,8	48
40	5,4	54
50	5,8	58
60	5,8	58
70	5,8	58
80	5,8	58
90	5,7	57
100	5,8	58
110	5,9	59
120	5,8	58

C) Electroliza soluției de NaCl 5%. (Tabel VI)

Timp prelevare probe (minute)	Volum de soluție metil-orange consumat (ml)	Concentrație clor liber (mg/dl)
10	2,3	23
20	3,8	38
30	5,6	56
40	6,0	60
50	6,2	62
60	6,4	64
70	6,4	64
80	6,4	64
90	6,3	63

Timp prelevare probe (minute)	Volum de soluție metil-orange consumat (ml)	Concentrație clor liber (mg/dl)
100	6,4	64
110	6,4	64
120	6,4	64

D) Electroliza soluției de NaCl 7%. (Tabel VII)

Timp prelevare probe (minute)	Volum de soluție metil-orange consumat (ml)	Concentrație clor liber (mg/dl)
10	2,8	28
20	4,5	45
30	6,3	63
40	6,5	65
50	6,7	67
60	6,9	69
70	6,9	69
80	7,0	70
90	6,9	69
100	6,9	69
110	6,9	69
120	6,9	69

E) Electroliza soluției de NaCl 9%. (Tabel VIII)

Timp prelevare probe (minute)	Volum de soluție metil-orange consumat (ml)	Concentrație clor liber (mg/dl)
10	3,1	31
20	5,4	54
30	6,8	68

Timp prelevare probe (minute)	Volum de soluție metil-orange consumat (ml)	Concentrație clor liber (mg/dl)
40	7,2	72
50	7,3	73
60	7,5	75
70	7,5	75
80	7,5	75
90	7,6	76
100	7,5	75
110	7,5	75
120	7,5	75

Reprezentând grafic datele obținute se constată că pe măsură ce crește salinitatea soluției supuse electrolizei, timpul necesar pentru atingerea unei concentrații constante a clorului liber crește, atingând un maxim. Acest fapt are importanță deosebită pentru stabilirea salinității la care se va desfășura epurarea probelor citostatice. (figura 43 a și b)

Se observă că pentru soluțiile de NaCl 5%, 7%, 9% atingerea unei concentrații constante a clorului liber se face în aproximativ 60 de minute comparativ cu celelalte cazuri analizate unde acest echilibru se atinge mai rapid. Folosind una din cele trei concentrații de NaCl pentru degradarea substantelor citostatice se asigură un contact mai lung al acestora cu mediul de reacție. Pentru epurarea probelor cu conținut de substanțe citostatice s-a ales soluția de NaCl 5% pentru a reduce cât mai mult necesarul de reactivi suplimentari introduși în procesul de degradare chimică și electrochimică a agenților citostatice.

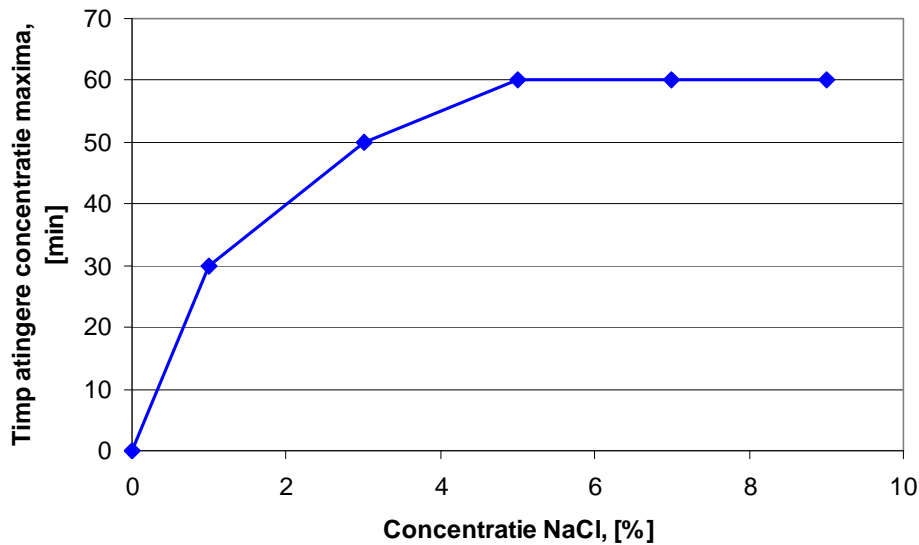


Figura 43 a. Timpul necesar pentru atingerea unei concentrații constante a clorului liber în funcție de concentrația soluției.

### Elaborarea modelului matematic statistic

În cazul în care se cunoaște variația parametrilor unui proces fără a dispune de modelul determinist se poate formula un model empiric prin stabilirea unor relații de corelare statistică.

Forma generală a unei relații de corelare este:

$$y = (X_1, \dots, X_n) \quad (19)$$

unde:

$x_1, \dots, x_n$  – variabilele independente ale procesului studiat;

$y$  – mărimea dependentă.

Determinarea valorilor coeficienților se face prin diferite metode funcție de natura modelului (liniar sau nelinier în variabile și coeficienți). Prin substituirea în ecuația (19) a seturilor de valori numerice ( $\hat{y}_j, x_{1j}, \dots, x_{nj}$ ) obținute experimental rezultă un sistem de  $m$  ecuații, unde  $m$  este numărul total de experimente.

Coeficienții sistemului reprezintă necunoscutele sistemului. Pentru alegerea valorilor coeficienților care satisfac cât mai convenabil toate ecuațiile

este necesară adoptarea unui criteriu de optimizare ce urmează a fi minimizat.

Criteriul cel mai frecvent utilizat în prelucrarea datelor experimentale cu eroare de măsurare normal distribuită este suma pătratelor abaterilor valorilor experimentale față de valorile calculate cu modelul de regresie. Aceasta este definită prin:

$$S = \sum_{j=1}^m (\hat{y}_j - y_j)^2 \quad (20)$$

unde:

$\hat{y}_j$  – valorile măsurate experimental pentru variabila dependentă;

$y_j$  – valorile calculate cu modelul propus pentru aceleași valori ale variabilelor  $x_{ij}, \dots, x_{nj}$ ;

$m$  – numărul total de experimente.

Minimizarea funcției obiectiv (20) se realizează printr-o metodă de optimizare adecvată. Dacă ecuația de regresie propusă este liniară în coeficienți (model polinomial) sau se poate liniariza, se apelează la derivarea criteriului  $S$  în raport cu coeficienții și rezolvarea sistemului de ecuații rezultat prin anularea derivatelor. Această metodă denumită metoda celor mai mici pătrate are avantajul ușurinței în rezolvare, sistemul de ecuații fiind întotdeauna liniar.

Valoarea unui model este dată de măsura în care predicțiile sale concordă cu realitatea. Dar stabilirea adecvanței unui model la realitate este deosebit de complexă. Încă din etapele de elaborare a modelului este necesar să se mențină un echilibru rațional între precizia cerută modelului și cea a informațiilor primare de care se dispune.

Se caută ca rezultatul modelului să aibă gradul de precizie al datelor care se introduc în model. La nivelul de cunoaștere atins astăzi în studiul sistemelor există posibilitatea dezvoltării mult mai riguroase decât precizia datelor care se utilizează și care provin din experiențe sau din formule aproximative. Modelul ridică de multe ori probleme interesante din punct de vedere strict matematic, dar lipsite de semnificație pentru procesul concret studiat. Orice model conține un anumit număr de parametrii ce trebuie

estimați pentru a compara predicțiile cu datele empirice.

Este important ca parametrii modelelor să fie studiați în condiții apropiate de cele existente în natură sau în sistemele reale. Precizia cu care trebuie determinați parametrii depinde și de influența lor în model.

Dacă un model conține parametri care nu pot fi estimați, el trebuie modificat astfel încât să devină verificabil [126,127,128].

După calcularea parametrilor modelului, este necesar să se efectueze o comparație între prezicerile modelului și datele furnizate de procesul real.

Adecvanța globală a modelului reprezintă capacitatea modelului identificat (cu structură precizată și parametri identificați) de a reprezenta datele experimentale cu o suficientă precizie în raport cu precizia (eroarea) experimentală.

Dacă modelul este adecvat, el poate fi acceptat cu condiția să nu poată fi simplificat, de pildă prin eliminarea unor termeni sau variabile (este necesară testarea semnificației coeficienților).

Drept indicatori ai adecvănței modelului se pot folosi:

- *Deviația standard (deviația medie pătratică),  $\sigma$*  :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_{icalc})^2}{n-1}} \quad (21)$$

- *Indicatorul preciziei modelului,  $R^2$* :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{icalc} - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2} \quad (22)$$

*Coeficientul de corelare multiplă,  $R$* :

$$R = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_{icalc})^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}} \quad (23)$$

Unde:

$n$  – numărul de seturi de date (determinări),

$y$  – variabila dependentă,

$y_{icalc}$  – valoarea rezultată pentru  $y$  pe baza ecuației de regresie,

$\hat{y}_i$  - valoarea experimentală,

$\bar{y}$  - valoarea medie.

Coeficientul de corelare multiplă reprezintă o măsură a capacității globale a modelului de a reprezenta datele experimentale, chiar dacă pe porțiuni modelul este mai puțin adecvat.

Acest coeficient trebuie să fie mai mare de 90%, fiind recomandabilă utilizarea numai împreună cu alte teste de adecvanță pentru model și calitatea estimatului [129].

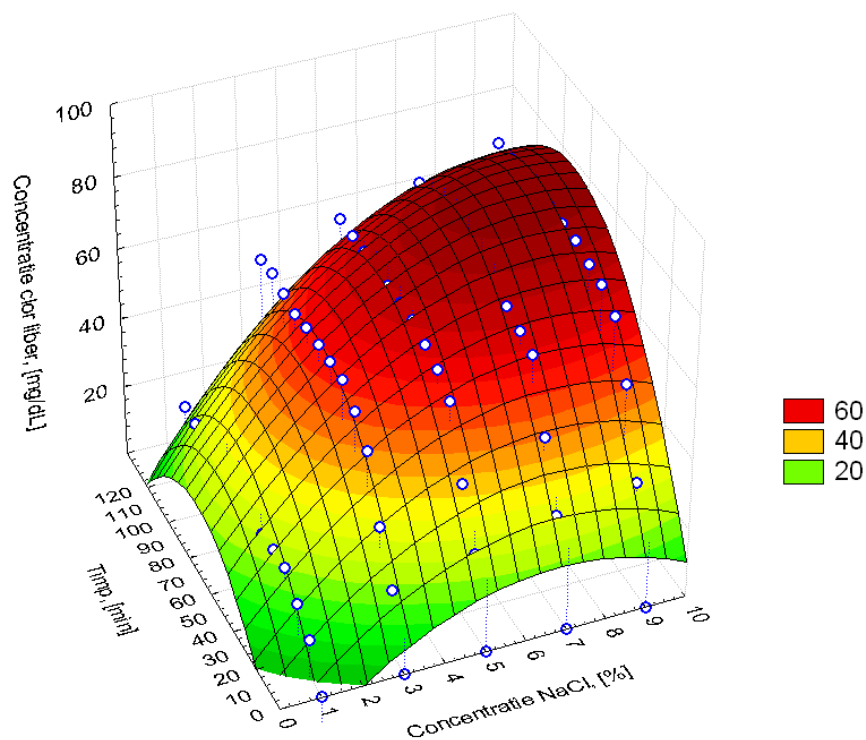


Figura 43 b. Dependența între concentrația de clor liber generat, concentrația soluției de NaCl supusă electrolizei și durata acesteia.

$$\text{Concentrație clor liber, [mg/dL]} = -19.9723 + 11.5352 \cdot x + 1.1391 \cdot y - 0.853 \cdot x \cdot x + 0.034 \cdot x \cdot y - 0.008 \cdot y \cdot y \quad (24)$$

Deviatia standard = 8.0178

Indicatorul de precizie al modelului,  $R^2 = 0.8905$

Coeficientul de corelație,  $R = 0.9437$



### **6.5.2. Eficiența epurării unor ape reziduale cu conținut de substanțe citostatice**

Apele reziduale sintetice au fost utilizate în studiile preliminare de epurare precum și la studiile de toxicitate pe sisteme biologice deoarece prezintă avantajul de a avea o compoziție simplă și bine definită.

Au fost prelucrate prin metoda electrochimică, în vederea epurării, ape reziduale sintetice și probe reale (urină) cu conținut de:

- Melphalan,
- Doxorubicină,
- Metotrexat,
- Ciclofosamidă,
- Ifosamidă.

Prin modul original de concepție al microinstalației experimentale, sunt favorizate reacțiile de interes: oxidarea electrochimică la anod și oxidarea chimică în masa de reacție prin speciile reactive ale clorului liber. Aceste mecanisme combinate duc la degradarea avansată a agenților citostatici [130,131].

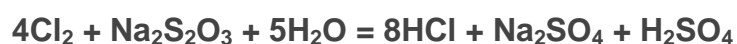
Pentru a putea colecta și studia probele reale de urină provenite de la pacienți, s-a solicitat consimțământul informat al acestora cu respectarea legislației în vigoare în ceea ce privește identitatea pacientului, și implicarea acestuia în cercetarea științifică.

Determinările experimentale au arătat ca unele dintre substanțele citostatice luate în studiu sunt foarte sensibile la oxidare, degradându-se foarte repede, pe când altele se degradează greu. Din acest considerent s-a ales ca durata procesului de epurare să fie 90 de minute pentru toate probele.

Toate probele supuse epurării au fost analizate cromatografic, respectiv fluorimetric pentru dozarea compușilor de interes precum și pentru urmărirea procesului de degradare a acestora.

După încheierea epurării probele au fost analizate din punct de vedere al citotoxicității prin determinări „in vitro” pe culturi de celule și „in vivo” pe animale de laborator, comparativ cu probele neepurate.

În vederea acestor determinări, toate probele recoltate în cursul desfășurării procesului de electroclorinare precum și la sfârșitul acestuia au fost tratate corespunzător pentru neutralizarea clorului liber rezidual, astfel încât să fie evitată orice degradare a substanțelor din momentul prelevării din microreactorul electrochimic și până în momentul analizei. Această neutralizare s-a făcut cu o soluție de tiosulfat de sodiu ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 5%. Acesta poate neutraliza cantități mari de clor liber conform reacției: [132]



Absența clorului liber se verifică prin metoda titrimetrică cu metil-oranj descrisă anterior.

Pentru fiecare determinare s-au prelevat 900  $\mu\text{L}$  probă care a fost introdusă într-un tub Eppendorff de 1,5 ml care conține 100  $\mu\text{L}$  de soluție tiosulfat de sodiu 5%. Acest adaos induce un factor de eroare de 1/10 în ceea ce privește concentrația reală a probei analizate care trebuie luat în considerare pentru determinările cantitative.

Deoarece probele prelevate în cursul desfășurării procesului electrochimic au un volum mic (900  $\mu\text{L}$ ) s-a folosit următoarea metodă originală (microanalitică) de verificare a absenței clorului liber rezidual: Într-un tub Eppendorff de 0,2 ml (folosite în tehnica PCR) se introduc pe rând:

- 50  $\mu\text{L}$  apă bidistilată,
- 10  $\mu\text{L}$  probă prelevată pe tiosulfat,
- 5  $\mu\text{L}$  soluție de acid sulfuric 30%.
- 10  $\mu\text{L}$  soluție metil-oranj 0,46 g/1000 ml.

Apariția unei culori roz persistente indică faptul că nu mai există clor liber rezidual în proba respectivă.

Probele recoltate la finalul procesului de epurare, care vor fi folosite în studiile pe modele biologice sunt tratate suplimentar:

- Neutralizarea clorului liber rezidual cu soluția de tiosulfat de sodiu 5%: 20 ml probă + 1 ml soluție tiosulfat într-un vas Erlenmeyer de 50 ml. Se verifică absența clorului liber cu metoda descrisă mai sus.

- pH-ul este corectat în vederea aducerii lui cit mai aproape de 7,4 (pH-ul fiziologic).
- Prin extracții în solvenți organici urmate de evaporări și resolubilizări sunt îndepărtați unii compuși care interferă cu sistemele biologice și induc erori în interpretarea rezultatelor.
- Sterilizare mecanică prin filtrare pe filtre microbiologice cu diametrul porilor de 0,2 micrometri.

Aceste aspecte vor fi prezentate pe larg cu particularitățile respective la fiecare agent citostatic luat în studiu.

### 6.5.2.1. Epurarea Melphalanului

Melphalanul este un agent citostatic alchilant, utilizat în tratamentul mielomului multiplu și al carcinomului ovarian avansat. Din datele de farmacocinetică rezultă că acesta se elimină renal netransformat în proporție de 25 – 30% și este detectabil în urină la 48 de ore după administrare. Astfel ajung în mediul înconjurător anumite cantități de melphalan care sunt crescute în cazul pacienților care beneficiază de transplant medular ca și opțiune terapeutică salvatoare pentru mielomul multiplu refractar la schemele convenționale de tratament. În aceste situații se administrează doze mari de melphalan: pentru un individ de 70 – 80 Kg se administrează 300 - 350 mg melphalan. Din acesta aproximativ 80 – 100 mg se elimină prin urină și ajung în mediul înconjurător [133 – 135].

Modelul experimental a fost pus la punct utilizând o apă reziduală sintetică cu un conținut de 15 mg/dl melphalan. S-a optat pentru această concentrație superioară celor care se pot atinge în probele de urină provenite de la pacienți pentru a se putea evidenția în mod facil și în timp scurt efectele citotoxice ale compusului în sistemele biologice de investigare (culturi de celule și animale de laborator). În mod similar s-a procedat și pentru celelalte citostatice supuse epurării prin metoda descrisă.

### Prepararea apei reziduale sintetice cu conținut de melphalan.

Se dizolvă 15 mg de melphalan în 5 ml alcool etilic absolut. Soluția astfel obținută se diluează la balon cotat de 100 ml cu soluție de clorură de sodiu 5% obținându-se astfel apa reziduală sintetică cu un conținut de 15 mg/dl melphalan.

### Dozarea melphalanului.

Pentru dozarea melphalanului atât în apa reziduală sintetică cât și în probele de urină provenite de la pacienți s-a utilizat cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC). [136] S-a utilizat un cromatograf de lichide de înaltă performanță tip Agilent 1100 prevăzut cu un detector spectrofotometric UV – VIS.

Condițiile de desfășurare ale analizei HPLC au fost:

- Faza mobilă: 20% acetonitril + 80% apă la pH = 6 (tampon fosfat)
- Fluxul de fază mobilă: 1 ml/minut
- Coloană cu fază inversată C18. (Zorbax SB-C18)
- Temperatura coloanei: 25°C
- Volumul de probă injectat: 20 µL
- Detecție la  $\lambda = 260$  nm
- Timpul de retenție pentru melphalan a fost de 24,3 minute
- Timpul de achiziție pentru fiecare cromatograma: 30 minute

S-a trasat o curbă de etalonare pentru melphalan în condițiile date. În tabelul IX sunt arătate datele obținute care sunt reprezentate grafic în figura 44.

Tabel IX. Curba de etalonare a sistemului HPLC pentru melphalan:

Concentrația de melphalan (mg/dl)	Aria picului corespunzător melphalanului [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător melphalanului (minute)
15	7090	24,08
10	4395	24,17
5	2120	24,32

Concentrația de melphalan (mg/dl)	Aria picului corespunzător melphalanului [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător melphalanului (minute)
2,5	954	24,46
1	335	24,66
0,5	150	24,83
0,1	26	25,02

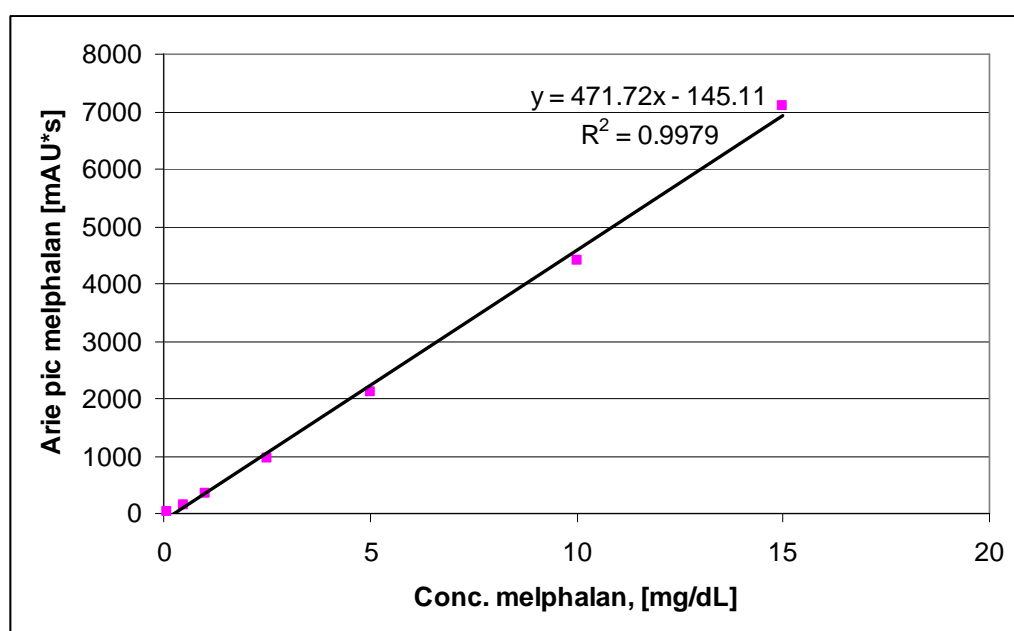


Figura 44. Curba de calibrare pentru melphalan.

Din analiza curbei de calibrare pentru melphalan prezentată în figura 44, reiese ca există o foarte bună corelație între concentrațiile de melphalan și ariile picului corespunzător acestuia ( $R^2 = 0,9979$ ), ceea ce permite validarea metodei de lucru și utilizarea ei pentru determinările concentrațiilor de melphalan în probele luate în lucru.

În figura 45a sunt prezentate cromatogramele pentru proba blank (soluția solvent pentru melphalan: NaCl 5% cu etanol 5 ml/dl), respectiv 45b – melphalan 15 mg/dl.

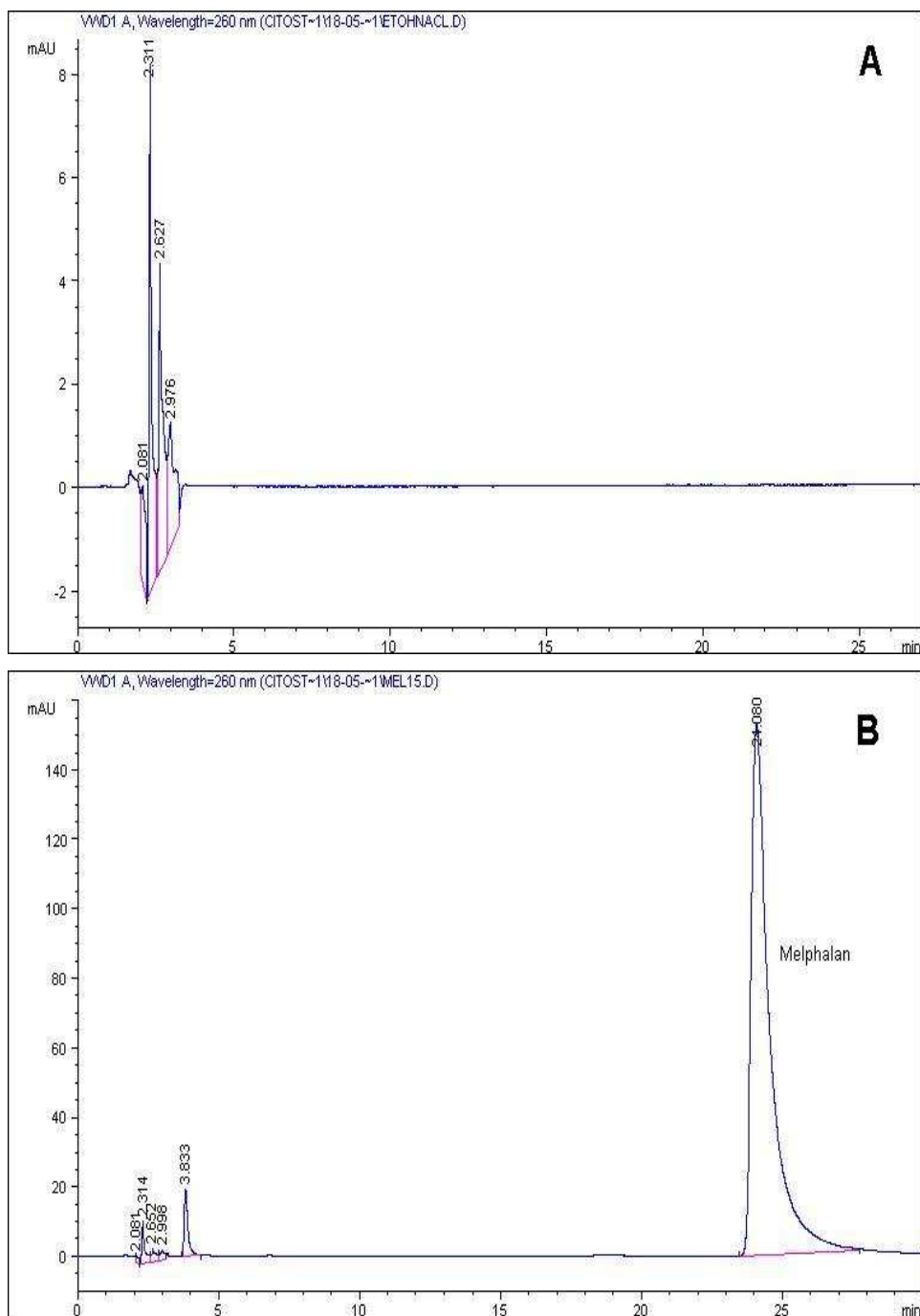


Figura 45 a și b. Cromatograma HPLC pentru blank - solvent (a) și melphalan 15 mg/dl (b).

Proba de apă reziduală sintetică cu conținut de melphalan (15 mg/dl) a fost supusă epurării în microinstalația experimentală, la un curent de 1A timp de 90 de minute. S-au prelevat probe din reactorul electrochimic în cursul desfășurării electrolizei care au fost analizate prin metoda HPLC propusă, obținându-se următoarele rezultate: (tabel X).

Tabel X. Epurarea apei reziduale sintetice cu conținut de melphalan.  
Analiza HPLC.

Momentul recoltării probei (minute)	Aria picului corespunzător melphalanului [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător melphalanului (minute)	Concentrația de melphalan (mg/dl)
0	6567,0	23,95	13,4
1	60,3	24,58	0,2
2	10,7	24,76	0,03
3	3,1	24,89	0,01
4	-	-	-
5	-	-	-
10	-	-	-
15	-	-	-
30	-	-	-
60	-	-	-
90	-	-	-

Se observă că în primele 3 minute de electroliză concentrația de melphalan scade sub limita de detecție a aparatului, însă este posibil ca, alți compuși intermediari (potențial toxici) formați în cursul oxidării să fie încă prezenți în mediul de reacție. Din acest considerent se continuă electroliza pînă la minutul 90 când se prelevează probe atât pentru studiile de citotoxicitate pe sisteme biologice cât și pentru analiză GC-MS cu scopul de a verifica dacă apar alți compuși evidențiabili și posibil identificabili prin această metodă.

În figura 46 este reprezentată variația concentrației de melphalan din proba sintetică în primele 3 minute ale procesului de epurare electrochimică. Din grafic se observă că scăderea concentrației de melphalan are loc după o ecuație exponențială:

$$\text{melphalan} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) = 13,4 \cdot e^{-2,718 \cdot \text{timp}(\text{min})} \quad (25)$$

Valoarea coeficientului de corelație obținută (0,8818) indică faptul că această ecuație aproximează bine evoluția concentrației de melphalan pe durata procesului de epurare.

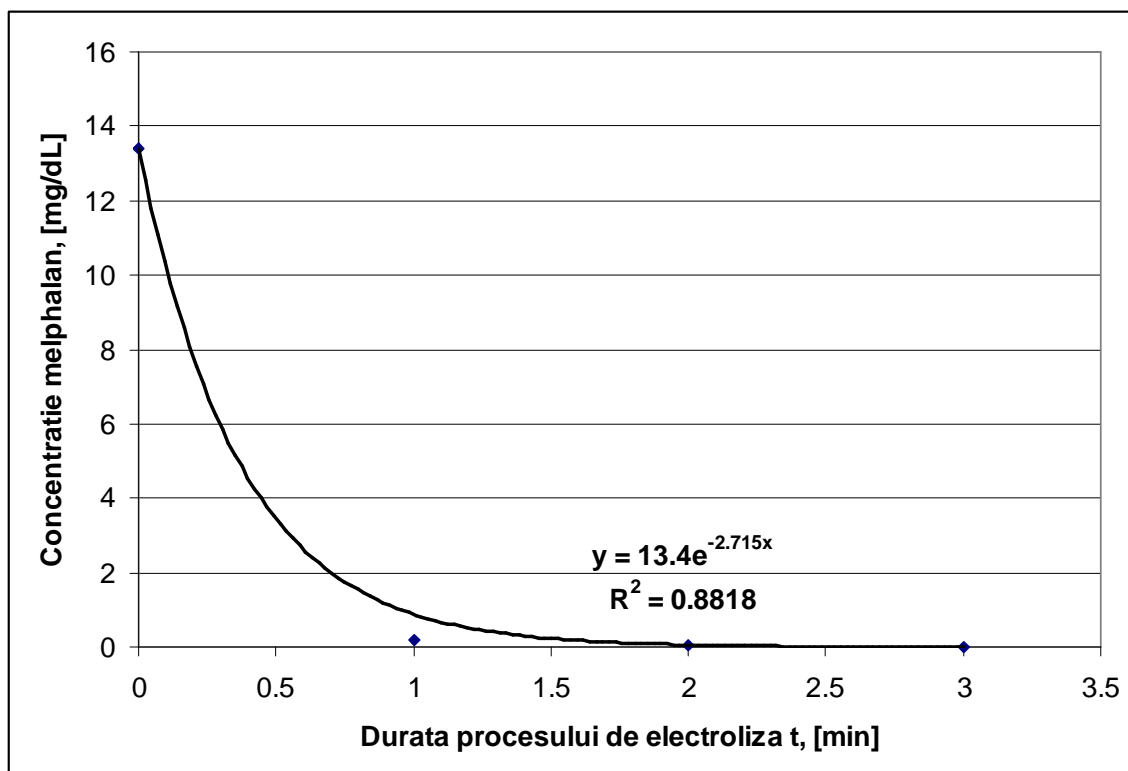


Figura 46. Variația concentrației de melphalan din proba sintetică în primele 3 minute ale procesului de epurare electrochimică.

S-au supus epurării cinci probe reale de urină provenite de la pacienți cu mielom multiplu care au beneficiat de transplant autolog de celule stem hematopoetice. Terapia de condiționare pretransplant a acestor pacienți a constat din monochimioterapie cu doze mari de melphalan: 140 – 160 mg/m<sup>2</sup> suprafață corporală, ceea ce înseamnă o doză de aproximativ 300 - 350 mg melphalan într-o singură administrare.

Concentrațiile de melphalan determinate prin metoda HPLC în urina pacienților respectivi au fost următoarele: (tabel XI)



Tabel XI. Concentrațiile urinare de melphalan ale pacienților luați în studiu.

Pacient	Concentrația urinară de melphalan (mg/dl)	Concentrația de melphalan (mg/dl) în urina salefiată
Pacient 1	1,8	1,4
Pacient 2	2,1	1,6
Pacient 3	1,4	1
Pacient 4	1,6	1,3
Pacient 5	1,1	0,9

În tabelul XII și figura 47 se prezintă datele obținute în urma epurării probelor reale de urină provenite de la pacienții incluși în studiu.

Tabel XII Epurarea probelor reale de urină cu conținut de melphalan. Concentrațiile de melphalan determinate HPLC.

Timp (minute)	0	0,5	1	1.5	2	3	4	5
P1	1,4	0.4	0.13	0.02	-	-	-	-
P2	1,6	0.38	0.15	0.03	-	-	-	-
P3	1	0.3	0.05	0.02	-	-	-	-
P4	1,3	0.35	0.10	0.01	-	-	-	-
P5	0,9	0.28	0.08	0.02	-	-	-	-

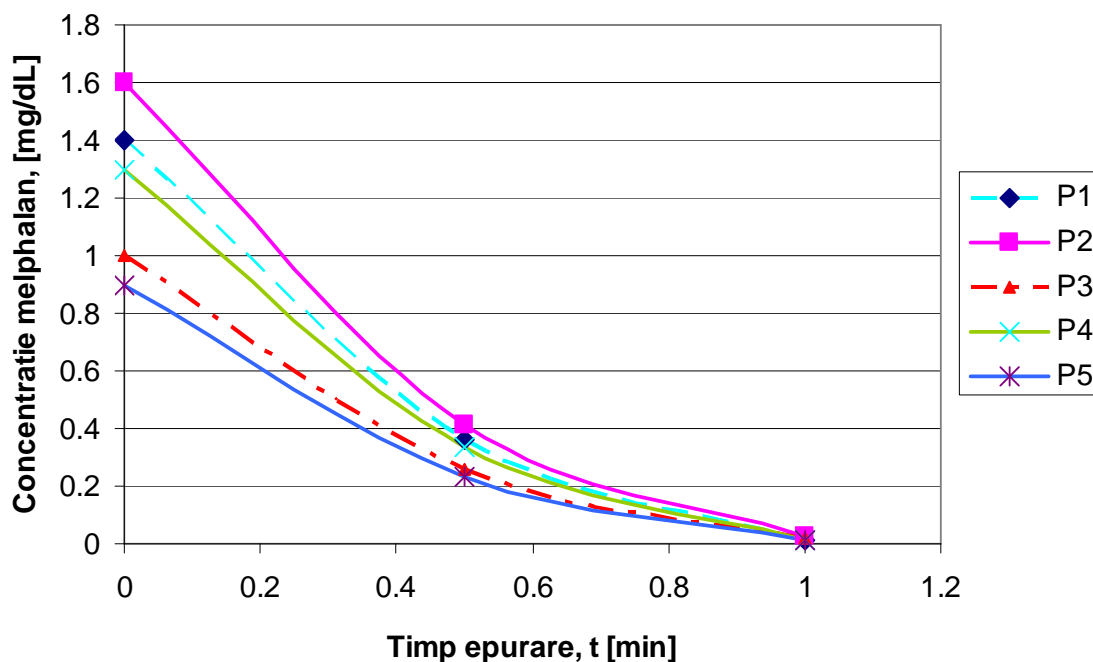


Figura 47. Epurarea probelor reale de urină cu conținut de melphalan.

Analiza datelor experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 5 pacienți indică o variație a concentrației de melphalan asemănătoare cu cea obținută în urma epurării probei sintetice.

Drept urmare, s-a verificat modul în care ecuația de variație a concentrației de melphalan în proba sintetică descrie evoluția concentrațiilor de melphalan în probele reale.

Concordanța dintre datele experimentale obținute în urma epurării probele reale provenite de la cei 5 pacienți și cele obținute în urma aplicării ecuației de variație a concentrației de melphalan în proba sintetică este redată în figura 48.

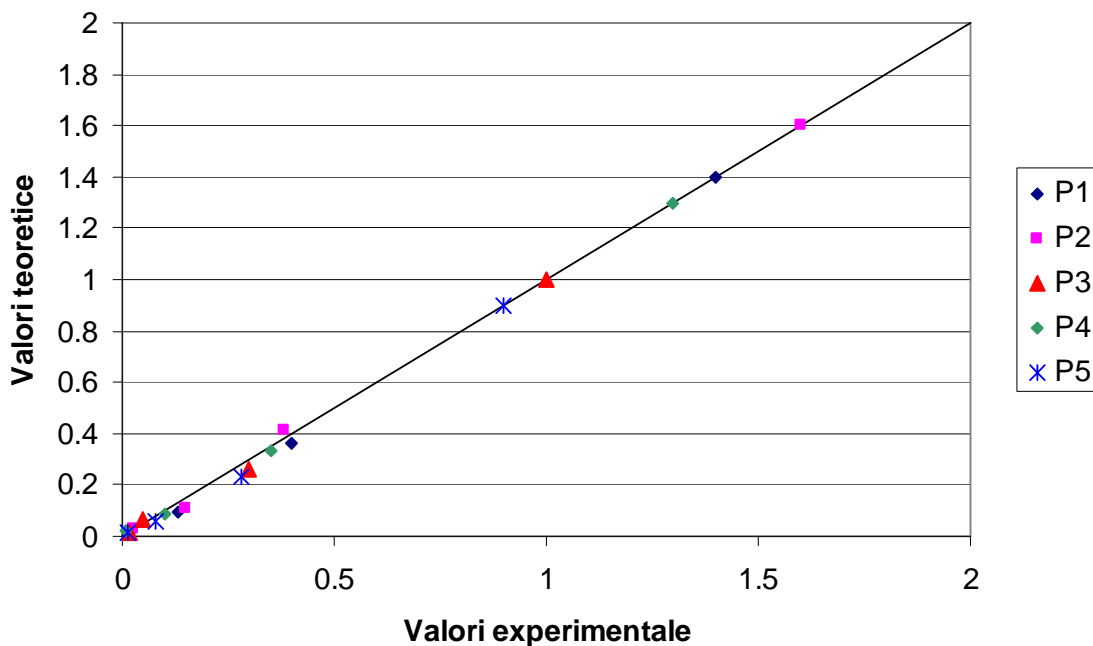


Figura 48. Concordanța dintre datele experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 5 pacienți și cele obținute în urma aplicării ecuației de variație a concentrației de melphalan în proba sintetică.

Din figură se observă că valorile teoretice calculate se apropie foarte mult de cele experimentale ceea ce arată că ecuația generată pe baza datelor experimentale obținute în urma epurării probei sintetice poate fi aplicată, cu succes, pentru toate probele reale provenite de la pacienți tratați cu diferite doze de melphalan.

Mecanismele de degradare prin oxidare electrochimică ale substanțelor organice sunt de regulă foarte complexe și dacă degradarea decurge complet deobicei se ajunge pînă la dioxid de carbon și apă.

Se propun pentru toate citostaticele luate în studiu, cele mai probabile căi de degradare electrochimică. Aceste mecanisme prezentate teoretic au putut fi parțial verificate prin metode analitice de mare sensibilitate: gaz cromatografia cuplată cu spectrometrie de masă precum și studiile complementare de citotoxicitate efectuate pe sisteme biologice: culturi de celule și animale de laborator.

În cazul melphalanului, transformările care au loc cel mai probabil în cursul degradării electrochimice, sunt prezentate în figura 49.

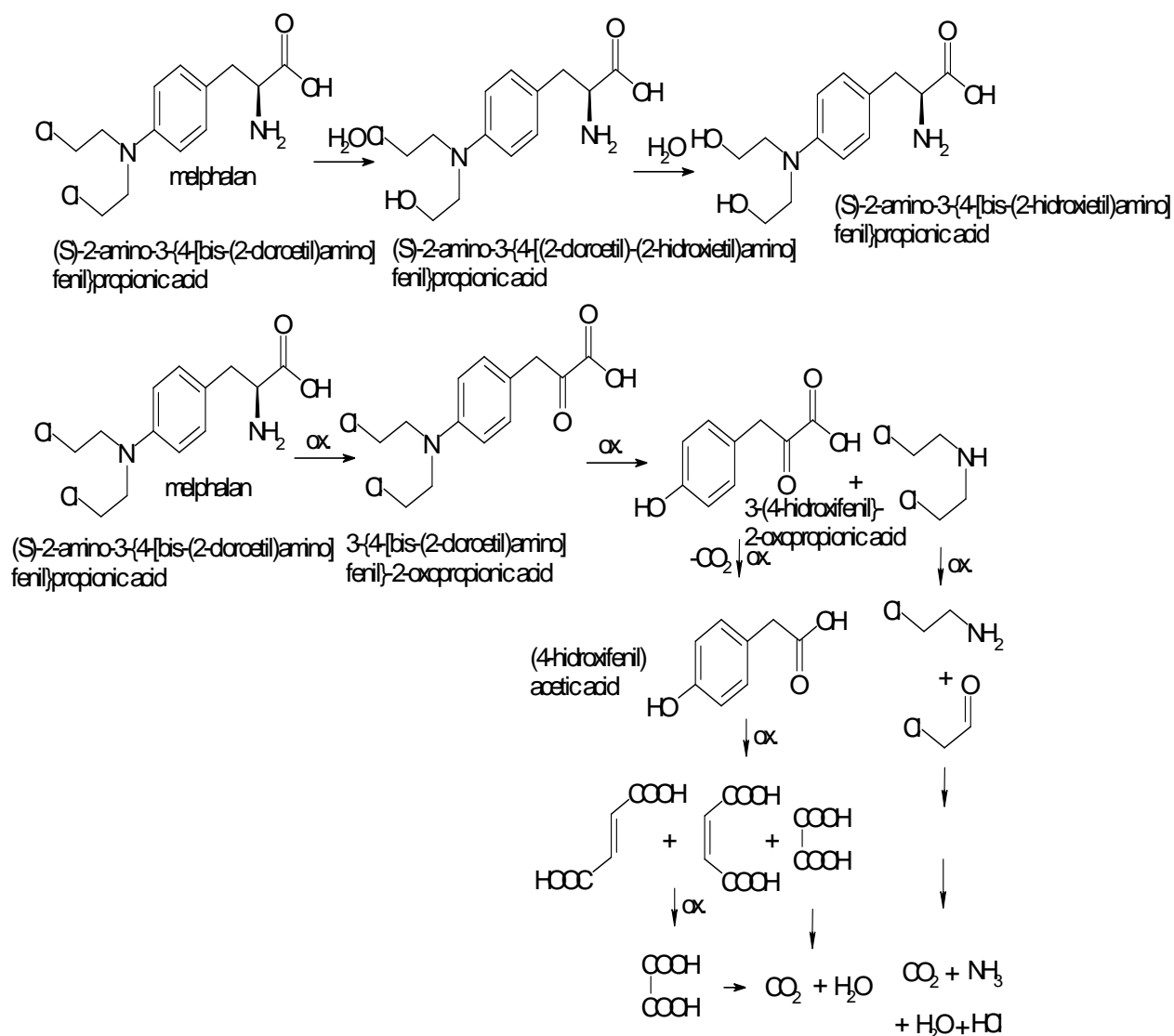


Figura 49. Degradarea prin oxidare electrochimică a melphalanului.

S-a urmărit dacă la sfârșitul celor 90 de minute de electroliză, în masa de reacție mai persistă compuși organici detectabili prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă.

Pentru aceasta, 750  $\mu$ L de probă în care s-a neutralizat clorul liber rezidual, s-au supus extracției lichid - lichid cu 500  $\mu$ L de amestec 1:1 diclorometan-cloroform. Extracția s-a realizat în tuburi de sticlă de 2 ml cu dop de teflon prin vortexare energetică timp de 20 de minute. După separarea fazei organice cu ajutorul unei micropipete de sticlă, aceasta a fost supusă uscării pe clorură de calciu anhidră timp de 24 de ore după care a fost injectată în cromatograf. S-a folosit un cromatograf de gaze cuplat cu spectrometru de masă de tip Agilent HP GC 6890 MS 5973 [43].

Parametrii de analiză GC-MS au fost:

- Volumul de probă injectat: 2  $\mu$ L
- Mod de injectare: manual
- Temperatura injector: 250 °C
- Coloană nepolară de tip HP-5MS. Lungimea 30 m, diametrul interior 0,25 mm, grosimea filmului de fază staționară 0,25 microni.
- Program de temperatură cuptor: 60 – 300 °C, cu o viteză de creștere a temperaturii de 4 °C/minut, și un hold de 5 minute la 300 °C.
- Delay time-ul 7 minute (pentru a se evita supraîncărcarea MS – ului)
- Plaja de scanare m/z: 30 – 600 u.a.m.
- Energia de ionizare: 70 eV.
- Durata unei analize: 65 de minute.

Cromatograma obținută în urma analizării efluentului rezultat de la epurarea melphalanului este prezentată în figura 50. Din analiza cromatogramei se observă că nu există compuși evidențiable prin metoda GC-MS în efluentul rezultat în urma epurării electrochimice a melphalanului.

Tinând cont de faptul că în etapele prefinale ale degradării melphalanului se formează preponderent acizi carboxilici, compuși puternic polari, este probabil ca aceștia să nu poată fi separați de sistemul GC-MS pe care s-a lucrat.

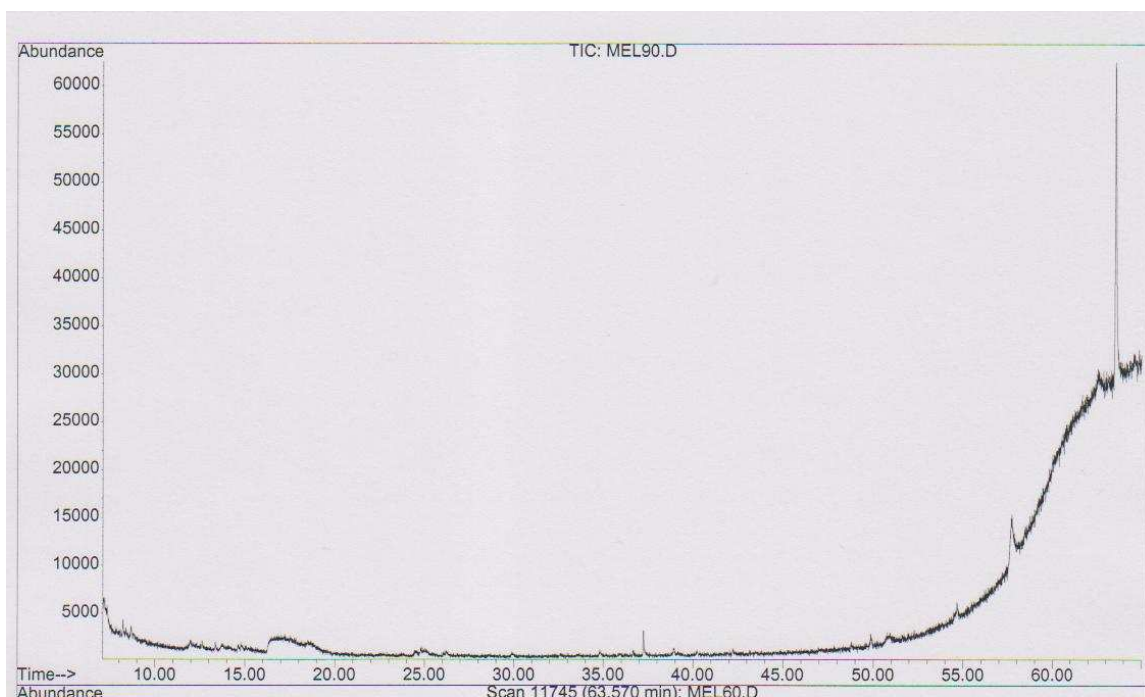


Figura 50. Cromatograma obținută în urma analizării GC a efluentului rezultat de la epurarea melphalanului. Timp de electroliză 90 minute la un curent de 1A.

S-a calculat randamentul de epurare al melphalanului în condițiile date de electroliză ca fiind raportul între concentrația de melphalan la minutul 3 de electroliză (limita de detecție a aparatului) notată cu  $C_f$  și concentrația de melphalan inițială notată cu  $C_i$ .

Pentru proba sintetică acest randament este:

$$\eta_{\text{melphalan}} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 99,93\% \quad (26)$$

Pentru probele de urină provenite de la pacienți s-a calculat o valoare medie a acestui randament:

$$\eta_{\text{melphalan}} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 99,82\% \quad (27)$$

### 6.5.2.2. Epurarea Doxorubicinei

Doxorubicina este un agent citostatic potent din clasa antibioticelor antitumorale. Este o antracilină sintetizată de *Streptomyces peucetius*, având în structură un nucleu antrachinonic atașat unui zahar aminat. Se administrează în leucemii, limfoame, sarcoame ale părților moi. Dozele administrate variază între 30 – 75 mg/m<sup>2</sup> suprafață corporală. Din analiza datelor de farmacocinetică reiese ca doxorubicina se metabolizează hepatic rezultând metaboliți inactivi dar și activi cu potențial citotoxic care se elimină atât urinar cât și digestiv. Doxorubicina este ușor de evidențiat în urina pacienților pentru că acesta este colorată în roșu câteva zile după administrare. Doze crescute de doxorubicină se administrează pacienților suferinzi de osteosarcoame: 50 -75 mg/m<sup>2</sup>, adică 85 – 100 mg pentru un pacient adult de greutate și talie medie. Din aceasta o parte ajunge în mediul înconjurător odată cu urina și fecalele pacienților [137-139].

Modelul experimental a fost pus la punct utilizând o apă reziduală sintetică cu un conținut de 10 mg/dl doxorubicină. S-a optat pentru această concentrație superioară celor care se pot atinge în probele de urină provenite de la pacienți pentru a se putea evidenția în mod facil și în timp scurt efectele citotoxice ale compusului în sistemele biologice de investigare (culturi de celule și animale de laborator).

#### **Prepararea apei reziduale sintetice cu conținut de doxorubicină.**

Se dizolvă 10 mg doxorubicină în 5 ml apă bidistilată. Soluția astfel obținută se diluează la balon cotat de 100 ml cu soluție de clorură de sodiu 5% obținându-se astfel apa reziduală sintetică cu un conținut de 10 mg/dl doxorubicină. Trebuie menționat faptul ca doxorubicina se dizolvă mult mai ușor în apă distilată decât în soluții saline, acesta fiind considerentul pentru care s-a ales ca solvent inițial apa distilată. În mod similar se procedează și în clinică pentru dizolvarea doxorubicinei.

#### **Dozarea doxorubicinei.**

Pentru dozarea doxorubicinei atât în apa reziduală sintetică cât și în probele de urină provenite de la pacienți s-a utilizat metoda fluorimetrică [34,37].

S-a utilizat un fluorimetru tip Jasco. Pentru doxorubicină, din datele de literatură, s-au stabilit lungimile de undă pentru excitație și pentru emisie.

- Excitație la  $\lambda = 480$  nm.
- Emisie la  $\lambda = 550$  nm.

S-a trasat o curbă de calibrare pe o serie de șase diluții preparate din soluția de 10 mg/dl doxorubicină. Diluțiile s-au făcut utilizând drept solvent tot soluția de NaCl 5%. Datele obținute sunt prezentate în tabelul XIII.

Tabel XIII. Dependența fluorescență - concentrație pentru doxorubicină.

Concentrația Doxorubicinei (mg/dl)	10	5	2,5	1	0,5	0,1
Intensitatea fluorescenței (unități relative)	0,1932	0,0951	0,0348	0,0192	0,0120	0,0035

Reprezentarea grafică a datelor este arătată în figura 51.

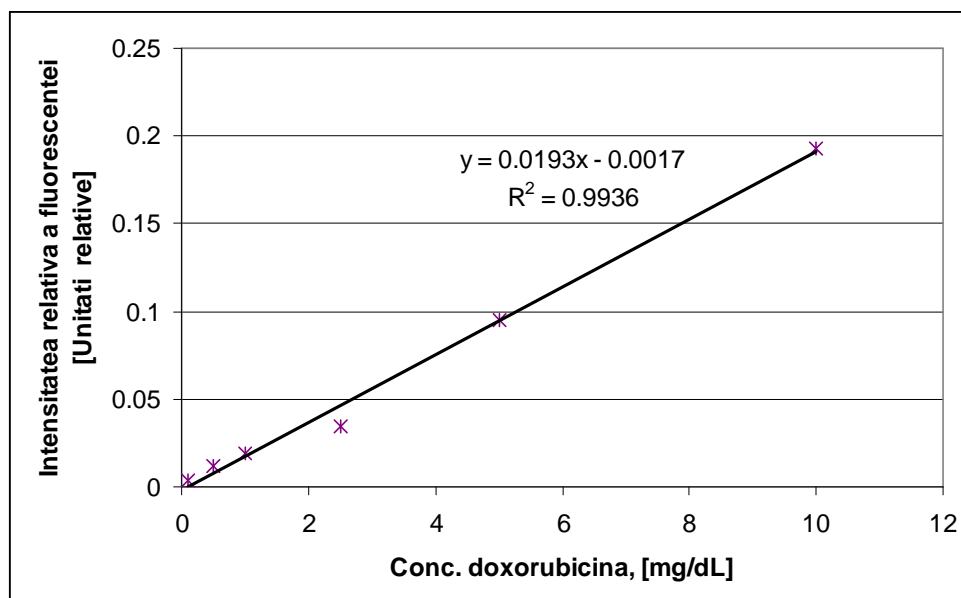


Figura 51. Curba de calibrare pentru doxorubicină.



Din analiza curbei de calibrare pentru doxorubicină prezentată în figura 51, reiese ca există o foarte bună corelație între concentrațiile de doxorubicină și intensitatea relativă a fluorescenței corespunzătoare acestora ( $R^2 = 0,9936$ ), ceea ce permite validarea metodei de lucru și utilizarea ei pentru determinările concentrațiilor de doxorubicină în probele luate în lucru.

Proba de apă reziduală sintetică cu conținut de doxorubicină (10 mg/dl) a fost supusă epurării în microinstalația experimentală, la un curent de 1A timp de 90 de minute. Doxorubicina fiind intens colorată în roșu este foarte ușor de urmărit vizual în cursul desfășurării procesului de electroliză.

Determinările preliminare au arătat atât vizual cât și fluorimetric că doxorubicina este foarte sensibilă la condițiile oxidante din microreactorul electrochimic, astfel încât s-a impus recoltarea probelor în vederea determinărilor cantitative fluorimetrice la intervale mult mai scurte de timp comparativ cu ceilalți agenți citostatici luați în lucru. Durata totală a procesului de epurare a fost tot de 90 de minute pentru a se distruge și intermediarii formați care nefiind fluorocromi nu pot fi detectați fluorimetric. S-au prelevat probe din reactorul electrochimic în cursul desfășurării electrolizei care au fost analizate prin metoda fluorimetrică propusă, obținându-se următoarele rezultate (tabel XIV).

Probele trebuie tratate cu tiosulfat de sodiu imediat după recoltare conform protocolului descris mai sus deoarece chiar și cantități minime de clor liber oxidează rapid doxorubicina din probă compromițând astfel rezultatele determinărilor cantitative.

Tabel XIV Epurarea apei reziduale sintetice cu conținut de doxorubicină. Analiza fluorimetrică.

Momentul recoltării probei (minute)	Intensitatea relativă a semnalului de fluorescență.	Concentrația de doxorubicină (mg/dl)
0	0,1925	9,96
0,25	0,0112	0,57
0,5	0,0036	0,18
1	0,0020	0,10

Momentul recoltării probei (minute)	Intensitatea relativă a semnalului de fluorescență.	Concentrația de doxorubicină (mg/dl)
1,5	0,0007	0,03
2	-	-
5	-	-

În figura 52 este reprezentată variația concentrației de doxorubicină din proba sintetică în primele 1,5 minute ale procesului de epurare electrochimică. Din grafic se observă că scăderea concentrației de doxorubicină are loc după o ecuație exponențială:

$$\text{doxorubicina} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) = 7 \cdot e^{-4.178 \cdot \text{timp} (\text{min})} \quad (28)$$

Valoarea coeficientului de corelație obținută (0,7219) indică faptul că această ecuație aproximează satisfăcător evoluția concentrației de doxorubicină pe durata procesului de epurare.

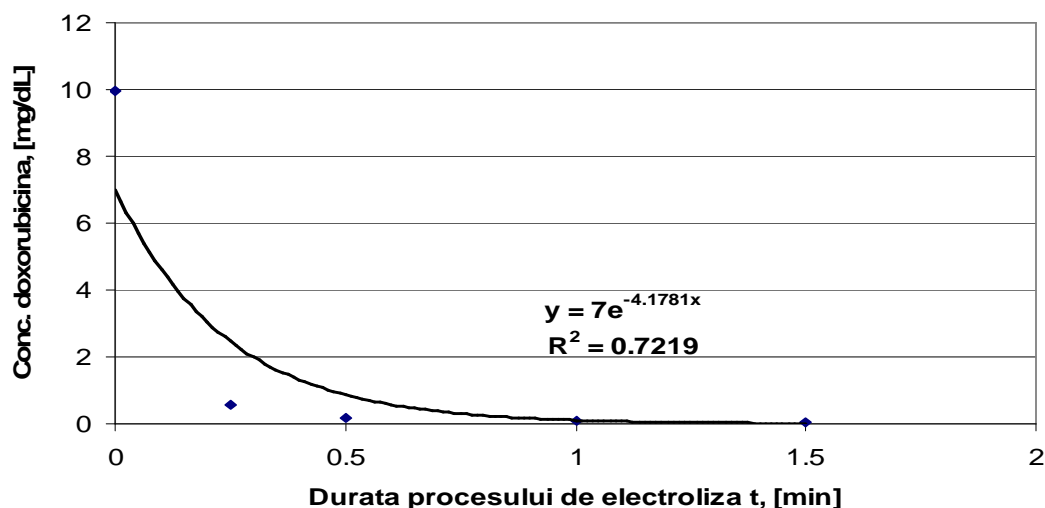


Figura 52. Variația concentrației de doxorubicină din proba sintetică în primele 1,5 minute ale procesului de epurare electrochimică.

S-au supus epurării patru probe reale de urină provenite de la pacienți cu osteosarcoame care au beneficiat de polichimioterapie care a inclus și

doxorubicina. S-au administrat doze mari de doxorubicină: 50 – 60 mg/m<sup>2</sup> suprafață corporală, ceea ce înseamnă o doză de aproximativ 80 - 90 mg doxorubicină pentru o administrare.

Concentrațiile de doxorubicină determinate în urina pacienților respectivi au fost următoarele: (tabel XV)

Tabel XV. Concentrațiile urinare de doxorubicină ale pacienților luați în studiu.

Pacient	Concentrația urinară de doxorubicină (mg/dl)	Concentrația de doxorubicină (mg/dl) în urina salefiată
Pacient 1	0,9	0,68
Pacient 2	1.2	0,9
Pacient 3	0,8	0,6
Pacient 4	0,6	0,45

În tabelul XVI se prezintă datele obținute în urma epurării probelor reale de urină provenite de la pacienții incluși în studiu.

Tabel XVI Epurarea probelor reale de urină cu conținut de doxorubicină. Concentrații de doxorubicină determinate fluorimetric.

Timp (sec/min)	0	15 sec	30 sec	1 min	1,5 min	2 min	5 min	10 min	30 min	60 min	90 min
P1	0,68	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	0,9	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	0,6	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	0,45	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Degradarea compusului în probele reale se face foarte rapid nepermițând citirea a suficiente valori de concentrație care să permită prelucrarea grafică a datelor obținute.

În cazul doxorubicinei, transformările care au loc cu probabilitatea cea mai mare în cursul degradării electrochimice, sunt prezentate în figura 53.

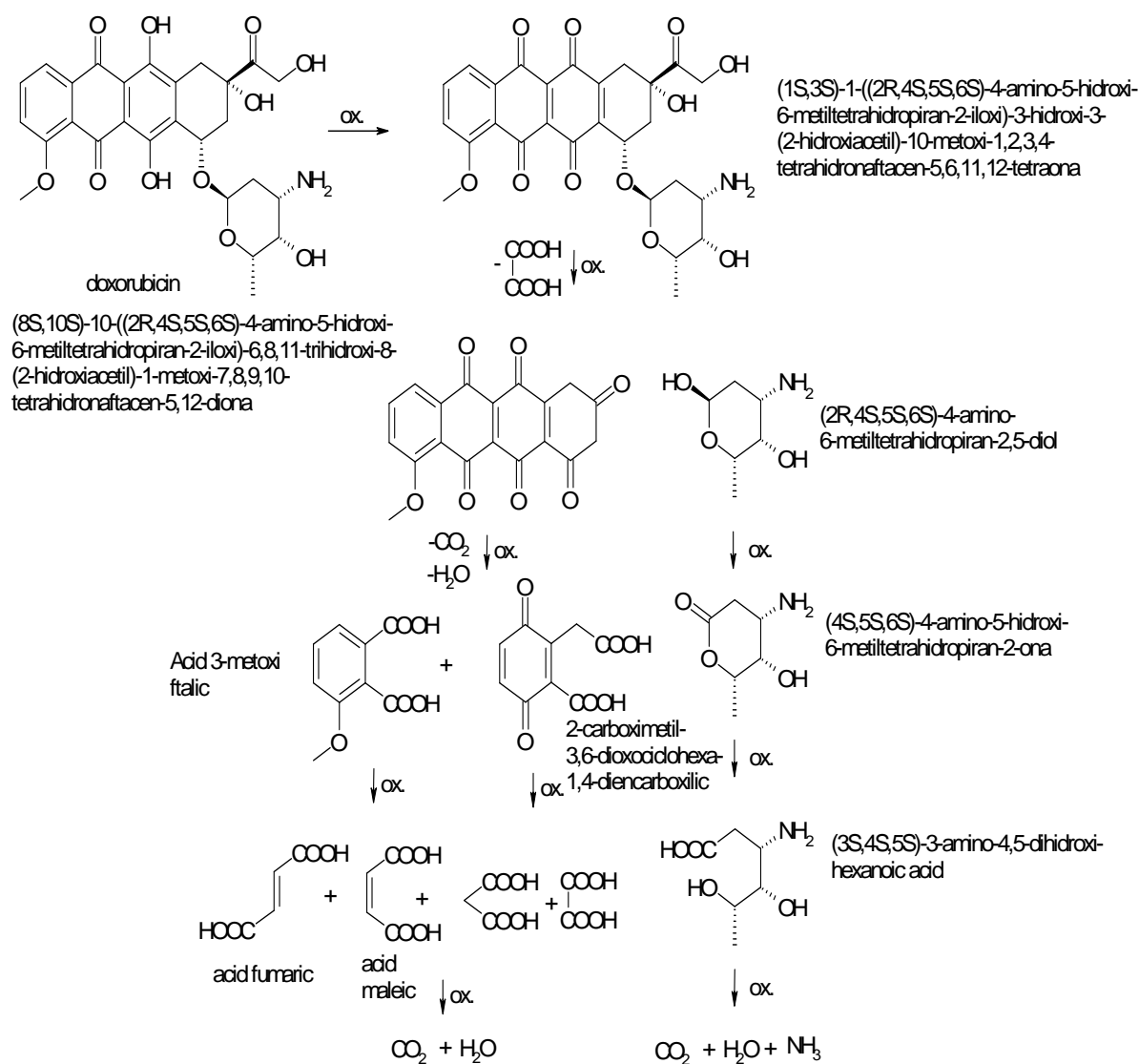


Figura 53. Degradarea prin oxidare electrochimică a doxorubicinei.

S-a urmărit dacă la sfârșitul celor 90 de minute de epurare electrochimică a doxorubicinei, în masa de reacție mai persistă compuși organici detectabili prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă.

Prelucrarea probei în vederea analizei GC-MS s-a făcut similar cu cea descrisă la epurarea melphalanului [43]. Protocolul de extracție și condițiile de analiză sunt identice așa că în continuare vor fi prezentate doar datele obținute prin interpretarea cromatogramei.

Cromatograma obținută în urma analizării efluentului rezultat de la epurarea doxorubicinei este prezentată în figura 54. Din analiza cromatogramei se observă că nu exista compuși evidențiabili prin metoda GC-MS în efluentul rezultat în urma epurării electrochimice a doxorubicinei. Tinând cont că și în cazul epurării doxorubicinei, la fel ca în cazul melphalanului, în etapele prefinale ale degradării se formează preponderent acizi carboxilici, compuși puternic polari, este probabil ca aceștia să nu poată fi separați de sistemul GC-MS pe care s-a lucrat.

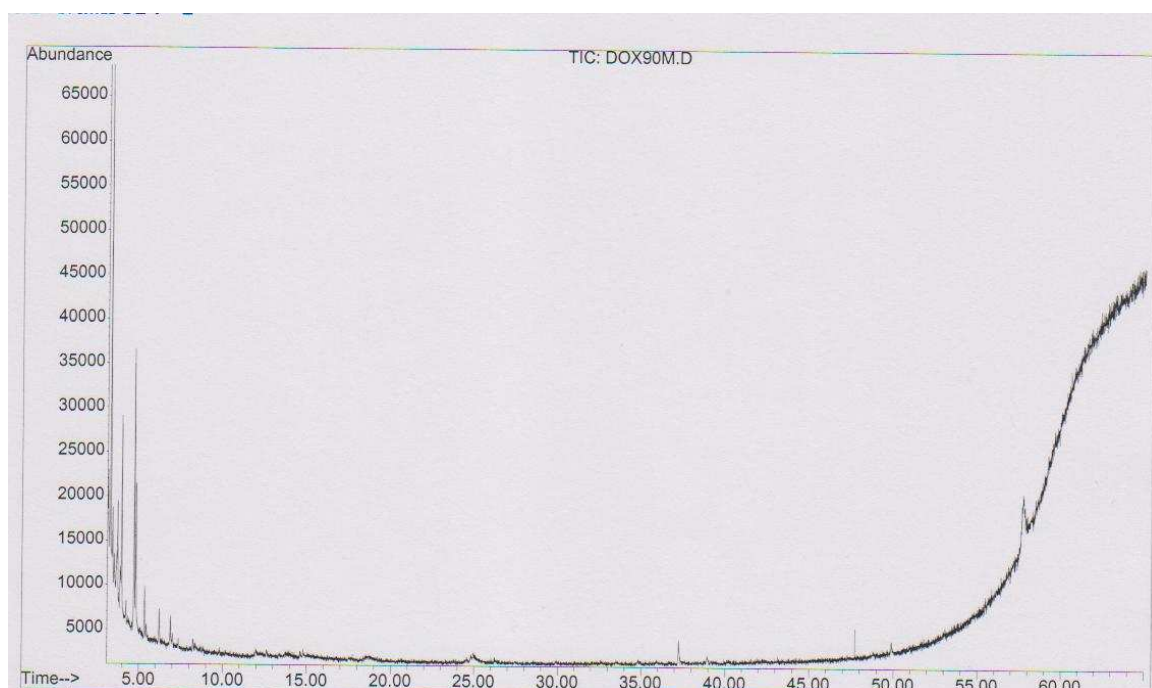


Figura 54. Cromatograma obținută în urma analizării GC a efluentului rezultat de la epurarea doxorubicinei. Timp de electroliză 90 minute la un curent de 1A.

S-a calculat randamentul de epurare al doxorubicinei în condițiile date de electroliză, ca fiind raportul între concentrația de doxorubicină la minutul 1,5 de electroliză (limita de detecție a aparatului) notată cu  $C_f$  și concentrația de doxorubicină inițială notată cu  $C_i$ .

Pentru proba sintetică acest randament este:

$$\eta_{doxorubicina} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 99,7\%$$

(29)

Pentru probele de urină provenite de la pacienți s-a calculat o valoare medie a acestui randament:

$$\eta_{\text{doxorubicină}} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 93,9\%$$

(30)

### 6.5.2.3. Epurarea Metotrexatului

Metotrexatul este un medicament cu efect citotoxic care acționează ca antimetabolit al acidului folic. Din datele de farmacocinetică reiese că se elimină preponderent renal (80%) nemodificat, în decurs de 24 ore ceea ce face să ajungă în mediul înconjurător odată cu urina pacienților tratați. Contaminarea mediului înconjurător devine semnificativă în cazul în care sursa de poluare este reprezentată de pacienți care primesc doze mari de metotrexat: 5 - 12 g/m<sup>2</sup> suprafață corporală, corespunzător la 10 – 20 de grame metotrexat în 24 de ore. De aceste doze beneficiază pacienții cu leucemii acute limfoblastice precum și cei cu sarcom Ewing [141,142,143].

#### **Prepararea apei reziduale sintetice cu conținut de metotrexat.**

Se dizolvă 200 mg de metotrexat în 100 ml soluție de clorură de sodiu 5% la balon cotat.

#### **Dozarea metotrexatului.**

Pentru dozarea metotrexatului atât în apa reziduală sintetică cât și în probele de urină provenite de la pacienți s-a utilizat cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) [144].

S-a utilizat un cromatograf de lichide de înaltă performanță tip Agilent 1100 prevăzut cu un detector spectrofotometric UV – VIS.

Condițiile de desfășurare ale analizei HPLC au fost:

- Faza mobilă: 20% acetonitril + 80% apă la pH = 6 (tampon fosfat)
- Fluxul de fază mobilă: 1 ml/minut
- Coloană cu fază inversată C18. (Zorbax SB-C18)
- Temperatura coloanei: 25°C
- Volumul de probă injectat: 20  $\mu$ L
- Detecție la  $\lambda = 373$  nm
- Timpul de retenție pentru metotrexat a fost de 2,2 minute
- Timpul de achiziție pentru fiecare cromatograma: 10 minute

S-a trasat o curbă de etalonare pentru metotrexat în condițiile date. În tabelul XVII sunt arătate datele obținute care sunt reprezentate grafic în figura 54.

Tabel XVII. Curba de etalonare pentru metotrexat:

Concentrația de metotrexat (mg/dl)	Aria picului corespunzător metotrexatului [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător metotrexatului (minute)
200	20179	2,23
150	14605	2,23
100	9234	2,25
50	4923	2,28
25	2420	2,29
10	963	2,31
5	424	2,34
1	65	2,37

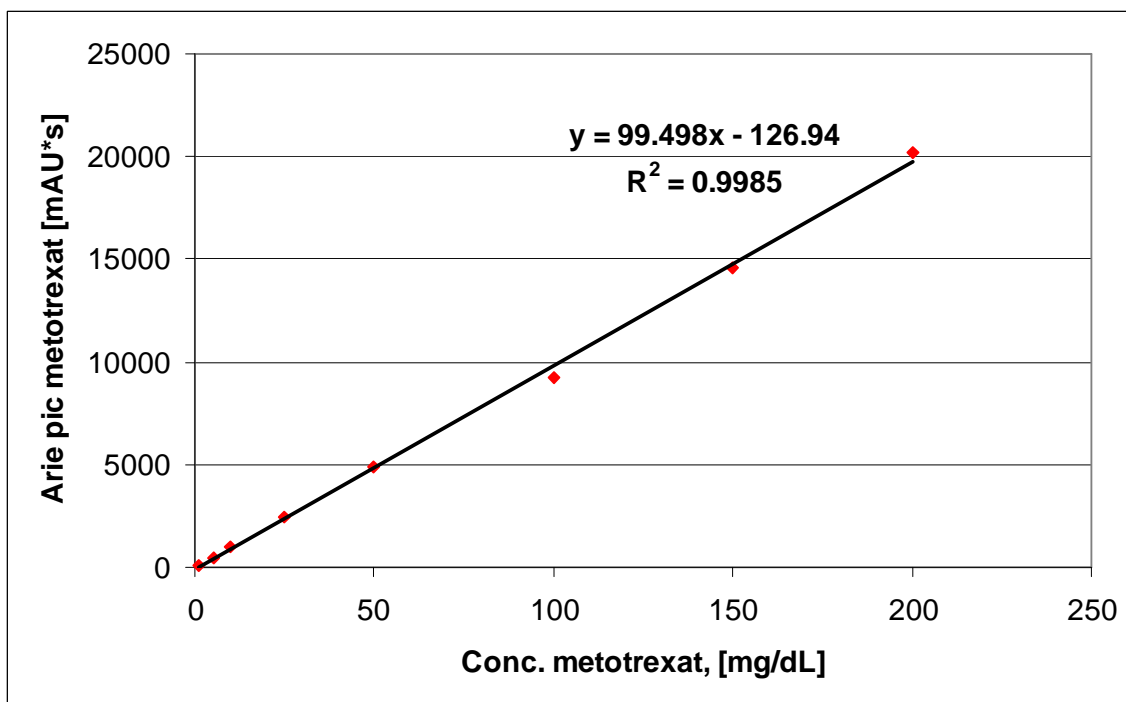


Figura 54. Curba de calibrare pentru metotrexat.

Din analiza curbei de calibrare pentru metotrexat prezentată în figura 54, reiese ca există o foarte bună corelație între concentrațiile de metotrexat și ariile picului corespunzător acestuia ( $R^2 = 0,9985$ ), ceea ce permite validarea metodei de lucru și utilizarea ei pentru determinările concentrațiilor de metotrexat în probele luate în lucru.

În figura 55 a sunt prezentate cromatogramele pentru proba blank (soluția solvent pentru metotrexat: NaCl 5%), respectiv 55 b – metotrexat 200 mg/dl.



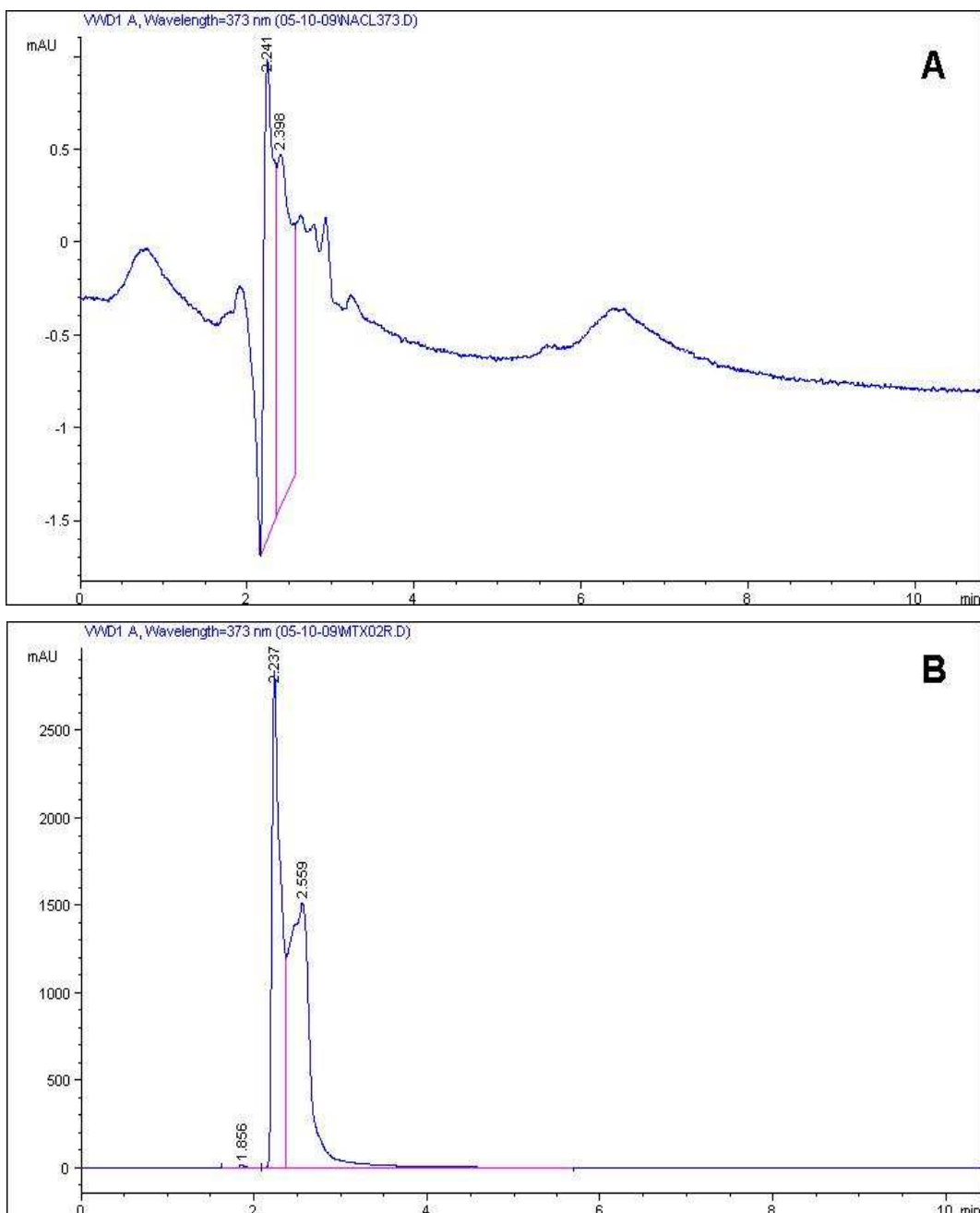


Figura 55 a și b. Cromatograma HPLC pentru blank - solvent (a) și metotrexat 200 mg/dl (b).

Proba de apă reziduală sintetică cu conținut de metotrexat (200 mg/dl) a fost supusă epurării în microinstalația experimentală, la un curent de 1A timp de 90 de minute. S-au prelevat probe din reactorul electrochimic în cursul desfășurării electrolizei care au fost analizate prin metoda HPLC propusă, obținându-se următoarele rezultate: (tabel XVIII).

Tabel XVIII. Epurarea apei reziduale sintetice cu conținut de metotrexat. Analiza HPLC.

Momentul recoltării probei (minute)	Aria picului corespunzător metotrexatului [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător metotrexatului (minute)	Concentrația de metotrexat (mg/dl)
0	20179	2,23	200
1	19573	2,23	194
2	18363	2,25	182
3	17656	2,28	175
4	17051	2,29	169
5	16344	2,31	162
10	12813	2,32	127
15	9080	2,34	90
30	5145	2,35	51
60	807	2,37	8
90	202	2,38	2

Se observă că, concentrația de metotrexat scade treptat și ajunge aproape de limita de detecție abia la minutul 90 de electroliză, deci acest compus este foarte rezistent la degradarea prin oxidare electrochimică, comparativ cu ceilalți agenți citostatici luați în studiu.

În figura 56 este reprezentată variația concentrației de metotrexat din proba sintetică în timpul procesului de epurare electrochimică. Din grafic se observă că scăderea concentrației de metotrexat are loc după o ecuație exponențială:

$$\text{Metotrexat} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) = 206,49 \cdot e^{-0,052 \cdot \text{timp (min)}} \quad (31)$$

Valoarea coeficientului de corelație obținută (0,9978) indică faptul că această ecuație aproximează foarte bine evoluția concentrației de metotrexat pe durata procesului de epurare.

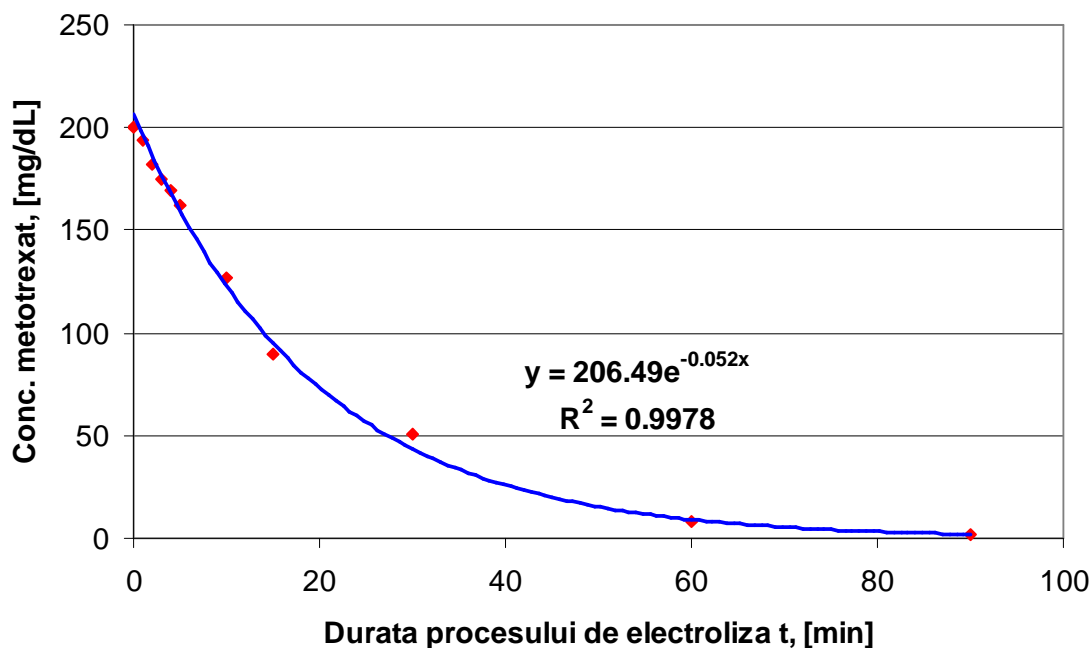


Figura 56. Variația concentrației de metotrexat din proba sintetică în timpul procesului de epurare electrochimică.

Din acest considerent se continuă electroliza pînă la minutul 90 când se prelevează probe atât pentru studiile de citotoxicitate pe sisteme biologice cât și pentru analiză GC-MS cu scopul de a verifica dacă apar alți compuși evidențiable și posibil identificabili prin această metodă.

S-au supus epurării nouă probe reale de urină provenite de la pacienți cu leucemii și sarcoame Ewing care au beneficiat chimioterapie cu doze mari de metotrexat. Terapia a presupus administrarea unor doze mari de metotrexat: 5 – 12 g/m<sup>2</sup> suprafață corporală, ceea ce înseamnă o doză de aproximativ 10 -20 g metotrexat în 24 de ore. Din această cantitate, aproximativ 80% se regăsește în urina pacienților respectivi.

Concentrațiile de metotrexat determinate în urina pacienților respectivi au fost următoarele: (tabel XIX)

Tabel XIX. Concentrațiile urinare de metotrexat ale pacienților luați în studiu.

Pacient	Concentrația urinară de metotrexat (mg/dl)	Concentrația de metotrexat (mg/dl) în urina salefiată
Pacient 1	246	198
Pacient 2	195	156
Pacient 3	267	221
Pacient 4	262	212
Pacient 5	175	138
Pacient 6	232	186
Pacient 7	160	129
Pacient 8	191	154
Pacient 9	165	135

În tabelul XX și figura 57 se prezintă datele obținute în urma epurării probelor reale de urină provenite de la pacienții incluși în studiu.

Tabel XX. Epurarea probelor reale de urină cu conținut de metotrexat. Analiză HPLC.

Pacient nr. / Timp (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	198	156	221	212	138	186	129	154	135
1	194	151	215	207	134	179	123	147	129
2	180	143	206	197	126	173	115	138	124

Pacient nr. / Timp (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	178	137	195	185	119	168	108	131	117
4	171	129	187	179	108	163	98	126	108
5	165	120	178	168	100	160	95	121	102
10	130	89	145	121	72	123	63	88	70
15	88	50	108	91	28	79	24	53	27
30	50	31	68	48	17	38	15	27	14
60	8	6	12	11	6	7	5	6	5
90	3	2	5	3	2	2	2	2	2

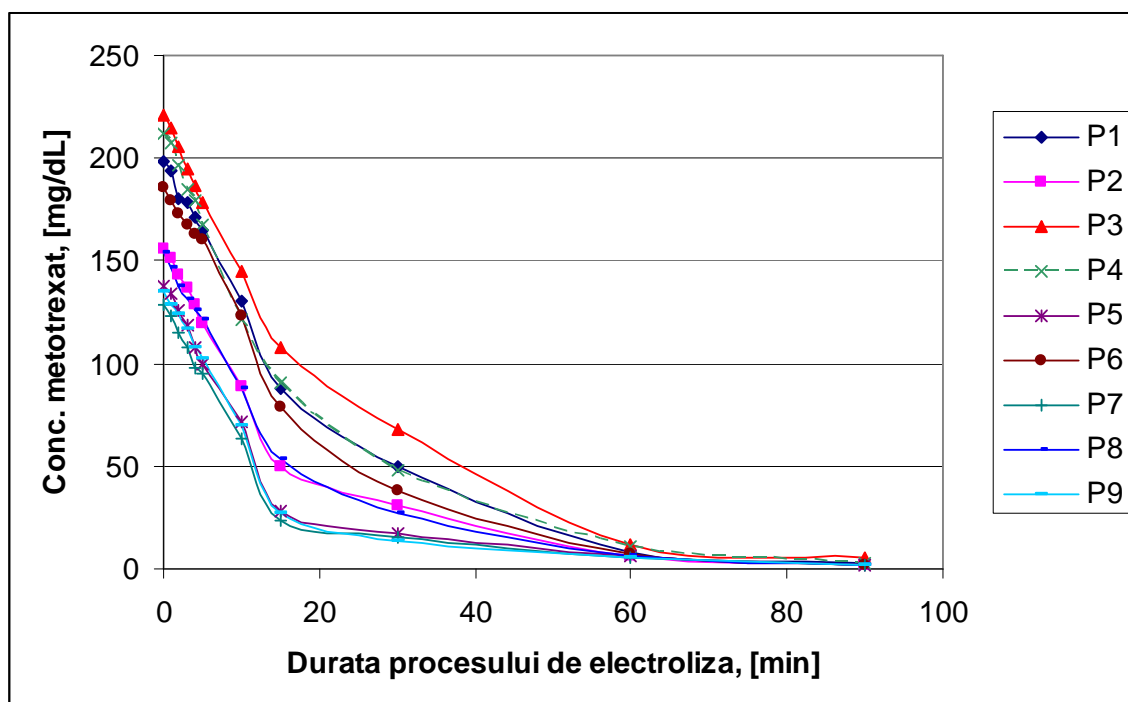


Figura 57. Epurarea probelor reale de urină cu conținut de metotrexat.

Analiza datelor experimentale obținute în urma epurării probele reale provenite de la cei 9 pacienți indică o variație a concentrației de metotrexat asemănătoare cu cea obținută în urma epurării probei sintetice.

Drept urmare, s-a verificat modul în care ecuația de variație a concentrației de metotrexat în proba sintetică descrie evoluția concentrațiilor de metotrexat în probele reale.

Concordanța dintre datele experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 9 pacienți și cele obținute în urma aplicării ecuației de variație a concentrației de metotrexat în proba sintetică este redată în figura 58.

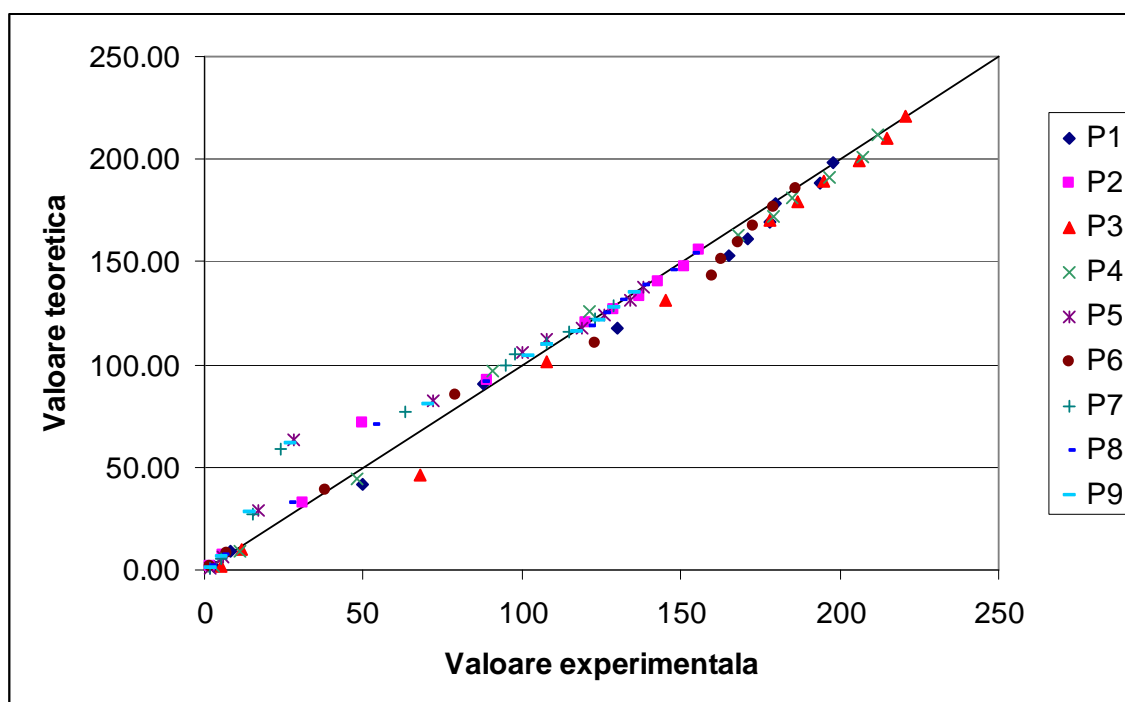


Figura 58. Concordanța dintre datele experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 9 pacienți și cele obținute în urma aplicării ecuației de variație a concentrației de metotrexat în proba sintetică.

Din figură se observă că valorile teoretice calculate se apropie foarte mult de cele experimentale ceea ce arată că ecuația generată pe baza datelor experimentale obținute în urma epurării probei sintetice poate fi aplicată, cu succes, pentru toate probele reale provenite de la pacienți tratați cu diferite doze de metotrexat.

În cazul metotrexatului, transformările care au loc cu cea mai mare probabilitate în cursul degradării electrochimice, sunt prezentate în figura 59a.

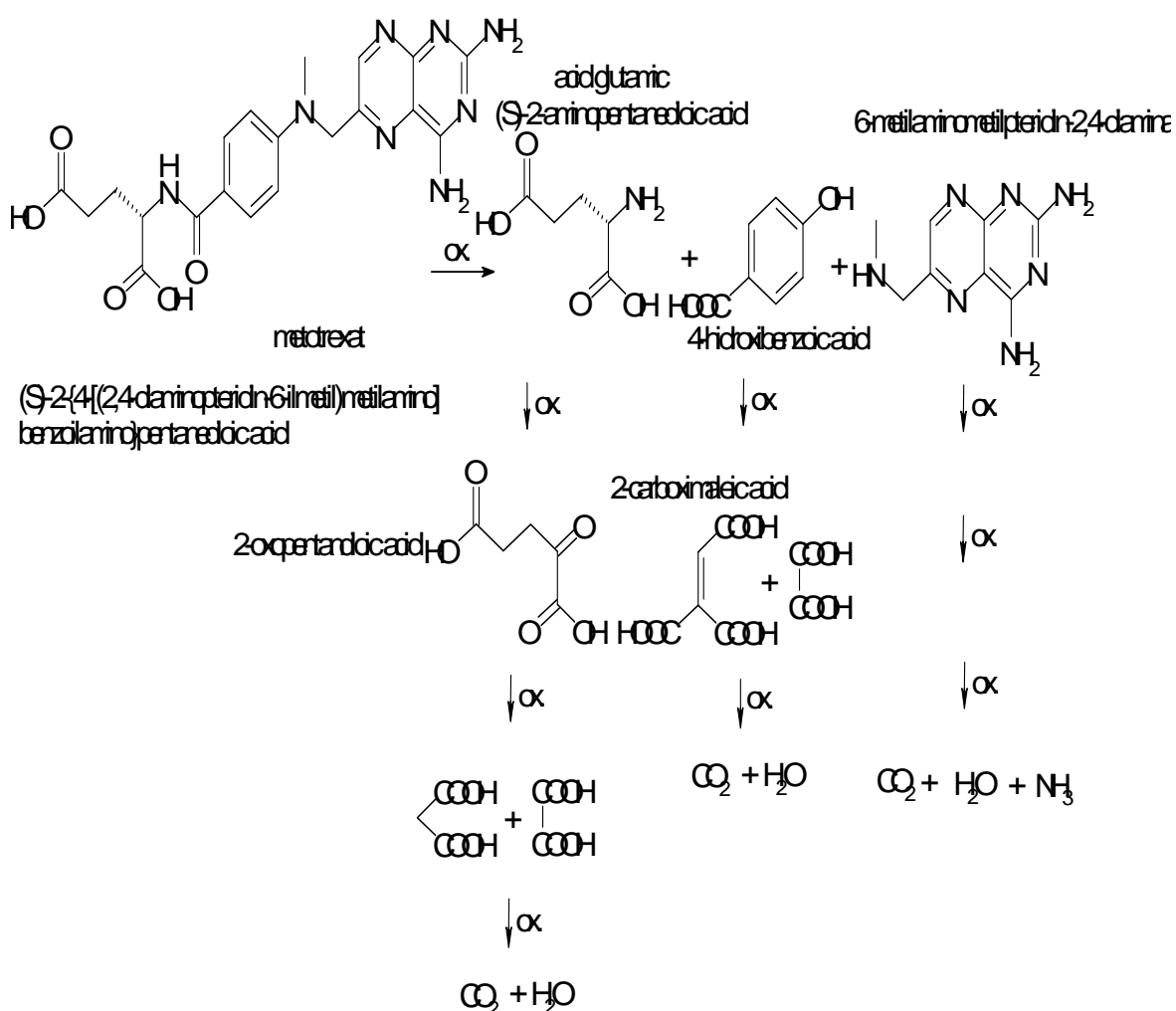


Figura 59a. Degradarea prin oxidare electrochimică a metotrexatului.

S-a urmărit dacă la sfârșitul celor 90 de minute de epurare electrochimică a metotrexatului, în masa de reacție mai persistă compuși

organici detectabili prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă.

Prelucrarea probei în vederea analizei GC-MS s-a făcut similar cu cea descrisă la epurarea celorlalte medicamente citostatice.

Protocolul de extracție și condițiile de analiză sunt identice așa că în continuare vor fi prezentate doar datele obținute prin interpretarea cromatogramei [43].

Cromatograma obținută în urma analizării efluentului rezultat de la epurarea metotrexatului este prezentată în figura 59b. Din analiza cromatogramei se observă că nu există compuși evidențiable prin metoda GC-MS în efluentul rezultat în urma epurării electrochimice a metotrexatului. Ținând cont că și în cazul epurării metotrexatului, la fel ca și în cazul melphalanului respectiv doxorubicinei, în etapele prefinale ale degradării se formează preponderent acizi carboxilici, compuși puternic polari, este probabil ca aceștia să nu poată fi separați de sistemul GC-MS pe care s-a lucrat.

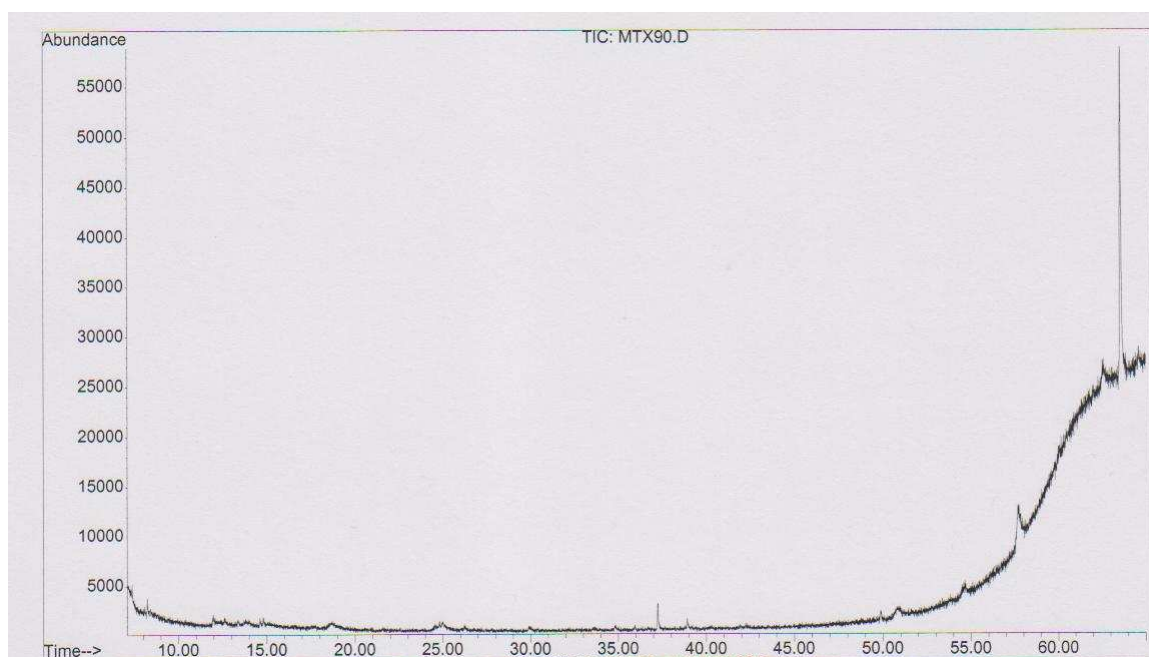


Figura 59b. Cromatograma obținută în urma analizei GC a efluentului rezultat de la epurarea metotrexatului. Timp de electroliză 90 minute la un curent de 1A.



S-a calculat randamentul de epurare al metotrexatului în condițiile date de electroliză, ca fiind raportul între concentrația de metotrexat la minutul 90 de electroliză notată cu  $C_f$  și concentrația de metotrexat inițială notată cu  $C_i$ .

Pentru proba sintetică acest randament este:

$$\eta_{\text{metotrexat}} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 99\% \quad (32)$$

Pentru probele de urină provenite de la pacienți s-a calculat o valoare medie a acestui randament:

$$\eta_{\text{metotrexat}} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 98,5\% \quad (33)$$

#### 6.5.2.4. Epurarea Ciclofosfamidei.

Ciclofosfamida este un agent alchilant derivat de mecloretamină folosit în tratamentul multor afecțiuni oncologice: limfoame, mielom multiplu, neuroblastom, sarcoame ale părților moi, tumori testiculare și unele leucemii. Doze mari de ciclofosfamidă se administrează în monochimioterapia intermitentă: 40 mg/ Kg corp/zi sub protecția unei hidratări adecvate deoarece are acțiune puternic iritantă pe căile renale. Din datele de farmacocinetică reiese că ciclofosfamida se elimină renal în proporție de 30% nemodificată, ceea ce face ca urina pacienților tratați cu doze mari de ciclofosfamidă să conțină cantități semnificative din acest compus citostatic. Datele de literatură au arătat ca ciclofosfamida prezintă efect teratogen și leucemogen. Deasemenea este iritantă dacă ajunge pe tegumente, de aceea în caz de

contact accidental cu această substanță tegumentul trebuie spălat cu apă din abundență [145–147].

#### **Prepararea apei reziduale sintetice cu conținut de ciclofosamidă.**

Ciclofosfamida se prezintă sub forma unei pulberi albe ușor solubile în apă. Se dizolvă 100 mg de ciclofosamidă în 100 ml soluție de clorură de sodiu 5% la balon cotate.

#### **Dozarea ciclofosfamidei.**

Pentru dozarea ciclofosfamidei atât în apa reziduală sintetică cât și în probele de urină provenite de la pacienți s-a utilizat cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) [148,149].

S-a utilizat un cromatograf de lichide de înaltă performanță tip Agilent 1100 prevăzut cu un detector spectrofotometric UV – VIS.

Condițiile de desfășurare ale analizei HPLC au fost:

- Faza mobilă: 20% acetonitril + 80% apă la pH = 6 (tampon fosfat)
- Fluxul de fază mobilă: 1,3 ml/minut
- Coloană cu fază inversată C18. (Zorbax SB-C18)
- Temperatura coloanei: 25°C
- Volumul de probă injectat: 20 μL
- Detecție la  $\lambda = 200$  nm
- Timpul de retenție pentru ciclofosamidă a fost de 18,8 minute
- Timpul de achiziție pentru fiecare cromatogramă: 23 minute

S-a trasat o curbă de etalonare pentru ciclofosamidă în condițiile date de analiză. În tabelul XXI sunt arătate datele obținute care sunt reprezentate grafic în figura 60.

Tabel XXI. Curba de etalonare pentru ciclofosfamidă:

Concentrația de ciclofosfamidă (mg/dl)	Aria picului corespunzător ciclofosfamidei [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător ciclofosfamidei (minute)
100	2633	18,74
50	1207	18,91
25	565	19,20
10	189	19,53
5	84	19,71
1	23	19,78
0,5	20	19,85
0,1	8,5	19,92

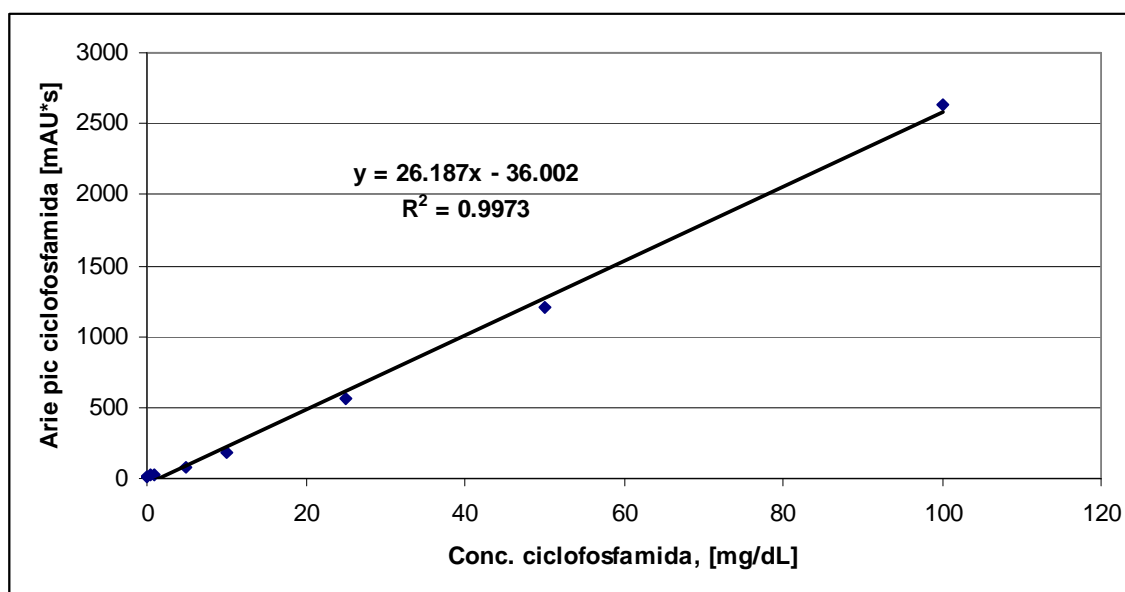


Figura 60. Curba de calibrare pentru ciclofosfamidă.

Din analiza curbei de calibrare pentru ciclofosfamidă prezentată în figura 60, reiese ca există o foarte bună corelație între concentrațiile de ciclofosfamidă și ariile picului corespunzător acestora ( $R^2 = 0,9973$ ), ceea ce permite validarea metodei de lucru și utilizarea ei pentru determinările concentrațiilor de ciclofosfamidă în probele luate în lucru.

În figura 61 a sunt prezentate cromatogramele pentru proba blank (soluția solvent pentru ciclofosamidă: NaCl 5%), respectiv 61 b – ciclofosamidă 100 mg/dl.

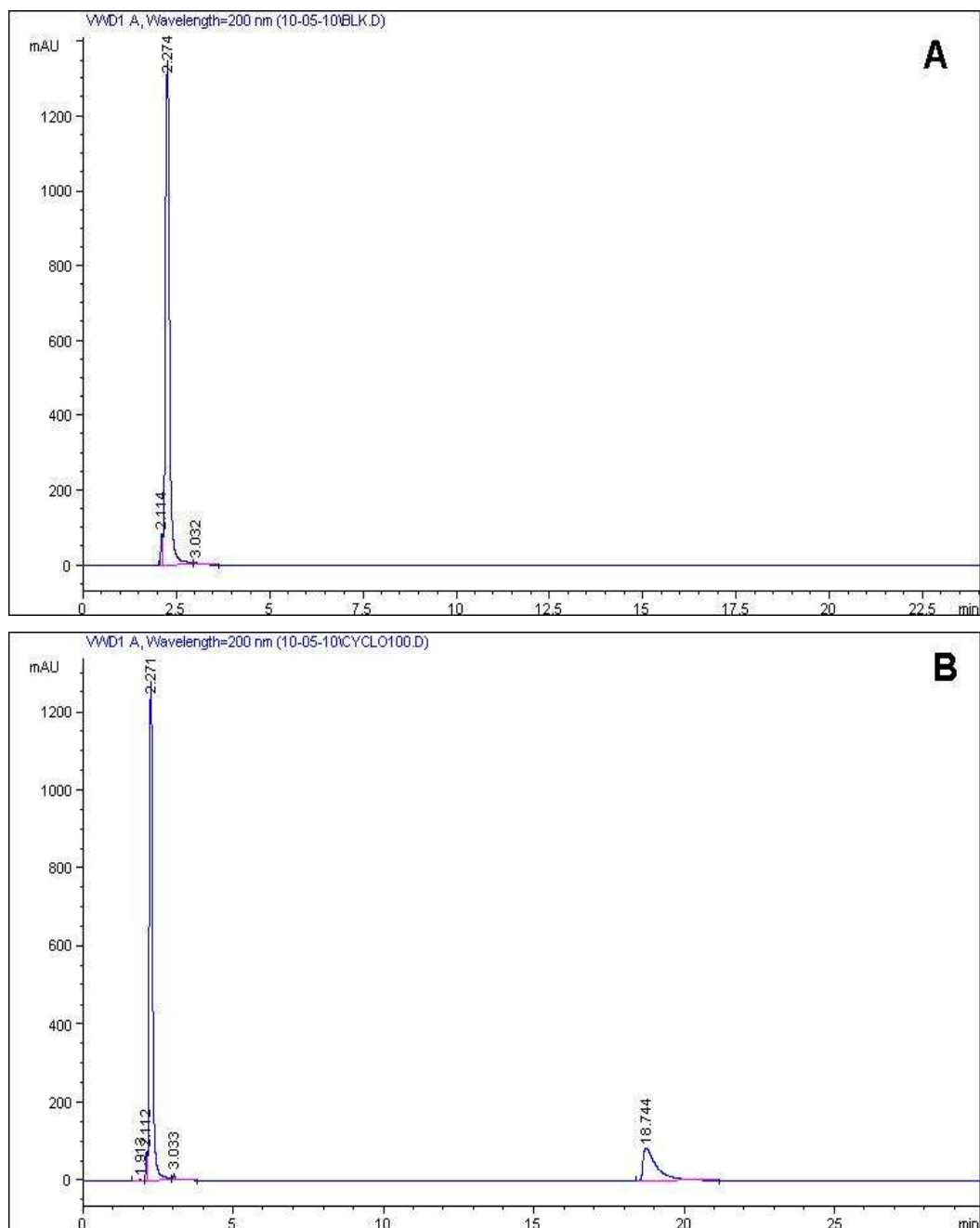


Figura 61 a și b. Cromatograma HPLC pentru blank - solvent (a) și ciclofosamidă 100 mg/dl (b).

Proba de apă reziduală sintetică cu conținut de ciclofosamidă (100 mg/dl) a fost supusă epurării în microinstalația experimentală, la un curent de

1A timp de 90 de minute. S-au prelevat probe din reactorul electrochimic în cursul desfășurării electrolizei care au fost analizate prin metoda HPLC propusă, obținându-se următoarele rezultate: (tabel XXII).

Tabel XXII. Epurarea apei reziduale sintetice cu conținut de ciclofosfamidă. Analiza HPLC.

Momentul recoltării probei (minute)	Aria picului corespunzător ciclofosfamidei [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător ciclofosfamidei (minute)	Concentrația de ciclofosfamidă (mg/dl)
0	2626	18,89	100
1	1669	19,00	69
2	713	19,21	29,5
3	240	19,51	10
4	78	19,96	4,6
5	14	20,10	0,8
10	6	20,12	0,3
15	-	-	-
30	-	-	-
60	-	-	-
90	-	-	-

Se observă că, concentrația de ciclofosfamidă scade treptat în cursul degradării electrochimice și ajunge la limita de detecție a instrumentului (HPLC) la minutul 10 ceea ce o încadrează între compușii cu rezistență intermediară la degradarea prin oxidare electrochimică, comparativ cu ceilalți agenți citostatici luați în studiu.

În figura 62 este reprezentată variația concentrației de ciclofosfamidă din proba sintetică în timpul procesului de epurare electrochimică. Din grafic se observă că scăderea concentrației de ciclofosfamidă are loc după o ecuație exponențială:

$$\text{ciclofosfamida} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) = 100 \cdot e^{-0,6727 \cdot \text{timp}(\text{min})} \quad (34)$$

Valoarea coeficientului de corelație obținută (0,8859) indică faptul că această ecuație aproximează bine evoluția concentrației de ciclofosfamidă pe durata procesului de epurare.

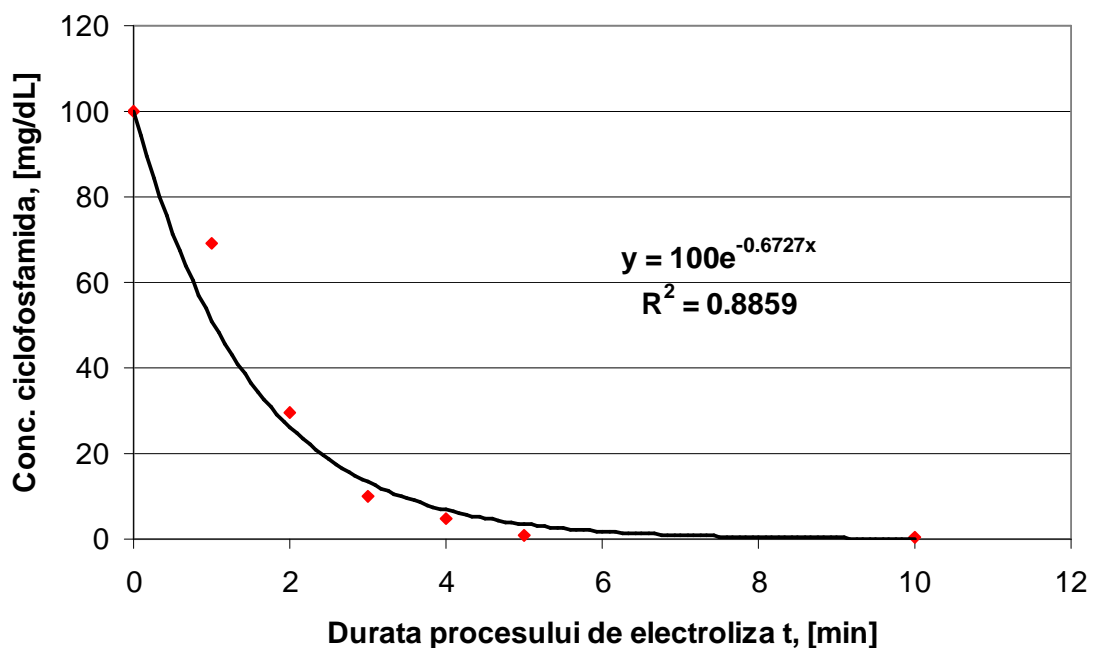


Figura 62. Variația concentrației de ciclofosfamidă din proba sintetică în timpul procesului de epurare electrochimică.

Ciclofosfamida este un compus care se pretează foarte bine pentru analiza prin metoda GC-MS. Aplicând această metodă la analiza probelor prelevate în timpul epurării electrochimice până la minutul 90 inclusiv, s-a constatat ca există ciclofosfamidă nereacționată chiar și la minutul 60 de la începutul electrolizei. Această observație vine în sprijinul afirmației că durata electrolizei trebuie să o depășească pe aceea a dispariției compusului studiat prin metoda HPLC care în acest caz are o sensibilitate inferioară GC-MS-ului.

În cele ce urmează va fi prezentată cromatograma GC (minutul 60) relevantă pentru afirmația făcută împreună cu spectrele de masă aferente.

Și în acest caz parametrii de analiză GC-MS au fost aceiași ca la determinările anterioare. De asemenea și condițiile de prelucrare a probei au fost identice [43]. În figura 63a. se observă gaz cromatograma și spectrul de masă al compusului corespunzător picului cu timpul de retenție 42,6 minute al probei prelevate la minutul 60 de epurare electrochimică a ciclofosfamidei, respectiv 63b. comparația spectrului obținut experimental cu cel din librăria de spectre NIST02.

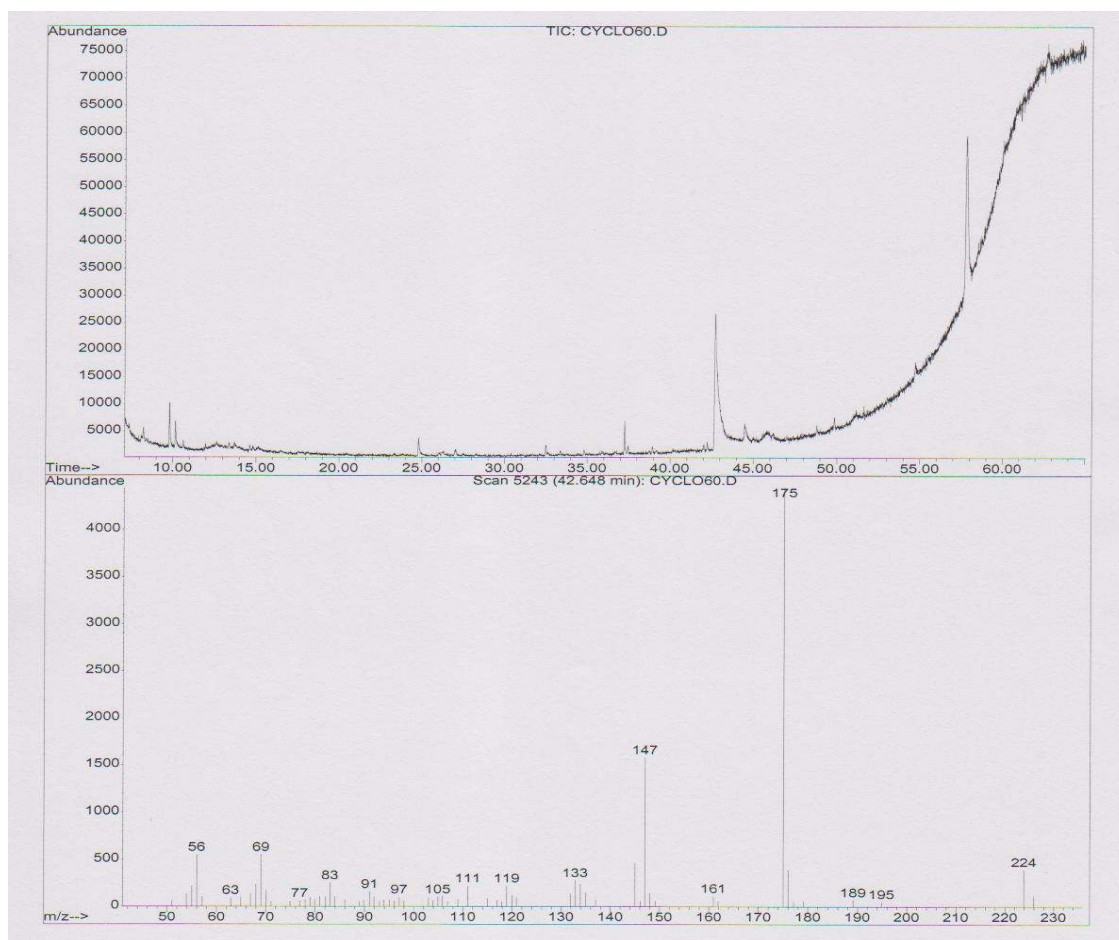


Figura 63a. Gaz cromatograma și spectrul de masă al compusului corespunzător picului cu timpul de retenție 42,6 minute al probei prelevate la minutul 60 de epurare electrochimică a ciclofosfamidei.

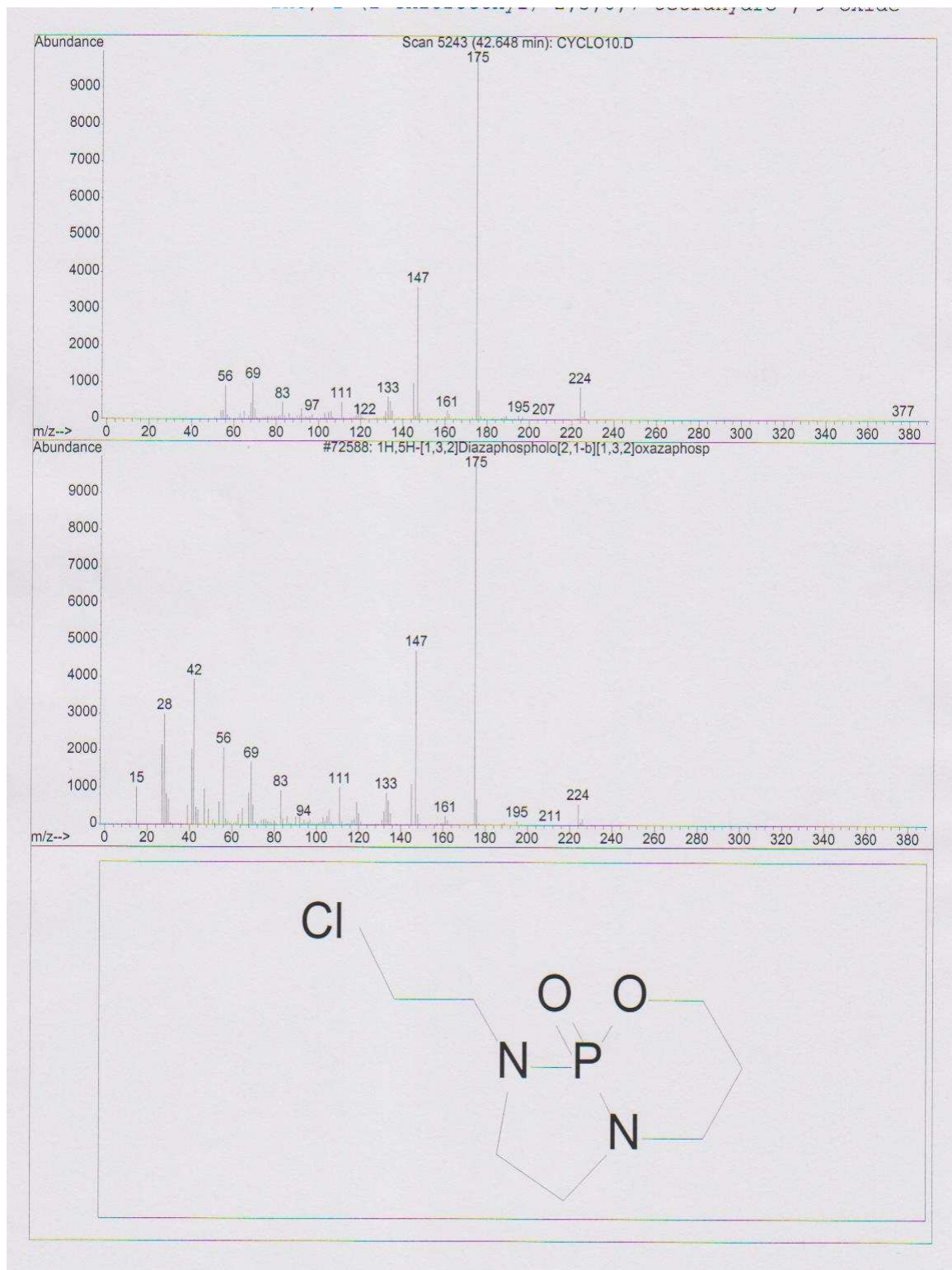


Figura 63b. Comparația spectrului obținut experimental cu cel din librăria de spectre NIST02 pentru ciclofosfamidă.

S-au supus epurării șase probe reale de urină provenite de la pacienți cu leucemie acută care au beneficiat de transplant allogen de celule stem



hematopoetice. Terapia de condiționare pretransplant se face cu o asociere de două citostatice cu efect puternic mielosupresiv: busulfanul care se administrează în doze de 4 mg/kg corp/zi 4 zile consecutiv și ciclofosfamida care se administrează în doze de 60 – 100 mg/kg corp/zi două zile consecutiv. Pentru un adult cu greutatea medie de 70 de kilograme se administrează 4 – 4,5 g de ciclofosfamidă zilnic.

Din acesta aproximativ 30% se elimină renal netransformată și odată cu urina pacienților respectivi ajunge să contamineze mediul înconjurător [150].

Concentrațiile de ciclofosfamidă determinate în urina pacienților respectivi au fost următoarele: (tabel XXIII)

Tabel XXIII. Concentrațiile urinare de ciclofosfamidă ale pacienților luați în studiu.

Pacient	Concentrația urinară de ciclofosfamidă (mg/dl)	Concentrația de ciclofosfamidă (mg/dl) în urina salefiată
Pacient 1	34,2	25,6
Pacient 2	20,4	15,3
Pacient 3	29,4	20,6
Pacient 4	36,3	26,1
Pacient 5	30,9	23,1
Pacient 6	24,3	17,9

În tabelul XXIV și figura 64 se prezintă scăderea concentrației de ciclofosfamidă în cursul epurării electrochimice a probelor reale de urină provenite de la cei șase pacienți incluși în studiu.

Tabel XXIV. Epurarea probelor reale de urină cu conținut de ciclofosamidă. Analiză HPLC.

Pacient nr. /	1	2	3	4	5	6
Timp (min)						
0	25,6	15,3	20,6	26,1	23,1	17,9
1	15,4	9,2	12,3	15,8	13,9	10,7
2	9,2	5,5	7,4	9,5	8,2	6,2
3	7,3	4,4	5,3	8,0	6,6	4,9
4	3,1	2	2,2	3,7	2,9	2,1
5	0,7	0,4	0,5	0,9	0,6	0,5
10	0,3	0,1	0,2	0,5	0,2	0,2
15	-	-	-	-	-	-

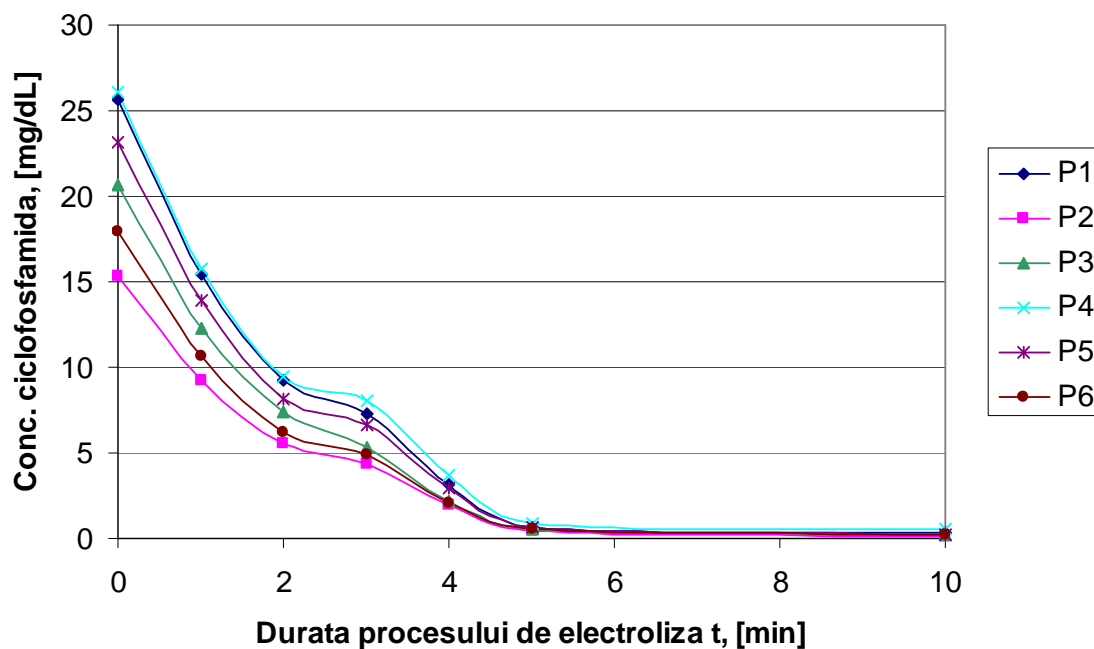


Figura 64. Epurarea probelor reale de urină cu conținut de ciclofosamidă.

Analiza datelor experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 6 pacienți indică o variație a concentrației de

ciclofosfamidă asemănătoare cu cea obținută în urma epurării probei sintetice. Drept urmare, s-a verificat modul în care ecuația de variație a concentrației de ciclofosfamidă în proba sintetică descrie evoluția concentrațiilor de ciclofosfamidă în probele reale.

Concordanța dintre datele experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 6 pacienți și cele obținute în urma aplicării ecuației de variație a concentrației de ciclofosfamidă în proba sintetică este redată în figura 65.

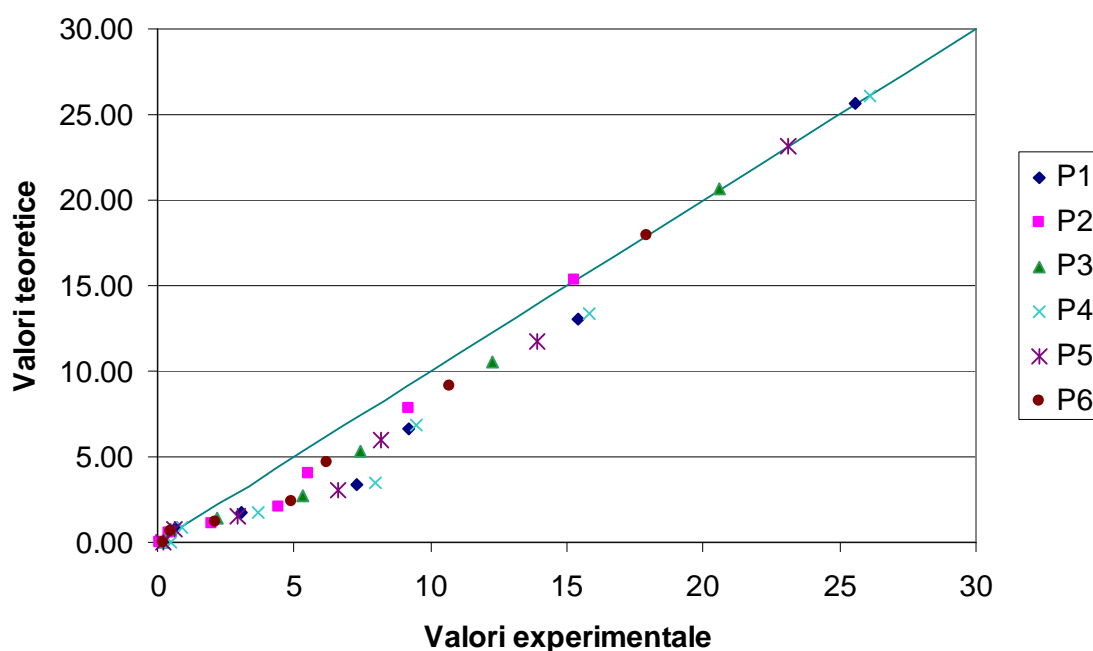


Figura 65. Concordanța dintre datele experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 6 pacienți și cele obținute în urma aplicării ecuației de variație a concentrației de ciclofosfamidă în proba sintetică.

Din figură se observă că valorile teoretice calculate se apropie mult de cele experimentale ceea ce arată că ecuația generată pe baza datelor experimentale obținute în urma epurării probei sintetice poate fi aplicată, cu succes, pentru toate probele reale provenite de la pacienți tratați cu diferite doze de ciclofosfamidă.

În cazul ciclofosfamidei, transformările care au loc cu cea mai mare probabilitate în cursul degradării electrochimice, sunt prezentate în figura 66.

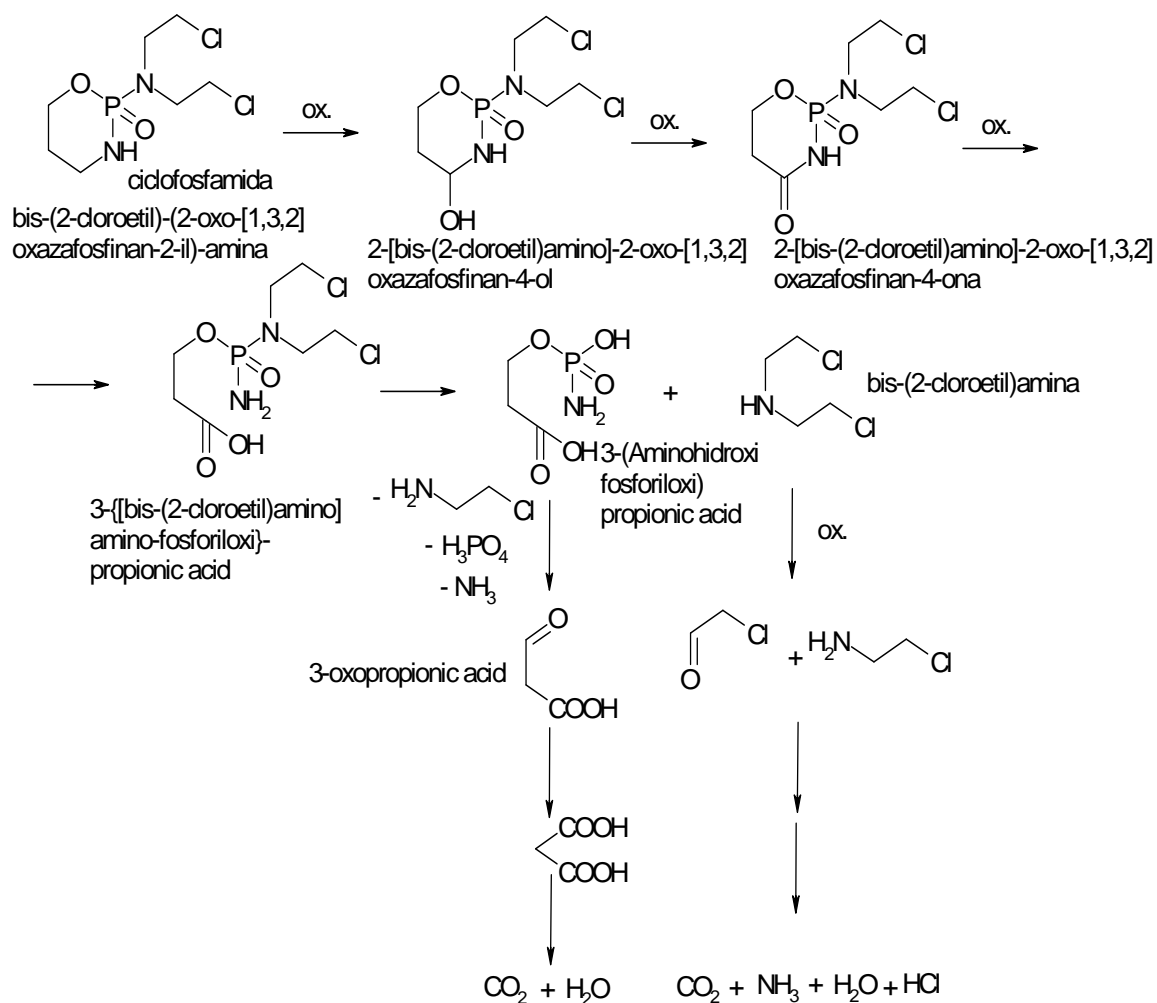


Figura 66. Degradarea prin oxidare electrochimică a ciclofosfamidei.

S-a urmărit dacă la sfârșitul celor 90 de minute de epurare electrochimică a ciclofosfamidei, în masa de reacție mai persistă compuși potențial toxici detectabili prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă. S-a urmărit în special porțiunea de cromatogramă cuprinsă între minutul 40 și 44 deoarece, așa cum s-a menționat mai sus, la minutul 60 de electroliză a apărut un pic cu abundență mică care a fost identificat MS ca fiind ciclofosfamida.

Prelucrarea probei în vederea analizei GC-MS s-a făcut similar cu cea descrisă la epurarea celorlalte medicamente citostatice. Protocolul de extracție și condițiile de analiză sunt identice așa că în continuare vor fi

prezentate doar datele obținute prin interpretarea cromatogramei. Cromatograma obținută în urma analizării efluentului rezultat de la epurarea ciclofosfamidei este prezentată în figura 67. Din analiza cromatogramei se observă că nu există compuși evidențiabili prin metoda GC-MS în efluentul rezultat în urma epurării electrochimice a ciclofosfamidei, și nici ciclofosamidă ca atare. Ținând cont că și în cazul epurării ciclofosfamidei, la fel ca și în cazul celorlalți agenți citostatici, în etapele prefinale ale degradării se formează preponderent acizi carboxilici, compuși puternic polari, este probabil ca aceștia să nu poată fi separați de sistemul GC-MS pe care s-a lucrat.

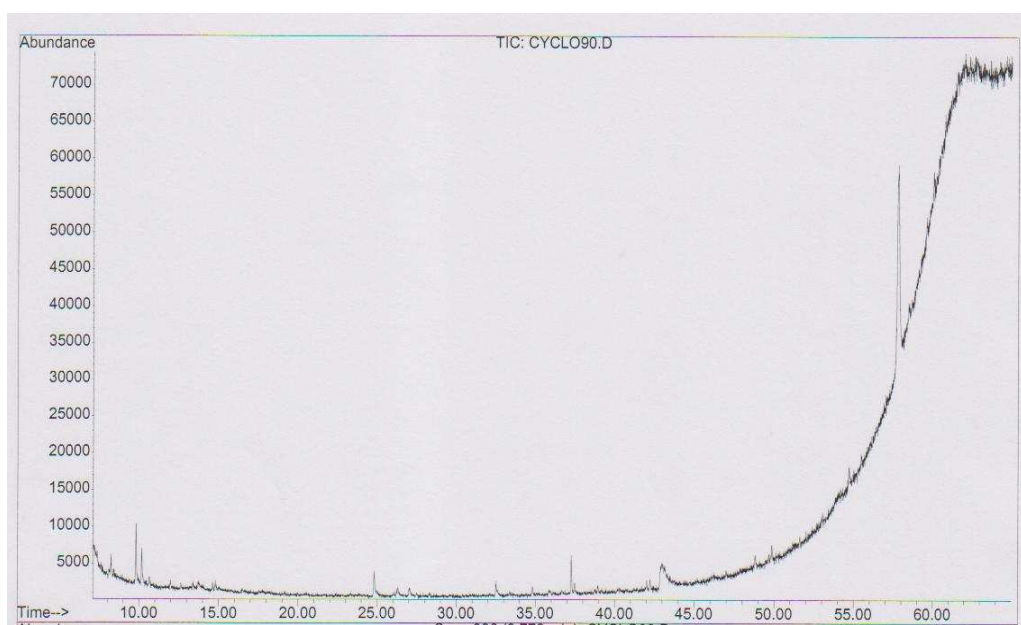


Figura 67. Cromatograma obținută în urma analizei GC a efluentului rezultat de la epurarea ciclofosfamidei. Timp de electroliză 90 minute la un curent de 1A.

S-a calculat randamentul de epurare al ciclofosfamidei în condițiile date de electroliză, bazat pe dozarea compusului prin metoda HPLC ca fiind raportul între concentrația de ciclofosamidă la minutul 10 de electroliză notată cu  $C_f$  și concentrația de ciclofosamidă inițială notată cu  $C_i$ .

Pentru proba sintetică acest randament este:

$$\eta_{\text{ciclofosfamida}} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 99,7\% \quad (35)$$

Pentru probele de urină provenite de la pacienți s-a calculat o valoare medie a acestui randament:

$$\eta_{\text{ciclofosfamida}} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 98,8\% \quad (36)$$

### 6.5.2.5. Epurarea Ifosfamidei

Este un izomer al ciclofosfamidei care diferă de acesta prin mutarea unui radical cloroetil la azotul inelului oxazofosforic. Mecanismul de acțiune este în mare parte superpozabil peste cel al ciclofosfamidei. Din datele de farmacocinetică rezultă ca biodisponibilitatea produsului este de 100%, timpul de înjumătățire plasmatică este de 5 – 6 ore, și se elimină renal în proporție de 50% nemodificată. Se administrează în doze relativ mari de 1,2 – 2 g/m<sup>2</sup> suprafață corporală și zi. Este un agent alchilant antitumoral cu spectru larg de acțiune fiind foarte activă în unele sarcoame, în carcinomul testicular și în unele limfoame rezistente la alte citostatice [151,152].

#### **Prepararea apei reziduale sintetice cu conținut de ifosamidă.**

Ifosfamida se prezintă sub forma unei pulberi albe ușor solubile în apă. Se dizolvă 150 mg de ifosamidă în 100 ml soluție de clorură de sodiu 5% la balon cotat.

#### **Dozarea Ifosfamidei.**

Pentru dozarea ifosfamidei atât în apa reziduală sintetică cât și în probele de urină provenite de la pacienți s-a utilizat cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC).

S-a utilizat un cromatograf de lichide de înaltă performanță tip Agilent 1100 prevăzut cu un detector spectrofotometric UV – VIS.

Condițiile de desfășurare ale analizei HPLC au fost:

- Faza mobilă: 20% acetonitril + 80% apă la pH = 6 (tampon fosfat)
- Fluxul de fază mobilă: 1,3 ml/minut
- Coloană cu fază inversată C18. (Zorbax SB-C18)
- Temperatura coloanei: 25°C
- Volumul de probă injectat: 20 μL
- Detecție la  $\lambda = 200$  nm
- Timpul de retenție pentru ifosfamidă a fost de 16,7 minute
- Timpul de achiziție pentru fiecare cromatograma: 20 minute.

S-a trasat o curbă de etalonare pentru ifosfamidă în condițiile date de analiză. În tabelul XXV sunt arătate datele obținute care sunt reprezentate grafic în figura 68.

Tabel XXV. Curba de etalonare pentru ifosfamidă:

Concentrația de ifosfamidă (mg/dl)	Aria picului corespunzător ifosfamidei [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător ifosfamidei (minute)
150	4092	16,43
100	2531	16,52
50	1252	16,65
25	594	16,77
10	224	16,94
1	109	17,30
0,5	56	17,67
0,1	12	17,96

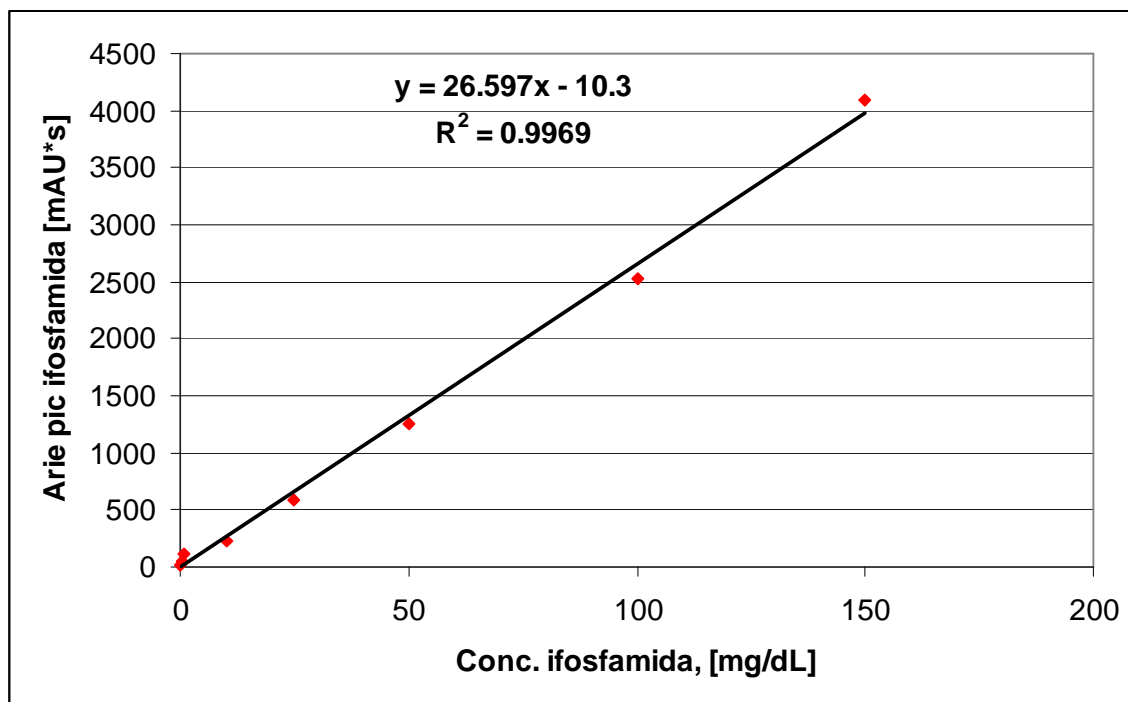


Figura 68. Curba de calibrare pentru ifosfamidă.

Din analiza curbei de calibrare pentru ifosfamidă prezentată în figura 68, reiese ca există o foarte bună corelație între concentrațiile de ifosfamidă și ariile picului corespunzător acestuia ( $R^2 = 0,9969$ ), ceea ce permite validarea metodei de lucru și utilizarea ei pentru determinările concentrațiilor de ifosfamidă în probele luate în lucru.

În figura 69a sunt prezentate cromatogramele pentru proba blank (soluția solvent pentru ciclofosfamidă: NaCl 5%), respectiv 69b – ifosfamidă 150 mg/dl.



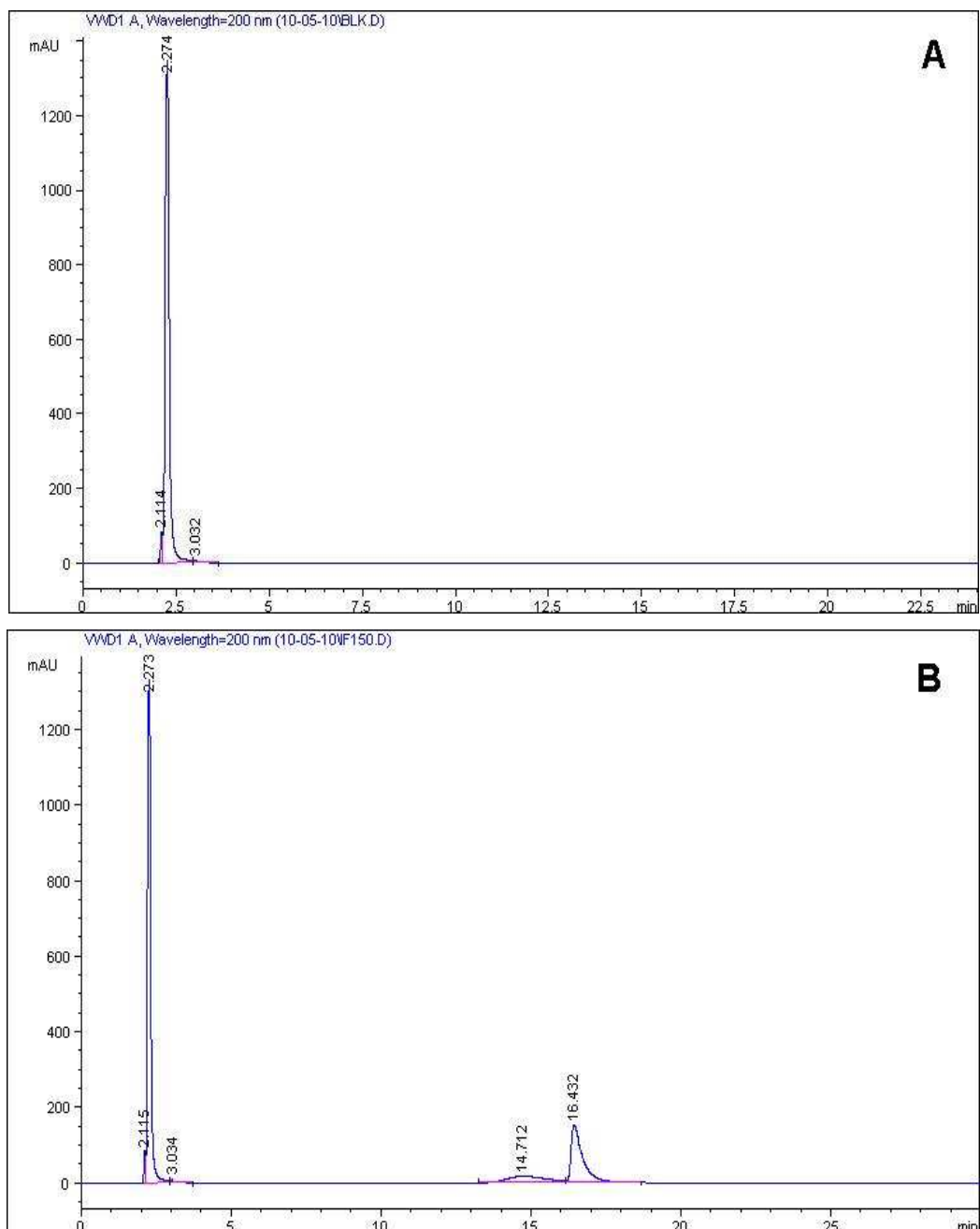


Figura 69 a și b. Cromatograma HPLC pentru blank - solvent (a) și ifosfamidă 150 mg/dl (b).

Proba de apă reziduală sintetică cu conținut de ifosfamidă (150 mg/dl) a fost supusă epurării în microinstalația experimentală, la un curent de 1A timp de 90 de minute. S-au prelevat probe din reactorul electrochimic în cursul desfășurării electrolizei care au fost analizate prin metoda HPLC propusă, obținându-se următoarele rezultate: (tabel XXVI).

Tabel XXVI. Epurarea apei reziduale sintetice cu conținut de ifosfamidă. Analiza HPLC.

Momentul recoltării probei (minute)	Aria picului corespunzător ifosfamidei [mAU*s]	Timpul de retenție corespunzător ifosfamidei (minute)	Concentrația de ifosfamidă (mg/dl)
0	4092	16,44	150
1	3040	16,50	111
2	2438	16,55	89
3	1788	16,61	65,5
4	1333	16,67	50
5	940	16,73	39,5
10	36	16,81	0,3
15	13	16,92	0,1
30	-	-	-
60	-	-	-
90	-	-	-

Se observă că, concentrația de ifosfamidă scade treptat în cursul degradării electrochimice și ajunge la limita de detecție a instrumentului (HPLC) la minutul 15 ceea ce o încadrează între compușii cu rezistență intermediară la degradarea prin oxidare electrochimică, comparativ cu ceilalți agenți citostatici luați în studiu.

În figura 70 este reprezentată variația concentrației de ifosfamidă din proba sintetică în timpul procesului de epurare electrochimică. Din grafic se observă că scăderea concentrației de ifosfamidă are loc după o ecuație exponențială:

$$t_{fosfamida} \left( \frac{mg}{dl} \right) = 150 \cdot e^{-0,4914 \cdot timp(min)} \quad (37)$$

Valoarea coeficientului de corelație obținută (0,9238) indică faptul că această ecuație aproximează foarte bine evoluția concentrației de ifosfamidă pe durata procesului de epurare.

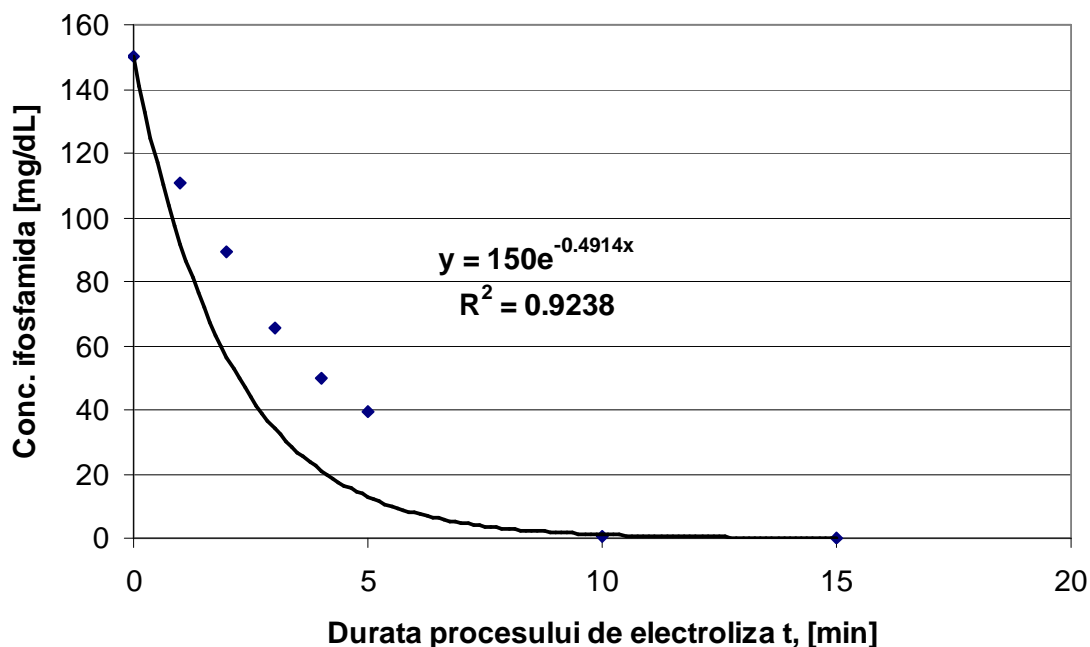


Figura 70. Variația concentrației de ifosfamidă din proba sintetică în timpul procesului de epurare electrochimică.

La fel ca și ciclofosfamida, ifosfamida este un compus care se pretează foarte bine pentru analiza prin metoda GC-MS. Aplicând această metodă la analiza probelor prelevate în timpul epurării electrochimice până la minutul 90 inclusiv, s-a constatat ca există ifosfamidă nereacționată chiar și la minutul 60 de la începutul electrolizei.

Această observație vine în sprijinul afirmației că durata electrolizei trebuie să o depășească pe aceea a dispariției compusului analizat prin metoda HPLC care în acest caz are o sensibilitate inferioară GC-MS-ului.

În cele ce urmează va fi prezentată cromatograma GC (minutul 60) relevantă pentru afirmația făcută împreună cu spectrele de masă aferente.

Și în acest caz parametrii de analiză GC-MS au fost aceiași ca la determinările anterioare. De asemenea și condițiile de prelucrare a probei au fost identice. În figura 71a. se observă gaz cromatograma și spectrul de

masă al compusului corespunzător picului cu timpul de retenție 43,7 minute al probei prelevate la minutul 60 de epurare electrochimică a ifosfamidei, respectiv 71b. comparația spectrului obținut experimental cu cel din librăria de spectre NIST02.

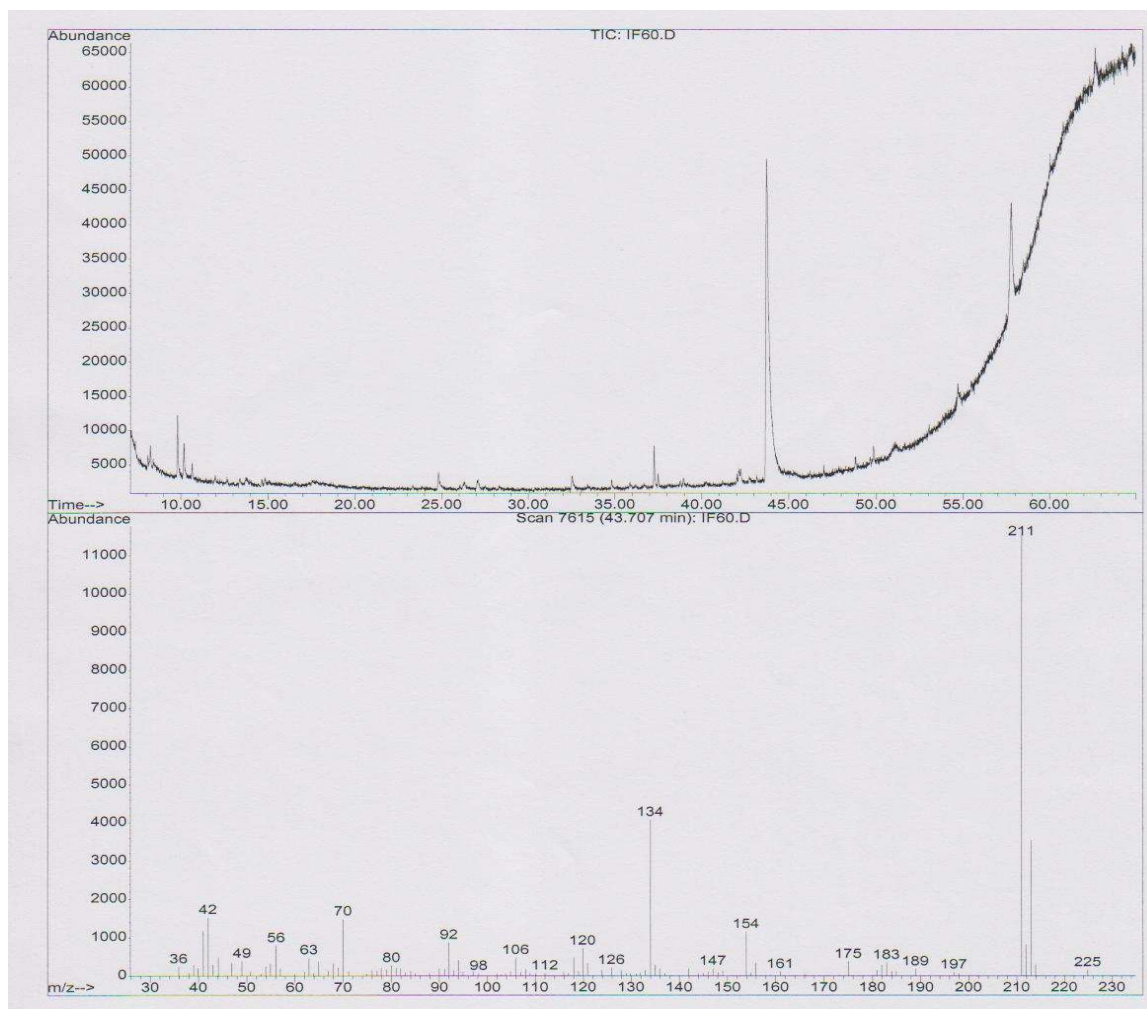


Figura 71.a. Gaz cromatograma și spectrul de masă al compusului corespunzător picului cu timpul de retenție 43,7 minute al probei prelevate la minutul 60 de epurare electrochimică a ifosfamidei.

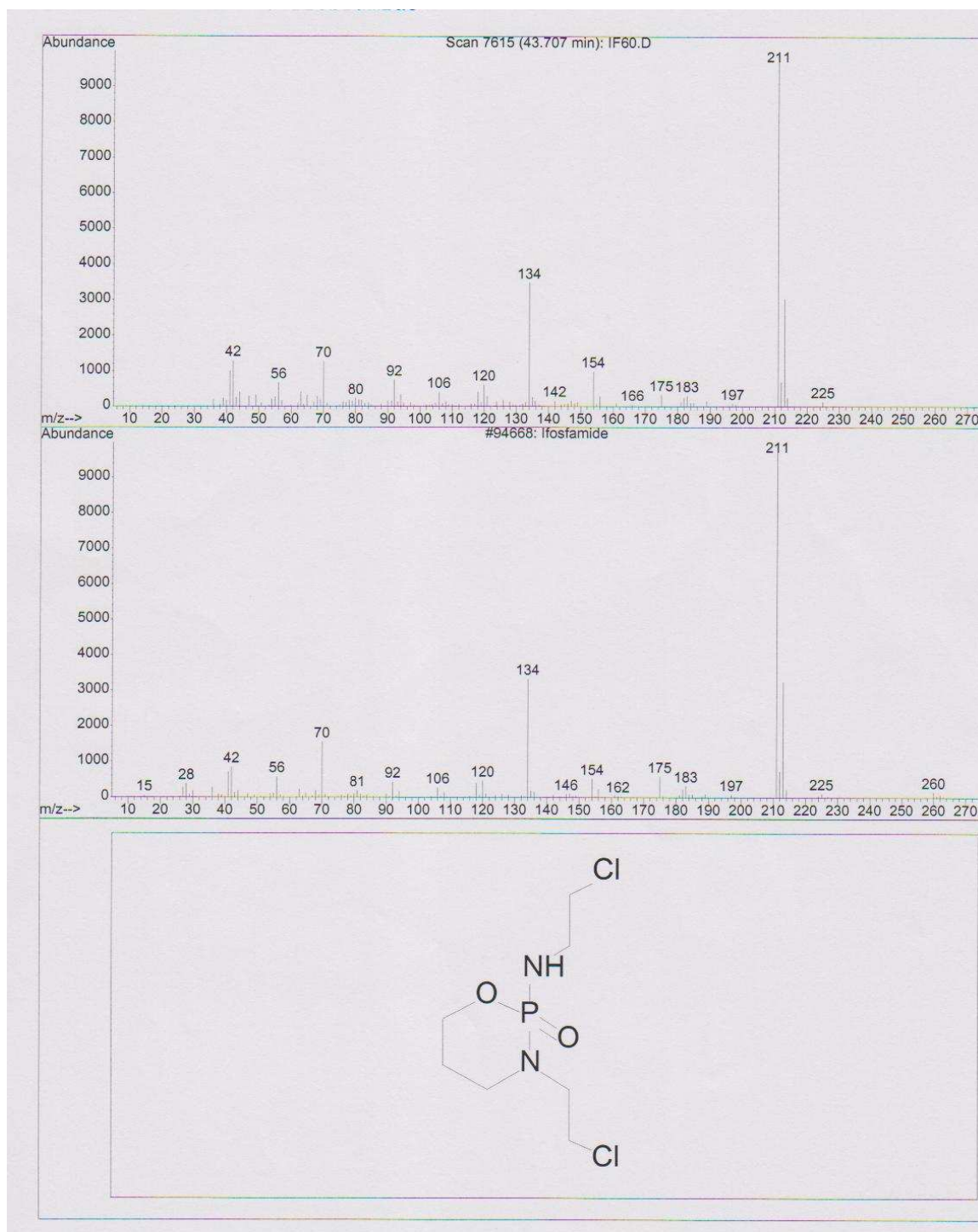


Figura 71b. Comparația spectrului obținut experimental cu cel din librăria de spectre NIST02 pentru ifosfamidă.

S-au supus epurării zece probe reale de urină provenite de la pacienți cu limfoame maligne Hodgkin și nonhodgkin care au beneficiat de așa numita terapie de salvare care se aplică formelor de boală rezistente la tratamentele convenționale. Terapia constă în administrarea ifosfamidei în doze mari: 2 – 3

g/m<sup>2</sup> suprafață corporală/zi, deci pentru un adult cu o suprafață corporală medie de 1,7 m<sup>2</sup> revine o doză de ifosfamidă de 3,4 – 5,1 grame în 24 de ore. Din acesta, aproximativ 50% se elimină renal netransformată și odată cu urina pacienților respectivi ajunge să contamineze mediul înconjurător [153,154].

Concentrațiile de ifosfamidă determinate în urina pacienților respectivi au fost următoarele: (tabel XXVII)

Tabel XXVII. Concentrațiile urinare de ifosfamidă ale pacienților luați în studiu.

Pacient	Concentrația urinară de ifosfamidă (mg/dl)	Concentrația de ifosfamidă (mg/dl) în urina salefiată
Pacient 1	41	32
Pacient 2	58	43,5
Pacient 3	39	30
Pacient 4	44	32
Pacient 5	57	42
Pacient 6	53	41
Pacient 7	73	54
Pacient 8	49	36
Pacient 9	32	24
Pacient 10	51	36

În tabelul XXVIII și figura 72 se prezintă scăderea concentrației de ifosfamidă în cursul epurării electrochimice a probelor reale de urină provenite de la cei zece pacienți incluși în studiu.

Tabel XXVIII. Epurarea probelor reale de urină cu conținut de ifosfamidă. Analiză HPLC.

Pacient nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/										
Timp (min)										
0	32	43,5	30	32	42	41	54	36	24	36
1	24	33	22	24	31	31	40	27	18	26
2	19	26,5	17	18,5	25	23	32	22	14	21
3	14	19	12,5	13,5	18	16,5	23	16	10,5	15
4	11	14,5	10	10	14	12	18	12	8	11,5
5	9	11,5	8	7	11	10	14	9,5	6,5	9
10	0,6	0,8	0,6	0,6	0,7	0,7	1	0,6	0,4	0,7
15	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,1	0,3
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

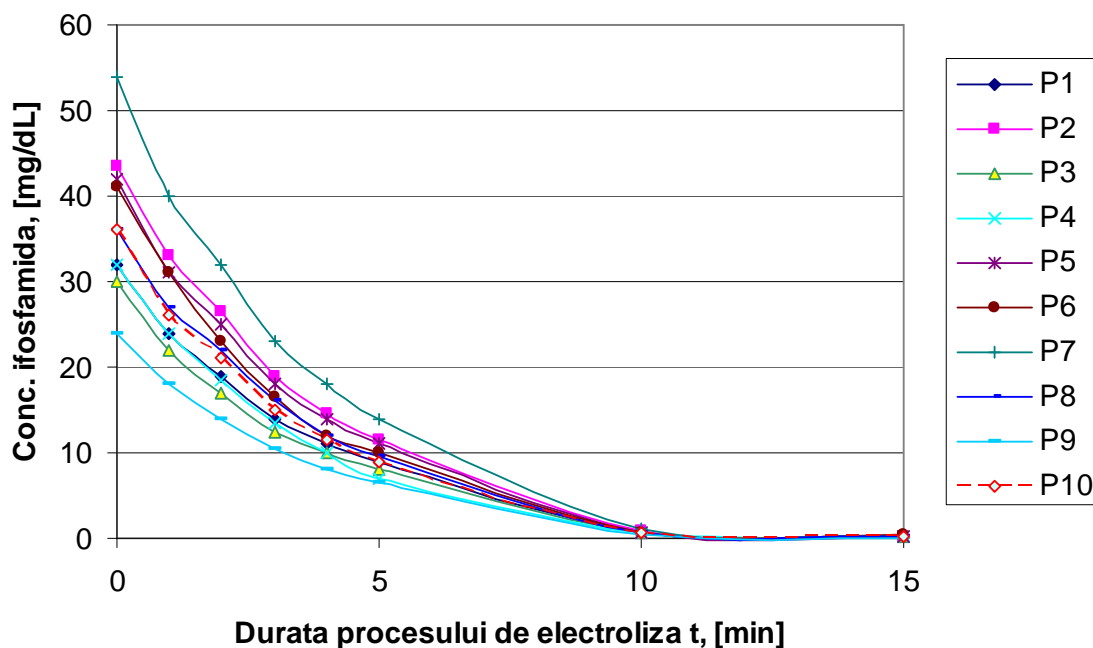


Figura 72. Epurarea probelor reale de urină cu conținut de ifosfamidă.

Analiza datelor experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 10 pacienți indică o variație a concentrației de ifosfamidă asemănătoare cu cea obținută în urma epurării probei sintetice.

Drept urmare, s-a verificat modul în care ecuația de variație a concentrației de ifosfamidă în proba sintetică descrie evoluția concentrațiilor de ifosfamidă în probele reale.

Concordanța dintre datele experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 10 pacienți și cele obținute în urma aplicării ecuației de variație a concentrației de ifosfamidă în proba sintetică este redată în figura 73.



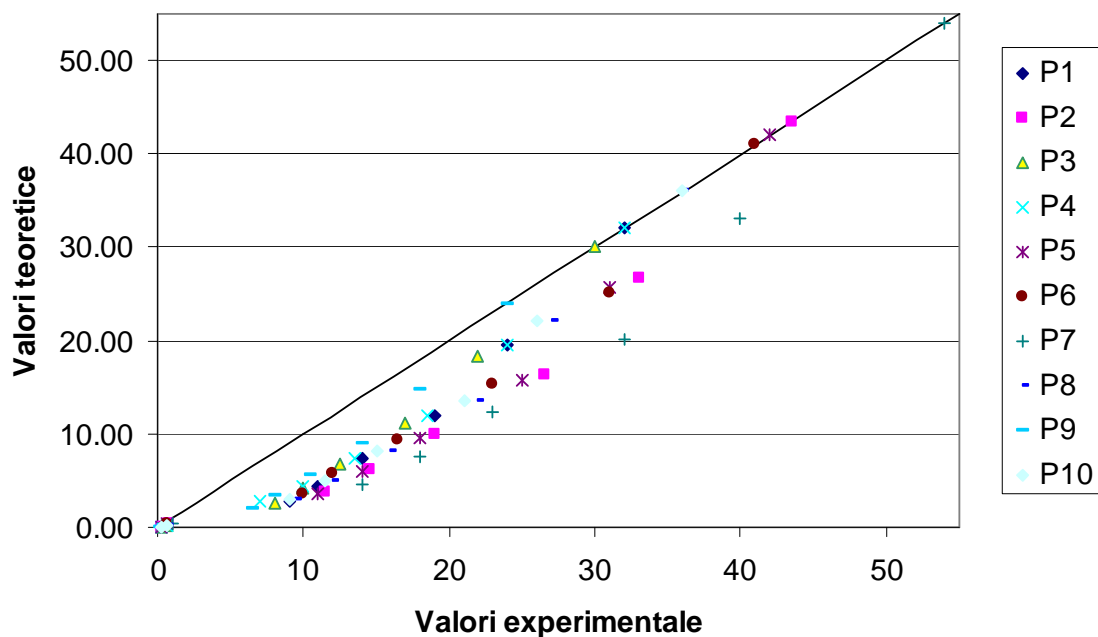


Figura 73. Concordanța dintre datele experimentale obținute în urma epurării probelor reale provenite de la cei 10 pacienți și cele obținute în urma aplicării ecuației de variație a concentrației de ifosfamidă în proba sintetică.

Din figură se observă că valorile teoretice calculate se apropie mult de cele experimentale ceea ce arată că ecuația generată pe baza datelor experimentale obținute în urma epurării probei sintetice poate fi aplicată, cu succes, pentru toate probele reale provenite de la pacienți tratați cu diferite doze de ifosfamidă.

În cazul ifosfamidei, transformările care au loc cu cea mai mare probabilitate în cursul degradării electrochimice, sunt prezentate în figura 74.

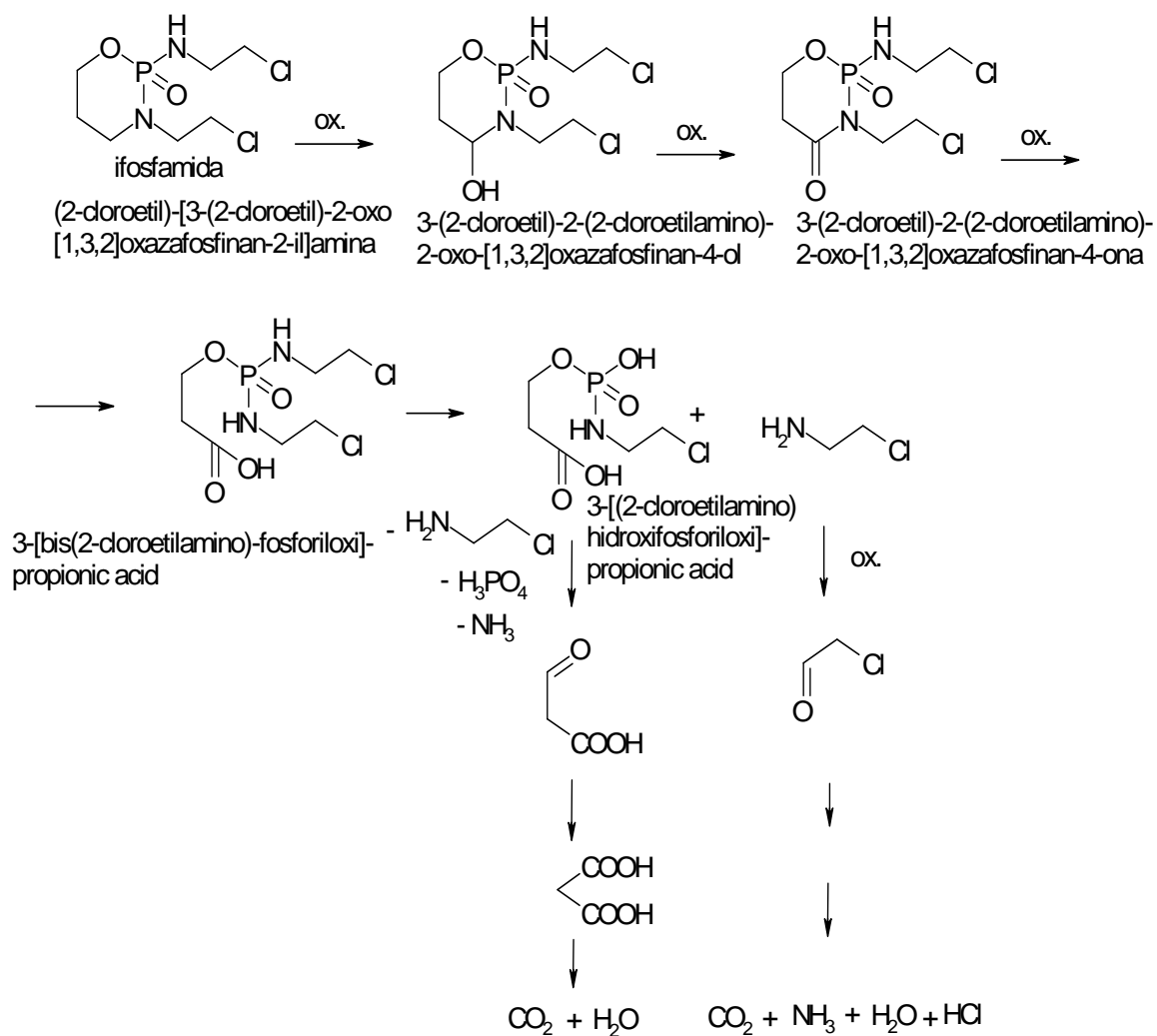


Figura 74. Degradarea prin oxidare electrochimică a ifosfamidei.

S-a urmărit dacă la sfârșitul celor 90 de minute de epurare electrochimică a ifosfamidei, în masa de reacție mai persistă compuși potențial toxici detectabili prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă. S-a urmărit în special porțiunea de cromatogramă între minutul 42 și 46 deoarece, așa cum s-a menționat mai sus, la minutul 60 de electroliză a apărut un pic cu abundență mică care a fost identificat MS ca fiind ifosfamida.

Prelucrarea probei în vederea analizei GC-MS s-a făcut similar cu cea descrisă la epurarea celorlalte medicamente citostatice.

Protocolul de extracție și condițiile de analiză sunt identice așa că în continuare vor fi prezentate doar datele obținute prin interpretarea cromatogramei.

Cromatograma obținută în urma analizării efluentului rezultat de la epurarea ifosfamidei este prezentată în figura 75. Din analiza cromatogramei se observă că nu există intermediari de degradare evidențiable prin metoda GC-MS în efluentul rezultat în urma epurării electrochimice a ifosfamidei, însă există ifosfamidă ca atare în urme. Ținând cont că și în cazul epurării ifosfamidei, la fel ca și în cazul celorlalți agenți citostatici, în etapele prefinale ale degradării se formează preponderent acizi carboxilici, compuși puternic polari, este probabil ca aceștia să nu poată fi separați de sistemul GC-MS pe care s-a lucrat.

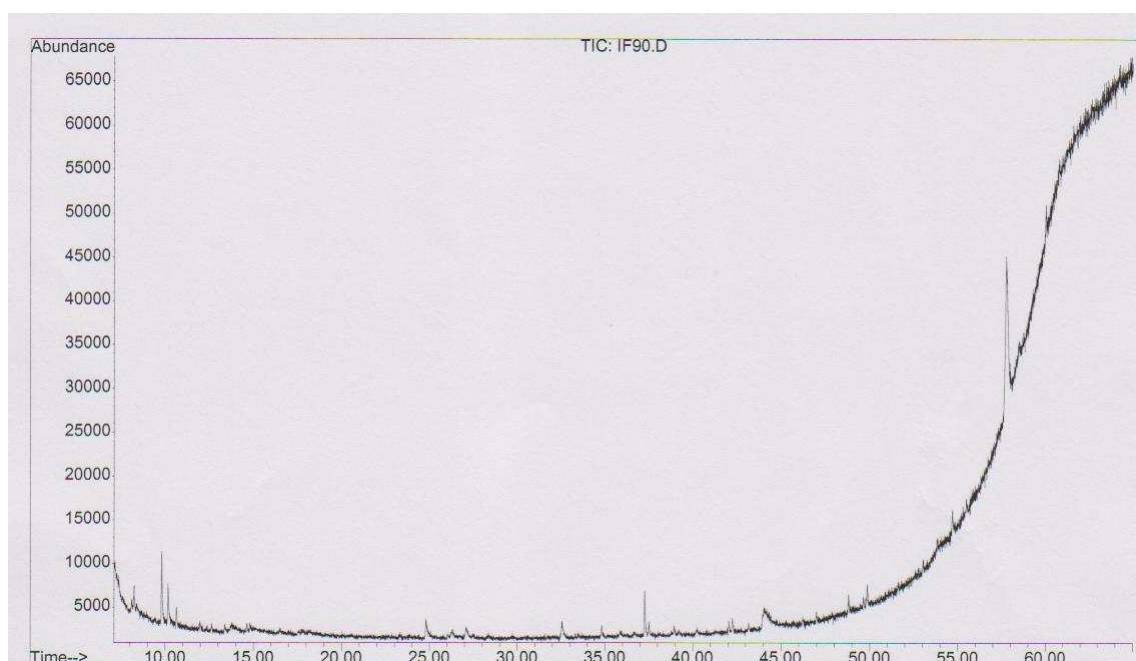


Figura 75. Cromatograma obținută în urma analizei GC a efluentului rezultat de la epurarea ifosfamidei. Timp de electroliză 90 minute la un curent de 1A.

S-a calculat randamentul de epurare al ifosfamidei în condițiile date de electroliză, pe baza dozării compusului prin metoda HPLC ca fiind raportul între concentrația de ifosfamidă la minutul 15 de electroliză notată cu  $C_f$  și concentrația de ifosfamidă inițială notată cu  $C_i$ .

Pentru proba sintetică acest randament este:

$$\eta_{ifosfamida} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 99,9\% \quad (38)$$

Pentru probele de urină provenite de la pacienți s-a calculat o valoare medie a acestui randament:

$$\eta_{\text{ifosfamida}} = 100 - \frac{C_f}{C_i} \cdot 100 = 99,4\% \quad (39)$$

### **6.5.3. Studiul citotoxicității apelor reziduale sintetice epurate versus probele inițiale pentru citostaticele studiate**

Studiile de citotoxicitate s-au efectuat pe sisteme biologice: culturi de celule și animale de laborator.

S-a optat pentru folosirea apelor reziduale sintetice deoarece conțin cantități mai mari de citostatice, comparabile cu cele care se administrează în clinică și deci efectele biologice vor apărea rapid, vor fi de intensitate mai mare și ușor de cuantificat. Pentru a putea analiza în mod obiectiv efectele mutagene, teratogene și cancerigene ale substanțelor citostatice în doze mici așa cum se întâmplă în mediul înconjurător ar fi necesare experimente de ani de zile cu expuneri cronice la acești poluanți, experimente care nu fac obiectul prezentei lucrări.

#### **6.5.3.1. Studii de citotoxicitate pe culturi celulare**

Prin culturi celulare se înțelege un ansamblu de tehnici de laborator care permit creșterea unor celule pe medii sintetice în afara organismului de proveniență [155,156,157].

Pentru testarea citotoxicității compușilor citostatici prezentați în lucrare s-a folosit o linie celulară tumorală stabilizată K – 562. Aceasta linie celulară provine de la o pacientă cu eritroleucemie aflată în fază finală blastică. Eritroleucemia este o formă de leucemie mieloidă pozitivă pentru genele de fuziune bcr – abl.

Celulele K -562 sunt celule neaderente care cresc ușor pe medii de cultură relativ simple de tipul RPMI.

Un mediu de cultura bun trebuie să ofere condiții cât mai apropiate de cele din mediul natural al celulelor respective. Astfel mediul de cultură este o sursă de elemente nutritive și în același timp contribuie la mentinerea parametrilor fizico-chimici: pH și osmolaritate la valori cât mai apropiate de cele fiziologice.

În condiții de cultură celulară „in vitro” se pot urmări foarte ușor aspecte legate de proliferarea, respectiv apoptoza celulară, însă au inconvenientul că scoțând celulele din mediul lor biologic acestea suferă modificări funcționale adaptative noilor condiții de viață. [158]

Pentru testarea citotoxicității probelor epurate în microinstalația electrochimică, comparativ cu cele inițiale s-a propus un model experimental care să evalueze proliferarea și viabilitatea celulară. În acest sens s-au realizat o serie de culturi celulare K – 562 la care s-au adăugat probele de testat după o prealabilă prelucrare a lor.

#### **Realizarea culturilor de celule:**

În etapa inițială a experimentului s-a expandat linia celulară K - 562 pentru a avea un număr suficient de celule pentru determinările propriuzise. Aceasta cultură se numește cultură primară.

#### **Materiale necesare:**

- Celule K – 562 congelate în azot lichid,
- Soluție tampon fosfat (PBS) fiziologică (pH = 7,4) sterilă,
- Mediul de cultură RPMI 1640,
- Soluție de L-glutamina 300 mg/L,
- Ser fetal de vițel (FCS),

- Soluție de penicilină și streptomycină 2%
- Plăci pentru culturi celulare cu 24 de godeuri, respectiv 96 de godeuri,
- Pipete de transfer sterile, pipete automate cu vârful sterile,
- Incubator pentru culturi celulare cu aer umidificat și adăus de 5% CO<sub>2</sub>. Temperatura de 37 °C,
- Baie de apă termostată la 37 °C,
- Microscop inversat pentru culturi celulare,
- Hotă cu flux laminar steril pentru culturi celulare,
- Centrifugă cu diverse tipuri de cupe pentru tuburile folosite la culturile de celule și cu modul de răcire.

#### **Mod de lucru:**

Toate operațiile care implica manipularea reactivilor și a celulelor în contact cu aerul atmosferic se vor face strict în hota cu flux de aer laminar steril.

Se decongelează un alicot cu celule K – 562 pe baia de apă termostată la 37°C după care rapid sunt trecute în tuburi de 16 ml preumplute cu 10 ml soluție PBS rece la 4 °C. Acest aspect este important pentru a dilua cât mai mult agentul crioconservant folosit (dimetil-sulfoxidul) care are acțiune toxică pe celule dacă nu este îndepărtat cât mai repede posibil și dacă celulele nu sunt meținute la 4 °C pe parcursul îndepărtării acestui conservant.

Tuburile sunt centrifugate în centrifuga racita la 4 °C timp de 15 minute la 2000 rotații/minut. Supernatantul care rezultă și care conține dimetil-sulfoxid este îndepărtat și se adaugă alți 10 ml soluție salină PBS rece. Prin agitare ușoară se resuspendă celulele după care se repetă centrifugarea și spalarea de încă 2 ori. La final, sedimentul care conține celulele este resuspendat în 1 ml tampon fosfat salin la temperatura laboratorului. Astfel celulele sunt pregătite pentru a fi însămânțate pe mediul de cultură.

În paralel, se pregătește o placă de cultură pentru celule cu suprafața de 75 cm<sup>2</sup> în care se introduc 10 ml de mediu de cultură complet care conține RPMI 1640 suplimentat cu 10% FCS, L-glutamina și antibiotice, peste care se introduc celulele pregătite.

Placa de cultură este introdusă în incubatorul pentru culturi celulare la 37°C și 5% CO<sub>2</sub>. Placa este examinată zilnic la microscopul inversat pentru a se aprecia multiplicarea celulară.

În 4 – 5 zile celulele ajung în faza de proliferare exponențială și pot fi folosite pentru experimentele propriuzise de citotoxicitate.

### **Pregătirea probelor de citostatice epurate electrochimic pentru studiile de citotoxicitate.**

Dacă probele inițiale, respectiv apele sintetice care conțin substanțele citostatice, au o compoziție simplă și cunoscută, nu același lucru se întâmplă în cazul efluentului microreactorului electrochimic, impunându-se prelucrarea acestuia în vederea studiilor pe celule, respectiv pe animalele de laborator.

#### **Materiale necesare:**

- Soluție de tiosulfat de sodiu 5%
- Soluție de hidroxid de sodiu 20%
- Carbonat de potasiu cristalizat
- Etanol absolut
- Soluție clorură de sodiu 5%
- pH – metru
- Flacoane Erlenmeyer, pipete, pâlnii de separare, pahare Berzelius, stative, capsule de porțelan
- Hota chimică cu evacuare.

#### **Mod de lucru:**

Într-un pahar Erlenmeyer se prelevează 40 ml efluent din microreactorul electrochimic după încheierea celor 90 de minute de electroliză. Se adaugă 2 ml soluție tiosulfat de sodiu 5%, se agită ușor și se lasă în repaus 10 minute. Se verifică absența clorului liber rezidual cu metil-oranj după tehnica descrisă la punctul 6.5.2. În cazul în care clorul liber este absent se trece la etapa următoare, iar dacă nu, se adaugă încă 0,5 ml soluție de tiosulfat și se repetă verificarea. Dacă este absent clorul rezidual, se măsoară pH-ul soluției și se ajustează la 7 cu soluția de hidroxid de sodiu 20%.

Această etapă este necesară pentru a evita efervescenta și spumarea în momentul adăugării carbonatului de potasiu.

Peste soluția astfel tratată se adaugă carbonat de potasiu în porțiuni mici și sub agitare până când acesta nu se mai dizolvă. (soluție saturată).

Se trece conținutul paharului Erlenmeyer într-o pâlnie de separare și se adaugă 20 ml etanol absolut care în aceste condiții nu mai este miscibil cu faza apoasă. Se extrage energic timp de 20 de minute după care se separa faza etanolică, care se transferă într-o capsulă de porțelan și se lasă să se evapore complet la temperatura laboratorului sub nișa chimică.

Astfel se extrag substanțele organice aflate în efluentul microreactorului care sunt preferențial solubile în etanol față de apă și se înlătură sărurile formate.

După ce etanolul s-a evaporat complet, reziduul rămas se reia cu 10 ml soluție de clorura de sodiu 5%.

Soluția astfel obținută se sterilizează mecanic prin filtrare pe filtre microbiologice cu diametrul porilor de 0,2 micrometri și se folosește mai departe la studiile de citotoxicitate atât pe culturi de celule cât și pe animalele de laborator.

### **Studiile de citotoxicitate in vitro pe culturi de celule**

Presupun evidențierea viabilității și proliferării celulare în condițiile în care în mediul de cultură s-au adăugat citostaticele de interes, respectiv producții lor de degradare rezultați în urma procesului de epurare electrochimică. La ora actuală există multe tehnici în vederea acestor determinări. Cele mai convenabile metode sunt cele care utilizează microplăci de cultură cu 96 de godeuri. Această miniaturizare permite analiza simultană și rapidă a mai multor probe.

Formatul de microplăci reduce de asemenea cantitatea de mediu de cultură și de celule care trebuie puse în godeu, de asemenea și costul consumabilelor. Metodele colorimetrice permit probelor să fie analizate direct în microplăci cu un cititor de plăci tip ELISA. Metodele pe microplăci s-au dezvoltat în baza diferiților parametri asociați viabilității și proliferării celulare. Cei mai importanți parametri utilizați sunt activitatea metabolică și sinteza de ADN.



Unul din parametrii utilizați pentru metoda colorimetrică este activitatea metabolică a celulelor viabile. Pentru cuantificarea proliferării și citotoxicității celulare se utilizează larg sarea de tetrazoliu MTT.

Datorită faptului că sarurile de tetrazoliu sunt reduse la un produs colorat, formazanul, doar prin activitatea metabolică (prezența reductazelor) a celulelor active, aceste teste detectează exclusiv celulele viabile. După solubilizare, formazanul format, poate fi cuantificat prin citire la un cititor de plăci tip ELISA la 570 nm [159-162].

În figura 76 sunt prezentate reacțiile de formare ale formazanului plecând de la diverse substraturi (saruri de tetrazoliu):

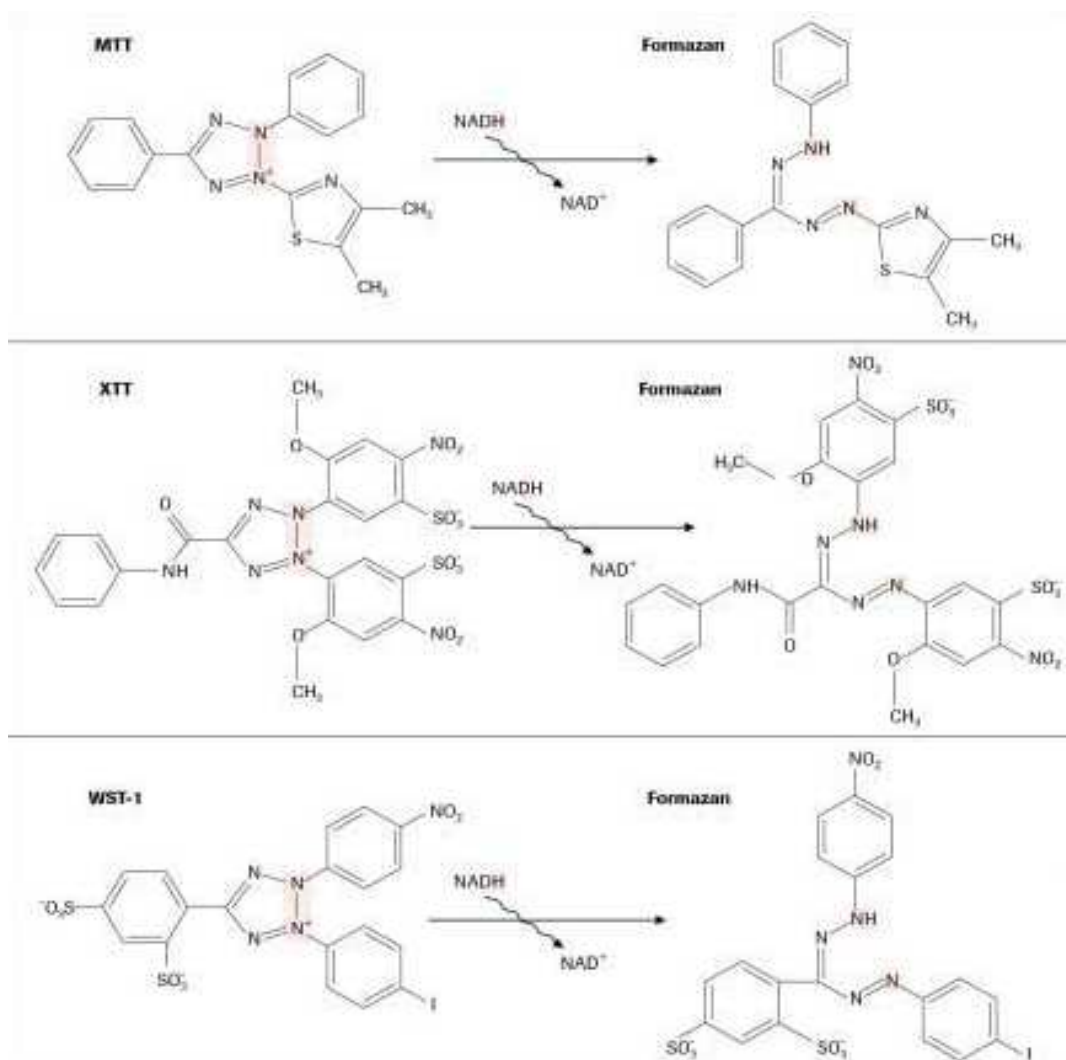


Figura 76. Reacțiile de formare ale formazanului

Din moment ce, celulele care proliferază sunt mai active metabolic decât cele care nu proliferază, metoda MTT este potrivită nu numai pentru determinarea viabilității celulare ci și pentru citotoxicitatea factomediată. Totuși, rezultatele obținute în urma testului cu MTT pot varia în funcție de condițiile de cultură neideale.(figura 77)

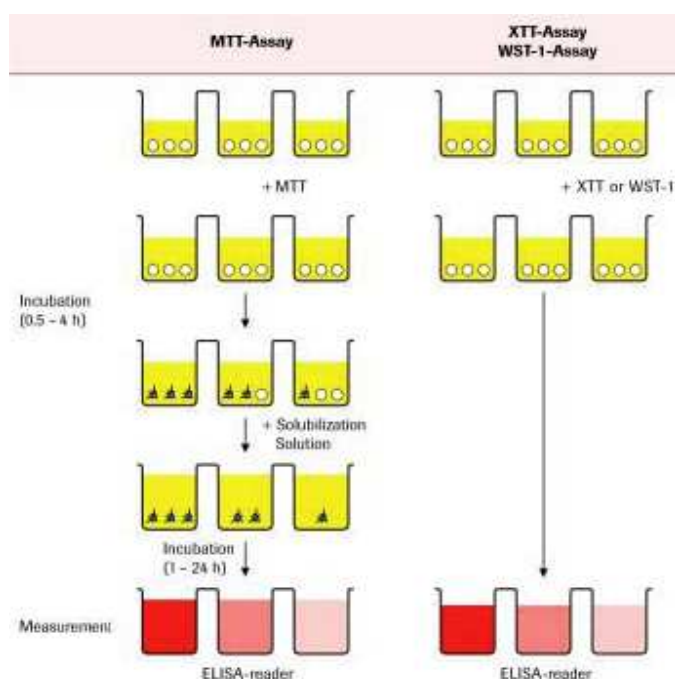


Figura 77. Măsurarea activității metabolice utilizând săruri MTT, XTT și WST-1 de tetrazoliu.

### Tehnica de lucru MTT – bromura de ( 3-(4,5 dimetiliazol)-2-il)-2,5-difenil tetrazoliu)

Reactivul MTT este gata de utilizare și stabil la 4°C la întuneric până la 18 luni.

#### Materiale necesare:

- cititor de plăci tip ELISA cu filtre având următoarele lungimi de undă: 650 nm, respectiv 570 nm.
- microscop inversat
- pipetă multicanal
- Incubator pentru culturi celulare cu aer umidificat și adaus de 5% CO<sub>2</sub>. Temperatura de 37°C

- hotă cu flux laminar pentru culturi de celule
- plăci cu 96 de godeuri, sterile pentru culturi celulare
- tuburi sterile de diferite capacități
- pipete sterile
- vârfuri sterile pentru pipete

### **Protocolul de lucru pentru MTT**

- se pun în plăcile cu godeuri 50.000 de celule per godeu;
- se incubează cu compusul de testat pentru 72 de ore;
- se adaugă 10  $\mu$ L de reactiv MTT în fiecare godeu;
- se incubează 4 ore cu MTT până devine vizibil precipitatul de formazan format de culoare purpurie;
- se adaugă 100  $\mu$ L reactiv detergent din kit-ul de MTT;
- se lasă 2 ore la temperatura camerei;
- se înregistrează absorbanta la 570 nm pe cititorul de plăci tip ELISA.
- fiecare substanța se testează în triplicat.

O placa de test cu 96 de godeuri trebuie să conțină :

- godeuri blank sau etalon, conținând doar mediul de cultură (4 godeuri);
- godeuri cu celule control, netratate (4 godeuri);
- godeuri cu celule tratate cu substanțele de interes (câte 3 din fiecare).

### **Interpretarea datelor**

Valorile absorbantei ce sunt mai mici față de ale celulelor control indică o reducere a ratei de proliferare. Invers, o absorbanta ridicată indică o creștere a proliferării celulare.

### **Rezultate experimentale:**

S-au testat apele reziduale sintetice cu conținut de citostatice și efluenții lor epurati versus control pozitiv sigur citotoxic – dimetil sulfoxidul - și celule fără nici un adăug citotoxic – controlul negativ [163,164].

Fiecare probă a fost făcută în triplicat pentru a reduce cât mai mult posibil variațiile individuale caracteristice oricărui sistem biologic, inclusiv culturilor de celule. Rezultatele finale reprezintă media aritmetică a celor trei determinări.

Din cultura primară de celule K – 562 s-au făcut subculturi în placa cu 96 de godeuri pe același mediu de cultură, introducându-se în fiecare godeu un număr de 50.000 de celule. Numărătoarea de celule s-a făcut la microscopul optic cu ajutorul camerei de numărat Burker.

În fiecare godeu s-au introdus 150  $\mu$ L de mediu de cultură cu cele 50.000 de celule și 20  $\mu$ L proba de analizat (apele sintetice, respectiv produșii lor de epurare).

Controlul pozitiv intens citotoxic s-a realizat prin adaugarea pe celule a 2  $\mu$ L dintr-o soluție de dimetilsulfoxid 10% în soluție PBS.

Controlul negativ constă din celule peste care se adaugă 20  $\mu$ L soluție PBS.

Dozele de compuși citostatici care revin pe fiecare godeu pentru fiecare probă de apă sintetică sunt:

- pentru melphalan – proba inițială: 3  $\mu$ g
- pentru doxorubicină – proba inițială: 2  $\mu$ g
- pentru metotrexat – proba inițială: 40  $\mu$ g
- pentru ciclofosfamidă – proba inițială: 20  $\mu$ g
- pentru ifosfamidă – proba inițială: 30  $\mu$ g
- pentru dimetilsulfoxid: 200  $\mu$ g

Rezultatele obținute sunt comparate cu controlul negativ unde nu avem nici un compus potențial citotoxic, unde celulele proliferază în ritmul lor natural și care reprezintă pe o scară arbitrară 100%.

Cu cât citotoxicitatea este mai mică cu atât celulele vor prolifera mai intens și se vor apropia de valoarea de 100% atribuită controlului negativ necitotoxic. În tabelul XXIX sunt prezentate datele obținute experimental la testul MTT și care sunt reprezentate grafic în figura 78.

Tabelul XXIX sunt prezentate datele obținute experimental la testul MTT pentru probele de citostatice versus control.

Numarul probei	Numele probei	% Proliferare celulara
1	Melphalan initial	10%
2	Melphalan epurat	72%
3	Doxorubicina initial	51%
4	Doxorubicina epurat	88%
5	Metotrexat initial	45%
6	Metotrexat epurat	91%
7	Ciclofosfamida initial	70%
8	Ciclofosfamida epurat	95%
9	Ifosfamida initial	22%
10	Ifosfamida epurat	73%
11	Control pozitiv citotoxic dimetilsulfoxid	4%
12	Control negativ necitotoxic Solutie PBS	100%

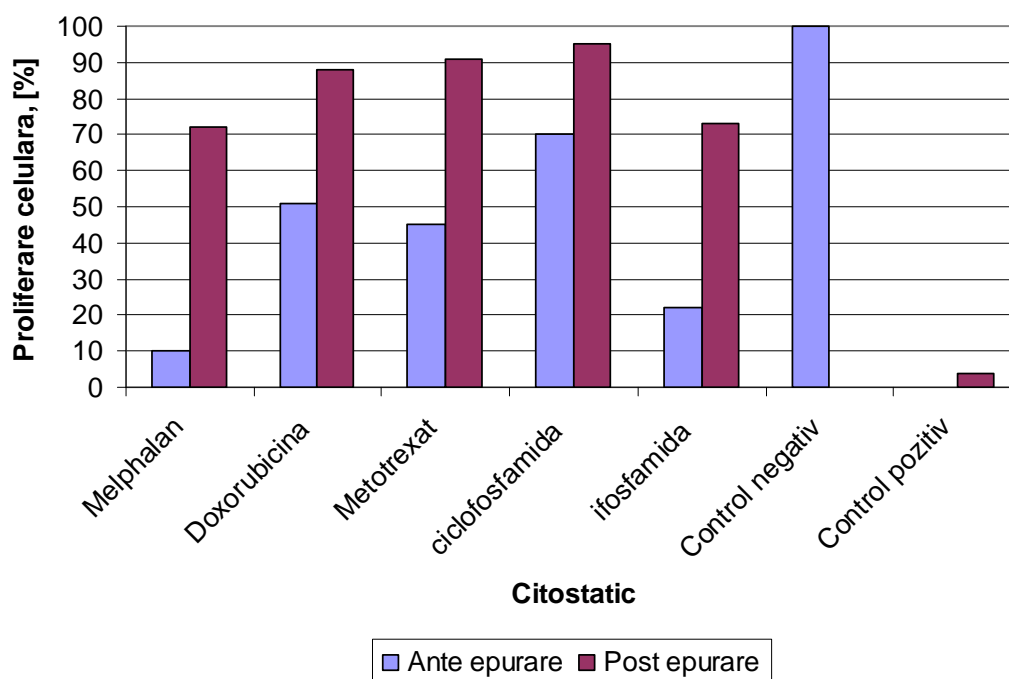


Figura 78. Testul MTT la citostatice versus control pozitiv și negativ.

### **6.5.3.2. Studii de citotoxicitate in vivo pe animale de laborator**

Toate experimentele pe animal s-au făcut cu avizul Comisiei de Bioetică a Universității de Medicină și Farmacie „V. Babeș” Timișoara și cu respectarea normelor legislative în vigoare – Convenția Europeană pentru protecția animalelor vertebrate folosite în experimente sau alte scopuri științifice Strassbourg Franța 1986.

Studiile pe animalele de laborator (șobolani) deși sunt mai complexe, oferă mai multe informații legate de fenomenul de citotoxicitate produs de agenții terapeutici antitumorali deoarece aceștia vor acționa într-un mediu biologic complet, în care intervine și metabolismul organismului receptor, ceea ce nu se poate realiza pe culturi de celule izolate [165-168].

Pentru determinările experimentale s-au folosit șobolani rasa Sprague-Dawley tineri cu greutatea medie de 80-90 g [169].

Animalele provin de la biobaza Universității de Medicină și Farmacie „V. Babeș” Timișoara. Animalele au beneficiat pe tot timpul experimentului de următoarele condiții:

- Ritm lumină – întuneric: 12 – 12 ore
- Temperatură constantă de 22+/-1°C
- Umiditate între 50 – 70%
- Hrana granulată specială produsă de Institutul National de Cercetare-Dezvoltare pentru Microbiologie și Imunologie „Cantacuzino” Bucuresti – ad libitum.
- Apă – ad libitum.

#### **Protocol de lucru:**

S-au administrat probele cu conținut citostatic, respectiv cele epurate, după ce în prealabil au fost prelucrate după tehnica descrisă mai sus și s-a urmărit evoluția numărului de leucocite circulante din sângele periferic înainte de administrarea probelor test (ziua zero), respectiv în ziua a – opt – a postadministrare. În paralel s-a studiat și efectul produs de administrarea solventului (soluția de clorură de sodiu 5%) – controlul negativ. Datorită variabilității individuale care apare inevitabil, pentru fiecare probă testată s-au folosit trei animale, iar rezultatul final este media celor trei valori obținute.

Cu 12 ore înainte de experiment animalelor le-a fost suspendat aportul de hrană și apă în vederea inducerii în condiții sigure a anesteziei generale. [170] Animalului anesteziat i se prelevează o probă de sânge în vederea determinărilor de laborator după care i se administrează proba de testat intraperitoneal.

Anestezia animalului s-a făcut inhalator cu un agent anestezic volatil: sevofluran. După inducție, care a fost făcută cu sevofluran 8% în oxigen, animalul a fost intubat orotraheal cu ajutorul unui laringoscop de concepție proprie și ventilat mecanic cu un ventilator elaborat, proiectat și realizat de către autorul prezentei lucrări. Menținerea anesteziei pe tot parcursul prelevării probei de sânge și a injectării substanței de testat s-a făcut tot inhalator cu sevofluran 3,5% în oxigen livrat prin intermediul ventilatorului mecanic. Acest tip de anestezie asigură un grad foarte bun de analgezie și hipnoză precum și trezirea rapidă a animalului la sfârșitul procedurii [171-175].

Recoltarea probei de sânge s-a făcut prin abordul venei femurale. După pregătirea tegumentului, s-a practicat o incizie de 1 cm în regiunea inghinală stângă, iar după disecția țesutului celular subcutanat s-a reperat pachetul vasculo-nervos femural și cu o seringă de insulină cu ac atraumatic s-a puncționat vena femurală recoltându-se 1 ml sânge venos care a fost trecut imediat într-un tub special pentru determinări hematologice care conține EDTA drept anticoagulant. După hemostază, plaga chirurgicală a fost suturată cu fir nerezorbabil de Prolene 5.0 cu ac atraumatic.

Numărul de leucocite a fost determinat cu ajutorul unui analizor automat de hematologie de tip Sysmex 1800.

În ziua a 8 – a s-a recoltat o nouă probă de sânge prin aceeași tehnică și s-a repetat determinarea numărului de leucocite pentru fiecare animal în parte.

Dozele de citostatice administrate au fost următoarele (valori medii):

- Melphalan: 5,6 mg/Kg corp
- Doxorubicină: 3,2 mg/Kg corp
- Metotrexat: 70,5 mg/Kg corp
- Ciclofosamidă: 33, 4 mg/Kg corp
- Ifosfamidă: 56,2 mg/Kg corp

### Rezultate experimentale:

Valorile medii ale numărului de leucocite obținute pentru fiecare probă în parte sunt prezentate în tabelul XXX.

Tabel XXX. Numărul de leucocite pentru probele de citostatice pre și post epurare.

	Număr de leucocite (ziua zero) (valori medii)	Număr de leucocite (ziua opt) (valori medii)
Melphalan inițial	10700	4500
Melphalan epurat	11200	13500
Doxorubicina inițial	13700	6800
Doxorubicina epurat	11600	10500
Metotrexat inițial	12900	5200
Metotrexat epurat	14200	13500
Ciclofosfamida inițial	12500	8900
Ciclofosfamida epurat	10200	10900
Ifosfamida inițial	13400	6500
Ifosfamida epurat	10700	12400
NaCl 5%	11800	12300

Din datele prezentate se observă că animalele tratate cu probele de citostatice neepurate au un număr semnificativ mai redus de leucocite comparativ cu cele care au primit produșii rezultați în urma epurării electrochimice. (figura 79)



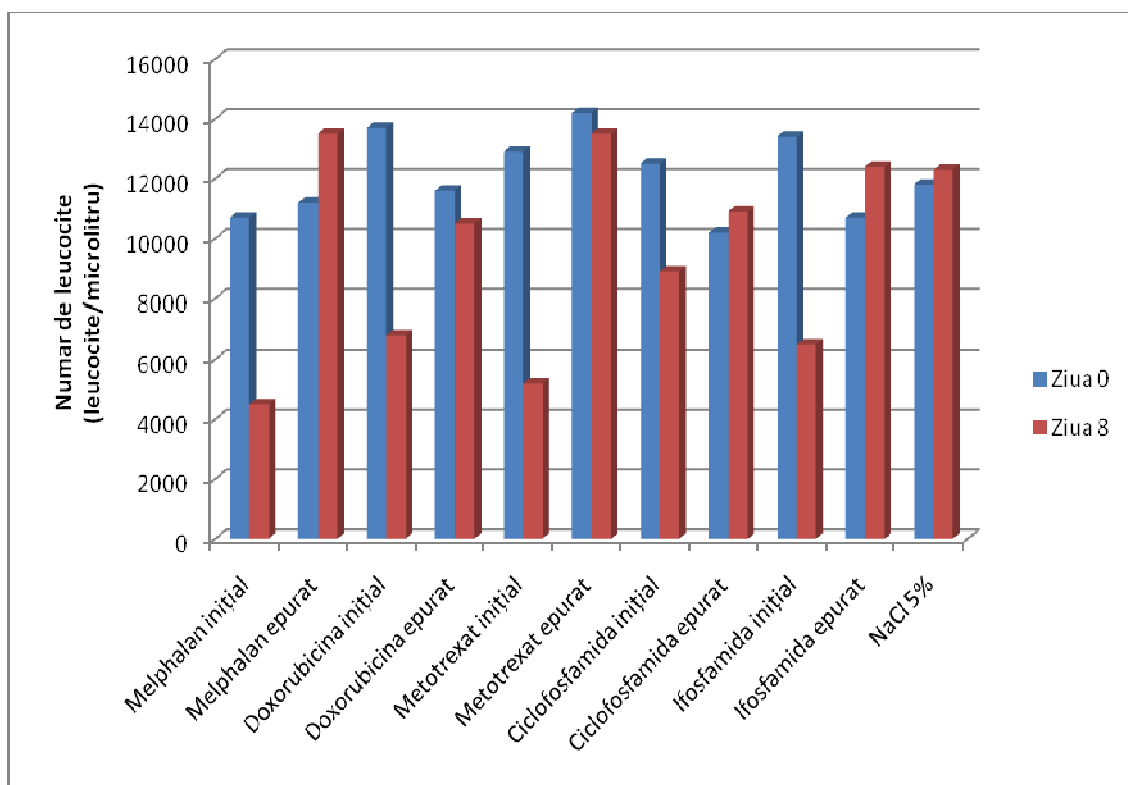


Figura 79. Evoluția numărului de leucocite funcție de citostaticul administrat, respectiv ziua determinării acestuia.

## Lista reactivilor folosiți pentru determinările experimentale

Următoarea listă conține reactivii folosiți pentru determinările experimentale din prezenta lucrare precum și proveniența acestora:

- Clorură de sodiu – Reactivul București
- Metil-orange - Fluka
- Acid sulfuric– Reactivul București
- Tiosulfat de sodiu– Reactivul București
- Hidroxid de sodiu – Sigma Aldrich
- Carbonat de potasiu– Reactivul București
- Apă pentru HPLC– Sigma Aldrich
- Acetonitril– Sigma Aldrich

- Fosfat de potasiu dibazic– Sigma Aldrich
- Fosfat de potasiu monobazic- Fluka
- Diclorometan– Sigma Aldrich
- Cloroform – Chimopar S.A.
- Etanol absolut– Sigma Aldrich
- Melphalan– Sigma Aldrich
- Doxorubicină – Actavis
- Metotrexat– Sigma Aldrich
- Ciclofosamidă– Sigma Aldrich
- Ifosamidă - Baxter
- Tampon PBS – Promo Cell
- RPMI 1640– Promo Cell
- L-glutamină pentru culturi celulare– Promo Cell
- Ser fetal de vițel (FCS)
- Solutie de penicilină și streptomycină pentru culturi celulare– Promo Cell
- Kit de citotoxicitate MTT– Sigma Aldrich

## **Concluzii generale ale studiului**

Este cunoscut faptul că medicamentele antineoplazice, cunoscute sub denumirea generică de citostatice, au pe lângă activitatea antitumorală, o serie de efecte adverse deloc neglijabile printre care se numără proprietățile teratogene, mutagene și nu de puține ori chiar oncogeneza. Aceste efecte nedorite apar cel mai frecvent la pacienții care beneficiază de un astfel de tratament, însă nu trebuie omis faptul că prin eliminarea lor în mediul înconjurător odată cu deșeurile provenite de la acești pacienți, precum și cantitățile de medicamente rămase neutilizate, se vor acumula în mediul înconjurător, producând profunde alterări ale ecosistemelor.

Tehnicile electrochimice de epurare a deșeurilor citotoxice oferă o serie de avantaje distincte față de cele uzuale cum este incinerarea.

Tinând cont de faptul că activitatea medicală, atât cea de diagnostic cât și în special cea de tratament, expune zi de zi atmosfera, apele și solul la acțiunea unor substanțe care în cantități mici nu au un efect poluant evident, dar care se acumulează în timp și pot duce la adevărate dezastre ecologice, în prezenta lucrare ne-am propus să efectuăm o serie de studii referitoare la posibilitatea epurării reziduurilor (urina) provenite de la pacienții care au beneficiat de tratamente oncologice chimioterapice.

În acest sens în lucrare s-a elaborat, proiectat și realizat o microinstalație experimentală care să permită epurarea deșeurilor citostatice rezultate din activitatea medicală oncologică.

Studiile abordate în lucrare au un caracter interdisciplinar pentru care s-a făcut apel la mai multe domenii ale științei cum ar fi: chimie organică, medicină, farmacie, inginerie chimică, automatizări, informatică, matematică statistică, modelare matematică, precum și la utilizarea unor programe de calcul specifice: Microsoft Office 2003, Statistica 6, C++.

**Analizând cu atenție conținutul lucrării se poate aprecia că obiectivele propuse au fost în totalitate atinse și îndeplinite, după cum urmează:**

**1. Realizarea unei documentații bibliografice cu privire la nivelul actual al cunoașterii în domeniul epurării deșeurilor citostatice rezultate din activitatea medicală oncologică.**

Obiectivul a fost realizat prin studierea unui număr mare de referințe bibliografice de actualitate din țară și străinătate inclusiv cele proprii. S-au prezentat diverse tehnologii de epurare a deșeurilor citostatice, insistând asupra celor electrochimice cu referire mai ales la reactoarele electrochimice cu densități de curent asimetrice.

**2. Elaborarea, proiectarea și realizarea unei microinstalații experimentale care să permită epurarea deșeurilor citotoxice rezultate din activitatea medicală oncologică.**

Microinstalația experimentală construită este alcătuită din trei părți componente distincte montate pe un șasiu comun:

- sistemul de pregătire a probei,
- microreactorul electrochimic,

- sistemul de automatizare.

Fiecare din aceste părți are în componență mai multe subansamble. Atât sistemul de pregătire a probei cât și microreactorul electrochimic sunt controlate de către sistemul de automatizare care include și calculatorul de proces. Trebuie menționat că întreaga microinstalație poate fi comandată atât de către calculatorul de proces cât și direct de către operator prin intermediul comenzilor manuale.

Este de menționat faptul că anumite elemente constructive ale părților componente sunt de concepție proprie și anume:

- Vasul de amestecare al probei cu soluția de sare,
- Microreactorul electrochimic,
- Unele module ale sistemului de automatizare: sursa de alimentare a microreactorului electrochimic, sursa de alimentare a reguletoarelor electronice, reguletorul discontinuu de nivel al vasului de amestecare, etajele de comandă ale pompelor peristaltice și electrovalvelor.

### **3. Testarea microinstalației și prelucrarea matematică a datelor experimentale obținute prin determinări complexe fizico-chimice și de citotoxicitate.**

Funcționarea microinstalației experimentale a fost testată în privința următoarelor aspecte:

- Producția de clor liber în cursul electrolizei unor soluții de clorură de sodiu cu diverse concentrații în limitele 0 – 10 g/ dl.
- Eficiența epurării unor ape reziduale sintetice cu conținut de substanțe citostatice în diverse concentrații prin metode fizico-chimice.
- Propunerea unor mecanisme teoretice care să explice degradarea citostaticelor luate în studiu, în condițiile din reactorul electrochimic.
- Eficiența epurării unor ape reziduale reale (urină provenită de la pacienții care au urmat diverse tratamente chimioterapice) prin metode fizico-chimice.

- Analiza prin metode biologice a produșilor rezultați în urma epurării (efluentul de la microreactorul electrochimic) în vederea determinării citotoxicității reziduale.

Aspectele menționate au fost studiate pe baza datelor experimentale obținute la testarea instalației experimentale în cazul epurării apelor reziduale sintetice și reale (urină) cu conținut de substanțe citostatice: melphalan, doxorubicină, metotrexat, ciclofosfamidă și ifosfamidă.

Prin modul original de concepție al microinstalației experimentale, sunt favorizate reacțiile de interes: oxidarea electrochimică la anod și oxidarea chimică în masa de reacție prin speciile reactive ale clorului liber. Aceste mecanisme combinate duc la degradarea avansată a agenților citostatici.

Determinările experimentale au arătat ca unele dintre substanțele citostatice luate în studiu sunt foarte sensibile la oxidare, degradându-se foarte repede, pe când altele se degradează greu (figura 80). Din acest considerent s-a ales ca durata procesului de epurare să fie 90 de minute pentru toate probele.

Toate probele supuse epurării au fost analizate cromatografic, respectiv fluorimetric pentru dozarea compușilor de interes precum și pentru urmărirea procesului de degradare a acestora.

În vederea acestor determinări, toate probele recoltate în cursul desfășurării procesului de electroliză precum și la sfârșitul acestuia au fost tratate corespunzător pentru neutralizarea clorului liber rezidual, astfel încât să fie evitată orice degradare a substanțelor din momentul prelevării din microreactorul electrochimic și până în momentul analizei.

În cadrul determinărilor experimentale s-au măsurat concentrațiile substanțelor citotoxice utilizate la testarea microinstalației experimentale înainte de inițierea procesului de epurare, în decursul acestuia la diferite intervale de timp și la final.

Rezultatele obținute prin analiza și interpretarea cromatogramelor sunt prezentate în tabelele corespunzătoare fiecărei substanțe citostatice în parte.

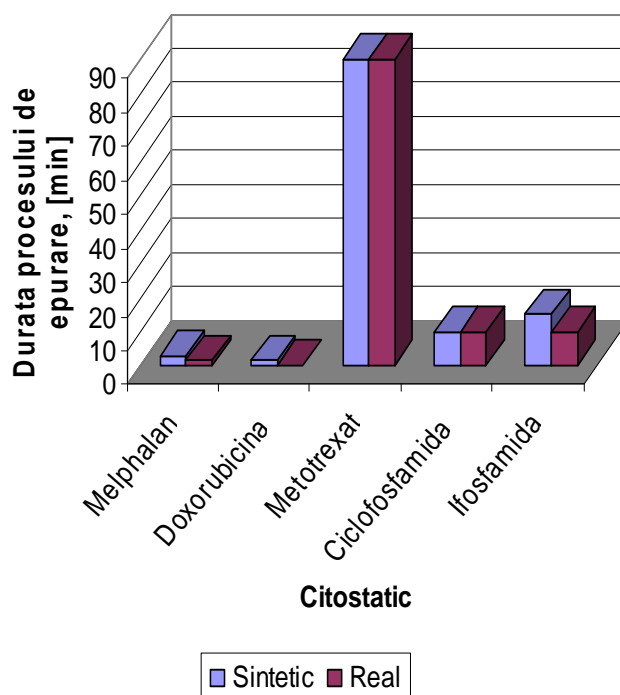


Figura 80. Viteza de degradare a compușilor citostatici luați în studiu

#### 4. Determinarea prin calcul a indicatorilor de performanță, care reflectă eficiența epurării efectuate în microinstalația experimentală.

În cadrul lucrării, drept indicator principal de performanță al microinstalației experimentale s-a adoptat „randamentul de epurare” care a fost definit ca raportul dintre concentrația finală și cea inițială (de referință) a agentului citostatic folosit, raportat procentual.

În tabelul XXXI sunt prezentate valorile randamentelor de epurare pentru cele cinci substanțe citostatice folosite la testarea microinstalației experimentale.

Tabel XXXI. Randamentul de epurare al citostaticelor

	Melphalan	Doxorubicină	Metotrexat	Ciclofosfamidă	Ifosfamidă
Randament de epurare ape sintetice (%)	99,93	99,7	99	99,7	99,9

	Melphalan	Doxorubicină	Metotrexat	Ciclofosamidă	Ifosamidă
Randament de epurare ape reale (urină) (%)	99,82	93,99	98,5	98,8	99,4

Din tabel se observă că randamentele de epurare au valori ridicate ceea ce confirmă faptul că instalația funcționează în condiții bune și în consecință procesul de epurare se desfășoară normal.

#### **5. Analiza prin metode biologice a produselor rezultate în urma epurării, în vederea determinării citotoxicității reziduale.**

După încheierea epurării probele au fost analizate din punct de vedere al citotoxicității prin determinări „in vitro” pe culturi de celule și „in vivo” pe animale de laborator, comparativ cu probele neepurate.

Atât determinările efectuate pe culturi de celule cât și cele pe animale de laborator confirmă rezultatele obținute prin determinările fizico-chimice (concentrațiile citostaticelor).

Citotoxicitatea efluenților epurați este semnificativ redusă în raport cu citotoxicitatea probelor inițiale.

#### **6. Elaborarea unei teorii proprii cu privire la modul în care are loc mecanismul de degradare prin oxidare electrochimică a substanțelor citostatice care au fost utilizate la testarea microinstalației.**

Pentru fiecare agent citostatic în parte s-a elaborat o schemă principială a mecanismului de degradare prin oxidare electrochimică. S-a pornit de la premisa că citostaticul supus epurării se va degrada până la dioxid de carbon și apă +/- amoniac (în cazul prezenței azotului în molecula respectivă). Această degradare se desfășoară cu generarea unor compuși intermediari potențial citotoxici care sunt dificil de pus în evidență în condițiile de desfășurare ale experimentelor.

***Ca atare se poate considera că microinstalația de epurare realizată prezintă o serie de avantaje deosebite cum ar fi: gabarit redus, performanțe funcționale bune, randament de epurare ridicat. Aceste avantaje recomandă utilizarea principiilor și conceptelor care au stat la baza elaborării microinstalației prezentate, la realizarea unor instalații de dimensiuni adecvate instituțiilor sanitare cu profil oncologic.***

## **Contribuții personale**

1. Realizarea unei documentări bibliografice cu privire la tehnologiile și reactoarele electrochimice utilizate la epurarea substanțelor poluante.
2. Realizarea unei documentări bibliografice sintetice asupra tehnicilor de modelare matematică, automatizare și optimizare, cu particularizare pentru tehnologiile și instalațiile de epurare a substanțelor poluante.
3. Proiectarea și construirea unei microinstalații experimentale, de concepție proprie pentru epurarea deșeurilor citostatice provenite din activitatea medicală oncologică.
4. Adaptarea metodei titrimetrice uzuale de dozare a clorului liber pentru determinări microanalitice.
5. Prelucrarea datelor experimentale cu programe de calcul specifice și stabilirea unor metodologii și a unor algoritmi de calcul acceptabili pentru determinarea modelelor matematice care descriu diferitele dependențe între concentrațiile de substanțe citostatice și timp.
6. Prepararea unor probe sintetice de referință cu compoziție bine cunoscută și elaborarea modelelor matematice pentru variația concentrației de substanță citostatică în acestea în cursul epurării electrochimice prin determinări fizico-chimice succesive.
7. Testarea și validarea modelelor matematice propuse în raport cu probele reale de urină provenite de la pacienții tratați cu respectivele substanțe citostatice.



8. Testarea efluenților rezultați în urma epurării agenților citostatici pe culturi de celule și animale de laborator în vederea determinării citotoxicității reziduale.
9. Pe baza cercetarilor efectuate se constată că microinstalația experimentală de epurare a deșeurilor citostatice a cărei funcționare a fost studiată în cadrul lucrării prezintă performanțe foarte bune sub aspectul randamentelor de epurare.

### **Articole publicate sub semnatura proprie din domeniul de studiu al tezei de doctorat în jurnale cotate ISI:**

1. **Valentin Ordodi**, Gabriela-Alina Dumitrel, Alexandra Gruia, Mihai Iacob, Aurel Felix Mic, Gheorghita Jinescu, Delia Perju., Electrochemical micro-installation for cytostatic waste depuration, Revista de chimie 2010 – in press.
2. **Ordodi LV**, Păunescu V, Mic AA, Ionac M, Săndesc D, Mic FA. *A small scale oxygenator for cardiopulmonary bypass in rats*. The international Journal of Artificial Organs 2006, 29(8).
3. **Ordodi LV**, Mic AF, Mic AA, Săndesc D, Păunescu V. *A simple device for intubation of rats*. Lab Animal 2005; 34(8).
4. **Ordodi LV**, Paunescu V, Mic AA, Gabor L, Ionac M, Toma O, Săndesc D, Mic FA., *A Pressure Controlled Rat Ventilator with Electronically Preset Respirations*. Artificial Organs 2006; 30(2).
5. Nicoleta G Hadaruga, Daniel I Hadaruga, Virgil Paunescu, Calin Tatu, **Valentin L Ordodi**, Geza Bandur, Alfa X Lupea. *Thermal stability of the linoleic acid/alpha and beta cyclodextrin complexes*. Food Chemistry, September 2005, 99, 500–508.
6. Nikola M. Pavlovic, William H. Orem, Calin A. Tatu, Harry E. Lerch, Joseph E. Bunnell, Gerald L. Feder, Emina N. Kostic and **Valentin L. Ordodi**. *The Role of Lecithin Cholesterol Acyltransferase and Organic Substances from Coal in the Etiology of Balkan Endemic Nephropathy: A New Hypothesis*. Food and chemical toxicology, 2008; 46, 949–954

7. Daniel I. Hădărugă, Nicoleta G. Hădărugă, Geza N. Bandur, Adrian Riviş, Corina Costescu, **Valentin L. Ordodi**, Aurel Ardelean, *Berberis vulgaris* extract/ $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles: synthesis and characterization, Revista de chimie 2010 – in press.

## Bibliografie:

1. Mihai Olteanu, *În actualitate Gestionarea Deșeurilor*, Univers Ingineresc nr.8/2004, Editura AGIR, 2004.
2. N.N. Antonescu, Nicolae Antonescu, Dan-Paul Stănescu, Lelia Letiția Popescu, *Gestiunea și tratarea deșeurilor urbane. Gestiunea regională*, Ed. MatrixRom, București, 2006.
3. Guvernul României, *HOTĂRÂRE nr. 856 din 16 august 2002 privind evidența gestiunii deșeurilor și pentru aprobarea listei cuprinzând deșeurile, inclusiv deșeurile periculoase*, Monitorul Oficial nr. 659/5 septembrie 2002.
4. Guvernul României, *Ordonanță de urgență nr. 78 din 16/06/2000 privind regimul deșeurilor*, Monitorul Oficial, Partea I nr. 283 din 22/06/2000.
5. Ministerul Mediului și Gospodăririi Apelor, *Normativ tehnic privind incinerarea deșeurilor, Normativ din 26.11.2004*, Monitorul Oficial, Partea I, nr. 86Bis din 26.01.2005.
6. Stefanie Hellweg, Thomas b. Hofstetter Konrad Hungerbühler: *Modeling waste incineration for life-cycle inventory analysis in Switzerland*, Environmental Modeling and Assesment, Editura Kluwer Academic Publishers, 2001.
7. K.Rajeshwar, J.G. Ibanez. *Environmental Electrochemistry, Fundamentals and Application in Pollution Abatement*, New York, 1997
8. Derek Pletcher and Frank C. Walsh, *Industrial Electrochemistry*, Second Edition, 2000.
9. Sequeira C.A.C., *Environmental Oriented Electrochemistry, Studies in Environmental Science*, 59, Elsevier, Amserdam-London-New York-Tokyo, 1994
10. Nicolae Mirica, Ana Dragos, Marius Mirica, *Metode electrochimice de recuperare a ionilor metalici din solutii*, Editura Mirton, Timisoara. 2006.
11. Claudia Maria Simonescu, *Epurarea biologica a apelor uzate*, Editura Matrix Rom Bucuresti 2009.

12. Marius Constantin Mirica, Mircea Preda, Nicolae Mirica, *Teoria reactoarelor electrochimice cu densitati de curent asimetrice*, Editura Mirton, Timisoara. 2006.
13. Antropov, Lev Ivanovici, *Theoretical Electrochemistry*, University Press of the Pacific, Honolulu Hawaii, 2001.
14. Rubinstein, Israel, *Physical Electrochemistry. Principles, Methods and Application*, Marcel Dekker Inc, New York 1995.
15. Brett, Christopher M.A., Brett Ana Maria Oliveira, *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press Inc., New York, 1998.
16. Kunisha Yoshida, *Electrooxidation in Organic Chemistry*, Krieger Publishing Company, Malabar Florida 1993.
17. Tatsuya Shono, *Electroorganic Synthesis*, Academic Press, London, New York, 1991.
18. D. Pletcher, F.C. Walsh, *Industrial Electrochemistry*, Chapman and Hall, London 1990.
19. D. J. Pickett, *Electrochemical reactor design*, Elsevier, Amsterdam, 1979.
20. N. Mirica, *Intensificarea proceselor de electrod prin deplasarea relativa electrod-electrolit la oxidarea electrochimica a manganatului de potasiu la permanganat*, Teza de doctorat, Cluj-Napoca, 1985.
21. M.C. Mirica, *Reactoare electrochimice cu densitati de curent asimetrice*, Teza de doctorat, Craiova, 2005.
22. N. Mirica, M.C. Mirica, *Stabilirea functiei de corelare a randamentului energetic cu parametrii constructivi ai reactoarelor electrochimice necompartimentate*, Sesiunea de Comunicari Stiintifice, Oradea, 2000.
23. K. Winnaker, L.Kucher, *Tehnologie chimica anorganica*, Editura Tehnica Bucuresti, 1962.
24. A. Regner, *Technica elektrochemie*, 1, Naklad Ceskoslov. Akad, Ved., Praha, 1967.
25. B. M. Carrus – Patent US No. 2.908.620 (13.10.1959).
26. M. Allan, *Predarea tehnicilor de spectroscopie electronica*, J. Chem.Educ, 1987

27. D. A. Ramsay, *Spectroscopie moleculara*, Encyclopedia of Applied Physics, New York, 1994.
28. O. Sorkhabi, W.M. Jackson and I. Daizadeh, *Spectroscopie comentata*, J.Chem. Educ, 1998.
29. Iuliu Pogany, Mircea Banciu, *Metode fizice in chimia organica*, Editura Stiintifica, Bucuresti, 1972.
30. G.L. Clark, *The encycloepdia of spectroscopy*, Reinhold, New York, 1960
31. P.F. Bernath, *Spectra of atoms and molecules*, Oxford University Press, New York, 1995.
32. C.R. Brundle and A. D. Baker, *Electron spectroscopy: theory, techniques and applications*, Vol 1-4 Academic Press, London, 1977
33. J. W. Robinson, *Practical handbook of spectroscopy*. CRC Press, Boca Raton, 1991.
34. Mihai Ionica, *Metode optoelectronice pentru determinarea xenobioticelor incriminate in intoxicatiile acute sau in contaminarea populatiei si personalul implicat in procesele industriale*, Teza de doctorat, Bucuresti, 2009.
35. R. Drago, *Physical methods for chemists*, Saunders, Philadelphia, 1992.
36. J.M.Hollas, *Modern spectroscopy*, Wiley New York, 1998.
37. J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer/Plenum, New York 1999.
38. Ionel Ciucanu, *Metode fizico-chimice in analiza chimica instrumentala*, Editura Mirton Timisoara, 1996.
39. Stahl E., *Thin layer Cromatography*, Springer Verlag, Berlin 1965
40. Snyder, L.R., *Principles of Adsorbtion Cromatography*, Marcel Dekker, New York, 1968.
41. Sargent, J.R., George S.G., *Methods in Zone Electrophoresis*, BDH Chemicals Poole, 1975
42. Zlatkis A., Kaiser R.E., *High Performance Thin Layer Cromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1977.
43. P.J. Baugh, *Gas Cromatography. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1993

44. Jonsson, J.A., *Cromatographic Theory and Basic Principles*. Cromatographic science series, Marcel Dekker, New York, 1987.
45. McNair H., Bonelli E., *Basic Gas Cromatography*, 3-rd Edition Varian Palo Alto, 1969.
46. Nicoleta G Hadaruga, Daniel I Hadaruga, Virgil Paunescu, Calin Tatu, **Valentin L Ordodi**, Geza Bandur, Alfa X Lupea. *Thermal stability of the linoleic acid/alpha and beta cyclodextrin complexes*. Food Chemistry, September 2005.
47. Grob K., *On-column injection in capillary gas cromatography*, Huething Verlag, Heidelberg 1991.
48. Grob K., *Making and manipulating capillary columns for gas cromatography*, Huething Verlag, Heidelberg 1986.
49. Clement R. E., *Gas Cromatography. Biochemical, biomedical and clinical applications*. J.Wiley and Sons, New York, 1990.
50. Schomburg G., *Gas Cromatography. A practical course*. VCH Weinheim, 1990.
51. Knox J.H., *High Performance Liquid Cromatography*, Edinburgh University press, 1978.
52. Kirkland J.J., Synder L.R., *Introduction to Modern Liquid Cromatography*, 2-nd Edition, J.Wiley and Sons, New York, 1979.
53. Nikola M. Pavlovic, William H. Orem, Calin A. Tatu, Harry E. Lerch, Joseph E. Bunnell, Gerald L. Feder, Emina N. Kostic and **Valentin L. Ordodi**. *The Role of Lecithin Cholesterol Acyltransferase and Organic Substances from Coal in the Etiology of Balkan Endemic Nephropathy: A New Hypothesis*. Food and chemical toxicology, 2008.
54. Daniel I. Hădărugă, Nicoleta G. Hădărugă, Geza N. Bandur, Adrian Riviș, Corina Costescu, **Valentin L. Ordodi**, Aurel Ardelean, *Berberis vulgaris extract/β-cyclodextrin nanoparticles: synthesis and characterization*, Revista de chimie 2010 – in press.
55. Florinel Badulescu, Victor Voicu, Laurentiu Pop, Adriana Badulescu, *Vademecum de chimioterapie antineoplazica*, Editura Medicala, Bucuresti, 1999.
56. Ghilezan N., *Oncologie Generala*, Editura Medicala, Bucuresti, 1982.
57. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01042>

58. <http://en.wikipedia.org/wiki/Melphalan>
59. \*\*\*\* Agenda medicala 2009.
60. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00997>
61. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00563>
62. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00531>
63. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01181>
64. Marinoiu V., Strătuță C., Petcu A., Pătrășcioiu C., Marinescu C., *Metode numerice aplicate în ingineria chimică*; Editura Tehnică, București, 1986.
65. Dima N. *Teoria erorilor și metoda celor mai mici pătrate*; Universitatea Tehnică Petroșani, 1992.
66. Puri G., *Metrologie generală*, Institutul Politehnic Traian Vuia, Timișoara, 1983.
67. Botez M., *Teoria erorilor și metoda celor mai mici pătrate*; Editura de Stat Didactică și Pedagogică, 1961.
68. Neagu C., Ioniță C., *Rețele neuronale. Teorie și aplicații în modelarea și simularea proceselor și sistemelor de producție*; Editura Matrix Rom, București, 2004.
69. Ciocârdia C., Ungureanu I., *Bazele cercetării experimentale în tehnologia construcțiilor de mașini*; Editura Didactică și Pedagogică, București, 1979.
70. Perju Delia, Todinca T., *Automatizarea utilajului tehnologic în industria chimică*; Institutul Politehnic „Traian Vuia”, Timișoara, 1986.
71. Perju Delia, *Analizoare automate de gaze – Referat documentar*, IPT; Timișoara, 1974.
72. Crișan S., Ignea A., *Măsurări și traductoare; Vol 1*, Lito UTT, Timișoara, 1993.
73. Savu T., *Sisteme computerizate pentru achiziția de date. Îndrumar de laborator*, 1999.
74. Ceaușescu D., Chiriac A. – *Intervale de încredere. Precizia măsurărilor*; Editura Mirton, Timișoara, 2002.

75. Davidescu Arjana – *Metrologie generală*; Editura Politehnica, Timișoara, 2001.
76. Puri G., Pugna A. – *Metrologie generală*; Centrul de multiplicare al Institutului Politehnic „Traian Vuia”, Timișoara, 1990.
77. Tiron M. – *Teoria erorilor de măsurare și metoda celor mai mici pătrate*; Editura Tehnică, București, 1972.
78. Nichici A., Cicală E., Mee R. – *Prelucrarea datelor experimentale. Curs și aplicații*; Centrul de multiplicare, Timișoara, 1996.
79. Jun Hirose, Fumitake Kondo, Takashi Nakano, Toyohide Kobayashi, Naoki Hiro, Yoko Ando, Hiroshi Takenaka, Kouichi Sano, *Inactivation of antineoplastics in clinical wastewater by electrolysis*, Chemosphere 60 (2005) 1018–1024.
80. **Valentin Ordodi**, Gabriela-Alina Dumitrel, Alexandra Gruia, Mihai Iacob, Aurel Felix Mic, Gheorghita Jinescu, Delia Perju., *Electrochemical micro-installation for cytostatic waste depuration*, Revista de chimie 2010 – in press.
81. Savu T. – *Sisteme computerizate pentru achiziția de date*. Îndrumar de laborator; 1999.
82. Șuta M. – *Sisteme analog numerice utilizate la măsurarea PH-ului*; Editura Politehnica, Timișoara, 2001.
83. Vasile Pode, *Procese hidrodinamice*, Editura Politehnica, Timisoara 2001.
84. Anton V., Popoviciu M., Fitero I., *Hidraulica si masini hidraulice*, Editura Didactica si Pedagogica Bucuresti, 1978.
85. Jinescu G., *Procese hidrodinamice si utilaje specifice in industria chimica*, Editura Didactica si Pedagogica Bucuresti, 1983.
86. Gropsian Z., Medeleanu M., Kohn D., *Fenomene de transfer si utilaje in industria chimica*, Institutul Politehnic “Traian Vuia” Timisoara 1985.
87. Rasanescu I., *Fenomene de transfer*, Editura Didactica si Pedagogica Bucuresti, 1984.
88. Curievici I., *Automatizari in industria chimica*, Editura Didactica si Pedagogica Bucuresti, 1983.
89. Dumitrescu S., *Aparate de masura si automatizari in petrol si petrochimie*, Editura Didactica si Pedagogica Bucuresti, 1983.



90. Perju D, Todincă T. *Automatizarea Proceselor Chimice*. Partea a II-a. Universitatea Politehnică « Traian Vuia » Timișoara, 1995.
91. Perju D, Suta M, Geantă M Rusnac C. *Automatizarea Proceselor Chimice*. Partea I. Ed. Mirton, Timișoara, 1998.
92. M.C.Mirica, A.Dragos, M.Preda, N.Mirica, *Optimizarea fazei de electroliza la electrosinteza ferocianurii de potasiu in reactoare necompartimentate*, Simpozionul National de Electrochimie aplicata, Editia a-III-a Septembrie 2003 Timisoara.
93. M.C.Mirica, M.Preda, N.Mirica, *Modalitate de calcul al parametrilor constructivi ai unui reactor pentru oxidarea electrochimica a ferocianurii de potasiu la ferocianura de potasiu*, A-XXVIII-a Conferinta Nationala de Chimie, 6-8 octombrie 2004, Calimanesti-Caciulata.
94. Gyulai F., *Pompe, ventilatoare, compresoare*, Vol I si II. Institutul Politehnic "Traian Vuia" Timisoara 1988.
95. Ioan C. Bacivarof, *Conexiuni prin lipire in aparatura electronica*, Editura tehnica Bucuresti, 1984.
96. \*\*\*222 *scheme de radiotehnica, electronica industrială si reglare automata*, Vol I si II, Editura tehnica Bucuresti, 1973
97. D. Dascalu, L. Turic, I. Hoffman, *Circuite electronice*, Editura Didactica si Pedagogica Bucuresti, 1981.
98. Ristea I., Popescu C., *Stabilizatoare de tensiune*, Editura Tehnica, Bucuresti, 1983
99. Simion E., Miron C., Festila Lelia, *Montaje electronice cu circuite integrate*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1986
100. [www.national.com/mpf/LM/LM350.html#Overview](http://www.national.com/mpf/LM/LM350.html#Overview)
101. Nowichi, J.R., *Power supplies for electronic equipment*, London, 1971.
102. Savescu M., *Circuite electronice*, Vol I si II, Editura Tehnica Bucuresti, 1969
103. Rapeanu R., *Circuite integrate analogice*. Catalog, Editura Tehnica Bucuresti, 1983
104. [http://www.datasheetcatalog.com/datasheets\\_pdf/7/8/1/2/7812.shtml](http://www.datasheetcatalog.com/datasheets_pdf/7/8/1/2/7812.shtml)

105. [http://www.datasheetcatalog.com/datasheets\\_pdf/7/8/0/5/7805.shtml](http://www.datasheetcatalog.com/datasheets_pdf/7/8/0/5/7805.shtml)
106. [http://www.datasheet4u.com/html/7/9/1/7912\\_SemiconductorsLTD.pdf.html](http://www.datasheet4u.com/html/7/9/1/7912_SemiconductorsLTD.pdf.html)
107. <http://www.national.com/ds/LM/LM117.pdf>
108. Mitrofan Gh., *Generatoare de impulsuri si de tensiune liniar variabila*, Editura Tehnica Bucuresti, 1980.
109. Costea I., *Oscilatoare de audiofrecventa, Teorie si Aplicatii*, Institutul Politehnic Bucuresti, 1979.
110. <http://www.oup.com/us/pdf/microcircuits/students/amps/ua741philip.pdf>
111. Ciugudean M., *Proiectarea unor circuite electronice*, Editura Facla, Timisoara, 1983.
112. **Ordodi LV**, Păunescu V, Mic AA, Ionac M, Săndesc D, Mic FA. *A small scale oxygenator for cardiopulmonary bypass in rats*. The international Journal of Artificial Organs 2006, 29(8).
113. Traian Jurca, dan Stoicu, *Instrumentatie de masurare. Structuri si circuite*. Editura de vest, Timisoara, 1996
114. Perju Delia, *Automatizarea proceselor tehnologice in industria chimica*, IPT; Timișoara, 1981.
115. I.C.C.E., *Catalog de componente electronice*, Bucuresti, 1988
116. Vatasescu A., *Circuite cu semiconductoare in industrie. Amplificatoare si oscilatoare*. Editura Tehnica Bucuresti, 1971.
117. Maria Nemes, Nicolae Vaszilcsin, *Electrochimie. Lucrari practice*, Universitatea "Politehnica" Timisorara, 2001.
118. West J.M., *Basic Electrochemistry*, Van Nostrand reinhold Co, New York, 1973.
119. Oniciu L., Constantinescu E., *Electrochimie si coroziune*, Editura Didactica si Pedagogica, Bucuresti, 1982.
120. [www.labjack.com/u3](http://www.labjack.com/u3)
121. William B, *PC Interfacing, Communications and Windows Programming*, Addison-Wesley, England, 1999.

122. S.B. Jonnalagadda, S. Nadupalli, *Effluent treatment using electrochemically bleached seawater—oxidative degradation of pollutants*, *Talanta* 64 (2004) 18–22.
123. M.I. Kerwick, S.M. Reddy, A.H.L. Chamberlain, D.M. Holt, *Electrochemical disinfection, an environmentally acceptable method of drinking water disinfection?*, *Electrochimica Acta* 50 (2005) 5270–5277.
124. Daescu C., *Industria Medicamentelor*, editura Uni-Press 1999.
125. STAS 6364-61 Determinarea clorului rezidual.
126. Bucur C.M., Popeea C.A., Simion Gh., *Matematici speciale. Calcul numeric*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1983.
127. Todinca T., Geantă M., *Modelarea și simularea proceselor chimice. Aplicații în Matlab*, Editura Politehnica, Timișoara, 1999.
128. R.C. Moldovan, Delia Perju, M. Glevitzky, S. Marinescu, *Mathematical Modelling of the Static Behaviour of the Thermal Boundary Layer Flowmeter Operating with Variable Thermal Flow*, *Buletinul Universității Petrol-Gaze din Ploiești*, Vol. LVIII, Seria Tehnică, Nr. 1, Editura Universității Petrol-Gaze Ploiești, p. 75-78, 2006.
129. Tănăsescu Nasta, *Modelarea matematică și simularea numerică a proceselor tehnologice din industria alimentară*, Editura Matrix Rom, București, 2000.
130. Bradley J. Hernlem, *Electrolytic destruction of urea in dilute chloride solution using DSA electrodes in a recycled batch cell*, *Water Research* 39 (2005) 2245–2252.
131. Mineo Ikematsu, Kazuhiro Kaneda, Masahiro Iseki, Masashi Yasuda, *Electrochemical treatment of human urine for its storage and reuse as flush water*, *Science of the Total Environment* 382 (2007) 159–164.
132. Nenitescu C.D., *Chimie generala*, Editura Tehnica Bucuresti 1963.
133. **Valentin Ordodi**, Gabriela Alina Dumitrel, Alexandra Gruia, Mihai Iacob, Aurel Felix Mic, Andrada Oprisoni, Loredana Gib-Balint, Elena Gai, Delia Perju, *Waste Water treatment wich Contains*

- Melphalan Using an Electrochemical Reactor with Asymmetric Current Densities*, 2-nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Timisoara, May 27-29, 2010.
134. Michallet M, Philip T, Philip I, et al. *Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: Impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution*. *Exp Hematol* 2000, 28:858.
  135. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. *High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma*. *N Engl J Med* 2003; 348:1875.
  136. S. Hansel M. Castegnaro M. H. Sportouch M. De Meo J. C. Milhavet M. Laget G. Dumenil, *Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan*, *Int Arch Occup Environ Health* (1997) 69:109-114.
  137. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD et al. *Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86*. *Blood* 1994;84: 3122-3133
  138. Tubergen DG, Gilchrist GS, O'Brian RT., *Improved outcome with delayed intensification for children with acute lymphoblastic leukemia and intermediate presenting features: a Children's Cancer Group phase III trial*. *J Clin Oncol* 1993; 11: 527-537
  139. DeVita VT Jr, Serpick A, Carbone PP, *Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease*. *Ann Intern Med* 1970; 73: 881
  140. Yeu-Ming Wang, Erlinda Lantin, Wataru Sutow, *Methotrexate in blood, urine and cerebrospinal fluid, of children receiving high-doses by infusion*, *Clin Chem* 22/7 1053-1056 (1976).
  141. Jaroslav Chladek, Ji Grim, Jiina Martinkova, Marie Simkova, Jaroslava Vaniekova, Vira Koudelkova & Marie Noiekova, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low-dose methotrexate in the treatment of psoriasis*, Blackwell Science Ltd *Br J Clin Pharmacol*, 54, 147-156, 2002

142. Judith M. Dalrymple, Lisa K. Stamp, John L. O'Donnell, Peter T. Chapman, Mei Zhang, and Murray L. Barclay, *Pharmacokinetics of Oral Methotrexate in Patients With Rheumatoid Arthritis*, *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 58, No. 11, November 2008, pp 3299–3308 DOI 10.1002/art.24034
143. CharlesB. Pratt, DeWayneRoberts, EllenC. Shanks,and EllenL. Warmath, *Clinical Trials and Pharmacokinetics of Intermittent High Dose Methotrexate • Leucovorin Rescue • for Children with Malignant Tumors*, *CANCER RESEARCH* 34, 3326-3331, December 1974
144. Abdolhosein Moghbel, Ahmad Zand-Moghaddam, Saeid Rezaee, Mohamad Pedram, *High-Performance Liquid Chromatography Determination of Methotrexate in Plasma*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2003) 149-152.
145. Pavone V, Gaudio F, Guarini A, Perrone T, Zonno A, Curci P and Liso. *Mobilization of peripheral blood stem cells with high-dose cyclophosphamide or the DHAP regimen plus G-CSF in non-Hodgkin's lymphoma Bone Marrow*, *Transplantation* 2002; 29, 285-290.
146. A. Oprisoni, S. Arghirescu, C. Jinca, L. balint-Gib, A. Isac, **V. Ordodi**, M. Baica, G. Doros, M. Serban. *Multifactorial dependence of hematopoietic stem cell graft and its impact on the outcome of autologous hematopoietic stem cell transplantation*. 36-th Annual Meeting of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. Vienna, 21 – 24 March 2010, Vol 45, Suppl 2.
147. Wheeler C, Eickhoff C, Elias A, et al. *High-dose cyclophosphamide, carmustine, and etoposide with autologous transplantation in Hodgkin's disease: A prognostic model for treatment outcomes*. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997; 3:98.
148. William P. Petros, Gloria Broadwater, Donald Berry, Roy B. Jones, James J. Vredenburgh, Colleen J. Gilbert, John P. Gibbs, O. Michael Colvin, and William P. Peters, *Association of High-dose Cyclophosphamide, Cisplatin, and Carmustine Pharmacokinetics with Survival, Toxicity, and Dosing Weight in Patients with Primary Breast Cancer*, *Clinical Cancer Research* Vol. 8, 698–705, March 2002.

149. Rodney R. Larson, M. B. Khazaeli, and H. Kenneth Dillon, *Development of an HPLC Method for Simultaneous Analysis of Five Antineoplastic Agents*, Applied Occupational and Environmental Hygiene Volume 18(2): 109–119, 2003.
150. Hänel M, Kröger N, Sonnenberg S et al. *Busulfan, cyclophosphamide, and etoposide as high-dose conditioning regimen in patients with malignant lymphoma*. Ann Hematol, 2002;81:96-102
151. Aurlien E, Holte H, Pharo A et al. *Combination chemotherapy with mitoguazon, ifosfamide, MTX, etoposide (MIME) and G-CSF can efficiently mobilize PBPC in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma*. Bone Marrow Transplantation, 1998;21:873-878
152. Móciková H, Konířová E, Stríteský J, *Serious cutaneous toxicity following ifosfamide, gemcitabine and vinorelbine therapy in a patient with relapsed Hodgkin lymphoma and ichthyosis*, Cas Lek Cesk. 2009;148(9):434-7.
153. Park BB, Kim WS, Eom HS, Kim JS, Lee YY, Oh SJ, Lee DH, Suh C, *Salvage therapy with gemcitabine, ifosfamide, dexamethasone, and oxaliplatin (GIDOX) for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a consortium for improving survival of lymphoma (CISL) trial*, Invest New Drugs. 2009 Sep 16.
154. Nishimori H, Fujii N, Maeda Y, Matsuoka K, Takenaka K, Shinagawa K, Ikeda K, Matsuo K, Harada M, Tanimoto M., *Efficacy and feasibility of IDEA therapy for refractory or relapsed non-Hodgkin's lymphoma*, Anticancer Res. 2009 May;29(5):1749-54.
155. Doina Verdes, Ioana Muntean, Daniela Puscasiu, *Biologie celulara si moleculara*, Editura Eurobit, Timisoara, 2006
156. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc, New York, London, 2002.
157. Celis J.E., *Cell Biology. A Laboratory Handbook*, Vo I, II. Academic Press New York, 1994.
158. Cotruz C., Carmen Cotruz, Maria Kocsis, Ionescu C.R., *Manual de lucrari practice de biologie celulara*, Editura Tehnica, Chisineu, 1994.

159. Shavandi Z, Ghazanfari T, Moghaddam KN, *In vitro toxicity of silver nanoparticles on murine peritoneal macrophages*, Immunopharmacol Immunotoxicol. 2010 May 27.
160. Shi Y, Yadav S, Wang F, Wang H, *Endotoxin promotes adverse effects of amorphous silica nanoparticles on lung epithelial cells in vitro*, J Toxicol Environ Health A. 2010 Jan;73(11):748-56.
161. Kastl L, Brown I, Schofield AC, *Altered DNA methylation is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells*, Int J Oncol. 2010 May;36(5):1235-41.
162. Lünenbürger H, Lanvers-Kaminsky C, Lechtape B, Frühwald MC., *Systematic analysis of the antiproliferative effects of novel and standard anticancer agents in rhabdoid tumor cell lines*, Anticancer Drugs. 2010 Jun;21(5):514-22.
163. Higaki S, Mochizuki K, Akashi Y, Yamaha E, Katagiri S, Takahashi Y., *Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos*, J Reprod Dev. 2010 Apr;56(2):212-8. Epub 2009 Dec 9.
164. Niklas J, Noor F, Heinzle E., *Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line Hep G2*, Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Nov 1;240(3):327-36. Epub 2009 Jul 14.
165. Mackie C, Wuyts K, Haseldonckx M, Blokland S, Gysemberg P, Verhoeven I, Timmerman P, Nijssen M., *New model for intravenous drug administration and blood sampling in the awake rat, designed to increase quality and throughput for in vivo pharmacokinetic analysis*, J Pharmacol Toxicol Methods. 2005 Sep-Oct;52(2):293-301. Epub 2004 Dec 29.
166. Bhattacharya R, Rao PV, Pant SC, Kumar P, Tulsawani RK, Pathak U, Kulkarni A, Vijayaraghavan R, *Protective effects of amifostine and its analogues on sulfur mustard toxicity in vitro and in vivo*, Toxicol Appl Pharmacol. 2001 Oct 1;176(1):24-33.
167. Stahl BU, Beer DG, Weber LW, Lebofsky M, Rozman K, *Decreased hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression after 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment*:

- implications for the acute toxicity of chlorinated dibenzo-p-dioxins in the rat*, Arch Toxicol Suppl. 1992;15:151-5
168. De Buck SS, Sinha VK, Fenu LA, Nijsen MJ, Mackie CE, Gilissen RA., *Prediction of human pharmacokinetics using physiologically based modeling: a retrospective analysis of 26 clinically tested drugs*, Drug Metab Dispos. 2007 Oct;35(10):1766-80. Epub 2007 Jul 9
169. The Harvard Bioscience. *Whole Rat Catalog*. Harvard Bioscience An Ealing Division, 1983
170. Freo U, Ori C. *Effects of Anesthesia and Recovery from Ketamine Racemate and Enantiomers on Regional Cerebral Glucose Metabolism in Rats*. Anesthesiology 2004; 100(5): 1172-1178.
171. Boersma FP, Wieringa RA. *Rat intubation. A method for safe and fast intubation of the rat trachea under direct vision*. Anaesthetist 1982; 31(5): 239-40.
172. Proctor E., and Fernando AR. *Oro-endotracheal intubation in the rat*. British Journal of Anaesthesia 1973; 45(2): 139-142.
173. **Ordodi LV**, Mic AF, Mic AA, Săndesc D, Păunescu V. *A simple device for intubation of rats*. Lab Animal 2005; 34(8).
174. **Ordodi LV**, Paunescu V, Mic AA, Gabor L, Ionac M, Toma O, Săndesc D, Mic FA., *A Pressure Controlled Rat Ventilator with Electronically Preset Respirations*. Artificial Organs 2006; 30(2).
175. Dikmen Y, Eminoglu E, Salihoglu Z, and Demirogluk S. *Pulmonary mechanics during isoflurane, sevoflurane and desflurane anaesthesia*. Anaesthesia 2003; 58: 745.



## Anexa

### Programul de conducere cu calculatorul a microinstalatiei experimentale:

```
//Start of LoadLabJackUD function.
//This is the function used to dynamically load the DLL.
void LoadLabJackUD (void)
{
    //Now try and load the DLL.
    if (hDLLInstance = LoadLibrary("labjackud.dll"))
    {
        //If successfully loaded, get the address of the functions.
        m_pListAll = (tListAll)::GetProcAddress(hDLLInstance,"ListAll");
        m_pOpenLabJack =
(tOpenLabJack)::GetProcAddress(hDLLInstance,"OpenLabJack");
        m_pAddRequest =
(tAddRequest)::GetProcAddress(hDLLInstance,"AddRequest");
        m_pGo = (tGo)::GetProcAddress(hDLLInstance,"Go");
        m_pGoOne = (tGoOne)::GetProcAddress(hDLLInstance,"GoOne");
        m_peGet = (teGet)::GetProcAddress(hDLLInstance,"eGet");
        m_pePut = (tePut)::GetProcAddress(hDLLInstance,"ePut");
        m_pGetResult = (tGetResult)::GetProcAddress(hDLLInstance,"GetResult");
        m_pGetFirstResult =
(tGetFirstResult)::GetProcAddress(hDLLInstance,"GetFirstResult");
        m_pGetNextResult =
(tGetNextResult)::GetProcAddress(hDLLInstance,"GetNextResult");
        m_peAIN = (teAIN)::GetProcAddress(hDLLInstance,"eAIN");
        m_peDAC = (teDAC)::GetProcAddress(hDLLInstance,"eDAC");
        m_peDI = (teDI)::GetProcAddress(hDLLInstance,"eDI");
        m_peDO = (teDO)::GetProcAddress(hDLLInstance,"eDO");
        m_peAddGoGet =
(teAddGoGet)::GetProcAddress(hDLLInstance,"eAddGoGet");
        m_peTCConfig = (teTCConfig)::GetProcAddress(hDLLInstance,"eTCConfig");
        m_peTCValues = (teTCValues)::GetProcAddress(hDLLInstance,"eTCValues");
        m_pResetLabJack =
(tResetLabJack)::GetProcAddress(hDLLInstance,"ResetLabJack");
        m_pDoubleToStringAddress =
(tDoubleToStringAddress)::GetProcAddress(hDLLInstance,"DoubleToStringAddress
");
        m_pStringToDoubleAddress =
(tStringToDoubleAddress)::GetProcAddress(hDLLInstance,"StringToDoubleAddress
");
        m_pStringToConstant =
(tStringToConstant)::GetProcAddress(hDLLInstance,"StringToConstant");
```

```

    m_pErrorToString =
(tErrorToString)::GetProcAddress(hDLLInstance,"ErrorToString");
    m_pGetDriverVersion =
(tGetDriverVersion)::GetProcAddress(hDLLInstance,"GetDriverVersion");
    m_pTCVoltsToTemp =
(tTCVoltsToTemp)::GetProcAddress(hDLLInstance,"TCVoltsToTemp");
}
else
{
    printf("\nFailed to load DLL\n");
    getchar();
    exit(0);
}
// m_pOpenLabJack now holds a pointer to the OpenLabJack function. The
compiler
// automatically recognizes m_pOpenLabJack as a pointer to a function and
// calls the function with the parameters given. If we created another
// variable of type tOpenLabJack and simply put "pNewVar = m_pOpenLabJack",
// then the compiler might not know to call the function.
}
//End of LoadLabJackUD function.

```

```

//This is our simple error handling function that is called after every UD
//function call. This function displays the errorcode and string description
//of the error. It also has a line number input that can be used with the
//macro __LINE__ to display the line number in source code that called the
//error handler. It also has an iteration input is useful when processing
//results in a loop (getfirst/getnext).

```

```

void ErrorHandler (LJ_ERROR lngErrorcode, long lngLineNumber, long
lngIteration)

```

```

{
    char err[255];

    if (lngErrorcode != LJE_NOERROR)
    {
        m_pErrorToString(lngErrorcode,err);
        printf("Error number = %d\n",lngErrorcode);
        printf("Error string = %s\n",err);
        printf("Source line number = %d\n",lngLineNumber);
        printf("Iteration = %d\n\n",lngIteration);
        if (lngErrorcode > LJE_MIN_GROUP_ERROR)
        {
            //Quit if this is a group error.
            getchar();
            exit(0);
        }
    }
}

```

```

    }
}

main()
{
    LJ_ERROR lngErrorcode;
    long lngGetNextIteration;
    long lngIOType=0, lngChannel=0;
    double dblValue=0;
    double dblValue2=0;
    double dblValue4=0;
    float counter=0, timpelectroliza = 0;;
    double dblError=0;
    int step =0;
    int variabilatest = 0;
    LJ_HANDLE DefaultHandle=0;
    char ch;
    char b_MessageNotDisplayed = 1;

    char err[255];

#define TRUE 1
#define FALSE 0

    //Load the DLL.
    LoadLabJackUD();

    //Open the first found LabJack U3.
    lngErrorcode = m_pOpenLabJack (LJ_dtU3, LJ_ctUSB, "1", 1, &DefaultHandle);
    ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

    //Start by using the pin_configuration_reset IOType so that all
    //pin assignments are in the factory default condition.
    lngErrorcode = m_pePut (DefaultHandle, LJ_ioPIN_CONFIGURATION_RESET,
0, 0, 0);
    ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

    //Configure all ports as digital. That means we
    //will start from channel 0 and update all 16 flexible bits. We will
    //pass a value of b0000000000000000 or d0.
    lngErrorcode = m_pePut (DefaultHandle, LJ_ioPUT_ANALOG_ENABLE_PORT,
0, 0, 16);
    ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

    while (1)
    {
        lngGetNextIteration=0; //Used by the error handling function.

```

```

while ((IngErrorcode < LJE_MIN_GROUP_ERROR))
{
    //Read if any error appear FIO7.
    IngErrorcode = m_peGet(DefaultHandle, LJ_ioGET_DIGITAL_BIT, 7,
&dblError, 0);
    ErrorHandler(IngErrorcode, __LINE__, 0);

    /* A aparut o eroare? */
    if (1 == dblError)
    {
        step = 6;
    }

    switch (step)
    {
    case 0:
        {
            IngErrorcode = m_peGet(DefaultHandle, LJ_ioGET_DIGITAL_BIT, 0,
&dblValue, 0);

            /* Preluarea probei s-a terminat? */
            if (0 == dblValue)
            {
                //Clear screen
                system("cls");

                //Set port1 to high
                IngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 1, 1, 1);
                ErrorHandler(IngErrorcode, __LINE__, 0);
                //Informare ca Pompa P2 a fost activata - port2 HIGH
                step = 1;
            }
            else
            {
                system("cls");
                printf("\n");
                puts("Preluare proba - Va rog asteptati!");
            }
            break;
        }
    case 1:
        {
            IngErrorcode = m_peGet(DefaultHandle, LJ_ioGET_DIGITAL_BIT, 2,
&dblValue2, 0);

            /* Salinitatea dorita a fost atinsa */
            if (1 == dblValue2)
            {
                //Clear screen

```

```

        system("cls");

        //Oprire pompa P2(salinitatea a fost atinsa)
        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 1, 0, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        //Deschidere electrovalva EV1
        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 3, 1, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        /* Odata verificat acest port nu mai este luat in considerare */
        step = 2;
    }
    else
    {
        system("cls");
        puts("Introducere solutie NaCl 25% - Se asteapta atingerea salinitatii
dorite");
    }
    break;
}
case 2:
{
    lngErrorcode = m_peGet(DefaultHandle, LJ_ioGET_DIGITAL_BIT, 4,
&dblValue4, 0);

    /* Reactor chimic plin? */
    if (1 == dblValue4)
    {
        //Clear screen
        system("cls");

        //Inchidere electrovalva EV1
        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 3, 0, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        /* Se informeaza ca timpul pt electroloza trebuie introdus */
        step = 3;
    }
    else
    {
        system("cls");
        puts(" Salinitate dorita atinsa.\n Se realizeaza umplerea reactorului
chimic. Va rog asteptati!");
    }
    break;
}
}

```

```

case 3:
{
    if (b_MessageNotDisplayed)
    {
        puts(" Introduceți timpul de electroliza in minute ");
        //Citire timp functionare electrliza
        scanf ("%f",&timpeselectroliza);

        b_MessageNotDisplayed = FALSE;

        /* Timpul introdus este gresit? */
        if ((timpeselectroliza < 1) || (timpeselectroliza > 90))
        {
            puts("Timpul introdus este incorect!");
            b_MessageNotDisplayed = TRUE;
        }
        else
        {
            //Clear screen
            system("cls");

            //Pornire reactor- pe durata timpului setat
            lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 5, 1, 1);
            ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

            /* Convert timer from minutes to counter */
            timpeselectroliza *= 1136.96;

            step = 4;
        }
    }
    break;
}
case 4:
{
    counter++;

    /* Timpul pentru electroliza a expirat? */
    if (timpeselectroliza <= counter)
    {
        //Oprire reactor
        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 5, 0, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        //Deschidere EV2 pe durata a 4 minute
        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 6, 1, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);
    }
}

```

```

        counter = 0;

        step = 5;

        system("cls");
    }
    else
    {
        system("cls");
        puts("Electroliza in desfasurare - Va rog asteptati!");
    }
    break;
}
case 5:
{
    counter++;

    /* Timpul de 4 min pentru deschiderea valvel EV2 a expirat? */
    if (76579.44 <= counter)
    {
        // Inchidere valva EV2
        lngErrorcode = lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 6, 0, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        //Deschidere electrovalva EV1 - din nou
        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle,
LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT, 3, 1, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        /* Reluare de la pasul: Semnal4 output */
        step = 2;

        /* Resetare variabile */
        b_MessageNotDisplayed = TRUE;
        timpelectroliza = 0;
        counter = 0;
    }
    break;
}
case 6:
{
    //system("cls");
    puts("ALARMA - Verifica: PROBA INSUFICIENTA");
    puts("          : SOLUTIE NaCl25% INSUFICIENTA");
    puts("          : SALINITATE IMPOSIBIL DE ATINS");
    puts("Este necesara actiunea operatorului - comanda manuala");
}

```

```

        /* Dezactiveaza toate iesirile */
        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle, LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT,
1, 0, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle, LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT,
3, 0, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle, LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT,
5, 0, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        lngErrorcode = m_pePut(DefaultHandle, LJ_ioPUT_DIGITAL_PORT,
6, 0, 1);
        ErrorHandler(lngErrorcode, __LINE__, 0);

        /* Resetare toate variabilele folosite */
        b_MessageNotDisplayed = TRUE;
        timpelectroliza = 0;
        counter = 0;

        printf("\nApasati (i) pentru iesire\n");
        ch = getchar();
        if (ch == 'i')
        {
            /* Resetare toate variabilele folosite */
            step = 0;
            return 0;
        }

        break;
    }
}

    lngGetNextIteration++;
}

//printf("\nApasati (i) pentru iesire\n");
//ch = getchar();
if (FALSE)//(ch == 'i')
{
    /* Resetare toate variabilele folosite */
    step = 0;
    b_MessageNotDisplayed = TRUE;
    return 0;
}
}
}

```